

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393059 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.02

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.17

(54) АГЕНТЫ ДЛЯ МЕТОДИК НАПРАВЛЕННОЙ КОНЬЮГАЦИИ И
КОНЬЮГИРОВАННЫЕ ПРОДУКТЫ

(31) 63/189,522

(32) 2021.05.17

(33) US

(86) PCT/US2022/029535

(87) WO 2022/245759 2022.11.24

(88) 2023.02.02

(71) Заявитель:
БАЙОХЭЙВЕН ТЕРАПЬЮТИКС
ЛТД. (US)

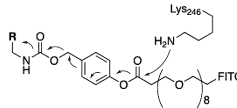
(72) Изобретатель:

Казмиерски Веслав, Дубовчик
Джин М., Колдуэлл Риис М., Шпигель
Дэвид Адам (US)

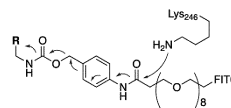
(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина
Е.М., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)

(57) Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены методики для сайт-направленной конъюгации различных представляющих интерес фрагментов с агентами-мишенями. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении используют связывающие мишень фрагменты для обеспечения высокой эффективности конъюгации и селективности. В некоторых вариантах осуществления предложенные методики применимы для получения конъюгатов антител.



R = uABT DAR = 1,3
R = H DAR = 0,06



R = uABT DAR = 0,8
R = H DAR = 0,13

A1

202393059

202393059

A1

АГЕНТЫ ДЛЯ МЕТОДИК НАПРАВЛЕННОЙ КОНЪЮГАЦИИ И КОНЪЮГИРОВАННЫЕ ПРОДУКТЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[1] ДАННАЯ ЗАЯВКА ИСПРАШИВАЕТ ПРИОРИТЕТ ПО ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ЗАЯВКЕ США № 63/189522, поданной 17 мая 2021 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[2] Настоящее изобретение относится к конъюгированным усилителям терапии, которые применимы для предотвращения и/или лечения различных патологических состояний, нарушений или заболеваний. В частности, настоящее изобретение относится к белковым конъюгатам, таким как конъюгаты антитело – лекарственный препарат, которые могут действовать как усилители терапии.

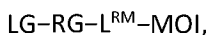
УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Конъюгированные усилители терапии активно использовали для предотвращения и/или лечения различных патологических состояний, нарушений или заболеваний. Такие усилители, как правило, содержат терапевтически активную молекулу, такую как антитело, связанную с фрагментом, имеющим аффинность в отношении конкретной мишени, связанной с патологическим состоянием, нарушением или заболеванием. Однако большинство известных методик конъюгации не направлены на конкретный сайт терапевтически активной молекулы и обычно приводят к получению смеси конъюгатов. Остается потребность в разработке сайт-специфических методик конъюгации, которые позволяют получать продукты реакции с высокой степенью гомогенности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] Настоящее изобретение относится к композициям, которые содержат агенты-усилители терапии, содержащие представляющие интерес фрагменты, конъюгированные с фрагментами агента-мишени в конкретных участках.

[5] В одном варианте осуществления предложено соединение, имеющее структуру формулы R-I:



(R-I)

или ее соли, где:

[6] LG представляет собой группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью,

RG представляет собой реактивную группу формулы $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$, где

L^{LG2} представляет собой $-NH-C(O)O-C(R')_2-$, где каждый R' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом R' необязательно соединены с образованием кольца;

L^{LG3} представляет собой необязательно замещенное арильное кольцо;

L^{LG4} представляет собой $-NH-$ или $-O-$;

L^{RG1} представляет собой $-C(O)-$, $-S(O)-$, $-OS(O)_2-$ или $-OP(O)(OR)_2-$; и

L^{RG2} представляет собой ковалентную связь или $[-C(R'')_2C(R'')=C(R'')]C(O)-$, где каждый R'' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом любые два R'' необязательно соединены с образованием кольца;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент.

[7] В другом варианте осуществления предложена композиция, содержащая вышеуказанное соединение.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[8] Эти и/или другие аспекты станут очевидными и более понятными из нижеследующего описания вариантов осуществления в сочетании с прилагаемыми графическими материалами, на которых:

[9] Фиг. 1. Связывающие мишень фрагменты и процесс конъюгации мишени (вверху) и схематическое изображение связывающего мишень фрагмента, взаимодействующего с Lys 246 иммуноглобулиновой мишени.

[10] Фиг. 2. Данные по специфичности связывания для линейного пептидного IgG-связывающего фрагмента. Приведены данные для пептида GSYWYDVWF (SEQ ID NO:1).

[11] Фиг. 3. Данные по специфичности связывания для циклического пептидного IgG-связывающего фрагмента. Приведены данные для пептида DCAWXLGELVWCT (SEQ ID NO:2).

[12] Фиг. 4. 4A иллюстрирует конъюгацию мишени, где реактивное соединение имеет реактивную группу, которая представляет собой аза-акцептор Михаэля, 4B иллюстрирует конъюгацию мишени, где реактивное соединение имеет реактивную группу, которая

высвобождает CO₂ после конъюгации.

[13] Фиг. 5. Связывающий мишень фрагмент, содержащий пептид
DKEWILQKIYEIMRLLDELGHAEASMRVSDLIYEFMKGDERLLEEAEERLLEEVER (SEQ ID NO:3)

[14] Фиг. 6. Проиллюстрированы связывающие мишень группы в соответствии с некоторыми вариантами осуществления. Ac-DCAWNLGELVWCT (SEQ ID NO:4), Ac-DCAWHLGELVWCT-R (SEQ ID NO:5), R-DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:6), ASYHLGELVW-Tic-Aib-CE -R (SEQ ID NO:7)

[15] Фиг. 7 и 8. Синтез проиллюстрированных связывающих мишень групп.

[16] Фиг. 9. Проиллюстрированы группы LG–RG.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[17] Следующее подробное описание приведено, чтобы помочь специалистам в области техники данного изобретения. Проиллюстрированные варианты осуществления будут подробно описаны далее. Однако эти варианты осуществления являются исключительно примерами, и настоящее изобретение ограничено не ими, а определено объемом прилагаемой формулы изобретения. Специалисты в данной области техники могут осуществлять модификации и вариации в описанных в данном документе вариантах осуществления, не отступая от сущности или объема настоящего изобретения.

[18] Соответственно, варианты осуществления описаны ниже со ссылкой на структуры и схемы исключительно для того, чтобы пояснить аспекты настоящего описания. В контексте данного документа термин «и/или» включает любые и все комбинации одного или более связанных перечисленных элементов. Термин «или» означает «и/или». Такие выражения, как «по меньшей мере один», когда они предшествуют перечню элементов, модифицируют весь перечень элементов, но не модифицируют отдельные элементы в перечне.

[19] Следует понимать, что когда указано, что элемент находится «на» другом элементе, он может находиться в непосредственном контакте с другим элементом или между ними могут присутствовать промежуточные элементы. В противоположность этому, когда указано, что элемент находится «непосредственно на» другом элементе, между ними не присутствуют никакие промежуточные элементы.

[20] Следует понимать, что хотя термины первый, второй, третий и т. д. можно использовать в данном документе для описания различных элементов, компонентов, участков, слоев и/или

разделов, эти элементы, компоненты, участки, слои и/или разделы не ограничиваются этими терминами. Эти термины используют только для того, чтобы отличить один элемент, компонент, участок, слой или раздел от другого элемента, компонента, участка, слоя или раздела. Таким образом, первый элемент, компонент, участок, слой или раздел, обсуждаемые ниже, можно называть вторым элементом, компонентом, участком, слоем или разделом, не отступая от принципов представленных вариантов осуществления.

[21] Следует понимать, что термины «содержит» и/или «содержащий» или «включает» и/или «включающий», используемые в описании, указывают на присутствие указанных признаков, участков, целых чисел, этапов, действий, элементов и/или компонентов, но не исключают наличия дополнительных одного или более других признаков, участков, целых чисел, этапов, действий, элементов, компонентов и/или групп.

[22] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Терминология, используемая в описании, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевает ограничения. Дополнительно следует понимать, что термины, такие как определенные в обычно используемых словарях, следует интерпретировать как имеющие значения, согласующиеся с их значениями в контексте соответствующей области техники и настоящего изобретения, и не следует интерпретировать в идеализированном или поверхностном формальном смысле, если в данном документе явно не указано иное.

[23] В контексте данной заявки, если только иное явно не указано в данном документе, каждый из следующих терминов имеет значение, приведенное ниже. Дополнительные определения приведены в тексте заявки. В случаях, когда термин явным образом не определен в данном документе, этот термин имеет значение, известное специалисту в данной области техники в случае применения этого термина в контексте его использования в данном изобретении.

[24] Форма единственного числа относится к одному или более чем одному (т. е. к по меньшей мере одному) грамматическим объектам, если из контекста явно не следует иное. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

[25] В контексте данного документа, если не приведено иное конкретное определение, термин «замещенная» относится к группе, замещенной дейтерием, галогеном (-F, -Cl, -Br, -I), гидроксигруппой (-OH), аминогруппой (-NH₂), карбоксильной группой (-CO₂H), замещенной или незамещенной C₁-C₁₀ аминной группой, нитро-группой (-NO₂), C₁-C₁₀ алкильной группой, C₃-C₁₀

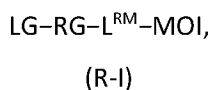
циклоалкильной группой, C₆-C₁₂ арильной группой, C₁-C₁₀ алкокси-группой, C₁-C₁₀ трифторалкильной группой, такой как трифторметильная группа (-CF₃) и т. п., или циано-группой (-CN), вместо по меньшей мере одного атома водорода замещающих группы или соединения.

[26] Дополнительные аспекты будут приведены частично в нижеследующем описании и частично станут очевидными из описания.

[27] Исходные материалы, применимые для получения фармацевтических композиций по данному изобретению, являются коммерчески доступными или могут быть получены специалистами в данной области техники.

[28] Данное изобретение относится к композициям, которые содержат агенты-усилители терапии, содержащие представляющие интерес фрагменты, конъюгированные с фрагментами агента-мишени в конкретных участках.

[29] В одном варианте осуществления предложено соединение, имеющее структуру формулы R-I:



или ее соли, где:

LG представляет собой группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью,

RG представляет собой реактивную группу формулы $-\text{L}^{\text{LG2}}-\text{L}^{\text{LG3}}-\text{L}^{\text{LG4}}-\text{L}^{\text{RG1}}-\text{L}^{\text{RG2}}-$, где

L^{LG2} представляет собой $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{C}(\text{R}')_2-$, где каждый R' независимо представляет собой H или C₁-C₁₀ алкил, при этом R' необязательно соединены с образованием кольца;

L^{LG3} представляет собой необязательно замещенное арильное кольцо;

L^{LG4} представляет собой $-\text{NH}-$ или $-\text{O}-$;

L^{RG1} представляет собой $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{OS}(\text{O})_2-$ или $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR})_2-$; и

L^{RG2} представляет собой ковалентную связь или $[-\text{C}(\text{R}'')_2\text{C}(\text{R}'')=\text{C}(\text{R}'')] \text{C}(\text{O})-$, где каждый R'' независимо представляет собой H или C₁-C₁₀ алкил, при этом любые два R'' необязательно соединены с образованием кольца;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент.

МИШЕНИ

[30] Специалистам в данной области техники после прочтения представленного изобретения

станет очевидно, что предложенные в данном документе методики применимы для конъюгации различных агентов-мишеней со многими типами представляющих интерес фрагментов. В некоторых вариантах осуществления предложенные методики в особенности применимы для конъюгации белковых агентов с различными представляющими интерес фрагментами. В некоторых вариантах осуществления агенты-мишени представляют собой или содержат белковый агент, нуклеиновую кислоту или их комбинацию.

[31] В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой или содержит белковый агент. В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой белковый агент. В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой природный белок в клетке, ткани, органе или организме. В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой эндогенный белок. В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой экзогенный белок. В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой изготовленный белок, например белок, полученный с использованием различных биотехнологий. В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой агент на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой антитело, применимое как терапевтическое средство. В данной области техники известны различные антитела, которые можно использовать в качестве агентов-мишеней. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой поликлональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой IVIG (в некоторых вариантах осуществления — пул от здоровых доноров). В некоторых вариантах осуществления белок содержит Fc-область. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает одну тяжелую цепь или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления Fc-область включает две тяжелые цепи или их фрагменты. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизованное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой мышинное антитело.

[32] В некоторых вариантах осуществления при изучении характеристик агентов на основе поликлональных антител или агентов IVIG проводят расщепление до, во время или после конъюгации, например ферментативное расщепление с использованием IdeZ, IdeS и т. д., так,

чтобы удалить определенные области антител (например, Fab), чтобы получить композиции с улучшенной гомогенностью для изучения характеристик (например, методом МС).

[33] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой терапевтическое антитело, например одобренное FDA антитело для терапевтических применений. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело применимо для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой адалимумаб, алемтузумаб, атезолизумаб, авелумаб, ипилимумаб, цетуксимаб, даратумумаб, динутуксимаб, элотузумаб, ибритумомаб, тиуксетан, имгатузумаб, инфликсимаб, ипилимумаб, нецитумумаб, обинутузумаб, офатумумаб, пертузумаб, реслизумаб, ритуксимаб, трастузумаб, могамулизумаб, AMP-224, FS-102, GSK-2857916, ARGX-111, ARGX-110, AFM-13, APN-301, BI-836826, BI-836858, эноблитузумаб, отлртузумаб, велтузумаб, КНК-4083, BIW-8962, ALT-803, каротуксимаб, эпрутузумаб, инебилизумаб, изатуксимаб, маргетуксимаб, MOR-208, окаратузумаб, талакотузумаб, тремелимумаб, бенрализумаб, лумиликсимаб, MOR-208, ифибатузумаб, GSK2831781, SEA-CD40, КНК-2823 или BI836858. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой ритуксимаб, базиликсимаб, инфликсимаб, цетуксимаб, силтуксимаб, динутуксимаб, альтертоксаксимаб, даклизумаб, паливизумаб, трастузумаб, алемтузумаб, омализумаб, эфализумаб, бевацизумаб, натализумаб, тоцилизумаб, экулизумаб, могамулизумаб, пертузумаб, обинутузумаб, ведолизумаб, пембролизумаб, меполизумаб, элотузумаб, даратумумаб, иксекизумаб, реслизумаб и атезолизумаб, адалимумаб, панитумумаб, голимумаб, устекинумаб, канакинумаб, офатумумаб, деносумаб, ипилимумаб, белимумаб, раксибакумаб, рамуцирумаб, ниволумаб, секукинумаб, эволокумаб, алирокумаб, нецитумумаб, бродалумаб или оларатумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой даратумумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой цетуксимаб. В некоторых вариантах осуществления предложенные соединения или агент, включая фрагмент агента на основе антитела, применимы для лечения патологического состояния, нарушения или заболевания, которое можно лечить агентом на основе антитела.

[34] Антитела можно получать с помощью ряда методик в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления антитела могут иметь сконструированные структуры по сравнению с природными иммуноглобулинами. В некоторых вариантах осуществления антитела могут содержать определенные теги для очистки, идентификации, оценки и т. д. В некоторых вариантах осуществления антитела могут содержать фрагменты (например, CDR и/или Fc, т. д.), но не полные иммуноглобулины. Специалистам в данной области

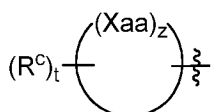
техники понятно, что при упоминании сайта антитела в настоящем изобретении (например, K246, K248, K288, K290, K317 и т. д.; если не указано иное, человеческого антитела по нумерации EU) аминокислотный остаток может не находиться в конкретном пронумерованном сайте, но может находиться в сайте, который соответствует этому пронумерованному сайту, например, по нумерации EU и/или гомологии последовательностей (например, гомологов одного или разных видов).

[35] Как понятно специалистам в данной области техники, предложенные методики, помимо прочего, могут обеспечить направленную конъюгацию с нативными мишенями, например нативными антителами. В некоторых вариантах осуществления агенты-мишени представляют собой или содержат агенты на основе нативных антител. В некоторых вариантах осуществления агенты-мишени представляют собой или содержат сконструированные агенты на основе антител. В некоторых вариантах осуществления агенты-мишени, например антитела, не содержат сконструированные остатки не встречающихся в природе аминокислот.

СВЯЗЫВАЮЩИЕ МИШЕНЬ ФРАГМЕНТЫ

[36] В некоторых вариантах осуществления формул (LG-I) и (R-I):

LG представляет собой $R^{LG}-L^{LG}$;

R^{LG} представляет собой , $R^c-(Xaa)_z-$, фрагмент нуклеиновой кислоты или фрагмент малой молекулы;

каждый Xaa независимо представляет собой остаток аминокислоты или аминокислотный аналог;

t равно 0–50;

z равно 1–50;

каждый R^c независимо представляет собой $-L^a-R'$;

каждый L^a независимо представляет собой ковалентную связь или необязательно замещенную двухвалентную группу, выбранную из C_1-C_{20} алифатического или C_1-C_{20} алифатического фрагмента, имеющего 1–5 гетероатомов, где одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $-C(R')_2-$, $-C_1-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$ или $-C(O)O-$;

каждый –Су– независимо представляет собой необязательно замещенную двухвалентную моноциклическую, бициклическую или полициклическую группу, где каждое моноциклическое кольцо независимо выбрано из C₃₋₂₀ циклоалифатического кольца, C₆₋₂₀ арильного кольца, 5–20-членного гетероарильного кольца, имеющего 1–10 гетероатомов, и 3–20-членного гетероциклического кольца, имеющего 1–10 гетероатомов;

L^{LG} представляет собой –L^{LG1}–, –L^{LG1}–L^{LG2}–, –L^{LG1}–L^{LG2}–L^{LG3}– или –L^{LG1}–L^{LG2}–L^{LG3}–L^{LG4}–;

каждый из L^{LG1}, L^{LG2}, L^{LG3} и L^{LG4} независимо представляет собой ковалентную связь или двухвалентную необязательно замещенную линейную или разветвленную C₁₋₁₀₀ группу, содержащую один или более алифатических фрагментов, арильных фрагментов, гетероалифатических фрагментов, каждый из которых независимо имеет 1–20 гетероатомов, гетероароматических фрагментов, каждый из которых независимо имеет 1–20 гетероатомов, или любые комбинации любого одного или более таких фрагментов, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены C₁₋₆ алкиленом, C₁₋₆ алкениленом, двухвалентной C₁₋₆ гетероалифатической группой, имеющей 1–5 гетероатомов, –C≡C–, –C_n–, –C(R')₂–, –O–, –S–, –S–S–, –N(R')–, –C(O)–, –C(S)–, –C(NR')–, –C(O)N(R')–, –C(O)C(R')₂N(R')–, –N(R')C(O)N(R')–, –N(R')C(O)O–, –S(O)–, –S(O)₂–, –S(O)₂N(R')–, –C(O)S–, –C(O)O–, –P(O)(OR')–, –P(O)(SR')–, –P(O)(R')–, –P(O)(NR')–, –P(S)(OR')–, –P(S)(SR')–, –P(S)(R')–, –P(S)(NR')–, –P(R')–, –P(OR')–, –P(SR')–, –P(NR')–, аминокислотным остатком или –[(–O–C(R')₂–C(R')₂)_n]–, где n равно 1–20;

каждый R' независимо представляет собой –R, –C(O)R, –CO₂R или –SO₂R;

каждый R независимо представляет собой –H или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₃₀ алифатического, C₁₋₃₀ гетероалифатического фрагмента, имеющего 1–10 гетероатомов, C₆₋₃₀ арильного, C₆₋₃₀ ариллифатического, C₆₋₃₀ арилгетероалифатического фрагмента, имеющего 1–10 гетероатомов, 5–30-членного гетероарила, имеющего 1–10 гетероатомов, и 3–30-членного гетероцикла, имеющего 1–10 гетероатомов, или

две группы R необязательно и независимо вместе образуют ковалентную связь или:

две или более групп R на одном атоме необязательно и независимо вместе с атомом образуют необязательно замещенное 3–30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, имеющее, в дополнение к атому, 0–10 гетероатомов; или

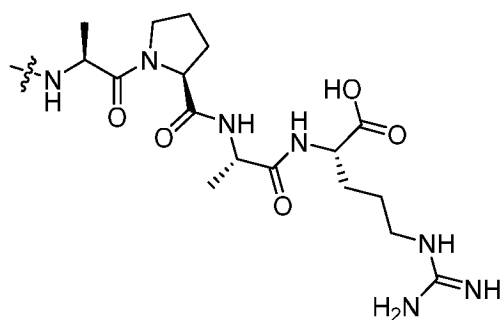
две или более групп R на двух или более атомах необязательно и независимо вместе со своими промежуточными атомами образуют необязательно замещенное 3–30-членное

моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, имеющее, в дополнение к промежуточным атомам, 0–10 гетероатомов.

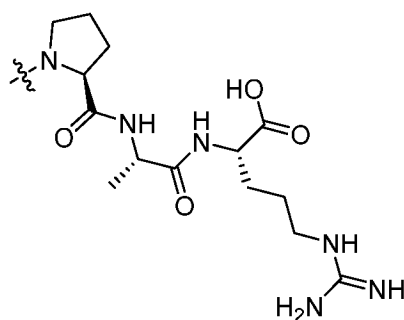
[37] В некоторых вариантах осуществления LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью, при этом агент-мишень представляет собой агент на основе антитела.

[38] В некоторых вариантах осуществления LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который связывается с Fc-областью, и/или R^{LG} представляет собой или содержит DCAWXLGELVWCT (SEQ ID NO:2), где два остатка цистеина необязательно образуют дисульфидную связь, а X представляет собой аминокислотный остаток.

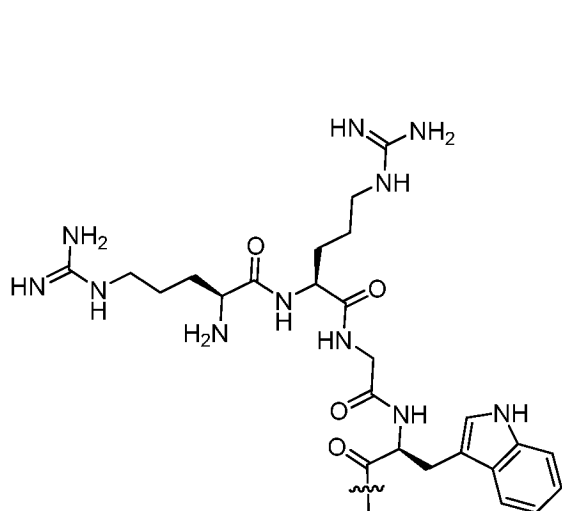
[39] В некоторых вариантах осуществления LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, имеющий структуру от A-1 до A-50:



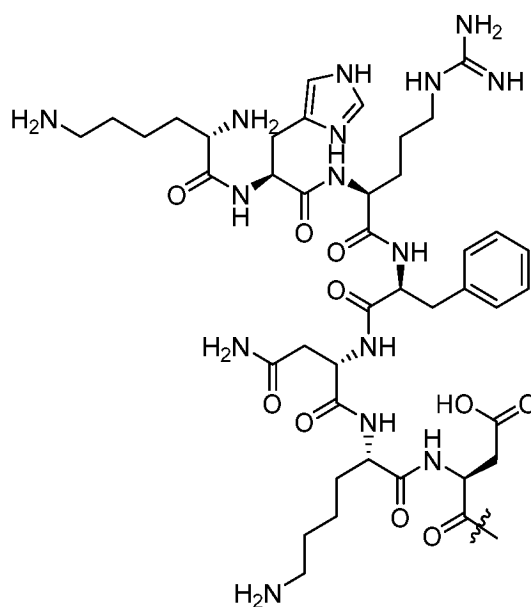
A-1



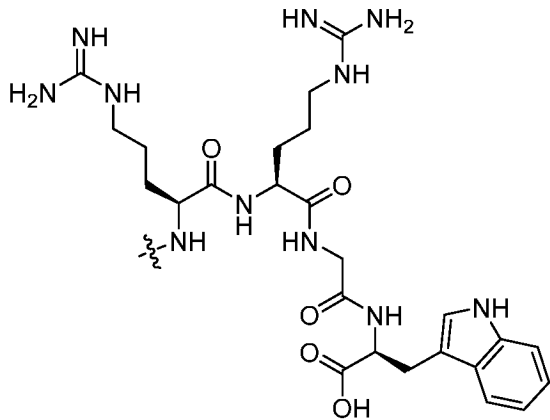
A-2



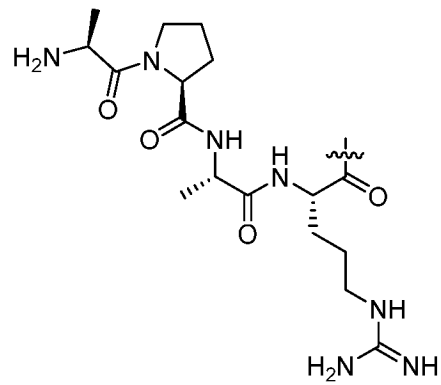
A-3



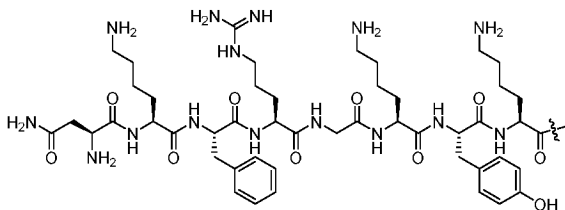
A-4



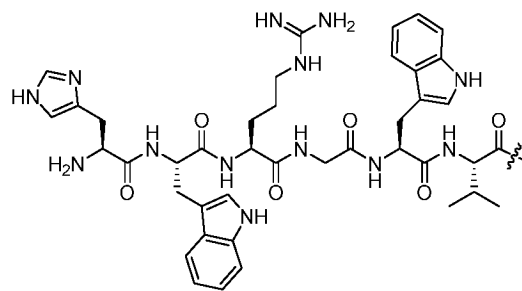
A-5



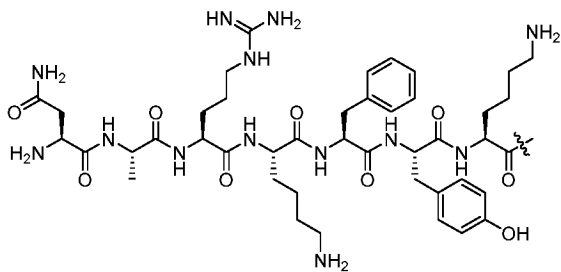
A-6



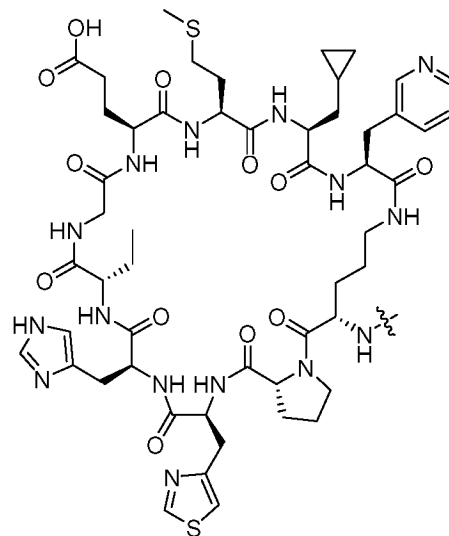
A-7



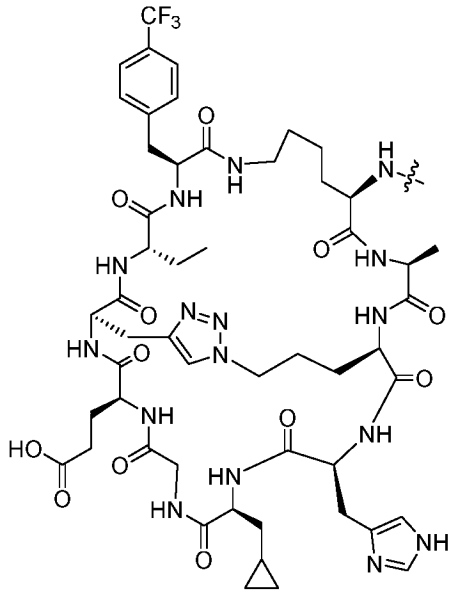
A-8



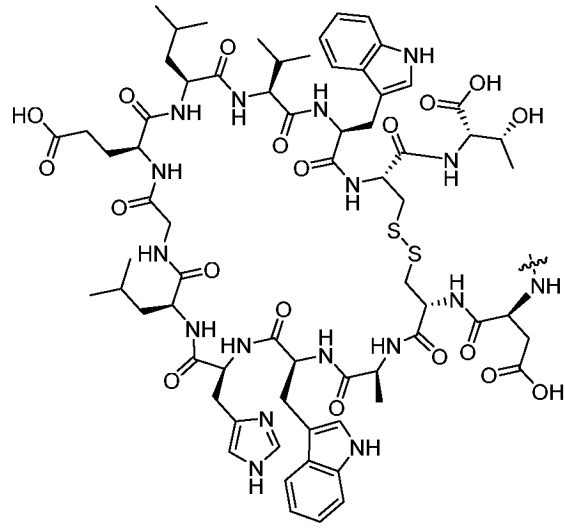
A-9



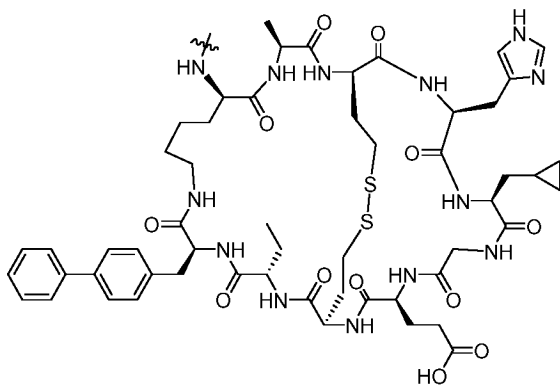
A-10



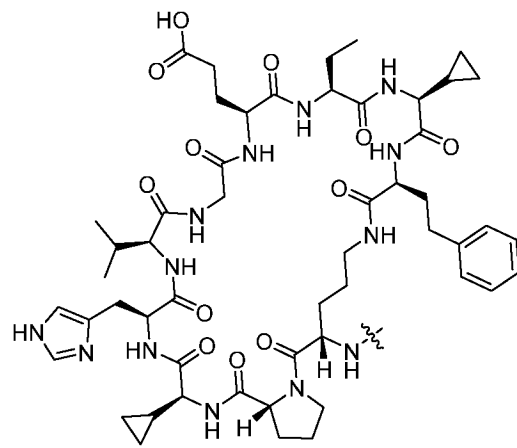
A-11



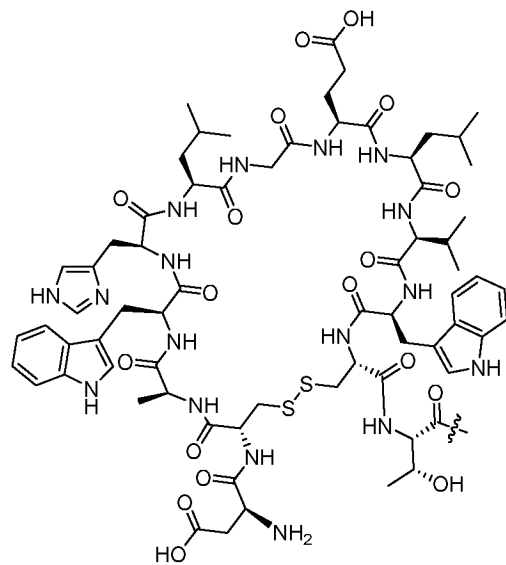
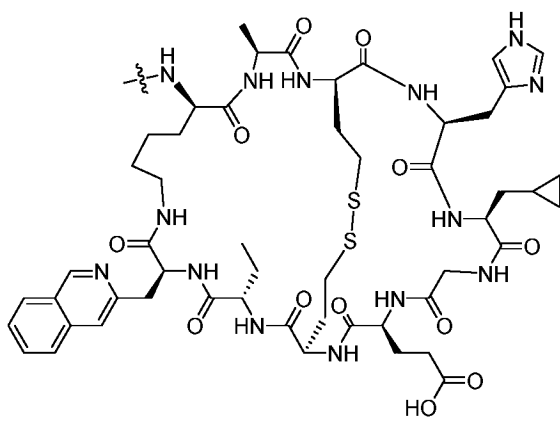
A-12



