

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391349 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.09.26

(22) Дата подачи заявки
2021.10.22

(51) Int. Cl. C07K 1/22 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 47/62 (2017.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07C 49/16 (2006.01)
C07K 1/10 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(54) СШИВАЮЩИЙ АГЕНТ ДЛЯ ПЕПТИДА И СШИТЫЙ ПЕПТИД, КОТОРЫЙ СШИВАЮТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УКАЗАННОГО СШИВАЮЩЕГО АГЕНТА

(31) 2020-186833; 2021-082739

(32) 2020.11.09; 2021.05.14

(33) JP

(86) PCT/JP2021/039054

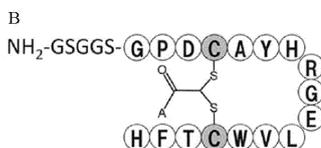
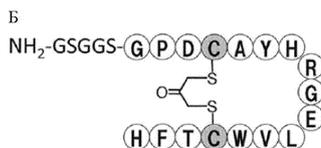
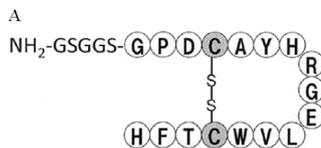
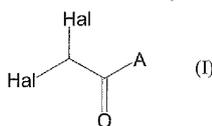
(87) WO 2022/097500 2022.05.12

(71) Заявитель:
КАГОСИМА ЮНИВЕРСИТИ (JP)

(72) Изобретатель:
Ито Юдзи, Накаяма Хироси, Рафик
Мд Абдур (JP)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении описан сшивающий агент для белка или пептида, представленный следующей формулой (I). В формуле А означает атом водорода, C₁-C₆ алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, или фенильную группу.



A1

202391349

202391349

A1

СШИВАЮЩИЙ АГЕНТ ДЛЯ ПЕПТИДА И СШИТЫЙ ПЕПТИД, КОТОРЫЙ
СШИВАЮТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УКАЗАННОГО СШИВАЮЩЕГО АГЕНТА

5

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способу получения сшитого пептида и т.п.

Предпосылки создания настоящего изобретения

10 Белковые фармацевтические препараты и пептидные фармацевтические препараты представляют собой один из биофармацевтических продуктов, которым в настоящее время уделяют наибольшее внимание. Прежде всего, фармацевтические препараты на основе антител, в основном антител IgG, и фармацевтические препараты на основе пептидов в последнее время используют
15 в области фармацевтики и приобретают все большее значение для промышленных и фармацевтических областей.

До настоящего времени авторы настоящего изобретения сообщали о возможности очистки IgG с использованием колонки, на которой иммобилизован пептидный лиганд, содержащий пептид IgG, состоящий из 17 остатков,
20 циклизированный дисульфидной связью и содержащий указанную последовательность, для получения конструкта системы, альтернативной колонке с белком А, которую используют для очистки фармацевтического продукта антитела (патентная литература 1). Однако такая колонка с пептидом IgG характеризуется низкой устойчивостью в щелочной среде дисульфидной
25 связи, присутствующей в пептиде, и, таким образом, ее нельзя использовать повторно. Авторы настоящего изобретения многократно исследовали растворы для повышения устойчивости в щелочной среде для решения проблемы слабой устойчивости дисульфидной связи в пептиде или белке при промывке в щелочных условиях, и в результате был выявлен IgG-связывающий пептид со
30 значительно повышенной устойчивостью при промывке в щелочной среде за счет сшивки между тиольными группами в остатке цистеина в пептиде или белке с использованием 1,3-дихлорацетона (патентная литература 2). Однако такая сшивка, хотя и придает значительную устойчивость к щелочам, характеризуется новой проблемой, которая заключается в низком сродстве ($K_d = 4,9 \text{ мкМ}$) к IgG

и потере функциональности. Затем сшитую структуру повторно конструировали и, таким образом, предпринимали попытку улучшить ее, чтобы обеспечить сохранение устойчивости к щелочам без какого-либо значительного ухудшения функциональности, в отличие от сшивки с использованием дихлорацетона, и в результате было установлено, что одна тиольная группа в составе дисульфида заменена на метильную группу для превращения связи SS в связь $\text{CH}_3\text{-S}$, при этом образуется сшитая структура, близкая к практической, в которой сшитая структура, хотя все еще и характеризуется немного низким сродством, значением K_d 340 нМ и устойчивостью в щелочных средах (патентная литература 3). Однако такой способ включает однократное хлорирование гомосерина в пептиде и последующее взаимодействие полученного продукта с тиольной группой цистеина и, таким образом, характеризуется получением продукта с низким выходом.

Список цитированной литературы

15 Патентная литература

Патентная литература 1: Международная публикация № WO 2013/027796.

Патентная литература 2: Международная публикация № WO 2018/092867.

Патентная литература 3: международная публикация № WO 2020/075670.

Краткое описание настоящего изобретения

20 Техническая задача

Цель настоящего изобретения заключается в разработке способа получения сшитой структуры, которая обладает высокой устойчивостью в щелочных средах и сохраняет функциональность без какого-либо значительного ухудшения сродства при повторном конструировании сшитой структуры.

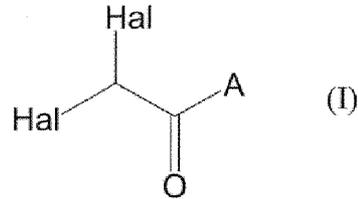
25 Решение проблемы

Авторы изобретения дополнительно изучили усовершенствование структур сшивающих агентов, и в результате был использован 1,1-дихлорацетон и его производное, которые обычно обладают высокой реакционной способностью и их не используют в качестве сшивающего агента в водном растворе, и таким образом получили IgG-связывающий пептид, сохраняющий устойчивую в щелочной среде и высокое сродство к IgG ($K_d=45$ нМ). В данном раскрытии предлагается способ сшивки, который можно использовать на практике для фармацевтических продуктов с высоким выходом и который может

позволить сохранить функцию белка или пептида с проявлением устойчивости в щелочных средах.

Сшивающий агент для белка или пептида согласно первому объекту настоящего изобретения представлен на следующей формуле (I).

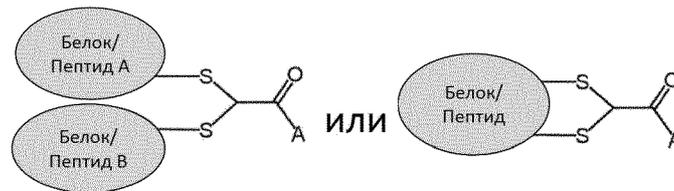
5 [Формула 1]



В формуле, А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, или фенильную группу.

10 Способ получения сшитого белка или пептида согласно второму объекту настоящего изобретения представляет собой способ получения сшитого белка или пептида, где по меньшей мере две тиольные группы в одном или отдельном белке(ах) или пептиде(ах) являются связанными, как представлено на следующей формуле.

15 [Формула 2]

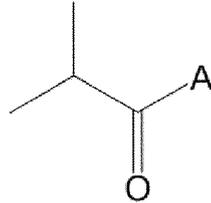


20 где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, и белок/пептид А и белок/пептид В необязательно являются одинаковыми или различными,

способ, включающий

взаимодействие белка или пептида со сшивающим агентом в соответствии с первым объектом настоящего изобретения для связывания двух тиольных групп через следующую группу:

[Формула 3]



5

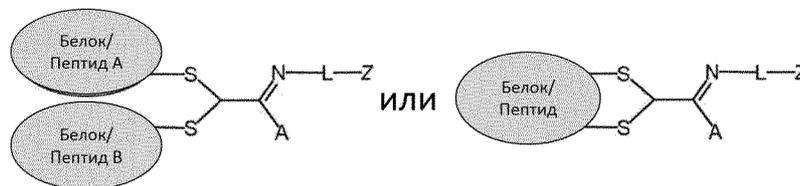
где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу.

Белок или пептид может представлять собой белок или пептид, в котором все или часть по меньшей мере двух тиольных групп образуют дисульфидную связь, и способ может включать восстановление дисульфидной связи с образованием, таким образом, двух тиольных групп.

Способ улучшения устойчивости белка или пептида в щелочных средах согласно третьему объекту настоящего изобретения включает связывание тиольных групп в белке или пептиде, при этом получают сшитый белок или пептид способом согласно второму объекту настоящего изобретения.

Способ получения белка или пептида согласно четвертому объекту настоящего изобретения представляет собой способ получения белка или пептида, связанного с реакционноспособной функциональной группой, которая представлена на следующей формуле.

[Формула 4]



где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, белок/пептид

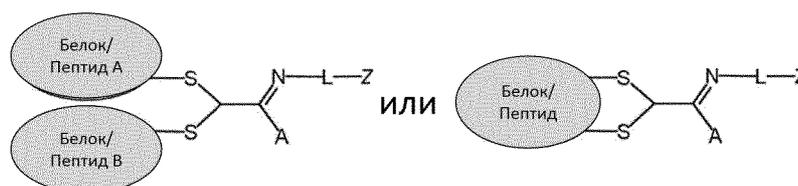
25

A и белок/пептид B могут являться одинаковыми или различными, L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу способ, включающий:

5 получение сшитого белка или пептида способом согласно второму объекту настоящего изобретения, и взаимодействие полученного сшитого белка или пептида с $\text{NH}_2\text{-L-Z}$ (L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу) для введения реакционноспособной функциональной группы в сшитую часть сшитого белка или пептида.

10 Способ получения белка или пептида согласно пятому объекту настоящего изобретения представляет собой способ получения белка(ов) или пептида(ов), связанных с реакционноспособной функциональной группой, которая представлена на следующей формуле:

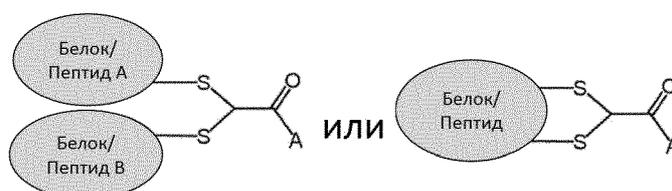
[Формула 5]



15 где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, белок/пептид А и белок/пептид В могут являться одинаковыми или различными, L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу, способ, включающий:

20 взаимодействие сшитого белка или пептида, представленных на следующей формуле:

25 [Формула 6]

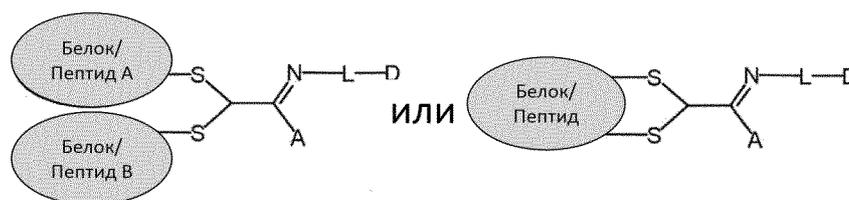


где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, и
5 белок/пептид А и белок/пептид В необязательно являются одинаковыми или различными,

и NH₂-L-Z (L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу) для введения реакционноспособной функциональной группы в шитую часть сшитого белка или пептида.

10 Способ получения комплекса белка или пептида и лекарственного средства согласно шестому объекту настоящего изобретения представляет собой способ получения комплекса белка или пептида и лекарственного средства, представленного на следующей формуле:

[Формула 7]



15 где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, белок/пептид А и белок/пептид В необязательно являются одинаковыми или различными, L означает линкер, а D означает лекарственное средство;

способ, включающий:

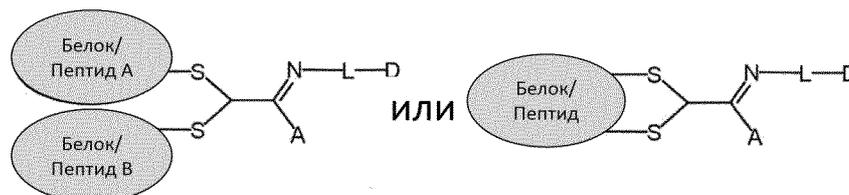
20 получение белка или пептида, связанного с реакционноспособной функциональной группой, способом согласно четвертому или пятому объекту настоящего изобретения, и

25 взаимодействие полученного белка или пептида, связанных с реакционноспособной функциональной группой, и лекарственного средства, содержащего функциональную группу, которая взаимодействует с реакционноспособной функциональной группой, при этом осуществляют

связывание лекарственного средства со сшитой частью сшитого белка или пептида.

Способ получения комплекса белка или пептида и лекарственного средства согласно седьмому объекту настоящего изобретения представляет собой способ получения комплекса белка или пептида и лекарственного средства, при этом комплекс представлен на следующей формуле:

[Формула 8]

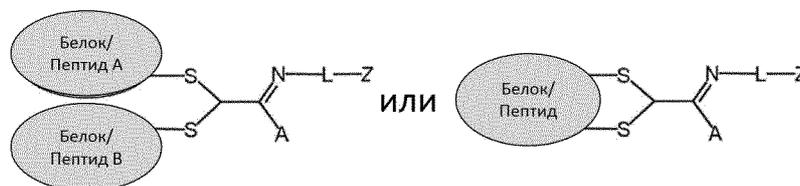


где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, белок/пептид А и белок/пептид В необязательно являются одинаковыми или различными, L означает линкер, а D означает лекарственное средство;

способ, включающий:

взаимодействие белка или пептида, связанных с реакционноспособной функциональной группой, представленных на следующей формуле:

[Формула 9]



где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, белок/пептид А и белок/пептид В могут являться одинаковыми или различными, L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу

и лекарственного средства с функциональной группой, которая взаимодействует с реакционноспособной функциональной группой, при этом осуществляют связывание лекарственного средства со сшитой частью сшитого белка или пептида.

5 В способах согласно четвертому-седьмому объектам настоящего изобретения линкер может содержать фрагмент, который расщепляется под действием протеолитического фермента.

10 В способах согласно второму-седьмому объектам настоящего изобретения белок или пептид может представлять собой пептид, содержащий 5-50 аминокислот.

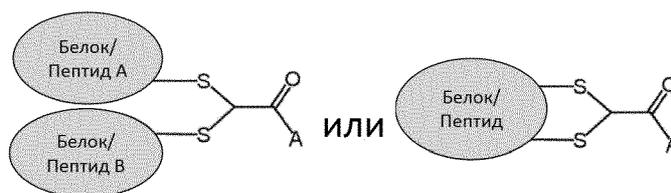
В способах согласно четвертовторому-седьмому объектам настоящего изобретения тиольные группы для сшивки могут присутствовать в одном белке или пептиде.

15 В способах согласно второму-седьмому объектам настоящего изобретения белок или пептид может представлять собой Fc-связывающий пептид.

В способах согласно второму-седьмому объектам настоящего изобретения тиольные группы для сшивки могут присутствовать в отдельном белке или пептиде.

20 Сшитый белок или пептид согласно восьмому объекту настоящего изобретения представлен на следующей формуле.

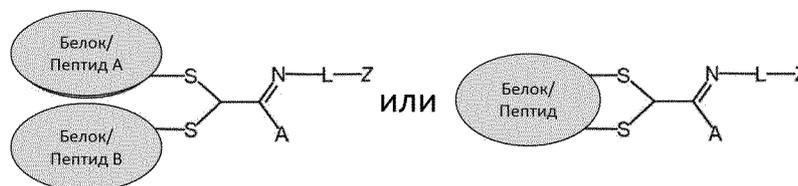
[Формула 10]



25 В формуле, А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, и белок/пептид А и белок/пептид В могут являться одинаковыми или различными].

Белок или пептид, связанный с реакционноспособной функциональной группой согласно девятому объекту настоящего изобретения, представлены на следующей формуле:

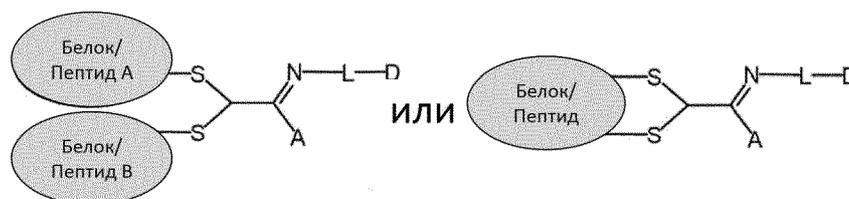
[Формула 11]



В формуле, А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, белок/пептид А и белок/пептид В могут являться одинаковыми или различными, L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу].

Комплекс белка или пептида и лекарственного средства согласно десятому объекту настоящего изобретения представлен на следующей формуле:

[Формула 12]



где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, белок/пептид А и белок/пептид В могут являться одинаковыми или различными, L означает линкер, а D означает лекарственное средство.

В белках или пептидах согласно восьмому и девятому объектам настоящего изобретения и в составе комплекса согласно десятому объекту

настоящего изобретения линкер может содержать фрагмент, который расщепляется под действием протеолитического фермента.

В белках или пептидах согласно восьмому и девятому объектам настоящего изобретения и в составе комплекса согласно десятому объекту настоящего изобретения белок или пептид может представлять собой пептид, содержащий 5-50 аминокислот.

В белках или пептидах согласно восьмому и девятому объектам настоящего изобретения и в составе комплекса согласно десятому объекту настоящего изобретения тиольная группа для сшивки могут присутствовать в одном белке или пептиде.

В белках или пептидах согласно восьмому и девятому объектам настоящего изобретения и в составе комплекса согласно десятому объекту настоящего изобретения белок или пептид может представлять собой Fc-связывающий пептид.

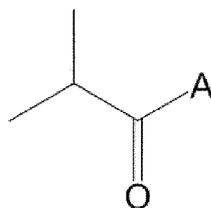
Аминогруппа в составе остатка лизина, остатка цистеина, остатка аспарагиновой кислоты, остатка глутаминовой кислоты, 2-аминосуBERиновой кислоты, диаминопропионовой кислоты, остатка аргинина или аминокислоты в положении 1 в Fc-связывающем пептиде может являться модифицированной DSG (дисукцинимидилглутаратом), DSS (дисукцинимидилсубератом), DMA (диметиладипимидата дигидрохлоридом), DMP (диметилпимелимидата дигидрохлоридом), DMS (диметилсуберимидата дигидрохлоридом), DTBP (диметил-3,3'-дитиобиспропионимидата дигидрохлоридом) или DSP (дитиобис(сукцинимидилпропионовой кислотой)).

В белках или пептидах согласно восьмому и девятому объектам настоящего изобретения и в составе комплекса согласно десятому объекту настоящего изобретения тиольная группа для сшивки может присутствовать в отдельном белке или пептиде.

Способ получения молекулы, содержащей IgG-Fc область, связанной со сшитым Fc-связывающим пептидом(ами) согласно одиннадцатому объекту настоящего изобретения, включает контактирование молекулы, содержащей IgG-Fc область, и белка или пептида согласно восьмому или девятому объектам настоящего изобретения или комплекса согласно десятому объекту настоящего изобретения.

Способ получения молекулы, содержащей IgG-Fc область, где Fc пептид связан согласно двенадцатому объекту настоящего изобретения, включает взаимодействие Fc-связывающего пептида, связанного с молекулой, содержащей IgG-Fc область, и сшивающего агента согласно первому объекту настоящего изобретения для связывания двух тиольных групп в Fc-связывающем пептиде через следующую группу:

[Формула 13]

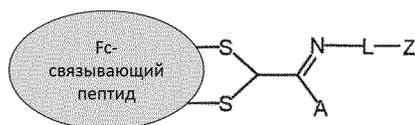


где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу.

Способ получения молекулы, содержащей IgG-Fc область, связанной с Fc-связывающим пептидом, содержащим реакционноспособную функциональную группу Z,

где Fc-связывающий пептид представлен на следующей формуле согласно тринадцатому объекту настоящего изобретения:

[Формула 14]

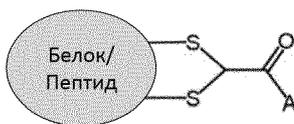


где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу,

включает

взаимодействие молекулы, содержащей IgG-Fc область, связанной со сшитым Fc-связывающим пептидом, представленным на следующей формуле:

[Формула 15]



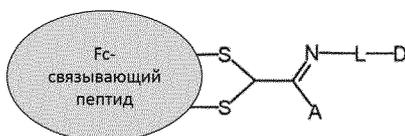
5 где A означает атом водорода, C1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или C1-6 алкильную группу,

и NH₂-L-Z (L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу), для введения реакционноспособной функциональной группы в шитую часть сшитого Fc-связывающего пептида.

10 Способ получения молекулы, содержащей IgG-Fc область, связанной с Fc-связывающим пептидом, содержащим лекарственное средство D,

где Fc-связывающий пептид представлен на следующей формуле согласно четырнадцатому объекту настоящего изобретения,

[Формула 16]



15

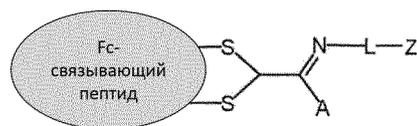
включает

взаимодействие молекулы, содержащей IgG-Fc область, связанной с Fc-связывающим пептидом, содержащим реакционноспособную функциональную

20 группу Z,

где Fc-связывающий пептид представлен на следующей формуле:

[Формула 17]



25

где A означает атом водорода, C1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или

C1-6 алкильную группу, L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу,

и лекарственного средства с функциональной группой, которая взаимодействует с реакционноспособной функциональной группой Z, для связывания лекарственного средства со сшитой частью сшитого белка или пептида.

Каждый из способов согласно одиннадцатому-четырнадцатому объектам настоящего изобретения может дополнительно включать ковалентное связывание Fc-связывающего пептида и молекулы, содержащей IgG-Fc область.

Молекула, содержащая IgG-Fc область, согласно пятнадцатому объекту настоящего изобретения представляет собой молекулу, с которой связаны белки или пептиды согласно восьмому и девятому объектам настоящего изобретения или комплекс согласно десятому объекту настоящего изобретения.

В молекуле согласно пятнадцатому объекту настоящего изобретения Fc-связывающий пептид и молекула, содержащая IgG-Fc область, могут являться ковалентно связанными.

Носителем согласно шестнадцатому объекту настоящего изобретения является носитель, к которому присоединен пептид согласно восьмому или девятому объекту настоящего изобретения.

Способ очистки молекулы, содержащей IgG-Fc область, согласно семнадцатому объекту настоящего изобретения включает

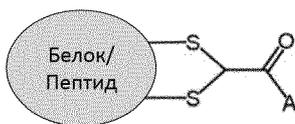
контактирование жидкости, содержащей молекулу, содержащую IgG-Fc область, с носителем согласно шестнадцатому объекту настоящего изобретения, удаление компонента, который не связывается с носителем, при

промывке, и

элюирование компонента, связанного с носителем, для извлечения молекулы, содержащей IgG-Fc область.

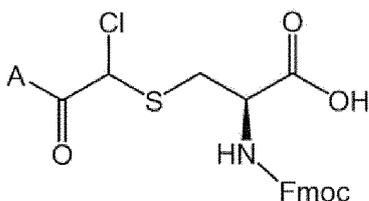
Способ получения сшитого белка или пептида согласно восемнадцатому объекту настоящего изобретения представляет собой способ получения сшитого белка или пептида, в котором по меньшей мере две тиольные группы связаны, где сшитый белок или пептид представлен на следующей формуле:

[Формула 18]



где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно
5 замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или
С1-6 алкильную группу, и белок/пептид означает белок или пептид,
способ, включающий:
синтез белка или пептида методом Fmoc, и
использование в синтезе соединения, представленного на следующей
10 формуле, вместо по меньшей мере одного цистеинового остатка.

[Формула 19]



Способ получения белка или пептида согласно девятнадцатому объекту
настоящего изобретения представляет собой способ получения белка или
15 пептида, связанного с реакционноспособной функциональной группой,
представленного на следующей формуле:

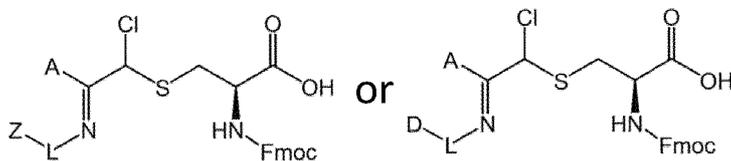
[Формула 20]



20 где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно
замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или
С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, L означает
линкер, Z означает реакционноспособную функциональную группу, а D означает
лекарственное средство,
25 способ, включающий:

синтез белка или пептида методом Fmoc, и использование в синтезе соединения, представленного на следующей формуле, вместо по меньшей мере одного цистеинового остатка.

[Формула 21]



5

Преимущества настоящего изобретения

Связь SH-SH в аминокислоте, полученной способом по настоящему изобретению, может образовывать сшитую структуру с высоким выходом. Связь обладает превосходной устойчивостью в щелочных средах и, таким образом, не расщепляется даже при воздействии щелочных условий. Соответственно, можно получить белок и пептид, обладающие высокой устойчивостью в щелочных условиях, и их можно использовать в качестве белка и пептида, которые можно использовать или промывать в щелочных условиях. Кроме того, такой белок и пептид сохраняют структуры, исходно сформированные после сшивки, и также свои функции, и, таким образом, их можно использовать для стабилизации различных пептидов и белков.

10

15

Краткое описание фигур

На фиг. 1 схематически представлена внутримолекулярная связь SS, на фиг. 1A - SS-связь в составе природного белка или пептида, на фиг. 1B – связь, сшитая при использовании стандартной методики, и на фиг. 1C – связь, сшитая, как описано в настоящем изобретении,

20

Фиг. 2 представлен график, на котором указаны результаты оценки DBC (динамической связывающей способности) на колонке с иммобилизованным производным, сшитым 1,1-дихлорацетоном пептидом, на вертикальной оси указано поглощение при 280 нм, на горизонтальной оси указано время элюирования, пунктирной линией обозначена точка проскока при 10%, сплошной линией обозначены результаты промывки щелочью от одного до 5 раз (точечной пунктирной линией обозначено большее количество процедур промывки), а сплошной линией обозначены результаты промывки щелочью от 10 до 30 раз (темной линией обозначено большее количество процедур промывки).

25

30

На фиг. 3 представлен график, на котором указано изменение DBC колонки с иммобилизованным пептидом при промывке щелочью, и на вертикальной оси указано изменение (%), а на горизонтальной оси указано количество процедур промывки.

5 На фиг. 4 представлена схема сшитого пептида по настоящему изобретению.

10 На фиг. 5 приведены диаграммы, представляющие результаты анализа до реакции сшивки и после реакции сшивки окситоцина, как описано в примере 11, с использованием методов жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ЖХ-МС), и на фиг. А и В указаны диаграммы, соответственно представляющие хроматограммы элюирования окисленной формы окситоцина SS до реакции сшивки и продукта реакции после реакции сшивки.

15 На фиг. 6 приведены диаграммы, представляющие результаты анализа до реакции сшивки и после реакции сшивки вазопрессина, как описано в примере 12, с использованием метода ЖХ-МС, и на фиг. А и В указаны диаграммы, соответственно представляющие хроматограммы элюирования окисленной формы вазопрессина SS до реакции сшивки и продукта реакции после реакции сшивки.

20 На фиг. 7 приведены диаграммы, представляющие результаты анализа окисленной формы SS окситоцина, подвергнутой воздействию α -химотрипсина, как описано в примере 13, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (офВЭЖХ).

25 На фиг. 8 приведены диаграммы, представляющие результаты анализа восстановленной SH-формы окситоцина, подвергнутой воздействию α -химотрипсина, как описано в примере 13, с использованием офВЭЖХ.

На фиг. 9 приведены диаграммы, представляющие результаты анализа продукта реакции формы, сшитой 2,2-дихлорацетофеноном, подвергнутой воздействию α -химотрипсина, как описано в примере 13, с использованием офВЭЖХ, и

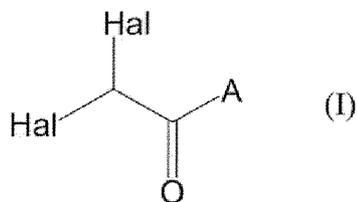
30 На фиг. 10 приведены диаграммы, представляющие степень изменения по отношению к каждому типу молекул после добавления α -химотрипсина, как описано в примере 13.

Описание вариантов осуществления настоящего изобретения

Сшивающий агент

Сшивающий агент для сшивки белка или пептида в одном объекте представлен на следующей формуле (I).

5 [Формула 22]



10 В формуле, Hal означает атом галогена, два атома галогена необязательно являются одинаковыми или различными, и A означает атом водорода, C1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, или фенильную группу.

15 Термин «алкильная группа», использованный в данном контексте, означает линейную, разветвленную или циклическую насыщенную углеводородную группу. C означает число атомов углерода, а термин «C1-6 алкильная группа» означает алкильную группу, содержащую от 1 до 6 атомов углерода. Примеры алкильной группы включают метильную группу, этильную группу, н-пропильную группу, изопропильную группу, н-бутильную группу, втор-бутильную группу, трет-бутильную группу, изобутильную группу, пентильную группу, изопентильную группу, 2,3-диметилпропильную группу, гексильную группу и циклогексильную группу.

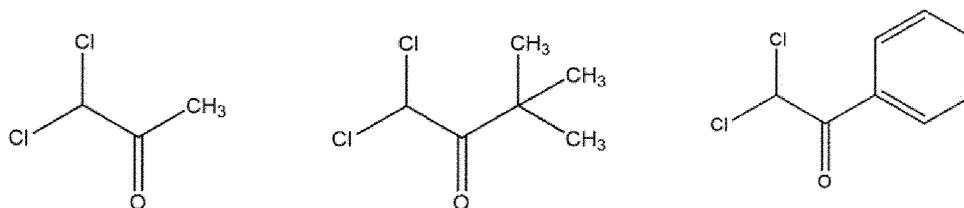
20 Количество заместителей в C1-6 алкильной группе в составе группы A составляет от 1 до 10, от 1 до 8, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, 3, 2 и/или 1, и, например, типичным является триптофан.

25 Термин «атом галогена» означает атом фтора, атом хлора, атом брома и атом йода, предпочтительно атом фтора, атом хлора и атом брома, более предпочтительно атом фтора или атом хлора.

