

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393066 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.01

(22) Дата подачи заявки
2022.05.19

(51) Int. Cl. A61K 38/02 (2006.01)
A61K 38/03 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C07K 1/10 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДИКИ МАТЕ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

(31) 63/190,703

(32) 2021.05.19

(33) US

(86) PCT/US2022/030070

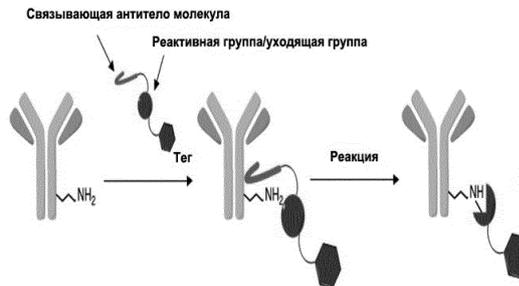
(87) WO 2022/246086 2022.11.24

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

(72) Изобретатель:
Казмиерски Веслав, Дубовчик
Джин М., Колдуэлл Риис М., Праситто
Ричард (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.



A1

202393066

202393066

A1

КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО – ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДИКИ МАТЕ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Данная заявка испрашивает приоритет по заявке США № 63/190703, поданной 19 мая 2021 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[1] Конъюгаты антитело – лекарственный препарат применимы в различных целях, например, в качестве диагностических реагентов, терапевтических средств (например, нацеленных на антиген терапевтических средств) и т. д. Существующие методики конъюгации лекарственных препаратов и антител могут иметь различные недостатки. Например, реакции конъюгации представляющих интерес фрагментов (например, выявляющих фрагментов, лекарственных фрагментов и т. д.) с молекулами-мишенями (например, антителами для конъюгатов антитело – лекарственный препарат) могут иметь низкую эффективность и/или иметь низкую селективность (например, конъюгация может происходить в разных участках (например, различных аминокислотных остатках антител) молекул-мишеней), а продукты композиций конъюгатов часто являются очень гетерогенными и содержат ряд индивидуальных типов конъюгатов, каждый из которых независимо имеет свое собственное число копий представляющих интерес фрагментов, участков конъюгации (например, разные аминокислотные остатки белков) и т. д.

[2] Одобренные конъюгаты антитело – лекарственный препарат для доставки цитотоксических агентов в раковые клетки включают ПАДЦЕВ (энфортумаб ведотин) и АДЦЕТРИС (брентуксимаб ведотин), которые оба применимы для доставки монометилауристатина Е (ММАЕ). Современные методики конъюгации лекарственных препаратов и антител включают конъюгацию посредством остатков лизина, конъюгацию посредством восстановленных межцепочечных дисульфидных связей и конъюгацию посредством сконструированных остатков цистеина. Фиг. 1. Каждая из этих методик имеет свои недостатки. Конъюгация посредством лизина дает широкий диапазон соотношений лекарственный препарат – антитело (DAR), при этом каждый меченый лизин является статистической вероятностью. Результатом являются миллионы возможных

конъюгатов антитело – лекарственный препарат. Молекулы с высоким соотношением DAR подвержены проблемам СМС, таким как агрегация. Некоторые молекулы могут легко высвободить свой конъюгированный лекарственный препарат, что приводит к токсичности. Конъюгация посредством восстановленных межцепочечных дисульфидных связей также дает ряд молекул конъюгатов антител. Связь с лекарственным препаратом может меняться со временем, приводя к высвобождению свободного лекарственного препарата. Существующие методики для конъюгации посредством сконструированных остатков цистеина включают масштабные манипуляции с антителами или их конструирование.

[3] Существует потребность в конъюгатах антитело – лекарственный препарат с прогнозируемым DAR и сайтами конъюгации, которые не позволяют конъюгированному лекарственному препарату «протекать», и без необходимости в масштабном конструировании антител. Данное изобретение удовлетворяет эту потребность и имеет дополнительные преимущества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] В данном изобретении предложены бифункциональные молекулы, содержащие монометилауристин Е (ММАЕ) и способные образовывать конъюгаты антитело – лекарственный препарат, в которых конъюгация происходит в конечном числе прогнозируемых сайтов антитела.

[5] В некоторых вариантах осуществления производство конъюгатов включает несколько этапов и включает различные реакции, такие как восстановление, окисление, гидролиз и т. д., при этом такие реакции могут приводить к нежелательным трансформациям, например, в одном или более участках фрагментов агентов-мишеней (например, в одном или более остатках и/или одной или более модификациях (например, гликанах) фрагментов антител). Такие нежелательные трансформации могут дополнительно снижать эффективность и/или повышать гетерогенность композиций продукта конъюгации, затруднять изучение характеристик, оценку и/или процессы очистки и повышать стоимость продукта.

[6] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены методики для конъюгации различных представляющих интерес фрагментов с мишенями (например, белками). В некоторых вариантах осуществления предложенные методики обеспечивают направленную конъюгацию в том смысле, что представляющие интерес фрагменты селективно конъюгированы в определенных участках мишеней (например, белков, таких как

антитела). В некоторых вариантах осуществления в предложенных методиках используют меньшее количество этапов. В некоторых вариантах осуществления в предложенных методиках используют мягкие условия реакций. В некоторых вариантах осуществления предложенные методики не включают такие условия реакций, как восстановление, окисление и/или гидролиз. В некоторых вариантах осуществления предложенные методики практически не включают отщепление от молекул конъюгатов, содержащих фрагменты агента-мишени и представляющие интерес фрагменты (например, отщепление группы от фрагментов агента-мишени, представляющих интерес фрагментов и/или линкерных фрагментов). В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты представляют собой выявляемые фрагменты (например, ФИТЦ). В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты представляют собой лекарственные фрагменты (например, различные лекарственные фрагменты, используемые в конъюгатах антитело – лекарственный препарат). В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты представляют собой белковые фрагменты (например, агенты на основе антител, конъюгированные с другими агентами на основе антител (в качестве фрагментов агента-мишени)). В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты представляют собой или содержат реакционные группы. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты представляют собой или содержат реакционные группы так, что могут быть дополнительно включены другие представляющие интерес фрагменты посредством реакций в этих реакционных группах.

[7] Методики по настоящему изобретению могут обеспечивать различные преимущества. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает улучшенную эффективность и/или селективность, сниженные уровни гетерогенности и/или меньшее количество нежелательных трансформаций (например, посредством меньшего количества этапов реакций (в некоторых вариантах осуществления только одного), избегания определенных условий реакций (например, восстановления, окисления, гидролиза и т. д.).

[8] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены агенты, содержащие представляющие интерес фрагменты, конъюгированные в определенных участках фрагментов агента-мишени. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены композиции с повышенной гомогенностью по сравнению с композициями референтной методики (например, методики без использования связывающих мишень фрагментов (например, LG), описанных в предложенных способах).

[9] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены методики, например, методики усиления терапии mAb (MATE™), которые могут обеспечить эффективную сайт-направленную химическую конъюгацию с имеющимися в наличии терапевтическими агентами на основе антител, например различными mAb, и обеспечить разработку различных биспецифических терапевтических агентов. Помимо прочего, методики по настоящему изобретению, например методики MATE, обеспечивают химическое конструирование агентов на основе антител, например, различных существующих антител, без необходимости в создании новых ДНК-векторов или генетического конструирования линий мастер-клеток. В некоторых вариантах осуществления преимущества предложенных методик включают 1) сайт-направленную специфичность конъюгации и/или 2) отсутствие необходимости генетического конструирования по сравнению с некоторыми существующими способами, в которых 1) отсутствует сайт-направленная специфичность конъюгации с неизбирательным связыванием/конъюгацией с доступными аминокислотными остатками и/или 2) необходимо генетическое конструирование для создания конъюгатных тегов. Схемы методики MATE приведены на Фиг. 2 и 3.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[10] Фиг. 1. Диаграммы существующих методик создания конъюгатов антител – лекарственный препарат. А. Конъюгация посредством остатков лизина. В. Конъюгация посредством восстановленных межцепочечных дисульфидных связей. С. Конъюгация посредством сконструированных остатков цистеина.