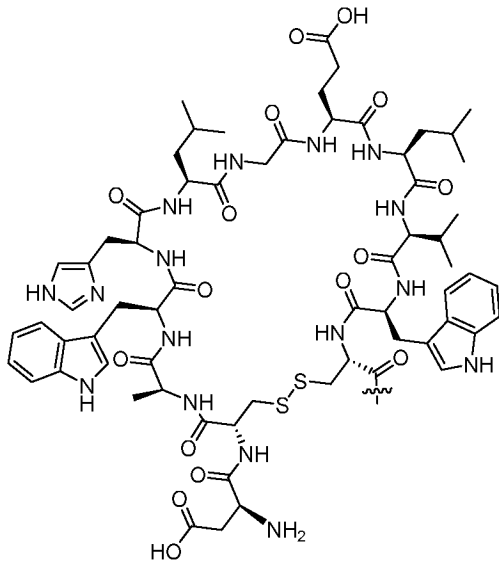
A-13



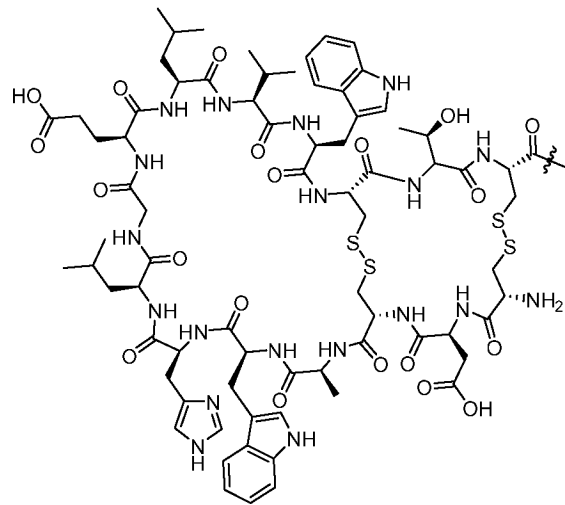
A-14



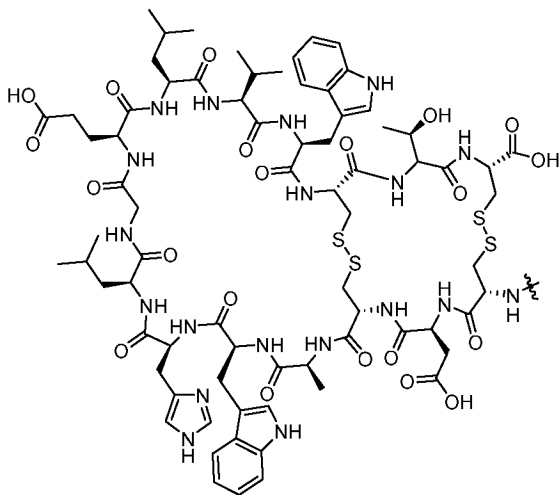
A-15



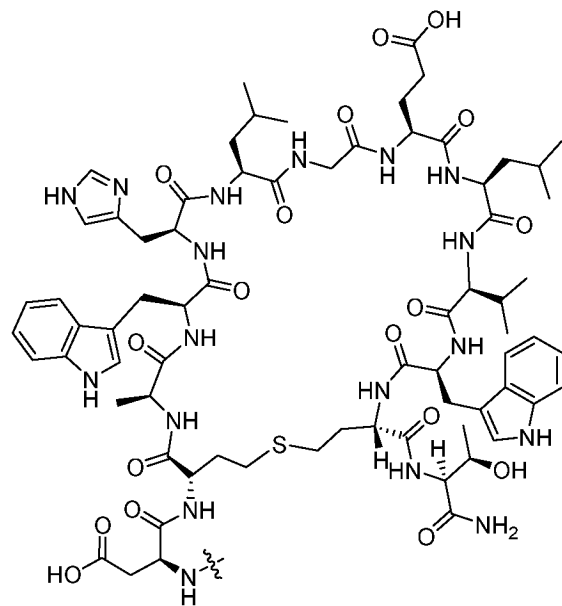
A-16



A-17



A-18

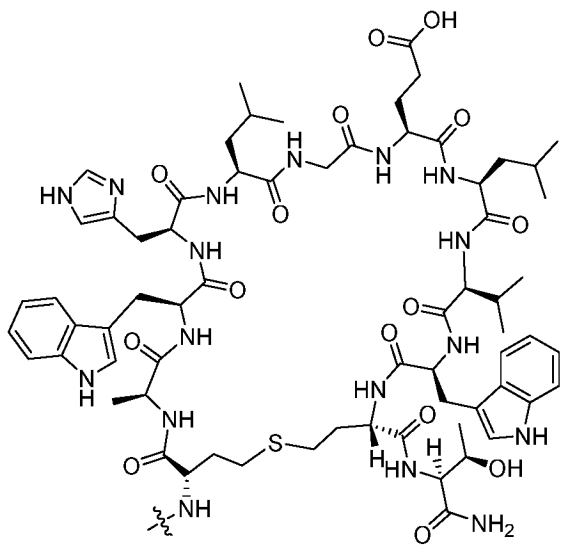


A-19

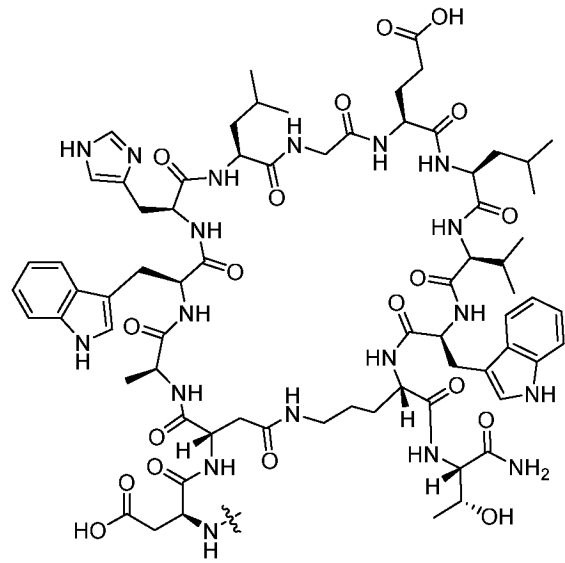


A-20

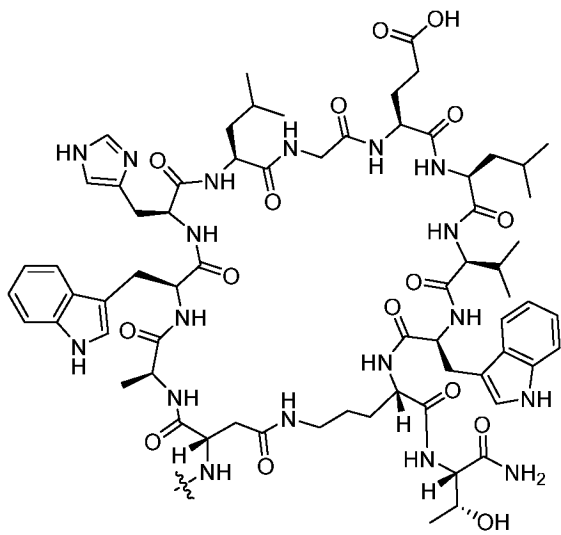




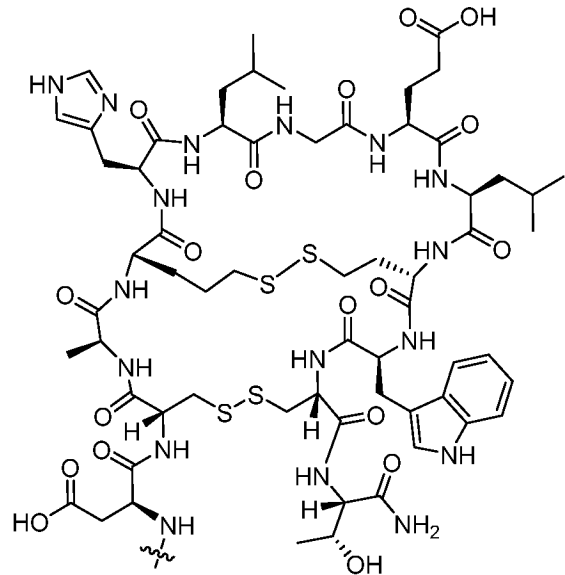
A-21



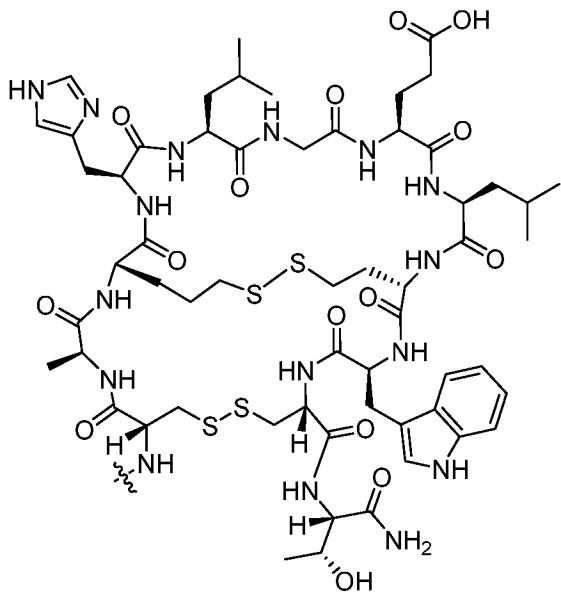
A-22



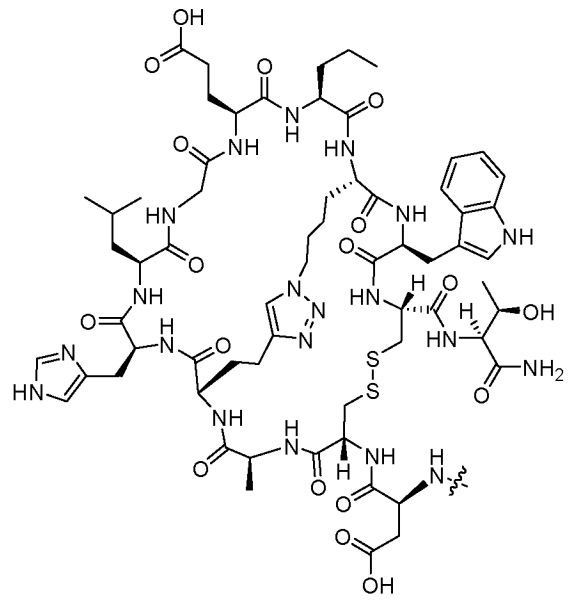
A-23



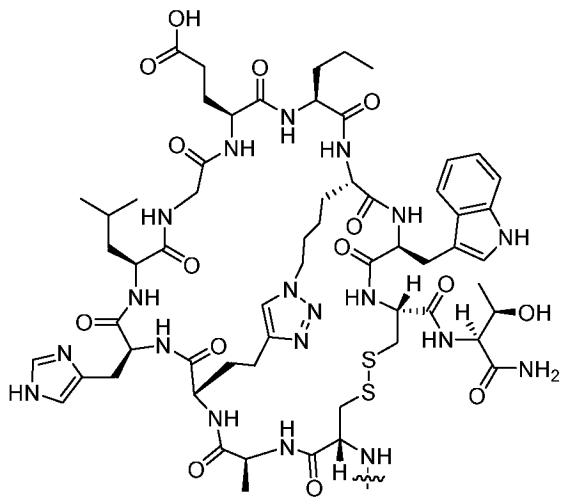
A-24



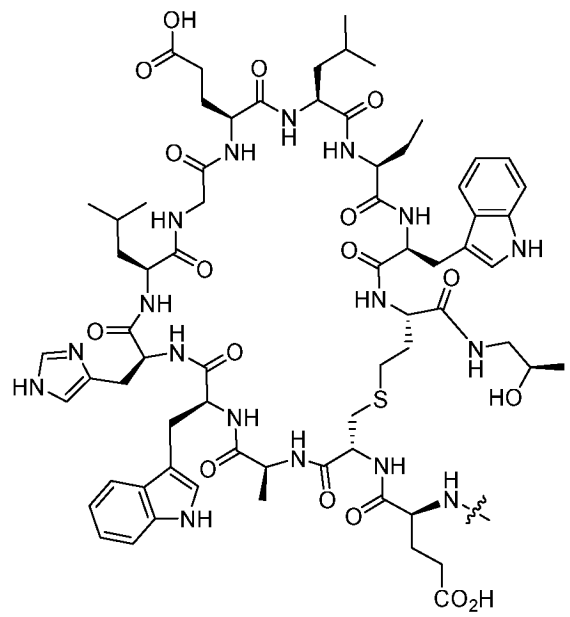
A-25



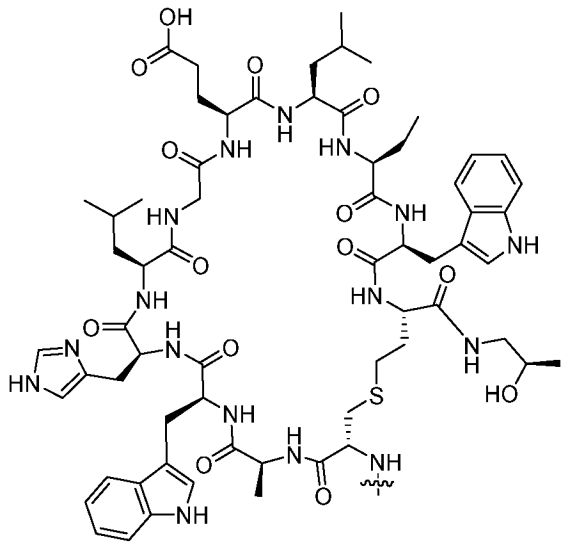
A-26



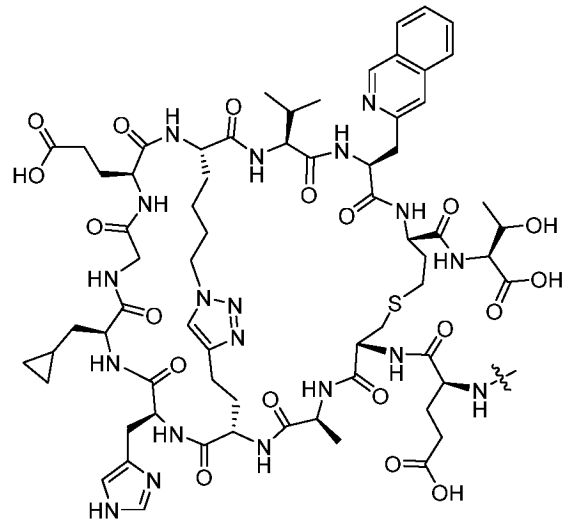
A-27



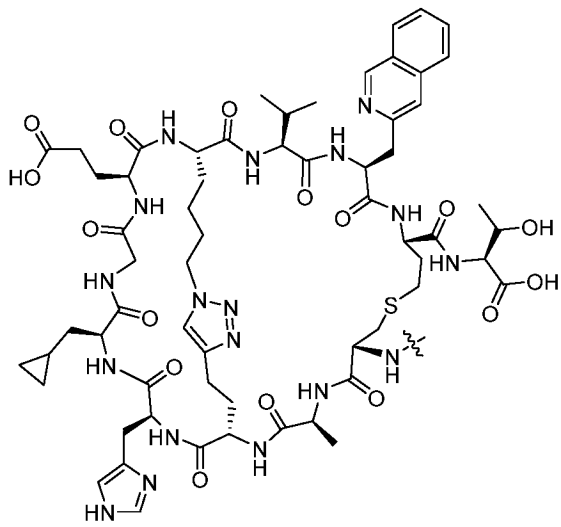
A-28



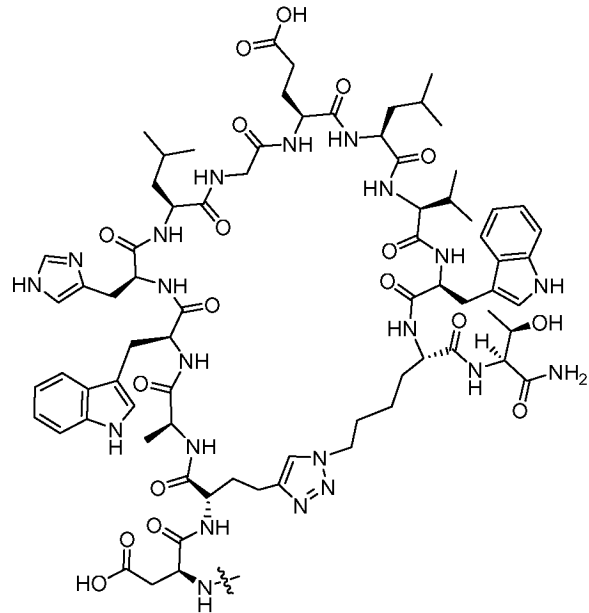
A-29



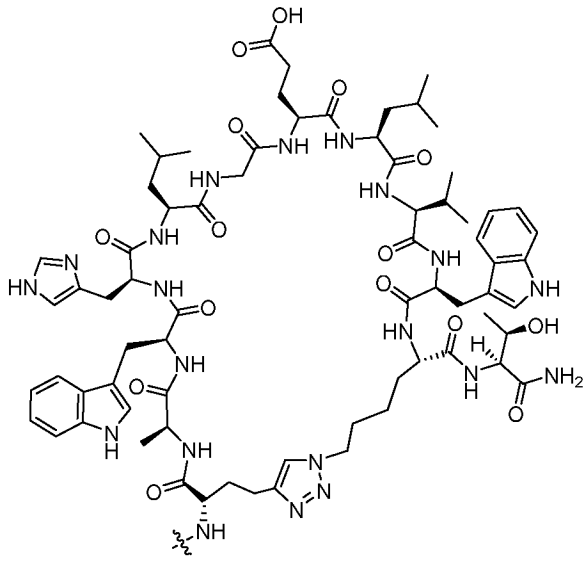
A-30



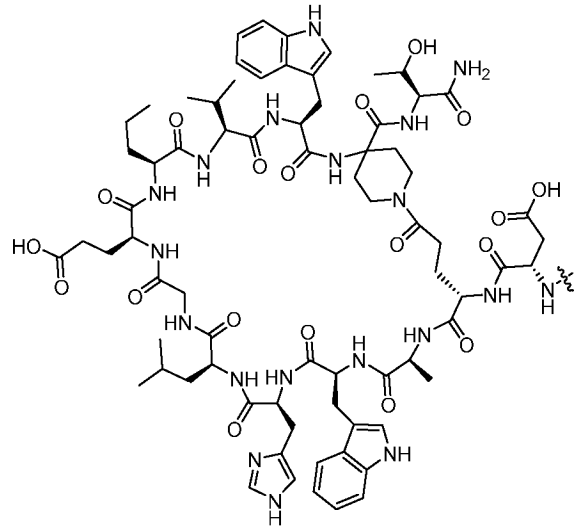
A-31



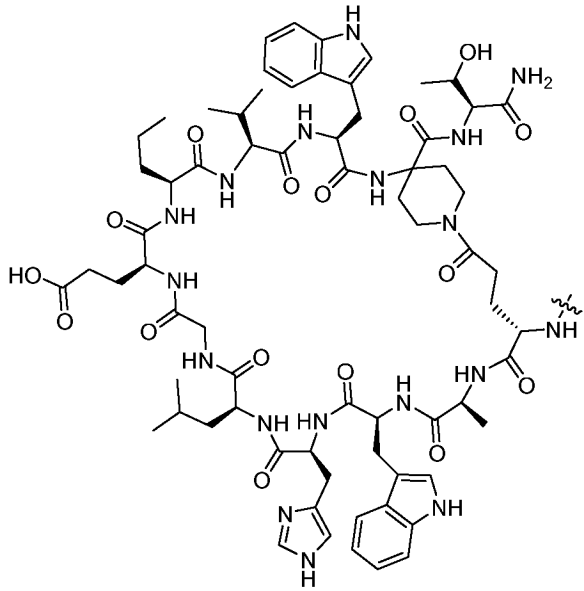
A-32



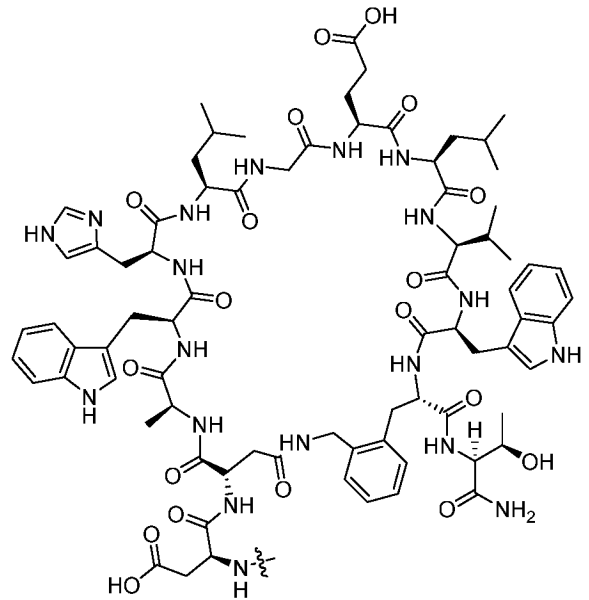
A-33



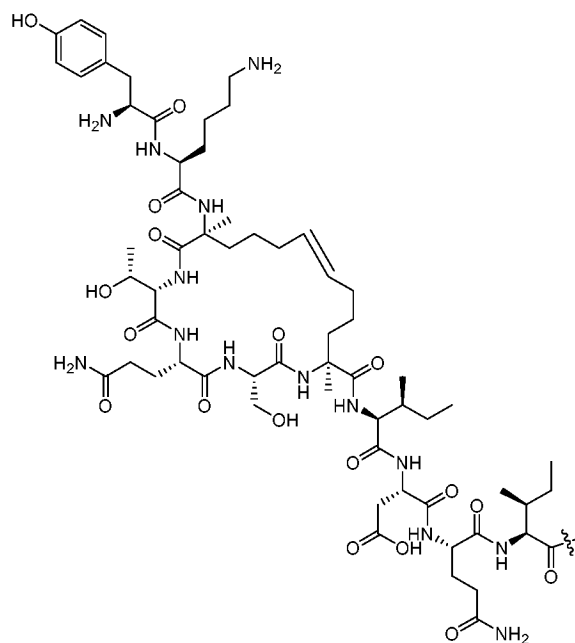
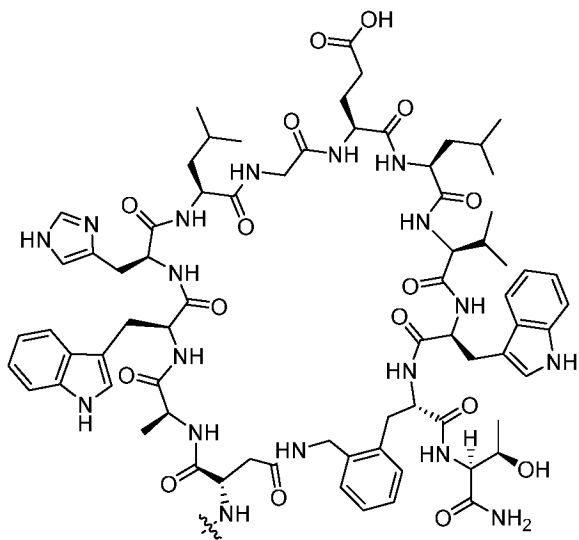
A-34



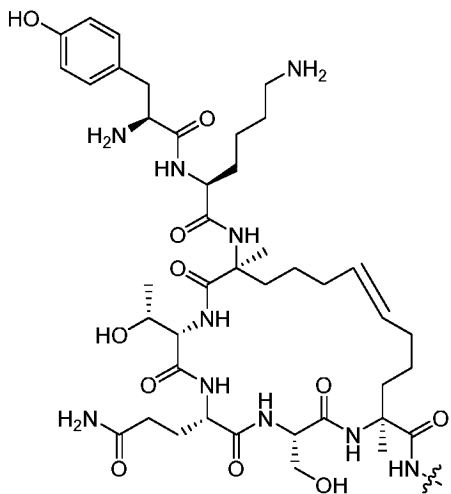
A-35



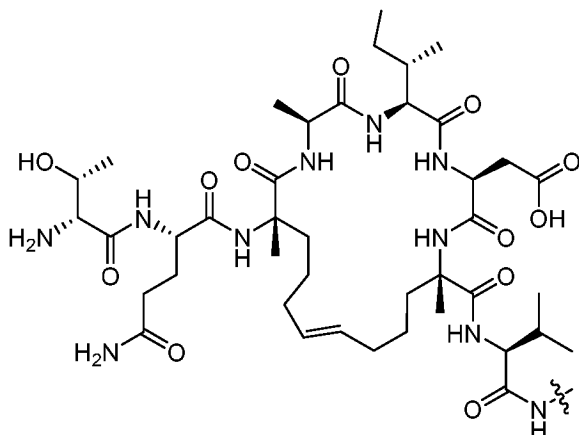
A-36



A-37

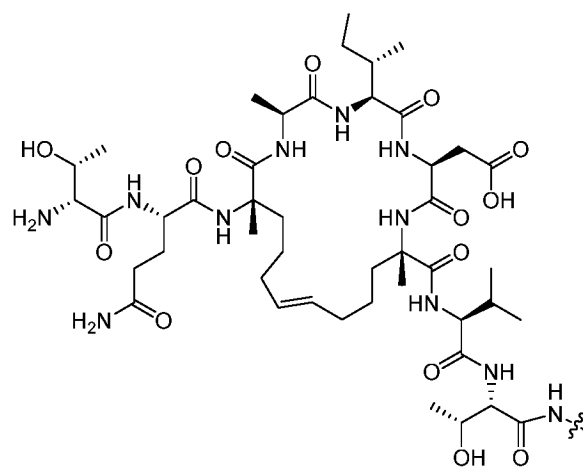


A-39

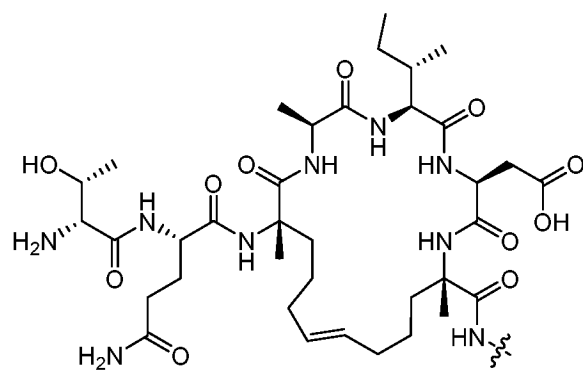


A-41

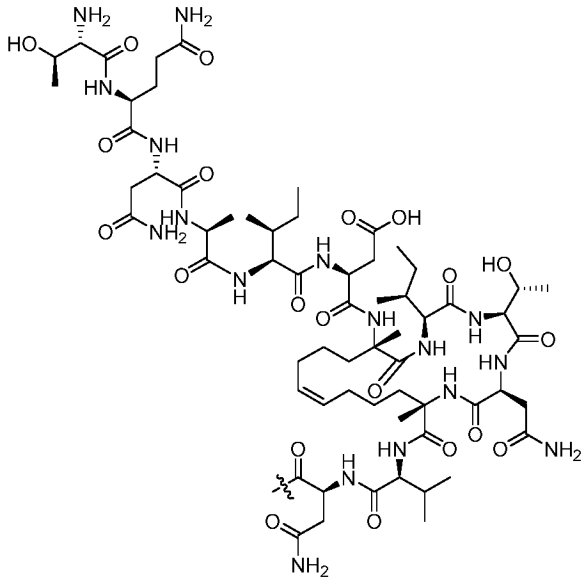
A-38



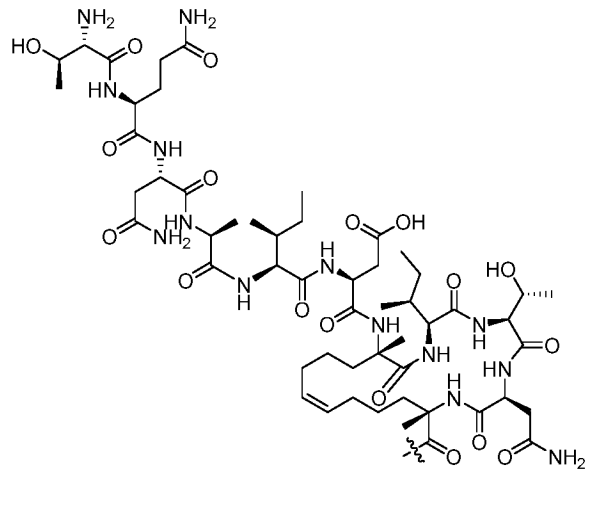
A-40



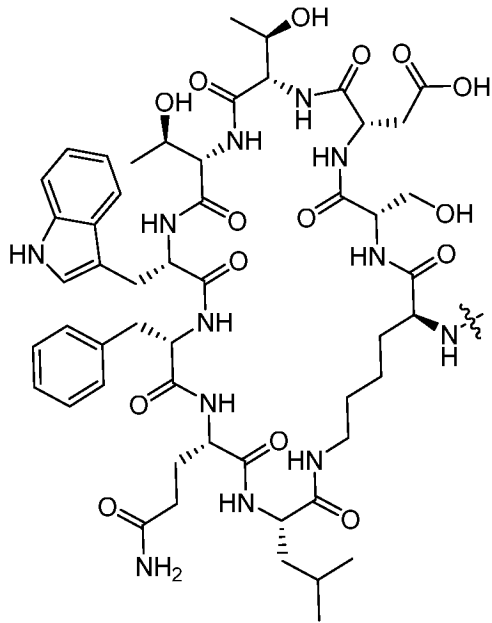
A-42



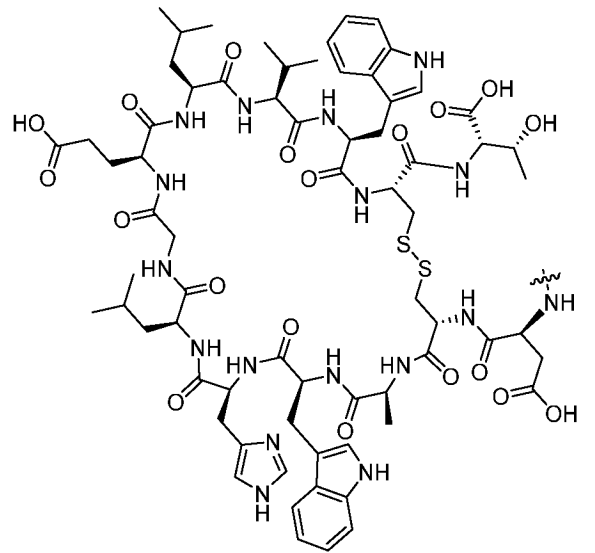
A-43



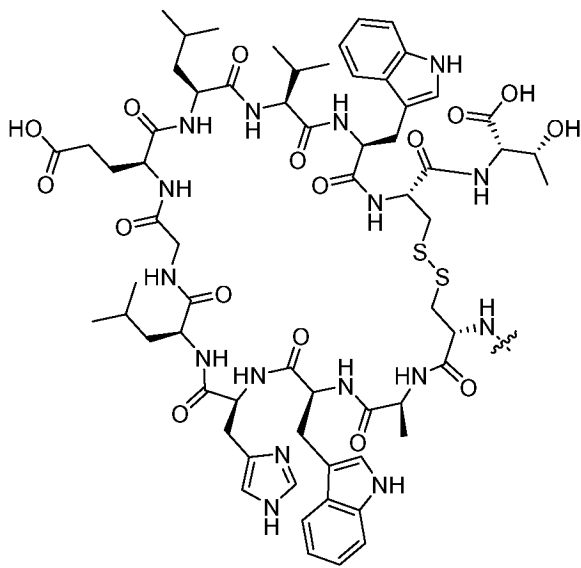
A-44



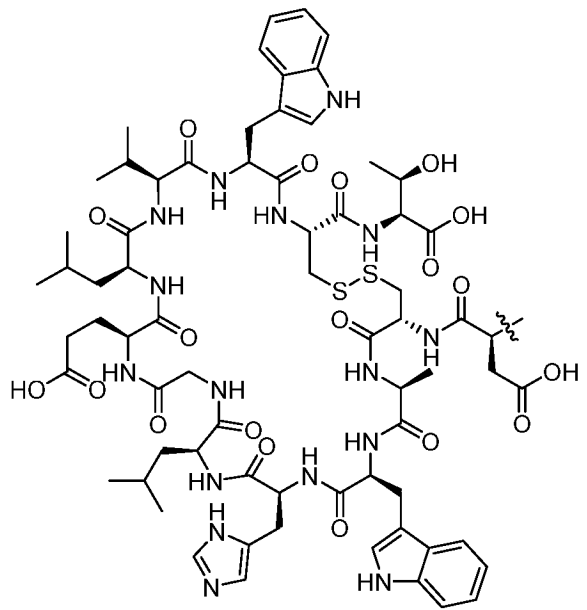
A-45



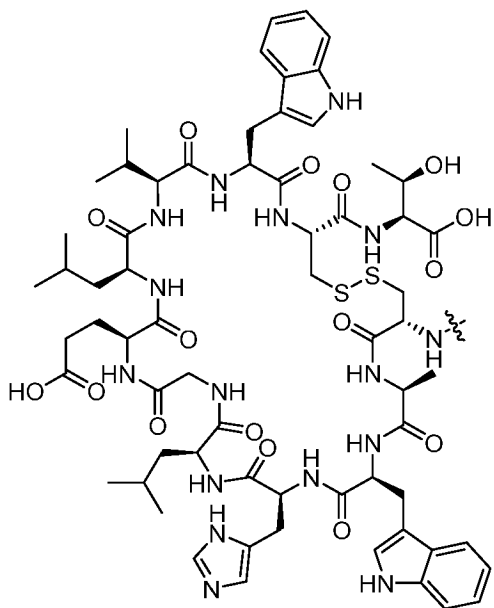
A-46



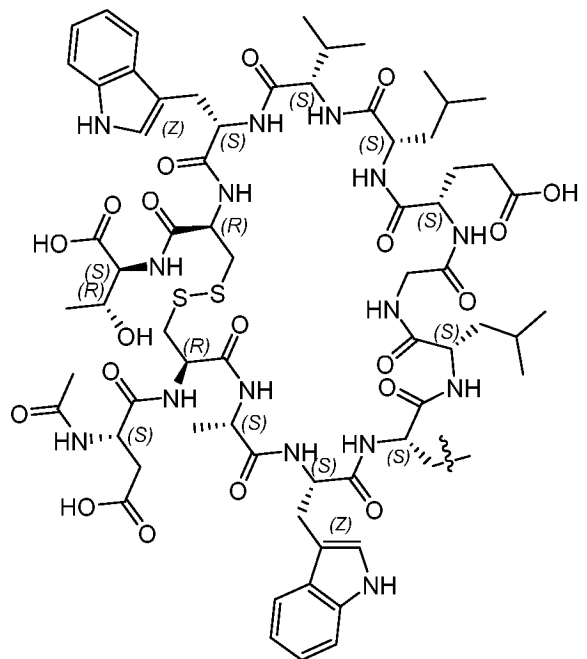
A-47



A-48



A-49



A-50

ПРЕДСТАВЛЯЮЩИЕ ИНТЕРЕС ФРАГМЕНТЫ

[40] Специалистам в данной области техники при прочтении настоящего изобретения станет понятно, что различные типы представляющих интерес фрагментов можно использовать в различных целях в соответствии с настоящим изобретением.

[41] В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты представляют

собой или содержат выявляемые фрагменты. Помимо прочего такие фрагменты могут быть применимы для выявления, количественного определения, диагностики, лечения и т. д. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит радиоактивную метку. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит метку, которую можно выявлять с помощью спектроскопии. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит флуорофор, такой как фрагмент ФИТЦ.

[42] Представляющий интерес фрагмент может представлять собой фрагмент, имеющий аффинность в отношении конкретной мишени, связанной с медицинским состоянием, нарушением или заболеванием. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты представляют собой или содержат фрагменты терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит лекарственный фрагмент, например лекарственный фрагмент в конъюгате антитело – лекарственный препарат. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит токсический агент. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит цитотоксический агент. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит противораковый агент. В некоторых вариантах осуществления противораковый агент представляет собой химиотерапевтический агент.

[43] В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты представляют собой или содержат фрагменты, которые могут взаимодействовать с другими агентами и/или рекрутировать другие агенты, такие как белки, нуклеиновые кислоты, клетки и т. д. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты взаимодействуют с белками, экспрессируемыми определенными типами клеток, например, иммунными клетками, клетками заболевания и т. д. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты представляют собой связывающие иммунные клетки фрагменты. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты рекрутируют иммунные клетки. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты иницируют, стимулируют и/или усиливают один или более видов иммунной активности, например, для удаления, уничтожения и/или ингибирования необходимых мишеней (например, раковых клеток, антигенов и т. д.). В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты рекрутируют клетки заболевания и/или связываются с ними и иницируют, стимулируют и/или усиливают удаление,

уничтожение и/или ингибирование клеток заболевания.

[44] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит низкомолекулярный агент (например, агент, который может специфически связываться со своими белковыми мишенями, клетками-мишенями и т. д.). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит пептидный или белковый агент (например, scFv, пептид, связывающийся с конкретной мишенью, и т. д.). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит агент на основе нуклеиновой кислоты (например, олигонуклеотид, мРНК и т. д.). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит углеводный агент. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит липидный агент.

[45] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит белковый комплекс (например, Fab). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит флуорофор. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит цитотоксический низкомолекулярный агент. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит цитотоксический пептидный агент.

[46] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой адъювант. Специалистам в данной области техники известны различные адъюванты, которые можно использовать как представляющие интерес фрагменты в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления адъювант представляет собой описанный в US 2019/0015516, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент стимулирует иммунную систему.

[47] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит частицу. В некоторых вариантах осуществления частица представляет собой или содержит наночастицу.

[48] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит агент на основе нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или

содержит аптамер.

[49] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой агент на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой фрагмент агента на основе антитела, который не содержит область, с которой связывается связывающий мишень фрагмент. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой агент на основе антитела, который не содержит Fc-область. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv направлен на другой антиген, чем агент-мишень на основе антитела.