Предпочтительно два атома галогена представляют собой одни и тот же атом галогена, и оба могут являться, например, атомами фтора, атомами хлора или атомами брома.

30 Примеры сшивающего агента включают 1,1-дихлорацетон, 1,1-дихлорпинаколин и 2,2-дихлорацетофенон.

[Формула 23]



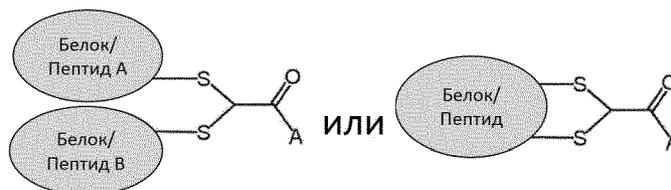
Способ синтеза сшивающего агента

Если А означает алкильную цепь, дихлорирование можно проводить методом синтеза, как описано в работе Gallucci и др. (Gallucci R.R., Going R., Journal of Organic Chemistry, т. 46 (12), сс. 2532-2538 (1981)). С другой стороны, если А означает фенил, дихлорирование можно осуществить методом синтеза, как описано в статье Zhang и др. (Shao-Lin Zhang, Zheng Yang, Xiaohui Hu, Kin Yip Tam, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, т. 28(21) сс. 3441-3445 (2018)).

Способ получения сшитого белка или пептида

В одном объекте способ получения сшитого белка или пептида представляет собой способ получения сшитого белка или пептида, в котором по меньшей мере две тиольные группы в одном или отдельном белке или пептиде образуют связь, причем сшитый белок или пептид представлен на следующей формуле:

[Формула 24]

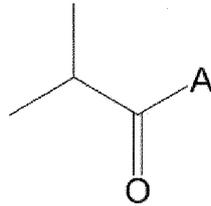


где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, и белок/пептид А и белок/пептид В необязательно являются одинаковыми или различными,

способ, включающий:

взаимодействие белка или пептида со сшивающим агентом согласно настоящему варианту осуществления для совместного связывания двух тиольных групп через следующую группу:

[Формула 25]

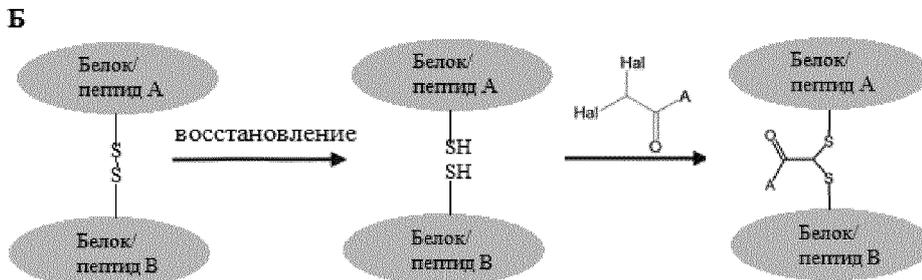
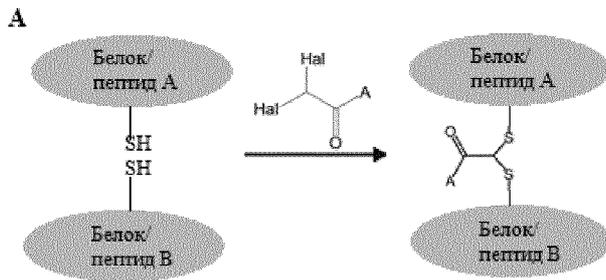


5

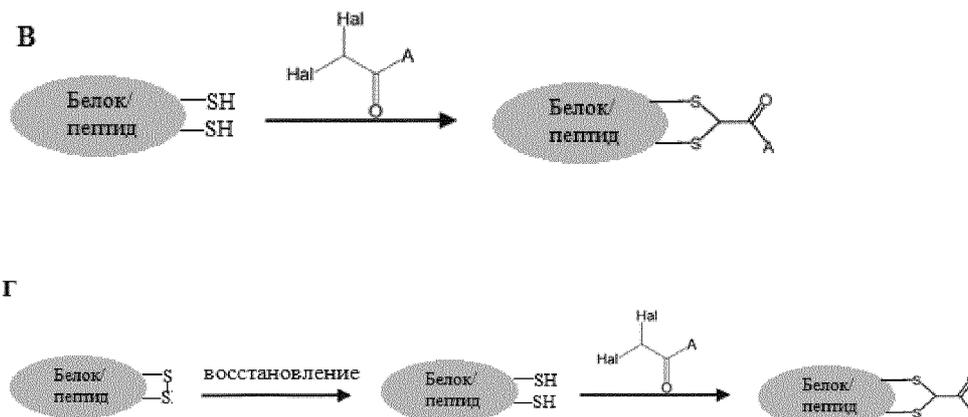
где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу.

Способ получения сшитого белка может быть представлен, например, на следующей схеме реакции.

[Формула 26]



15



5 Реакция сшивки между сшивающим агентом и тиольными группами можно осуществлять при добавлении сшивающего агента, растворенного в ацетонитриле, в раствор белка или пептида, где SH-группа образуется в результате расщепления дисульфидной связи при добавлении TCEP-HCl, при необходимости растворенного в буферном растворе, таком как PBS, и при
10 восстановлении при перемешивании при комнатной температуре в течение от 30 мин до 1 сут, с последующим перемешиванием смеси при комнатной температуре в течение от 30 мин до 1 сут. Реакционный раствор при необходимости можно очистить с использованием ВЭЖХ или т.п. В белок или пептид, представляющий собой исходный материал, можно, при необходимости,
15 вводить защитную группу Fmoc, и в этом случае после реакции добавляют основание, такое как пиперидин, для удаления Fmoc-защитной группы в белке или пептиде. Реакционный раствор при необходимости можно дополнительно очистить с использованием ВЭЖХ (колонка с обращенной фазой C18).
20 Образование сшитого белка или пептида можно подтвердить при определении молекулярной массы, например, с использованием анализа ЖХ-МС.

 Сшивающий агент согласно данному варианту осуществления может обеспечивать сшивку SH-групп, присутствующих в двух различных белках или пептидах, и в этом случае такие два белка или пептида вступают в реакцию со сшивающим агентом и, таким образом, связываются (А). Такие две молекулы
25 необязательно представляют собой одинаковые или различные типы молекул. В другом варианте, данный способ сшивки может включать сшивку двух SH-групп, присутствующих в одной молекуле, и в этом случае для сшивки один белок или пептид вводят в реакцию со сшивающим агентом (С).

Сшивающий агент в данном контексте обеспечивает сшивку двух тиольных групп. «Тиольная группа» или «группа SH» обычно представляет собой производное цистеинового остатка, содержащегося в белке или пептиде, и может представлять собой группу, введенную искусственно, например, с использованием искусственной аминокислоты. Две тиольные группы, находящиеся в природном состоянии или в состоянии до сшивки, могут образовывать или не образовывать дисульфидную связь.

При образовании двумя тиольными группами, которые находятся в природном состоянии или в состоянии до сшивки, дисульфидной связи, для образования тиольных групп перед сшивкой (B и D) можно включить стадию восстановления дисульфидной связи. Например, дисульфидную связь можно восстановить, с использованием, например, восстанавливающего агента, выпускаемого фирмами для дисульфида белка, такого как трис(2-карбозетокси)фосфин (ТСЕР), его гидрохлорид, дитиоэтанол (ДТТ), 2-меркаптоэтанол и гидрохлорид цистеина (Cys-HCl). Две тиольные группы могут являться тиольными группами, присутствующими в цистеиновом остатке, содержащемся в одном белке или пептиде, или могут представлять собой тиольные группы отдельных белков или пептидов (включая белки, пептиды и комбинацию белка и пептида). При нахождении тиольных групп, образующих дисульфидную связь в отдельном белке или пептиде, в сшитом состоянии, структура после сшивания предпочтительно обеспечивает стерическую структуру, аналогичную структуре дисульфидной связи.

Сшиваемый белок или пептид содержит по меньшей мере две SH-группы в случае внутримолекулярной сшивки или по меньшей мере одну SH-группу в случае межмолекулярной сшивки. Белок или пептид может содержать, например, одну или более (например, от 1 до 10, от 2 до 8, от 4 до 6, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) дисульфидных связей в молекуле или между молекулами. Например, белок может представлять собой белок с молекулярной массой 500 Да или более, 1000 Да или более, 2000 Да или более и/или 500000 Да или менее, 200000 Да или менее или 100000 Да или менее. Например, белок может представлять собой фермент, гликопротеин (эритропоэтин и т.п.), цитокин, токсин, адъювант, структурный белок, антитело, Fc-гибридный белок, фрагмент антитела (F(ab')₂, Fab', Fab, Fab₃, одноцепочечный Fv(scFv), (тандемный) биспецифический одноцепочечный Fv(sc(Fv)₂), одноцепочечное тритело, нанотело, двухвалентное

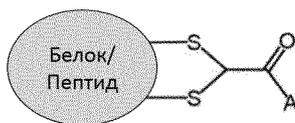
VНН, пятиявалентное VНН, минитело, (двухцепочечное) диатело, тандемное дитело, биспецифическое тритело, биспецифическое битело, молекула перенаправленного действия с двойной аффинностью (DART), триантитело (или тритело), тетратело (или $[\text{sc}(\text{Fv})_2]_2$), или $(\text{scFv-SA})_4$ Fv с дисульфидной связью, компактный IgG, тяжелая цепь антитела или его полимер). Пептид может представлять собой, например, пептид, содержащий от 5 до 5000 аминокислот, от 5 до 1000 аминокислот, от 5 до 500 аминокислот, от 5 до 100 аминокислот, от 5 до 50 аминокислот или от 10 до 40 аминокислот. Пептид может являться циклическим или линейным. Примеры пептида включают вакцину, микроантитело и антибактериальный пептид. В данном контексте белок и пептид, каждый из которых содержит Fc-область антитела, называют «антителом или т.п.».

В ходе осуществления способа сшивки можно получать отдельную или одинаковую сшитую структуру или много сшитых структур. Можно сшивать множество белков или пептидов, и, таким образом, можно сшить одни и те же или различные три или более белков и/или пептидов. Такую сшивку можно осуществлять с использованием комбинации внутримолекулярной сшивки и межмолекулярной сшивки и, например, можно осуществлять с использованием двух видов сшивки, внутримолекулярной сшивки в Fc-связывающем пептиде, описанном ниже, и межмолекулярной сшивки между пептидом и Fc-областью антитела.

Способ получения сшитого белка или пептида методом пептидного синтеза

В другом варианте, способ сшивки согласно другому объекту представляет собой способ получения сшитого белка или пептида, в котором связаны по меньшей мере две тиольные группы в белке или пептиде, причем сшитый белок или пептид представлен на следующей формуле:

[Формула 27]

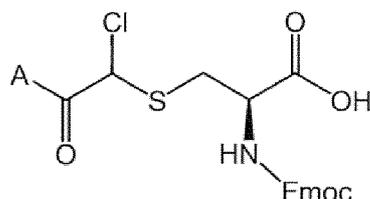


где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, а белок/пептид означает белок или пептид,

способ, включающий:

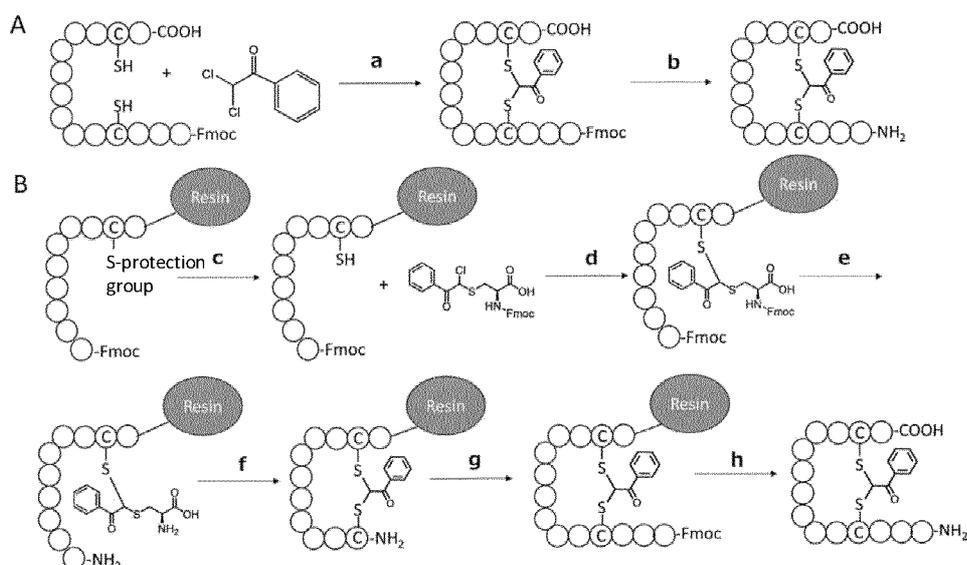
- 5 синтез белка или пептида методом Fmoc, и
использование в синтезе соединения, представленного на следующей формуле, вместо по меньшей мере одного цистеинового остатка.

[Формула 28]



- 10 Более подробно, настоящий способ включает синтез пептида, содержащего два цистеиновых остатка, которые предназначены для сшивки, с С-конца, на носителе, таком как смола для синтеза пептидов, согласно методу Fmoc. Первый Cys связывают с использованием стандартного Cys (при необходимости, SH-группу необязательно защищают) и подвергают синтезу до
- 15 предшествующей аминокислоты оставшегося другого Cys согласно стандартному методу Fmoc. При наличии защитной группы в остатке Cys, который содержится в синтезируемом пептиде, то такую защитную группу удаляют, а затем Fmoc-цистеин (пример: Fmoc-хлорацетофеноилцистеин), где производное 1,1-дихлорацетона (например, 1,1-дихлорацетон, 1, 1-
- 20 дихлорпинаколин или 2,2-дихлорацетофенон) связывают и присоединяют к SH-группе (стадия d на схеме B). Защитную группу Fmoc удаляют (стадия e на схеме B), и соединяют α-аминогруппу на N-конце полученного пептида и α-карбоксыльную группу со стороны ацетофеноилцистеина (стадия f на схеме B), и, таким образом, цистеин, в составе которого производное 1,1-дихлорацетона
- 25 связано с SH-группой, оказывается связанным с пептидной цепью. Оставшуюся аминокислоту синтезируют при связывании согласно методу Fmoc (стадия g на схеме B), и, таким образом, сшивка пептидной цепи завершается.

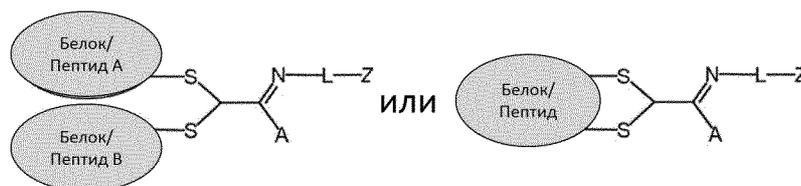
[Формула 29]



Способ введения реакционноспособной функциональной группы

5 Реакционноспособную функциональную группу можно дополнительно вводить в сшивающий агент, полученный данным способом. Соответственно, способ получения белка или пептида в одном объекте представляет собой способ получения белка или пептида, в котором реакционноспособная функциональная группа является связанной, при этом белок или пептид представлен на следующей формуле:

10 [Формула 30]

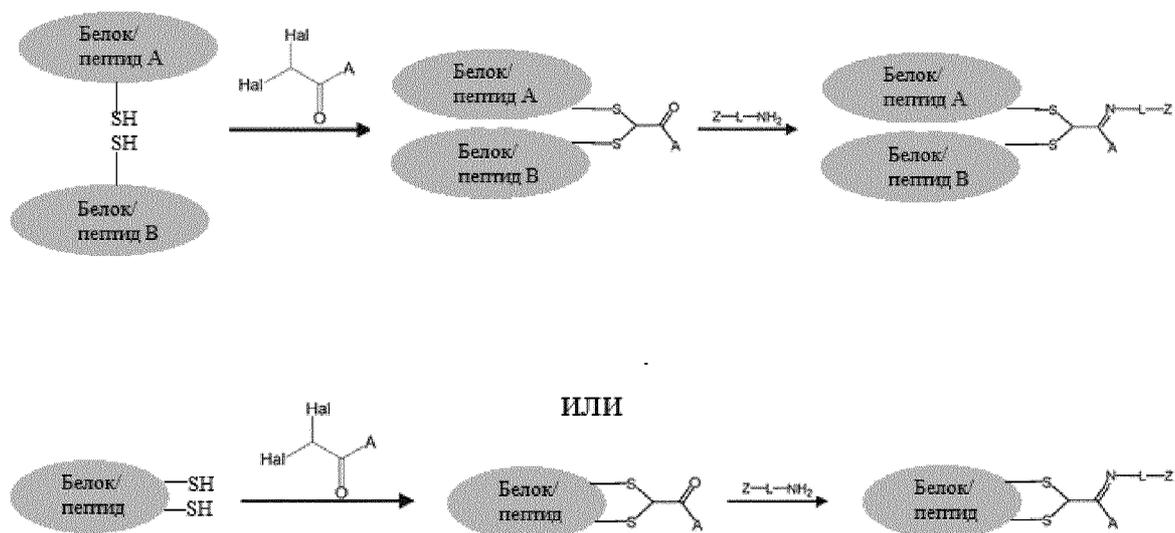


15 где A означает атом водорода, C1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или C1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, белок/пептид A и белок/пептид B необязательно являются одинаковыми или различными, L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу, способ, включающий:

получение сшитого белка или пептида указанным способом, и

взаимодействие полученного сшитого белка или пептида с $\text{NH}_2\text{-L-Z}$ (L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу) для введения таким образом реакционноспособной функциональной группы в сшитую часть сшитого белка или пептида.

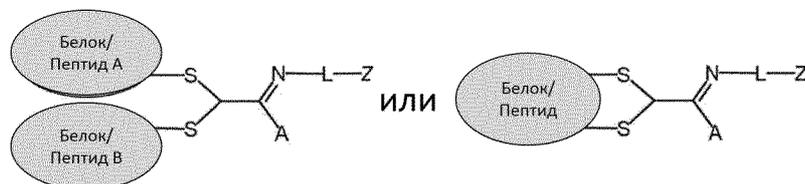
5 [Формула 31]



10 В другом варианте, в другом объекте способ получения белка или пептида, в котором реакционноспособная функциональная группа является связанной, можно осуществлять с использованием сшитого вещества. Соответственно, в другом объекте способ может представлять собой способ получения белка или пептида, в котором реакционноспособная функциональная

15 группа является связанной:

[Формула 32]



где A означает атом водорода, C1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или C1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, белок/пептид

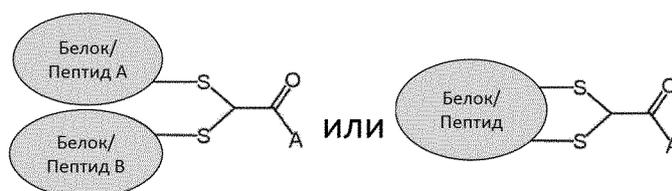
20

A и белок/пептид B необязательно являются одинаковыми или различными, L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу, способ, включающий:

взаимодействие сшитого белка или пептида, представленного на

5 следующей формуле:

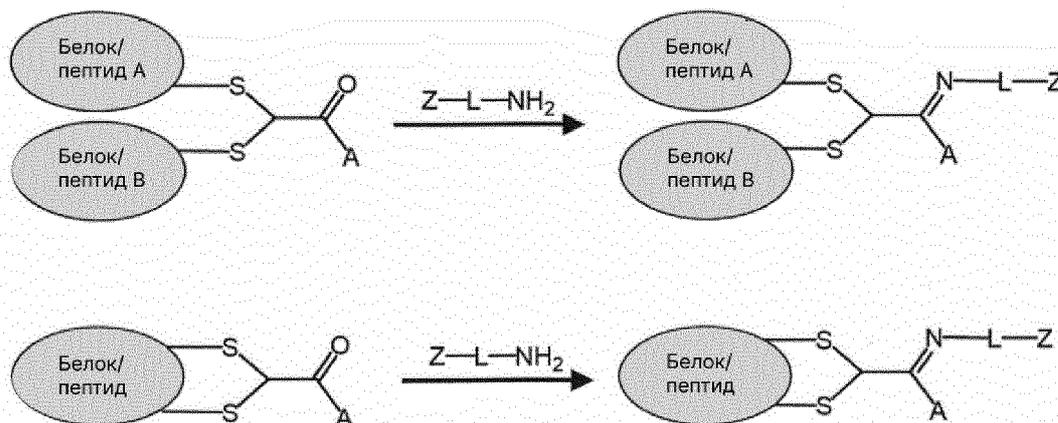
[Формула 33]



где A означает атом водорода, C1-6 алкильную группу, необязательно
10 замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или
C1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, и
белок/пептид A и белок/пептид B необязательно являются одинаковыми или
различными,

и NH₂-L-Z (L означает линкер, а Z означает реакционноспособную
15 функциональную группу) для введения реакционноспособной функциональной
группы в сшитую часть сшитого белка или пептида.

[Формула 34]



20 Способ получения белка или пептида по другому объекту представляет
собой способ получения белка или пептида, в котором реакционноспособная

функциональная группа является связанной, при этом белок или пептид представлен на следующей формуле:

[Формула 35]



5

где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, L означает линкер, Z означает реакционноспособную функциональную группу, а D означает лекарственное средство,

10

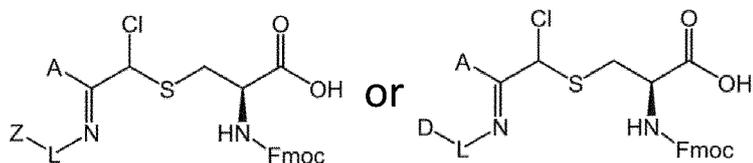
способ, включающий:

синтез белка или пептида методом Fmoc, и

использование в синтезе соединения, представленного на следующей формуле, вместо по меньшей мере одного цистеинового остатка.

15

[Формула 36]



Настоящий способ можно осуществлять тем же способом, который описан выше (способ получения сшитого белка или пептида с использованием пептидного синтеза), за исключением того, что используемый остаток цистеина представляет собой указанное выше соединение.

20

Реакционноспособная функциональная группа

Более подробно, реакционноспособную функциональную группу можно вводить при взаимодействии белка или пептида, сшитого сшивающим агентом согласно варианту осуществления настоящего изобретения, с аминсоединением (NH₂-L-Z), содержащим реакционноспособную функциональную группу, при этом образуется оксим (метод оксима). Аминсоединение, содержащее реакционноспособную функциональную группу, которое используют в данном контексте, может представлять собой NH₂-X-L'-Z (где X означает O, NH или N(C1-4 алкил)).

25

Линкер

В данном контексте каждый из L и L' означает линкер. В данном контексте длина «линкера» особо не ограничена, если она позволяет связывать реакционноспособную функциональную группу или лекарственное средство с линкером и сшитым белком или пептидом, и характеризуется структурой, не влияющей на какие-либо реакции сшивки, а также линкер может отсутствовать (может представлять собой связь). В качестве примера линкер может содержать один или более алкиленов, алкениленов и алкиниленов. Такие алкилены, алкенилены и алкинилены могут являться прямыми, разветвленными или циклическими. Число атомов углерода в составе алкилена может составлять от 1 до 20, от 1 до 10, от 1 до 6, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2, 2 или 1, а количество атомов углерода в составе алкенилена и алкинилена в каждом случае может составлять от 2 до 20, от 2 до 10, от 2 до 6, от 2 до 4, от 2 до 3 или 2. Линкер может содержать одну или более групп -O-, -S-, -S-S-, -NH-, -N((C1-C6)алкил)-, -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, феноленов, гетероариленов и/или гетероцикленом. Кроме того, линкер может содержать один или более остатков аминокислотных групп и может содержать, например, от 1 до 100, от 1 до 50, от 1 до 25, от 1 до 20, от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 5, 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2, 2 или 1 аминокислотных остатков. Атом водорода, связанный с атомом углерода, может быть заменен атомом галогена в группе, входящий в состав линкера. При необходимости окончательного связывания сшивающего агента по настоящему изобретению с лекарственным средством и последующего высвобождения лекарственного средства в определенных условиях (например, сшивающий агент по настоящему изобретению предназначен для связывания (например, комплекс антитело-лекарственное средство (ADC)) с пептидом или белком (например, молекула, содержащая Fc-область), направленным на указанную мишень для высвобождения лекарственного средства в конкретной области, обогащенной мишенью), при этом линкер содержит фрагмент, расщепляемый предпочтительно в определенных условиях *in vivo*, предпочтительно в условиях, характерных для конкретной области. Примеры таких условий включают присутствие фермента и значение pH. Например, линкер может содержать пептидную связь, которая расщепляется протеазой или эстеразой (например, GGFG, которая расщепляется лизосомным ферментом, см. статью Marcin Poreba, *The FEBS Journal*, т. 287, сс. 1936-1969 (2020)), или сложный эфир. В этом

случае линкер может содержать аминокислотный фрагмент, отличный от пептидной связи, которая расщепляется протеазой.

5 Термин «алкилен», использованный в данном контексте, означает двухвалентную группу, полученную при удалении одного атома водорода из алкильной группы. Примеры алкиленовой группы включают алкилен с прямой
10 или разветвленной цепью от C1 до C20 и циклоалкилен от C3 до C7, и их примеры включают метиленовую группу, этиленовую группу, пропиленовую группу, бутиленовую группу, пентиленовую группу, гексиленовую группу и циклогексиленовую группу. Алкилен при необходимости необязательно замещен гидроксильной группой, атомом галогена и аминогруппой, и в этом случае
15 количество заместителей в алкилене может составлять от 1 до 10, от 1 до 8, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, 3, 2 и/или 1.

Термин «алкенилен» означает двухвалентную группу, полученную при удалении двух атомов водорода от любого атома углерода линейного,
15 разветвленного или циклического ненасыщенного углеводорода, содержащего одну или более двойных связей углерод-углерод. Примеры алкенилена включают C2-20 алкенилен, и их примеры включают винилен, пропенилен, изопропенилен, бутенилен, пентенилен, гексенилен, гептенилен, октенилен, ноненилен и деценилен.

20 Термин «алкинилен» означает двухвалентную группу, полученную при удалении двух атомов водорода от любого атома углерода линейного или разветвленного ненасыщенного углеводорода, содержащего одну или более тройных связей углерод-углерод. Примеры алкинилена включают C2-20 алкинилен, и их примеры включают этинилен, пропинилен, бутинилен,
25 пентинилен, гексинилен и фенилэтинилен.

Термины «гетероарилен» и «гетероциклен» соответственно означают ароматические и неароматические 5-14-членные двухвалентные моноциклические или конденсированные гетероциклические группы, каждая из которых содержит по меньшей мере один из одного или более гетероатомов,
30 которые выбирают из атома азота, атома кислорода и атома серы. Количество гетероатомов, содержащихся в 5-14-членной гетероциклической группе, может составлять, например, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2, 2 или 1. Моноциклическая гетероциклическая группа предпочтительно представляет собой 5-6-членное кольцо. Конденсированная гетероциклическая группа

предпочтительно представляет собой 8-10-членное кольцо. Примеры гетероарилена и гетероциклена могут включать пиперидилен, пиперазилен, морфолилен, хинуклидилен, пирролидилен, азетидилен, оксэтилен, азиридилилен, тропанилен, фурилен, тетрагидрофурилен, тиенилен, пирролилен, 5 пирролинилен, пирролидинилен, диоксоланилен, оксазолилен, оксазолинилен, изоксазолилен, тиазолилен, тиазолинилен, изотиазолилен, имидазолилен, имидазолинилен, имидазолидинилен оксазолидинилен, тиазолидинилен, пиразолилен, пиразолинилен, пиразолидинилен, оксадиазолилен, фуразанилен, тиadiaзолилен, триазолилен, тетразолилен, пиранилен, пиридилен, 10 пиперидинилен, пиридазинилен, пиримидинилен, пиразинилен, пиперазинилен, диоксанилен, оксазинилен, морфолинилен, тиaдинилен, триазинилен, бензофуранилен, изобензофуранилен, дигидробензофуранилен, дигидроизобензофуранилен, бензотиенилен, изобензотиенилен, дигидробензотиенилен, дигидроизобензотиенилен, тетрагидробензотиенилен, 15 хинолилен, изохинолилен, хиназолинилен, фталазинилен, птеридинилен, кумарилен, хромонилен, индолилен, изоиндолилен, бензимидазоилен, бензофурилен, пуринилен, акридинилен, феноксазинилен, фенотиазинилен, бензоксазолилен, бензотиазолилен, индазолилен, бензимидазолилен, бензодиоксоланилен, бензодиоксанилхроменилен, хроманилен, изохроманилен, 20 хроманонилен, циннолинилен, хиноксалинилен, индолизинилен, хинолидинилен, имидазопиридилен, нафтилидинилен, дигидробензоксазинилен, дигидробензоксазолинонилен, дигидробензоксазинонилен и бензотиоксанилен.

Термин «включающий», использованный в данном контексте, означает включение случая «состоит из/состоящий из» и его можно рассматривать как 25 «состоит из/состоящий из».