[11] Фиг. 2. Схема методики MATE. Реакционный партнер, несущий реактивный связывающий мишень фрагмент, реактивная группа, соединенная посредством линкера с MOI, специфически связывается с мишенью (антителом). Реактивная группа присоединена в остатке лизина антитела с высвобождением связывающего мишень фрагмента.

[12] Фиг. 3. Химическая диаграмма реактивного фрагмента-мишени, специфически связывающегося с антителом после реакции его реактивной группы с лизином тяжелой цепи антитела. Реактивный связывающий мишень фрагмент содержит циклический пептидный связывающий мишень фрагмент, фторфенильный реактивный фрагмент, ПЭГ-линкер и пептидный

МОI.

[13] Фиг. 4. Стандартные кривые для анализа остаточной нагрузки (Фиг. 4А) для соед. 1101, анализа остаточного реагента (Фиг. 4В) для соед. 1101 и анализа остаточного uABT (Фиг. 4С).

[14] Фиг. 5. Кривые и площади пиков ВЭЖХ для анализа нагрузки для соед. 1101. Последовательные кривые приведены для нагрузок 10 мкМ (наибольший пик), 5 мкМ, 2 мкМ и 1 мкМ.

[15] Фиг. 6. Кривые и площади пиков ВЭЖХ для анализа остаточного реагента для соед. 1101. Последовательные кривые приведены для нагрузок 10 мкМ (наибольший пик), 5 мкМ, 2 мкМ и 1 мкМ.

[16] Фиг. 7. Кривые ВЭЖХ для анализа uABT. Последовательные кривые приведены для нагрузок 14 мкМ (наибольший пик), 7 мкМ, 3,5 мкМ, 1,75 мкМ и 0,7 мкМ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Определения

[17] Соединения по настоящему изобретению включают описанные в целом в данном документе и дополнительно проиллюстрированы классами, подклассами и видами, описанными в данном документе. В контексте данного документа применимы следующие определения, если не указано иное. В целях данного изобретения химические элементы определены в соответствии с Периодической таблицей элементов, версия CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed. Дополнительно, общие принципы органической химии описаны в "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, и "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001.

[18] В контексте данного документа, если иное не следует из контекста, (i) термин в единственном числе можно понимать как «по меньшей мере один»; (ii) термин «или» можно понимать как означающий «и/или»; (iii) термины «содержащий», «содержать», «включающий» (используемый с «но не ограничивающийся этим» или нет) и «включать» используемый с «но не ограничиваться этим» или нет) можно понимать как охватывающие перечисленные компоненты или этапы, представленные отдельно или вместе с одним или более дополнительными компонентами или этапами; (iv) открытое переходное выражение «содержащий» (и другие открытые переходные выражения, такие как «содержать», «включающий» и «включать») охватывают и включают промежуточные и закрытые выражения «состоящий преимущественно

из» и «состоящий из» и, если из контекста не следует иное, пункт с открытым выражением может быть заменен промежуточным или закрытым переходным выражением, (v) термин «другой» можно понимать как означающий по меньшей мере дополнительные/вторые один или более элементов; (v) термины «около» и «приблизительно» можно понимать как допускающие стандартное отклонение, понятное специалистам в данной области техники; и (vi) там, где приведены диапазоны, включены конечные точки. Если не указано иное, описанные в данном документе соединения, можно получать и/или использовать в форме соли, в частности форме фармацевтически приемлемой соли.

[19] *Агент:* Термин «агент» можно использовать для обозначения соединения или объекта любого химического класса, включая, например, полипептид, нуклеиновую кислоту, сахарид, липид, малую молекулу, металл или их комбинацию или комплекс. В соответствующих обстоятельствах, как будет понятно специалистам в данной области техники из контекста, этот термин можно использовать для обозначения объекта, который представляет собой или содержит клетку или организм, или их фракцию, экстракт или компонент. В альтернативном или дополнительном варианте, как четко следует из контекста, этот термин можно использовать для обозначения природного продукта в том смысле, что он встречается в природе и/или получен из нее. В некоторых случаях, снова как четко следует из контекста, этот термин можно использовать для обозначения одного или более объектов, созданных человеком в том смысле, что они разработаны, сконструированы и/или получены руками человека и/или не встречаются в природе. В некоторых вариантах осуществления агент можно использовать в выделенной или чистой форме; в некоторых вариантах осуществления агент можно использовать в неочищенной форме. В некоторых вариантах осуществления потенциальные агенты могут быть предоставлены в виде коллекций или библиотек, например, по которым можно проводить скрининг, чтобы идентифицировать или охарактеризовать активные агенты среди них. В некоторых случаях термин «агент» может относиться к соединению или объекту, которые представляют собой или содержат полимер; в некоторых случаях этот термин может относиться к соединению или объекту, которые содержат один или более полимерных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления термин «агент» может относиться к соединению или объекту, которые не представляют собой полимер и/или практически не содержат какие-либо полимер и/или один или более конкретных полимерных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления этот термин может относиться к соединению или объекту, в которых отсутствует или которые практически не содержат какой-либо полимерный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой

соединение (например, малую молекулу, белок, нуклеиновую кислоту и т. д.). В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой одно-, двух- или поливалентный фрагмент соединения (например, за счет удаления одного (для одновалентного фрагмента) или более (для двух- или поливалентного фрагмента) атомов водорода и/или других одновалентных групп из соединения).

[20] *Алифатический*: «Алифатический» означает линейную (т. е. неразветвленную) или разветвленную, замещенную или незамещенную углеводородную цепь, которая является полностью насыщенной или которая содержит одно или более звеньев ненасыщенности, или замещенное или незамещенное моноциклическое, бициклическое или полициклическое углеводородное кольцо, которое является полностью насыщенным или которое содержит одно или более звеньев ненасыщенности (но не является ароматическим), или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления алифатические группы содержат 1–50 алифатических атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления алифатические группы содержат 1–20 алифатических атомов углерода. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1–10 алифатических атомов углерода. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1–9 алифатических атомов углерода. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1–8 алифатических атомов углерода. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1–7 алифатических атомов углерода. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1–6 алифатических атомов углерода. В других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1–5 алифатических атомов углерода, а в еще других вариантах осуществления алифатические группы содержат 1, 2, 3 или 4 алифатических атома углерода. Подходящие алифатические группы включают, но не ограничены этим, линейные или разветвленные, замещенные или незамещенные алкильные, алкенильные, алкинильные группы и их гибриды, такие как (циклоалкил)алкил, (циклоалкенил)алкил или (циклоалкил)алкенил.

[21] *Алкенил*: «Алкенил» означает алифатическую группу по определению в данном документе, имеющую одну или более двойных связей.

[22] *Алкил*: «Алкил» имеет свое обычное в данной области техники значение и может включать насыщенные алифатические группы, включая алкильные группы с линейной цепью, алкильные группы с разветвленной цепью, циклоалкильные (алициклические) группы, алкил-замещенные циклоалкильные группы и циклоалкил-замещенные алкильные группы. В некоторых вариантах осуществления алкил имеет 1–100 атомов углерода. В определенных вариантах

осуществления алкил с линейной или разветвленной цепью имеет около 1–20 атомов углерода в остове (например, C₁-C₂₀ для линейных цепей, C₂-C₂₀ для разветвленных цепей) и, в альтернативном варианте, около 1–10. В некоторых вариантах осуществления циклоалкильные кольца имеют около 3–10 атомов углерода в кольцевой структуре, при этом такие кольца являются моноциклическими, бициклическими или полициклическими, и, в альтернативном варианте, около 5, 6 или 7 атомов углерода в кольцевой структуре. В некоторых вариантах осуществления алкильная группа может представлять собой низшую алкильную группу, при этом низшая алкильная группа содержит 1–4 атома углерода (например, C₁-C₄ для низших алкилов с линейной цепью).