[50] В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты представляют собой или содержат реактивные фрагменты, в частности партнеры по реакции для биоортогональных реакций. Подходящие реактивные фрагменты, включая фрагменты для биоортогональных реакций, широко известны в данной области техники и могут использоваться в данном документе. В некоторых вариантах осуществления биоортогональная реакция представляет собой реакцию циклодобавления, например, клик-химию. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит $-N_3$. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит алкин.

[51] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент может представлять собой фрагмент, который связывается с вирусом SARS-CoV-2, который связан с заболеванием COVID-19. Например, фрагмент, который связывается с вирусом SARS-CoV-2, может представлять собой полипептид, описанный в L. Cao et al., "De novo design of picomolar SARS-CoV-2 mini-protein inhibitors" *Science* 370, 426–431 (2020), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Такой полипептидный фрагмент может приводить к связыванию со спайк-белками SARS-CoV-2, ингибированию, снижению и предотвращению связывания и/или инфицирования клеток, ингибированию, уничтожению и удалению вирусов SARS-CoV-2 и/или инфицированных ими клеток и т. д. Различные представляющие интерес фрагменты, которые взаимодействуют с вирусом SARS-CoV-2, описаны в заявке на Международный патент № PCT/US21/24186, поданной 25 марта 2021 г., предварительной заявке на патент США № 63/146584, поданной 6 февраля 2021 г., и предварительной заявке на патент США № 63/182098, поданной 30

апреля 2021 г., каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[52] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент улучшает одно или более свойств и/или один или более видов активности агента-мишени. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит усилитель стабильности. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент улучшает одно или более фармакодинамических и/или фармакокинетических свойств агента-мишени.

[53] В некоторых вариантах осуществления выполнено по меньшей мере одно из следующих условий:

(a) представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит терапевтический агент;

(b) представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит фрагмент, который может связываться с белком, нуклеиновой кислотой или клеткой; и/или

(c) представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит реактивный фрагмент, подходящий для биоортогональной реакции.

[54] В некоторых вариантах осуществления MOI представляет собой или содержит терапевтический агент; и/или MOI представляет собой или содержит агент на основе антитела.

СВЯЗЫВАЮЩИЕ ГРУППЫ

[55] В некоторых вариантах осуществления фрагменты необязательно соединены друг с другом посредством линкерных фрагментов. Например, в некоторых вариантах осуществления реактивная группа, например RG, соединена с представляющим интерес фрагментом, например MOI, посредством линкера, например L^{RM} . В некоторых вариантах осуществления фрагмент, например LG, может также содержать один или более линкеров, например L^{LG1} , L^{LG2} , L^{LG3} , L^{LG4} и т. д., для связывания различных частей. В некоторых вариантах осуществления L^{LG} представляет собой линкерный фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} представляет собой линкерный фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой линкерный фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой линкерный фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^{LG4} представляет собой линкерный фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^{RM} представляет собой линкерный фрагмент, описанный в данном документе. В

некоторых вариантах осуществления L^{PM} представляет собой L, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^{PM} представляет собой линкерный фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^{PM} представляет собой L, как описано в данном документе.

[56] Линкерные фрагменты различных типов и/или предназначенные для различных целей, например, применимые в конъюгатах антитело – лекарственный препарат и т. д., можно использовать в соответствии с настоящим изобретением.

Линкерные фрагменты могут быть двухвалентными или поливалентными в зависимости от того, как они используются. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент является поливалентным и соединяет более двух фрагментов.

[57] В некоторых вариантах осуществления L^{LM} содержит один или более $-[(CH_2)_n-O]_m-$, где каждое n независимо равно 1–20 и m равно 1–100.

[58] В некоторых вариантах осуществления линкер L^{RM} содержит один или более $-[(CH_2)_n-O]_m-$, где каждое n независимо равно 1–20 и m равно 1–100.

РЕАКТИВНЫЕ ГРУППЫ

[59] В некоторых вариантах осуществления предложенные соединения, например применимые в качестве реакционных партнеров, содержат реактивные группы (например, RG). Как проиллюстрировано в данном документе, во многих вариантах осуществления в предложенных соединениях реактивные группы (например, RG) расположены между первыми группами (например, LG) и представляющими интерес фрагментами (например, MOI) и необязательно и независимо связаны с первыми группами и представляющими интерес фрагментами посредством линкеров. В некоторых вариантах осуществления RG представляет собой реактивную группу, описанную в данном документе.

[60] В некоторых вариантах осуществления, как продемонстрировано в данном документе, реактивные группы при использовании в соединениях, которые содержат связывающие мишень фрагменты, реагируют медленно и обеспечивают низкий уровень или, в некоторых вариантах осуществления, отсутствие конъюгации представляющих интерес фрагментов с агентами-мишенями. Как продемонстрировано в данном документе, комбинация реактивных групп со связывающими мишень фрагментами в одних и тех же соединениях, например как в соединениях формулы R-I или их солях, может, помимо прочего, способствовать реакциям между реактивными группами и агентами-мишенями, повышать эффективность реакции, уменьшать количество

побочных реакций и/или улучшать селективность реакции (например, в терминах целевых сайтов, где происходит конъюгация представляющих интерес фрагментов с агентами-мишенями).

[61] Реактивные группы в предложенных соединениях могут вступать в реакцию с различными типами групп в агентах-мишенях. В некоторых вариантах осуществления реактивные группы в предложенных соединениях селективно вступают в реакцию с аминогруппами агентов-мишеней, например, группами $-NH_2$ боковых цепей остатков лизина белков. В некоторых вариантах осуществления реактивные группы при использовании в предложенных соединениях, например соединениях формулы R-I или их солях, селективно вступают в реакцию с конкретными сайтами агентов-мишеней, например, как показано в примерах в данном документе, одном или более из K246, K248, K288, K290, K317 и т. д. в IgG1, K251, K253 и т. д. в случае IgG2, K239, K241 в случае IgG4 и т. д. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K246 или K248 тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления сайты представляют собой K246 и/или K248 тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K246 тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K248 тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K288 или K290 тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K288 тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K290 тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K317. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K414 тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K185 легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K187 легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления сайты представляют собой K251 и/или K253 тяжелой цепи IgG2. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K251 тяжелой цепи IgG2. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K253 тяжелой цепи IgG2. В некоторых вариантах осуществления сайты представляют собой K239 и/или K241 тяжелой цепи IgG4. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K239 тяжелой цепи IgG4. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K241 тяжелой цепи IgG4. В некоторых вариантах осуществления конъюгация селективно происходит в одном или более сайтах тяжелой цепи по сравнению с сайтами легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, в случае методик без связывающих мишень фрагментов, конъюгация происходит в сайтах легкой цепи больше, чем в сайтах тяжелой цепи.

[62] В некоторых вариантах осуществления реактивная группа, например RG, представляет

собой или содержит сложноэфирную группу. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа, например RG, представляет собой или содержит электрофильную группу, например акцептор Михаэля.

[63] В некоторых вариантах осуществления RG представляет собой реактивную группу формулы $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$, где

L^{LG2} представляет собой $-NH-C(O)O-C(R')_2-$, где каждый R' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом R' необязательно соединены с образованием кольца;

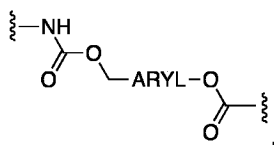
L^{LG3} представляет собой необязательно замещенное арильное кольцо;

L^{LG4} представляет собой $-NH-$ или $-O-$;

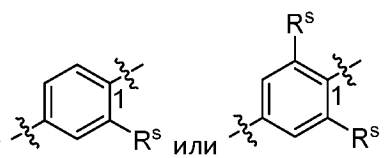
L^{RG1} представляет собой $-C(O)-$, $-S(O)-$, $-OS(O)_2-$ или $-OP(O)(OR)_2-$; и

L^{RG2} представляет собой ковалентную связь или $[-C(R'')_2C(R'')=C(R'')]C(O)-$, где каждый R'' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом любые два R'' необязательно соединены с образованием кольца.

[64] В некоторых вариантах осуществления RG представляет собой или содержит реактивную группу, имеющую следующую формулу:

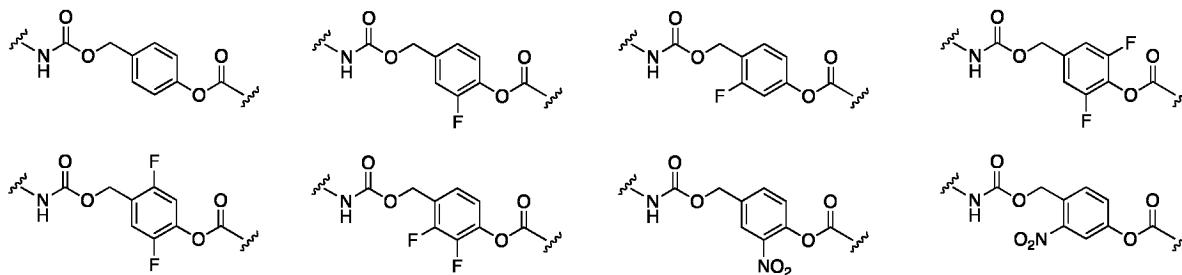


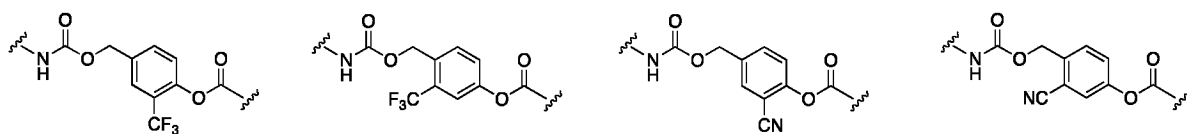
где ARYL представляет собой замещенное или незамещенное парафениленовое кольцо. В



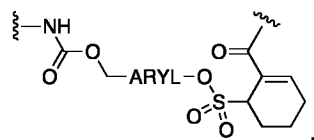
некоторых вариантах осуществления ARYL может иметь структуру некоторых вариантов осуществления ARYL может иметь структуру R^S или R^S , где R^S в каждом случае независимо выбран из галогена, $-NO_2$, $-F$, $-L-R'$, $-C(O)-L-R'$, $-S(O)-L-R'$, $-S(O)_2-L-R'$ и $-P(O)(-L-R')_2$, а R' представляет собой H или C₁-C₆алкил.

[65] В некоторых вариантах осуществления реактивная группа представляет собой или содержит одну из следующих формул:





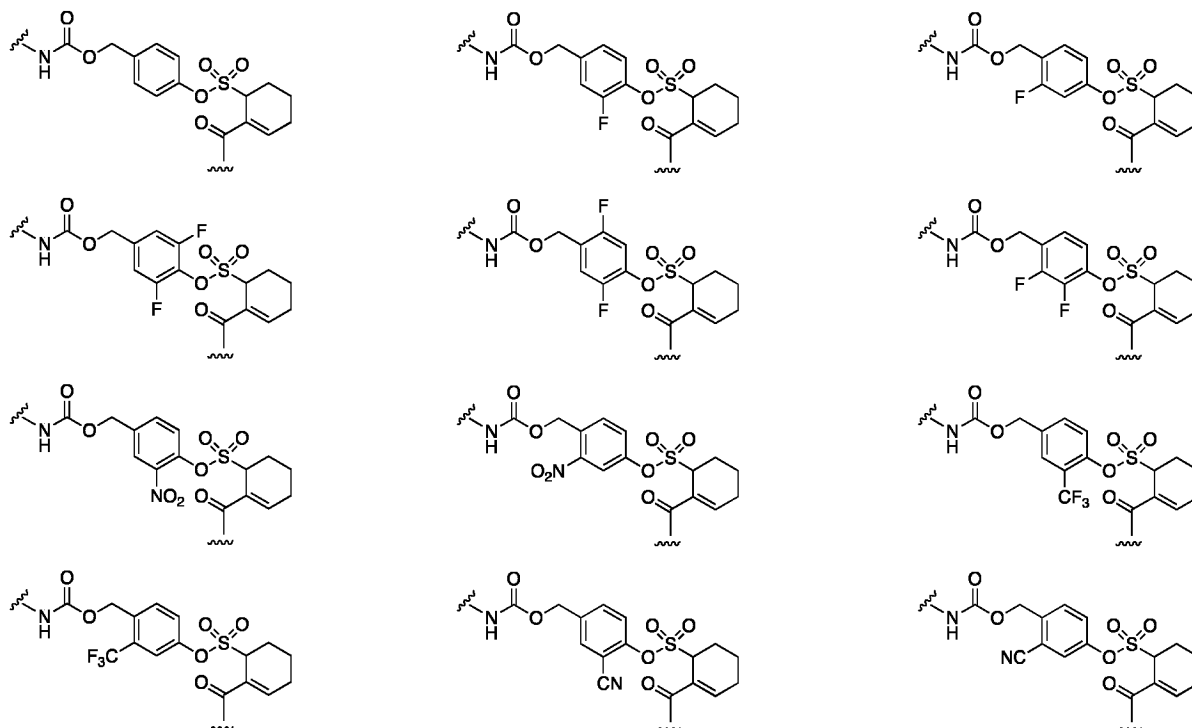
[66] В некоторых вариантах осуществления RG представляет собой или содержит реактивную группу, имеющую следующую формулу:



где ARYL представляет собой замещенное или незамещенное парафениленовое кольцо. В

некоторых вариантах осуществления ARYL может иметь структуру или , где R^s в каждом случае независимо выбран из галогена, -NO₂, -F, -L-R', -C(O)-L-R', -S(O)-L-R', -S(O)₂-L-R' и -P(O)(-L-R')₂, а R' представляет собой H или C₁-C₆алкил.

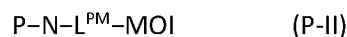
[67] В некоторых вариантах осуществления реактивная группа представляет собой или содержит одну из следующих формул:



КОМПОЗИЦИИ

[68] В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая одно или более из вышеуказанных соединений.

[69] В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать:
первое соединение, имеющее структуру формулы (P-II):



где:

P-N представляет собой фрагмент белкового агента, содержащий остаток лизина;

L^{PM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент; и

второе соединение, имеющее структуру:



где LG представляет собой группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью.

[70] В некоторых вариантах осуществления композиция может дополнительно содержать:
третье соединение, имеющее формулу (R-I):



LG представляет собой группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью, которая идентична LG в формуле (LG-I);

RG представляет собой реактивную группу формулы $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$, где

L^{LG2} представляет собой $-NH-C(O)O-C(R')_2-$, где каждый R' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом R' необязательно соединены с образованием кольца;

L^{LG3} представляет собой необязательно замещенное арильное кольцо;

L^{LG4} представляет собой $-NH-$ или $-O-$;

L^{RG1} представляет собой $-C(O)-$, $-S(O)-$, $-OS(O)_2-$ или $-OP(O)(OR)_2-$; и

L^{RG2} представляет собой ковалентную связь или $[-C(R'')_2C(R'')=C(R'')]C(O)-$,

где каждый R'' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом любые два R'' необязательно соединены с образованием кольца;

L^{RM} представляет собой линкер, который идентичен линкеру в формуле (P-II); и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент;

четвертое соединение, имеющее формулу (R-III):



или их комбинацию.

[71] В некоторых вариантах осуществления композиции могут содержать первое и второе соединения в эквимолярном количестве. В некоторых вариантах осуществления количество второго соединения может составлять 50 мольных процентов (моль %) или менее в расчете на общее число молей первого и второго соединений в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество второго соединения может составлять 50 моль % или менее, 45 моль % или менее, 40 моль % или менее, 35 моль % или менее, 30 моль % или менее, 25 моль % или менее, 20 моль % или менее, 15 моль % или менее, 10 моль % или менее или 5 моль % или менее в расчете на общее число молей первого и второго соединений в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество второго соединения может составлять 5 % или менее, 4 % или менее, 3 % или менее, 2 % или менее или 1 % или менее в расчете на общее число молей первого и второго соединений в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество второго соединения может составлять 1,0 % или менее, 0,9 % или менее, 0,8 % или менее, 0,7 % или менее, 0,6 % или менее, 0,5 % или менее, 0,4 % или менее, 0,3 % или менее, 0,2 % или менее, 0,1 % или менее в расчете на общее число молей первого и второго соединений в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество второго соединения может составлять 0,10 % или менее, 0,09 % или менее, 0,08 % или менее, 0,07 % или менее, 0,06 % или менее, 0,05 % или менее, 0,04 % или менее, 0,03 % или менее, 0,02 % или менее, 0,01 % или менее в расчете на общее число молей первого и второго соединений в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество второго соединения может составлять 0,010 % или менее, 0,009 % или менее, 0,008 % или менее, 0,007 % или менее, 0,006 % или менее, 0,005 % или менее, 0,004 % или менее, 0,003 % или менее, 0,002 % или менее, 0,001 % или менее в расчете на общее число молей первого и второго соединений в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество второго соединения может составлять 0,0010 % или менее, 0,0009 % или менее, 0,0008 % или менее, 0,0007 % или менее, 0,0006 % или менее, 0,0005 % или менее, 0,0004 % или менее, 0,0003 % или менее, 0,0002 % или менее, 0,0001 % или менее в расчете на общее число молей первого и второго соединений в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество второго соединения может составлять 0,00010 % или менее, 0,00009 % или менее, 0,00008 % или менее, 0,00007 % или менее, 0,00006 % или менее, 0,00005 % или менее, 0,00004 % или менее, 0,00003 % или менее, 0,00002 % или менее, 0,00001 % или менее в расчете на общее число молей первого и второго соединений в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество

второго соединения может составлять 0,000010 % или менее, 0,000009 % или менее, 0,000008 % или менее, 0,000007 % или менее, 0,000006 % или менее, 0,000005 % или менее, 0,000004 % или менее, 0,000003 % или менее, 0,000002 % или менее, 0,000001 % или менее в расчете на общее число молей первого и второго соединений в композиции.

[72] В некоторых вариантах осуществления композиции могут дополнительно содержать третье соединение, четвертое соединение или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления количество третьего соединения, четвертого соединения или их комбинации может составлять 5 % или менее, 4 % или менее, 3 % или менее, 2 % или менее или 1 % или менее в расчете на число молей первого соединения в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество третьего соединения, четвертого соединения или их комбинации может составлять 1,0 % или менее, 0,9 % или менее, 0,8 % или менее, 0,7 % или менее, 0,6 % или менее, 0,5 % или менее, 0,4 % или менее, 0,3 % или менее, 0,2 % или менее, 0,1 % или менее в расчете на число молей первого соединения в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество третьего соединения, четвертого соединения или их комбинации может составлять 0,10 % или менее, 0,09 % или менее, 0,08 % или менее, 0,07 % или менее, 0,06 % или менее, 0,05 % или менее, 0,04 % или менее, 0,03 % или менее, 0,02 % или менее, 0,01 % или менее в расчете на число молей первого соединения в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество третьего соединения, четвертого соединения или их комбинации может составлять 0,010 % или менее, 0,009 % или менее, 0,008 % или менее, 0,007 % или менее, 0,006 % или менее, 0,005 % или менее, 0,004 % или менее, 0,003 % или менее, 0,002 % или менее, 0,001 % или менее в расчете на число молей первого соединения в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество третьего соединения, четвертого соединения или их комбинации может составлять 0,0010 % или менее, 0,0009 % или менее, 0,0008 % или менее, 0,0007 % или менее, 0,0006 % или менее, 0,0005 % или менее, 0,0004 % или менее, 0,0003 % или менее, 0,0002 % или менее, 0,0001 % или менее в расчете на число молей первого соединения в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество третьего соединения, четвертого соединения или их комбинации может составлять 0,00010 % или менее, 0,00009 % или менее, 0,00008 % или менее, 0,00007 % или менее, 0,00006 % или менее, 0,00005 % или менее, 0,00004 % или менее, 0,00003 % или менее, 0,00002 % или менее, 0,00001 % или менее в расчете на число молей первого соединения в композиции. В некоторых вариантах осуществления количество третьего соединения, четвертого соединения или их комбинации может составлять 0,000010 % или менее, 0,000009 % или менее, 0,000008 % или менее, 0,000007 % или менее, 0,000006 % или менее,

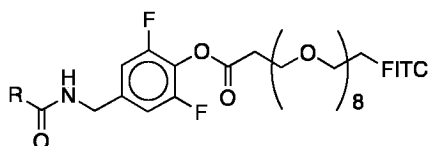
0,000005 % или менее, 0,000004 % или менее, 0,000003 % или менее, 0,000002 % или менее, 0,000001 % или менее в расчете на число молей первого соединения в композиции.

[73] Данное изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами.

ПРИМЕРЫ

[74] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент может представлять собой связывающий иммуноглобулин фрагмент, содержащий K246 и/или K248, а способ направленной конъюгации может быть представлен следующими диаграммами, приведенными на Фиг. 1.

[75] В некоторых вариантах осуществления связывающая мишень группа может представлять собой линейный пептидный связывающий IgG фрагмент, содержащий направляющую группу, имеющую K_d 600 нМ:



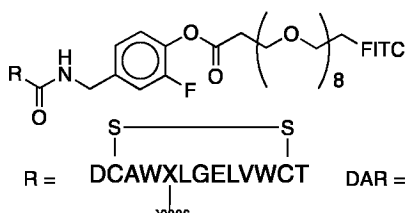
R = GSYWYDVWF-PEG2— DAR = 0.6

R = H DAR = 0.06

(SEQ ID NO:1)

[76] Данные по специфичности связывания для линейного пептидного связывающего IgG фрагмента приведены на Фиг. 2.

[77] В некоторых вариантах осуществления связывающая мишень группа может представлять собой циклический пептидный связывающий IgG фрагмент, содержащий направляющую группу, имеющую K_d 15 нМ:



R = DCAWXLGELVWCT DAR = 1.4

R = H DAR = 0.02

(SEQ ID NO:2)

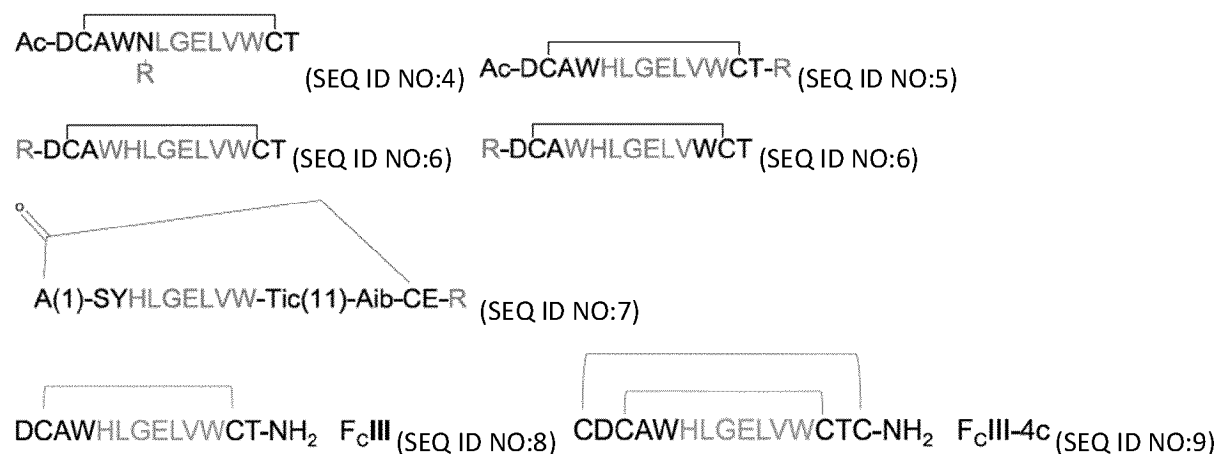
[78] Данные по специфичности связывания для циклического пептидного связывающего IgG

фрагмента приведены на Фиг. 3.

[79] В некоторых вариантах осуществления соединение может иметь реактивную группу, которая представляет собой аза-акцептор Михаэля, как показано на Фиг. 4А. В некоторых вариантах осуществления соединение может иметь реактивную группу, которая после конъюгации высвобождает CO₂, как показано на Фиг. 4В.

[80] В некоторых вариантах осуществления соединения может иметь структуру, показанную на Фиг. 5.

[81] В некоторых вариантах осуществления связывающая мишень группа может содержать одну из следующих последовательностей, которые приведены на Фиг. 6:



[82] Синтез некоторых из этих групп проиллюстрирован на Фиг. 7–8.

[83] Типовые группы LG–RG в соответствии с некоторыми вариантами осуществления приведены на Фиг. 9.

[84] В тексте данной заявки ссылки на различные публикации приведены по имени автора и дате или по номеру патента или номеру патентной публикации. Описание этих публикаций в полном объеме включено в данную заявку посредством ссылки с целью более полного описания уровня техники, известного специалистам в данной области техники на момент создания изобретения, описанного и заявленного в данном документе. Однако цитирование литературы в данном документе не следует воспринимать как признание того, что такая литература составляет предшествующий настоящему изобретению уровень техники.

[85] Специалисты в данной области техники определяют или смогут установить, используя лишь рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретным процедурам, описанным в данном документе. Считается, что такие эквиваленты входят в объем изобретения и охватываются

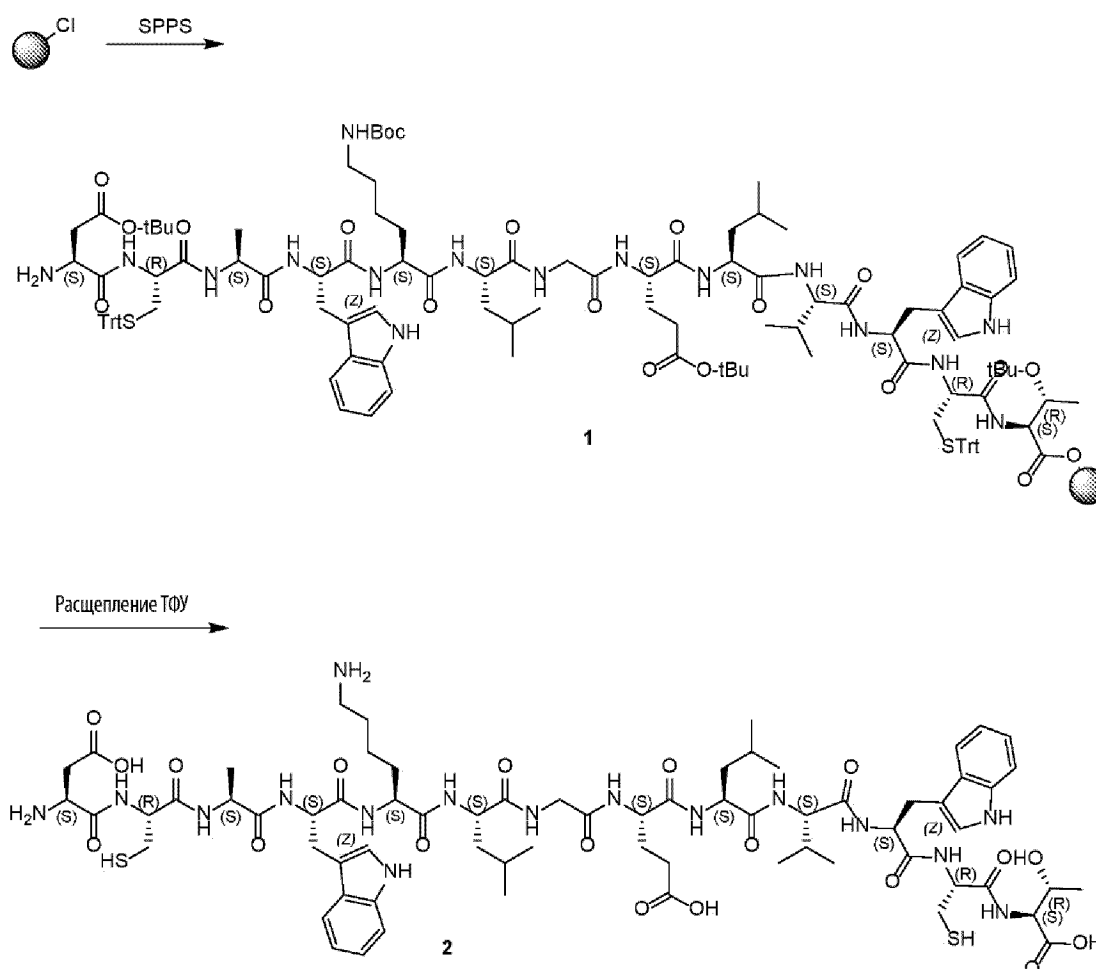
нижеприведенной формулой изобретения. Например, можно использовать фармацевтически приемлемые соли, отличные от конкретно приведенных в описании и примерах в данном документе. Кроме того, подразумевается, что конкретные элементы в рамках перечней элементов или подгруппы элементов в рамках больших групп элементов можно комбинировать с другими конкретными элементами, подгруппами элементов или большими группами элементов, независимо от того, была ли такая комбинация явно определена в данном документе.

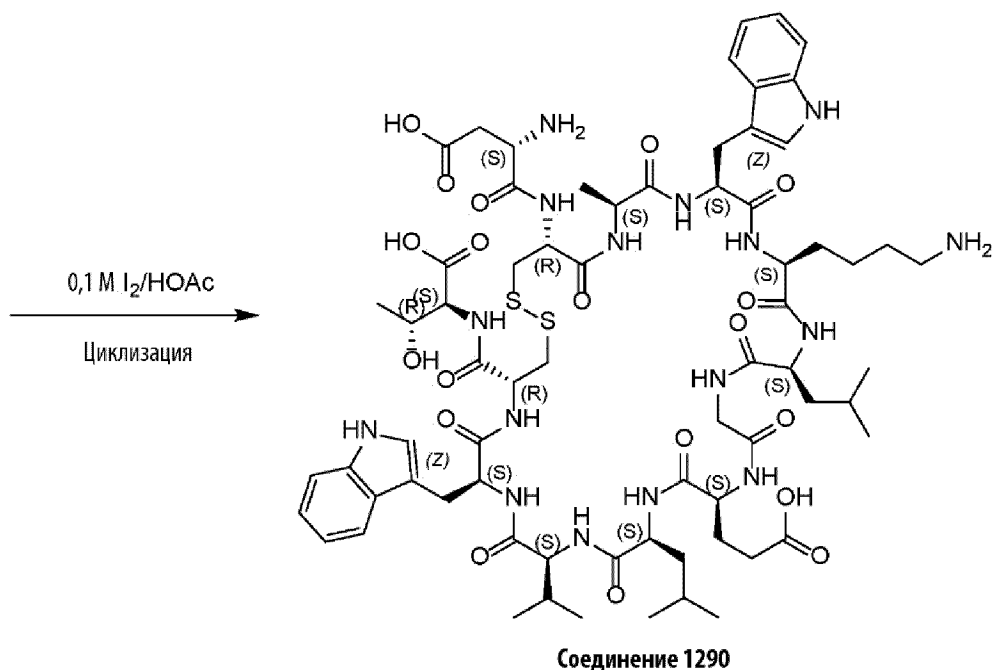
СОКРАЩЕНИЯ

№	Сокращение	ТАБЛИЦА 1	Термин
1	FMOC		Флуоренилметилоксикарбонил
2	Смола СТС		Смола на основе 2-хлортритилхлорида
3	ДХМ		Дихлорметан
4	MeOH		Метанол
5	DMF		N,N-диметилформаид
6	ГБУ		N,N,N',N'-тетраметил-O-(1H-бензотриазол-1-ил)урония гексафторфосфат
7	ДИЭА		N,N-диизопропилэтиламин
8	ТФУ		Трифторуксусная кислота
9	TIS		ГБУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
10	MeCN		Ацетонитрил
11	AcOH/HOAc		Уксусная кислота
12	МС		Масс-спектрометрия
13	NMM		4-метилморфолин
15	HOBT		1-гидроксибензотриазола гидрат
16	DMAPI		4-(диметиламино)пиридин
17	ЖХМС		Жидкостная хроматография – масс-спектрометрия
18.	ФИТЦ		Флуоресцеинизотиоцианат, изомер I
19	ВЭЖХ		Высокоэффективная жидкостная хроматография
20	ТГФ		Тетрагидрофуран
21	NaNH ₄		Боргидрид натрия
22	BOC		трет-бутоксикарбонильная защитная группа

23	SPPS	9-антраценкарбоксамид, связанный с полимером
24	ALLOC	Аллилоксикарбонильная защитная группа
25	IgG	Иммуноглобулин G
26	scFv	одноцепочечный переменный фрагмент
27	SEQ ID	ID последовательности
28	ЭДКИ	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
29	ТИПс	Триизопропилсилан
30	ДИК	N,N'-диизопропилкарбодиимид

ПРИМЕР 1. Процедура для получения соединения 1290.





Получение соединения 1290:

[86] Пептид синтезировали, используя стандартную химию Fmoc (смола CTC).

[87] Получение смолы: В сосуд, содержащий смолу CTC (1,00 г, 1,00 ммоль, 1,00 ммоль/г) и Fmoc-Thr(tBu)-ОН (397,0 мг, 1,00 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (10 мл), каплями добавляли ДИЭА (4,00 экв.) и смешивали в течение 2 ч с барботированием N₂ при 25 °С. Затем добавляли MeOH (1,0 мл) и барботировали N₂ еще в течение 30 мин. Смолу промывали ДМФ (20 мл) с последующим добавлением 20 % пиперидина в ДМФ (10 мл) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С для снятия защиты Fmoc. Смесь фильтровали, а смолу промывали ДМФ (10 мл) перед переходом к следующему этапу.

[88] Сочетание: Раствор Fmoc-Cys(Trt)-ОН (1,76 г, 3,0 ммоль, 3,00 экв.), ГБУ (0,82 г, 2,86 ммоль, 2,85 экв.) в ДМФ (10 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИЭА (6,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (20 мл).

[89] Снятие защиты: В смолу добавляли 20 % пиперидин в ДМФ (20 мл) и барботировали смесь N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию снятия защиты отслеживали по тесту с нингидрином, если он был синим или коричнево-красным, реакция была завершена. Затем смолу промывали ДМФ (20 мл).

[90] Этапы 2 и 3 повторяли для удлинения следующими аминокислотами: Номер № 3–13, таблица 1.

[91] После завершения всех этапов смолу промывали ДМФ (50 мл) , MeOH (50 мл), затем сушили при пониженном давлении для получением связанного со смолой пептидного промежуточного соединения 1 (смола СТС, 2,40 г, 1,00 ммоль).

[92] Таблица 2: Перечень аминокислот и соответствующие реагенты, используемые на SPPS.