Термин «реакционноспособная функциональная группа», использованный в данном контексте, или группа, которую обозначают как «Z», означает группу, способную вступать в реакцию и связываться с пептидом, белком, нуклеиновой кислотой, низкомолекулярным фармацевтическим препаратом или т.п. в 30 относительно мягких условиях. Примеры реакционноспособной функциональной группы могут включать малеимид, тиольную группу или защищенную тиольную группу, спирт, акрилат, акриламид, амин или защищенный амин, карбоновую кислоту или защищенную карбоновую кислоту, азид, алкин, включая циклоалкин, 1,3-диен, включая циклопентадиен и фуран, альфа -

галогенкарбонил, N-гидроксисукцинимидил, N-гидроксисульфосукцинимидил, нитрофениловый эфир, карбонат, дибензоциклооктин (DBCO), тетразин, метилтетразин (MTZ), транс-циклооктен (TCO), азид, карбокси, тозил, amino, эпокси, ацил, изотиоцианат, изоцианат, ацилазид, сложный эфир NHS, 5 хлорангидрид, альдегид, глиоксаль, эпоксид, оксиран, карбонат, арилирующий агент, имидный эфир, карбодиимид, ангидрид кислоты, галогенацетил, алкилгалогенид, малеимид, азиридин, производное акрилоила, арилирующий агент, диазоалкан, диазоацетильное соединение, карбонил, кетон, карбодиимид, эпоксид, оксиран, карбонилдиимидазол, N,N'-дисукцинимидилкарбонат, N- 10 гидроксисукцинимидилхлорформиат, алкилгалогенид, изоцианат, гидразин, основание Шиффа, продукт восстановительного аминирования, продукт конденсации Манниха, производное диазония, продукт конденсации Манниха, продукт реакции иодирования, арилазид, арилазидгалогенид, бензофенон, диазосоединение и производное диазиридина.

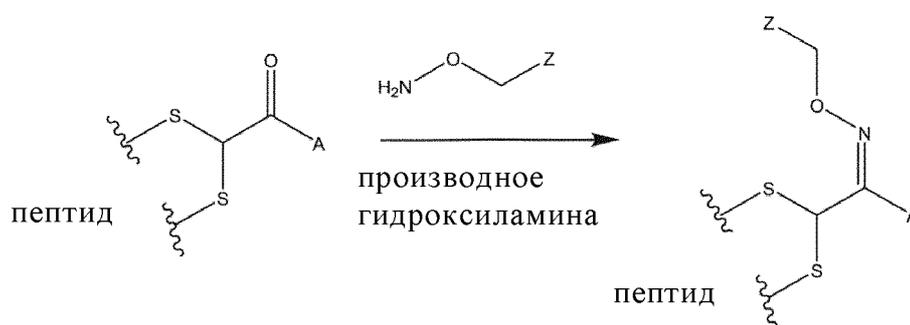
15 Реакционноспособная функциональная группа может представлять собой группу, образующую ковалентную связь через амидную связь, дисульфидную связь, простую тиоэфирную связь, сложную тиоэфирную связь, связь гидразона, сложноэфирную связи, простую эфирную связь или связь уретана в связанной 20 форме с лекарственным средством. Например, реакционноспособная функциональная группа, пригодная для реакции с первичным амином, представляет собой N-сукцинимидиловый эфир или N-сульфосукцинимидиловый эфир, реакционноспособная функциональная группа, пригодная для реакции с аминогруппой, представляет собой пара- нитрофениловый эфир, динитрофениловый эфир или пентафторфениловый эфир, 25 реакционноспособная функциональная группа группа, пригодная для реакции с меркаптогруппой, представляет собой малеимидную группу, хлорангидрид карбоновой кислоты, пиридилдитиогруппу, нитропиридилдитиогруппу, галогеналкильную группу и галогенацетильную группу, а реакционноспособная функциональная группа, пригодная для реакции с гидроксигруппой, 30 представляет собой изоцианатную группу (изоцианат) (Greg t. Hermanson, Bioconjugate Techniques Second Edition, стр. 234-345).

Реакционноспособная функциональная группа дополнительно включает также реакционноспособную функциональную группу, участвующую (способную к реакции) в реакции, в результате которой образуется оксимная

связь в результате реакции с алкоксиамином, реакции присоединения-1,3-
диполярной циклизации Хьюсгена (реакция «клика»), которая является реакцией
с алкином или азидом в присутствии катализатора Cu(I), реакцией Дильса-
Альдера с обращенными электронными требованиями, реакцией Михаэля,
5 реакцией метатезиса, реакцией кросс-конденсации в присутствии катализатора
на основе переходного металла, реакцией радикальной полимеризации, реакцией
окислительного связывания, реакцией трансацилирования или реакцией
фотоклика (Kim CH и др., Curr Opin Chem Biol., т. 17(3), сс412-409 (2013)).

В качестве одного примера введение реакционноспособной
10 функциональной группы можно выполнить при введении реакционноспособной
функциональной группы, такой как алкиновая группа, при реакции белка или
пептида или его гибридного продукта, совместно связанного с использованием
сшивающего агента, и производного гидроксиламина в буферном растворе, таком
как PBS (pH 7,4), в среде при температуре от 4°C до комнатной температуры в
15 течение от 30 мин до 16 ч.

[Формула 37]



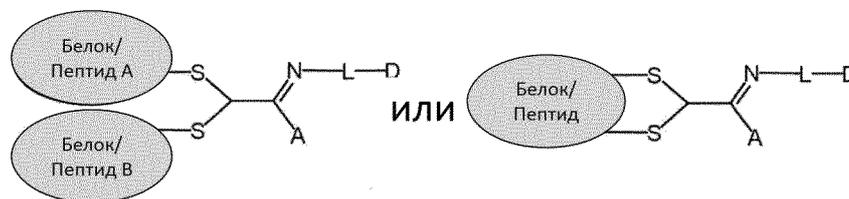
Способ связывания лекарственного средства

Сшивающий агент согласно данному варианту осуществления можно
20 использовать для введения таким образом лекарственного средства
(цитотоксический агент) в белок или пептид или гибридный продукт. Более
подробно, реакционноспособная функциональная группа белка или пептида или
гибридный продукт с введенной реакционноспособной функциональной
группой, и лекарственное средство (цитотоксический агент) может
25 взаимодействовать и связываться, при этом лекарственное средство
(цитотоксический агент) вводится в белок или пептид или гибридный продукт.

Соответственно, в одном объекте способ получения комплекса белка или
пептида и лекарственного средства представляет собой способ получения

комплекса белка или пептида и лекарственного средства, комплекс представлен на следующей формуле:

[Формула 38]



5

где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, белок/пептид А и Белок/пептид В необязательно являются одинаковыми или различными, L

10

означает линкер, а D означает лекарственное средство,

способ, включающий:

получение белка или пептида со связанной реакционноспособной функциональной группой, указанным способом, и

15

взаимодействие полученного белка или пептида со связанной реакционноспособной функциональной группой, и лекарственного средства, содержащего функциональную группу, вступающую в реакцию с реакционноспособной функциональной группой, при этом лекарственное средство связывается со сшитой частью сшитого белка или пептида.

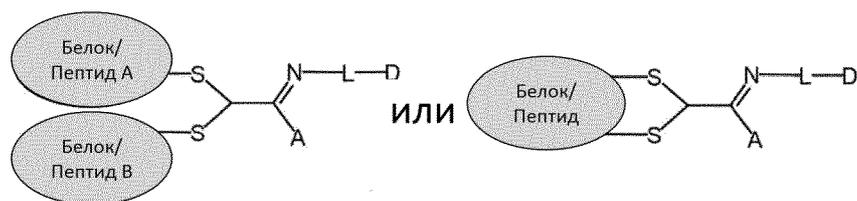
20

В другом варианте, способ получения комплекса белка или пептида и лекарственного средства можно осуществлять с использованием белка и/или пептида с реакционноспособной функциональной группой. Соответственно, способ получения комплекса белка или пептида и лекарственного средства в другом объекте представляет собой способ получения комплекса белка или пептида и лекарственного средства, комплекс представлен на следующей

25

формуле:

[Формула 39]

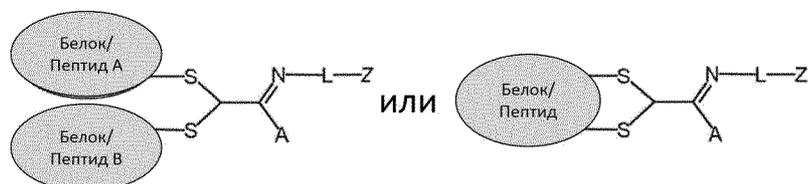


где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно
замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или
С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, белок/пептид
А и белок/пептид В необязательно являются одинаковыми или различными, L
означает линкер, а D означает лекарственное средство,

способ, включающий:

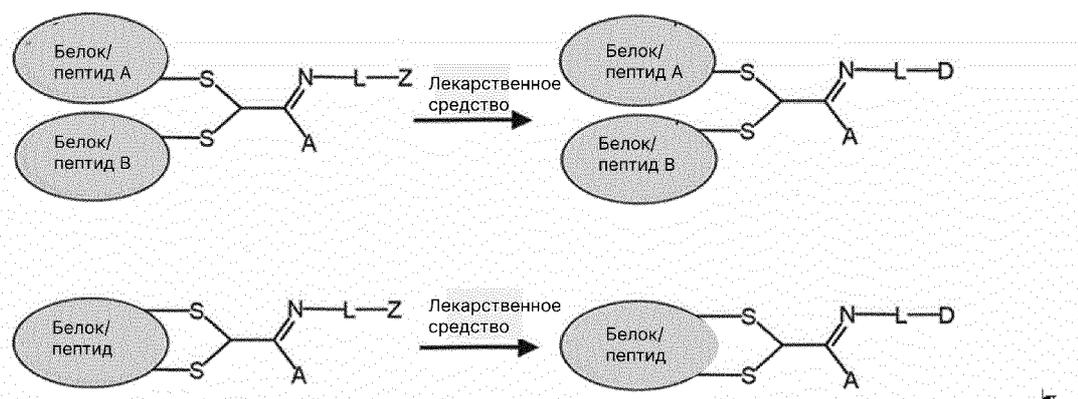
взаимодействие белка или пептида со связанной реакционноспособной
функциональной группой, при этом белок или пептид представлен на следующей
формуле:

[Формула 40]



где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно
замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или
С1-6 алкильную группу, белок/пептид означает белок или пептид, белок/пептид
А и Белок/пептид В необязательно являются одинаковыми или различными, L
означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу,
и лекарственного средства, содержащего функциональную группу,
вступающую в реакцию с реакционноспособной функциональной группой, при
этом лекарственное средство связывается со сшитой частью сшитого белка или
пептида.

[Формула 41]

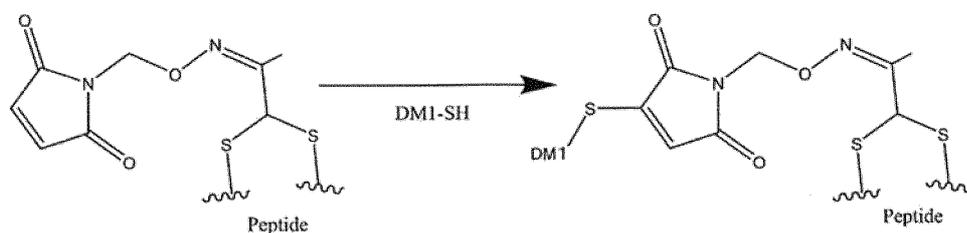


В данном контексте, значение термина «лекарственное средство» практически не ограничено, если оно означает лекарственное средство, которое вводят в белок или пептид и затем используют, и его примеры включают терапевтический агент, профилактический агент, направляющий агент, меченый агент или диагностический агент. Примеры терапевтического средства или профилактического средства могут включать противораковые средства, такие как монOMETИЛАУРИСТАТИН, АУРИСТАТИН, МАЙТАНЗИН, ЭМТАНЗИН, ДОКСОРУБИЦИН, БЛЕОМИЦИН, ОЗОГАМИЦИН, ВЕДОТИН, ПАЗУДОТОКС, ДЕРУКСТЕКАН, МАЙТАНЗИНОЛ, КАЛИХИМИЦИН, ЭКЗАТЕКАН, ДИМЕР ПИРРОЛОБЕНЗОДИАЗЕПИНА, ДУОКАРМИЦИН, ЭРИБУЛИН, SN-38, PNU-159682, ЭМТАНЗИН (DM1), МЕРТАНЗИН или их производные, радиоизотопы, такие как ⁹⁰Y, направляющие агенты, такие как лекарственное средство, способное связываться с рецептором на гематоэнцефалическом барьере и затем перемещать в центральный нерв, и лекарственное средство, способное связываться с раковыми клетками и затем переносить в клетки антитела, и детектируемые метки, такие как радиоактивная метка, фермент, флуоресцентная метка, биолюминесцентная метка и металлическая хемилюминесцентная метка.

Например, лекарственный агент можно вводить с использованием реакции белка или пептида или гибридного продукта, где малеимидную группу в качестве реакционноспособной функциональной группы вводят заранее с использованием оксимной реакции, а малеимид образуется при введении азидной группы в SH-группу в составе мертанзина, который представляет собой противораковое средство, в качестве лекарственного средства в буферном

растворе, таком как PBS (pH 7,4), в условиях окружающей среды при температуре от 4°C до комнатной температуры в течение от 30 мин до 16 ч.

[Формула 42]

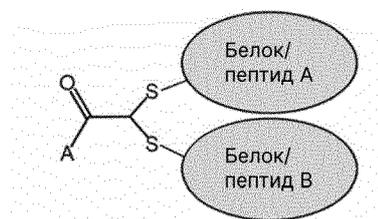


5 Сшитый белок или пептид

В одном объекте предлагается сшитый сшивающим агентом белок и/или пептид. Другой объект относится к белку или гибриднему пептиду со следующей структурой, в которой две тиольные группы, присутствующие в отдельном белке и/или пептиде, связаны друг с другом через сшивающий агент.

10 В данном контексте белок/пептид А и белок/пептид В необязательно представляют собой одно и то же вещество или отличающиеся друг от друга вещества.

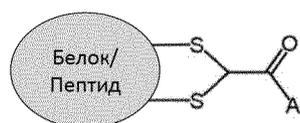
[Формула 43]



15 В формуле значение А аналогичны значению в формуле (I).

Другой объект относится к белку или пептиду следующей структуры, в которой две тиольные группы, присутствующие в одном белке или пептиде, связаны друг с другом через сшивающий агент по настоящему раскрытию.

[Формула 44]



20

В формуле значение А аналогичны значению в формуле (I).

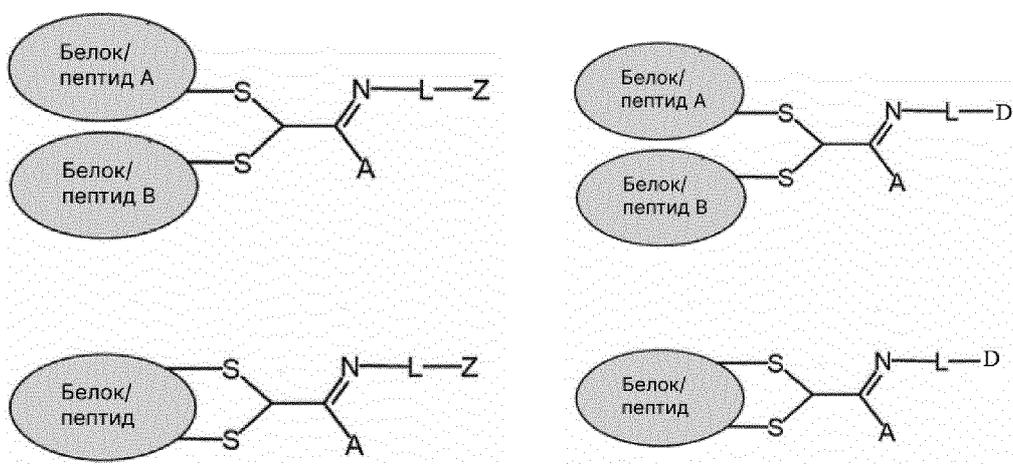
Сшивающий агент согласно настоящему варианту осуществления может быть связан с реакционноспособной функциональной группой или

лекарственным средством для введения функциональной группы или лекарственного средства в требуемый белок, пептид или их комплекс.

Соответственно, сшитый белок и пептид могут представлять собой белок или пептид, в котором реакционноспособная функциональная группа связана с

5 использованием сшивающего агента, или может представлять собой белок или пептид, в котором лекарственное средство связано с использованием сшивающего агента, формула которого представлена ниже.

[Формула 45]



10

В формуле, L означает линкер, Z означает реакционноспособную функциональную группу, а D означает лекарственное средство.

Линкер, описанный в данном контексте, может иметь разветвленную

15 структуру для связывания со множеством функциональных групп Z или

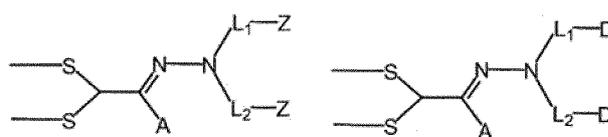
лекарственных средств D. Количество функциональных групп Z или

лекарственных средств D, связанных со сшивающим агентом согласно

настоящему варианту осуществления, может составлять от 1 до 20, от 1 до 10, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2 или 1.

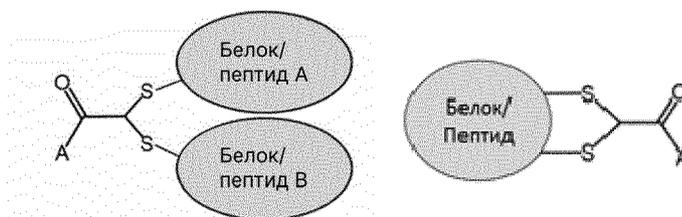
20 Например, если количество функциональных групп Z или лекарственных средств D составляет 2, то можно принять следующую структуру (каждый из L1 и L2 означает линкер, значение термина “линкер” приведено выше).

[Формула 46]



Сшивающий агент согласно настоящему варианту осуществления можно использовать для увеличения стабильности связывания требуемого белка, пептида или их комплекса. Например, группа А в составе сшитого белка или пептида может означать атом водорода, а также белок или пептид содержит молекулу, представленную ниже.

[Формула 47]



10

В приведенном выше описании значения линкера L, реакционноспособной функциональной группы Z и лекарственного средства D аналогичны описанным выше. Сшитая молекула представляет собой молекулу с повышенной устойчивостью к щелочам и стабилизированную по сравнению с дисульфидной связью. Количество таких участков связывания через сшивающий агент может составлять один, два или более. В случае присутствия двух или более таких участков сшивки, можно проводить сшивку в одном белке или пептиде, в отдельном белке и/или пептиде или можно объединить сшивку в одном белке или пептиде и сшивку в отдельном белке и/или пептиде. В случае присутствия в отдельном белке или пептиде двух или более таких участков сшивки, можно проводить сшивку между одними и теми же двумя белками и/или пептидами или связывание за счет сшивки между тремя или более белками и/или пептидами за счет сшивки между несколькими белками и/или пептидами.

25 Сшитый Fc-связывающий пептид

Пептид для сшивки, как описано в данном контексте, может представлять собой Fc-связывающий пептид. Соответственно, в другом объекте предлагается Fc-связывающий пептид, представленный на следующей формуле (где значения

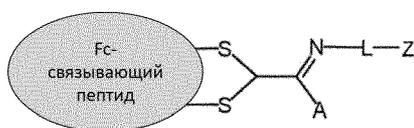
A, L, Z и D аналогичны описанным выше), сшитый с использованием сшивающего агента, или способ его получения.

[Формула 48]

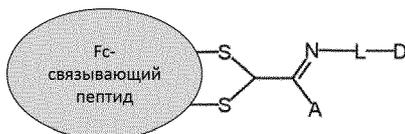


5

[Формула 49]



[Формула 50]



10

Термин «Fc-связывающий пептид», использованный в данном контексте, означает пептид, который специфически связывается с Fc-областью IgG. Термин «Fc-область IgG», использованный в данном контексте, обычно означает фрагмент, расположенный на C-конце, полученный в виде продукта, образующегося при обработке IgG папаином, который представляет собой протеолитический фермент. Fc-связывающий пептид предпочтительно представляет собой пептид, который связывается с участком, который выбирают из Lys248, Lys246, Lys338, Lys288, Lys290, Lys360, Lys414 и Lys439 в составе Fc в соответствии с нумерацией Eu, и/или прилегающей к нему области, предпочтительно Lys248 и/или его соседнего участка, или он может быть связанным с участком связывания белка A. Например, Fc-связывающий пептид может представлять собой частичный пептид белка A, который характеризуется способностью связываться с Fc, или его мутантом. Конкретные примеры такого пептида описаны в международной публикации № WO 2008/054030,

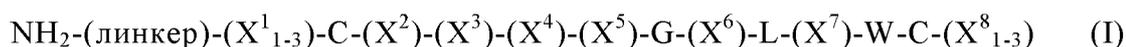
25

международной публикации № WO 2013/027796, международной публикации № WO 2016/186206, международной публикации № WO 2018/230257 и в статье Kyohei Muguruma и др., ACS Omega, т.4(11), сс. 14390-14397 (2019), и такой пептид можно соответствующим образом получать в соответствии со способом, описанным в каждом из этих документов. В составе Fc-связывающего пептида предпочтительно два цистеиновых остатка, цистеин, ближайший к С-концу, и цистеин, ближайший к N-концу, являются сшитыми с использованием сшивающего агента.

Термин «IgG», использованный в данном контексте, может означать IgG млекопитающих, например, приматов, таких как человек и шимпанзе, лабораторных животных, таких как крысы, мыши и кролики, сельскохозяйственных животных, таких как свиньи, крупный рогатый скот, лошади, овцы и козы, и домашних животных, таких как собаки и кошки, и предпочтительно означает IgG человека (IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). Термин IgG, использованный в данном контексте, предпочтительно означает IgG1, IgG2 или IgG4 человека или IgG кролика и прежде всего предпочтительно IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

Прежде всего, Fc-связывающий пептид может представлять собой пептид, который выбирают из следующих компонентов (i)-(iv):

(i) пептид, представленный на следующей формуле (I):



где (линкер) означает линкер, в котором от одного до трех X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 и X^7 , и от одного до трех X^8 , каждый из которых совместно независимо означает одинаковые или различные аминокислотные остатки,

каждый из X^1 , X^2 и X^3 и каждый X^8 совместно независимо означают любые аминокислотные остатки, отличающиеся от C, одинаковые или различные,

X^4 означает H, R, S или D,

X^5 означает один аминокислотный остаток, который выбирают из K, C, D, E, R, V, F, L, 2-аминосубериновой кислоты, Dpr, Orn, AcOrn, AcDab, Dab, Nle, Nva, Tle, Ala(t-Bu) и Cha,

X^6 означает E, N, R или D, и

X^7 означает I или V,

(ii) пептид, представленный на следующей формуле (II), или пептид, содержащий аминокислотную последовательность (II), где одна или более аминокислот добавлены, удалены и/или заменены в положении, отличающемся от X⁹-X¹³:

5 X⁹₁₋₂ NMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNAX11IX12SIRDDC-(линкер 2)-CONH₂ (SEQ ID NO: 2) ... (II)

где (линкер 2) означает линкер, X⁹₁₋₂ выбирают из группы, состоящей из GF, AF, VF, LF, IF, MF, PF, FF, WF, KF, Orn-F, CF, DF, EF, βAla-F, 2-аминосубериновой кислоты-F, Dpr-F и NH₂-(PEG)_n-CO (n = от 1 до 50)-F, F, K, Orn, C, D, E, остаток 2-аминосубериновой кислоты, и Dpr, и

10 каждый из X¹¹ и X¹² независимо выбирают из группы, состоящей из R, H, D, E, S, T, N, Q, Y и C,

(iii) пептид, представленный на следующей формуле (I') или (I''):

15 Z-[(Linker3)-(X¹₁₋₃)-C-(X²)-(X³)-(X⁴)-(X⁵)-G-(X⁶)-L-(X⁷)-W-C-(X⁸₁₋₃)] ... (I')
[(X¹₁₋₃)-C-(X²)-(X³)-(X⁴)-(X⁵)-G-(X⁶)-L-(X⁷)-W-C-(X⁸₁₋₃)-(Linker3)]-Z ... (I'')

где Z означает реакционноспособную функциональную группу,

(Linker3) означает линкер,

от одного до трех X¹, X², X³, X⁴, X⁵, X⁶ и X⁷ и от одного до трех X⁸,

20 каждый из которых совместно независимо означает одинаковые или различные аминокислотные остатки,

каждый из X¹, X² и X³ и каждый X⁸ совместно независимо означают аминокислотные остатки, отличающиеся от C, одинаковые или различные,

X⁴ означает H, R, S или D,

25 X⁵ означает один аминокислотный остаток, который выбирают из K, C, D, E, R, V, F, L, 2-аминосубериновой кислоты, Dpr, Orn, AcOrn, AcDab, Dab, Nle, Nva, Tle, Ala(t-Bu) и Cha,

X⁶ представляет собой E, N, R или D, и

X⁷ представляет собой I или V,

30 (iv) пептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную на следующей формуле (II'), или пептид, содержащий аминокислотную последовательность (II'), где одна или более аминокислот добавлены, удалены и/или заменены в определенном положении, отличающемся от X⁹ до X¹⁴:

$X^9_{1,2}$ NMQCQX14RFYEALHDPNLNEEQRNAX11IX12SIRDDC-(линкер 2)-NH₂ (SEQ ID NO: 3) ... (II')

где (линкер 2) означает линкер, $X^9_{1,2}$ выбирают из группы, включающей GF, AF, VF, LF, IF, MF, PF, FF, WF, KF, Orn-F, CF, DF, EF, β Ala -F, 2-аминосубериновую кислоту-F, Dpr-F и NH₂-(PEG)_n-CO (n составляет от 1 до 50)-F, F, K, Orn, C, D, E, остаток 2-аминосубериновой кислоты, Dpr и Ацетил-K, каждый из X^{11} и X^{12} независимо выбирают из группы, включающей R, H, D, E, S, T, N, Q, Y, C и K(Z),

X^{14} означает R, C, K(Z) и

10 Z означает реакционноспособную функциональную группу.

Термин X^m (m означает целое число), использованный в данном контексте, означает аминокислоту. Термин « X^m n» означает соединение n аминокислот X^m , а « X^m », где n не указано, означает наличие одной аминокислоты X^m . В случае, когда n составляет 2 или более, множество X^m может независимо означать одинаковые или различные аминокислоты. Случай, когда n означает «p-q», означает наличие от p до q аминокислот X^m . В аминокислотных последовательностях, описанных в данном контексте, A означает остаток аланина, R означает остаток аргинина, N означает остаток аспарагина, D означает остаток аспарагиновой кислоты, C означает остаток цистеина, Q означает остаток глутамина, E означает остаток глутаминовой кислоты, G означает остаток глицина, H означает остаток гистидина, I означает остаток изолейцина, L означает остаток лейцина, K означает остаток лизина, M означает остаток метионина, F означает остаток фенилаланина, P означает остаток пролина, S означает остаток серина, T означает остаток треонина, W означает остаток триптофана, Y означает остаток тирозина и V означает остаток валина. Hsu означает гомоцистеин, Dpr означает диаминопропионовую кислоту, Orn означает остаток орнитина, β Ala означает остаток β -аланина, Dab означает остаток 2,4-диаминомасляной кислоты, Nle означает остаток норлейцина, Nva означает остаток норвалина, Tle означает остаток трет-лейцина, Ala(t-Bu) означает остаток трет-бутилаланина, а Cha означает остаток циклогексилаланина. В остатке (остатке лизина, остатке орнитина, остатке 2,4-диаминомасляной кислоты), содержащем аминогруппу в боковой цепи, аминогруппу при необходимости можно ацетилировать. В данном контексте каждая ацетилированная форма природной и искусственной аминокислоты

также может быть обозначена префиксом Ac в обозначении такой аминокислоты, и такую аминокислоту интерпретируют как включающую такую ацетилированную форму, даже если она не обозначена с использованием Ac, если только такая интерпретация не является особенно противоречивой. Термин K(Z), использованный в данном контексте, означает остаток лизина, связанный с функциональной группой, и K(Z) предпочтительно означает K(азид). K (азид) означает остаток лизина, связанный с азидом.

В данном контексте Fc-связывающий пептид может представлять собой пептид для связывания с носителем, который предназначен для связывания с носителем при связывании антитела и носителя, или может представлять собой пептид для связывания лекарственного средства, который предназначен для связывания лекарственного средства с антителом через пептид. В случае пептида для связывания с носителем предпочтительным является пептид (i) или (ii).

В формуле (I) линкер означает (GSGGS)₁₋₃, (SGSGS)₁₋₃, (GGGGS)₁₋₃ или (PEG)₂₋₁₀ (предпочтительно (PEG)₄) или отсутствует. Для связывания с носителем аминокислотная группа может быть связана с карбоксильным концом (-COOH) на C-конце формулы (I), при этом образуется группа (-C(=O)NH₂), или линкер (определение которого описано выше) может быть произвольно вставлен между карбоксильным концом и аминокислотной группой. Если линкер присутствует на C-конце, то на N-конце он может отсутствовать. Другими словами, также может образоваться структура (X¹₁₋₃)-C-(X²)-(X³)-(X⁴)-(X⁵)-G-(X⁶)-L-(X⁷)-W-C-(X⁸₁₋₃)-(линкер)-NH₂. Аминокислотная группа на N-конце формулы (I) может являться ацетилированной (в этом случае остаток Lys вводится в соответствующее положение вблизи N-конца в линкере на N-концевой стороне).

Примеры пептида, представленного на формуле (I), предпочтительно включают следующие пептиды.

[1] X¹₁₋₃ означает аминокислотную последовательность, представленную (S, G, F или отсутствует)-(D, G, A, S, P, Hcy или отсутствует)-(S, D, T, N, E или R).

[2] X¹₁₋₃ означает D, GPD, R, GPR, SPD, GDD, GPS, SDD, RGN, G-Hcy-D, RGP или GPD.

[3] X¹₁₋₃ означает это D или GPD.

[4] X² означает A, S или T.

[5] X² означает A или T.

[6] X² означает A.

[7] X³ означает Y или W.

[8] X³ означает Y.

[9] X⁴ означает H.

5 [10] X⁵ означает один аминокислотный остаток, который выбирают из A, R, K, C, D, E, L, 2-аминосубериновой кислоты, Dpr, R, F, 2-аминосубериновой кислоты, Dpr, AcOrn, AcDab, Dab, Nle, Nva, Ala(t-Bu), и Cha.

[11] X⁵ означает K, R или AcOrn.