[23] *Алкинил*: «Алкинил» представляет собой алифатическую группу по определению в данном документе, имеющую одну или более тройных связей.

[24] *Арил*: «Арил», отдельно или как часть более крупного фрагмента, как в «аралкиле», «аралкокси» или «арилоксиалкиле», относится к моноциклическим, бициклическим или полициклическим кольцевым системам, имеющим в целом от пяти до тридцати кольцевых членов, при этом по меньшей мере одно кольцо в системе является ароматическим. В некоторых вариантах осуществления арильная группа представляет собой моноциклическую, бициклическую или полициклическую кольцевую систему, имеющую в целом от пяти до четырнадцати кольцевых членов, при этом по меньшей мере одно кольцо в системе является ароматическим, и при этом каждое кольцо в системе содержит от 3 до 7 кольцевых членов. В некоторых вариантах осуществления арильная группа представляет собой биарильную группу. Термин «арил» можно взаимозаменяемо использовать с термином «арильное кольцо». В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения «арил» относится к ароматической кольцевой системе, которая включает, но не ограничивается этим, фенил, бифенил, нафтил, бинафтил, антрацил и т. п., которая может нести один или более заместителей. Также в контексте данного документе в объем термина «арил» включена группа, в которой ароматическое кольцо конденсировано с одним или более неароматическими кольцами, такими как инданил, фталимидил, нафтимидил, фенантридинил или тетрагидронафтил и т. п.

[25] *Антитело*: Термин «антитело» относится к полипептиду, который содержит каноническую последовательность элементов иммуноглобулина, достаточную для обеспечения специфического связывания с конкретным антигеном-мишенью. Как известно в данной области техники, интактные антитела, вырабатываемые в естественных условиях, представляют собой приблизительно 150 кДа тетрамерные агенты, состоящие из двух идентичных полипептидов

тяжелой цепи (около 50 кДа каждый) и двух идентичных полипептидов легкой цепи (около 25 кДа каждый), которые связаны друг с другом с образованием того, что обычно называют «Y-образной» структурой. Каждая тяжелая цепь состоит из по меньшей мере четырех доменов (каждый длиной около 110 аминокислот) — аминоконцевого вариабельного (VH) домена (расположенного на концах Y-структуры), за которым следуют три константных домена: CH1, CH2 и карбокси-концевой CH3 (расположенный в основе ствола Y). Короткая область, известная как «переключатель», соединяет вариабельную и константную области тяжелой цепи. «Шарнирная область» соединяет домены CH2 и CH3 с остальной частью антитела. Две дисульфидные связи в этой шарнирной области соединяют два полипептида тяжелой цепи друг с другом в интактном антителе. Каждая легкая цепь состоит из двух доменов: аминоконцевого вариабельного (VL) домена, за которым следует карбокси-концевой константный (CL) домен, отделенных друг от друга другим «переключателем». Интактные тетрамеры антител состоят из двух димеров тяжелой и легкой цепей, в которых тяжелая и легкая цепи связаны друг с другом одинарной дисульфидной связью; две другие дисульфидные связи соединяют шарнирные области тяжелой цепи друг с другом, так что димеры соединены друг с другом с образованием тетрамера. Вырабатываемые в естественных условиях антитела также являются гликозилированными, как правило, в домене CH2. Каждый домен в природном антителе имеет структуру, характеризующуюся «иммуноглобулиновой укладкой», образованной из двух бета-складок (например, 3-, 4- или 5-цепочечных складок), упакованных друг против друга в сжатой антипараллельной бета-бочке. Каждый вариабельный домен содержит три гипервариабельные петли, известные как «определяющие комплементарность области» (CDR1, CDR2 и CDR3), и четыре в некоторой степени инвариантные «каркасные» области (FR1, FR2, FR3 и FR4). При сборке природных антител FR-области образуют бета-складки, которые обеспечивают структурный каркас для доменов, а области петель CDR как тяжелой, так и легкой цепей сближаются в трехмерном пространстве с созданием единого гипервариабельного антигенсвязывающего сайта, расположенного в вершине Y-структуры. Fc-область встречающихся в природе антител связывается с элементами системы комплемента и с рецепторами на эффекторных клетках, включая, например, эффекторные клетки, которые опосредуют цитотоксичность. Как известно в данной области техники, аффинность и/или другие атрибуты связывания Fc-областей с Fc-рецепторами можно модулировать посредством гликозилирования или другой модификации. В некоторых вариантах осуществления антитела, полученные и/или применяемые в соответствии с настоящим изобретением, включают гликозилированные Fc-домены, включая Fc-домены с модифицированным или

сконструированным гликозилированием. В целях настоящего изобретения, в некоторых вариантах осуществления любой полипептид или комплекс полипептидов, который включает достаточное количество последовательностей доменов иммуноглобулина, встречающихся в природных антителах, может называться и/или использоваться как «антитело», независимо от того, получен ли такой полипептид естественным путем (например, сгенерированный организмом в ответ на антиген) или с помощью рекомбинантной инженерии, химического синтеза или другой искусственной системы или методологии. В некоторых вариантах осуществления антитело является поликлональным; в некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет последовательности константной области, характерные для антител мыши, кролика, примата или человека. В некоторых вариантах осуществления элементы последовательности антител являются гуманизированными, приматизированными, химерными и т. д., как известно в данной области техники. Кроме того, термин «антитело», в контексте данного документа, может относиться в соответствующих вариантах осуществления (если не указано иное или не ясно из контекста) к любым из известных в данной области техники или разработанных конструкций или форматов для использования структурных и функциональных особенностей антитела в альтернативном представлении. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело, применяемое в соответствии с настоящим изобретением, находится в формате, выбранном из, без ограничения, интактных антител IgA, IgG, IgE или IgM; би- или мультиспецифических антител (например, Zybodyes[®], дополнительных би- или мультиспецифических антител, описанных в Ulrich Brinkmann & Roland E. Kontermann (2017) The making of bispecific antibodies, mAbs, 9:2, 182-212, doi: 10.1080/19420862.2016.1268307 и т. д.); фрагментов антител, таких как Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fd'-фрагменты, Fd-фрагменты и выделенные CDR или их группы; одноцепочечных FVS; слияний «полипептид-Fc»; однодоменных антител (например, однодоменные антитела акулы, таких как IgNAR или их фрагменты); верблюжьих антител; маскированных антител (например, Probodyes[®]); малых модульных иммунофармацевтических препаратов («SMIPs[™]»); одноцепочечных или tandemных диател (TandAb[®]); VHH; антикалинов[®]; нанотел[®]; минител; BiTE[®]; белков анкириновых повторов или дарпинов (DARPIN[®]); авимеров[®]; DART; TCR-подобных антител; аднектинов[®]; аффилинов[®]; транс-тел[®]; аффител[®]; TrimerX[®]; микропротеинов; финомеров[®]; центриринов[®]; KALBITOR[®]; CovX-тел; и CrossMab. В некоторых вариантах осуществления антитела могут иметь усиленные Fc-домены. В некоторых вариантах осуществления антитела могут содержать один или более не природных аминокислотных

остатков. В некоторых вариантах осуществления в антителе может отсутствовать ковалентная модификация (например, присоединение гликана), которую оно имело бы, если бы было получено естественным образом. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой афукозилированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с другим объектом. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать ковалентную модификацию (например, присоединение гликана, нагрузку [например, выявляемый фрагмент, терапевтический фрагмент, каталитический фрагмент и т. д.] или другую подвешенную группу [например, полиэтиленгликоль и т. д.]).