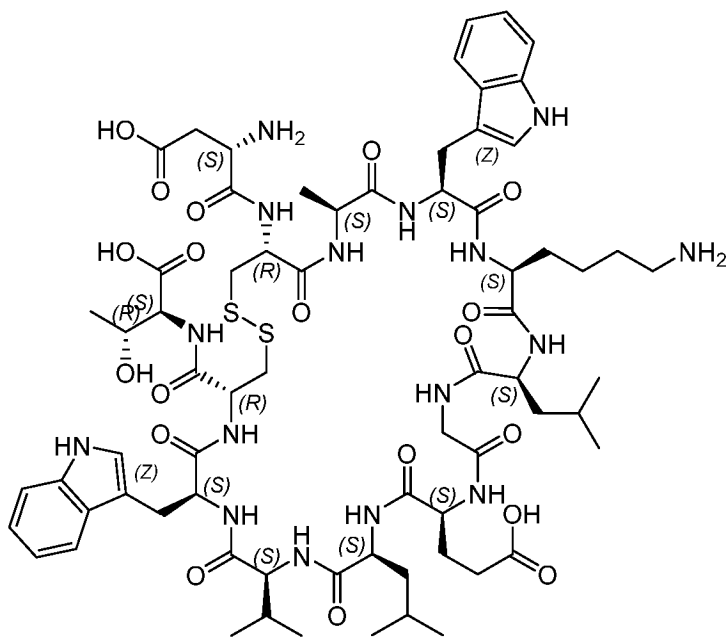
TABLE 2		
№	Материалы	Реагенты для сочетания
1	Fmoc-Thr(<i>t</i> Bu)-OH (1,00 экв.)	ДИЭА (4,00 экв.)
2	Fmoc-Cys(Trt)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
3	Fmoc-Trp-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
4	Fmoc-Val-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
5	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
6	Fmoc-Glu(<i>Ot</i> Bu)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
7	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
8	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
9	Fmoc-Lys(Вос)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
10	Fmoc-Trp-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
11	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
12	Fmoc-Cys(Trt)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
13	Fmoc-Asp(<i>Ot</i> Bu)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)

Расщепление и циклизация пептида:

[93] Расщепление: Раствор ТФУ/TIS/H₂O/3-меркаптопропановой кислоты (92,5/2,5/2,5/2,5, об./об./об., 40 мл) добавляли в смолу (промежуточное соединение 1, 0,50 ммоль, еще 0,5 ммоль использовали для соединения 1291) выше комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. После фильтрации собирали фильтрат и осаждали холодным изопропиловым эфиром (200 мл), затем отфильтровывали, а твердое вещество дважды промывали изопропиловым эфиром (100 мл) и сушили неочищенный пептид при пониженном давлении в течение 2 ч с получением промежуточного соединения 2 (0,50 ммоль, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

[94] Циклизация: В неочищенный пептид (**промежуточное соединение 2**) в MeCN/H₂O (1/1, об./об., 500 мл) каплями добавляли 0,1 M I₂/AcOH до стойкого желтого цвета, затем смесь перемешивали при 25 °С в течение 5 мин. Смесь гасили покапельным добавлением 0,1 M водн.

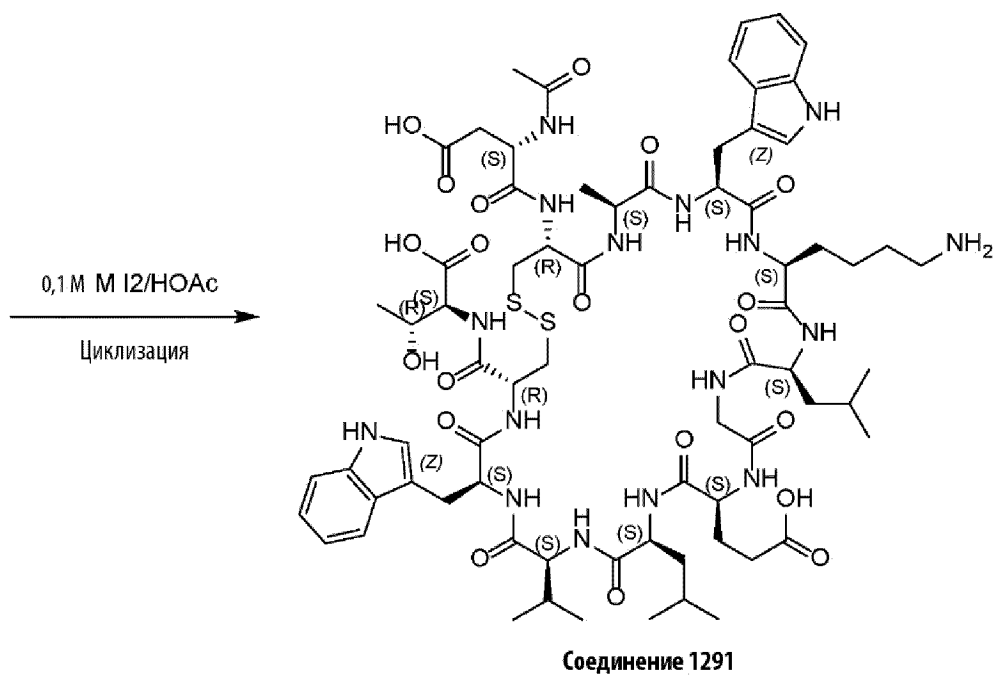
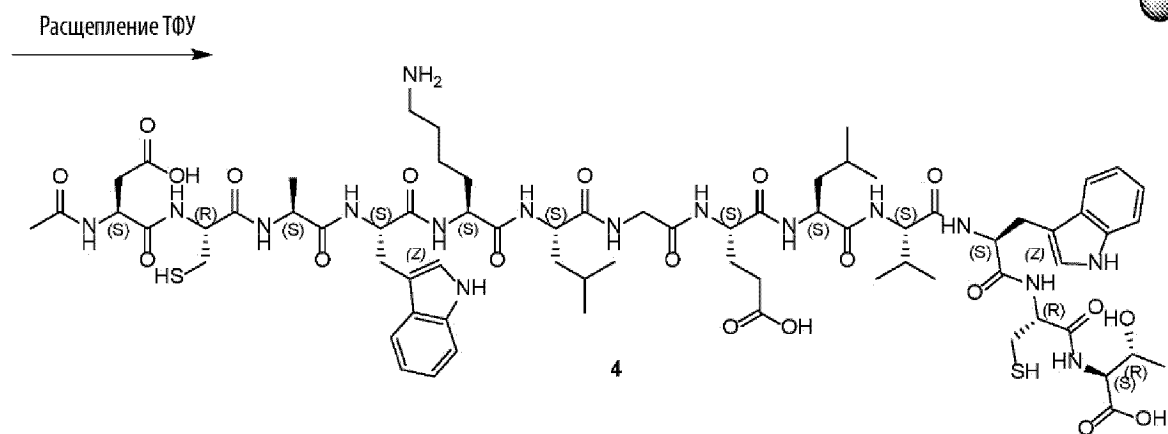
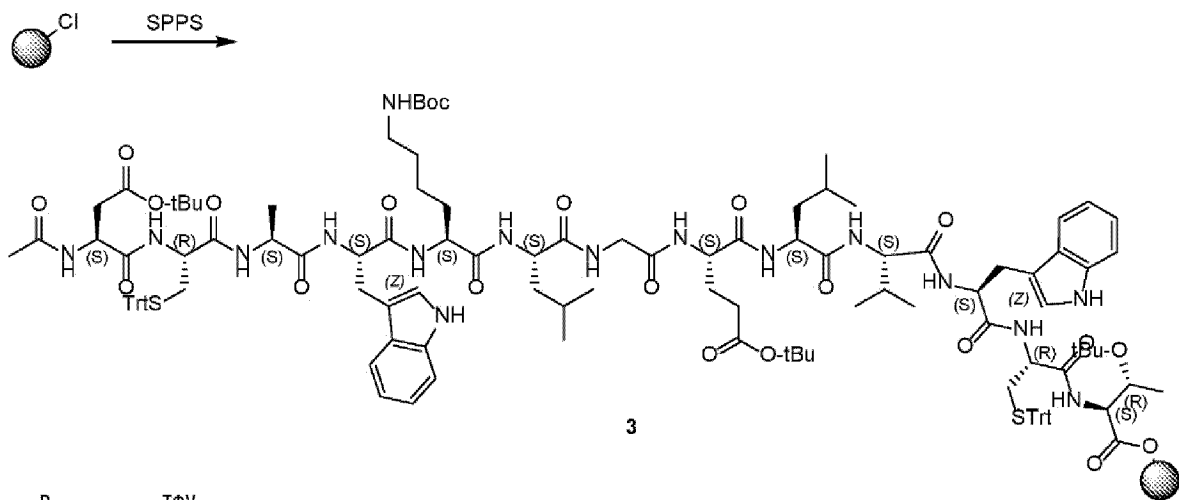
Na₂S₂O₃ до исчезновения желтого цвета. После фильтрации фильтрат очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% ТФУ/Н₂О, В: MeCN) с последующей лиофилизацией с получением **соединения 1290** (93,0 мг, 94,6 % чистота, 15,5 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 0,81 мин, МС расчит.: M_{av} = 1521,76, полученная масса: [M + H]⁺ = 1522,70, [M + 2H]²⁺ = 761,50.



Молекулярная масса: 1521,76

Соединение 1290

ПРИМЕР 2. Процедура для получения соединения 1291.



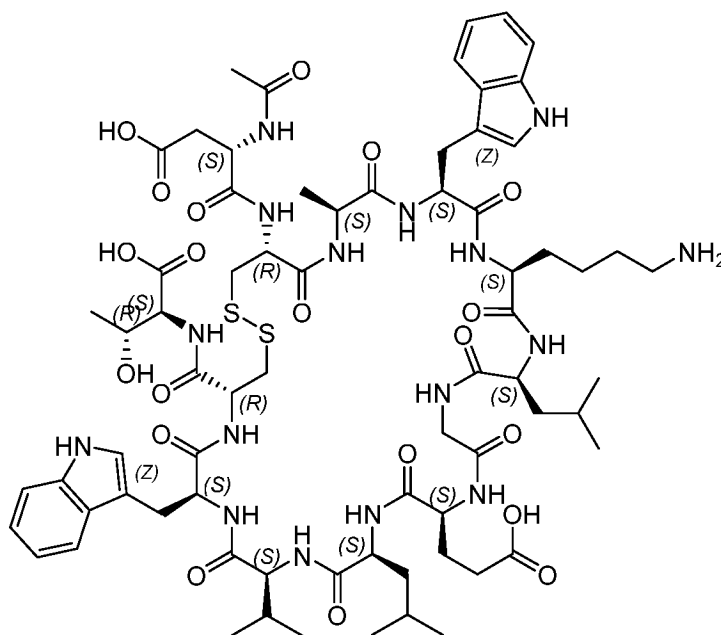
Получение соединения 1291:

[95] Промежуточное соединение 3 (пептидная смола) синтезировали путем проведения ацетилирования на пептидной смоле (промежуточное соединение 1, 0,50 ммоль).

[96] Ацетилирование: В смолу добавляли раствор Ac₂O/NMM/ДМФ (10/5/85, об./об./об., 40 мл), смесь барботировали N₂ в течение 20 мин. Реакцию ацетилирования отслеживали по тесту с нингидрином. Затем смолу промывали ДМФ (20 мл), MeOH (20 мл), затем сушили при пониженном давлении для получения связанного со смолой пептидного промежуточного соединения 4 (смола СТС, 1,23 г, 0,50 ммоль).

ТАБЛИЦА 3: Ацетилирование на SPPS.		
№	Материалы	Реагенты для сочетания
1	Ацетилирование	Ac ₂ O/NMM/ДМФ (10/5/85, об./об./об., 20 мл)

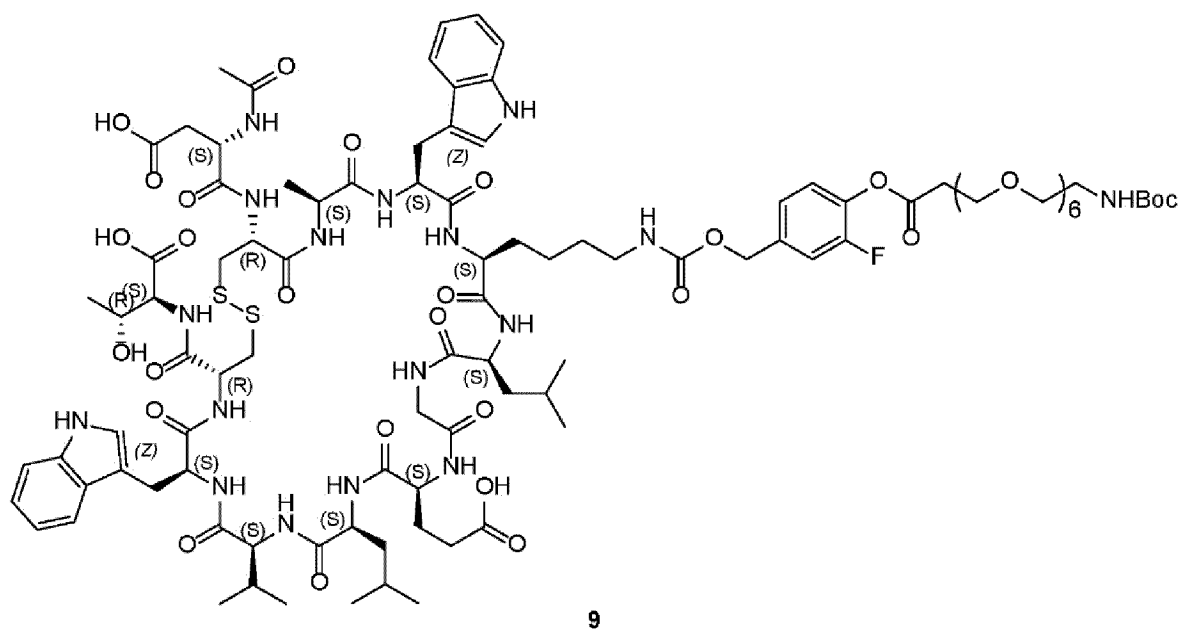
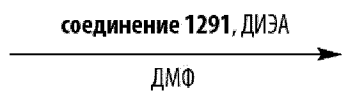
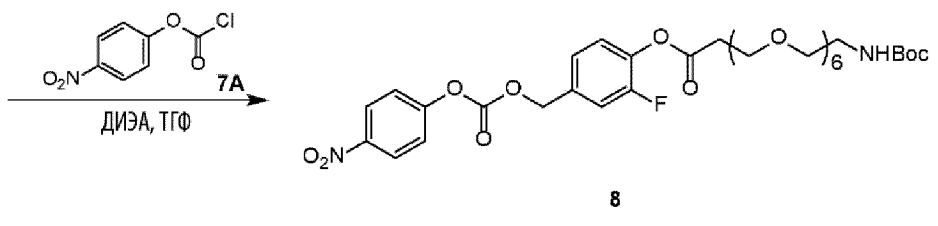
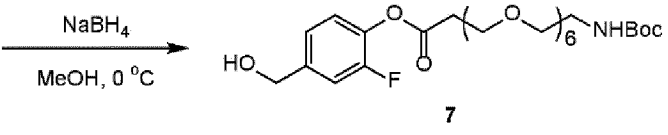
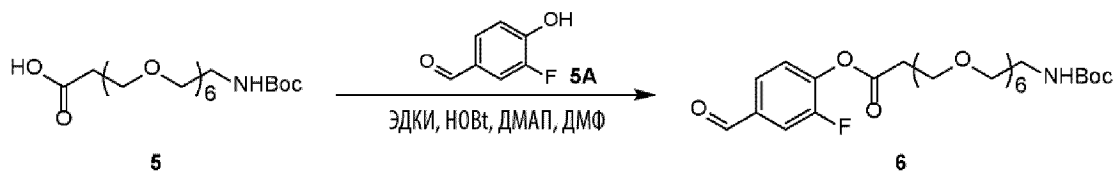
[97] Расщепление и циклизацию пептида проводили с помощью следующей процедуры, упомянутой в реакции расщепления и циклизации пептида в примере 1. 0,50 ммоль смолы дало **соединение 1291** (148,0 мг, 95,5 % чистота, 18,1 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,53 мин, МС расчит.: M_{av} = 1563,79, полученная масса: [M + H]⁺ = 1564,40, [M + 2H]²⁺ = 782,80.

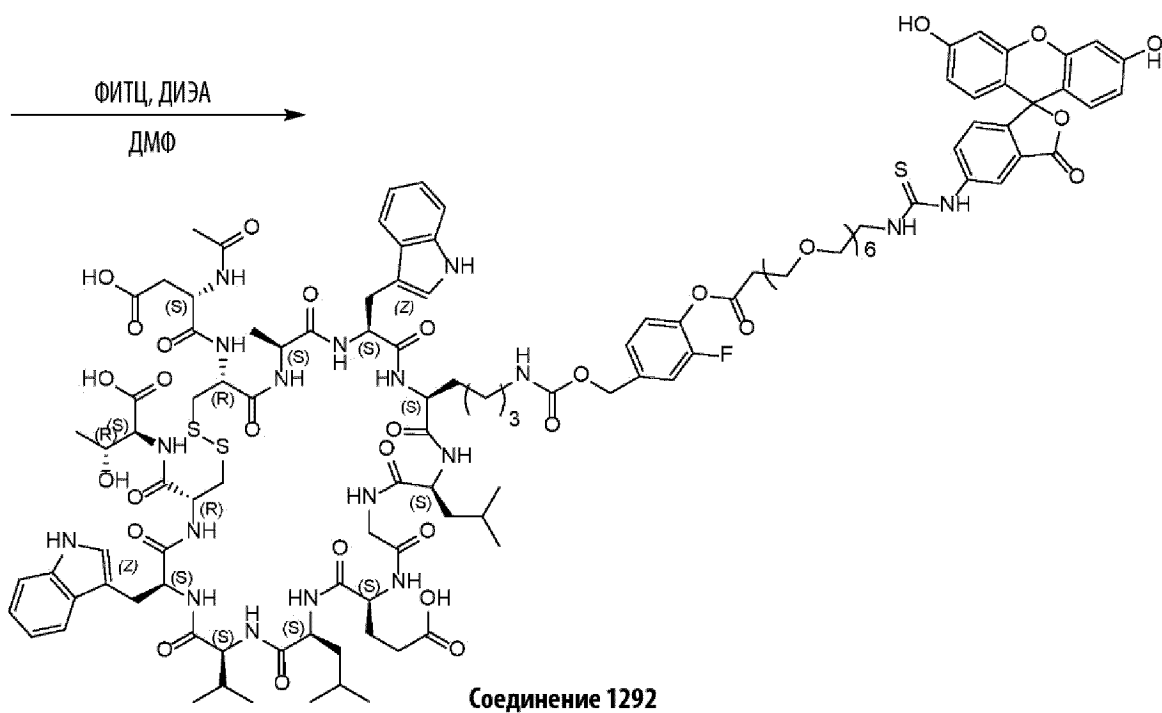
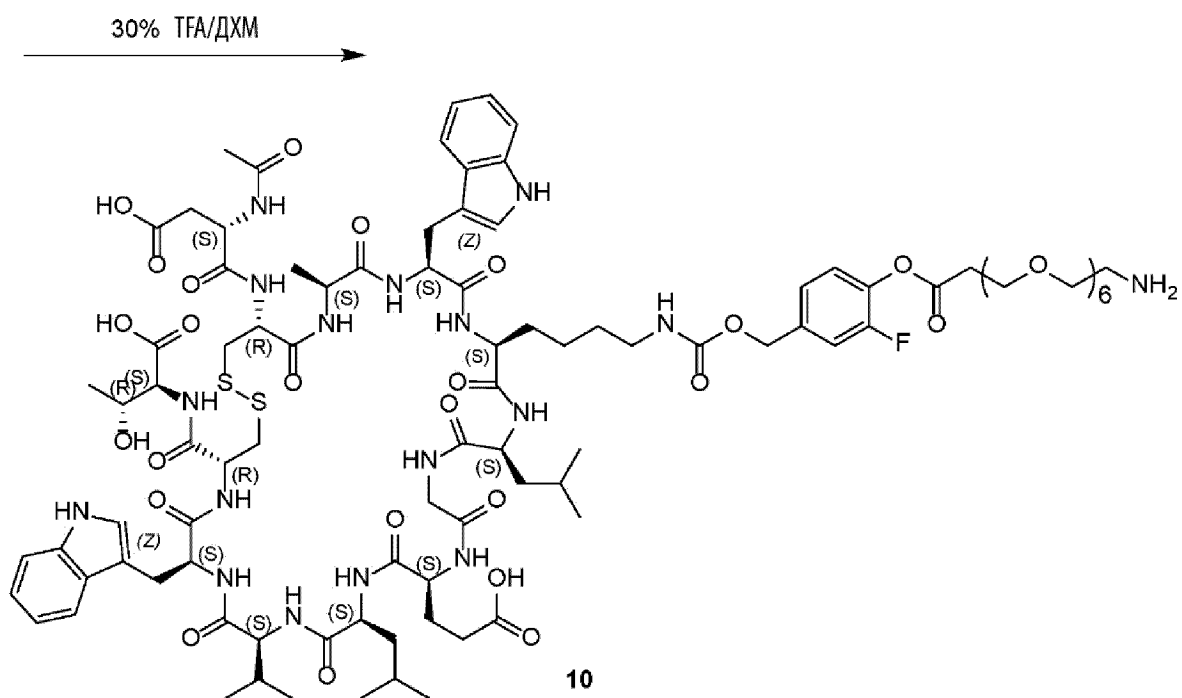


Молекулярная масса: 1563,79

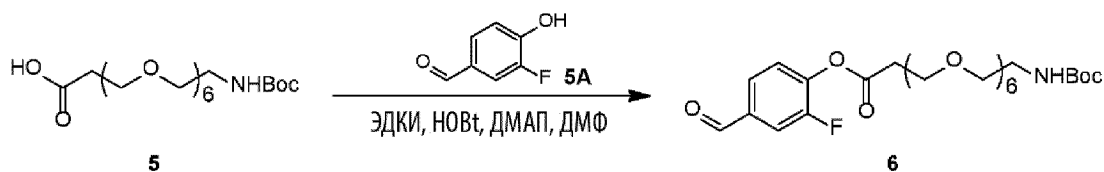
Соединение 1291

ПРИМЕР 3. Процедура для получения соединения 1292.



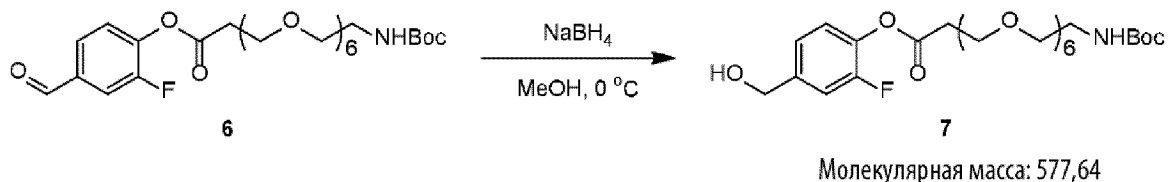


Получение промежуточного соединения 6:



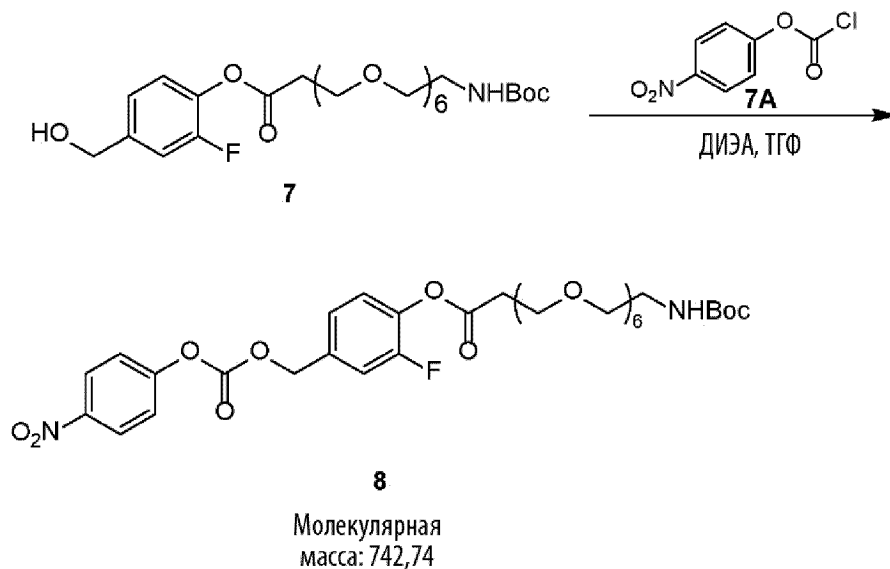
[98] Смесь **промежуточного соединения 5** (1,40 г, 3,09 ммоль, 1,00 экв.) и **промежуточного соединения 5A** (1,30 г, 9,26 ммоль, 3,00 экв.), HOBT (1,25 г, 9,26 ммоль, 3,00 экв.), DMAP (188,56 мг, 1,54 ммоль, 0,50 экв.) и ЭДКИ (1,78 г, 9,26 ммоль, 3,00 экв.) в DMF (0,2 мл) перемешивали при 25 °C в течение 16 ч. Смесь очищали посредством флэш-хроматографии (C18, А: 0,075 % ТФУ/Н₂О, В: MeCN) напрямую, с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 6** (1,10 г, 1,91 ммоль, 61,9 % выход) в виде желтого масла.

Получение промежуточного соединения 7:



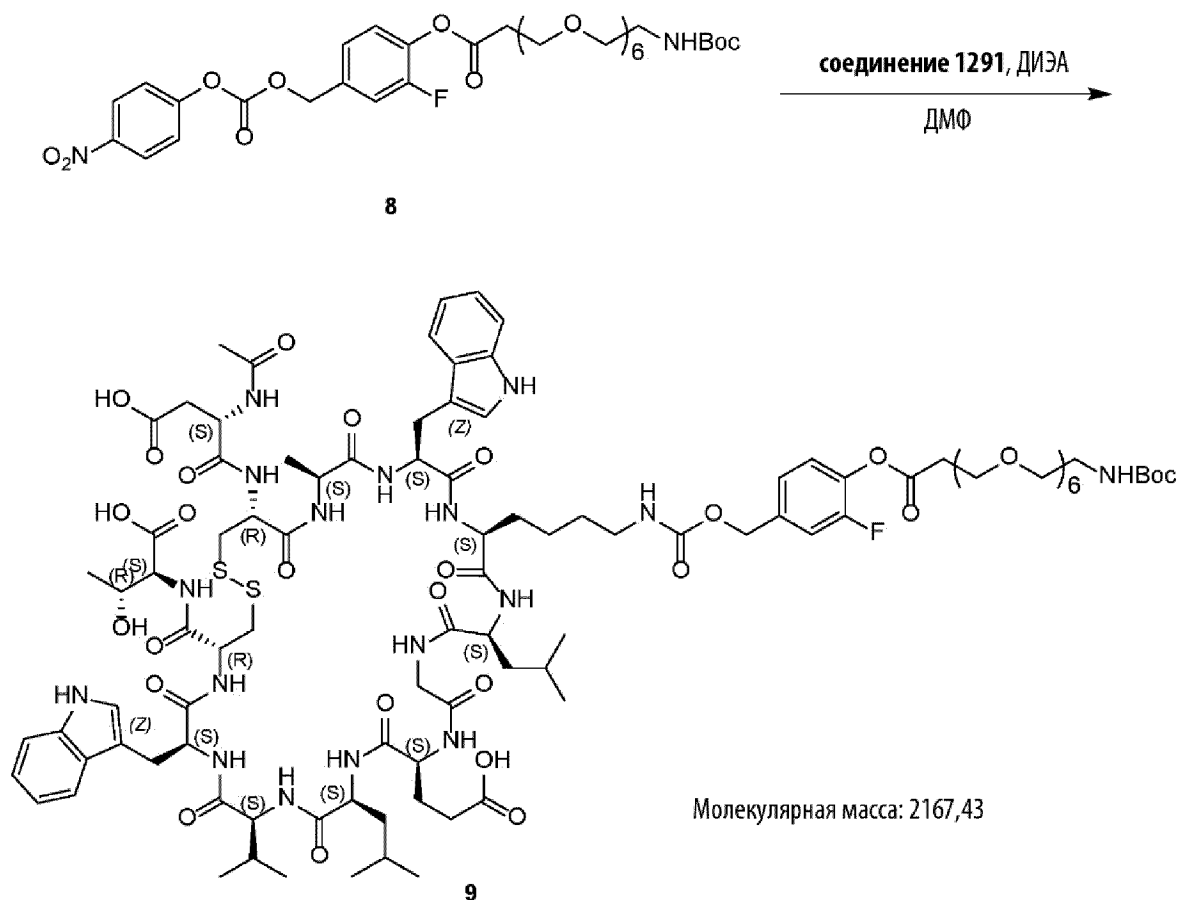
[99] Смесь **промежуточного соединения 6** (1,85 г, 3,21 ммоль, 1,00 экв.) растворяли в MeOH (5 мл), в реакционную смесь каплями добавляли смесь NaBH₄ (145,91 мг, 3,86 ммоль, 1,20 экв.) в MeOH (1 мл) при 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 2 ч. После завершения реакцию отслеживали с помощью ЖХ-МС, смесь подкисляли 1 М HCl до pH = 5, затем очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075 % ТФУ/Н₂О, В: MeCN) напрямую, с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 7** (1,35 г, 2,34 ммоль, 72,7 % выход) в виде бесцветного масла. ЖХМС: RT = 9,3 мин, МС рассчит.: M_{av} = 577,64, полученная масса: [M + H]⁺ = 578,30, [M + H₂O + H]⁺ = 595,4, [M – Boc + H]⁺ = 478,37.

Получение промежуточного соединения 8:



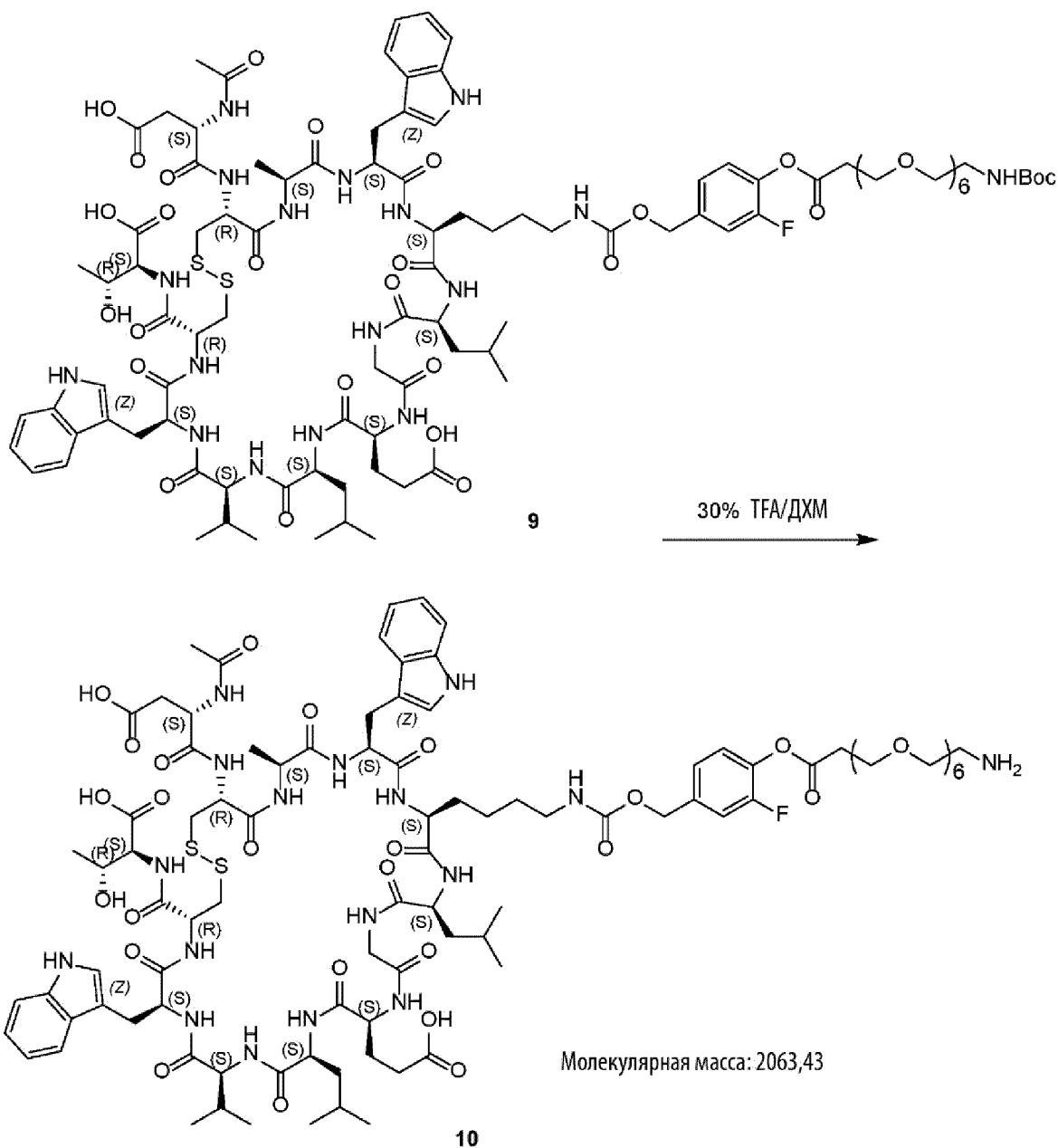
[100] В раствор **промежуточного соединения 7** (1,20 г, 2,08 ммоль, 1,00 экв.), ТЭА (420,43 мг, 4,15 ммоль, 578,30 мкл, 2,00 экв.) в ДХМ (10 мл) добавляли **промежуточное соединение 7A** (460,61 мг, 2,29 ммоль, 1,10 экв.) реакционную смесь перемешивали при 25 °С в течение 4 ч. После отслеживали завершение с помощью ЖХ-МС, смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% ТФУ/Н₂О, В: MeCN) напрямую, с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 8** (900,0 мг, 1,21 ммоль, 58,3 % выход) в виде желтого масла. ЖХМС: RT = 9,3 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 742,74$, полученная масса: $[M + H]^+ = 743,2$, $[M + H_2O + H]^+ = 761,3$, $[M - Boc + H]^+ = 643,3$.