10 [12] X⁵ означает один аминокислотный остаток, который выбирают из V, Dab, F, R, L, Nva, Nle, Ala(t-Bu) и Cha.

[13] X⁵ означает один аминокислотный остаток, который выбирают из F, R, L, Nva, Nle, Ala(t-Bu) и Cha.

[14] X⁵ означает один аминокислотный остаток, который выбирают из L, Ala(t-Bu) и Cha.

15 [15] X⁶ означает E или N.

[16] X⁶ означает E.

[17] X⁷ означает V.

[18] X⁸₁₋₃ означает (S, T или D)-(H, G, Y, T, N, D, F, Hcy или отсутствует)- (Y, F, H, M или отсутствует).

20 [19] X⁸₁₋₃ означает T, TFH, S, SFH, TNH, TFY, TYH или T-Hcy-H.

[20] X⁸₁₋₃ означает T или TFH.

25 Пептид, представленный на формуле (I), может представлять собой пептид, удовлетворяющий любому одному или комбинации двух или более из вышеуказанных условий, или может представлять собой, например, пептид, удовлетворяющим следующим условиям: [8] и [9], [8] и [17], [9] и [17], [8] и [9] и [17], или их комбинация с любым из условий [10]-[14].

30 Более конкретно, их примеры могут включать следующие пептиды (в данном контексте определение X⁵ аналогично описанному выше, группа NH₂- (линкер) может присутствовать на N-конце, а группа -NH₂ или группа NH₂- (Линкер) может присутствовать на C-конце:

1) DCA_YHX⁵GELVWCT (SEQ ID NO: 4)

2) GPDCA_YHX⁵GELVWCTFH (SEQ ID NO: 5)

3) RCA_YHX⁵GELVWCS (SEQ ID NO: 6)

4) GPRCA_YHX⁵GELVWCSFH (SEQ ID NO: 7)

- 5) SPDCAYHX⁵GELVWCTFH (SEQ ID NO: 8)
6) GDDCAYHX⁵GELVWCTFH (SEQ ID NO: 9)
7) GPSCAYHX⁵GELVWCTFH (SEQ ID NO: 10)
8) GPDCAYHX⁵GELVWCSFH (SEQ ID NO: 11)
5 9) GPDCAYHX⁵GELVWCTHH (SEQ ID NO: 12)
10) GPDCAYHX⁵GELVWCTFY (SEQ ID NO: 13)
11) SPDCAYHX⁵GELVWCTFY (SEQ ID NO: 14)
12) SDDCAYHX⁵GELVWCTFY (SEQ ID NO: 15)
13) RGNCAYHX⁵GQLVWCTYH (SEQ ID NO: 16)
10 14) G-Hcy-DCA YHX⁵GELVWCT-Hcy-H (SEQ ID NO: 17)
15) RRGPDCA YHX⁵GELVWCTFH (SEQ ID NO: 18)
16) DCTYHX⁵GNLVWCT (SEQ ID NO: 19)
17) DCA YHX⁵GNLVWCT (SEQ ID NO: 20)
18) DCTYHX⁵GELVWCT (SEQ ID NO: 21)
15 19) DCAWHX⁵GELVWCT (SEQ ID NO: 22)
20) DCTYTX⁵GNLVWCT (SEQ ID NO: 23)
21) DCA YTX⁵GNLVWCT (SEQ ID NO: 24)
22) DCSYTX⁵GNLVWCT (SEQ ID NO: 25)
23) DCTWTX⁵GNLVWCT (SEQ ID NO: 26)
20 24) DCTYHX⁵GNLVWCT (SEQ ID NO: 27)
25) DCTYRX⁵GNLVWCT (SEQ ID NO: 28)
26) DCTYSX⁵GNLVWCT (SEQ ID NO: 29)
27) DCTYTX⁵GNLVWCT (SEQ ID NO: 30)
28) DCTYTX⁵GELVWCT (SEQ ID NO: 31)
25 29) DCTYTX⁵GRLVWCT (SEQ ID NO: 32)
30) DCTYTX⁵GDLVWCT (SEQ ID NO: 33)
31) DCTYTX⁵GNLIWCT (SEQ ID NO: 34)
32) DCA YHRGELVWCT (SEQ ID NO: 35)
33) GPDCAYHRGELVWCTFH (SEQ ID NO: 36)
30 34) RCAYHRGELVWCS (SEQ ID NO: 37)
35) GPRCA YHRGELVWCSFH (SEQ ID NO: 38)
36) SPDCAYHRGELVWCTFH (SEQ ID NO: 39)
37) GDDCA YHRGELVWCTFH (SEQ ID NO: 40)
38) GPSCAYHRGELVWCTFH (SEQ ID NO: 41)

- 39) GPDCAYHRGELVWCSFH (SEQ ID NO: 42)
40) GPDCAYHRGELVWCTHH (SEQ ID NO: 43)
41) GPDCAYHRGELVWCTFY (SEQ ID NO: 44)
42) SPDCAYHRGELVWCTFY (SEQ ID NO: 45)
5 43) SDDCAYHRGELVWCTFY (SEQ ID NO: 46)
44) DCTYHRGNLVWCT (SEQ ID NO: 47)
45) DCAYHRGNLVWCT (SEQ ID NO: 48)
46) DCTYHRGELVWCT (SEQ ID NO: 49)
47) DCAWHRGELVWCT (SEQ ID NO: 50)
10 48) DCTYTNGNLVWCT (SEQ ID NO: 51)
49) DCAYTNGNLVWCT (SEQ ID NO: 52)
50) DCSYTNGNLVWCT (SEQ ID NO: 53)
51) DCTWTNGNLVWCT (SEQ ID NO: 54)
52) DCTYHNGNLVWCT (SEQ ID NO: 55)
15 53) DCTYRNGNLVWCT (SEQ ID NO: 56)
54) DCTYSNGNLVWCT (SEQ ID NO: 57)
55) DCTYTRGNLVWCT (SEQ ID NO: 58)
56) DCTYTNGELVWCT (SEQ ID NO: 59)
57) DCTYTNGRLVWCT (SEQ ID NO: 60)
20 58) DCTYTNGDLVWCT (SEQ ID NO: 61)
59) DCTYTNGNLIWCT (SEQ ID NO: 62)

В качестве одного примера для связывания носителя можно использовать пептид со следующей структурой.

- GSGGS-GPDCAYHRGELVWCTFH-NH₂
25 (PEG)₄-GPDCAYHRGELVWCTFH-NH₂
GSGGS-DCAYHRGELVWCT-NH₂
(PEG)₄-DCAYHRGELVWCT-NH₂

В формуле (II) линкер 2 означает (GSGGS)₁₋₃, (SGSGS)₁₋₃, (GGGGS)₁₋₃ или (PEG)₂₋₁₀-Lys (предпочтительно (PEG)₄-Lys) или отсутствует. Концевую (-NH₂)
30 группу N-концевой аминокислоты формулы (II) можно ацетилировать и, таким образом, образуется группа (CH₃-C(=O)-NH-). Линкер 2 может быть связан с аминоконцевой группой (в этом случае остаток Lys вводится в соответствующее положение вблизи N-конца в линкере с N-концевой стороны), и в этом случае линкер 2 может присутствовать на C-конце или отсутствовать.

Примеры пептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную на формуле (II), предпочтительно включают следующие пептиды.

5 [21] X^9 выбирают из группы, включающей GF, AF, β AlaF, $\text{NH}_2\text{-(PEG)}_n\text{-CO}$ (n равно от 2 до 10)-F, F, K, Orn, C и Drg.

[22] X^9 выбирают из группы, включающей GF, F и K.

[23] X^{11} и X^{12} каждый независимо выбирают из группы, включающей R, H и E.

[24] X^{11} и X^{12} означают R.

10 Примеры пептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную на формуле (II), более конкретно, могут включать следующие пептиды:

60) FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO: 63),

61) GFNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO: 64),

15 62) KNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO: 65),

63) GFNMQCQKRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO: 66),

64) KNMQCQKRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO: 67),

или

66) GKFMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO: 68).

20 Например, пептид со следующей структурой можно использовать в качестве пептида для связывания с носителем.

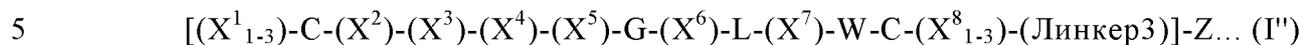
Ацетил-FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SGSGSK-NH₂

Ацетил-FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-(PEG)₄-Lys-NH₂

25 Пептид для связывания с носителем содержит по меньшей мере одну аминогруппу (-NH₂) для ковалентной связи с носителем. Такая аминогруппа предпочтительно представляет собой аминогруппу на N-конце и может представлять собой любую аминогруппу боковой цепи остатка лизина, остатка цистеина, остатка аспарагиновой кислоты, остатка глутаминовой кислоты, 2-аминосубериновой кислоты, Drg, и остаток аргинина вблизи N-конца или C-конца (например, расположенный в линкере) при условии, что может быть
30 осуществлено связывание с носителем.

В случае пептида для связывания лекарственного средства предпочтительным является пептид (iii) или (iv).

Пептид, представленный на формуле (I'), может содержать функциональную группу на С-конце вместо функциональной группы на N-конце. Другими словами, пептид, представленный на формуле (I'), может представлять собой пептид, представленный на следующей формуле (I''):



где Z означает функциональную группу и связан с любой частью структуры, представленной на формуле $[(X^{1-3})-C-(X^2)-(X^3)-(X^4)-(X^5)-G-(X^6)-L-(X^7)-W-C-(X^{8-3})-(\text{Линкер3})]$, (Линкер3) означает линкер и от одного до трех X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 и X^7 и от одного до трех X^8 каждый совместно независимо означают одинаковые или различные аминокислотные остатки,

каждый из X^1 , X^2 и X^3 и каждый X^8 совместно независимо означают любые аминокислотные остатки, отличающиеся от C, одинаковые или различные,

X^4 означает H, R, S или T,

15 X^5 означает один аминокислотный остаток, который выбирают из K, C, D, E, R, V, F, L, 2-аминосуберинового кислоты, Dpr, Orn, AcOrn, AcDab, Dab, Nle, Nva, Tle, Ala(t-Bu) и Cha,

X^6 означает E, N, R или D, и

X^7 означает I или V.

20 В формуле (I') и формуле (I'') линкер 3 означает RRRGS, EEGGS или (ПЭГ)₁₋₈ (предпочтительно (ПЭГ)₄) или отсутствует. Аминогруппа может быть связана с концевой группой (-COOH) C-концевой аминокислоты формулы (I') и, таким образом, образуется группа (-C(=O)NH₂). Ацетильная группа может быть связана с концевой группой (-NH₂) N-концевой аминокислоты формулы (I'') и, таким образом, образуется группа (CH₃-C(=O)-NH-).

25 Пептиды с аминокислотными последовательностями, представленными на формуле (I) и формуле (I''), могут означать Z-(Линкер3)-(X¹⁻³)-C-(X²)-(X³)-(X⁴)-(X⁵)-G-(X⁶)-L-(X⁷)-W-C-(X⁸⁻³) или (X¹⁻³)-C-(X²)-(X³)-(X⁴)-(X⁵)-G-(X⁶)-L-(X⁷)-W-C-(X⁸⁻³)-(Линкер3)-Z. Предпочтительная аминокислотная последовательность является такой же, как предпочтительная аминокислотная последовательность в пептиде, представленном на формуле (I).

Примеры пептида для связывания лекарственного средства могут включать следующие пептиды.



- Ацетил-К(Z)-EEGGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
Ацетил-К(Z)-(ПЭГ)₄-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
Малеимид -RRRGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
Малеимид -EEGGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
5 Малеимид -(PEG)₄-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
DBCO-RRRGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
DBCO-EEGGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
DBCO-(ПЭГ)₄-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
Тетразин-RRRGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
10 Тетразин-EEGGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
Тетразин-(ПЭГ)₄-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
ТСО-RRRGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
ТСО-EEGGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
ТСО-(ПЭГ)₄-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH₂
15 Ацетил-К(Z)RRRGS-DCAYHKGELVWCT-NH₂
Ацетил-К(Z)EEGGS-DCAYHKGELVWCT-NH₂
Ацетил-К(Z)-(ПЭГ)₄-DCAYHKGELVWCT-NH₂
Малеимид -RRRGS-DCAYHKGELVWCT-NH₂
Малеимид -EEGGS-DCAYHKGELVWCT-NH₂
20 Малеимид -(ПЭГ)₄-DCAYHKGELVWCT-NH₂
DBCO-RRRGS-DCAYHKGELVWCT-NH₂
DBCO-EEGGS-DCAYHKGELVWCT-NH₂
DBCO-(ПЭГ)₄-DCAYHKGELVWCT-NH₂
Тетразин-RRRGS-DCAYHKGELVWCT-NH₂
25 Тетразин-EEGGS-DCAYHKGELVWCT-NH₂
Тетразин-(ПЭГ)₄-DCAYHKGELVWCT-NH₂
ТСО-RRRGS-DCAYHKGELVWCT-NH₂
ТСО-EEGGS-DCAYHKGELVWCT-NH₂
ТСО-(ПЭГ)₄-DCAYHKGELVWCT-NH₂
30 В формуле (II') линкер 2 означает SGSGSK, SRRCR, SRRK(Z)R, SRRCRRCRRC, SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z) или (PEG)₁₋₈-Lys (предпочтительно, (PEG)₄-Lys), либо отсутствует. Концевую группу (-NH₂) N-концевой аминокислоты формулы (II') можно ацетилировать и, таким образом, образуется группа (CH₃-C(=O)-NH-). Другая функциональная молекула также при

необходимости, связана с остатком Cys (C), который содержится в линкере, через малеимид.

Примеры пептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную на формуле (II'), предпочтительно включают следующие пептиды.

[a] X⁹ выбирают из группы, включающей GF, AF, βAlaF, NH₂-(ПЭГ)_n-CO (n равно от 1 до 50)-F, F, K, Orn, C, Drg и ацетил-K.

[b] X⁹ выбирают из группы, включающей GF, F и ацетил-K.

[b] каждый из X¹¹ и X¹² независимо выбирают из группы, включающей R, H и E.

[c] X¹¹ означает R.

[d] X¹² означает R или K(Z) (предпочтительно Z означает собой азид).

Примеры пептида, содержащего аминокислотную последовательность, представленную на формуле (II'), более конкретно, могут включать пептиды, описанные в пунктах 60) - 66) (где функциональная группа может быть при необходимости связана с содержащимся остатком лизина):

FNMQQQCRFYALHDPNLNEEQRNARIC SIRDDP-SRRCRRCRRC-NH₂

Ацетил-KNMQQQCRFYALHDPNLNEEQRNARIC SIRDDP-SRRCRRCRRC-NH₂

GFNMQQQCRFYALHDPNLNEEQRNARIC SIRDDP-SRRCRRCRRC-NH₂

FNMQCQZRFYALHDPNLNEEQRNARIR SIRDDC-NH₂

Ацетил-KNMQCQZRFYALHDPNLNEEQRNARIR SIRDDC-NH₂

GFNMQCQK(Z)RFYALHDPNLNEEQRNARIR SIRDDC-SRRK(Z)R-NH₂

FNMQCQK(Z)RFYALHDPNLNEEQRNARIR SIRDDC-NH₂

Ацетил-KNMQCQK(Z)RFYALHDPNLNEEQRNARIR SIRDDC-SRRK(Z)R-NH₂

GFNMQCQK(Z)RFYALHDPNLNEEQRNARIR SIRDDC-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH₂

Ацетил-KNMQCQK(Z)RFYALHDPNLNEEQRNARIR SIRDDC-

SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH₂

GFNMQCQK(Z)RFYALHDPNLNEEQRNARIR SIRDDC-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH₂

Другие примеры Fc-связывающего пептида могут включать следующие пептиды (фиг. 4).

- 1) CAWHLGELVWC (SEQ ID NO: 70)
- 2) DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 71)
- 3) DCAWHLGELVFCT (SEQ ID NO: 72)
- 4) DCAWHLGELVXCT (SEQ ID NO: 73)

5 X означает 1-нафтоил, 2-нафтоил, бензил или бензотиофен

- 5) CDCAWHLGELVWCTC (SEQ ID NO: 74)
- 6) CAYHLGELVWC (SEQ ID NO: 75)
- 7) DCAYHLGELVWCTF(2-Рya) (SEQ ID NO: 76)

Например, реакционноспособную функциональную группу

10 (предпочтительно азидную группу) можно при необходимости связать с N-концом или C-концом (предпочтительно, N-концом) пептида для связывания лекарственного средства по данному контексту через линкер. Например, реакционноспособная функциональная группа (например, азидная группа) находится в концевом фрагменте пептида, где от 1 до 3 (предпочтительно 2)

15 глутаминовых кислот дополнительно связаны в N-концевом и/или C-концевом фрагменте. Пептид с азидной группой может вступать в клик-реакцию с другой функциональной молекулой, содержащей дибензилциклооктин (DBCO), алкин и TCO, что приводит к связыванию такой другой функциональной молекулы с пептидом. Связывание пептида и такого другого функционального вещества

20 можно также проводить другим способом, известным специалистам в данной области техники, например, по реакции малеимида и сульфгидрильной группы.

С пептидом, описанным в данном контексте, можно также связать и другую функциональную молекулу. Например, такую другую молекулу можно связать через реакционноспособную функциональную группу (например, с

25 аминок группой на концевом фрагменте или т.п.), можно связать с реакционноспособной функциональной группой (например, азидной группой в качестве заместителя в остатке лизина) в случае, если аминокислота (например, остаток лизина) в пептиде содержит реакционноспособную функциональную группу или может быть связана с остатком Cys (например, остатком Cys в

30 линкере 2) в пептиде через малеимид.

Другие функциональные молекулы, способные связываться с пептидом, включают вещество-метку или медицинское лекарственное средство, каждый из которых содержит пептид, белок, нуклеиновую кислоту или низкомолекулярный фармацевтический препарат, без ограничения перечисленным. Любую молекулу,

в которой можно применить антигенную специфичность и другие свойства молекулы Fc, можно связать в качестве такой другой молекулы. Примеры такого вещества включают противораковый агент, низкомолекулярный фармацевтический продукт, радиационную метку, флуоресцентную метку, фармацевтический препарат на основе нуклеиновой кислоты, препарат для генной терапии, фармацевтический пептид и антитело, такое как IgA или VHH.

Пептид для связывания с носителем содержит по меньшей мере одну аминогруппу (-NH₂) для ковалентной связи с антителом. Такая аминогруппа предпочтительно представляет собой аминогруппу на амино-концевом фрагменте и может представлять собой любую аминогруппу в боковой цепи остатка лизина, остатка цистеина, остатка аспарагиновой кислоты, остатка глутаминовой кислоты, 2-аминосубериновой кислоты, диаминопропионовой кислоты и остатка аргинина.

Сшивка с использованием сшивающего агента приводит к высокой устойчивости к щелочам, и, таким образом, способ сшивки согласно настоящему варианту осуществления может представлять собой способ, включающий повышение устойчивости белка или пептида или гибридных продуктов, содержащих две или более SH-групп, к щелочи. Способ сшивки согласно настоящему варианту осуществления может представлять собой, например, способ повышения устойчивости дисульфидной связи к щелочи, способ повышения устойчивости белка или пептида, содержащих в молекуле дисульфидную связь, к щелочи, или способ повышения стабильности. Прежде всего, предложен способ улучшения устойчивости белка или пептида к щелочам, включающий связывание двух тиольных групп в белке или пептиде с использованием указанного способа.

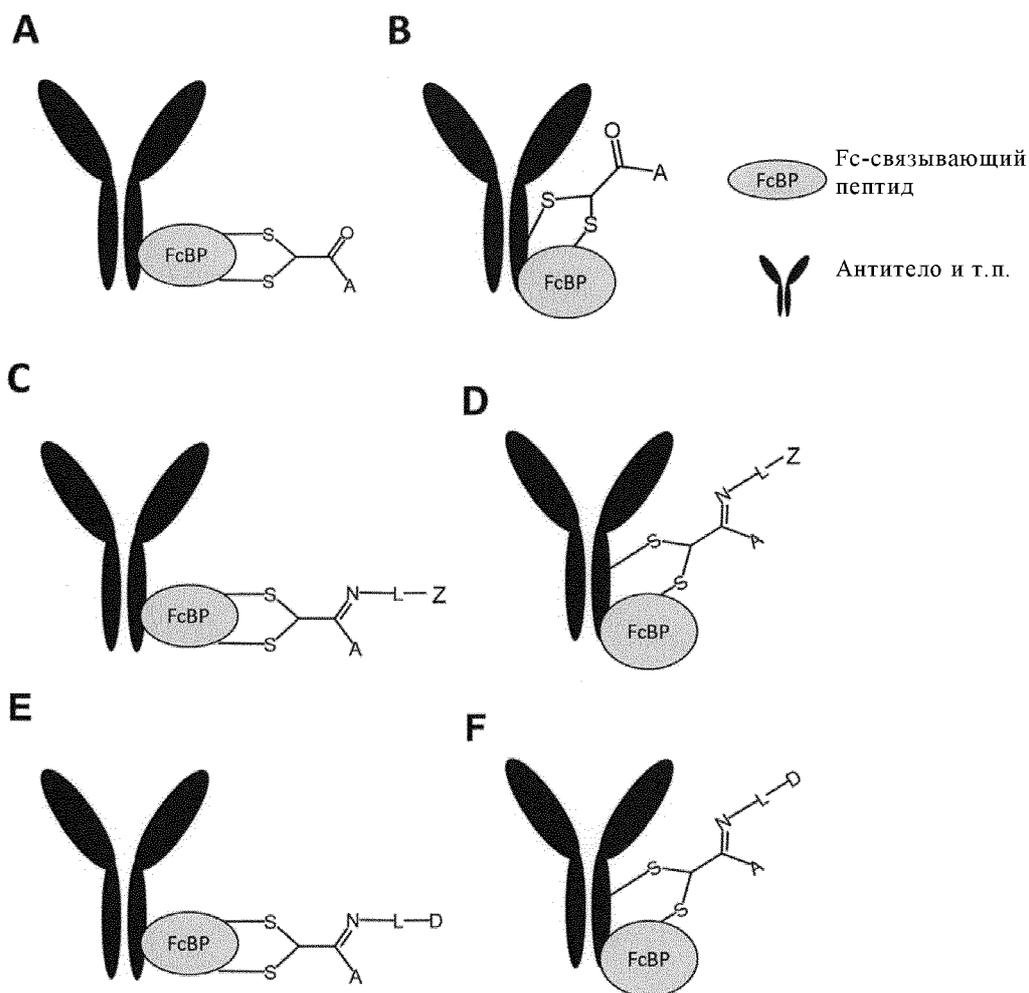
Молекула, содержащая IgG-Fc область, с которой связан сшитый Fc-связывающий пептид

Fc-связывающий пептид может быть связан с молекулой, содержащей IgG-Fc область. Соответственно, комплекс согласно другому варианту осуществления представляет собой комплекс Fc-связывающего пептида, внутримолекулярно сшитого с использованием сшивающего агента и молекулы, содержащей IgG-Fc область. Комплекс включает комплекс, в котором Fc-связывающий пептид, сшитый с использованием сшивающего агента, содержащим лекарственное средство, связан с молекулой, содержащей IgG-Fc

область, и комплекс, в котором Fc-связывающий пептид, сшитый с использованием сшивающего агента, содержащим реакционноспособную функциональную группу, связан с молекулой, содержащей IgG-Fc область.

Сшивающий агент согласно настоящему варианту осуществления может 5 обеспечивать сшивку между Fc-связывающим пептидом и молекулой, содержащей IgG-Fc область. Прежде всего, Fc-связывающий пептид может быть связан с SH-группой цистеинового остатка, содержащегося в антителе или т.п., через сшивающий агент. Fc-связывающий пептид в таком антителе или подобный Fc-связывающему пептиду продукт сшивки можно дополнительно 10 сшить внутримолекулярно, и, например, реакционноспособная функциональная группа/лекарственное средство может быть связана с Fc-связывающим пептидом с использованием внутримолекулярной сшивки и Fc-связывающий пептид можно дополнительно сшить с молекулой, содержащей Fc-область антитела или т.п. Соответственно, комплекс согласно другому варианту осуществления 15 представляет собой комплекс Fc-связывающего пептида и молекулы, содержащей IgG-Fc область, сшитых сшивающим агентом. Комплекс включает комплекс, в котором молекула, содержащая IgG-Fc область, и Fc-связывающий пептид сшиты сшивающим агентом, содержащим лекарственное средство, и комплекс, в котором молекула, содержащая IgG-Fc область, и Fc-связывающий 20 пептид сшиты сшивающим агентом, содержащим реакционноспособную функциональную группу.

[Формула 51]

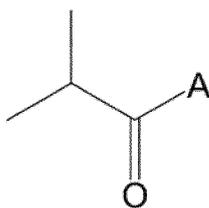


Термин «молекула, содержащая IgG-Fc область», использованный в данном контексте, означает пептид, белок или другой комплекс, содержащий Fc IgG область, и включает, кроме IgG дикого типа или искусственного типа и их мутанта, гибридный продукт Fc IgG области и другого вещества (активного компонента, лекарственного средства, белка, низкомолекулярного соединения, олигомера, среднемолекулярного соединения, высокомолекулярного соединения, матрицы, липида, липосомы, наночастицы, носителя для DDS, нуклеиновой кислоты и/или пептида), который представляет собой типированный гибридным Fc белком продукт, и молекулу, состоящую только из Fc-области. Например, в случае, когда Fc молекула представляет собой гибридный белок Fc, примеры белка или пептида, который предназначен для слияния с Fc, включают рецептор, цитокин, интерлейкин, фактор VIII, CTLA4, лактоферрин человека, рецептор TNF или LFA-3, или его часть (предпочтительно часть, связанная с мишенью).

Комплекс можно получить при контактировании Fc-связывающего пептида, сшитого сшивающим агентом, с молекулой, содержащей IgG-Fc область. Соответственно, способ получения молекулы, содержащей гибридный продукт IgG-Fc области и лекарственного средства, включает контактирование молекулы, содержащей IgG-Fc область, с Fc-связывающим пептидом, сшитым сшивающим агентом. В другом варианте, комплекс можно получать при связывании Fc-связывающего пептида с молекулой, содержащей IgG-Fc область, с последующей внутримолекулярной и/или межмолекулярной сшивкой с использованием сшивающего агента.

Соответственно, способ получения молекулы, содержащей IgG-Fc область, представляет собой способ получения молекулы, содержащей IgG-Fc область, где сшитый Fc-связывающий пептид связан, при этом способ включает: взаимодействие Fc-связывающего пептида, связанного с молекулой, содержащей IgG-Fc область, со сшивающим агентом для совместного связывания двух тиольных групп в Fc-связывающем пептиде через следующую группу:

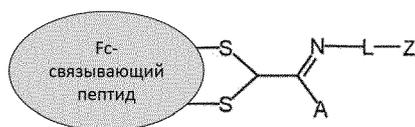
[Формула 52]



где A означает атом водорода, C1-6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или C1-6 алкильную группу.

Способ получения молекулы, содержащей IgG-Fc область, представляет собой способ получения молекулы, содержащей IgG-Fc область, где Fc-связывающий пептид, с которым связана реакционноспособная функциональная группа Z, представляет собой Fc-связывающий пептид, представленный на следующей формуле:

[Формула 53]



где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно
5 замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или
С1-6 алкильную группу, L означает линкер и Z означает реакционноспособную
функциональную группу,

который является связанным,
способ, включающий:

10 реакцию молекулы, содержащей область IgG-Fc, в которой сшитый Fc-
связывающий пептид, представленный на следующей формуле, является
связанным:

[Формула 54]



15 где А означает атом водорода, С1-6 алкильную группу, необязательно
замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или
С1-6 алкильную группу,

и NH₂-L-Z (L означает линкер, а Z означает реакционноспособную
20 функциональную группу), для введения реакционноспособной функциональной
группы в шитую часть сшитого Fc-связывающего пептида.

Способ связывания Fc-связывающего пептида с антителом или подобным
ему веществом можно осуществлять со ссылкой на международную публикацию
№ WO 2013/027796, международную публикацию № WO 2018/092867,
25 международную публикацию № WO 2020/075670 и/или т.п.

Аминокислота в остатке лизина, остатке цистеина, остатке аспарагиновой
кислоты, остатке глутаминовой кислоты, 2-аминосубериновой кислоте,
диаминопропионовой кислоты, остатке аргинина (предпочтительно остатке

лизина) или аминокислота в 1-м положении в Fc-связывающем пептиде является необязательно модифицированной фрагментом для ковалентного связывания с антителом и можно ковалентно связывать с антителом или т.п. в составе фрагмента, если пептид связан с антителом или т.п. В данном контексте Fc-связывающий пептид, модифицированный фрагментом, иногда называют «реагентом ССАР». Термин «фрагмент для ковалентного связывания с антителом», использованный в данном контексте, означает химическую структуру для связывания Fc-связывающего пептида и молекулы, содержащей IgG-Fc область, ковалентной связью, и может представлять собой химическую структуру, содержащую по меньшей мере один участок, способный связываться с требуемой аминокислотой (например, остатком лизина, остатком цистеина, остатком аспарагиновой кислоты, остатком глутаминовой кислоты, 2-аминосульфиновой кислоты, диаминопропиновой кислоты, или остатком аргинина). Примеры соединения, обеспечивающего фрагментом для ковалентного связывания с антителом, могут включать DSG (дисукцинимидилглутарат), DSS (дисукцинимидилсуберат), DMA (диметиладипимидат дигидрохлорид), DMP (диметилпимелимидат дигидрохлорид), DMS (диметилсуберимидат дигидрохлорид), DTBP (диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат дигидрохлорид) и DSP (дитиобис(сукцинимидилпропионовую кислоту)), и DSG, DSS или DSP являются предпочтительными. Например, сукцинимидильная группа, такая как DSS или DSG, вступает в реакцию с первичным амином, присутствующим в боковой цепи остатка лизина и на N-конце полипептида, и, таким образом, только боковую цепь остатка лизина IgBP можно специфически модифицировать с использованием DSS или DSG при блокировании N-конца Fc-связывающего пептида и последующего проведения реакции с DSS или DSG. Сшивка между Fc-связывающим пептидом и IgG может происходить сайт-специфичным методом, например, между аминокислотным остатком X⁵, X⁹, X¹¹, X¹² или X¹⁴ Fc-связывающего пептида и Lys248 или Lys246 в Fc-области IgG, предпочтительно Lys248.