[26] *Сравнимый:* В контексте данного документа термин «сравнимый» относится к двум или более агентам, объектам, ситуациям, наборам условий и т. д., которые могут не быть идентичными друг другу, но являются достаточно сходными, чтобы можно было провести сравнение между ними, так что специалисту в данной области техники будет понятно, что выводы могут быть обоснованно сделаны на основе наблюдаемых различий или сходств. В некоторых вариантах осуществления сравнимые совокупности условий, обстоятельств, индивидов или популяций характеризуются множеством практически идентичных признаков и одним или небольшим количеством переменных признаков. Специалисты в данной области техники поймут, исходя из контекста, какая степень идентичности необходима в любом заданном случае, чтобы два или более таких агентов, объектов, ситуаций, наборов условий и т. д. считались сравнимыми. Например, специалистам в данной области техники будет понятно, что совокупности обстоятельств, индивидов или популяций являются сравнимыми друг с другом, если они характеризуются достаточным количеством и типом практически идентичных признаков, чтобы обеспечить обоснованное заключение о том, что различия в полученных результатах или явлениях, наблюдаемые в или при разных обстоятельствах, у разных индивидов или в разных популяциях, вызваны или указывают на вариации в тех признаках, которые варьируются.

[27] *Циклоалифатический:* Термины «циклоалифатический», «карбоцикл», «карбоциклил», «карбоциклический радикал» и «карбоциклическое кольцо» используются взаимозаменяемо и относятся к насыщенным или частично ненасыщенным, но неароматическим циклическим алифатическим моноциклическим, бициклическим или полициклическим кольцевым системам, описанным в данном документе, имеющим, если не указано иное, от 3 до 30 кольцевых членов. Циклоалифатические группы включают, без ограничения, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил, циклогептенил, циклооктил, циклооктенил, норборнил, адамантил и циклооктаденил. В

некоторых вариантах осуществления циклоалифатическая группа имеет 3–6 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления циклоалифатическая группа является насыщенной и представляет собой циклоалкил. Термин «циклоалифатический» может также включать алифатические кольца, конденсированные с одним или более ароматическими или неароматическими кольцами, такими как декагидронафтил или тетрагидронафтил. В некоторых вариантах осуществления циклоалифатическая группа является бициклической. В некоторых вариантах осуществления циклоалифатическая группа является трициклической. В некоторых вариантах осуществления циклоалифатическая группа является полициклической. В некоторых вариантах осуществления «циклоалифатический» относится к C_3 - C_6 моноциклическому углеводороду или C_8 - C_{10} бициклическому или полициклическому углеводороду, который является полностью насыщенным или содержит одно или более звеньев ненасыщенности, но который не является ароматическим, который имеет одну точку присоединения к остальной части молекулы, или C_9 - C_{16} полициклический углеводород, который является полностью насыщенным или содержит одно или более звеньев ненасыщенности, но который не является ароматическим, который имеет одну точку присоединения к остальной части молекулы.

[28] *Галогеналкил и галогеналкокси:* Термин «галогеналкил» относится к C_{1-4} линейной или разветвленной алкильной группе, которая замещена одним или более атомами галогена, примерами которой являются трифторметил, дифторметил и дихлорметил. Термин «галогеналкокси» представляет собой галогеналкильную группу, присоединенную к группе, которую она замещает, посредством связи -O-. Примеры включают трифторметокси и дифторметокси.

[29] *Гетероалифатический:* Термин «гетероалифатический» имеет свое обычное значение в данной области техники и относится к алифатическим группам, описанным в данном документе, в которых один или более атомов углерода независимо замещены одним или более гетероатомами (например, кислородом, азотом, серой, кремнием, фосфором и т. п.). В некоторых вариантах осуществления одно или более звеньев, выбранных из C, CH, CH_2 и CH_3 , независимо замещены одним или более гетероатомами (включая их окисленные и/или замещенные формы). В некоторых вариантах осуществления гетероалифатическая группа представляет собой гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления гетероалифатическая группа представляет собой гетероалкенил.

[30] *Гетероалкил:* Термин «гетероалкил» имеет свое обычное значение в данной области техники и относится к алкильным группам, описанным в данном документе, в которых

один или более атомов углерода независимо замещены одним или более гетероатомами (например, кислородом, азотом, серой, кремнием, фосфором и т. п.). Примеры гетероалкильных групп включают, но не ограничиваются этим, алкокси, поли(этиленгликоль)-, алкилзамещенную аминогруппу, тетрагидрофуранил, пиперидинил, морфолинил и т. д.

[31] *Гетероарил*: Термин «гетероарил», используемый отдельно или как часть большего фрагмента, например «гетероаралкил» или «гетероаралкокси», относится к моноциклическим, бициклическим или полициклическим кольцевым системам, имеющим в целом от пяти до тридцати кольцевых членов, при этом по меньшей мере одно кольцо в системе является ароматическим и по меньшей мере один атом ароматического кольца представляет собой гетероатом. В некоторых вариантах осуществления гетероарильная группа представляет собой группу, имеющую от 5 до 10 кольцевых атомов (т. е. моноциклическую, бициклическую или полициклическую), в некоторых вариантах осуществления — 5, 6, 9 или 10 кольцевых атомов. В некоторых вариантах осуществления гетероарильная группа имеет 6, 10 или 14 π-электронов, общих в циклическом упорядочении; и имеет, помимо атомов углерода, от одного до пяти гетероатомов. Гетероарильные группы включают, без ограничения, тиенил, фуранил, пирролил, имидазолил, пирозолил, триазолил, тетразолил, оксазолил, изоксазолил, оксадиазолил, тиазолил, изотиазолил, тиадиазолил, пиридил, пиридазинил, пиримидинил, пиразинил, индолизинил, пуридил, нафтиридинил и птеридинил. В некоторых вариантах осуществления гетероарил представляет собой гетеробиарильную группу, такую как бипиридил и т. п. В контексте данного документа термин «гетероарил» также включает группы, в которых гетероароматическое кольцо конденсировано с одним или более арильными, циклоалифатическими или гетероциклическими кольцами, при этом радикал или точка присоединения находится на гетероароматическом кольце. Неограничивающие примеры включают индолил, изоиндолил, бензотиенил, бензофуранил, дибензофуранил, индазолил, бензимидазолил, бензтиазолил, хинолил, изохинолил, циннолинил, фталазинил, хиназолинил, хиноксалинил, 4Н-хинолизинил, карбазолил, акридинил, феназинил, фенотиазинил, феноксазинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил и пиридо[2,3-*b*]-1,4-оксазин-3(4Н)-он. Гетероарильная группа может быть моноциклической, бициклической или полициклической. Термин «гетероарил» можно взаимозаменяемо использовать с терминами «гетероарильное кольцо», «гетероарильная группа» или «гетероароматическая группа», любой из которых включает кольца, которые являются необязательно замещенными. Термин «гетероаралкил» относится к алкильной группе, замещенной гетероарильной группой, при этом алкильная и гетероарильная части независимо

являются необязательно замещенными.

[32] *Гетероатом:* Термин «гетероатом» означает атом, который не является углеродом или водородом. В некоторых вариантах осуществления гетероатом представляет собой бор, кислород, серу, азот, фосфор или кремний (включая различные формы таких атомов, такие как окисленные формы (например, азота, серы, фосфора или кремния), кватернизованную форму основного азота или замещаемого азота гетероциклического кольца (например, N, как в 3,4-дигидро-2H-пирролиле), NH (как в пирролидиниле) или NR⁺ (как в N-замещенном пирролидиниле) и т. д.). В некоторых вариантах осуществления гетероатом представляет собой кислород, серу или азот.