Получение промежуточного соединения 9:



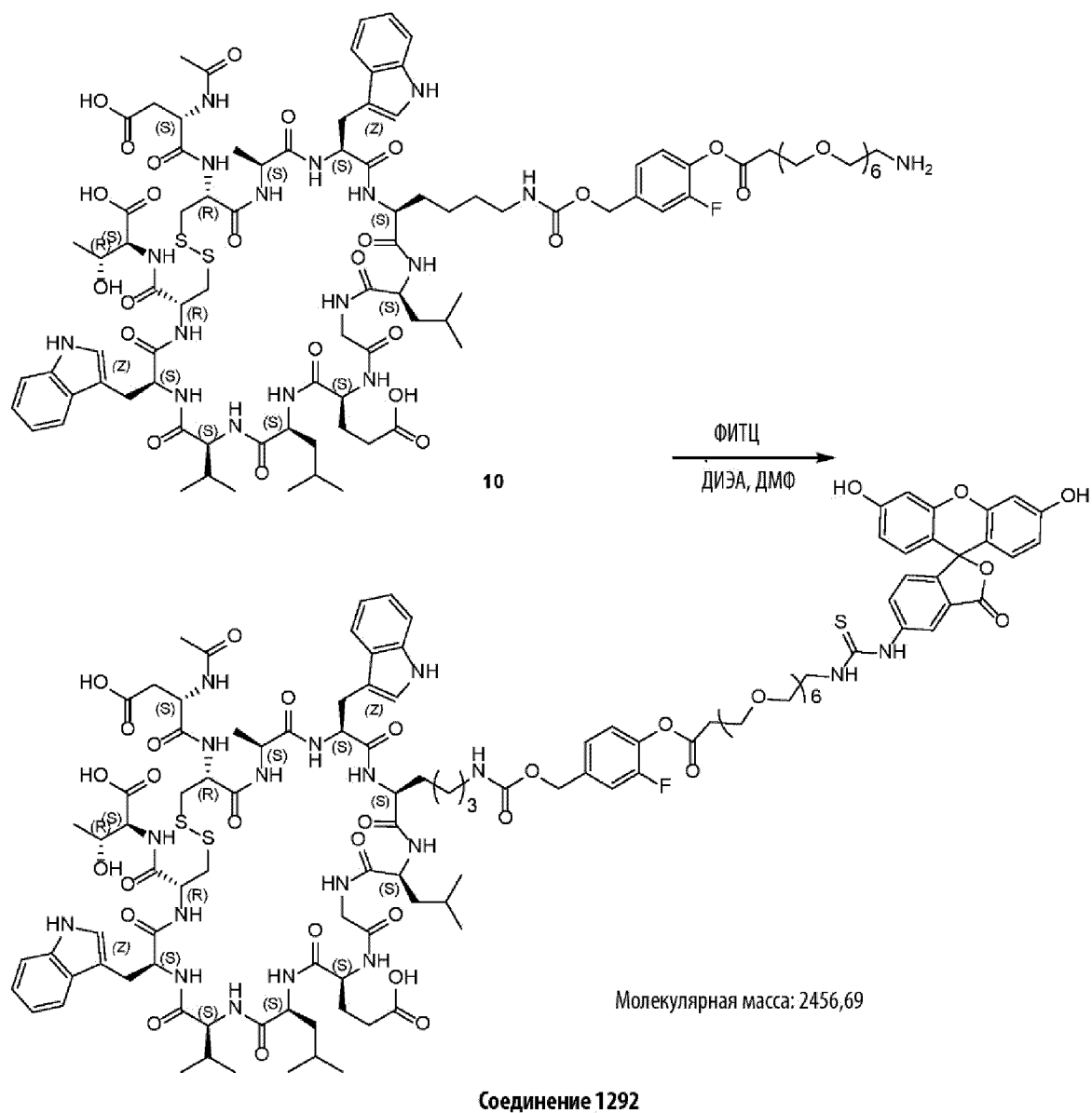
[101] Смесь **промежуточного соединения 8** (500,00 мг, 667,50 мкмоль, 2,00 экв.) и **соединения 1291** (521,5 мг, 333,70 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (129,0 мг, 174,3 мкл, 1,00 ммоль, 3,00 экв.) в ДМФ (5 мл) перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. После отслеживали завершение с помощью ЖХ-МС, смесь подкисляли 1 М HCl до pH = 5, затем очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075 % ТФУ/Н₂O, В: MeCN) напрямую, с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 9** (517,3 мг, 238,69 мкмоль, 81,2 % чистота, 71,5 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,05 мин, МС расчит.: $M_{av} = 2167,43$, полученная масса: $[M - \text{Boc} + 2H]^{2+} = 1034,58$.

Получение промежуточного соединения 10:



[102] Смесь **промежуточного соединения 9** (517,3 мг, 238,69 мкмоль) в ТФУ/ДХМ (3/7, об./об., 3 мл) перемешивали при 0 °С в течение 2 ч. После отслеживали завершение с помощью ЖХ-МС, растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075 % ТФУ/Н₂О, В: MeCN) с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 10** (429,27 мг, 207,65 мкмоль, 87,0 % выход, соль ТФУ) в виде белого твердого вещества. УВЭЖХ: RT = 0,92 мин, МС рассчит.: M_{av} = 2067,43, полученная масса: [M + 2H]²⁺ = 1034,12.

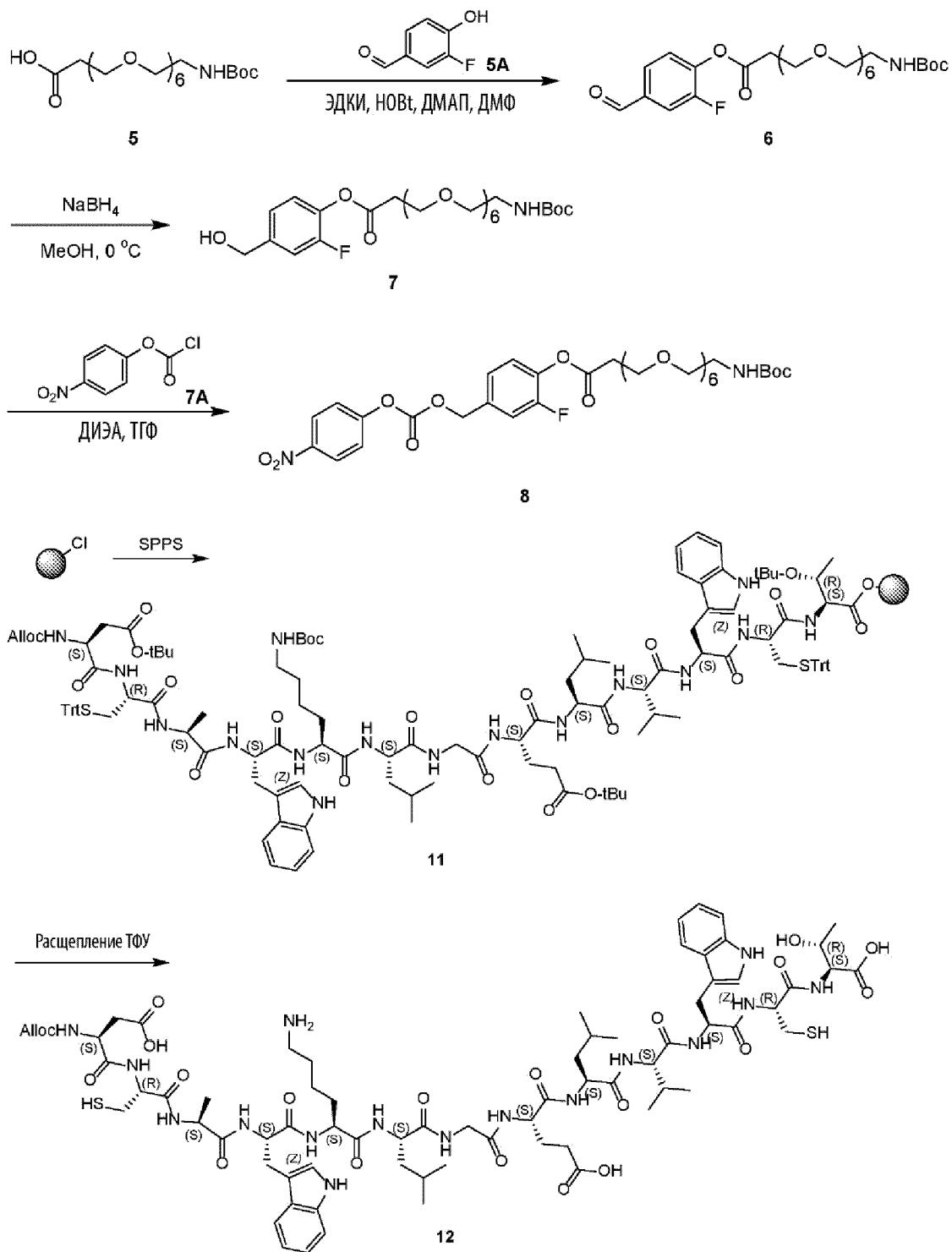
Получение соединения 1292:

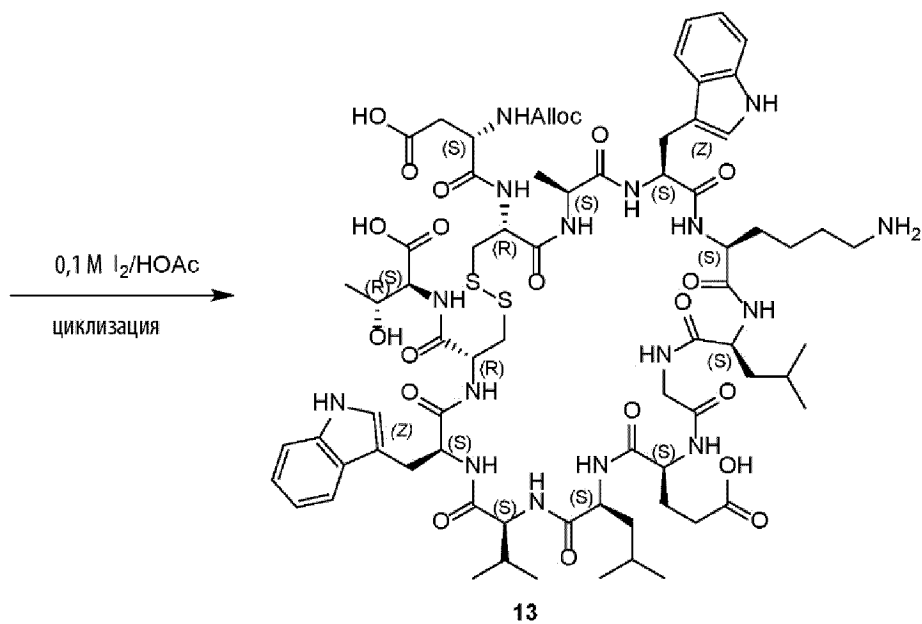


[103] В смесь **промежуточного соединения 10** (429,27 мг, 207,65 мкмоль, 1,00 экв.) и **ФИТЦ** (121,28 мг, 311,47 мкмоль, 1,50 экв.) в ДМФ (0,2 мл) добавляли ДИЭА (20,76 мг, 934,42 мкмоль, 162,75 мкл, 4,50 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. После отслеживали завершение с помощью ЖХ-МС, смесь подкисляли 1 М HCl до pH = 5, затем очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075 % ТФУ/Н₂О, В: MeCN) напрямую, с последующей лиофилизацией с получением **соединения 1292** (115,0 мг, 92,0 % чистота, 22,5 % выход) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС: RT = 2,08 мин, МС расчит.: $M_{av} = 2456,69$, полученная масса: $[M + 2H]^{2+} = 1229,1$,

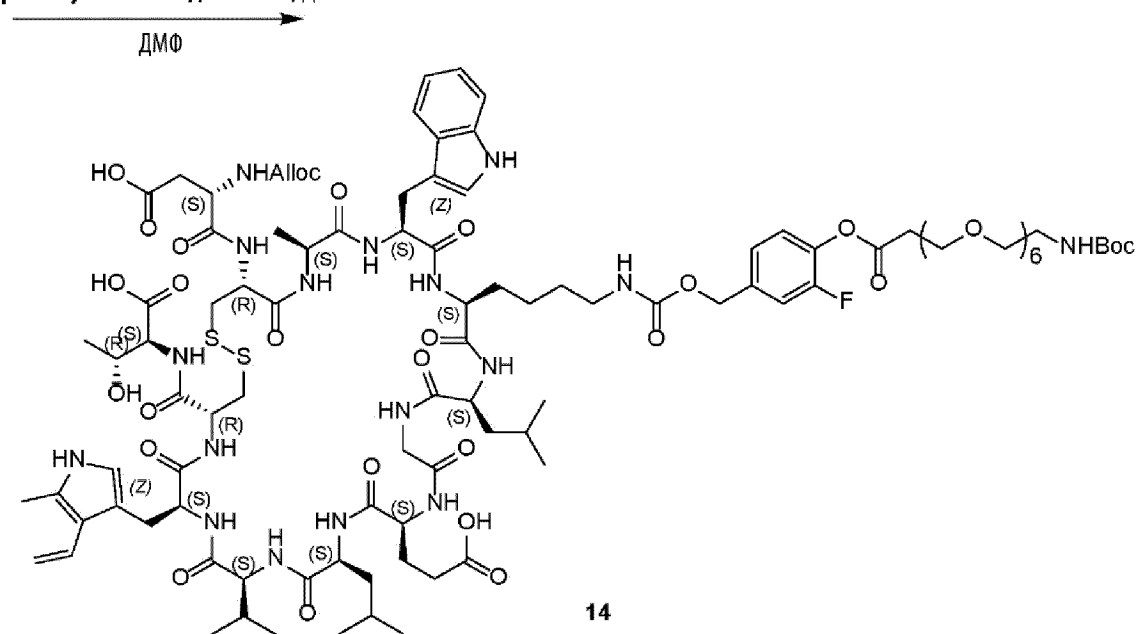
$[M + 3H]^{3+} = 819,7$, $[2M + 3H]^{3+} = 1637,9$.

ПРИМЕР 4. Процедура для получения соединения 1294.

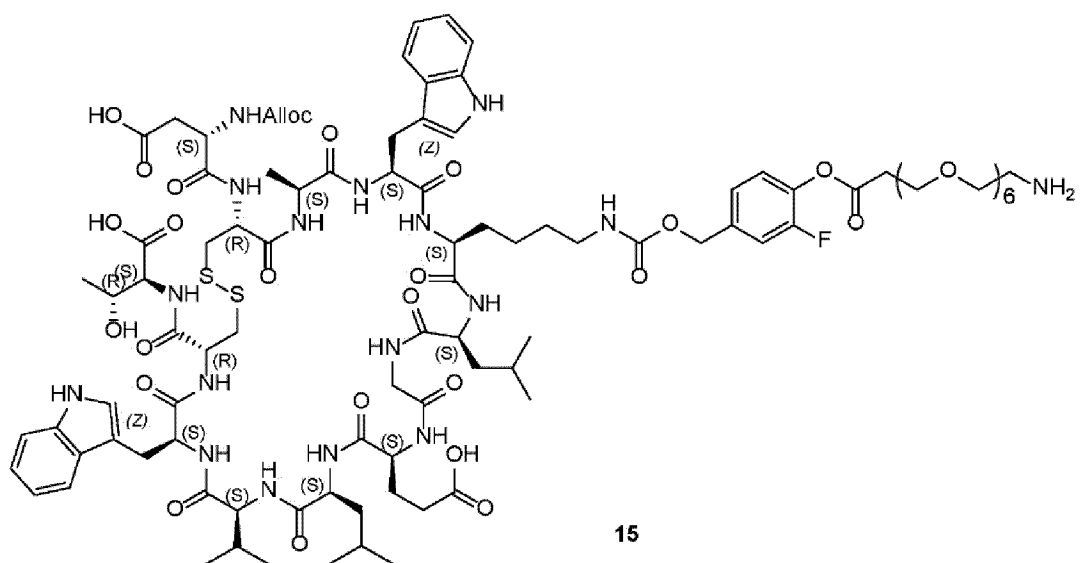




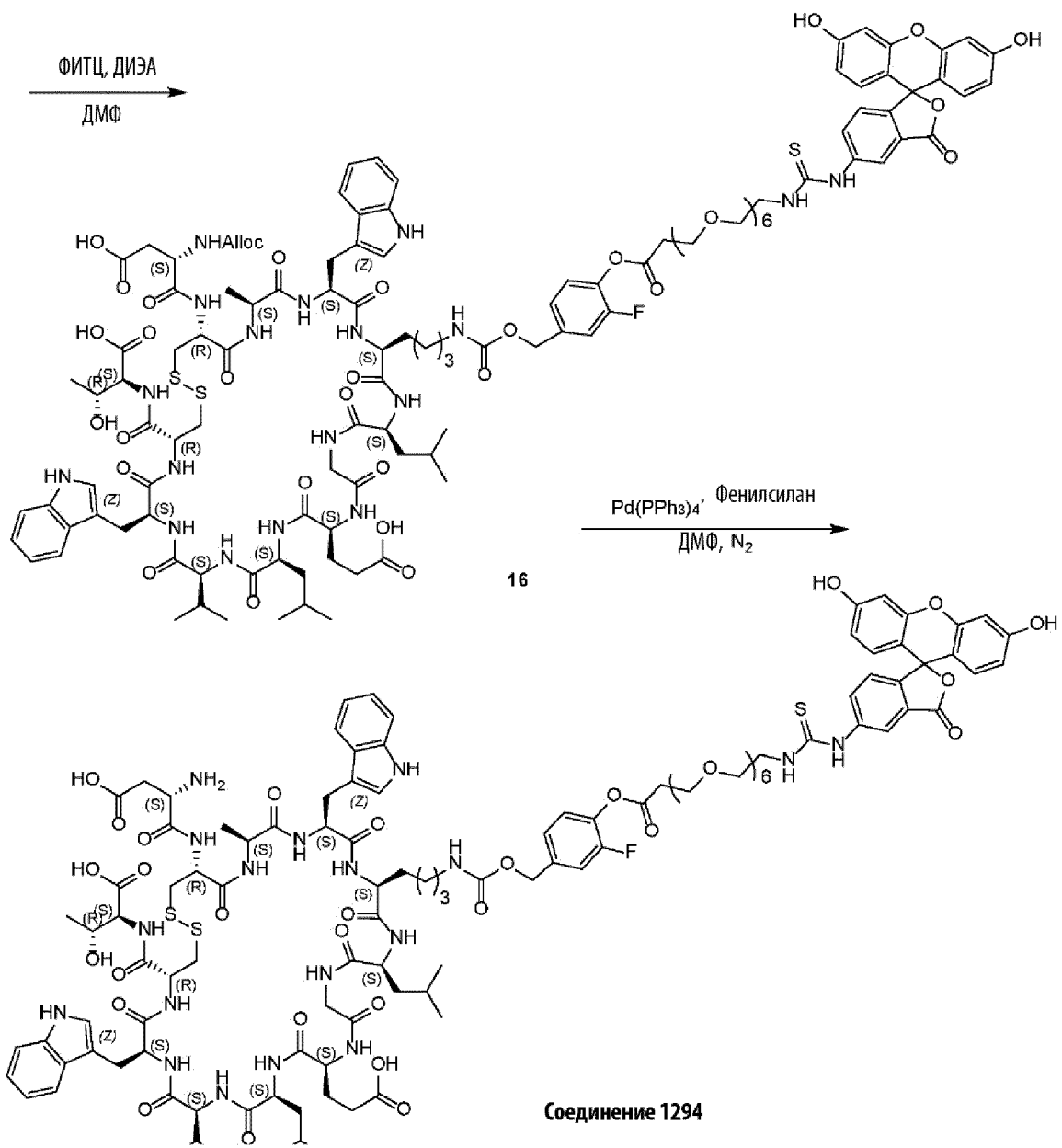
промежуточное соединение 8, ДИЭА



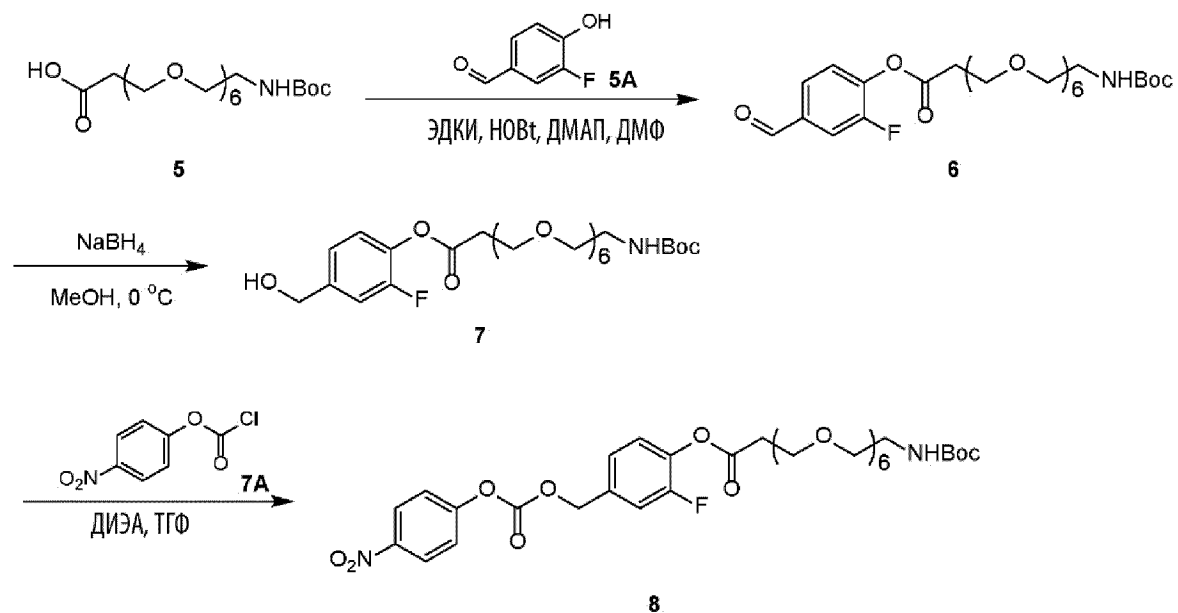
30% TFA/DXM



15

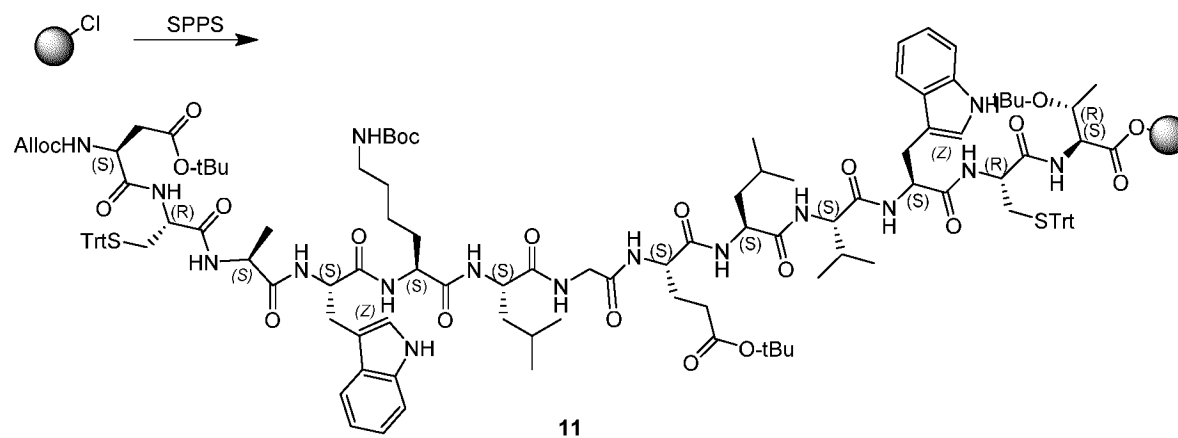


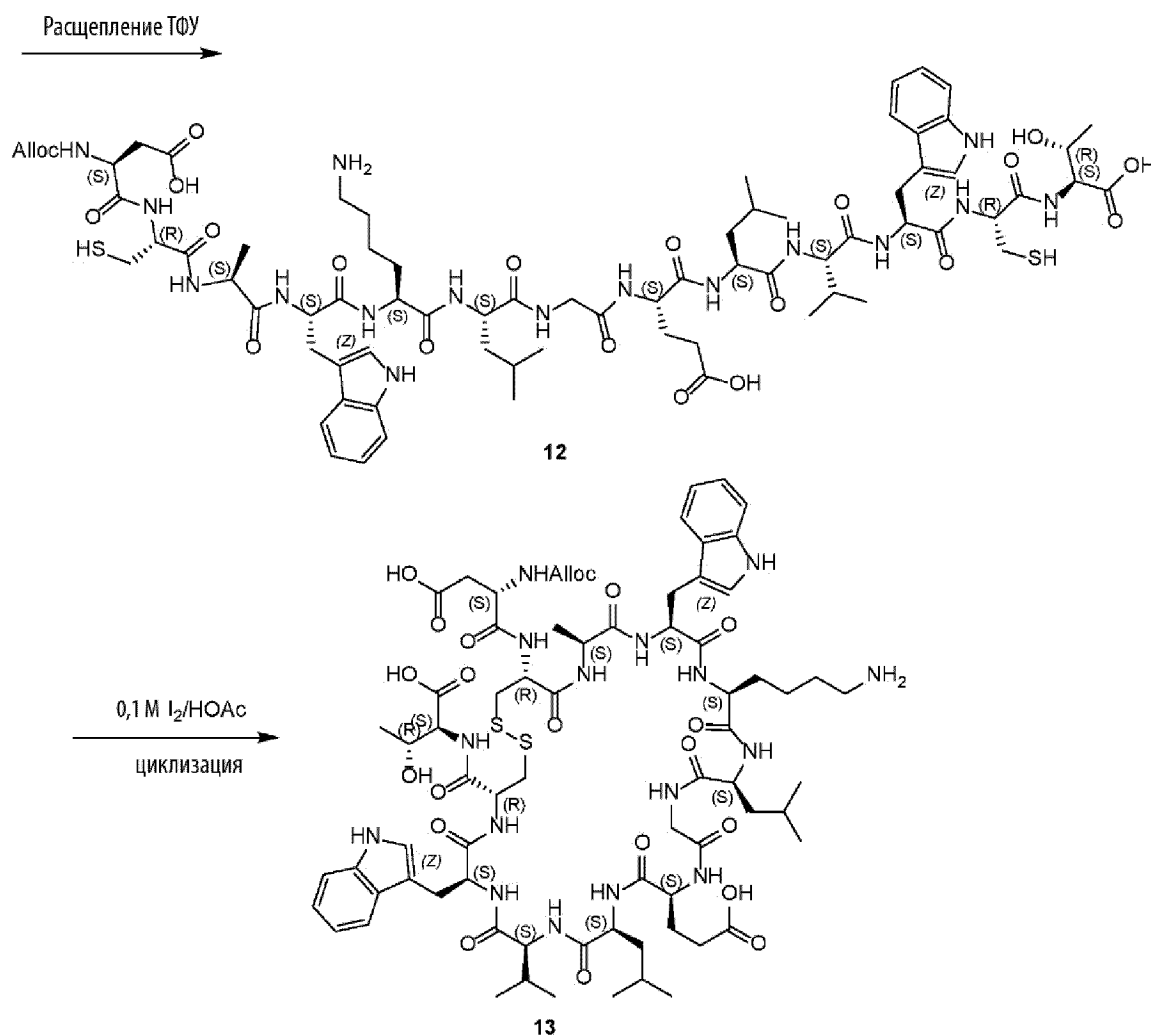
Получение промежуточного соединения 6, 7, 8:



[104] Промежуточные соединения **6**, **7**, **8** синтезировали, следуя процедуре, описанной для получения промежуточных соединений **6**, **7**, **8** в примере 3.

Получение промежуточного соединения **13:**





[105] Пептид синтезировали, используя стандартную химию Fmoc (смола СТС).

[106] Получение смолы: В сосуд, содержащий смолу СТС (1,00 г, 1,00 ммоль, 1,00 ммоль/г) и Fmoc-Thr(tBu)-ОН (397,0 мг, 1,00 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (10 мл), каплями добавляли ДИЭА (4,00 экв.) и смешивали в течение 2 ч с барботированием N₂ при 25 °С. Затем добавляли MeOH (1,0 мл) и барботировали N₂ еще в течение 30 мин. Смолу промывали ДМФ (20 мл) с последующим добавлением 20 % пиперидина в ДМФ (10 мл) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С для снятия защиты Fmoc. Смесь фильтровали, а смолу промывали ДМФ (10 мл) перед переходом к следующему этапу.

[107] Сочетание: Раствор Fmoc-Cys(Trt)-ОН (1,76 г, 3,0 ммоль, 3,00 экв.), ГБТУ (0,82 г, 2,86 ммоль, 2,85 экв.) в ДМФ (10 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИЭА (6,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию сочетания

отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (20 мл).

[108] Снятие защиты: В смолу добавляли 20 % пиперидин в ДМФ (20 мл) и барботировали смесь N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию снятия защиты отслеживали по тесту с нингидрином, если он был синим или коричнево-красным, реакция была завершена. Затем смолу промывали ДМФ (20 мл) .

[109] Этапы 2 и 3 повторяли для удлинения следующими аминокислотами: Номер № 3–13, таблица 3.

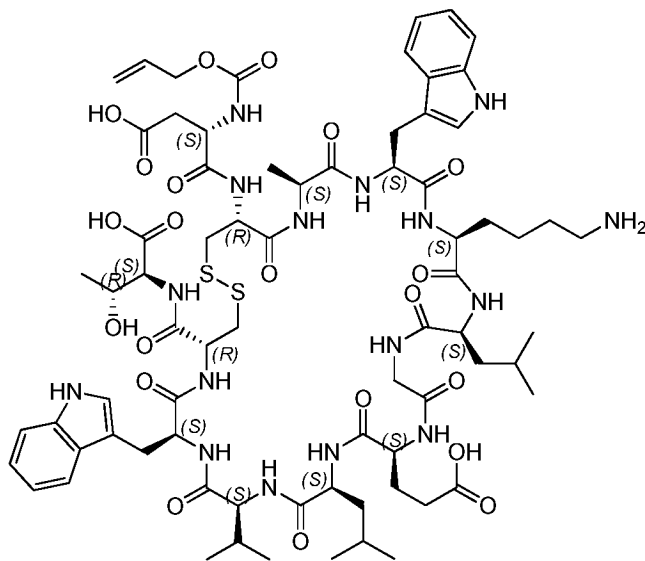
[110] Alloc-Cl сочетание на N-конце: смолу промывали ДХМ (20 мл) . Раствор Alloc-Cl (0,72 г, 6,0 ммоль, 6,00 экв.) в ДХМ (10 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИЭА (12,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДХМ (50 мл) * 3, ДМФ (50 мл) * 3, MeOH (50 мл) * 3, затем сушили при пониженном давлении для получением связанного со смолой пептидного промежуточного **промежуточного соединения 11** (смола СТС, 2,35 г, 1,00 ммоль).

TABLE 4: Перечень аминокислот и соответствующие реагенты, используемые на SPPS.		
№	Материалы	Реагенты для сочетания
1	Fmoc-Thr(tBu)-OH (1,00 экв.)	ДИЭА (4,00 экв.)
2	Fmoc-Cys(Trt)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
3	Fmoc-Trp-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
4	Fmoc-Val-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
5	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
6	Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
7	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
8	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
9	Fmoc-Lys(Dde)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
10	Fmoc-Trp-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
11	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
12	Fmoc-Cys(Trt)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
13	Fmoc-Asp(OtBu)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
14	Alloc-Cl (6,00 экв.)	ДИЭА (12,00 экв.)

Расщепление и циклизация пептида:

[111] Расщепление: Раствор ТФУ/ТИС/Н₂О/3-меркаптопропановой кислоты (92,5/2,5/2,5/2,5, об./об./об., 40 мл) добавляли в смолу (промежуточное соединение 11, 1,00 ммоль) выше комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. После фильтрации собирали фильтрат и осаждали холодным изопропиловым эфиром (400 мл), затем отфильтровывали, а твердое вещество дважды промывали изопропиловым эфиром (200 мл) и сушили неочищенный пептид при пониженном давлении в течение 2 ч с получением промежуточного соединения 12 (1,00 ммоль, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

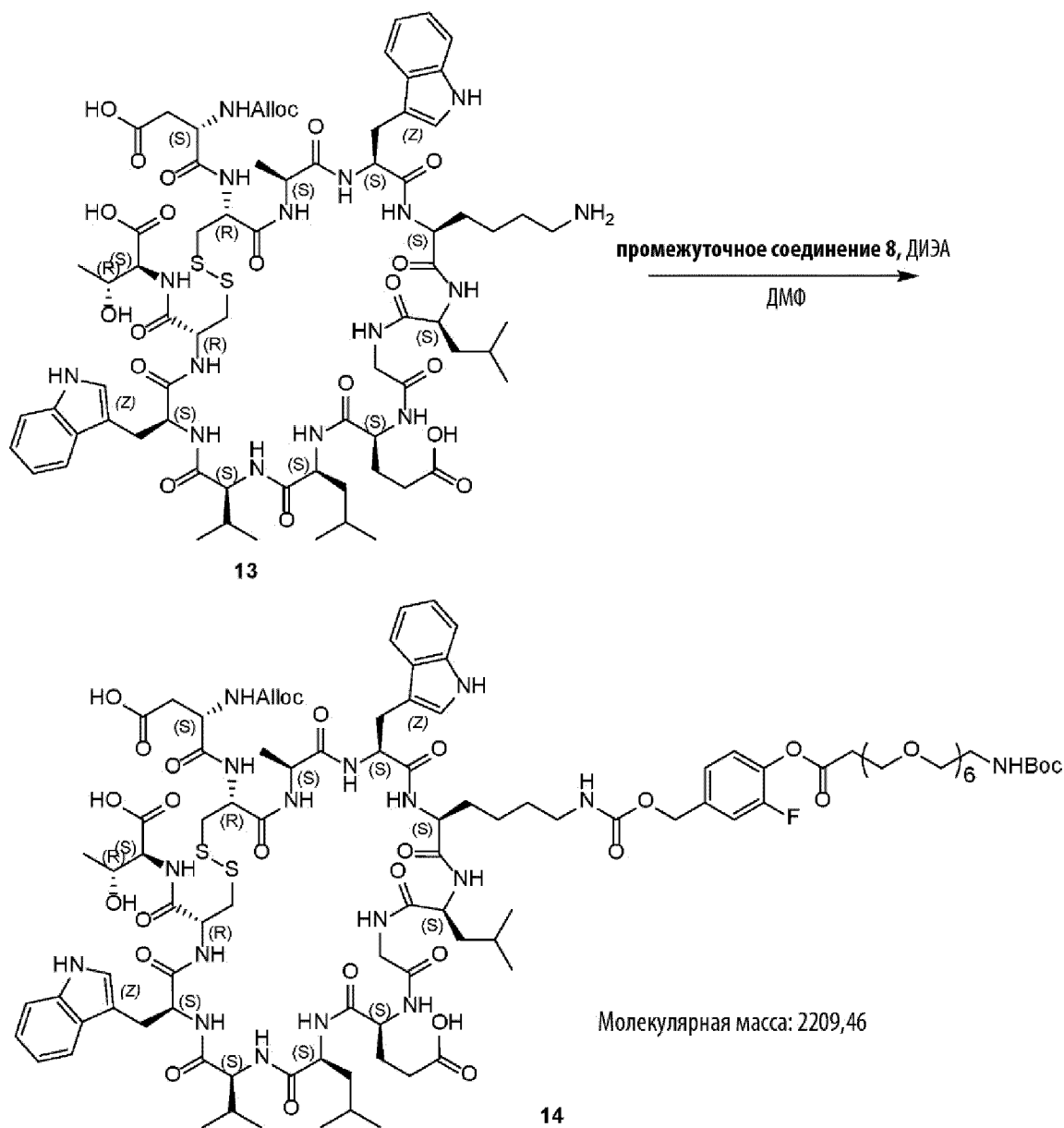
[112] Циклизация: В неочищенный пептид (**промежуточное соединение 12**) в MeCN/Н₂О (1/1, об./об., 1000 мл) каплями добавляли 0,1 М I₂/АсОН до стойкого желтого цвета, затем смесь перемешивали при 25 °С в течение 5 мин. Смесь гасили покапельным добавлением 0,1 М водн. Na₂S₂O₃ до исчезновения желтого цвета. После фильтрации фильтрат очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% ТФУ/Н₂О, В: MeCN), с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 13** (280,5 мг, 17,4 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 7,9 мин, МС расчит.: $M_{av} = 1605,83$, полученная масса: $[M + H]^+ = 1606,80$, $[M + 2H]^{2+} = 803,52$.