Связывание между Fc-связывающим пептидом в качестве реагента ССАР и антителом или т.п. в значительной степени не ограничена при условии, что связывание осуществляется в условиях, допускающих осуществление реакции сшивки, и его можно осуществлять, например, по реакции Fc-связывающего

пептида и антитела и т.п. при смешивании в пригодном буферном растворе при комнатной температуре (например, приблизительно от 15°C до 30°C). Стадию смешивания можно осуществлять при необходимости при добавлении требуемого количества катализатора, ускоряющего реакцию сшивки.

- 5 Соотношение при смешивании Fc-связывающего пептида и антитела или т.п. на стадии смешивания может составлять от 1:1 до 20:1, предпочтительно от 2:1 до 20:1 или от 5:1 до 10:1, например, в терминах молярного соотношения Fc-связывающий пептид/антитело и т.п. Время смешивания (время реакции) на
- 10 стадии смешивания может составлять, например, от 1 мин до 5 ч, предпочтительно от 10 мин до 2 ч или от 15 мин до 1 ч. Полученный связанный продукт можно при необходимости очищать дополнительно.

Fc-область IgG или т.п. обычно образует константную область тяжелой цепи, которая представляет собой симметричную пару из двух, и, таким образом, могут присутствовать два участка связывания Fc-связывающего пептида.

- 15 Соответственно, от одного до двух пептидов, предпочтительно один пептид из Fc-связывающего пептида, можно связать с одной молекулой, содержащей IgG-Fc участок.

Сшитый Fc-связывающий пептид, связанный с носителем

- 20 Fc-связывающий пептид можно связать с носителем, которым заполнена колонка или т.п., и, таким образом, использовать для очистки антитела или т.п. Способ сшивки по настоящему изобретению приводит к повышению устойчивости к щелочи, и, таким образом, Fc-связывающий пептид, сшитый сшивающим агентом по настоящему изобретению, можно использовать для
- 25 повторного использования носителя при однократной или многократной промывки щелочью. Соответственно, в одном объекте предлагается носитель, в котором Fc-связывающий пептид, внутримолекулярно сшитый сшивающим агентом, является связанным. Связывание пептида с носителем можно осуществлять, например, по реакции пептида с носителем, содержащим функциональную группу, которая взаимодействует с аминок группой. Реакцию
- 30 проводят в условиях, обеспечивающих достаточное связывание обоих реагентов, и ее можно проводить, например, при контактировании их в буферном растворе при комнатной температуре в течение от 1 до 5 ч (предпочтительно от 2,5 до 3,5 ч).

Примеры носителя включают формы геля (например, гель для колонок), частицы, гранулы, наночастицы, мелкие частицы, макрогранулы, мембрану, микропланшет и чип, а примеры материала, из которого они состоят, включают магнитное вещество, латекс, агарозу, стекло, целлюлозу, сефарозу, нитроцеллюлозу, полистирол и другие полимерные материалы. Носитель предпочтительно представляет собой гель для колонок (колоночная хроматография). Носитель, используемый в данном контексте, может представлять собой, например, HiTrap NHS-активированный HP (GE Healthcare).

Предлагается также способ очистки молекулы, содержащей IgG-Fc область, с использованием носителя. Способ очистки антитела или т.п. в одном объекте включает контактирование жидкости, содержащей антитело или т.п., с носителем для связывания таким образом антитела или т.п. с носителем, промывку и удаление компонента, не связанного с носителем, и элюирование и извлечение компонента, связанного с носителем.

Контактирование жидкости, содержащей антитело, или подобной жидкости, с носителем осуществляют в условиях, обеспечивающих достаточную степень контактирования обоих. Например, если носитель представляет собой колонку, то контактирование осуществляют при введении в колонку жидкости, содержащей антитело или подобное вещество. Удаление компонента, не связанного с носителем, можно осуществить обычным способом, например, при промывке носителя, связанного с антителом или т.п., буферным раствором (рН приблизительно 7,0). Выделение антитела или т.п., связанного с носителем, можно проводить при рН 2,5 или выше, и желательно, при низкой степени кислотности для предотвращения денатурации антитела или т.п., и рН предпочтительно составляет 3,6 или более, и может составлять, например, от 3,6 до 4,3. В другом варианте, если в качестве носителя используются гранулы, антитело или т.п. можно выделять при контактировании антитела или т.п. с носителем с последующим выделением гранул при центрифугировании или т.п. и их повторным суспендированием в элюате.

Медицинская композиция

В другом аспекте предлагается медицинская композиция, содержащая в качестве активного ингредиента пептид и/или белок, сшитые сшивающим агентом, или молекулу, содержащую IgG-Fc область, в которой связан Fc-связывающий пептид, сшитый сшивающим агентом по настоящему

изобретению, прежде всего, лекарственное средство, профилактическое лекарственное средство или средство для диагностики. Пептид или белок, сшитый сшивающим агентом, с которым связано лекарственное средство, обладающее терапевтическим или профилактическим действием, можно использовать в медицинской (терапевтической или профилактической) композиции.

Если вышеуказанный пептид и/или белок, или лекарственное средство D, связанное с использованием сшивающего агента, являются/является терапевтическим лекарственным средством, профилактическим лекарственным средством или лекарственным средством, служащим в качестве вакцины, пептид и/или белок являются сшитыми, или антитело или т.п., где пептид и/или сшитый белок являются/является связанными, можно использовать для лечения или профилактики.

Если вышеуказанный пептид и/или белок, или лекарственное средство D, связанное с помощью сшивающего агента, представляют собой/является лекарственным средством, служащим в качестве метки, пептид и/или белок является сшитым, или антитело и т.п., где пептид и/или белок являются/является сшитым, можно использовать для диагностики или етктирования.

Если указанная выше композиция представляет собой терапевтическую или профилактическую композицию, то лекарственное средство представляет собой терапевтическое средство или профилактическое средство, а если указанная выше композиция представляет собой диагностический продукт, то лекарственное средство представляет собой вещество-метку. Целевое заболевание медицинской композиции можно установить соответствующим образом за счет выбора пептида, белка или антитела или т.п., которые будут использовать, и лекарственного средства, которое необходимо связать, и его примеры включают рак, воспалительное заболевание, инфекцию и нейродегенеративное заболевание.

Например, медицинскую композицию можно использовать в качестве препарата для инъекций, и она включает лекарственные формы, такие как препарат для внутривенных инъекций, препарат для подкожных инъекций, препарат для внутрикожных инъекций, препарат для внутримышечных инъекций и препарат для капельных инъекций. Такой препарат для инъекций можно получить, например, при растворении, суспендировании или эмульгировании

активного ингредиента в стерильной водной или масляной жидкости, которую обычно используют в препаратах для инъекций, в соответствии с известным способом. Полученный раствор для инъекций обычно упаковывают в соответствующую ампулу, флакон или шприц. Раствор для инъекций также можно получить при добавлении соответствующего эксципиента к активному ингредиенту, при этом получают лиофилизированный состав, и растворении состава в растворителе для инъекций, физиологическом растворе или т.п. перед применением. Несмотря на то, что введение белка, такого как антитело, пероральным способом, обычно затруднено из-за его разложения в пищеварительной системе, такое введение пероральным способом также можно осуществить вследствие оригинальности и неординарности фрагмента антитела и модифицированного фрагмента антитела, а также лекарственной формы. Примеры состава для перорального введения могут включать капсулу, таблетку, сироп и гранулу.

Медицинскую композицию соответствующим образом получают в виде лекарственной формы стандартной дозы, адаптированной к количеству вводимого активного компонента. Лекарственная форма стандартной дозы представляет собой, например, препарат для инъекций (ампула, флакон или предварительно заполненный шприц) и обычно может содержать от 5 до 500 мг, от 5 до 100 мг, от 10 до 250 мг активного ингредиента или лекарственного средства в расчете на лекарственную форму стандартной дозы.

Путь введения медицинской композиции может являться местным или системным. Способ введения в значительной степени не ограничен и представляет собой введение парентеральным или пероральным способом, как описано выше. Примеры парентерального способов введения включают введение подкожным способом, введение внутрибрюшинным способом, введение в кровь (внутривенным или внутриартериальным способом) или инъекцию или капельное введение в спинномозговую жидкость, при этом введение в кровь является предпочтительным. Лечебную или диагностическую композицию можно вводить временно или можно вводить непрерывно или периодически. Например, введение также может представлять собой непрерывное введение в течение от 1 мин до 2 недель. Схема введения медицинской композиции в значительной степени не ограничивается при условии, что доза и время введения устанавливаются таким образом, чтобы обеспечить требуемый терапевтический

эффект или профилактический эффект, и ее можно соответствующим образом определить в зависимости от симптома, пола, возраста и т.п. Например, разовую дозу активного ингредиента целесообразно вводить примерно от одного до десяти раз в день, предпочтительно от одного до пяти раз в день, обычно от примерно 0,01 до 20 мг/кг массы тела, предпочтительно примерно от 0,1 до 10 мг/кг массы тела, более предпочтительно приблизительно от 0,1 до 5 мг/кг массы тела в виде внутривенной инъекции до и/или после развития клинических симптомов заболевания. В случаях другого парентерального введения и перорального введения, введение можно осуществлять в аналогичной дозе.

Далее настоящее раскрытие более подробно описано со ссылкой на примеры, однако настоящее раскрытие не ограничивается этими примерами. Все документы, цитируемые в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки.

Пример 1

Получение циклического пептида, сшитого 1,1-дихлорацетоном

Исходный пептид [последовательность: Fmoc-HN-GSGGS-GPDCAYHRGELVWCTFH (SEQ ID NO: 1): IgGBP-longGS или IgGBP-LGS] синтезировали по заказу (фирма Eurofins) методом твердофазного пептидного синтеза (Fmoc-метод). В 1500 мкл DMF растворяли 5 мг (1,95 мкмоль) исходного пептида, к нему добавляли TCEP-HCl (1,12 мг, 3,9 мкмоль, 2 моль-экв.), предварительно растворенный в 2 мл PBS (pH 7,4), и реакцию восстановления проводили при перемешивании при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем добавляли 1,1-дихлор-2-пропанон (0,495 мг, 3,9 мкмоль, 2 моль-экв.), растворенный в 120 мкл ацетонитрила, и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 1 ч завершение реакции подтверждали методом ЖХ-МС-анализа (на установке LC-MS8030 производства фирмы SHIMADZU CORPORATION), и реакционный раствор очищали методом ВЭЖХ (на колонке с обращенной фазой C18), при этом получали Fmoc-циклизованный пептид (2 мг, 0,76 мкмоль, выход 40%). Затем добавляли 2% пиперидин для удаления защитной группы Fmoc, завершение реакции подтверждали через 10 мин методом ЖХ-МС-анализа (на установке LC-MS8030 производства фирмы SHIMADZU CORPORATION), и реакционный раствор очищали напрямую методом ВЭЖХ (на колонке с обращенной фазой C18), при этом получали циклизованный пептид (1 мг, 0,38 мкмоль, выход 20%). Окончательно

очищенный пептид подвергали процедуре подтверждения молекулярной массы методом ЖХ-МС-анализа (на установке LC-MS8030 производства фирмы SHIMADZU CORPORATION), а затем лиофилизировали.

Пример 2

5 Получение 1,1-дихлорпинаколин-сшитого циклического пептида

Исходный пептид [последовательность: Fmoc-HN-GSGGS-GPDCAYHRGELVWCTFH (SEQ ID NO: 1)] синтезировали по заказу (фирма Eurofins) методом твердофазного пептидного синтеза (Fmoc-метод). В 1500 мкл DMF растворяли 10 мг (3,9 мкмоль) исходного пептида, к нему добавляли TCEP-HCl (2,24 мг, 7,8 мкмоль, 2 моль-экв.), предварительно растворенный в 2 мл PBS (pH 7,4), и реакцию восстановления проводили при перемешивании при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем добавляли 1,1-дихлорпинаколин (1,32 мг, 7,8 мкмоль, 2 моль-экв. моля), растворенный в 120 мкл ацетонитрила, и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 1 ч
15 завершение реакции подтверждали методом ЖХ-МС-анализа (на установке LC-MS8030 производства фирмы SHIMADZU CORPORATION), и реакционный раствор очищали методом ВЭЖХ (на колонке с обращенной фазой C18), при этом получали Fmoc-циклизованный пептид (7 мг, 2,7 мкмоль). Затем добавляли 2% пиперидин для удаления защитной группы Fmoc, завершение
20 реакции подтверждали через 10 мин методом ЖХ-МС-анализа (на установке LC-MS8030 производства фирмы SHIMADZU CORPORATION), и реакционный раствор очищали напрямую методом ВЭЖХ (на колонке с обращенной фазой C18), при этом получали циклизированный пептид (5 мг, 2,04 мкмоль, выход 50%). Подтверждение молекулярной массы окончательно очищенного пептида
25 проводили методом ЖХ-МС-анализа (на установке LC-MS8030 производства фирмы SHIMADZU CORPORATION), а затем лиофилизировали.

Пример 3

Получение циклического пептида, сшитого 2,2-дихлорацетофеноном

Исходный пептид [последовательность: Fmoc-HN-GSGGS-GPDCAYHRGELVWCTFH (SEQ ID NO: 1)] синтезировали по заказу (фирма Eurofins) методом твердофазного пептидного синтеза (Fmoc-метод). В 1500 мкл DMF растворяли 2,5 мг (1,00 мкмоль) исходного пептида, к нему добавляли
30 предварительно растворенный в 2 мл PBS (pH 7,4) TCEP-HCl (0,506 мг, 2,0 мкмоль, 2 моль-экв.) и реакцию восстановления проводили при перемешивании

при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем добавляли 2,2-дихлорацетофенон (0,38 мг, 2,0 мкмоль, 2 моль-экв.), растворенный в 120 мкл ацетонитрила, и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 1 ч завершение реакции подтверждали методом ЖХ-МС-анализа (на установке LC-MS8030 производства фирмы SHIMADZU CORPORATION), и реакционный раствор очищали методом ВЭЖХ (на колонке с обращенной фазой C18), при этом получали приблизительно 2 мг Fmoc-циклизованного пептида. Затем добавляли 2% пиперидин для удаления защитной группы Fmoc, завершение реакции подтверждали через 10 мин методом ЖХ-МС-анализа (на установке LC-MS8030 производства фирмы SHIMADZU CORPORATION), и реакционный раствор очищали напрямую методом ВЭЖХ (на колонке с обращенной фазой C18), при этом получали циклизированный пептид (1,2 мг, 0,49 мкмоль, выход 49%). Подтверждение молекулярной массы окончательно очищенного пептида проводили методом ЖХ-МС-анализа (на установке LC-MS8030 производства фирмы SHIMADZU CORPORATION), а затем лиофилизировали.

Пример 4

Определение аффинности связывания сшитого циклического пептида

Анализ аффинности проводили следующим способом. Сначала на биосенсоре VIAcoreT200 (фирмы GE Healthcare) устанавливали сенсорный чип CM5, и в сенсорный чип впрыскивали 0,4 М раствор 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (EDC) в смеси с 0,1 М раствором сульфо-N-гидроксисукцинимид (сульфо-NHS), смешанных в эквивалентных количествах, при скорости потока 10 мкл/мл, чтобы тем самым активировать сенсорный чип. Затем IgG иммобилизовали на сенсорном чипе при pH 5,5 (10 мМ ацетат натрия). При определении использовали буферный раствор HBS-EP (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,005% Tween 20, 3 мМ ЭДТА, pH 7,4) и вводили 15,625, 31,2, 62,5, 125, 250 и 500 нМ каждого пептида при скорости потока 50 мкл/мл в течение 180 с, чтобы таким образом контролировать реакцию связывания. При анализе реакции диссоциации вводили только буферный раствор в течение 600 с. Параметр взаимодействия анализировали с помощью программного обеспечения VIAevaluation T100.

Сравниваемые и оцениваемые производные IgG-связывающего пептида изображены на фигуре 1. Результаты оценки аффинности этих пептидов к IgG1

человека указаны в таблице 1. Значение K_d (равновесной константы диссоциации) аффинности исходного IgG-связывающего пептида, характеризующегося наличием дисульфидной связи, составило 8,2 нМ, а указанная величина для сшитого 1,3-дихлорацетоном циклического пептида составила 4,9 мкМ, и аффинность снижалась приблизительно в 500 раз. Аналогичным образом значение K_d для циклического пептида, сшитого 1,1-дихлорацетоном, составило 45,6 нМ и снижалось приблизительно в 5 раз по сравнению с этим значением для исходного пептида, значение K_d для циклического пептида, сшитого 1,1-дихлорпинаколином, составило 112 нМ и снизилось приблизительно в 14 раз по сравнению с этим значением для исходного пептида, а значение K_d для циклического пептида, сшитого 2,2-дихлорацетофеноном, составило 6,4 нМ и было сравнимо с этим значением для исходного пептида.

Таблица 1

Наименование пептида	Последовательность пептида	Наименование сшивающего агента	SPR (поверхностный плазмонный резонанс)		
			k_a	k_d	Значение K_d (нМ)
IgG-BP-LongGS	GSGGSGPDCAYHRGELVWCTFH	Исходный	2,37E+06	0,019	8,0
		1,1-дихлорацетон	1,84E+06	0,0604	45,6
		1,1-дихлорацетофенон	5,64E+06	0,03625	6,4
		1,1-дихлорпинаколин	3,33E+06	0,0677	112,0
		1,3-дихлорацетон	1,00E+06	0,005	4900

15

Пример 5

Подготовка колонки с иммобилизованным пептидом и очистка IgG

5 мл 1 мМ соляной кислоты наносили на предварительно заполненную NHS-активированную колонку объемом 1 мл и из колонки удаляли раствор изопропанола. Затем раствор пептида с концентрацией 10,0 мг/мл (растворенный в 100 мкл ДМСО) разбавляли раствором для конденсации (20 мМ карбонатный буферный раствор, 50 мМ хлорид натрия, pH 8,3) в 10 раз, наносили 1 мл жидкости для разбавления и проводили иммобилизацию при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем непрореагировавший NHS блокировали 5 мл 1 М Трис (pH 8,0) при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем колонку промывали 5 мл 0,1 н. водного раствора NaOH. Наконец, наносили 10 мл

25

раствора PBS (20 мМ фосфатного буферного раствора, 150 мМ хлорида натрия, рН 7,4) и использовали в хроматографическом анализе.

Полученную колонку с иммобилизованным IgG-связывающим пептидом соединяли с жидкостной хроматографической системой BioLogic LP (производства фирмы Bio-Rad Laboratories Inc.) и уравнивали PBS. Затем 1 мг/мл IgG, полученного из сыворотки крови человека (производства фирмы Sigma-Aldrich Co. LLC), растворенного в PBS, наносили при скорости потока 1 мл/мин в течение 1 мин. Кроме того, колонку промывали PBS и элюцию осуществляли с использованием элюирующего раствора (100 мМ глициновый буферный раствор, рН 2,8), при этом элюировали IgG в качестве адсорбированного компонента. Элюцию IgG из колонки контролировали по поглощению при 280 нм.

Пример 6

Определение динамической связывающей способности (DBC) и оценка 1
15 стабильности к действию щелочи колонки с иммобилизованным пептидом

Колонку, в которой количество иммобилизованного пептида составляло 1 мг, получали, как описано выше. Полученную колонку уравнивали PBS, и 1 мг/мл IgG, полученного из сыворотки крови человека (производства фирмы Sigma-Aldrich Co. LLC), растворенного в PBS, наносили при скорости потока 1 мл/мин (время удерживания 1 мин). DBC указывали как величину, определенную по количеству белка, добавленного в момент времени, когда элюировалось 10% добавленного образца, определяемого по поглощению при 280 нм.

Затем 5 мл 0,1 н. водного раствора гидроксида натрия пропускали через колонку объемом 1 мл, на которой иммобилизовали 1 мг пептида. После этого проводили промывку с помощью PBS. Этот цикл повторяли 30 раз для циклического пептида, сшитого 1,1-дихлорацетоном, и повторяли 10 раз для циклического пептида, сшитого 1,1-дихлорпинаколином. Определение DBC выполняли при скорости потока 1 мл/мин с 1-го по 5-й и на 10-м цикле, а затем проводили с 20-го и 30-го циклов в отношении циклического пептида, сшитого 1,1-дихлорацетоном, и таким образом оценивали стабильность к действию щелочи. Изменение DBC определяли на основе результатов измерений, предполагая, что DBC сразу после изготовления колонки составляет 100% в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Число промывок 0,1 н. NaOH	IgG-BP-LGS/2,2-дихлорацетон (IgGBPLGS-DCA)			
	Максимальная связывающая способность (мг)	Изменение максимальной связывающей способности IgGBPLGS-DCA (%)	Динамическая связывающая способность (мг/мл)	Изменение динамической связывающей способности IgGBPLGS-DCA (%)
1	9,68	100,0	12,78	100,0
2	9,70	100,2	12,78	100,0
3	9,88	102,1	12,18	95,3
4	10,12	104,5	12,18	95,3
5	9,93	102,6	12,38	96,9
10	9,32	96,3	12,18	95,3
20	8,35	86,3	12,18	96,9
30	8,78	90,7	11,58	90,6

Число промывок 0,1 н. NaOH	IgG-BP-LGS/1,1-дихлорпинаколин (IgGBPLGS-DCP)			
	Максимальная связывающая способность (мг)	Изменение максимальной связывающей способности IgGBPLGS-DCP (%)	Динамическая связывающая способность (мг/мл)	Изменение динамической связывающей способности IgGBPLGS-DCP (%)
1	12,11	100,0	16,70	100,0
2	12,09	99,8	17,20	103,0
3				
4				
5	10,87	89,8	16,24	97,2
10	10,55	87,1	14,46	86,6
20				
30				

Число промывок 0,1 н. NaOH	IgG-BP-LGS			
	Максимальная связывающая способность (мг)	Изменение максимальной связывающей способности IgGBPLGS (%)	Динамическая связывающая способность (мг/мл)	Изменение динамической связывающей способности IgGBPLGS (%)
1	12,37	100,0	17,24	100,0
2				
3				
4				
5	6,09	49,2	8,74	50,7
10				
20				
30				

5 В этом отношении, хотя начальное значение DBC колонки для каждого пептида составляло 17,24 мг/мл на колонку в случае исходного пептида и 2,3 мг/мл на колонку в случае пептида, сшитого 1,3-дихлорацетоном, значение DBC составляло 12,8 мг/мл на колонку в случае пептида, сшитого 1,1-дихлорацетоном

и 16,70 мг/мл на колонку в случае пептида, сшитого 1,1-дихлорпинаколином. Соответственно, было установлено, что эффективность адсорбции IgG оказалась высокой по сравнению с обычным сшитым циклическим пептидом.

Пример 7

5 Определение динамической связывающей способности (DBC) и оценка 2 стабильности к действию щелочи колонки с иммобилизованным пептидом

10 Через полученную колонку объемом 1 мл, в которой количество
иммобилизованного пептида составляло 1 мг, пропускали 5 мл 0,1 М раствора
гидроксида натрия, затем проводили промывку 5 мл PBS. Эти операции
10 обозначены как один цикл, а обработку промывкой водным раствором NaOH и
промывкой PBS выполняли от 1 до 30 раз, затем определяли DBC при скорости
10 потока 1 мл/мин заданное количество раз (1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 раз).

15 Результаты проиллюстрированы на фигуре 2. Было установлено, что хотя
степень связывания антитела с колонкой снижалась после промывки щелочью в
15 случае исходного IgG-связывающего пептида, характеризующегося наличием
дисульфидной связи (не показано), снижение степени связывания антител к
колонке было чрезвычайно мало как в случае пептида, сшитого 1,1-
дихлорацетоном, так и пептида, сшитого 1,1-дихлорпинаколином.

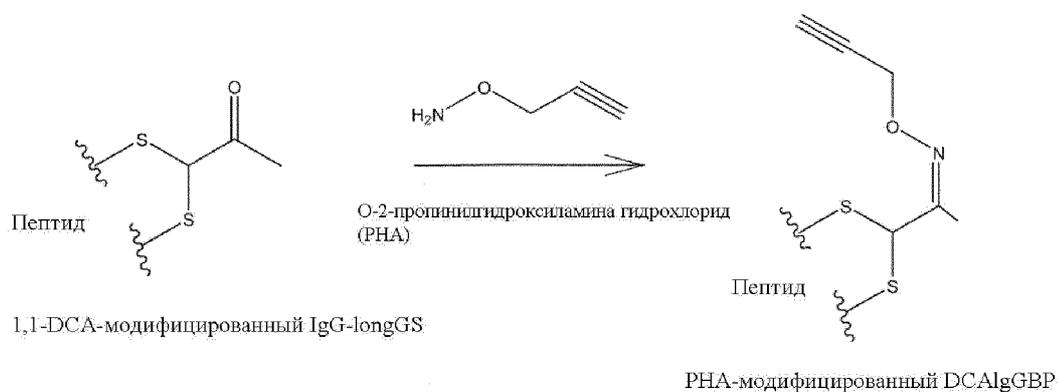
20 На фигуре 3 представлены результаты сравнения скорости изменения
количества антител при значении DBC 10%. В то время как DBC исходной
колонки с иммобилизованным IgG-связывающим пептидом, характеризующимся
наличием дисульфидной связи, снижалась до 50% или менее при 5-кратной
промывке щелочью, DBC пептида, сшитого 1,1-дихлорацетоном, сохранялась на
уровне 90% или более при 30-кратной промывке, а DBC пептида, сшитого 1,1-
25 дихлорпинаколином, сохранялась на уровне 85% или более при 10-кратной
промывке (фигура 3). Таким образом, было установлено, что пептид, сшитый
1,1-дихлорацетоном, и пептид, сшитый 1,1-дихлорпинаколином,
характеризовались значительно более высокой стабильностью к действию
щелочи. В этом отношении, в то время как значение DBC само по себе для
30 исходной колонки с иммобилизованным IgG-связывающим пептидом,
характеризующимся наличием дисульфидной связи, составляло 17,24 мг/мл, то
для колонки с пептидом, сшитым 1,1-дихлорацетоном, DBC составила 12,8 мг/мл
и соответствовала приблизительно 74%, а для колонки с пептидом, сшитым 1,1-
дихлорпинаколином, составила 16,70 мг/мл и соответствовала приблизительно

96%. Как правило, DBC значительно варьируется также в зависимости от количества иммобилизованного лиганда (пептида) и скорости потока, поэтому колонки, в которых использовали пептид, сшитый 1,1-дихлорацетоном, и пептид, сшитый 1,1-дихлорпинаколином, соответственно, также рассматриваются как пригодные для обработки в качестве колонок, предназначенных для практического использования при определении оптимальных условий.

Пример 8

Введение реакционноспособной функциональной группы

10 [Схема 55]



0,201 мкмоль Полученного сшитого 1,1-дихлорацетоном циклического пептида растворяли в 400 мкл DMF и в полученный раствор добавляли 100-кратный объем раствора гидрохлорида О-2-пропинилгидроксиламина (20,1 мкмоль), полученного растворением в 1,0 мл 0,2 М буферного раствора NaHCO_3 (рН 8,3), добавленного заранее. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Завершение реакции подтверждали методом ЖХ-МС-анализа (на установке LC-MS8030 производства фирмы SHIMADZU CORPORATION), и реакционный раствор очищали напрямую методом ВЭЖХ (колонка с обращенной фазой C18), при этом получали сшитый циклический пептид с введенной алкиновой функциональной группой (0,10 мкмоль, выход 50%). Молекулярную массу окончательно очищенного пептида подтверждали методом ЖХ-МС-анализа (на установке LC-MS8030 производства фирмы SHIMADZU CORPORATION), а затем лиофилизировали. Аффинность полученного соединения определяли, как описано в примере 4 (определение аффинности связывания сшитого циклического пептида), и полученное значение

Kd составило 334 нМ и снижалось приблизительно в 42 раза по сравнению с величиной для исходного пептида.

Пример 9

Сшивка антитела VHH с 1,1-дихлорацетоном

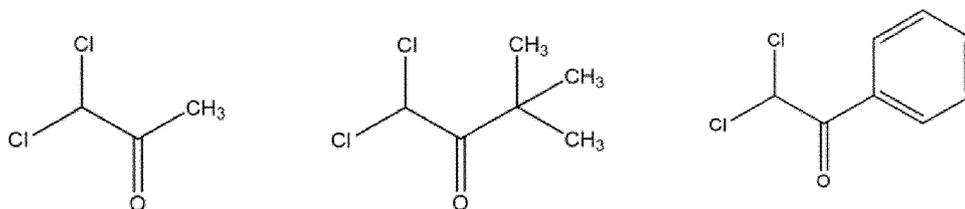
5 Раствор мочевины добавляли к 100 мкл (95 мкг, 56×10^{-10} моль) раствора 950 мкг/мл анти-CD89 VHH-антитела (IgARC25) в PBS (pH 7,4) до конечной концентрации 5 М, и смесь выдерживали при комнатной температуре 1 ч. Затем добавляли ТСЕРТСЕР-НСl (11,2 нмоль, 2 моль-экв.) и проводили реакцию восстановления при перемешивании при комнатной температуре в течение 30
10 мин. Затем добавляли 1,1-дихлорацетон (11DCA, 11,2 нмоль, 2 моль-экв.), растворенный в 120 мкл ацетонитрила, и смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 1 ч завершение реакции подтверждали методом ЖХ-МС-анализа (на установке Bio-Accord SYSTEM производства фирмы Waters Sorpogation). В результате молекулярная масса IgARC25 составила 14028 Да до
15 сшивки и 14085 Да после обработки 11DCA, и было установлено, что она увеличилась на 57 Да, и таким образом подтверждали сшивку с помощью 11DCA.