[33] *Гетероцикл:* Термины «гетероцикл», «гетероциклил», «гетероциклический радикал» и «гетероциклическое кольцо» используются взаимозаменяемо и относятся к моноциклическому, бициклическому или полициклическому кольцевому фрагменту (например, 3–30-членному), который является насыщенным или частично ненасыщенным и имеет один или более кольцевых гетероатомов. В некоторых вариантах осуществления гетероциклическая группа представляет собой стабильный 5–7-членный моноциклический или 7–10-членный бициклический гетероциклический фрагмент, который является либо насыщенным, либо частично ненасыщенным, и содержит, помимо атомов углерода, один или более, предпочтительно от одного до четырех гетероатомов, по определению выше. При использовании в отношении кольцевого атома гетероцикла термин «азот» включает замещенный азот. Например, в насыщенном или частично ненасыщенном кольце, имеющем 0–3 гетероатома, выбранных из кислорода, серы и азота, азот может быть N (как в 3,4-дигидро-2H-пирролиле), NH (как в пирролидиниле), или ⁺NR (как в N-замещенном пирролидиниле). Гетероциклическое кольцо может быть присоединено к подвешенной группе посредством любого гетероатома или атома углерода с образованием стабильной структуры, а любой из атомов в кольце может быть необязательно замещен. Примеры таких насыщенных или частично ненасыщенных гетероциклических радикалов включают, без ограничения, тетрагидрофуранил, тетрагидроотиенил, пирролидинил, пиперидинил, пирролинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, оксазолидинил, пиперазинил, диоксанил, диоксоланил, diazepинил, оксазепинил, тиазепинил, морфолинил и хинуклидинил. В контексте данного документа термины «гетероцикл», «гетероциклил», «гетероциклическое кольцо», «гетероциклическая группа», «гетероциклический фрагмент» и «гетероциклический радикал» используются взаимозаменяемо и также включают группы, в которых гетероциклическое кольцо конденсировано с одним или

более арильными, гетероарильными или циклоалифатическими кольцами, такими как индолинил, 3*H*-индолил, хроманил, фенантридинил или тетрагидрохинолинил. Гетероциклическая группа может быть моноциклической, бициклической или полициклической. Термин «гетероциклическая» относится к алкильной группе, замещенной гетероциклической, при этом алкильная и гетероциклическая части независимо являются необязательно замещенными.

[34] *Необязательно замещенный*: Как описано в данном документе, соединения по изобретению могут содержать необязательно замещенные и/или замещенные фрагменты. В общем случае термин «замещенный», которому предшествует или не предшествует термин «необязательно», означает, что один или более атомов указанного фрагмента замещены подходящим заместителем. Если не указано иное, «необязательно замещенная» группа может иметь подходящий заместитель в каждом замещаемом положении группы, а когда существует возможность замещения более одного положения в любой заданной структуре более чем одним заместителем, выбранным из указанной группы, заместители могут быть одинаковыми или разными в каждом положении. В некоторых вариантах осуществления необязательно замещенная группа является незамещенной. Комбинации заместителей, предусмотренных в этом изобретении, предпочтительно представляют собой соединения, которые приводят к образованию стабильных или химически возможных соединений. В контексте данного документа термин «стабильный» относится к соединениям, которые по существу не меняются при воздействии условий, обеспечивающих их получение, выявление и, в определенных вариантах осуществления, их выделение, очистку и применение в одной или более целях, описанных в данном документе. Определенные заместители описаны ниже.

[35] Подходящие одновалентные заместители на замещаемом атоме, например, подходящем атоме углерода, независимо представляют собой галоген; $-(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OR^\circ$; $-O(CH_2)_{0-4}R^\circ$, $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}CH(OR^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}Ph$, который может быть замещен R° ; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$, который может быть замещен R° ; $-CH=CHPh$, который может быть замещен R° ; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$ -пиридил, который может быть замещен R° ; $-NO_2$; $-CN$; $-N_3$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)C(S)NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^\circ$; $-C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^\circ_3$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^\circ$; $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR^\circ$, $-SC(S)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR^\circ_2$; $-C(S)NR^\circ_2$; $-C(S)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^\circ_2$; $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(O)C(O)R^\circ$; $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$; $-C(NOR^\circ)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SSR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^\circ$; $-S(O)_2NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)S(O)_2NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$; $-N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(NH)NR^\circ_2$; $-$

$\text{Si}(\text{R}^\circ)_3$; $-\text{OSi}(\text{R}^\circ)_3$; $-\text{B}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{OB}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{OB}(\text{OR}^\circ)_2$; $-\text{P}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{P}(\text{OR}^\circ)_2$; $-\text{P}(\text{R}^\circ)(\text{OR}^\circ)$; $-\text{OP}(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{OP}(\text{OR}^\circ)_2$; $-\text{OP}(\text{R}^\circ)(\text{OR}^\circ)$; $-\text{P}(\text{O})(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^\circ)_2$; $-\text{OP}(\text{O})(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^\circ)_2$; $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^\circ)(\text{SR}^\circ)$; $-\text{SP}(\text{O})(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{SP}(\text{O})(\text{OR}^\circ)_2$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{P}(\text{O})(\text{R}^\circ)_2$; $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{P}(\text{O})(\text{OR}^\circ)_2$; $-\text{P}(\text{R}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{P}(\text{OR}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{OP}(\text{R}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-\text{OP}(\text{OR}^\circ)_2[\text{B}(\text{R}^\circ)_3]$; $-(\text{C}_{1-4} \text{ линейный или разветвленный алкилен})\text{O}-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$; или $-(\text{C}_{1-4} \text{ линейный или разветвленный алкилен})\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$, где каждый R° может быть замещен, как определено в данном документе, и независимо представляет собой водород, C_{1-20} алифатическую группу, C_{1-20} гетероалифатическую группу, содержащую 1–5 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, серы, кремния и фосфора, $-\text{CH}_2-(\text{C}_{6-14} \text{ арил})$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}(\text{C}_{6-14} \text{ арил})$, $-\text{CH}_2-(5-14\text{-членное гетероарильное кольцо})$, $5-20\text{-членное, моноциклическое, бициклическое или полициклическое, насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, имеющее 0–5 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, серы, кремния и фосфора, или, несмотря на приведенное выше определение, два независимых случая } \text{R}^\circ \text{ вместе с промежуточным(и) атомом(ами) образуют } 5-20\text{-членное, моноциклическое, бициклическое или полициклическое, насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, содержащее 0–5 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, серы, кремния и фосфора, которые могут быть замещены, как определено ниже.}$

[36] Подходящие одновалентные заместители на R° (или кольцо, образованном двумя независимыми случаями R° вместе с их промежуточными атомами) независимо представляют собой галоген, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{R}^\bullet$, $-(\text{галоген}-\text{R}^\bullet)$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{OR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{CH}(\text{OR}^\bullet)_2$; $-\text{O}(\text{галоген}-\text{R}^\bullet)$, $-\text{CN}$, $-\text{N}_3$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{R}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{SR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{SH}$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NHR}^\bullet$, $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NR}^\bullet_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SiR}^\bullet_3$, $-\text{OSiR}^\bullet_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{SR}^\bullet$, $-(\text{C}_{1-4} \text{ линейный или разветвленный алкилен})\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$ или $-\text{SSR}^\bullet$, где каждый R^\bullet является незамещенным или, в случае, если ему предшествует «галоген», замещенным только одним или более галогенами, и независимо выбран из C_{1-4} алифатического фрагмента, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ или $5-6\text{-членного насыщенного, частично ненасыщенного или арильного кольца, имеющего 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы.}$ Подходящие двухвалентные заместители на насыщенном атоме углерода R° включают $=\text{O}$ и $=\text{S}$.