Молекулярная масса 1605,83

Промежуточное соединение 13

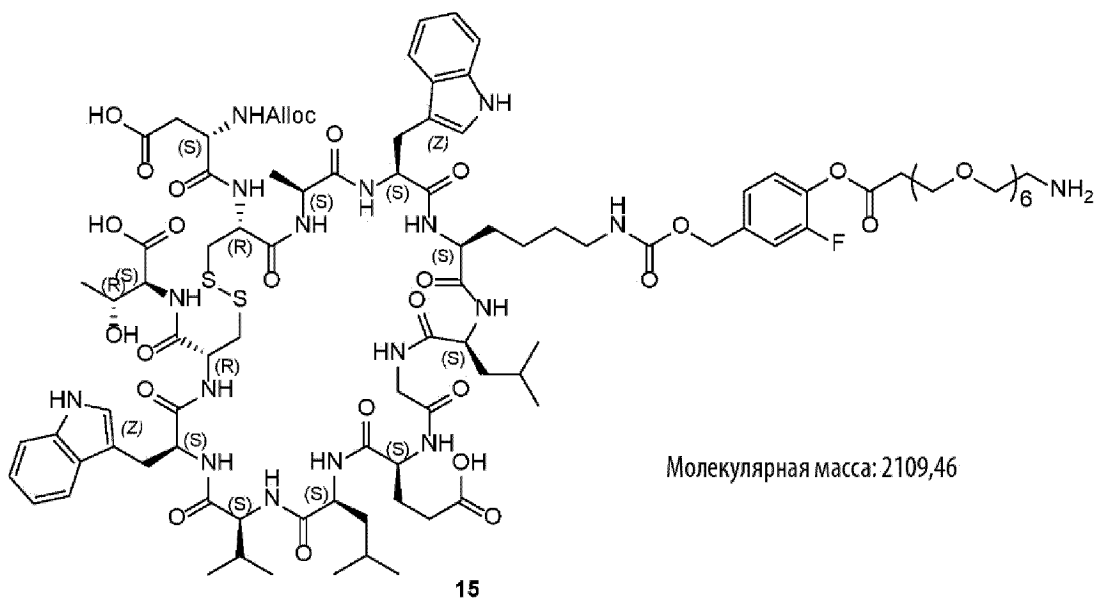
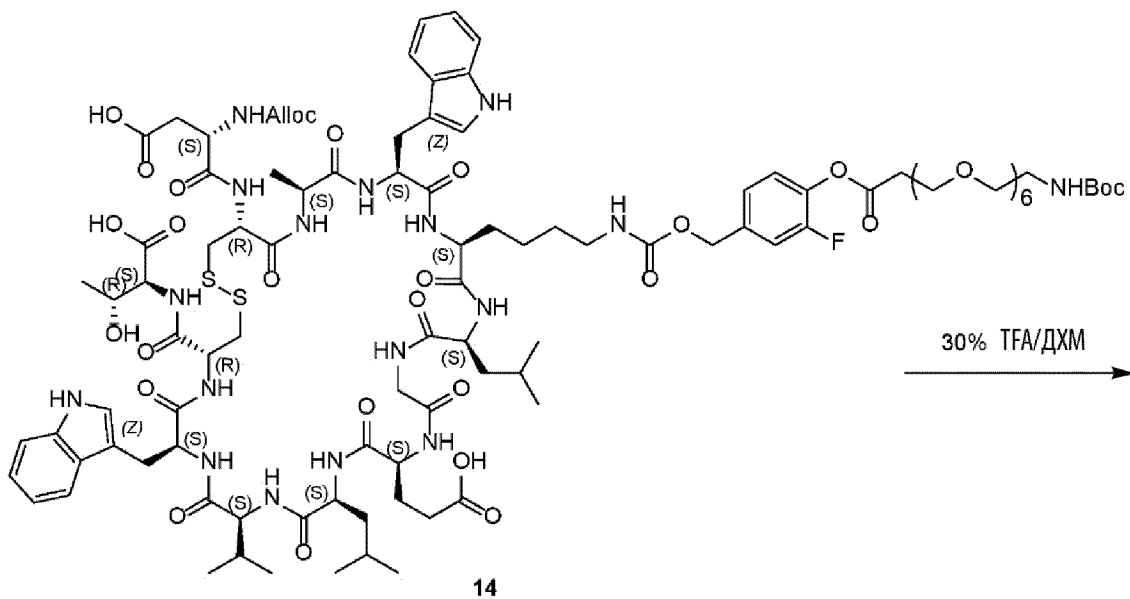
Получение промежуточного соединения 14:



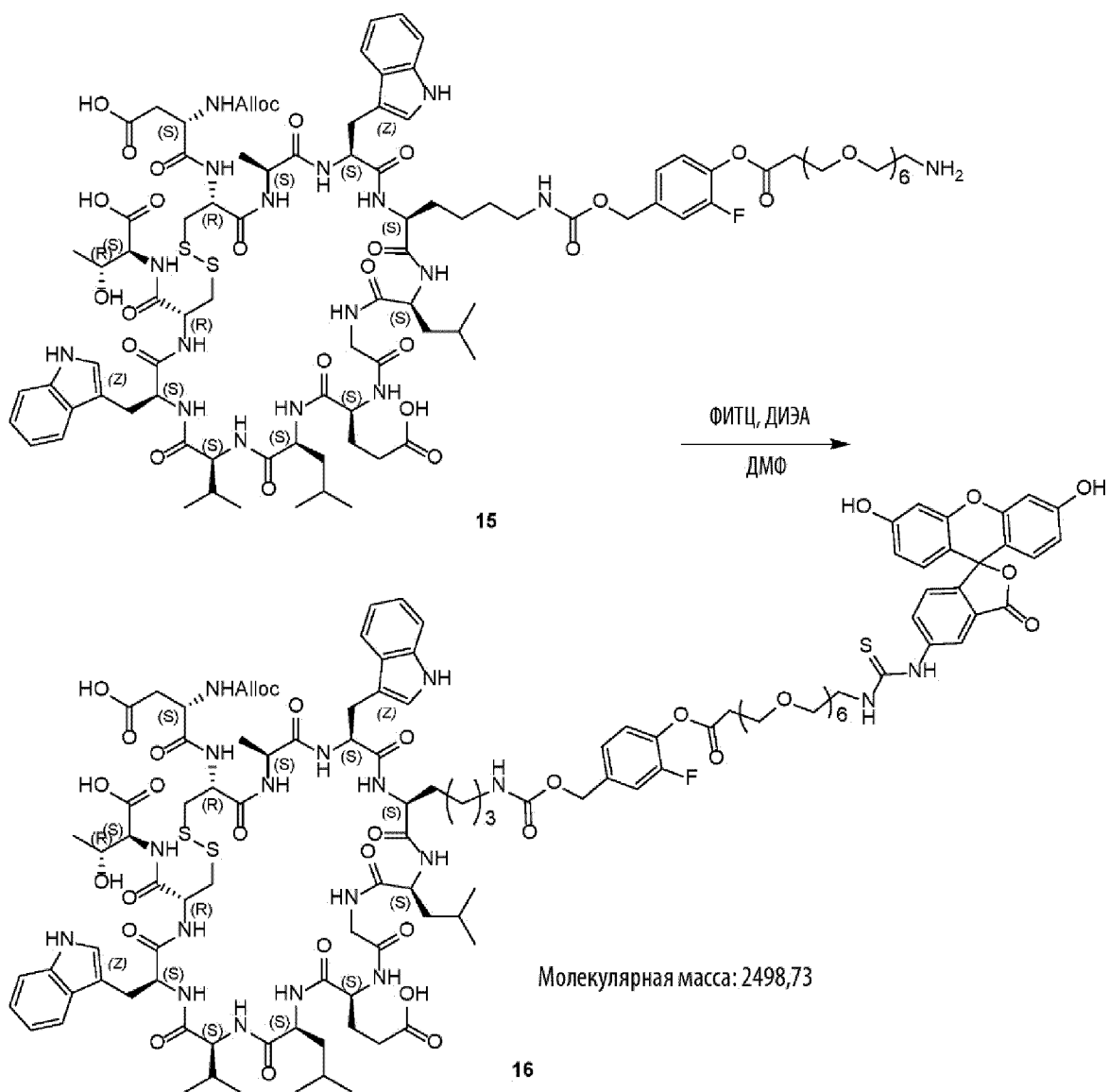
[113] Смесь промежуточного соединения 8 (475,28 мг, 0,63 ммоль, 2,00 экв.) и промежуточного соединения 13 (500,0 мг, 0,31 ммоль, 1,00 экв.), ДИЭА (120,5 мг, 162,9 мкл, 0,93 ммоль, 3,00 экв.) в ДМФ (5 мл) перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. После отслеживания завершения с помощью ЖХ-МС, смесь подкисляли 1 М HCl до pH = 5, затем очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% ТФУ/Н₂О, В: MeCN) напрямую, с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 14** (517,3 мг, 74,6 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 0,960 мин, МС расчит.: $M_{av} = 2209,46$, полученная масса: $[M - \text{Boc} + 2H]^+ = 1055,28$.

Получение промежуточного соединения 15:

[114] Смесь **промежуточного соединения 14** (517,3 мг) в ТФУ/ДХМ (3/7, 5 мл) перемешивали при 0 °С в течение 2 ч. После отслеживания завершения с помощью ЖХ-МС, смесь подкисляли 1 М HCl до pH = 5, затем очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% ТФУ/Н₂O, В: MeCN) напрямую, с последующей лиофилизацией с получением **соединения 1579** (437,0 мг, 97,9 % чистота, 88,4 % выход, соль ТФУ) в виде белого твердого вещества.

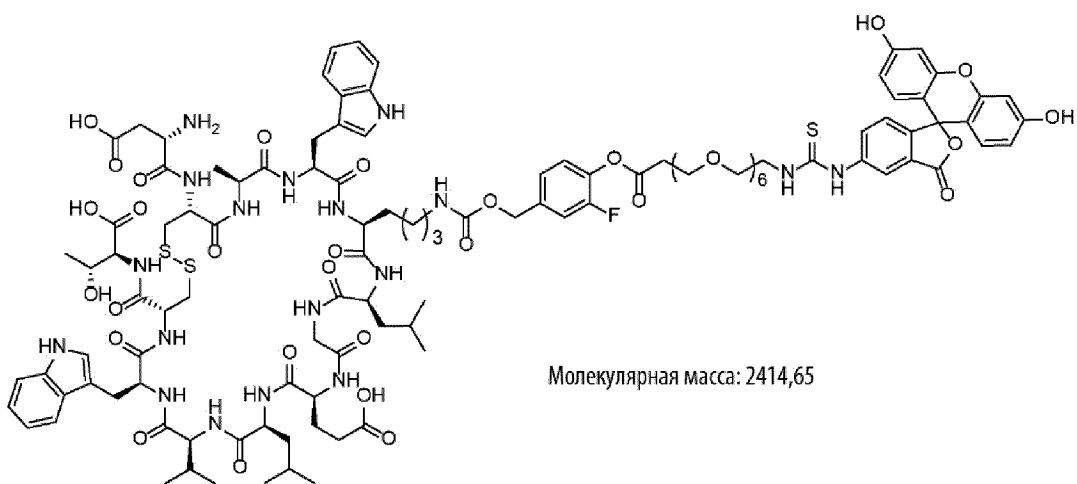
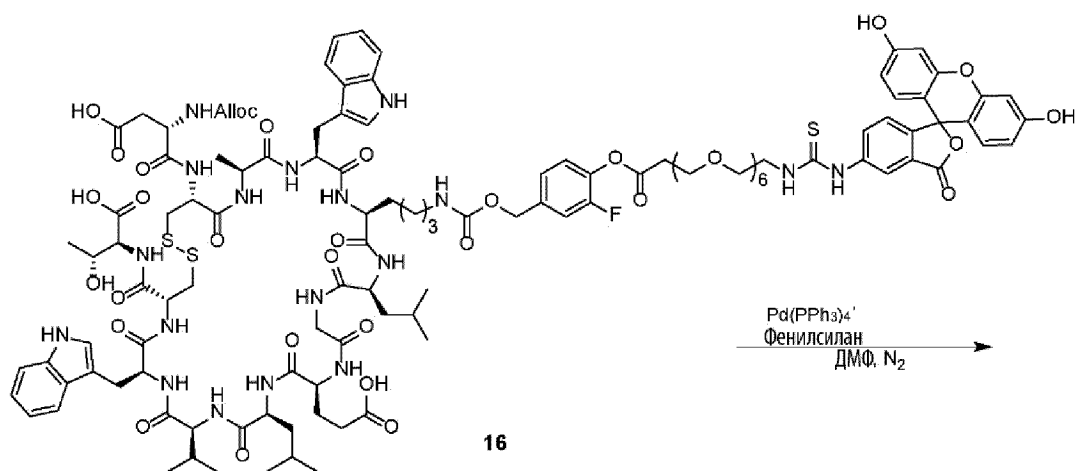


Получение промежуточного соединения 16:



[115] В смесь **промежуточного соединения 15** (437,0 мг, 207,2 мкмоль, 1,00 экв.) и **ФИТЦ** (120,8 мг, 310,80 мкмоль, 1,50 экв.) в ДМФ (0,2 мл) добавляли ДИЭА (120,7 мг, 162,5 мкл, 932,4 мкмоль, 4,50 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. После отслеживали завершение с помощью ЖХ-МС, смесь подкисляли 1 М НСl до pH = 5, затем очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% ТФУ/Н₂О, В: MeCN) напрямую, с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 16** (300,0 мг, 92,5 % чистота, 57,9 % выход) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС: RT = 9,3 мин, МС расчит.: $M_{av} = 2498,73$, полученная масса: $[M + 2H]^{2+} = 1249,87$.

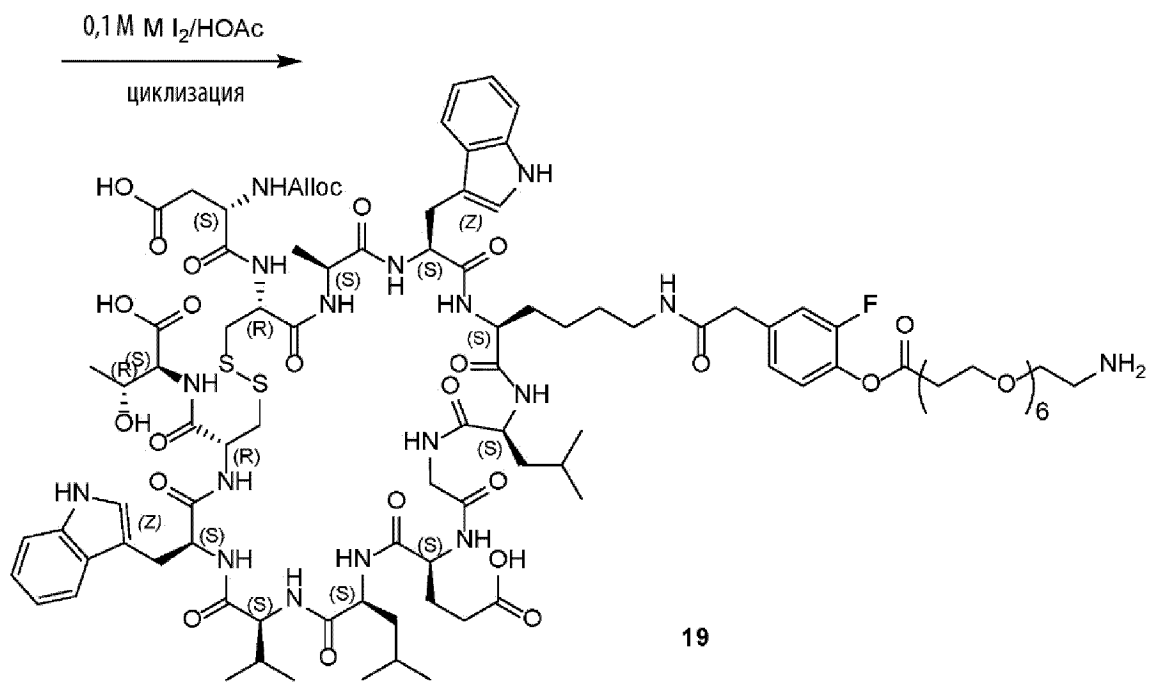
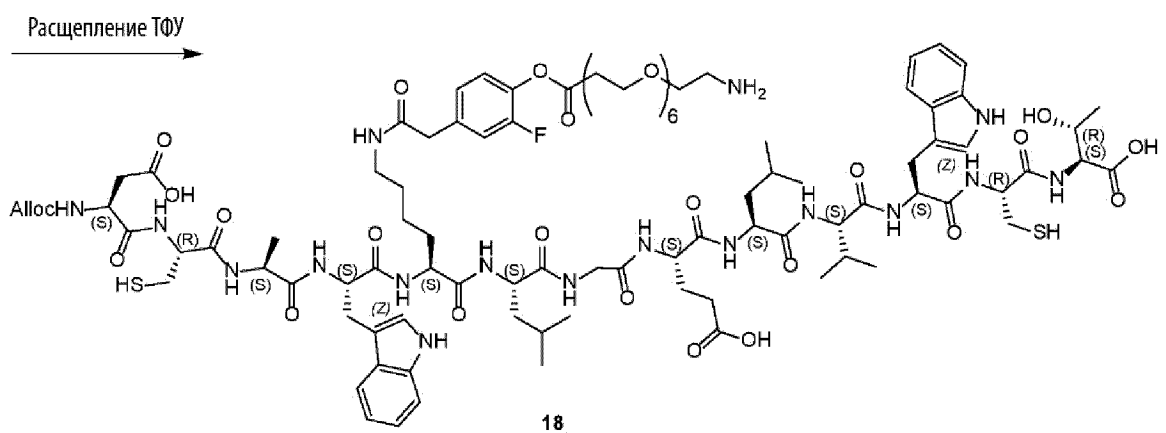
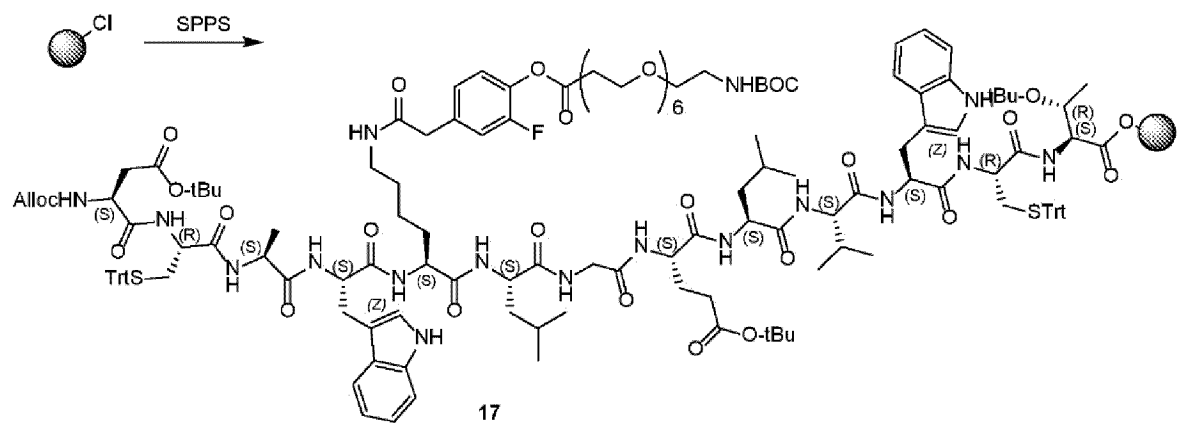
Получение соединения 1294:

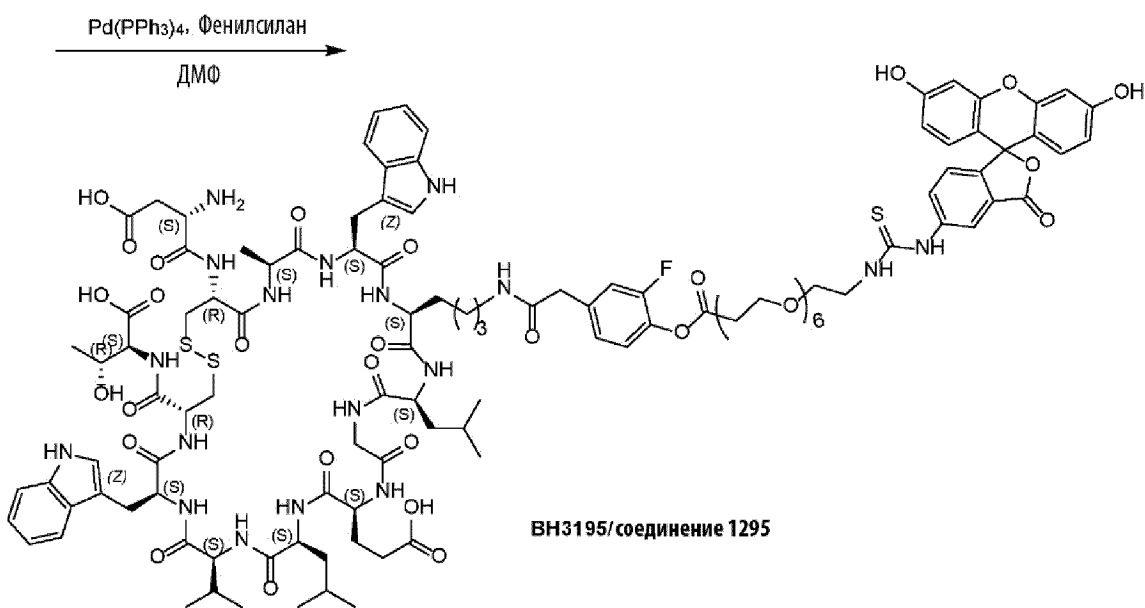
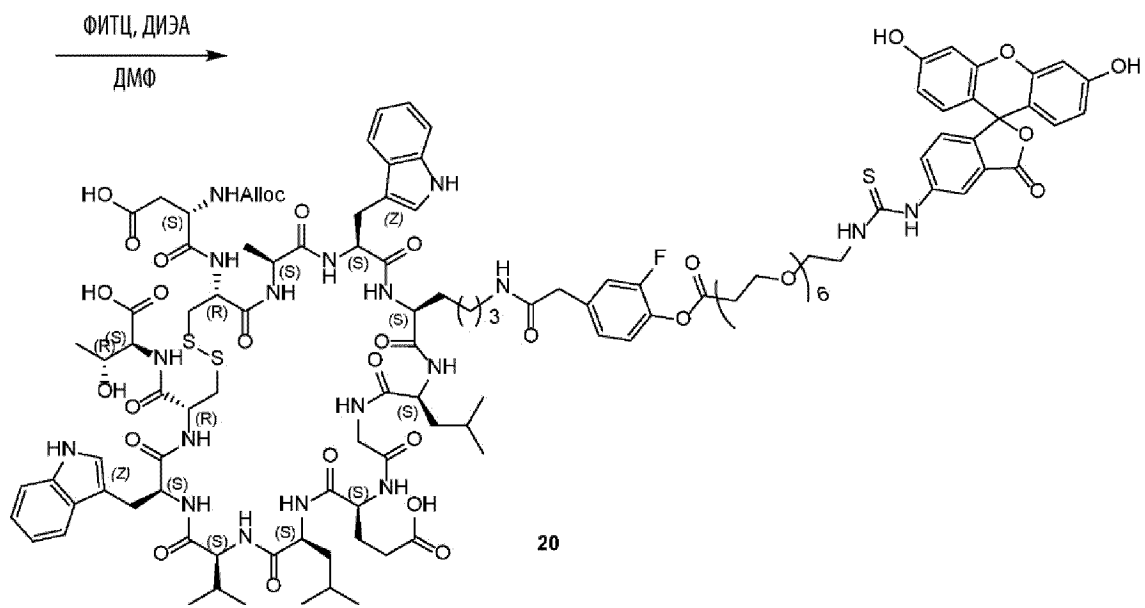


Соединение 1294

[116] В смесь **промежуточного соединения 16** (300,0 мг, 120,06 мкмоль, 1,00 экв.), растворенного в ДМФ (3 мл), добавляли Pd(PPh₃)₄ (20,81 мг, 18,01 мкмоль, 0,15 экв.) и фенилсилан (129,92 мг, 1,20 ммоль, 148,14 мкл, 10,00 экв.). Смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч, а полученную реакционную смесь перемешивали в течение 5 мин при 0 °С. После отслеживали завершение с помощью ЖХ-МС. Смесь подкисляли 1 М HCl до pH = 5, затем очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% ТФУ/Н₂O, В: MeCN) напрямую, с последующей лиофилизацией с получением **соединения 1294** (98,3 мг, 87,0 % чистота, 29,5 % выход) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС: RT = 2,02 мин, МС расчет.: M_{av} = 2414,65, полученная масса: [2M + 3H]³⁺ = 1610,6, [M + 2Na]²⁺ = 1230,5, [M + H + Na]²⁺ = 1219,3, [M + 2H]²⁺ = 1208,1, [M + 3H]³⁺ = 805,8.

ПРИМЕР 5. Процедура для получения соединения 1295.





Получение промежуточного соединения 19:

[116] Пептид синтезировали, используя стандартную химию Fmoc (смола СТС).

[117] Получение смолы: В сосуд, содержащий смолу СТС (0,50 г, 0,50 ммоль, 1,00 ммоль/г) и Fmoc-Thr(tBu)-ОН (198,5 мг, 0,50 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (5 мл), каплями добавляли ДИЭА (4,00 экв.) и смешивали в течение 2 ч с барботированием N₂ при 25 °С. Затем добавляли MeOH (0,5 мл) и барботировали N₂ еще в течение 30 мин. Смолу промывали ДМФ (10 мл) с последующим

добавлением 20 % пиперидина в ДМФ (10 мл) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С для снятия защиты Fmoc. Смесь фильтровали, а смолу промывали ДМФ (10 мл) перед переходом к следующему этапу.

[118] Сочетание: Раствор Fmoc-Cys(Trt)-ОН (0,88 г, 1,5 ммоль, 3,00 экв.), ГБУ (0,41 г, 1,43 ммоль, 2,85 экв.) в ДМФ (5 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИЭА (6,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (20 мл).

[119] Снятие защиты: В смолу добавляли 20 % пиперидин в ДМФ (10 мл) и барботировали смесь N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию снятия защиты отслеживали по тесту с нингидрином, если он был синим или коричнево-красным, реакция была завершена. Затем смолу промывали ДМФ (10 мл).

[120] Этапы 2 и 3 повторяли для удлинения следующими аминокислотами: Номер № 3–9, таблица 4.

[121] Сочетание: Раствор 2-(3-фтор-4-гидроксифенил)уксусной кислоты (253,5 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.), НОВt (189,0 мг, 202,5 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.) в ДМФ (5 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИК (1,50 ммоль, 3,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (10 мл).

[122] Снятие защиты Dde: В смолу добавляли 3 % гидрат гидразина в ДМФ (10 мл) с барботированием N₂ в течение 30 мин. Затем реакцию снятия защиты отслеживали по тесту с нингидрином, если он был синим или коричнево-красным, реакция была завершена. Затем смолу промывали ДМФ (10 мл).

[123] Сочетание: Раствор Fmoc-Trp-ОН (639,0 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.), НОВt (202,5 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.) в ДМФ (5 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИК (1,50 ммоль, 3,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (10 мл).

[124] Снятие защиты: В смолу добавляли 20 % пиперидин в ДМФ (10 мл) и барботировали смесь N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию снятия защиты отслеживали по тесту с нингидрином, если

он был синим или коричнево-красным, реакция была завершена. Затем смолу промывали ДМФ (10 мл).

[125] Этапы 7 и 8 повторяли для удлинения следующими аминокислотами: Номер № 11–14, таблица 5.

[126] Alloc-Cl сочетание на N-конце: смолу промывали ДХМ (20 мл) . Раствор Alloc-Cl (0,36 г, 3,0 ммоль, 6,00 экв.) в ДХМ (10 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИЭА (6,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДХМ (50 мл), ДМФ (50 мл).

[127] Сочетание: Раствор BocHN-PEG6-CH₂CH₂COOH (700,0 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.), HOBt (202,5 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.), ДМАП (61,0 мг, 0,50 ммоль, 1,00 экв.) в ДМФ (5 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИК (1,50 ммоль, 3,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 16 ч при 25 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (10 мл) , MeOH (50 мл), затем сушили при пониженном давлении для получением связанного со смолой пептидного промежуточного **соединения 17** (смола СТС, 1,30 г, 0,50 ммоль).

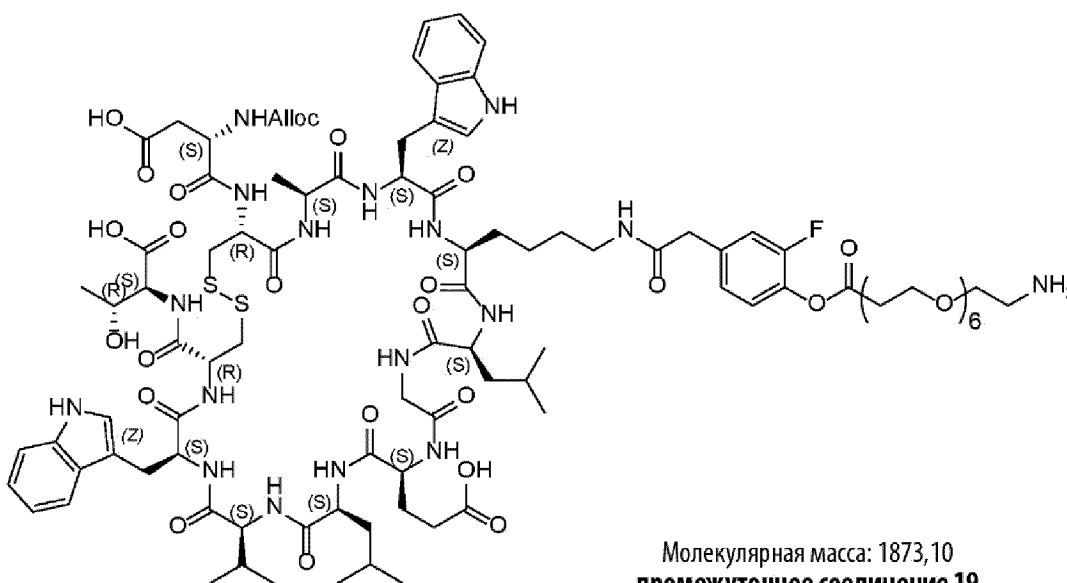
ТАБЛИЦА 5: Перечень аминокислот и соответствующие реагенты, используемые на SPPS.		
№	Материалы	Реагенты для сочетания
1	Fmoc-Thr(tBu)-OH (1,00 экв.)	ДИЭА (4,00 экв.)
2	Fmoc-Cys(Trt)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
3	Fmoc-Trp-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
4	Fmoc-Val-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
5	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
6	Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
7	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
8	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
9	Dde-Lys(Fmoc)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
10	2-(3-фтор-4-гидроксифенил)уксусная кислота (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и HOBt (3,00 экв.)
11	Fmoc-Trp-OH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и HOBt (3,00 экв.)
12	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и HOBt (3,00 экв.)
13	Fmoc-Cys(Trt)-OH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и HOBt (3,00 экв.)

14	Fmoc-Asp(OtBu)-OH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и НОВт (3,00 экв.)
15	Алос-Cl (6,00 экв.)	ДИЭА (12,00 экв.)
16	ВосHN-ПЭГ6-CH ₂ CH ₂ COOH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.), НОВт (3,00 экв.), ДМАП (3,00 экв.)

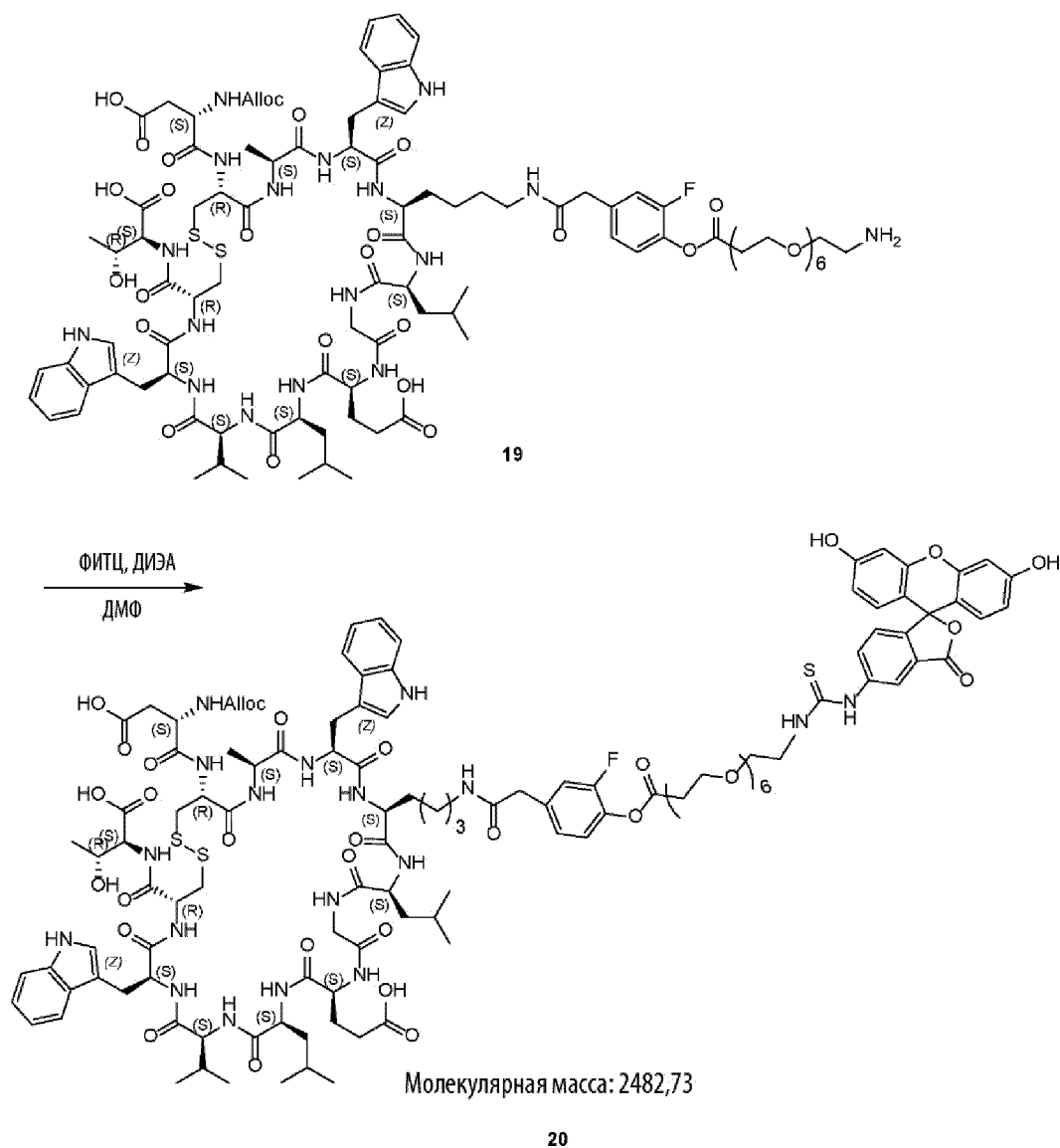
[128] Расщепление и циклизация пептида:

[129] Расщепление: Раствор ТФУ/TIS/H₂O/3-меркаптопропановой кислоты (92,5/2,5/2,5/2,5, об./об./об., 30 мл) добавляли в смолу (промежуточное соединение 17, 0,50 ммоль) выше комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. После фильтрации собирали фильтрат и осаждали холодным изопропиловым эфиром (150 мл), затем отфильтровывали, а твердое вещество дважды промывали изопропиловым эфиром (100 мл) и сушили неочищенный пептид при пониженном давлении в течение 2 ч с получением промежуточного соединения 18 (0,50 ммоль, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

[130] Циклизация: В неочищенный пептид (**промежуточное соединение 18**) в MeCN/H₂O (1/1, об./об., 500 мл) каплями добавляли 0,1 М I₂/AcOH до стойкого желтого цвета, затем смесь перемешивали при 25 °С в течение 5 мин. Смесь гасили покапельным добавлением 0,1 М водн. Na₂S₂O₃ до исчезновения желтого цвета. После фильтрации фильтрат очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% ТФУ/H₂O, В: MeCN) с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 19** (150,1 мг, 94,6 % чистота, 14,3 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,00 мин, МС расчит.: M_{ov} = 2093,35, полученная масса: [M + 2H]²⁺ = 1048,2, [M + 3H]³⁺ = 880,56.