Пример 10

20 Получение пептида, характеризующегося сшитой структурой, с помощью пептидного синтеза

В ходе реакции сшивки дисульфидной связи с помощью соединения, производного 1,1-дихлорацетона (1,1-дихлорацетон, 1,1-дихлорпинаколин, 2,2-дихлорацетофенон), представленного следующей формулой:

[Схема 56]



25 пептид, содержащий два остатка Cys, каждый из которых модифицирован Fmoc на N-конце (или пептид, полученный восстановлением пептида, модифицированного Fmoc на N-конце и характеризующийся наличием
30 дисульфидной связи), и от 1,0 до 2,0 экв. соединения, производного 1,1-

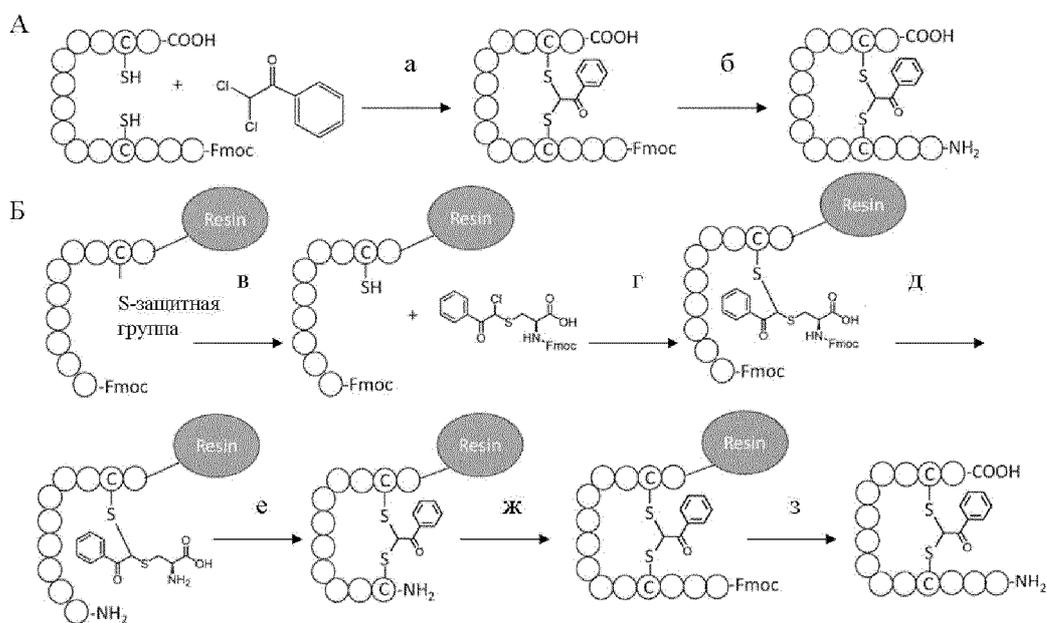
дихлорацетона, взаимодействовали в PBS, тем самым осуществляли сшивку (стадия а на схеме А), и, наконец, Fmoc на N-конце удаляли и снимали защитные группы (стадия б на схеме А), при этом получали соединение, как показано на следующей схеме. С другой стороны, был разработан способ, не

5 соответствующий этому методу, в котором реакцию сшивки проводили в ходе пептидного синтеза Fmoc-методом, как показано на схеме В. Пептид, содержащий один из двух остатков Cys, предназначенных для сшивки, синтезировали от С-конца к предыдущему концу другого Cys на смоле для пептидного синтеза Fmoc-методом. Защитную группу Cys в пептиде удаляли

10 (стадия с на схеме В), а затем добавляли и присоединяли Fmoc-хлорацетофеноилцистеин (стадия d на схеме В). Fmoc-защитную группу снимали (стадия е на схеме В), и α -аминогруппу на N-конце образовавшегося пептида, а также α -карбоксильную группу со стороны ацетофеноилцистеина конденсировали (стадия f на схеме В). Оставшиеся аминокислоты присоединяли

15 и проводили синтез Fmoc-методом (стадия g на схеме В), и, наконец, после отщепления от смолы и удаления Fmoc-защитной группы получали конечный пептид.

[Схема 57]

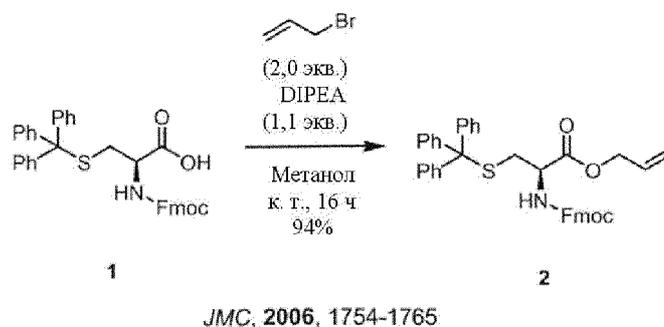


(Синтез Fmoc-аллилированного хлорацетофеноилцистеина)

20 Fmoc-хлорацетофеноилцистеин (в дальнейшем соединение 5), используемый в настоящем методе, синтезировали следующим способом. Затем

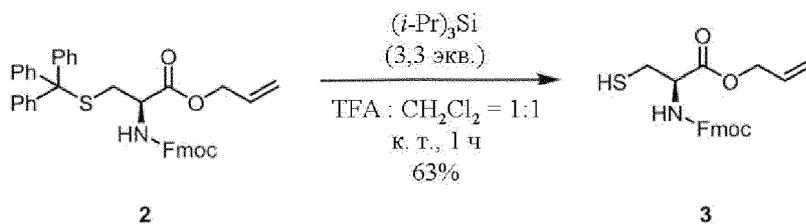
α -карбоксильную группу Fmoc-хлорацетофеноилцистеина защищали аллильной группой.

[Схема 58]



5 N,N-Диизопропилэтиламин (1,60 мл, 9,38 ммоль, 1,1 экв.) добавляли в токе аргона к ацетонитрильному раствору (85 мл) соединения 1 (5,00 г, 8,53 ммоль) и аллилбромид (1,44 мл, 17,1 ммоль, 2 экв.), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. После завершения реакции при добавлении воды реакцию смесь концентрировали и затем экстрагировали этилацетатом, органический слой промывали насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия, водным 2 н. раствором хлористоводородной кислоты и насыщенным солевым раствором, а затем сушили над сульфатом натрия. Полученный продукт концентрировали и полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат 4:1), при этом получали соединение 2 (5,03 г, 94%).

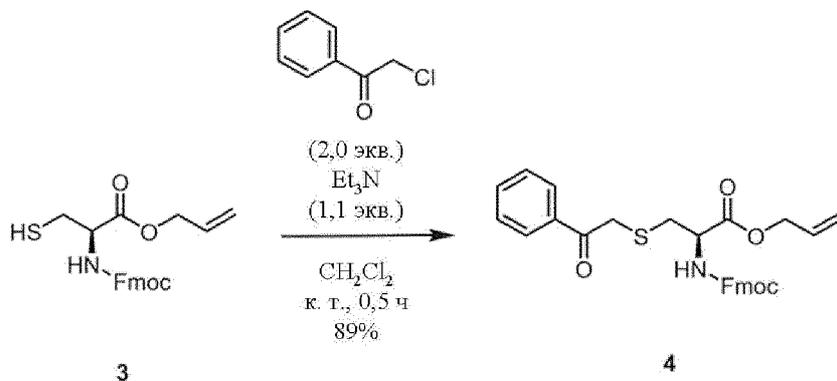
15 [Схема 59]



20 Соединение 2 (5,03 г, 8,03 ммоль) и триизопропилсилан (5,45 мл, 26,5 ммоль, 3,3 экв.) добавляли к раствору трифторуксусной кислоты и дихлорметана при соотношении 1:1 (30 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. После завершения реакции и последующей азеотропной перегонки с толуолом остаток, полученный с помощью концентрирования, очищали

колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат 4:1), при этом получали соединение 3 (1,94 г, 63%).

[Схема 60]

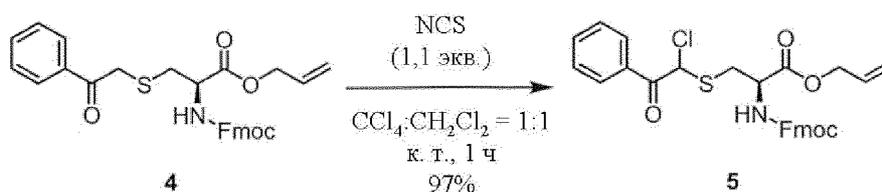


Триэтиламин (0,401 мл, 2,90 ммоль, 1,1 экв.) добавляли в токе аргона к
5 раствору (26 мл) соединения 3 (1,00 г, 2,63 ммоль) и фенацилхлорида (814 мг,
5,27 ммоль, 2 экв.) в дихлорметане и смесь перемешивали при комнатной
температуре в течение 30 мин. После завершения реакции при добавлении воды
проводили экстракцию дихлорметаном, органический слой промывали
насыщенным солевым раствором и затем сушили над сульфатом натрия.
10 Полученный продукт концентрировали и полученный остаток очищали
колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат 2:1), при этом
получали соединение 4 (1,17 г, 89%).

По данным метода ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , част./млн): δ 7,96 (d, $J = 7,8$
Гц, 2H), 7,76 (d, $J = 7,3$ Гц, 2H), 7,64–7,57 (m, 3H), 7,47 (dd, $J = 7,6, 8,0$ Гц, 2H),
15 7,40 (dd, $J = 7,3, 7,8$ Гц, 2H), 7,31 (ddd, $J = 1,4, 7,3, 7,3$ Гц, 2H), 5,94–5,84 (m, 2H),
5,33 (d, $J = 16,9$ Гц, 1H), 5,24 (dd, $J = 1,4, 10,1$ Гц, 1H), 4,71–4,64 (m, 3H), 4,40–
4,38 (m, 2H), 4,23 (dd, $J = 6,9, 6,9$ Гц, 1H), 3,90 (s, 2H), 3,16–3,03 (m, 2H).

По данным метода HRMS (FAB-TOF) m/z : $[(M+H)^+]$, рассч. для
 $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_1\text{O}_5\text{S}_1$, составила 502,1688, найд. составила 502.1690.

20 [Схема 61]



Раствор соединения 4 (204 мг, 0,401 ммоль) и N-хлорсукцинимид (59,6 мг, 0,447 ммоль, 1,1 эквивалента) добавляли в токе азота в смесь четыреххлористого углерода и дихлорметана в соотношении 1:1 (4 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. После завершения реакции при добавлении воды, водный слой экстрагировали дихлорметаном, а органический слой промывали насыщенным соевым раствором и затем сушили над сульфатом натрия. Полученный продукт концентрировали и полученный остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле (использовали только дихлорметан), при этом получали соединение 5 (210 мг, 97%).

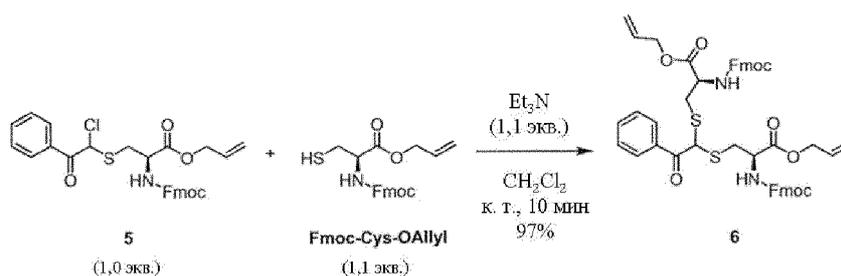
По данным метода ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , част./млн): δ 7,99 (d, J = 7,8 Гц, 2H), 7,76 (d, J = 7,3 Гц, 2H), 7,63-7,57 (m, 3H), 7,48 (dd, J = 7,8, 7,8 Гц, 2H), 7,39 (dd, J = 7,3, 7,8 Гц, 2H), 7,30 (ddd, J = 1,0, 7,3, 7,3 Гц, 2H), 6,37 (d, J = 25,6 Гц, 1H), 5,95-5,84 (m, 1H), 5,63-5,58 (m, 1H), 5,38-5,24 (m, 2H), 4,76-4,60 (m, 3H), 4,39 (d, J = 6,9 Гц, 2H), 4,21 (dd, J = 6,9, 6,9 Гц, 1H), 3,51-3,14 (m, 2H).

По данным метода HRMS (FAB-TOF) m/z: $[(\text{M}+\text{H})^+]$, рассч. для $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{N}_1\text{O}_5\text{S}_2\text{Cl}_1\text{S}_1$, составила 536,1296; найд. составила 536,1298.

Реакционная способность Fmoc-аллилированного хлорацетофеноилцистеина и Cys

Реакционную способность синтезированного Fmoc-аллилированного хлорацетофеноилцистеина (соединение 5) в отношении тиола Cys оценивали с помощью следующей реакции.

[Схема 62]



Триэтиламин (0,017 мл, 0,121 ммоль, 1,1 экв.) добавляли в токе аргона к раствору (1,1 мл) соединения 5 (59,0 мг, 0,110 ммоль) и Fmoc-Cys-OAllyl (0,046 мг, 0,121 ммоль, 1,1 экв.) в дихлорметане, и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. После завершения реакции при добавлении воды водный слой экстрагировали дихлорметаном, а органический слой промывали насыщенным соевым раствором и затем сушили над сульфатом натрия.

Полученный продукт концентрировали и полученный остаток очищали методом колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат 3:1), при этом получали соединение 6 (93,8 мг, 97%).

По данным метода ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, част./млн): δ 7,96 (d, J = 7,8 Гц, 2H), 7,75 (dd, J = 2,7, 7,8 Гц, 4H), 7,59-7,53 (m, 5H), 7,41 (dd, J = 7,8, 7,8 Гц, 2H), 7,39-7,35 (m, 4H), 7,30-7,26 (m, 4H), 5,91-5,80 (m, 2H), 5,70 (dd, J = 7,8, 22,0 Гц, 2H), 5,61 (s, 1H), 5,31 (d, J = 17,4 Гц, 2H), 5,22 (d, J = 11,6 Гц, 2H), 4,69-4,59 (m, 6H), 4,41-4,29 (m, 4H), 4,19 (dd, J = 7,3, 7,3 Гц, 2H), 3,33-2,97 (m, 4H).

По данным метода HRMS (FAB-TOF) m/z: [(M+Na)⁺], рассч. для C₅₀H₄₆N₂O₉S₂Na, составила 905,2542, найд. составила 905.2542.

На основании приведенных выше результатов было установлено, что Fмос-аллилированный хлорацетофеноилцистеин (соединение 5) проявляет реакционную способность по отношению к тиолу в составе Cys, и было продемонстрировано протекание реакции, показанной на стадии d на схеме В.

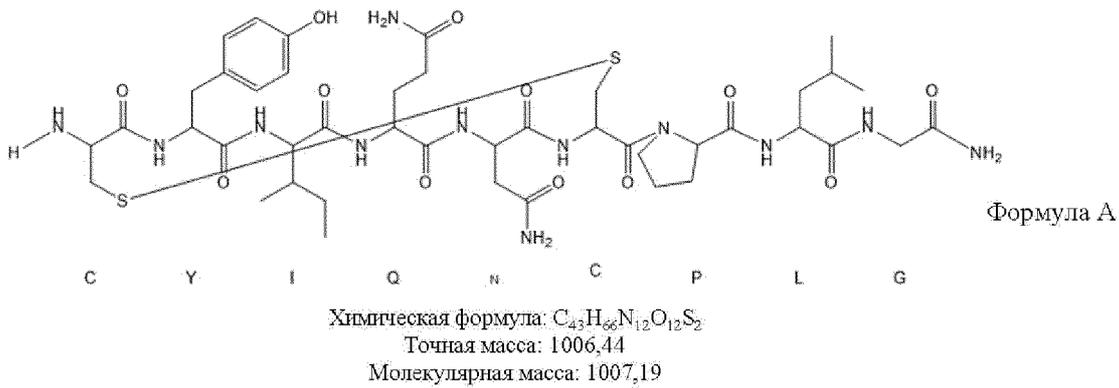
На основании приведенных выше результатов подтверждено, что синтез нового сшитого пептида можно проводить по схеме В.

Пример 11

Сшивка окситоцина

Сшивку окситоцина (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂ (SEQ ID NO: 77), внутримолекулярная связь SS, молекулярная масса: 1007,19) проводили с использованием 1,1-дихлорацетона. Десять мг (9,92 мкмоль) ацетата (производства фирмы Toronto Research Chemicals) окситоцина SS в окисленной форме (окситоцин-OX), представленной следующей формулой А, растворяли в 3 мл 0,1 М HEPES-HCl буферного раствора (pH 8,0), смешивая с 10,2 мл 0,1 М HEPES-HCl буферного раствора (pH 8,0), в котором растворено 57,1 мг (200 мкмоль) гидрохлорида ТСЕР (трис(2-карбоксивтил)фосфин гидрохлорид) в качестве восстанавливающего агента, и перемешивали в течение 1 ч. В указанную смесь же добавляли 2,77 мг (21,8 мкмоль) (молярное отношение к окситоцину: 2,2) 1,1-дихлорацетона, растворенного в 0,722 мл ацетонитрила, и смесь перемешивали в течение 1 ч.

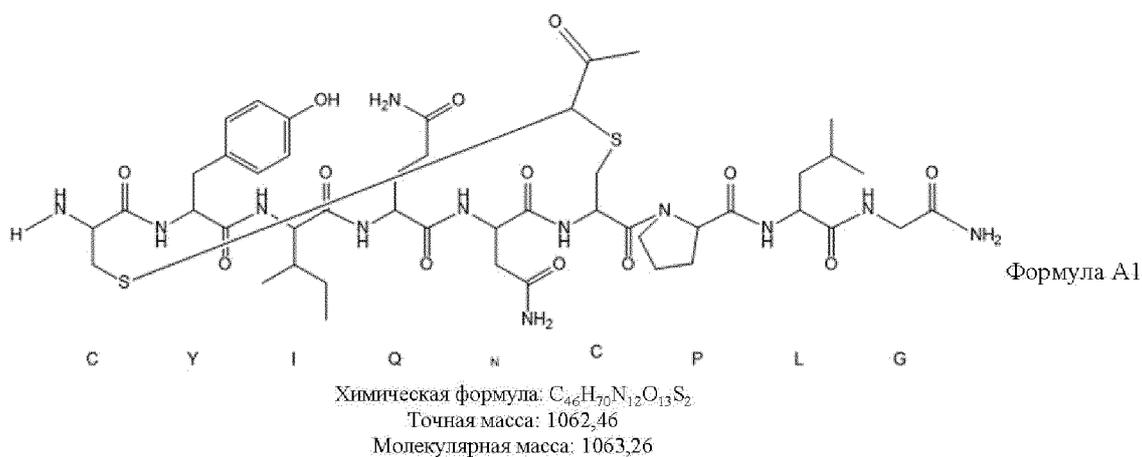
[Схема 63]



Полученный продукт реакции анализировали с помощью метода ЖХ-МС следующим образом. Продукт реакции разбавляли 0,1% муравьиной кислотой в 5 раз, затем 20 мкл этого раствора анализировали (скорость потока: 0,2 мл/мин, элюция: линейный градиент от 4% CH_3CN , содержащего 0,1% муравьиной кислоты, до 70% CH_3CN , температура колонки: 25°C) в детекторной системе Acquity UPLC/SQ (производства фирмы Waters Corporation), соединенной с колонкой Peptide ВЕН-С18 (130Å, 1,7 мкм, 2,1 × 100 мм, производства фирмы Waters Corporation).

Соответствующие результаты для оксикодина-ОХ до добавления гидрохлорида ТСЕР и для продукта реакции, проанализированного методом ЖХ-МС, проиллюстрированы на фигуре 5А и фигуре 5Б. Измеренное значение массы на пике, относящемуся к оксикодину-ОХ, составило 1006,3 и было почти идентичным значению 1007,19, взятому в качестве теоретического значения по отношению к оксикодину-ОХ. С другой стороны, пик, относящийся к продукту реакции сшивки 1,1-дихлорацетоном, элюировался после пика исходного вещества, и масса на пике составляла 1060,4. Масса составляла почти идентичное значение 1063,26, взятое в качестве теоретического значения для сшитой формы оксикодина-дихлорацетона (оксикодин-DA), указанной в формуле А1, и, таким образом, было установлено, что получен сшитый продукт, характеризующийся целевой структурой.

[Схема 64]

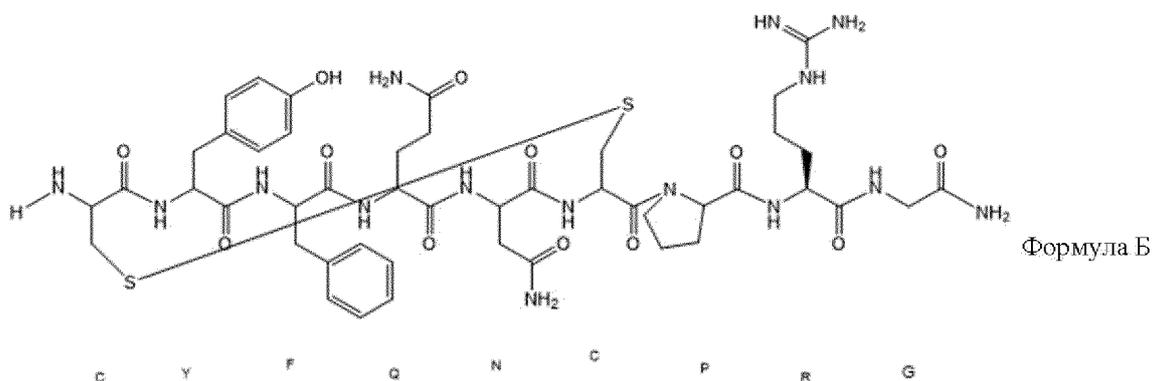


Пример 12

Сшивка вазопрессина

- 5 Сшивку вазопрессина (Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂ (SEQ ID NO: 78), внутримолекулярная связь SS, молекулярная масса: 1084,24) проводили с использованием 1,1-дихлорацетона. В 1,65 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора (pH 8,0) растворяли 5,5 мг (5,07 мкмоль) ацетата (производства фирмы Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) окисленной формы вазопрессина SS
- 10 (вазопрессин-OX), представленной следующей формулой В, и смешивали с 4,4 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора (pH 8,0), в котором было растворено 24,6 мг (86,0 мкмоль) гидрохлорида ТСЕР, и смесь перемешивали в течение 1 ч. В эту смесь добавляли 1,42 мг (11,2 мкмоль) (молярное отношение к вазопрессину: 2,2) 1,1-дихлорацетона, растворенного в 0,371 мл ацетонитрила, и
- 15 смесь перемешивали в течение 1 ч.

[Схема 65]



Химическая формула: $C_{46}H_{65}N_{15}O_{12}S_2$

Точная масса: 1083,44

Молекулярная масса: 1084,24

Полученный продукт реакции анализировали с помощью метода ЖХ-МС таким же образом, как описано в контрольном примере 11. Соответствующие

5 результаты для вазопрессина-ОХ до добавления гидрохлорида ТСЕР и продукта реакции, проанализированного с помощью метода ЖХ-МС, проиллюстрированы на фигуре 6А и фигуре 6Б. Измеренное значение массы на пике, относящемся к вазопрессину-ОХ, составило 1083,7 и составляло почти идентичное значение 1084,24, взятое в качестве теоретического значения в отношении вазопрессина-

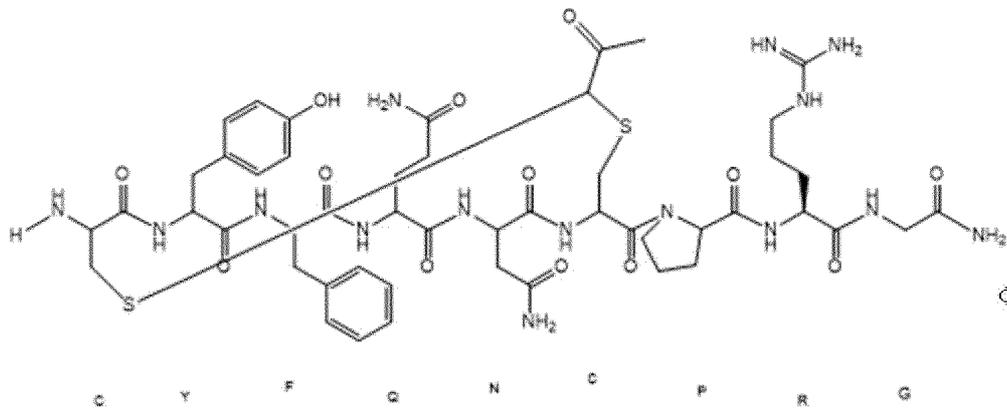
10 ОХ. С другой стороны, пики, относящиеся к продукту реакции сшивки 1,1-дихлорацетоном, элюировались следом за исходным пиком, а массы пиков составляли 1139,0 и 1121,6. Масса 1139,0 составляла почти идентичное значение 1140,30, взятое в качестве теоретического значения в отношении сшитой формы вазопрессин-дихлорацетон (вазопрессин-DA), представленной следующей

15 формулой В1, и, таким образом, было установлено, что получен сшитый продукт, характеризующийся целевой структурой. С другой стороны, масса 1121,6 снижалась по сравнению с массой 1139,0 на 17,4, и причина этого заключалась в том, что вазопрессин-DA, представленный формулой В1, подвергался реакции восстановления с помощью ТСЕР и, таким образом,

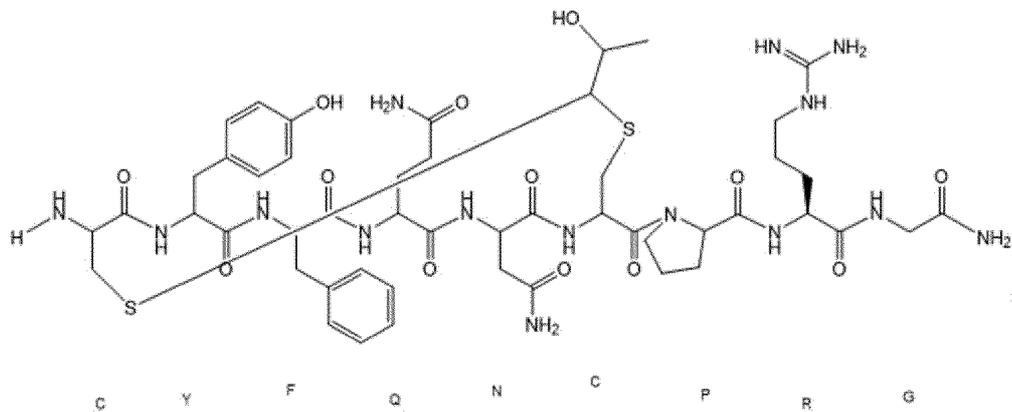
20 образовывался восстановленный продукт (вазопрессин-DA-R) сшитой формы вазопрессин-дихлорацетона, представленный следующей формулой В2, и кроме того он подвергался реакции дегидратации и, таким образом, был преобразован в восстановленную/дегидратированную форму (вазопрессин-DA-RDH, теоретическое значение массы: 1124,3) вазопрессин-дихлорацетон-сшитой

25 формы, представленную формулой В3.