[37] Подходящими двухвалентными заместителями, например, на пригодном атоме углерода, независимо являются следующие: $=\text{O}$, $=\text{S}$, $=\text{NNR}^*_2$, $=\text{NNHC}(\text{O})\text{R}^*$, $=\text{NNHC}(\text{O})\text{OR}^*$, $=\text{NNHS}(\text{O})_2\text{R}^*$, $=\text{NR}^*$, $=\text{NOR}^*$, $-\text{O}(\text{C}(\text{R}^*_2))_{2-3}\text{O}-$ или $-\text{S}(\text{C}(\text{R}^*_2))_{2-3}\text{S}-$, где каждый независимый случай R^* выбран из водорода, C_{1-6} алифатического фрагмента, который может быть замещен в соответствии с определением ниже, и незамещенного $5-6\text{-членного насыщенного, частично}$

ненасыщенного или арильного кольца, имеющего 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы. Подходящие двухвалентные заместители, которые связаны с вицинальными замещаемыми атомами углерода «необязательно замещенной» группы включают: $-\text{O}(\text{CR}^*)_{2-3}\text{O}-$, где каждый независимый случай R^* выбран из водорода, C_{1-6} алифатического фрагмента, который может быть замещен в соответствии с определением ниже, и незамещенного 5–6-членного насыщенного, частично ненасыщенного и арильного кольца, имеющего 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

[38] Подходящие заместители на алифатической группе R^* независимо представляют собой галоген, $-\text{R}^\bullet$, $-(\text{галоген}-\text{R}^\bullet)$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^\bullet$, $-\text{O}(\text{галоген}-\text{R}^\bullet)$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^\bullet$, $-\text{NR}^\bullet_2$ или $-\text{NO}_2$, где каждый R^\bullet является незамещенным или, в случае, если ему предшествует «галоген», замещенным только одним или более галогенами, и независимо выбран из C_{1-4} алифатического фрагмента, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ или 5–6-членного насыщенного, частично ненасыщенного или арильного кольца, имеющего 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

[39] В некоторых вариантах осуществления подходящие заместители на замещаемом атоме азота «необязательно замещенной» группы включают $-\text{R}^\dagger$, $-\text{NR}^\dagger_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^\dagger$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\dagger$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^\dagger$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^\dagger$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\dagger$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^\dagger_2$, $-\text{C}(\text{S})\text{NR}^\dagger_2$, $-\text{C}(\text{NH})\text{NR}^\dagger_2$ или $-\text{N}(\text{R}^\dagger)\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\dagger$; где каждый R^\dagger независимо представляет собой водород, C_{1-6} алифатический фрагмент, который может быть замещен в соответствии с определением ниже, незамещенный $-\text{OPh}$ или незамещенное 5–6-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное кольцо, имеющее 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, или, как исключение из вышеприведенного определения, два независимых случая R^\dagger вместе со своим(и) промежуточным(и) атомом(ами) образуют 3–12-членное насыщенное, частично ненасыщенное или арильное моно- или бициклическое кольцо, имеющее 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

[40] Подходящие заместители на алифатической группе R^\dagger независимо представляют собой галоген, $-\text{R}^\bullet$, $-(\text{галоген}-\text{R}^\bullet)$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^\bullet$, $-\text{O}(\text{галоген}-\text{R}^\bullet)$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\bullet$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}^\bullet$, $-\text{NR}^\bullet_2$ или $-\text{NO}_2$, где каждый R^\bullet является незамещенным или, в случае, если ему предшествует «галоген», замещенным только одним или более галогенами, и независимо выбран из C_{1-4} алифатического фрагмента, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ или 5–6-членного насыщенного, частично ненасыщенного или арильного кольца, имеющего 0–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы.

[41] *Частично ненасыщенный:* В контексте данного документа термин «частично ненасыщенный» относится к кольцевому фрагменту, который содержит по меньшей мере одну двойную или тройную связь. Термин «частично ненасыщенный» подразумевает включение колец, имеющих множество участков ненасыщенности, но не подразумевает включение арильных или гетероарильных фрагментов, определенных в данном документе.

[42] *Фармацевтическая композиция:* В контексте данного документа термин «фармацевтическая композиция» относится к активному агенту, составленному вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления активный агент присутствует в количестве единичной дозы, подходящем для введения по терапевтической схеме, которая демонстрирует статистически значимую вероятность достижения заданного терапевтического эффекта при введении релевантной популяции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут быть специально составлены для введения в твердой или жидкой форме, включая те, которые адаптированы для следующего: перорального введения, например, жидкие лекарственные формы для перорального введения (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например, предназначенные для трансбуккального, сублингвального и системного всасывания, болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; парентерального введения, например, путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции в форме, например, стерильного раствора или суспензии, или состава с замедленным высвобождением; местного нанесения, например, в форме крема, мази, пластыря или спрея с контролируемым высвобождением, наносимых на кожу, вводимых в легкие или в полость рта; интравагинального или интаректального введения, например, в форме пессария, крема или пены; сублингвального применения; глазного; трансдермального; или введения через нос, легкие и другие слизистые поверхности.

[43] *Фармацевтически приемлемый:* В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый» относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или дозированным формам, которые с медицинской точки зрения являются подходящими для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерных токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, в соответствии с разумным соотношением «польза/риск».

[44] *Фармацевтически приемлемый носитель:* В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый материал,

композицию или среду, например, жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент или растворитель, инкапсулирующий материал, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения от одного органа или части тела к другому органу или части тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами препарата и не причинять вреда пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; эксципиенты, такие как масло какао и воски для суппозитория; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; pH-забуферные растворы; сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; и другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

[45] *Фармацевтически приемлемая соль*: В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к солям таких соединений, которые подходят для применения в фармацевтическом контексте, т. е. соли, которые в рамках рационального медицинского суждения подходят для применения в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерных токсичности, раздражения, аллергического ответа и т. п. и соответствуют разумному соотношению «польза/риск». Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, перечень фармацевтически приемлемых солей можно найти в G. Steffen Paulekuhn, *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 6665 и *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*, P. Heinrich Stahl and Camille G. Wermuth Editors, Wiley-VCH, 2002.

[46] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются этим, соли присоединения нетоксичных кислот, представляющих собой соли аминогруппы, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, малеиновая

кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или образованные с помощью других способов, применяемых в данной области техники, таких как ионный обмен. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются этим, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, fumarat, глюкогоптонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталенсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, p-толуолсульфонат, ундеканоат, валерат и т. д. В некоторых вариантах осуществления предложенное соединение содержит одну или более кислотных групп, а фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль щелочного, щелочноземельного металла или аммония (например, аммониевую соль $N(R)_3$, при этом каждый R независимо определен и описан в данном документе). Типовые соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и т. п. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой калиевую соль. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой кальциевую соль. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли включают, в соответствующих случаях, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и аминов, образуемые с участием противоионов, такие как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, алкил с 1–6 атомами углерода, сульфонат и арилсульфонат. В некоторых вариантах осуществления предложенное соединение содержит более одной кислотной группы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль, или в общем случае соль, такого соединения содержит два или более катионов, которые могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления в фармацевтически приемлемой соли (или в общем случае соли) весь ионизируемый водород (например, в водном растворе с рКа не более чем около 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2; в некоторых вариантах осуществления не более чем около 7; в некоторых вариантах осуществления не более чем около 6; в некоторых вариантах осуществления не более чем около 5; в некоторых вариантах осуществления не более чем около 4; в некоторых вариантах осуществления не более чем около 3) в кислотных группах замещен

катионами.