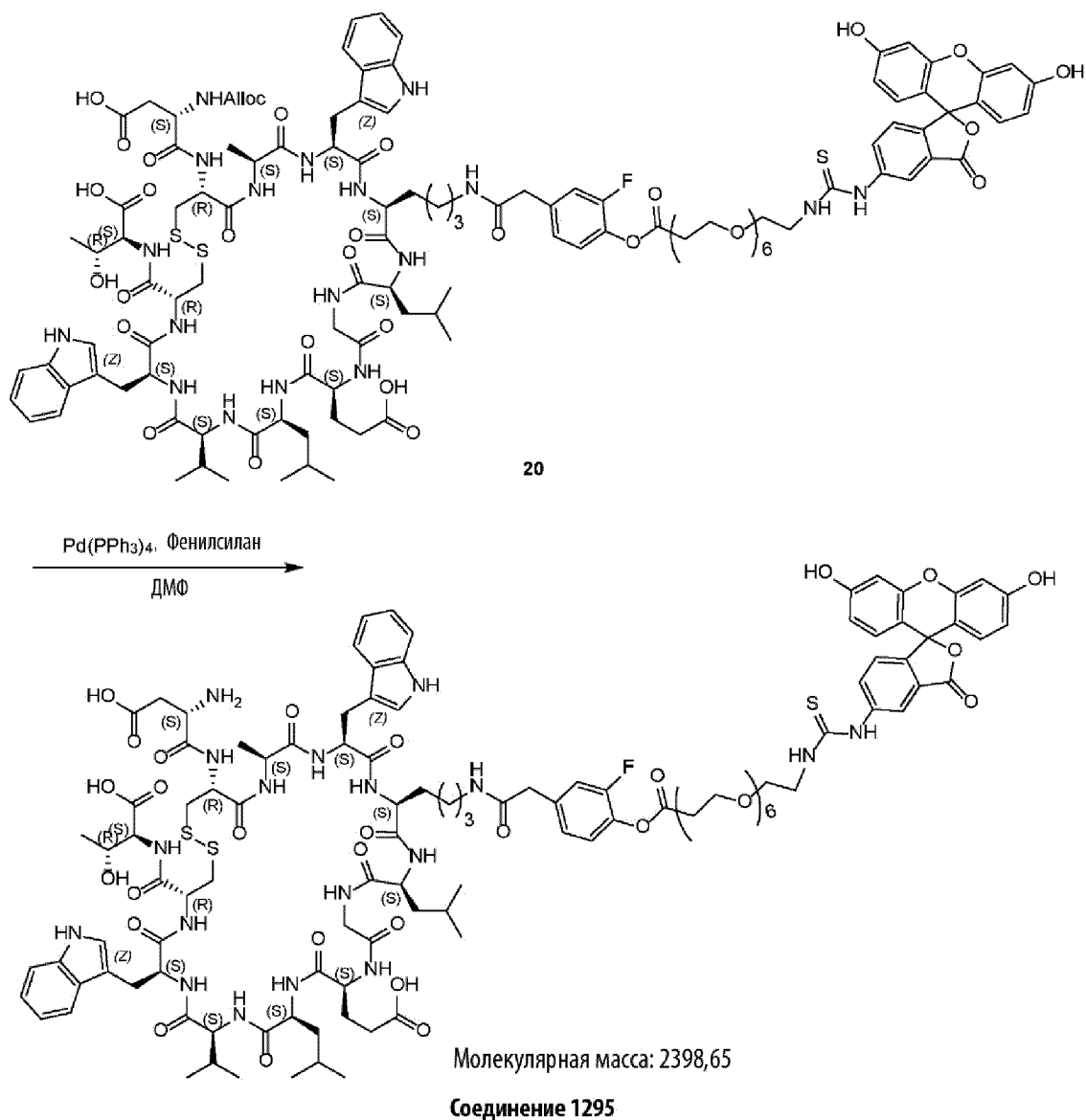


Получение промежуточного соединения 20:



[131] В смесь **промежуточного соединения 19** (150,1 мг, 71,7 мкмоль, 1,00 экв.) и **ФИТЦ** (41,9 мг, 107,55 мкмоль, 1,50 экв.) в ДМФ (2 мл) добавляли **ДИЭА** (27,7 мг, 37,5 мкл, 515,1 мкмоль, 3,00 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. После отслеживания завершения с помощью ЖХ-МС, смесь подкисляли 1 М HCl до pH = 5, затем очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% ТФУ/Н₂О, В: MeCN) напрямую, с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 20** (80,3 мг, 77,4 % чистота, 34,9 % выход) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,06 мин, МС расчет.: M_{av} = 2482,73, полученная масса: [2M + 3H]³⁺ = 1655,79, [M + 2H]²⁺ = 1242,10, [M + 3H]³⁺ = 828,31, [M + 4H]⁴⁺ = 621,72.

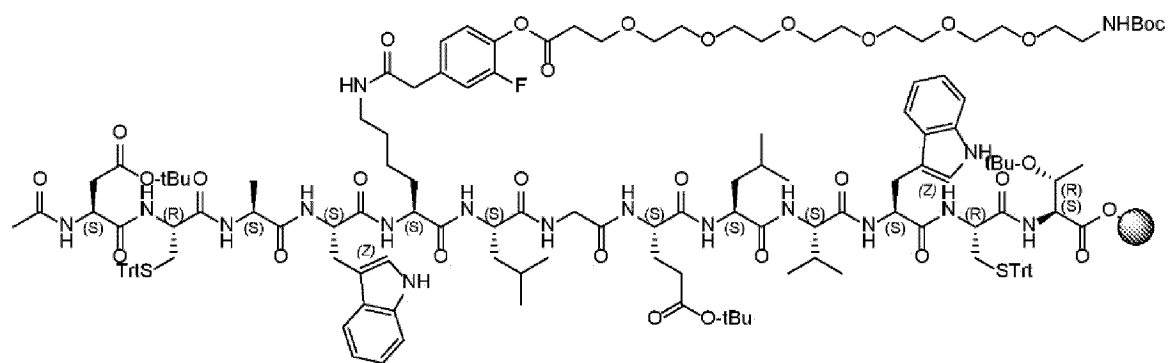
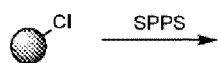
Получение соединения 1295:



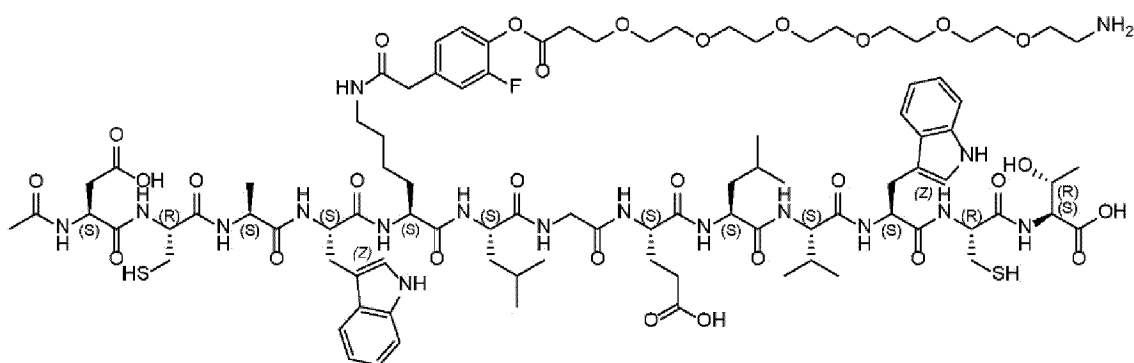
[132] В смесь **промежуточного соединения 20** (80,30 мг, 32,30 мкмоль, 1,00 экв.), растворенного в ДМФ (1 мл), добавляли Pd(PPh₃)₄ (5,60 мг, 4,84 мкмоль, 0,15 экв.) и фенилсилан (35,0 мг, 323,0 мкмоль, 10,00 экв.). Смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч, а полученную реакционную смесь перемешивали в течение 5 мин при 0 °С. После отслеживали завершение с помощью ЖХ-МС. Смесь подкисляли 1 М HCl до pH = 5, затем очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% ТФУ/Н₂О, В: MeCN) напрямую, с последующей лиофилизацией с получением **соединения 1295** (17,0 мг, 94,9 % чистота, 15,9 % выход) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС: RT = 2,02

мин, МС расчит.: $M_{av} = 2398,65$, полученная масса: $[2M + 3H]^{3+} = 1599,8$, $[M + H + Na]^{2+} = 1211,6$, $[M + 2H]^{2+} = 1200,1$, $[M + 3H]^{3+} = 800,4$.

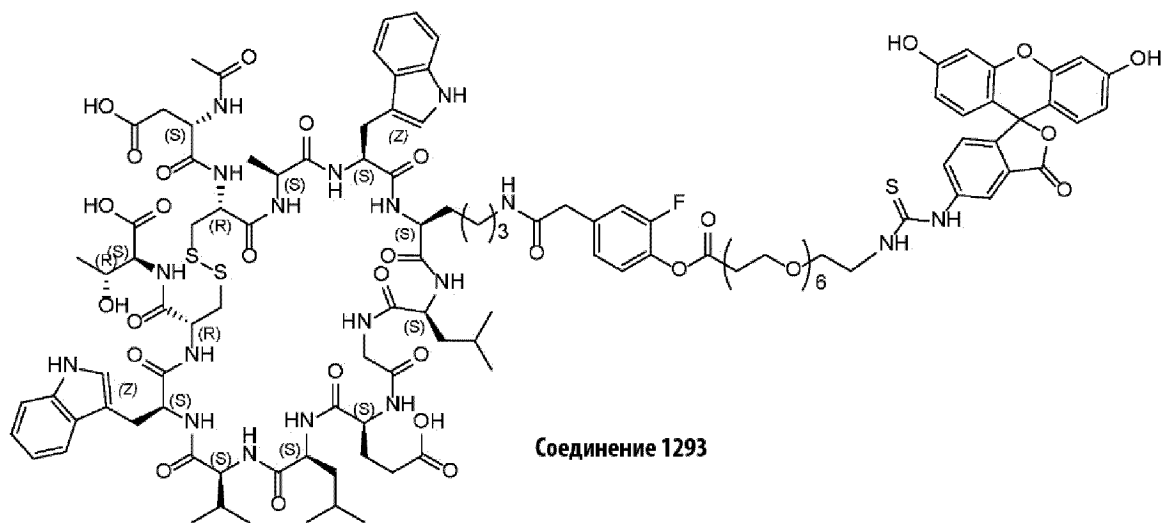
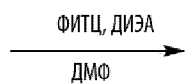
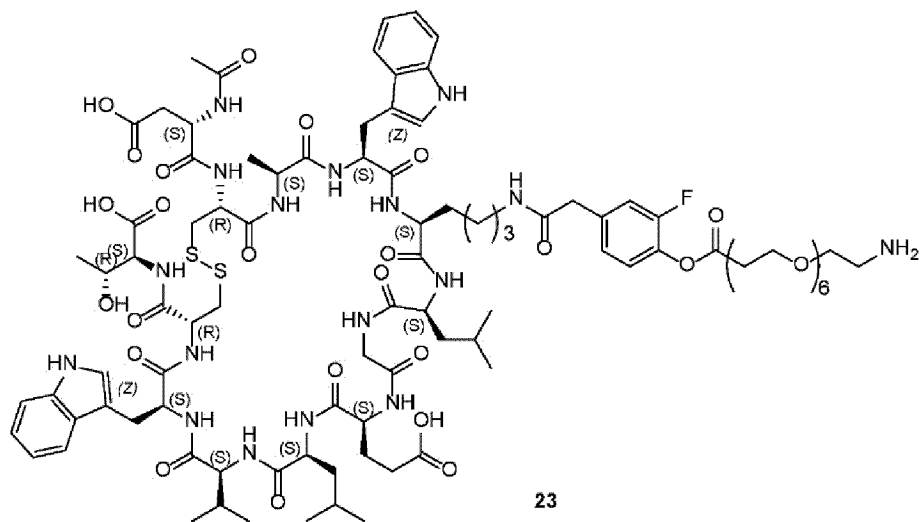
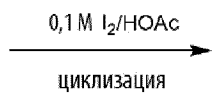
ПРИМЕР 6. Процедура для получения соединения 1293.



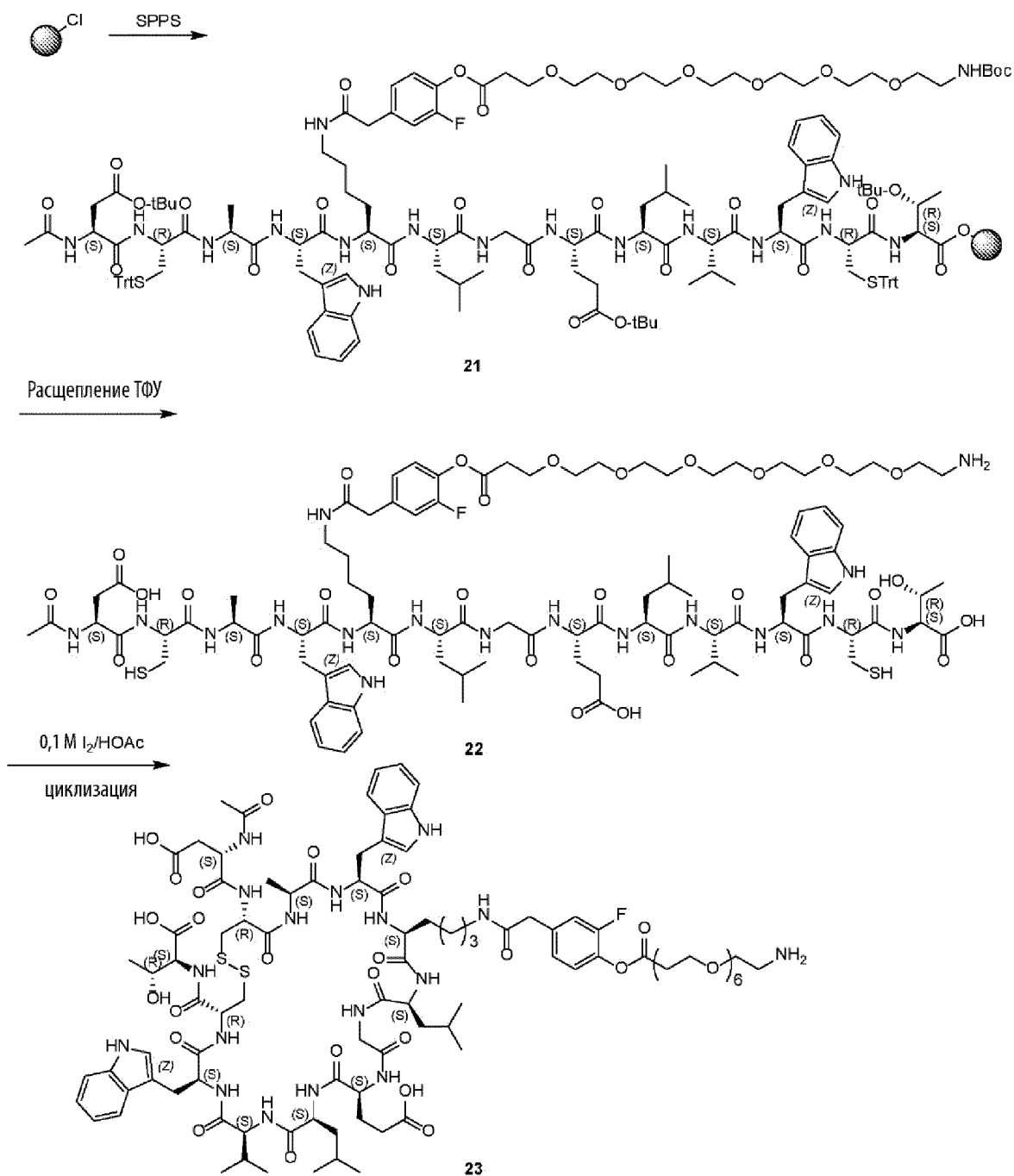
21



22



Получение промежуточного соединения 23:



[133] Пептид синтезировали, используя стандартную химию Fmoc (смола CTC).

[134] Получение смолы: В сосуд, содержащий смолу CTC (0,50 г, 0,50 ммоль, 1,00 ммоль/г) и Fmoc-Thr(tBu)-OH (198,5 мг, 0,50 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (5 мл), каплями добавляли ДИЭА (4,00 экв.) и смешивали в течение 2 ч с барботированием N_2 при 25 °С. Затем добавляли MeOH (0,5 мл) и барботировали N_2 еще в течение 30 мин. Смолу промывали ДМФ (10 мл) с последующим

добавлением 20 % пиперидина в ДМФ (10 мл) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С для снятия защиты Fmoc. Смесь фильтровали, а смолу промывали ДМФ (10 мл) перед переходом к следующему этапу.

[135] Сочетание: Раствор Fmoc-Cys(Trt)-ОН (0,88 г, 1,5 ммоль, 3,00 экв.), ГБТУ (0,41 г, 1,43 ммоль, 2,85 экв.) в ДМФ (5 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИЭА (6,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (20 мл).

[136] Снятие защиты: В смолу добавляли 20 % пиперидин в ДМФ (10 мл) и барботировали смесь N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию снятия защиты отслеживали по тесту с нингидрином, если он был синим или коричнево-красным, реакция была завершена. Затем смолу промывали ДМФ (10 мл).

[137] Этапы 2 и 3 повторяли для удлинения следующими аминокислотами: Номер № 3–9, таблица 6.

[138] Сочетание: Раствор 2-(3-фтор-4-гидроксифенил)уксусной кислоты (253,5 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.), НОВt (189,0 мг, 202,5 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.) в ДМФ (5 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИК (1,50 ммоль, 3,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (10 мл).

[139] Снятие защиты Dde: В смолу добавляли 3 % гидрат гидразина в ДМФ (10 мл) с барботированием N₂ в течение 30 мин. Затем реакцию снятия защиты отслеживали по тесту с нингидрином, если он был синим или коричнево-красным, реакция была завершена. Затем смолу промывали ДМФ (10 мл).

[140] Сочетание: Раствор Fmoc-Trp-ОН (639,0 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.), НОВt (202,5 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.) в ДМФ (5 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИК (1,50 ммоль, 3,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (10 мл).

[141] Снятие защиты: В смолу добавляли 20 % пиперидин в ДМФ (10 мл) и барботировали смесь N₂ в течение 30 мин при 25 °С. Реакцию снятия защиты отслеживали по тесту с нингидрином, если

он был синим или коричнево-красным, реакция была завершена. Затем смолу промывали ДМФ (10 мл).

[142] Этапы 7 и 8 повторяли для удлинения следующими аминокислотами: Номер № 11–14, таблица 6.

[143] Ацетилирование: В смолу добавляли раствор Ac₂O/NMM/ДМФ (2/1/17, об./об./об., 40 мл), смесь барботировали N₂ в течение 20 мин. Реакцию ацетилирования отслеживали по тесту с нингидрином. Затем смолу промывали ДМФ (20 мл).

[144] Сочетание: Раствор BocHN-PEG₆-CH₂CH₂COOH (700,0 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.), HOBt (202,5 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.), ДМАП (61,0 мг, 0,50 ммоль, 1,00 экв.) в ДМФ (5 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИК (1,50 ммоль, 3,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 16 ч при 25 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (10 мл), MeOH (50 мл), затем сушили при пониженном давлении для получением связанного со смолой пептидного промежуточного **соединения 21** (смола СТС, 1,35 г, 0,50 ммоль).

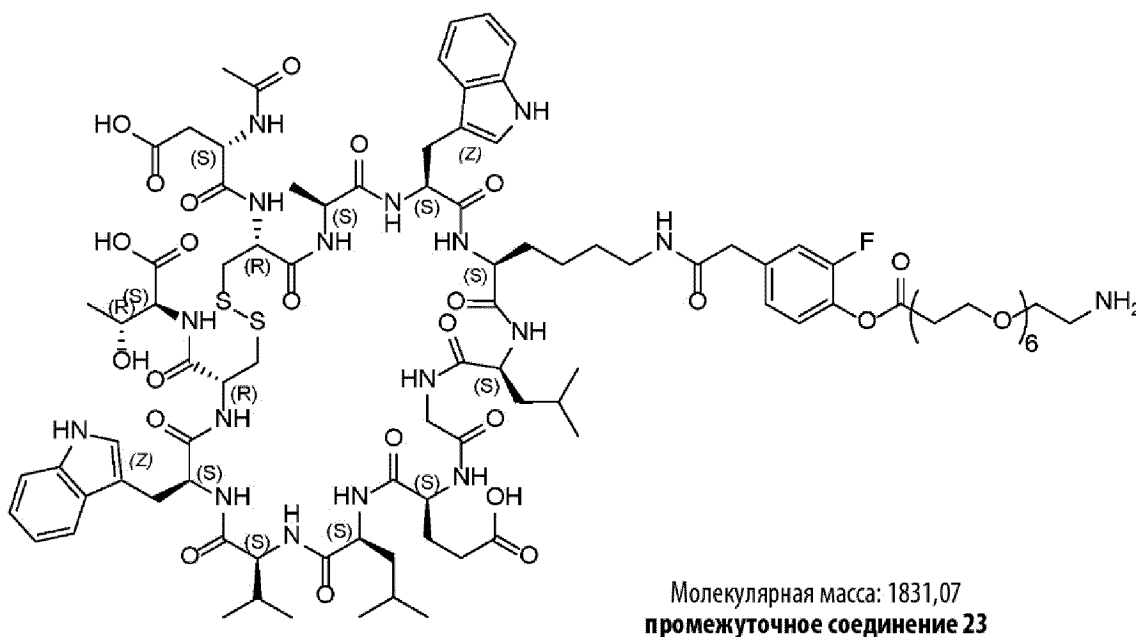
Таблица 6: Перечень аминокислот и соответствующие реагенты, используемые на SPPS.		
№	Материалы	Реагенты для сочетания
1	Fmoc-Thr(tBu)-OH (1,00 экв.)	ДИЭА (4,00 экв.)
2	Fmoc-Cys(Trt)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
3	Fmoc-Trp-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
4	Fmoc-Val-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
5	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
6	Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
7	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
8	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
9	Dde-Lys(Fmoc)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
10	2-(3-фтор-4-гидроксифенил)уксусная кислота (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и HOBt (3,00 экв.)
11	Fmoc-Trp-OH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и HOBt (3,00 экв.)
12	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и HOBt (3,00 экв.)
13	Fmoc-Cys(Trt)-OH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и HOBt (3,00 экв.)
14	Fmoc-Asp(OtBu)-OH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и HOBt (3,00 экв.)
15	Ацетилирование (6,00 экв.)	Ac ₂ O/NMM/ДМФ (10/5/85, 10 мл)

16	ВосHN-ПЭГ6-CH ₂ CH ₂ COOH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.), НОВт (3,00 экв.), ДМАП (3,00 экв.)
----	---	---

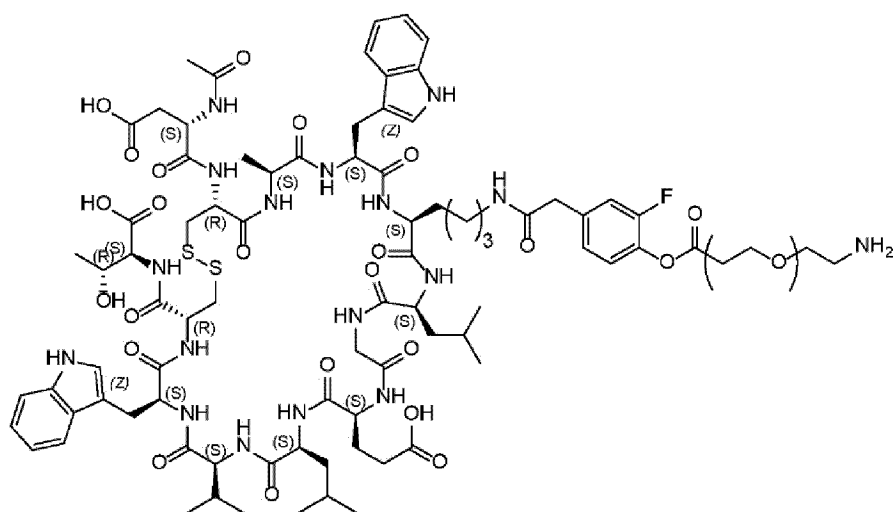
Расщепление и циклизация пептида:

[145] Расщепление: Раствор ТФУ/TIS/H₂O/3-меркаптопропановой кислоты (92,5/2,5/2,5/2,5, об./об./об., 30 мл) добавляли в смолу (промежуточное соединение 21, 0,50 ммоль) выше комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. После фильтрации собирали фильтрат и осаждали холодным изопропиловым эфиром (150 мл), затем отфильтровывали, а твердое вещество дважды промывали изопропиловым эфиром (100 мл) и сушили неочищенный пептид при пониженном давлении в течение 2 ч с получением промежуточного соединения 22 (0,50 ммоль, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

[146] Циклизация: В неочищенный пептид (**промежуточное соединение 22**) в MeCN/H₂O (1/1, об./об., 500 мл) каплями добавляли 0,1 М I₂/AcOH до стойкого желтого цвета, затем смесь перемешивали при 25 °С в течение 5 мин. Смесь гасили покапельным добавлением 0,1 М водн. Na₂S₂O₃ до исчезновения желтого цвета. После фильтрации фильтрат очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% ТФУ/H₂O, В: MeCN) с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 23** (160,1 мг, 90,0 % чистота, 15,6 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 7,9 мин, МС рассчит.: M_{av} = 2051,31, полученная масса: [M + 2H]²⁺ = 1026,60, [M + 3H]³⁺ = 684,59.

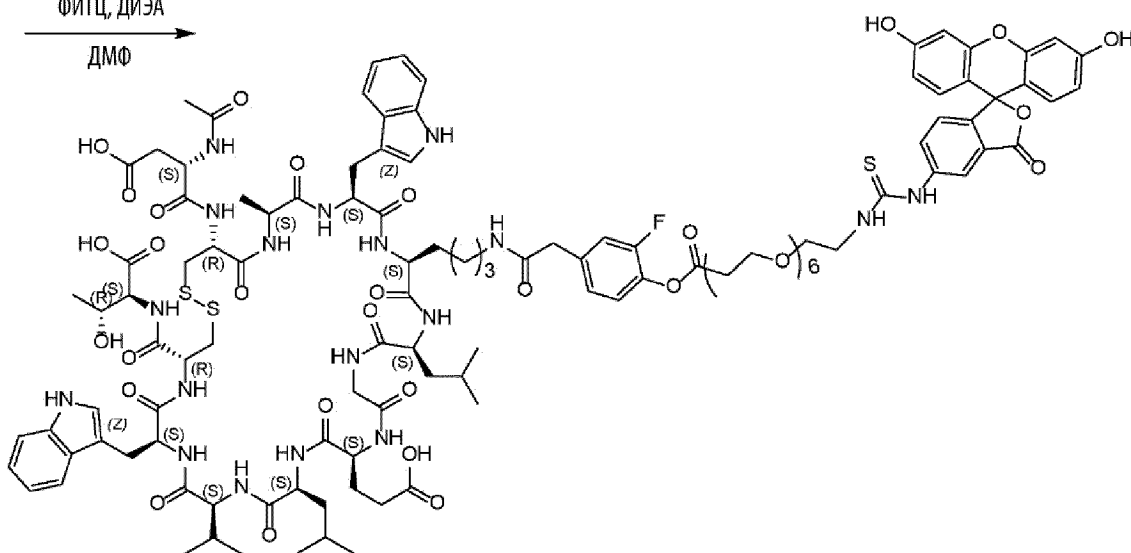


Получение соединения 1293:



23

ФИТЦ, ДИЭА
 ДМФ



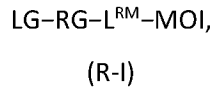
Молекулярная масса: 2440,69

Соединение 1293

[147] В смесь **промежуточного соединения 23** (120,0 мг, 58,50 мкмоль, 1,00 экв.) и **ФИТЦ** (34,08 мг, 87,51 мкмоль, 1,50 экв.) в ДМФ (2 мл) добавляли ДИЭА (27,7 мг, 30,59 мкл, 175,5 мкл, 3,00 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. После отслеживали завершение с помощью ЖХ-МС, смесь подкисляли 1 М HCl до pH = 5, затем очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% ТФУ/Н₂О, В: MeCN) напрямую, с последующей лиофилизацией с получением **соединения 1293** (33,8 мг, 91,4 % чистота, 23,7 % выход) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС: RT = 2,02 мин, МС расчет.: $M_{av} = 2440,69$, полученная масса: $[M + Na + H]^{2+} = 1232,00$, $[M + 2H]^{2+} = 1221,60$, $[M + 3H]^{3+} = 814,30$.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, имеющее структуру формулы R-I:



или ее соли, где:

LG представляет собой группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью,

RG представляет собой реактивную группу формулы $-\text{L}^{\text{LG2}}-\text{L}^{\text{LG3}}-\text{L}^{\text{LG4}}-\text{L}^{\text{RG1}}-\text{L}^{\text{RG2}}-$, где

L^{LG2} представляет собой $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{C}(\text{R}')_2-$, где каждый R' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом R' необязательно соединены с образованием кольца;

L^{LG3} представляет собой необязательно замещенное арильное кольцо;

L^{LG4} представляет собой $-\text{NH}-$ или $-\text{O}-$;

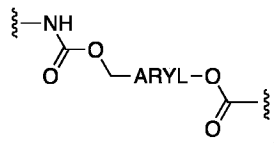
L^{RG1} представляет собой $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{OS}(\text{O})_2-$ или $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR})_2-$; и

L^{RG2} представляет собой ковалентную связь или $[-\text{C}(\text{R}'')_2\text{C}(\text{R}'')=\text{C}(\text{R}'')]\text{C}(\text{O})-$, где каждый R'' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом любые два R'' необязательно соединены с образованием кольца;

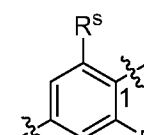
L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент.

2. Соединение по п. 1, где RG представляет собой или содержит реактивную группу, имеющую следующую формулу:

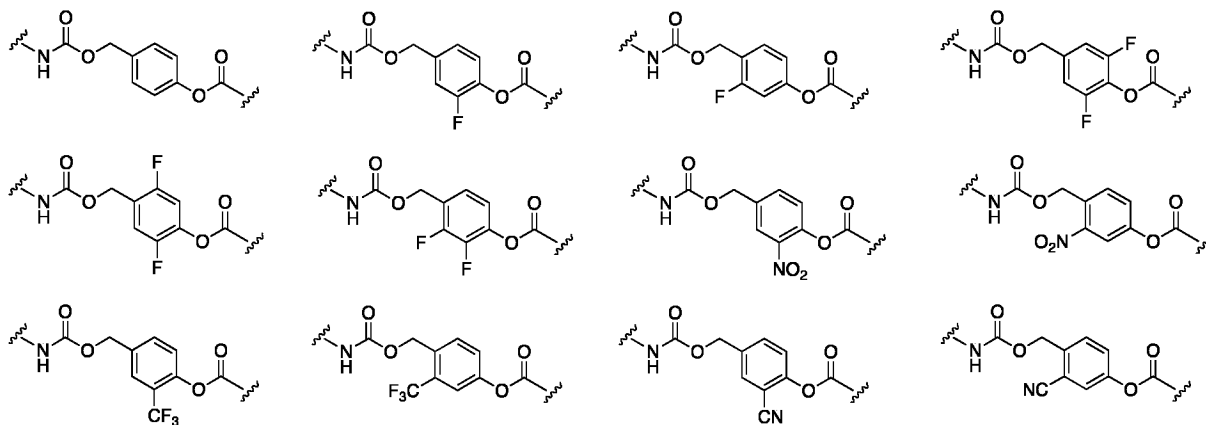


где ARYL представляет собой замещенное или незамещенное парафениленовое кольцо.

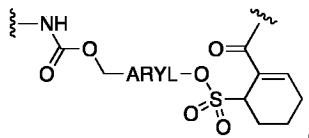
3. Соединение по п. 2, где ARYL имеет структуру  или , где R^S

в каждом случае независимо выбран из галогена, $-\text{NO}_2$, $-\text{F}$, $-\text{L}-\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})-\text{L}-\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})-\text{L}-\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2-\text{L}-\text{R}'$ и $-\text{P}(\text{O})(-\text{L}-\text{R}')_2$, а R' представляет собой H или C_1 - C_6 алкил.

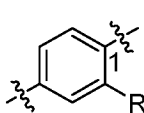
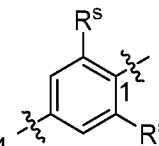
4. Соединение по п. 2 или 3, где реактивная группа представляет собой или содержит одну из следующих формул:



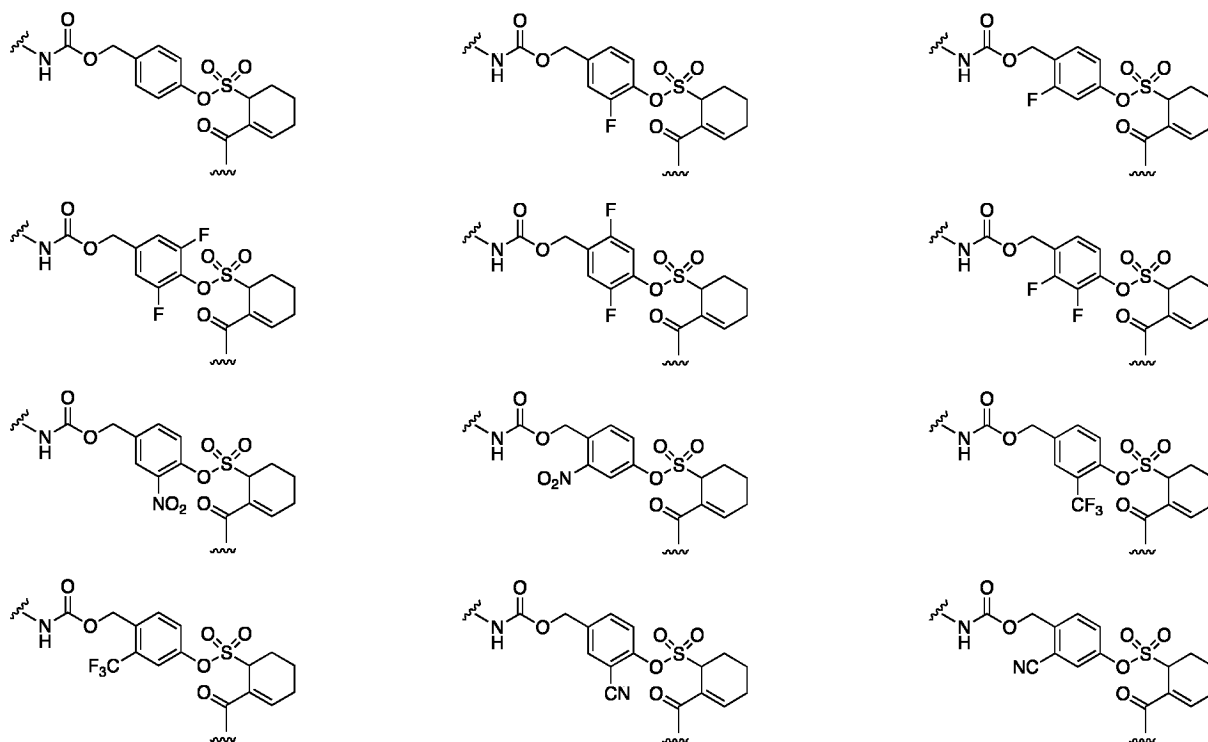
5. Соединение по п. 1, где RG представляет собой или содержит реактивную группу, имеющую следующую формулу:



где ARYL представляет собой замещенное или незамещенное парафениленовое кольцо.