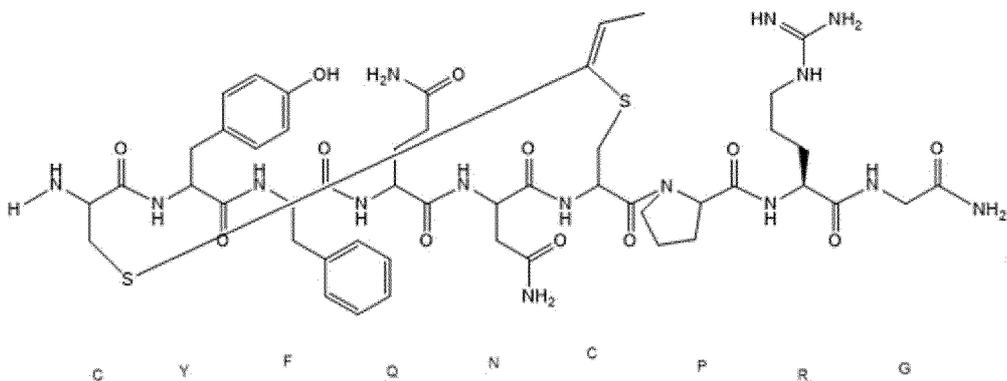
[Схема 66]



Химическая формула: $C_{49}H_{69}N_{15}O_{13}S_2$
Точная масса: 1139,46
Молекулярная масса: 1140,30



Химическая формула: $C_{49}H_{71}N_{15}O_{13}S_2$
Точная масса: 1141,48
Молекулярная масса: 1142,32



Химическая формула: $C_{49}H_{69}N_{15}O_{12}S_2$
Точная масса: 1123,47
Молекулярная масса: 1124,30

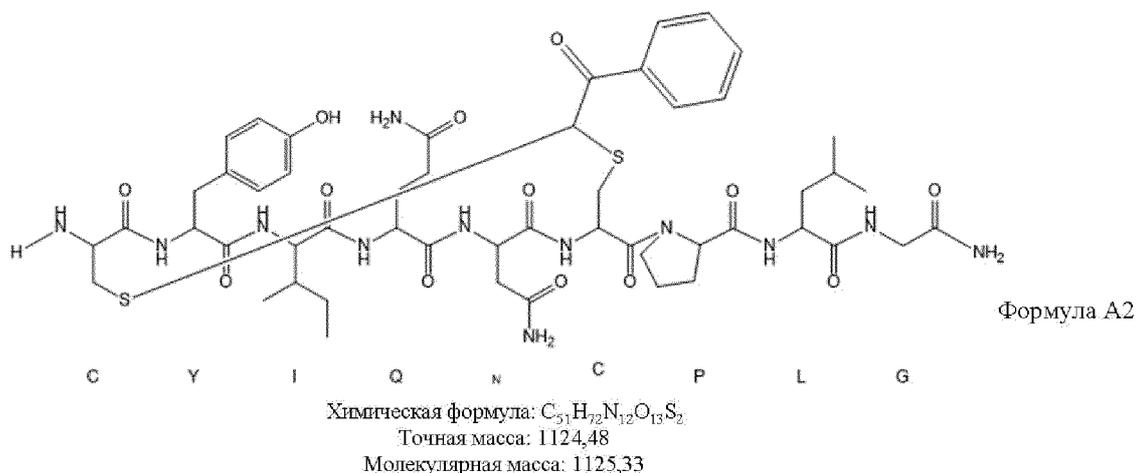
Пример 13

Приобретение устойчивости к протеазе с помощью сшивки окситоцина

Для оценки стабильности пептида, полученного в ходе реакции сшивки, оценивали стабильность α -химотрипсина (полученного из бычьей поджелудочной железы, производства фирмы MP Biomedicals) к разложению под действием протеазы, при этом использовали окситоцин, сшитый 2,2-дихлорацетофеноном. Сшивку окситоцина 2,2-дихлорацетофеноном проводили таким же образом с заменой 1,1-дихлорацетона в примере 11 на 2,2-дихлорацетофенон, и целевой продукт получали методом обращено-фазовой ВЭЖХ. Более подробное описание метода: 10 мг (10 мкмоль) ацетата окситоцина растворяли в 3 мл 0,1 М HEPES солянокислого буферного раствора (pH 8,0), раствор смешивали с 2 мл 0,1 М HEPES солянокислого буферного раствора (pH 8,0), содержащего 57,4 мг (200 мкмоль) TCEP-HCl, и смесь перемешивали в течение 1 ч. Затем добавляли 8,3 мг (44 мкмоль) 2,2-дихлорацетофенона, растворенного и перемешанного в 0,44 мл ацетонитрила, и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученную смесь наносили на колонку InertSustain C18 (5 мкм, 14 × 250 мм, производства фирмы GL Sciences Inc.) (скорость потока 5 мл/мин), соединенную с системой LC-Forte (производства фирмы YMC). Элюцию проводили в линейном градиенте от 4% до 70% ацетонитрила (содержащего 0,1% муравьиной кислоты). Отбирали целевой продукт и лиофилизировали после удаления ацетонитрила при пониженном давлении.

Структура сшитой 2,2-дихлорацетофеноном формы (окситоцин-DP) окситоцина представлена формулой A2.

[Схема 67]



Оценку проводили с использованием окситоцина-ОХ и восстановленной формы окситоцина SH (окситоцина-RD), представленной следующей формулой А3, используемых в качестве субъектов сравнения. Другими словами, раствор окситоцина, полученный растворением в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 7,0) в концентрации 0,5 мг/мл, принимали за окситоцин-ОХ, а вещество, полученное через 30 мин после добавления раствора окситоцина, полученного растворением в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 7,0), содержащем 0,5 мг/мл ТСЕР, в концентрации 0,5 мг/мл, принимали за окситоцин-RD. К 200 мкл каждого из этих растворов добавляли 10 мкл (1:10 в массовом отношении к окситоцину) α -химотрипсина при концентрации 1 мг/мл, полученный раствор инкубировали при 37°C и анализировали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. В случае холостого опыта вместо α -химотрипсина добавляли фосфатный буферный раствор.

Вещество, полученное через 30 мин после растворения очищенного окситоцина-DP в концентрации 0,5 мг/мл в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 7,0), содержащем 0,5 мг/мл ТСЕР, принимали в качестве образца, аналогичным образом добавляли α -химотрипсин и проводили анализ методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

[Схема 68]



В то время как не наблюдалось изменений какого-либо пика даже в течение от 15 мин до 2 ч в случае окситоцина-ОХ, как показано на фигуре 7, в случае окситоцина-RD любой пик исчезал через 10 мин, как показано на фигуре 8. Широкий пик, элюируемый приблизительно через 15 мин, считали пиком, относящимся к α -химотрипсину.

На фигуре 9 представлена хроматограмма при элюции образца, полученного из окситоцина-DP, которая получена методом обращено-фазовой ВЭЖХ. В данном случае появлялись два пика, пики А и В. Массы анализировали методом масс-анализа, и, таким образом, масса на пике А составляла 1126,7, а масса на пике В составляла 1106,5. Они оказались почти идентичны значению 1125,34, взятому в качестве теоретического значения массы сшитой формы окситоцина-дихлорацетонфенона (окситоцин-DP), представленной следующей формулой А4, и значению 1109,33, взятому в качестве теоретического значения массы окситоцина-DP-RDH (представленного следующей формулой А6), полученного дегидратацией восстановленного продукта (окситоцин-DP-R, представлен следующей формулой А5). Таким образом, было установлено, что образец представлял собой смесь окситоцина-DP и окситоцина-DP-RDH.

Реакция протекала после добавления α -химотрипсина к этому образцу в количестве, соответствующем массовому соотношению 1:10, и при этом не наблюдалось уменьшения двух пиков даже после добавления α -химотрипсина, как и в случае окситоцина-ОХ, в отличие от случая окситоцина-RD.

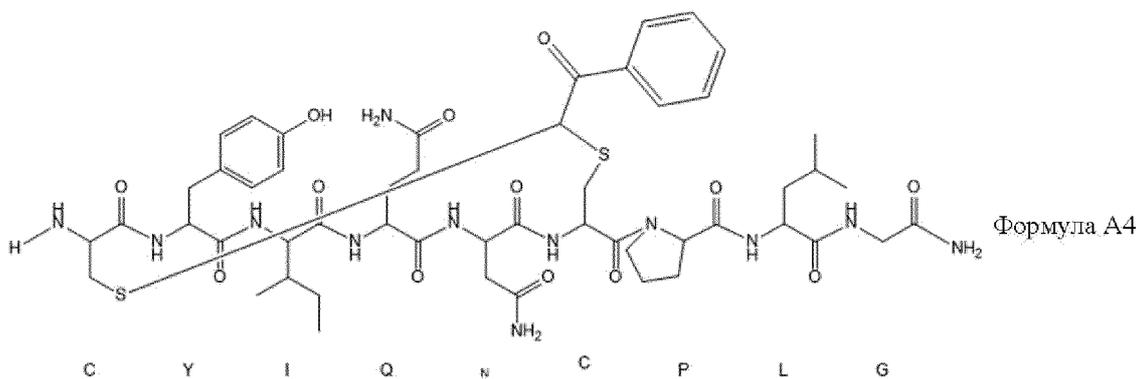
На фигуре 10 представлены результаты построения графика относительного значения (%) площади пика контрольного образца в зависимости от времени, с целью наблюдения за степенью изменения в отношении каждого типа этих молекул после добавления α -химотрипсина. В то время как считается, что

окситоцин-RD характеризуется чрезвычайно низкой стабильностью к действию протеазы из-за быстрого исчезновения пика сразу после добавления α -химотрипсина, разложения окситоцина-OX, как и его SS-сшитого продукта, не наблюдали даже при добавлении α -химотрипсина, и окситоцин-OX

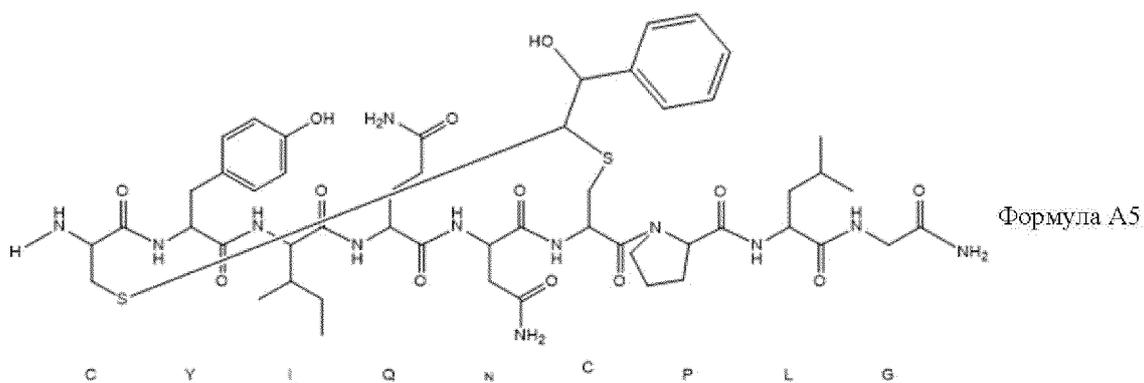
5 характеризуются высокой стабильностью к действию протеазы, таким образом, было установлено, что сшивка SS-связью в значительной степени способствует повышению стабильности. С другой стороны, сшитая дихлорацетонфеноном форма (окситоцин-DP и окситоцин-DP-RDH) также обладает высокой

10 стабильностью к расщеплению α -химотрипсином в присутствии восстанавливающего агента TCEP. Это указывает на то, что настоящий способ сшивки может в значительной степени способствовать повышению стабильности пептида, прежде всего, стойкости (стабильности) к действию протеазы.

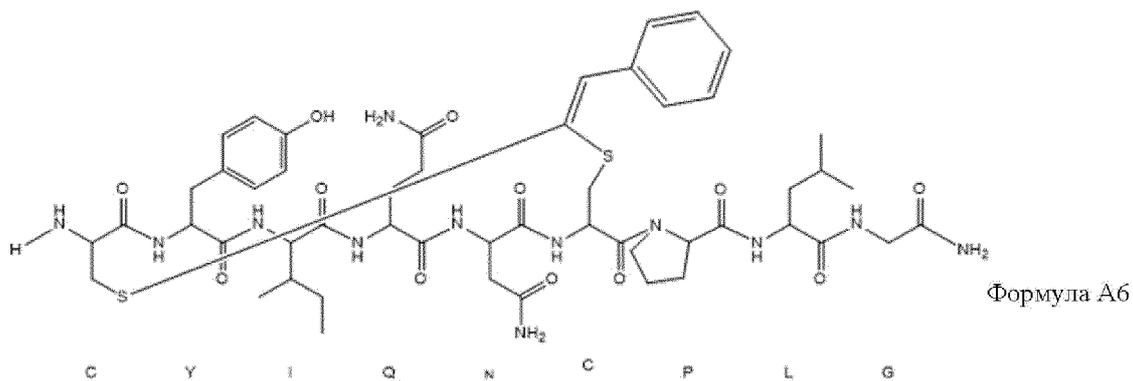
[Схема 69]



Химическая формула: $C_{51}H_{72}N_{12}O_{13}S_2$
Точная масса: 1124,48
Молекулярная масса: 1125,33



Химическая формула: $C_{51}H_{74}N_{12}O_{13}S_2$
Точная масса: 1126,49
Молекулярная масса: 1127,34



Химическая формула: $C_{51}H_{72}N_{12}O_{12}S_2$
Точная масса: 1108,48
Молекулярная масса: 1109,33

Выше описаны некоторые типичные варианты осуществления настоящего изобретения в пояснительных целях. Хотя в вышеприведенном обсуждении 5 представлены конкретные варианты, специалистам в данной области техники представляется очевидным, что возможны изменения в форме и деталях без

ограничения широкой сущности и объема настоящего изобретения.

Соответственно, описание и фигуры следует рассматривать в иллюстративном, а не в ограничивающем смысле. Таким образом, настоящее подробное описание не следует понимать в ограничительном смысле, и объем настоящего изобретения определяется только включенной формулой изобретения вместе с полным набором эквивалентов, на которые распространяется такая формула изобретения.

5
10 В настоящей заявке заявлены преимущества японской патентной заявки № 2020-186833, поданной 9 ноября 2020 г., и японской патентной заявки № 2021-82739, поданной 14 мая 2021 г., полное раскрытие которых включено в данном контексте в качестве ссылки.

Промышленная применимость

Настоящее изобретение можно использовать для сшивки пептида и белка.

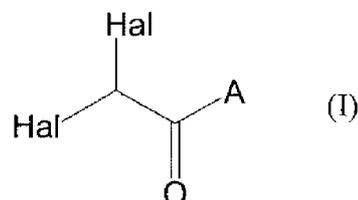
Перечень последовательностей

15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сшивающий агент для белка или пептида, представленный следующей формулой (I):

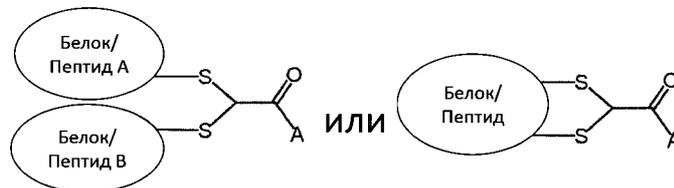
5 [Схема 1]



где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, или фенильную группу.

10 2. Способ получения сшитого белка или пептида, где по меньшей мере две тиольные группы в составе одного или отдельного белка или пептида присоединены, как представлено следующей формулой:

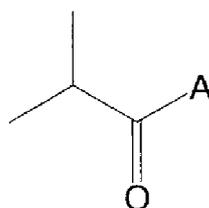
[Схема 2]



15 где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу, Белок/Пептид означает белок или пептид, и Белок/Пептид А и Белок/Пептид В необязательно являются одинаковыми или различными,

20 способ включает взаимодействие белка или пептида со сшивающим агентом по п. 1 для совместного присоединения двух тиольных групп через следующую группу:

[Схема 3]



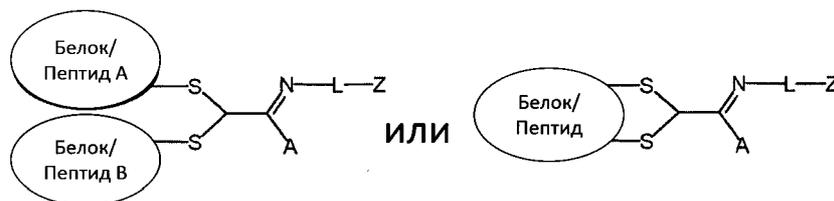
где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно
замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или
5 С1-С6 алкильную группу.

3. Способ по п. 2, где белок или пептид представляет собой белок или
пептид, где все или часть по меньшей мере двух тиольных групп образуют
дисульфидную связь, и способ включает восстановление дисульфидной связи,
10 при этом тем самым образуются две тиольные группы.

4. Способ улучшения щелочной стабильности белка или пептида,
включающий присоединение тиольных групп в составе белка или пептида для
образования сшитого белка или пептида способом по п. 2 или п. 3.

15 5. Способ получения белка или пептида, где реакционноспособная
функциональная группа присоединена, а белок или пептид представлен на
следующей формуле:

[Схема 4]

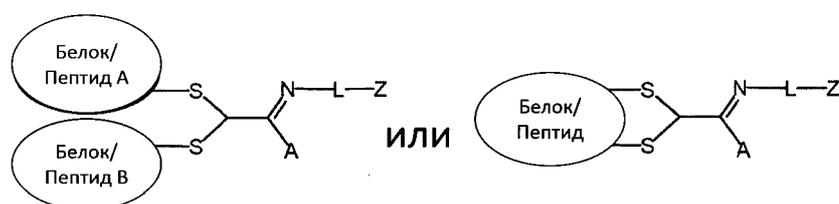


20 где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно
замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или
С1-С6 алкильную группу, Белок/Пептид означает белок или пептид,
Белок/Пептид А и Белок/Пептид В необязательно являются одинаковыми или
25 различными, L означает линкер, а Z означает реакционноспособную
функциональную группу,
способ включает:

получение сшитого белка или пептида способом по п. 2 или п. 3, и взаимодействие полученного сшитого белка или пептида с $\text{NH}_2\text{-L-Z}$ (L означает линкер и Z означает реакционноспособную функциональную группу), при этом происходит введение реакционноспособной функциональной группы в сшитую часть сшитого белка или пептида.

6. Способ получения белка или пептида, где присоединена реакционноспособная функциональная группа, а белок или пептид представлен на следующей формуле:

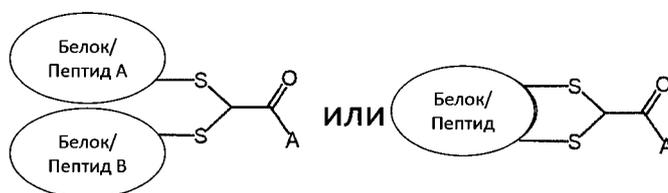
10 [Схема 5]



где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу, Белок/Пептид означает белок или пептид, Белок/Пептид А и Белок/Пептид В необязательно являются одинаковыми или различными, L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу,

15 способ включает:
взаимодействие полученного сшитого белка или пептида, представленного на следующей формуле:

20 [Схема 6]



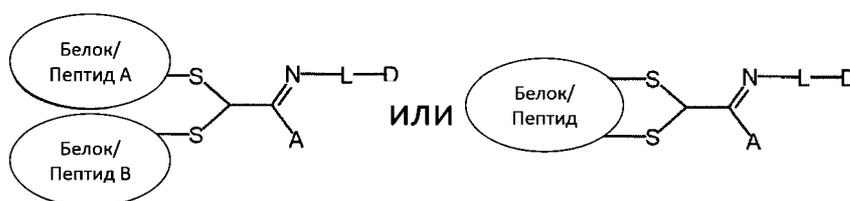
где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу, Белок/Пептид означает белок или пептид, и

Белок/Пептид А и Белок/Пептид В необязательно являются одинаковыми или различными,

и $\text{NH}_2\text{-L-Z}$ (L означает линкер и Z означает реакционноспособную функциональную группу), для введения таким образом реакционноспособной функциональной группы в шитую часть шитого белка или пептида.

7. Способ получения комплекса белка или пептида и лекарственного средства, а комплекс представлен на следующей формуле:

[Схема 7]



10

где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу, Белок/Пептид означает белок или пептид,

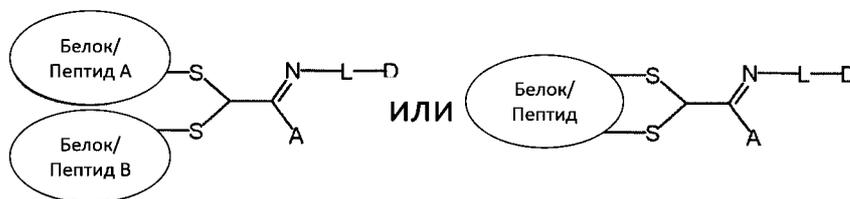
Белок/Пептид А и Белок/Пептид В необязательно являются одинаковыми или различными, L означает линкер, и D означает лекарственное средство, способ, включающий:

получение белка или пептида, где реакционноспособная функциональная группа присоединена способом по п. 5 или п. 6, и

взаимодействие полученного белка или пептида, где реакционноспособная функциональная группа присоединена, и лекарственного средства, содержащего функциональную группу, способную взаимодействовать с реакционноспособной функциональной группой, таким образом при этом осуществляют присоединение лекарственного средства к шитой части шитого белка или пептида.

8. Способ получения комплекса белка или пептида и лекарственного средства, при этом комплекс представлен на следующей формуле:

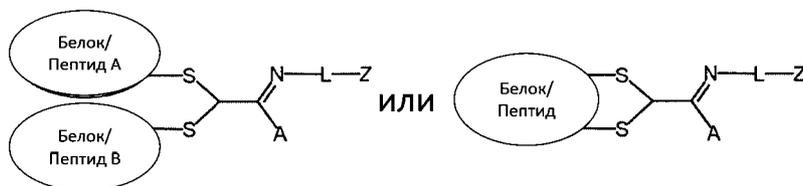
[Схема 8]



5 где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу, Белок/Пептид означает белок или пептид, и Белок/Пептид А и Белок/Пептид В необязательно являются одинаковыми или различными, L означает линкер, и D означает лекарственное средство,
10 способ, включающий:

взаимодействие белка или пептида, где реакционноспособная функциональная группа присоединена, а белок или пептид представлен на следующей формуле:

[Схема 9]



15 где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу, Белок/Пептид означает белок или пептид, Белок/Пептид А и Белок/Пептид В необязательно являются одинаковыми или
20 различными, L означает линкер, и Z означает реакционноспособную функциональную группу,

и лекарственного средства, содержащего реакционноспособную функциональную группу, взаимодействующую с реакционноспособной функциональной группой, таким образом при этом осуществляют присоединение
25 лекарственного средства к сшитой части сшитого белка или пептида.

9. Способ по любому из пунктов 5-8, где линкер содержит фрагмент, расщепляемый протеолитическим ферментом.

5 10. Способ по любому из пунктов 2-9, где белок или пептид представляет собой пептид, содержащий 5-50 аминокислотных остатков.

11. Способ по любому из пунктов 2-10, где тиольная группа, предназначенная для сшивки, присутствует в одном белке или пептиде.

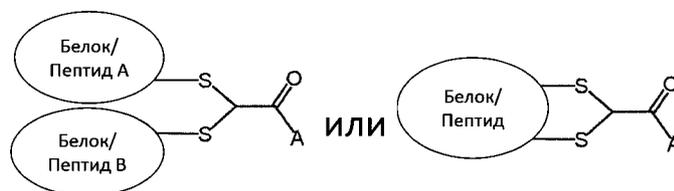
10

12. Способ по п. 11, где белок или пептид представляет собой Fc-связывающий пептид.

13. Способ по любому из пунктов 2-10, где тиольная группа, предназначенная для сшивки, присутствует в отдельном белке или пептиде.

15

14. Сшитый белок или пептид представлен на следующей формуле [Схема 10]

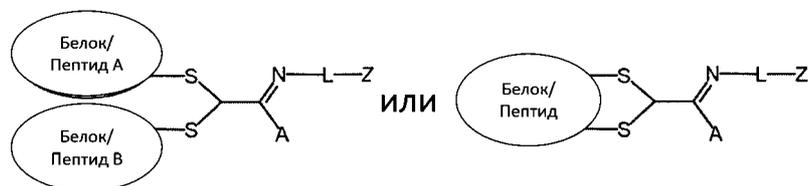


20 где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу, Белок/Пептид означает белок или пептид, и Белок/Пептид А и Белок/Пептид В необязательно являются одинаковыми или различными.

25

15. Белок или пептид, где присоединена реакционноспособная функциональная группа, а белок или пептид представлен на следующей формуле:

[Схема 11]



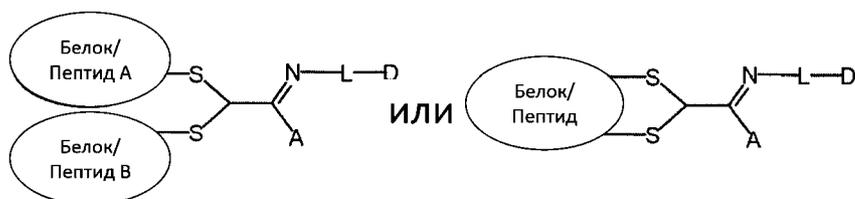
5

где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу, Белок/Пептид означает белок или пептид, Белок/Пептид А и Белок/Пептид В необязательно являются одинаковыми или различными, L означает линкер, а Z означает реакционноспособную функциональную группу.

10

16. Комплекс белка или пептида и лекарственного средства, представленный на следующей формуле:

[Схема 12]



15

где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу, Белок/Пептид означает белок или пептид, и Белок/Пептид А и Белок/Пептид В необязательно являются одинаковыми или различными, L означает линкер, и D означает лекарственное средство.

20

17. Белок или пептид по п. 14, белок или пептид по п. 15, или комплекс по п. 16, где линкер содержит фрагмент, расщепляемый протеолитическим ферментом.

25

18. Белок, пептид или комплекс по любому из пунктов 14-17, где белок или пептид представляет собой пептид, содержащий 5-50 аминокислотных остатков.

5 19. Белок, пептид или комплекс по любому из пунктов 14-18, где тиольная группа, предназначенная для сшивки, присутствует в одном белке или пептиде.

20. Белок, пептид или комплекс по п. 19, где белок или пептид представляет собой Fc-связывающий пептид.

10 21. Белок, пептид или комплекс по п. 20, где аминокислотная группа в остатке лизина, остатке цистеина, остатке аспарагиновой кислоты, остатке глутаминовой кислоты, 2-аминосульфонической кислоты, диаминопропионовой кислоты, остатке аргинина или аминокислоты в положении 1 в составе Fc-связывающего пептида, модифицирована следующими соединениями: DSG (дисукцинимидилглутарат), DSS (дисукцинимидилсульфонат), DMA (дигидрохлорид диметиладипимидата), DMP (дигидрохлорид диметилпимелимидата), DMS (дигидрохлорид диметилсульфонимидата), DTBP (дигидрохлорид диметил-3,3'-дитиобиспропионимидата) или DSP (дитиобис(сукцинимидилпропионовая кислота)).

15

20

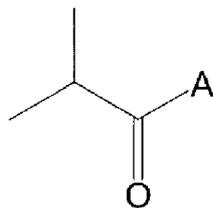
22. Белок, пептид или комплекс по любому из пунктов 14-18, где тиольная группа, предназначенная для сшивки, присутствует в отдельном белке или пептиде.

25 23. Способ получения IgG-Fc-область-содержащей молекулы, где присоединен сшитый Fc-связывающий пептид, включающий контактирование IgG-Fc-область-содержащей молекулы и белка, пептида или комплекса по п. 20 или п. 21.

30 24. Способ получения IgG-Fc-область-содержащей молекулы, где присоединен сшитый Fc-связывающий пептид, включающий:
взаимодействие Fc-связывающего пептида, присоединенного к IgG-Fc-область-содержащей молекуле, и сшивающего агента по п. 1 для совместного

связывания двух тиольных групп в составе Fc-связывающего пептида через следующую группу:

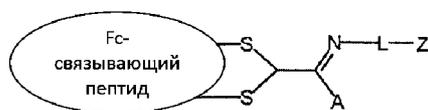
[Схема 13]



5 где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу.

25. Способ получения IgG-Fc-область-содержащей молекулы, где
10 присоединен Fc-связывающий пептид, содержащий реакционноспособную функциональную группу Z, где Fc-связывающий пептид представлен на следующей формуле:

[Схема 14]



15 где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу, L означает линкер и Z означает реакционноспособную функциональную группу,

способ, включающий:

20 взаимодействие IgG-Fc-область-содержащей молекулы, где присоединен Fc-связывающий пептид, представленный на следующей формуле:

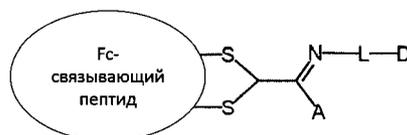
[Схема 15]



где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу,

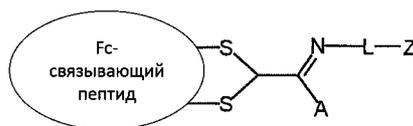
и NH₂-L-Z (L означает линкер и Z означает реакционноспособную функциональную группу), таким образом при этом осуществляют введение реакционноспособной функциональной группы в сшитую часть в составе сшитого Fc-связывающего пептида.

26. Способ получения IgG-Fc-область-содержащей молекулы, где присоединен Fc-связывающий пептид, содержащий лекарственное средство D, где Fc-связывающий пептид представлен следующей формулой:
[Схема 16]



способ, включающий:

15 взаимодействие IgG-Fc-область-содержащей молекулы, где присоединен Fc-связывающий пептид, содержащий реакционноспособную функциональную группу Z, где Fc-связывающий пептид представлен следующей формулой:
[Схема 17]



20 где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу, L означает линкер и Z означает реакционноспособную функциональную группу,

и лекарственного средства, содержащего функциональную реакционноспособную группу, которая способна взаимодействовать с реакционноспособной группой Z, таким образом при этом осуществляют присоединение лекарственного средства к сшитой части в составе сшитого белка или пептида.

27. Способ по любому из пунктов 23-26, дополнительно включающий ковалентное связывание Fc-связывающего пептида и IgG-Fc-область-содержащей молекулы.

5 28. IgG-Fc-Область-содержащая молекула, где присоединены белок, пептид или комплекс по п. 20 или п. 21.

29. Молекула по п. 28, где Fc-связывающий пептид и IgG-Fc-область-содержащая молекула соединены ковалентной связью.

10

30. Носитель, где присоединен пептид по п. 20 или п. 21.

31. Способ очистки IgG-Fc-область-содержащей молекулы, при этом способ включает:

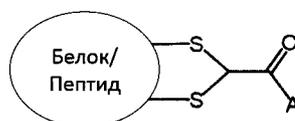
15 контактирование жидкости, содержащей IgG-Fc-область-содержащую молекулу, с носителем по п. 30,

удаление не связавшегося с носителем компонента, с помощью промывки, и элюция связавшегося с носителем компонента для регенерации IgG-Fc-область-содержащей молекулы.