[47] *Защитная группа:* Термин «защитная группа» хорошо известный в данной области техники и включает группы, подробно описанные в *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999, в полном объеме включенной в данный документ посредством ссылки. Также включены защитные группы, специально адаптированные для химии нуклеозидов и нуклеотидов, описанные в *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, edited by Serge L. Beaucage *et al.* 06/2012, глава 2 которой в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Подходящие аминозащитные группы включают метилкарбамат, этилкарбамат, 9-флуоренилметилкарбамат (Fmoc), 9-(2-сульфо)флуоренилметилкарбамат, 9-(2,7-дибром)флуоренилметилкарбамат, 2,7-ди-*m*-бутил-[9-(10,10-диоксо-10,10,10-тетрагидротиоксантил)]метилкарбамат (DBD-Tmoc), 4-метоксифенацил карбамат (Phenoc), 2,2,2-трихлорэтилкарбамат (Troc), 2-триметилсилилэтилкарбамат (Teoc), 2-фенилэтилкарбамат (hZ), 1-(1-адамантил)-1-метилэтилкарбамат (Adroc), 1,1-диметил-2-галогенэтилкарбамат, 1,1-диметил-2,2-дибромэтилкарбамат (DB-*m*-BOC), 1,1-диметил-2,2,2-трихлорэтилкарбамат (TCBOC), 1-метил-1-(4-бифенилил)этилкарбамат (Broc), 1-(3,5-ди-*m*-бутилфенил)-1-метилэтилкарбамат (*m*-Bumeoc), 2-(2'- и 4'-пиридил)этилкарбамат (Pycoc), 2-(*N,N*-дициклогексилкарбоксамидо)этилкарбамат, *m*-бутилкарбамат (BOC), 1-адамантилкарбамат (Adoc), винилкарбамат (Voc), аллилкарбамат (Alloc), 1-изопропилаллилкарбамат (Ipaoc), циннамилкарбамат (Coc), 4-нитроциннамилкарбамат (Noc), 8-хинолилкарбамат, *N*-гидроксипиперидинилкарбамат, алкилдитиокарбамат, бензилкарбамат (Cbz), *p*-метоксибензилкарбамат (Moz), *p*-нитробензилкарбамат, *p*-бромбензилкарбамат, *p*-хлорбензилкарбамат, 2,4-дихлорбензилкарбамат, 4-метилсульфинилбензилкарбамат (MsZ), 9-антриметилкарбамат, дифенилметилкарбамат, 2-метилтиоэтилкарбамат, 2-метилсульфонилэтилкарбамат, 2-(*p*-толуолсульфонил)этилкарбамат, [2-(1,3-дителил)]метилкарбамат (Dmoc), 4-метилтиофенилкарбамат (Mtpc), 2,4-диметилтиофенилкарбамат (Bmpc), 2-фосфониоэтилкарбамат (Pcoc), 2-трифенилфосфониоизопропилкарбамат (Ppoc), 1,1-диметил-2-цианоэтилкарбамат, *m*-хлор-*p*-ацилксибензилкарбамат, *p*-(дигидроксиборил)бензилкарбамат, 5-бензизоксазолметилкарбамат, 2-(трифторметил)-6-хромонилметилкарбамат (Tcroc), *m*-нитрофенил карбамат, 3,5-диметоксибензилкарбамат, *o*-нитробензилкарбамат, 3,4-диметокси-6-нитробензилкарбамат, фенил(*o*-нитрофенил)метилкарбамат, производное фенотиазинил-(10)-

карбонила, производное *N'*-*p*-толуолсульфонаминокрбонила, производное *N'*-фениламинотиокрбонила, *m*-амилкарбамат, *S*-бензилтиокрбамат, *p*-цианобензилкарбамат, циклобутилкарбамат, циклогексилкарбамат, циклопентилкарбамат, циклопропилметилкарбамат, *p*-дециклоксибензилкарбамат, 2,2-диметоксикарбонилвинилкарбамат, *o*-(*N,N*-диметилкарбоксамидо)бензилкарбамат, 1,1-диметил-3-(*N,N*-диметилкарбоксамидо)пропилкарбамат, 1,1-диметилпропинилкарбамат, ди(2-пиридил)метилкарбамат, 2-фуранилметилкарбамат, 2-йодэтилкарбамат, изоборинилкарбамат, изобутилкарбамат, изоникотинилкарбамат, *p*-(*p'*-метоксифенилазо)бензилкарбамат, 1-метилциклобутилкарбамат, 1-метилциклогексилкарбамат, 1-метил-1-циклопропилметилкарбамат, 1-метил-1-(3,5-диметоксифенил)этилкарбамат, 1-метил-1-(*p*-фенилазофенил)этилкарбамат, 1-метил-1-фенилэтилкарбамат, 1-метил-1-(4-пиридил)этилкарбамат, фенилкарбамат, *p*-(фенилазо)бензилкарбамат, 2,4,6-три-*m*-бутилфенилкарбамат, 4-(триметиламмоний)бензилкарбамат, 2,4,6-триметилбензилкарбамат, формаамид, ацетаамид, хлорацетаамид, трихлорацетаамид, трифторацетаамид, фенилацетаамид, 3-фенилпропанаамид, пиколинаамид, 3-пиридилкарбоксамид, производное *N*-бензоилфенилаланила, бензаамид, *p*-фенилбензаамид, *o*-нитрофенилацетаамид, *o*-нитрофеноксиацетаамид, ацетоацетаамид, (*N'*-дитиобензилоксикарбониламино)ацетаамид, 3-(*p*-гидроксифенил)пропанаамид, 3-(*o*-нитрофенил)пропанаамид, 2-метил-2-(*o*-нитрофенокси)пропанаамид, 2-метил-2-(*o*-фенилазофенокси)пропанаамид, 4-хлорбутанаамид, 3-метил-3-нитробутанаамид, *o*-нитроциннаамид, производное *N*-ацетилметионина, *o*-нитробензаамид, *o*-(бензоилоксиметил)бензаамид, 4,5-дифенил-3-оксазолин-2-он, *N*-фталимид, *N*-дитиасукцинимид (Dts), *N*-2,3-дифенилмалеимид, *N*-2,5-диметилпиррол, *N*-1,1,4,4-тетраметилдисирилазациклопентановый аддукт (STABASE), 5-замещенный 1,3-диметил-1,3,5-триазациклогексан-2-он, 5-замещенный 1,3-добензил-1,3,5-триазациклогексан-2-он, 1-замещенный 3,5-динитро-4-пиридон, *N*-метиламин, *N*-аллиламин, *N*-[2-(триметилсилил)этокси]метиламин (SEM), *N*-3-ацетоксипропиламин, *N*-(1-изопропил-4-нитро-2-оксо-3-пироолин-3-ил)амин, четвертичные соли аммония, *N*-бензиламин, *N*-ди(4-метоксифенил)метиламин, *N*-5-добензосубериламин, *N*-трифенилметиламин (Tr), *N*-[(4-метоксифенил)дифенилметил]амин (MMTr), *N*-9-фенилфлуорениламин (PhF), *N*-2,7-дихлор-9-флуоренилметиленамин, *N*-ферроценилметиламино (Fcm), *N*-2-пиколиламино *N'*-оксид, *N*-1,1-диметилтиометиленамин, *N*-бензилиденамин, *N*-*p*-метоксибензилиденамин, *N*-дифенилметиленамин, *N*-[(2-пиридил)мезитил]метиленамин, *N*-(*N'*,*N'*-

диметиламинометил)амин, *N,N'*-изопропилидендиамин, *N-p*-нитробензилиденамин, *N*-салицилиденамин, *N*-5-хлорсалицилиденамин, *N*-(5-хлор-2-гидроксифенил)фенилметиленамин, *N*-циклогексиденамин, *N*-(5,5-диметил-3-оксо-1-циклогексенил)амин, производное *N*-борана, производное *N*-дифенилбориновой кислоты, *N*-[фенил(пентакарбонилхром- или вольфрам)карбонил]амин, *N*-хелат меди, *N*-хелат цинка, *N*-нитроамин, *N*-нитрозоамин, амина *N*-оксид, дифенилфосфинамид (Dpp), диметилтиофосфинамид (Mpt), дифенилтиофосфинамид (Ppt), диалкилфосфорамидаты, дибензилфосфорамидат, дифенилфосфорамидат, бензолсульфенамид, *o*-нитробензолсульфенамид (Nps), 2,4-динитробензолсульфенамид, пентахлорбензолсульфенамид, 2-нитро-4-метоксибензолсульфенамид, трифенилметилсульфенамид, 3-нитропиридинсульфенамид (Npys), *p*-толуолсульфонамид (Ts), бензолсульфонамид, 2,3,6-триметил-4-метоксибензолсульфенамид (Mtr), 2,4,6-триметоксибензолсульфенамид (Mtb), 2,6-диметил-4-метоксибензолсульфенамид (Pme), 2,3,5,6-тетраметил-4-метоксибензолсульфенамид (Mte), 4-метоксибензолсульфенамид (Mbs), 2,4,6-триметилбензолсульфенамид (Mts), 2,6-диметокси-4-метилбензолсульфенамид (iMds), 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонамид (Pmc), метансульфонамид (Ms), β -триметилсилилэтансульфонамид (SES), 9-антраценсульфонамид, 4-(4',8'-диметоксинафтилметил)бензолсульфонамид (DNMBS), бензилсульфонамид, трифторметилсульфонамид и фенацилсульфонамид.