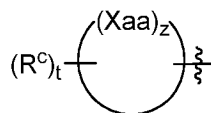
6. Соединение по п. 5, где ARYL имеет структуру  или , где R^S в каждом случае независимо выбран из галогена, $-\text{NO}_2$, $-\text{F}$, $-\text{L}-\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})-\text{L}-\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})-\text{L}-\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2-\text{L}-\text{R}'$ и $-\text{P}(\text{O})(-\text{L}-\text{R}')_2$, а R' представляет собой H или C_1 - C_6 алкил.

7. Соединение по п. 5 или 6, где реактивная группа представляет собой или содержит одну из следующих формул:



8. Соединение по п. 1, где

LG представляет собой $R^{LG}-L^{LG}$;



R^{LG} представляет собой , $R^c-(Xaa)_z-$, фрагмент нуклеиновой кислоты или фрагмент малой молекулы;

каждый Xaa независимо представляет собой остаток аминокислоты или аминокислотный аналог;

t равно 0–50;

z равно 1–50;

каждый R^c независимо представляет собой $-L^a-R'$;

каждый L^a независимо представляет собой ковалентную связь или обязательно замещенную двухвалентную группу, выбранную из C_{1-20} алифатического или C_{1-20} алифатического фрагмента, имеющего 1–5 гетероатомов, где одно или более метиленовых звеньев группы обязательно и независимо замещены $-C(R')_2-$, $-Cγ-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$ или $-C(O)O-$;

каждый –Су– независимо представляет собой необязательно замещенную двухвалентную моноциклическую, бициклическую или полициклическую группу, где каждое моноциклическое кольцо независимо выбрано из C₃₋₂₀ циклоалифатического кольца, C₆₋₂₀ арильного кольца, 5–20-членного гетероарильного кольца, имеющего 1–10 гетероатомов, и 3–20-членного гетероциклического кольца, имеющего 1–10 гетероатомов;

L^{LG} представляет собой –L^{LG1}–, –L^{LG1}–L^{LG2}–, –L^{LG1}–L^{LG2}–L^{LG3}– или –L^{LG1}–L^{LG2}–L^{LG3}–L^{LG4}–;

каждый из L^{LG1}, L^{LG2}, L^{LG3} и L^{LG4} независимо представляет собой ковалентную связь или двухвалентную необязательно замещенную линейную или разветвленную C₁₋₁₀₀ группу, содержащую один или более алифатических фрагментов, арильных фрагментов, гетероалифатических фрагментов, каждый из которых независимо имеет 1–20 гетероатомов, гетероароматических фрагментов, каждый из которых независимо имеет 1–20 гетероатомов, или любые комбинации любого одного или более таких фрагментов, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены C₁₋₆ алкиленом, C₁₋₆ алкениленом, двухвалентной C₁₋₆ гетероалифатической группой, имеющей 1–5 гетероатомов, –C≡C–, –C_n–, –C(R')₂–, –O–, –S–, –S–S–, –N(R')–, –C(O)–, –C(S)–, –C(NR')–, –C(O)N(R')–, –C(O)C(R')₂N(R')–, –N(R')C(O)N(R')–, –N(R')C(O)O–, –S(O)–, –S(O)₂–, –S(O)₂N(R')–, –C(O)S–, –C(O)O–, –P(O)(OR')–, –P(O)(SR')–, –P(O)(R')–, –P(O)(NR')–, –P(S)(OR')–, –P(S)(SR')–, –P(S)(R')–, –P(S)(NR')–, –P(R')–, –P(OR')–, –P(SR')–, –P(NR')–, аминокислотным остатком или –[(–O–C(R')₂–C(R')₂)_n]–, где n равно 1–20;

каждый R' независимо представляет собой –R, –C(O)R, –CO₂R или –SO₂R;

каждый R независимо представляет собой –H или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₃₀ алифатического, C₁₋₃₀ гетероалифатического фрагмента, имеющего 1–10 гетероатомов, C₆₋₃₀ арильного, C₆₋₃₀ арилалифатического, C₆₋₃₀ арилгетероалифатического фрагмента, имеющего 1–10 гетероатомов, 5–30-членного гетероарила, имеющего 1–10 гетероатомов, и 3–30-членного гетероцикла, имеющего 1–10 гетероатомов, или

две группы R необязательно и независимо вместе образуют ковалентную связь или:

две или более групп R на одном атоме необязательно и независимо вместе с атомом образуют необязательно замещенное 3–30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, имеющее, в дополнение к атому, 0–10 гетероатомов; или

две или более групп R на двух или более атомах необязательно и независимо вместе со своими промежуточными атомами образуют необязательно замещенное 3–30-членное

моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, имеющее, в дополнение к промежуточным атомам, 0–10 гетероатомов.

9. Соединение по п. 1, где LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью, при этом агент-мишень представляет собой агент на основе антитела.

10. Соединение по п. 1, где LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который связывается с Fc-областью, и/или R^{LG} представляет собой или содержит DCAWXLGELVWCT (SEQ ID NO:2), где два остатка цистеина необязательно образуют дисульфидную связь, а X представляет собой аминокислотный остаток.

11. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что соблюдено по меньшей мере одно из следующих условий:

(a) представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит терапевтический агент;

(b) представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит фрагмент, который может связываться с белком, нуклеиновой кислотой или клеткой; и/или

(c) представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит реактивный фрагмент, подходящий для биоортогональной реакции.

12. Соединение по п. 1, где LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, имеющий структуру формулы от A-1 до A-50, приведенную в описании.

13. Соединение по п. 1, где MOI представляет собой или содержит фрагмент терапевтического агента и/или MOI представляет собой или содержит агент на основе антитела.

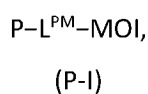
14. Соединение по п. 1, где L^{RM} содержит один или более $-[(CH_2)_n-O]_m-$, где каждое n независимо равно 1–20 и m равно 1–100.

15. Соединение по п. 1, где в формуле (R-I):

агент-мишень представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь IgG, содержащую K246 или K248, и

связывающий мишень фрагмент сконструирован с возможностью связывать антитело так, чтобы реактивная группа оказалась вблизи K246 или K248 тяжелой цепи IgG, чтобы сделать возможной реакцию между K246 или K248 и реактивной группой, которая приводит к присоединению фрагмента, содержащего L^{RM} -MOI, к K246 или K248 и отделению группы, содержащей связывающий мишень фрагмент, от соединения.

16. Способ получения агента, имеющего структуру P-I:



или ее соли, где:

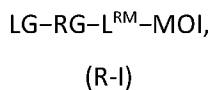
P представляет собой фрагмент агента-мишени;

L^{PM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент.

включающий такие этапы:

1) приведение агента-мишени в контакт с реакционным партнером, имеющим структуру формулы R-I:



или ее соли, где:

LG представляет собой группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью,

RG представляет собой реактивную группу формулы $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$, где

L^{LG2} представляет собой $-NH-C(O)O-C(R')_2-$, где каждый R' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом R' необязательно соединены с образованием кольца;

L^{LG3} представляет собой необязательно замещенное арильное кольцо;

L^{LG4} представляет собой $-NH-$ или $-O-$;

L^{RG1} представляет собой $-C(O)-$, $-S(O)-$, $-OS(O)_2-$ или $-OP(O)(OR)_2-$; и

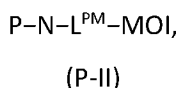
L^{RG2} представляет собой ковалентную связь или $[-C(R'')_2C(R'')=C(R'')]C(O)-$, где каждый R'' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом

любые два R'' необязательно соединены с образованием кольца;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент; и

2) образование агента, имеющего структуру формулы P-I; или
способ получения агента, имеющего структуру P-II:



где:

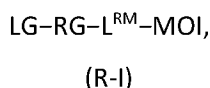
P-N представляет собой фрагмент белкового агента, содержащий остаток лизина;

L^{PM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент;

при этом способ включает:

приведение P-N в контакт с реакционным партнером, имеющим структуру формулы R-I:



или ее соли, где:

LG представляет собой группу, содержащую связывающий белок фрагмент,
который связывается с P-N,

RG представляет собой реактивную группу формулы $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$, где

L^{LG2} представляет собой $-NH-C(O)O-C(R')_2-$, где каждый R' независимо
представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом R' необязательно соединены с
образованием кольца;

L^{LG3} представляет собой необязательно замещенное арильное кольцо;

L^{LG4} представляет собой $-NH-$ или $-O-$;

L^{RG1} представляет собой $-C(O)-$, $-S(O)-$, $-OS(O)_2-$ или $-OP(O)(OR)_2-$; и

L^{RG2} представляет собой ковалентную связь или $[-C(R'')_2C(R'')=C(R'')]C(O)-$,

где каждый R'' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом
любые два R'' необязательно соединены с образованием кольца;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что агент-мишень представляет собой или

содержит агент на основе антитела.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент селективно присоединен к агенту на основе антитела в K246 или K248 тяжелой цепи IgG1 или соответствующем положении.

19. Способ по п. 17, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент селективно присоединен к агенту на основе антитела в K251 или K253 тяжелой цепи IgG2 или соответствующем положении.

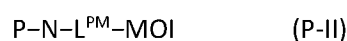
20. Способ по п. 17, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент селективно присоединен к агенту на основе антитела в K239 или K241 тяжелой цепи IgG4 или соответствующем положении.

21. Способ по п. 16, отличающийся тем, что этапы приведения в контакт и образования проводят в ходе одной химической реакции.

22. Композиция, содержащая одно или более соединений по любому из пп. 1–15.

23. Композиция, содержащая:

первое соединение, имеющее структуру формулы (P-II):



где:

P-N представляет собой фрагмент белкового агента, содержащий остаток лизина;

L^{PM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент; и

второе соединение, имеющее структуру:



где LG представляет собой группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью.

24. Композиция по п. 23, дополнительно содержащая:

третье соединение, имеющее формулу (R-I):



LG представляет собой группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью, которая идентична LG в формуле (LG-I);

RG представляет собой реактивную группу формулы $-\text{L}^{\text{LG2}}-\text{L}^{\text{LG3}}-\text{L}^{\text{LG4}}-\text{L}^{\text{RG1}}-\text{L}^{\text{RG2}}-$, где

L^{LG2} представляет собой $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{C}(\text{R}')_2-$, где каждый R' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом R' необязательно соединены с образованием кольца;

L^{LG3} представляет собой необязательно замещенное арильное кольцо;

L^{LG4} представляет собой $-\text{NH}-$ или $-\text{O}-$;

L^{RG1} представляет собой $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{OS}(\text{O})_2-$ или $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR})_2-$; и

L^{RG2} представляет собой ковалентную связь или $[-\text{C}(\text{R}'')_2\text{C}(\text{R}'')=\text{C}(\text{R}'')]\text{C}(\text{O})-$,

где каждый R'' независимо представляет собой H или C1-C10 алкил, при этом любые два R'' необязательно соединены с образованием кольца;

L^{RM} представляет собой линкер, который идентичен линкеру в формуле (P-II); и

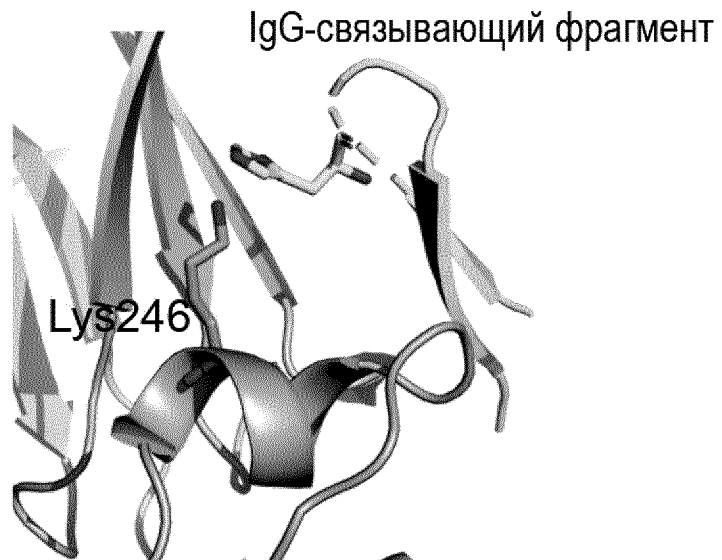
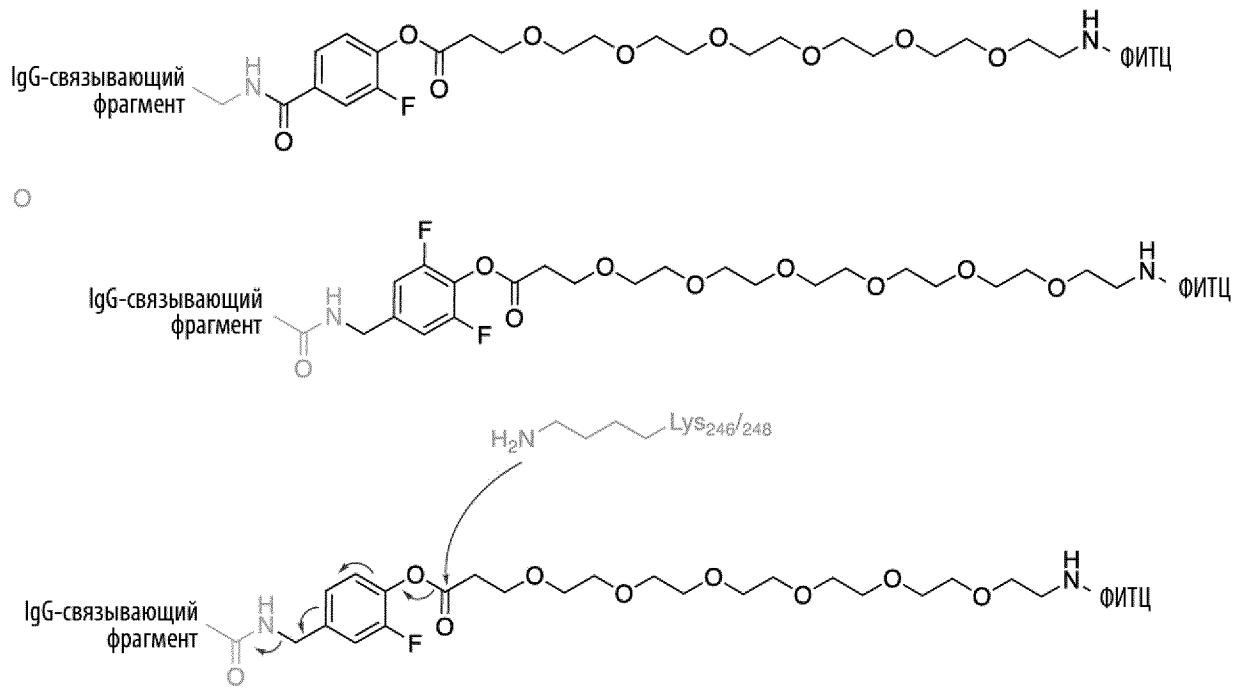
MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент;

четвертое соединение, имеющее формулу (R-III):

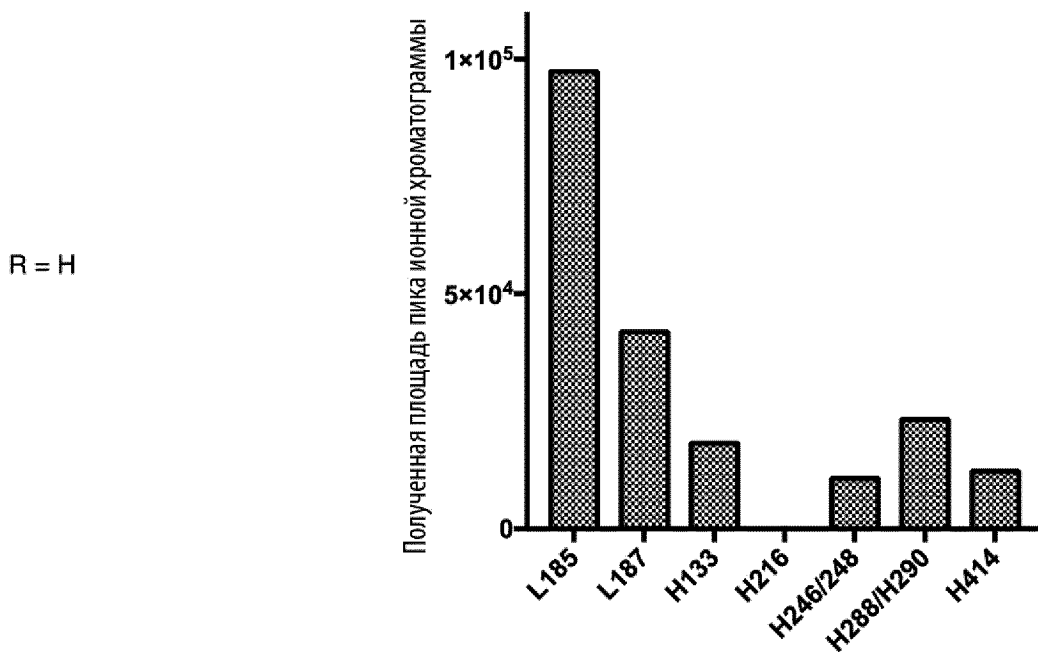
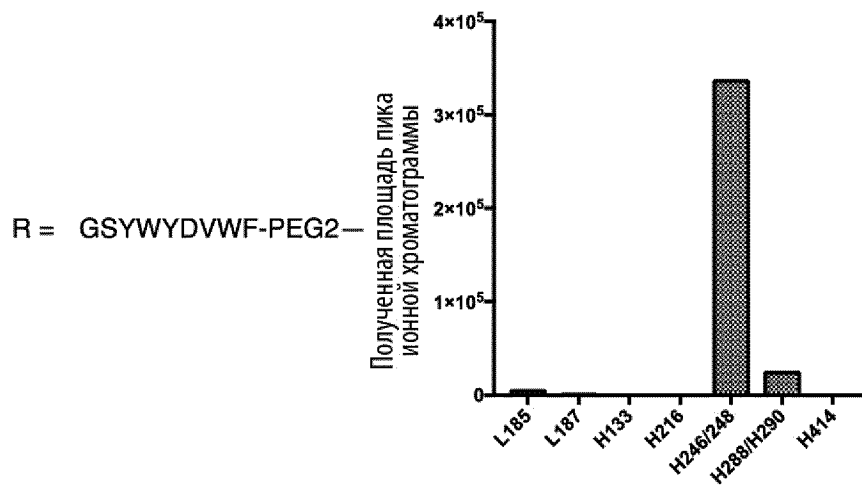
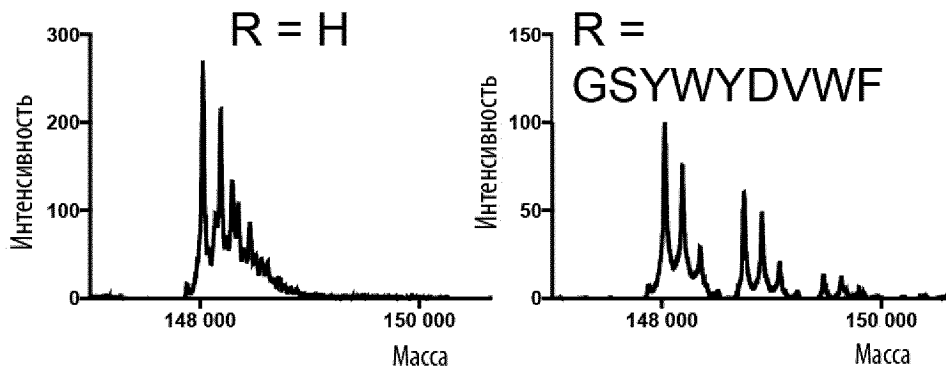


или их комбинацию.

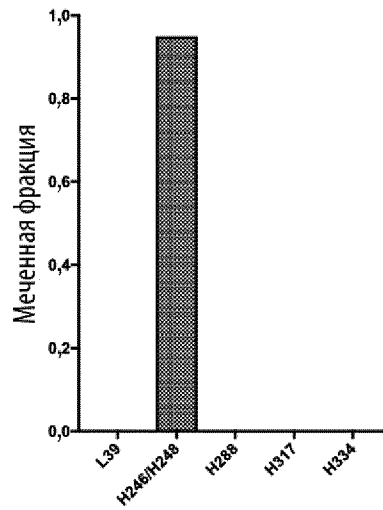
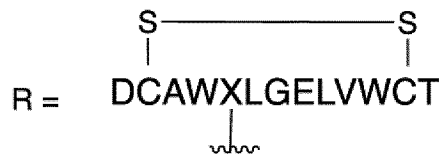
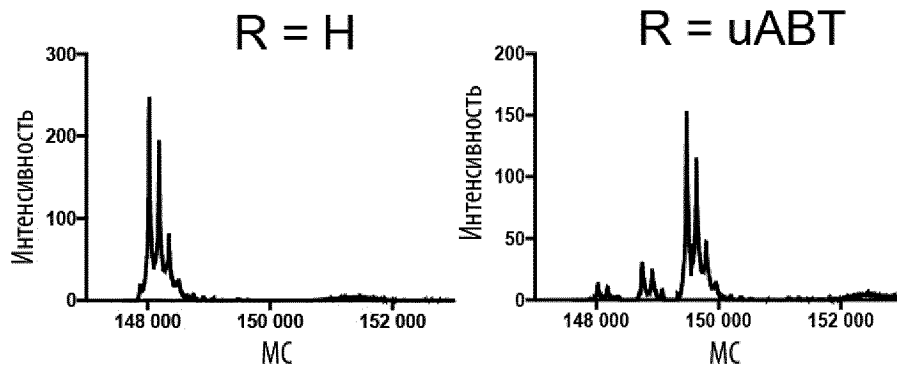
Фиг. 1



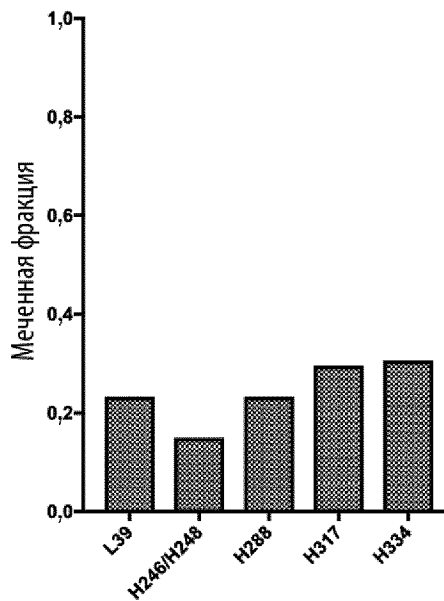
Фиг. 2



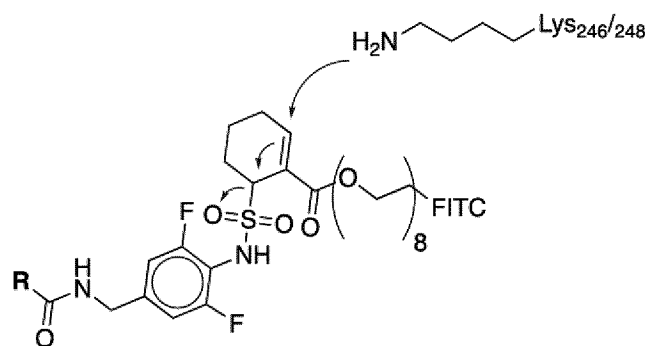
Фиг. 3



R = H

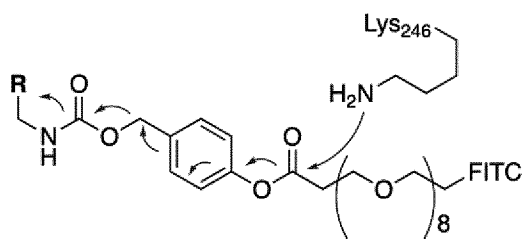


Фиг. 4А

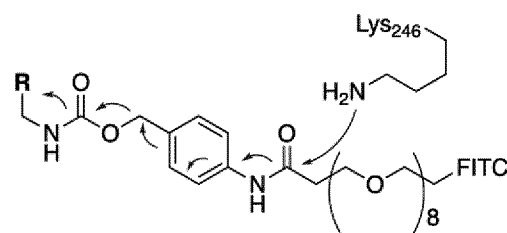


R = uABT DAR = 0,8
 R = H DAR = 0,2

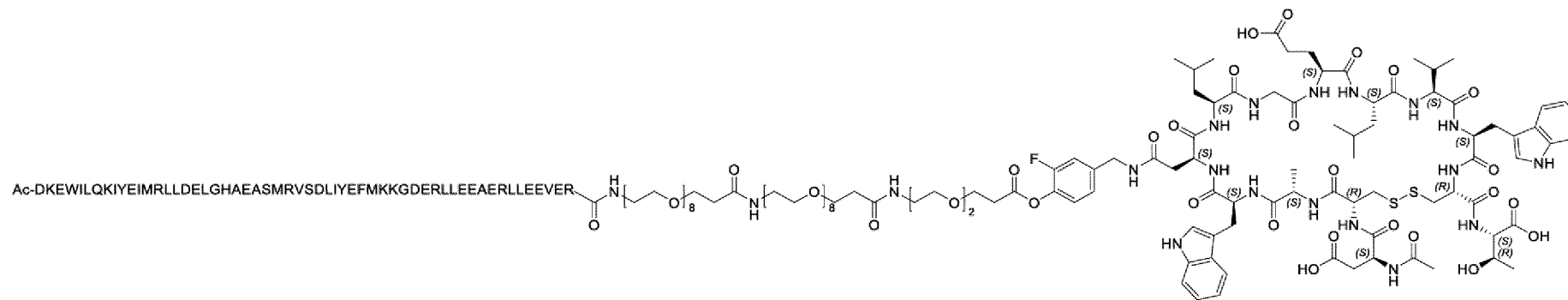
Фиг. 4В



R = uABT DAR = 1,3
 R = H DAR = 0,06

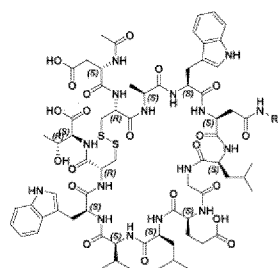


R = uABT DAR = 0,8
 R = H DAR = 0,13



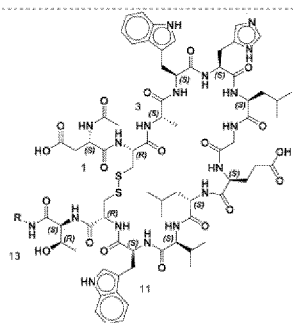
Фиг. 5

Реагент Mate uABT



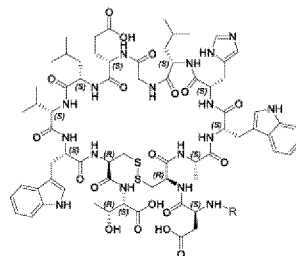
Ac-DCAWNLGELVWCT
R

KP1774 uABT-группа



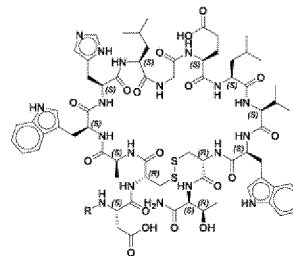
Ac-DCAWHLGELVWCT-R

KP1237 uABT-группа



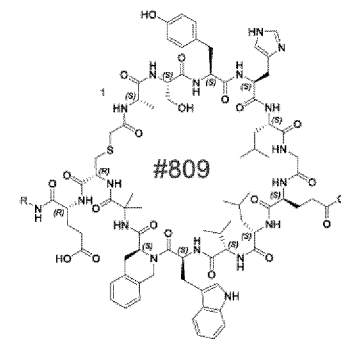
R-DCAWHLGELVWCT

KP2508 uABT-группа



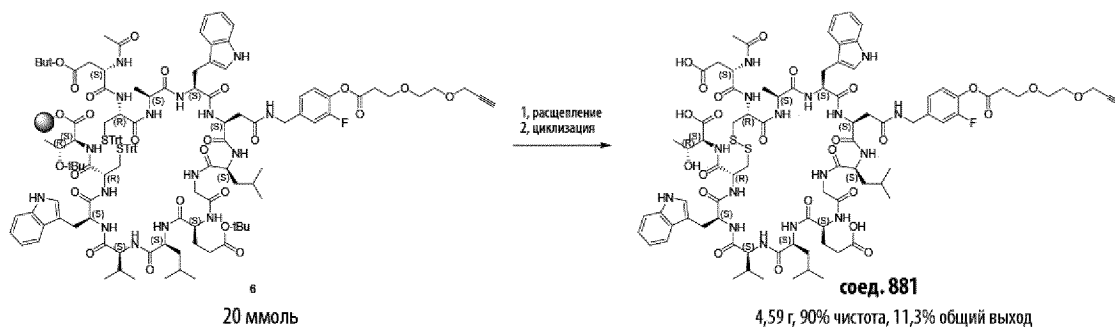
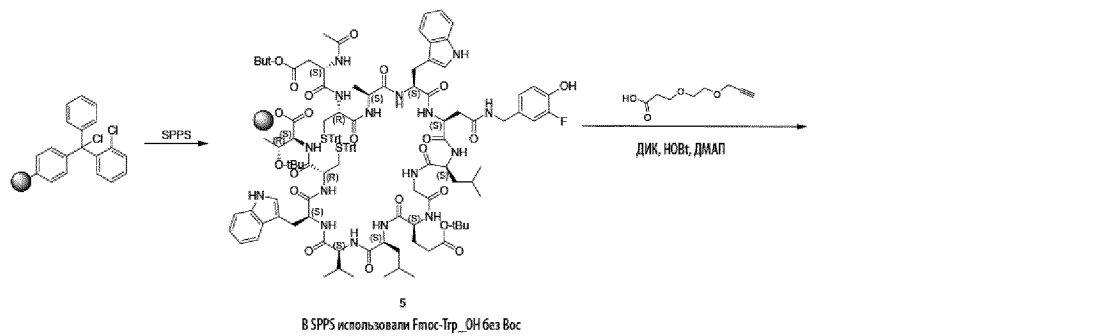
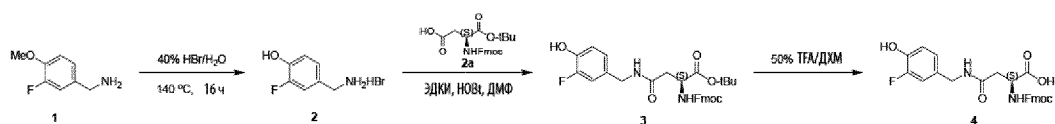
R-DCAWHLGELVWCT

KP2050 uABT-группа

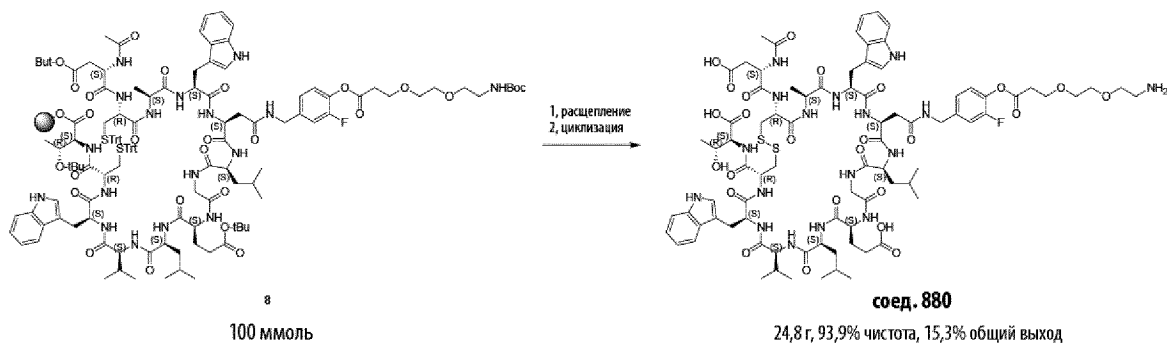
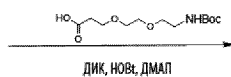


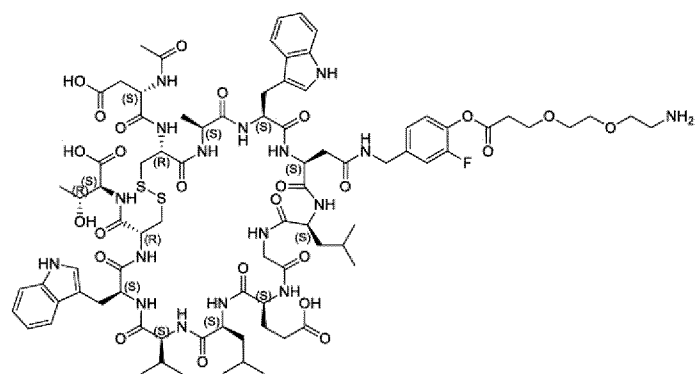
A(1)-SYHLGELVW-Tic(11)-Aib-CE-R

Фиг. 6



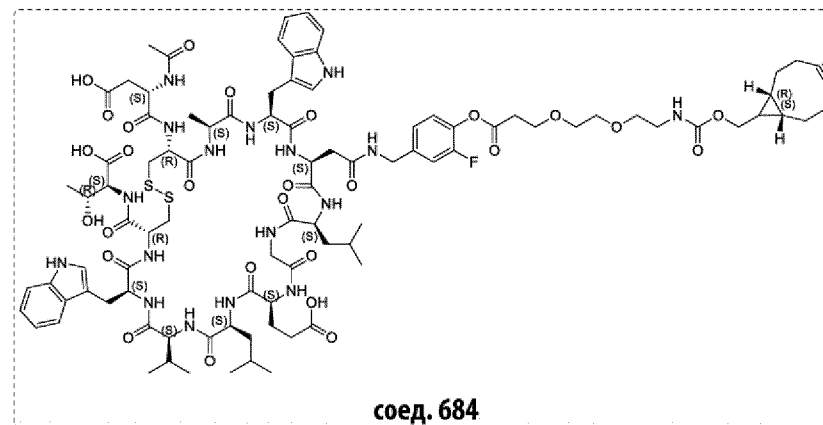
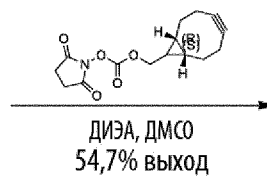
5
В SPPS использовали Fmoc-Trp_ОН без Boc





соед. 880

24,8 г, 93,9% чистота, 15,3% общий выход | 2,0 г



соед. 684

1,2 г, 90% чистота, 8,4% общий выход

Фиг. 8

Фиг. 9