20

32. Способ получения сшитого белка или пептида, где по меньшей мере две тиольные группы в составе белка или пептида присоединены, где сшитый белок или пептид представлен на следующей формуле:

[Схема 18]



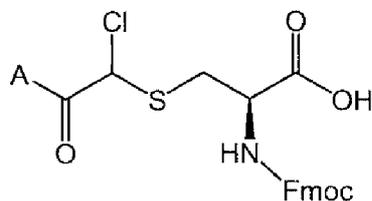
25

где А означает атом водорода, С1-С6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или С1-С6 алкильную группу, и Белок/Пептид означает белок или пептид, способ, включающий:

30 синтез белка или пептида методом Fmoc, и

использование соединения, представленного на следующей формуле, вместо по меньшей мере одного остатка цистеина, в синтезе

[Схема 19]



5

33. Способ получения белка или пептида, где присоединена реакционноспособная функциональная группа, а белок или пептид представлен на следующей формуле:

[Схема 20]



10

где A означает атом водорода, C1-C6 алкильную группу, необязательно замещенную фенильной группой или атомом галогена, фенильную группу или C1-C6 алкильную группу, Белок/Пептид означает белок или пептид, L означает линкер, Z означает реакционноспособную функциональную группу и D означает лекарственное средство,

15

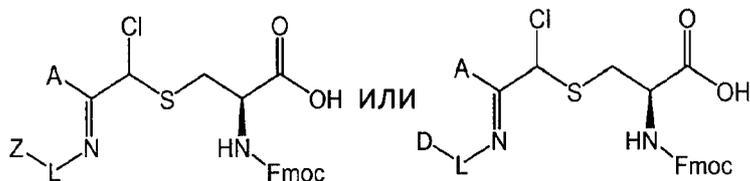
способ включающий:

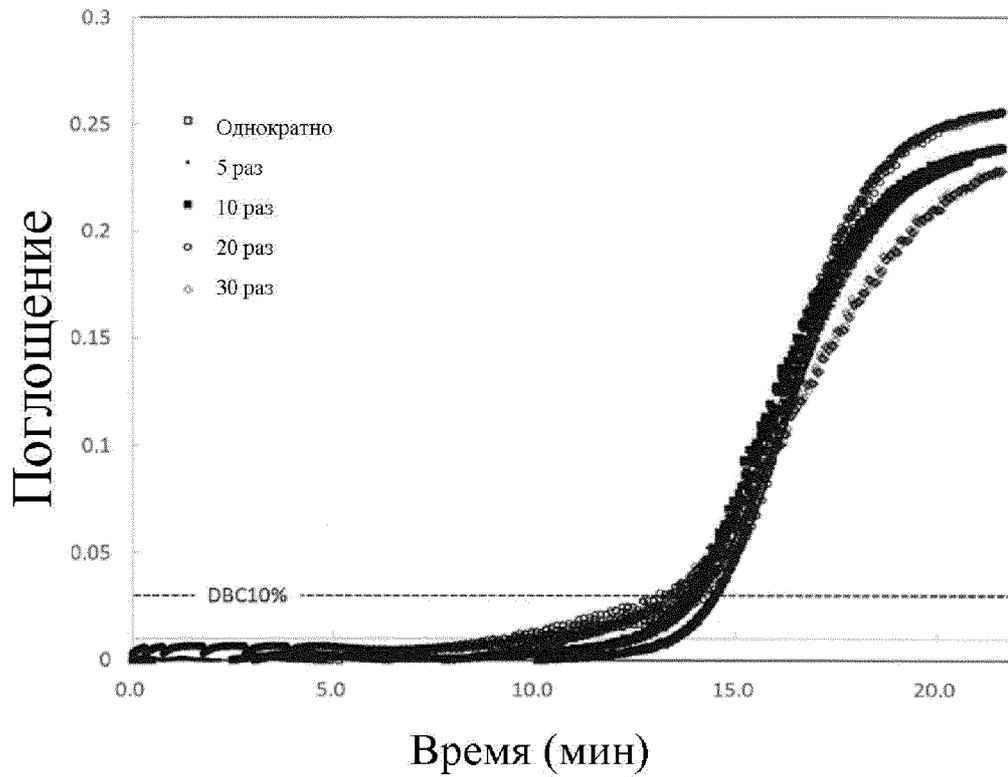
синтез белка или пептида методом Fmoc, и

использование соединения, представленного на следующей формуле, вместо по меньшей мере одного остатка цистеина, в синтезе

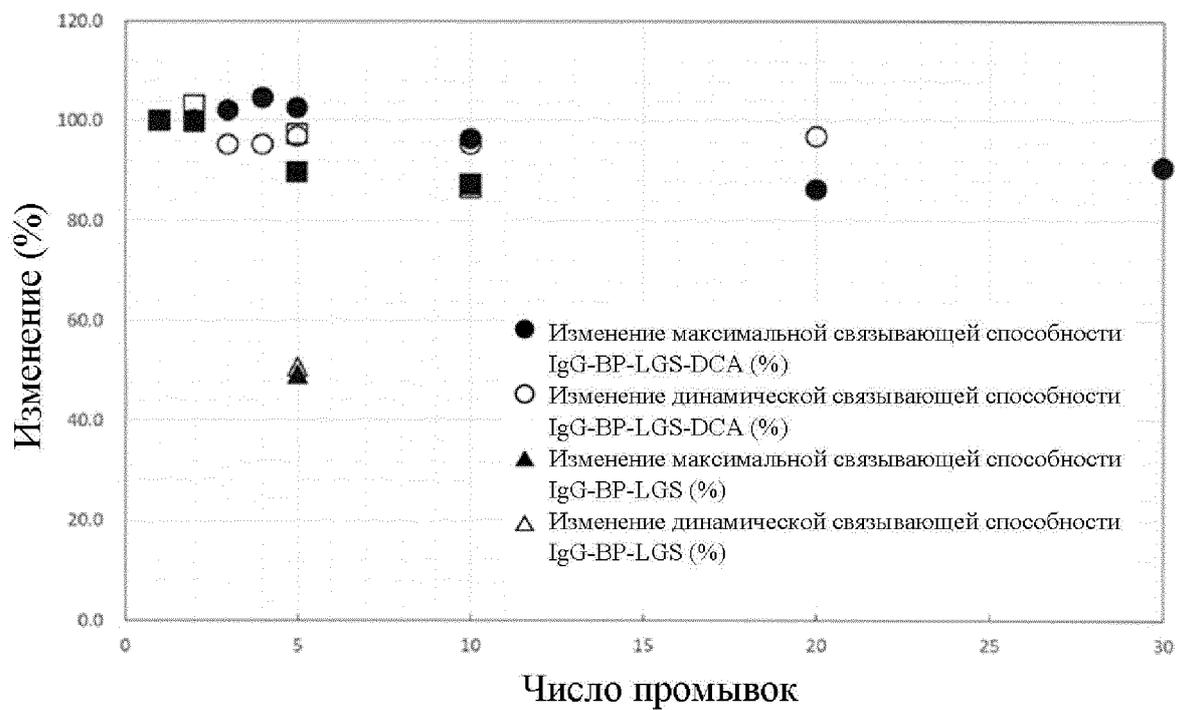
20

[Схема 21]



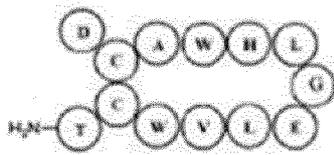


Фигура 2.



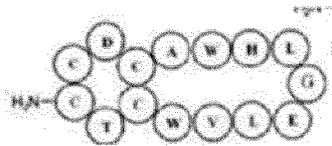
Фигура 3.

- 1) CAWHLGELVWC
 - 2) DCAWHLGELVWCT
 - 3) DCAWHLGELVFCT
 - 4) DCAWHLGELVXCT
- X = 1-нафтоил, 2-нафтоил, бензил, бензотиофен
- 5) CDCAWHLGELVWCTC
 - 6) CAYHLGELVWC
 - 7) DCAYHLGELVWCTF(2-Pya)



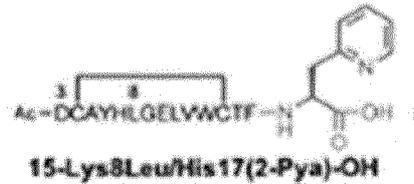
Fc-III; K_d 16 нМ

DCAWHLGELVWCT

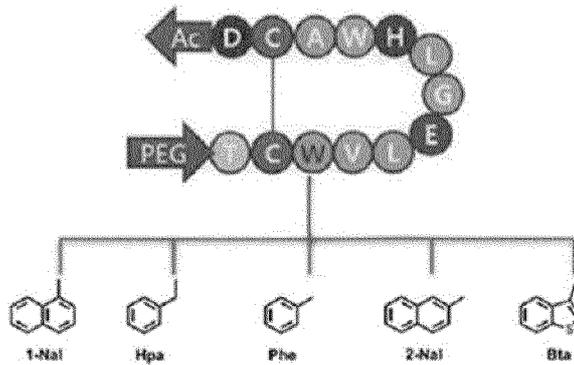


Fc-III-4C; K_d 2,45 нМ

CDCAWHLGELVWCTC



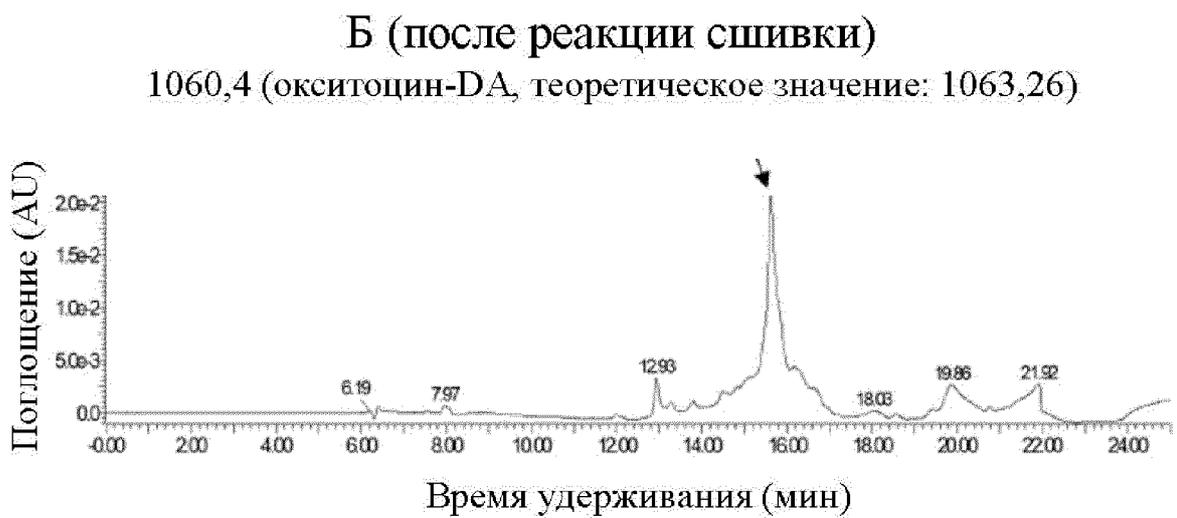
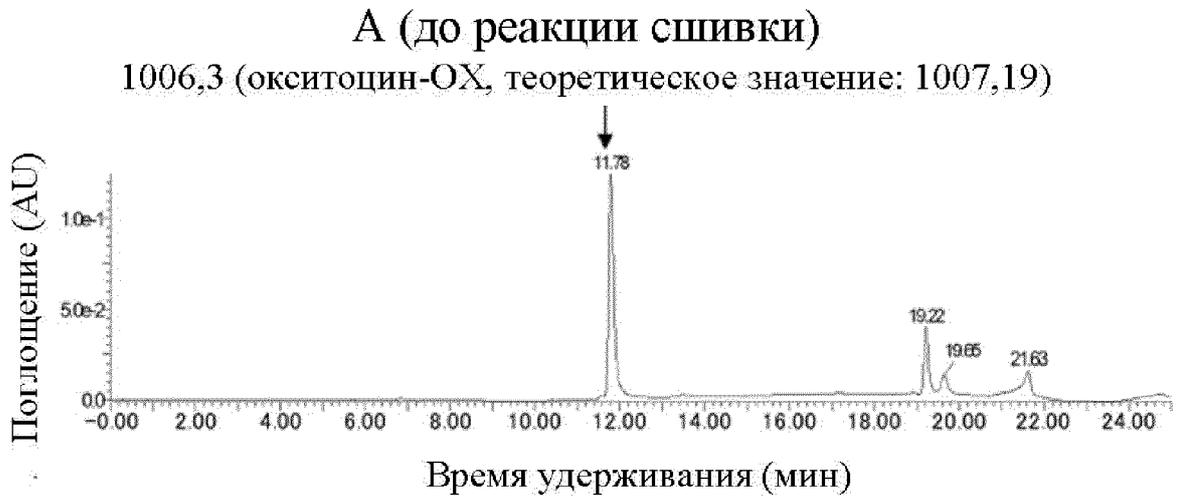
DCAYHLGELVWCTF(2-Pya)
CAYHLGELVWC



DCAWHLGELVXCT

X = боковая цепь представленного выше соединения

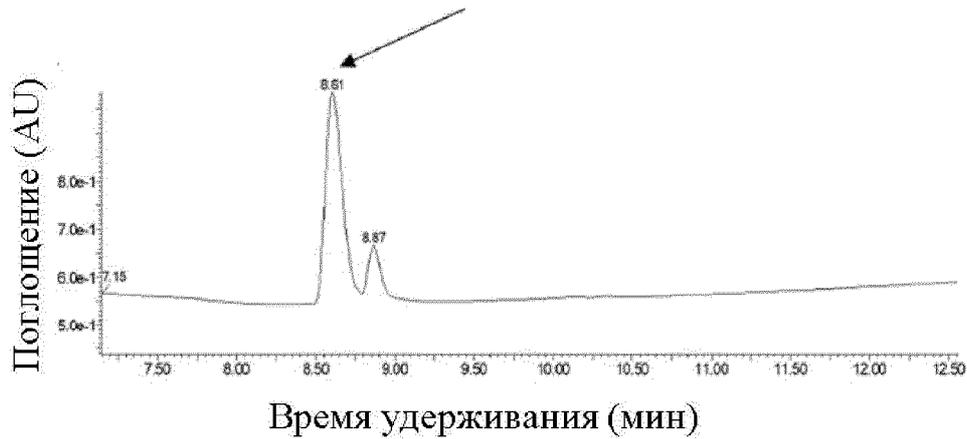
Фигура 4.



Фигура 5.

А (до реакции сшивки)

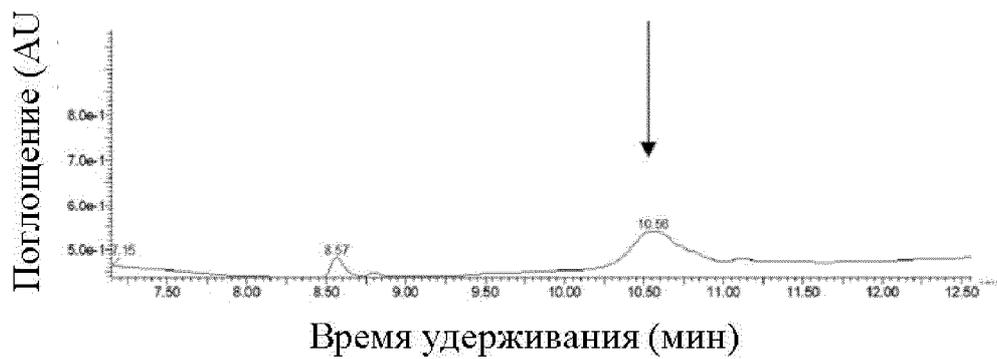
1083,7 (вазопрессин-ОХ, теоретическое значение: 1084,24)

**Б (после реакции сшивки)**

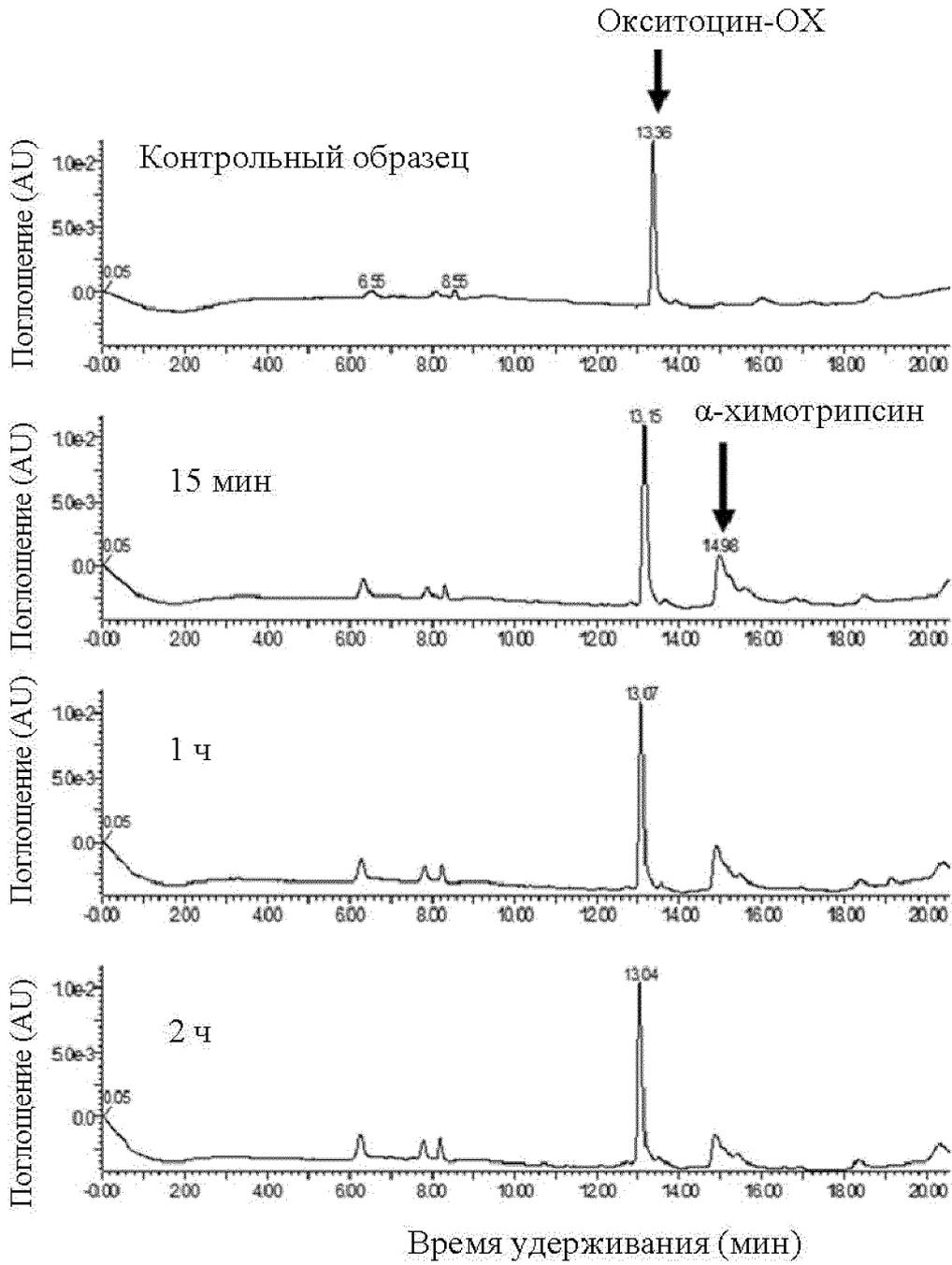
1121,6 (вазопрессин-DA-RDH, теоретическое значение: 1124,30)

+

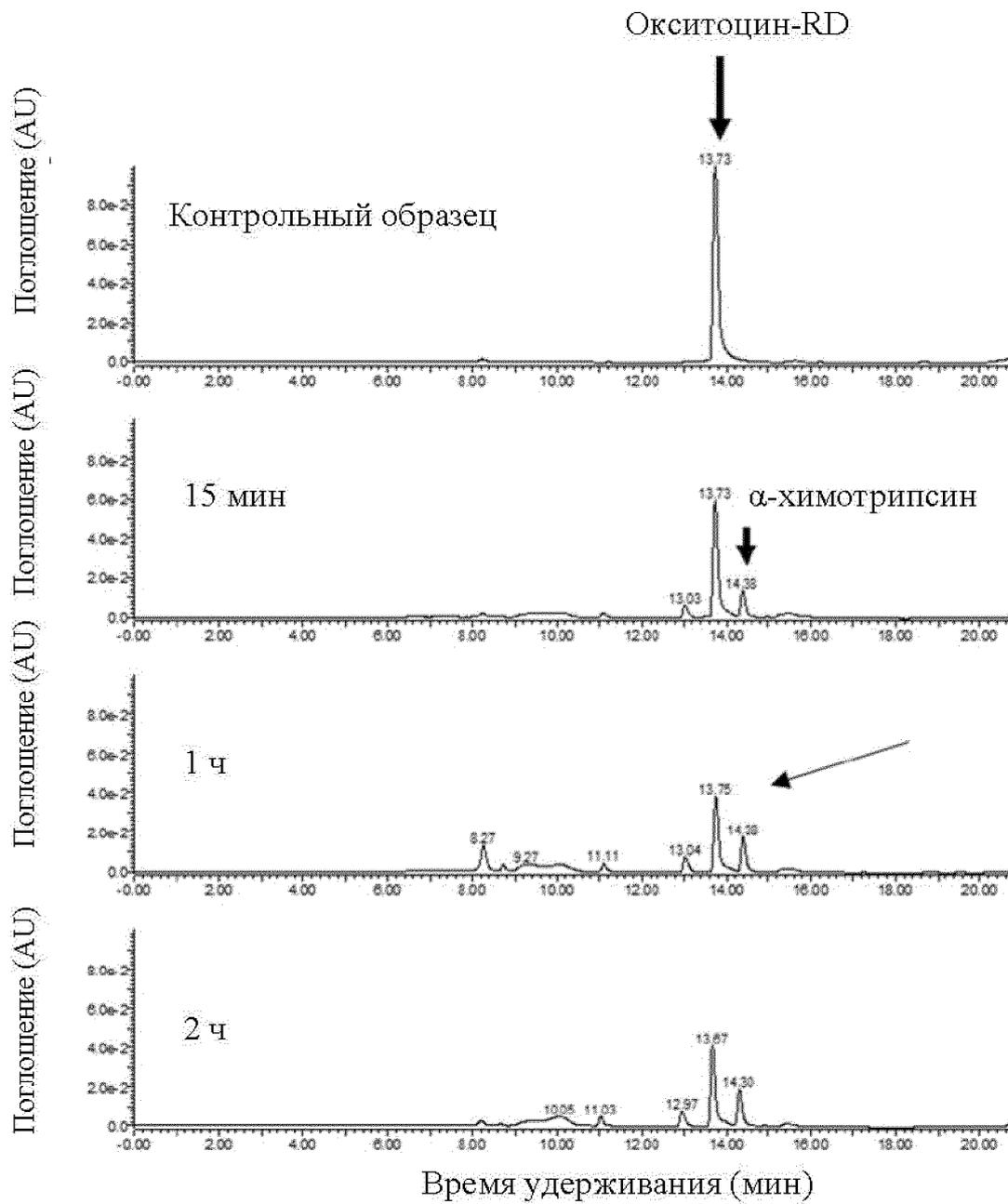
1139,0 (вазопрессин-DA, теоретическое значение: 1140,30)



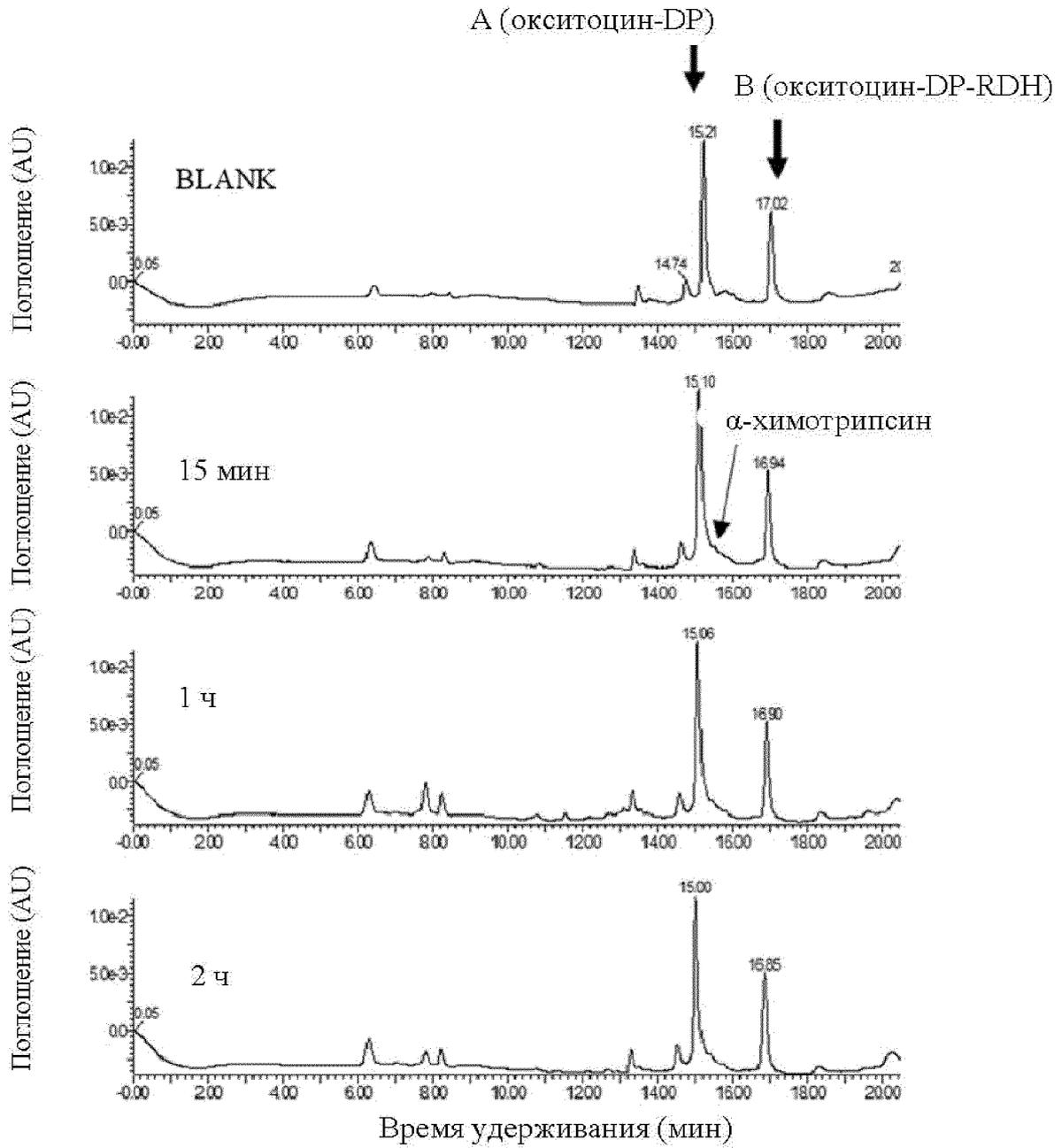
Фигура 6.



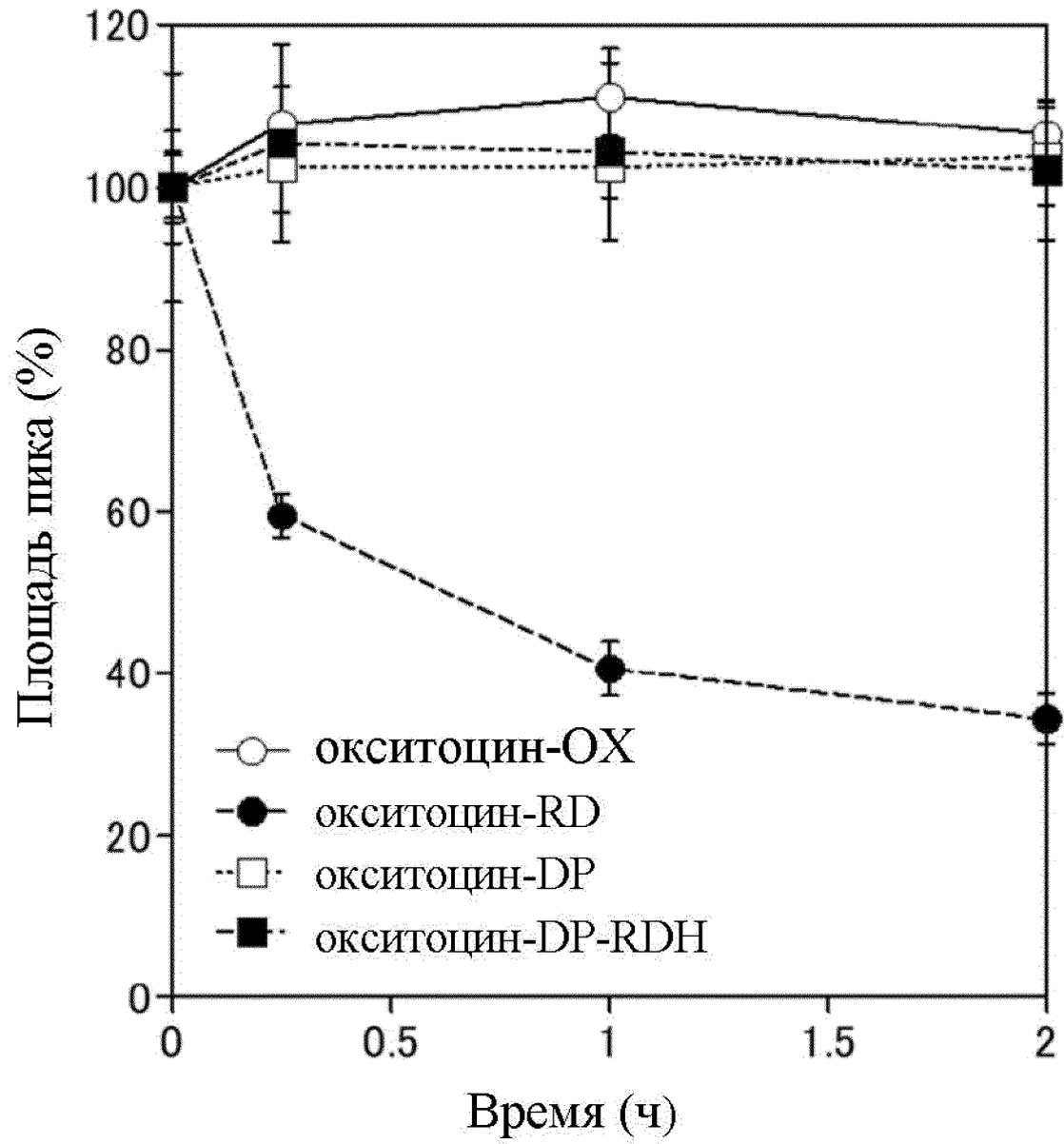
Фигура 7.



Фигура 8.



Фигура 9.



Фигура 10.