[48] Подходящие защищенные карбоновые кислоты дополнительно включают, но не ограничиваются этим, силил-, алкил-, алкенил-, арил- и арилалкил-защищенные карбоновые кислоты. Примеры подходящих силильных групп включают триметилсилил, триэтилсилил, *t*-бутилдиметилсилил, *t*-бутилдифенилсилил, триизопропилсилил и т. п. Примеры подходящих алкильных групп включают метил, бензил, *p*-метоксибензил, 3,4-диметоксибензил, тритил, *t*-бутил, тетрагидропиран-2-ил. Примеры подходящих алкенильных групп включают аллил. Примеры подходящих арильных групп включают необязательно замещенный фенил, бифенил или нафтил. Примеры подходящих арилалкильных групп включают необязательно замещенный бензил (например, *p*-метоксибензил (MPM), 3,4-диметоксибензил, *O*-нитробензил, *p*-нитробензил, *p*-галогенбензил, 2,6-дихлорбензил, *p*-цианобензил) и 2- и 4-пиколил.

[49] Подходящие гидроксильные защитные группы включают метил, метоксиметил (MOM), метилтиометил (MTM), *m*-бутилтиометил, (фенилдиметилсилил)метоксиметил (SMOM), бензилоксиметил (BOM), *p*-метоксибензилоксиметил (PMBM), (4-метоксифенокси)метил (*p*-

АОМ), гваяколметил (GUM), *m*-бутоксиметил, 4-пентенилоксиметил (POM), силоксиметил, 2-метоксиэтоксиметил (MEM), 2,2,2-трихлорэтоксиметил, бис(2-хлорэтокси)метил, 2-(триметилсилил)этоксиметил (SEMOR), тетрагидропиранил (THP), 3-бромтетрагидропиратинил, тетрагидропиранил, 1-метоксициклогексил, 4-метокситетрагидропиранил (MTHP), 4-метокситетрагидротиопиранил, 4-метокситетрагидротиопиранила S,S-диоксид, 1-[(2-хлор-4-метил)фенил]-4-метоксиперидин-4-ил (CTMP), 1,4-диоксан-2-ил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиофуранил, 2,3,3а, 4,5,6,7,7а-октагидро-7,8,8-триметил-4,7-метанобензофуран-2-ил, 1-этоксиил, 1-(2-хлорэтокси)этил, 1-метил-1-метоксиэтил, 1-метил-1-бензилоксиэтил, 1-метил-1-бензилокси-2-фторэтил, 2,2,2-трихлорэтил, 2-триметилсилилэтил, 2-(фенилселенил)этил, *m*-бутил, аллил, *p*-хлорфенил, *p*-метоксифенил, 2,4-динитрофенил, бензил, *p*-метоксибензил, 3,4-диметоксибензил, *o*-нитробензил, *p*-нитробензил, *p*-галогенбензил, 2,6-дихлорбензил, *p*-цианобензил, *p*-фенилбензил, 2-пиколил, 4-пиколил, 3-метил-2-пиколил *N*-оксидо, дифенилметил, *p,p'*-динитробензгидрил, 5-дибензосуберил, трифенилметил, α -нафтилдифенилметил, *p*-метоксифенилдифенилметил, ди(*p*-метоксифенил)фенилметил, три(*p*-метоксифенил)метил, 4-(4'-бромфенацилоксифенил)дифенилметил, 4,4',4''-трис(4,5-дихлорфталимидофенил)метил, 4,4',4''-трис(левулиноилоксифенил)метил, 4,4',4''-трис(бензоилоксифенил)метил, 3-(имидазол-1-ил)бис(4',4''-диметоксифенил)метил, 1,1-бис(4-метоксифенил)-1'-пиренилметил, 9-антрил, 9-(9-фенил)ксантенил, 9-(9-фенил-10-оксо)антрил, 1,3-бензодитиолан-2-ил, бензизотиазолил S,S-диоксидо, триметилсилил (TMS), триэтилсилил (TES), триизопропилсилил (TIPS), диметилизопропилсилил (IPDMS), диэтилизопропилсилил (DEIPS), диметилтрексилсилил, *m*-бутилдиметилсилил (TBDMS), *m*-бутилдифенилсилил (TBDPS), трибензилсилил, три-*p*-ксилилсилил, трифенилсилил, дифенилметилсилил (DPMS), *t*-бутилметоксифенилсилил (TBMPS), формиат, бензоилформиат, ацетат, хлорацетат, дихлорацетат, трихлорацетат, трифторацетат, метоксияцетат, трифенилметоксияцетат, феноксияцетат, *p*-хлорфеноксияцетат, 3-фенилпропионат, 4-оксопентаноат (левулинат), 4,4-(этилендитио)пентаноат (левулиноилдитиоацеталь), пивалоат, адамантоат, кротонат, 4-метоксикротонат, бензоат, *p*-фенилбензоат, 2,4,6-триметилбензоат (мезитоат), алкилметилкарбонат, 9-флуоренилметилкарбонат (Fmoc), алкилэтилкарбонат, алкил 2,2,2-трихлорэтилкарбонат (Troc), 2-(триметилсилил)этилкарбонат (TMSEC), 2-(фенилсульфонил)этилкарбонат (Psec), 2-(трифенилфосфонат)этилкарбонат (Peoc), алкилизобутилкарбонат, алкилвинилкарбонат, алкилаллилкарбонат, алкил *p*-нитрофенилкарбонат, алкилбензилкарбонат, алкил *p*-метоксибензилкарбонат, алкил 3,4-

диметоксибензил карбонат, алкил *o*-нитробензилкарбонат, алкил *p*-нитробензилкарбонат, алкил *S*-бензилтиокарбонат, 4-этокси-1-нафтилкарбонат, метил-дитиокарбонат, 2-иодбензоат, 4-азидобутират, 4-нитро-4-метилпентаноат, *o*-(дибромметил)бензоат, 2-формилбензолсульфонат, 2-(метилтиометокси)этил, 4-(метилтиометокси)бутират, 2-(метилтиометоксиметил)бензоат, 2,6-дихлор-4-метилфеноксиацетат, 2,6-дихлор-4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)феноксиацетат, 2,4-бис(1,1-диметилпропил)феноксиацетат, хлордифенилацетат, изобутират, моносукциноат, (*E*)-2-метил-2-бутеноат, *o*-(метоксикарбонил)бензоат, α -нафтоат, нитрат, алкил *N,N,N',N'*-тетраметилфосфородиамидат, алкил *N*-фенилкарбамат, борат, диметилфосфинотиоил, алкил-2,4-динитрофенилсульфенат, сульфат, метансульфонат (мезилат), бензилсульфонат и тозилат (Ts). Для защиты 1,2- или 1,3-диолюв защитные группы включают метиленацеталь, этилиденацеталь, 1-*m*-бутилэтилиденкеталь, 1-фенилэтилиденкеталь, (4-метоксифенил)этилиденацеталь, 2,2,2-трихлорэтилиденацеталь, ацетонид, циклопентилиденкеталь, циклогексилиденкеталь, циклогептилиденкеталь, бензилиденацеталь, *p*-метоксибензилиденацеталь, 2,4-диметоксибензилиденкеталь, 3,4-диметоксибензилиденацеталь, 2-нитробензилиденацеталь, метоксиметиленацеталь, этоксиметиленацеталь, диметоксиметиленовый ортоэфир, 1-метоксиэтилиденный ортоэфир, 1-этоксиэтилидиновый ортоэфир, 1,2-диметоксиэтилиденный ортоэфир, α -метоксибензилиденный ортоэфир, производное 1-(*N,N*-диметиламино)этилидена, производное α -(*N,N'*-диметиламино)бензилидена, 2-оацетилидениденный ортоэфир, ди-*m*-бутилсилиленовую группу (DTBS), производное 1,3-(1,1,3,3-тетраизопропилдисилилоксанилидена) (TIPDS), производное тетра-*m*-бутоксидисилоксан-1,3-дилидена (TBDS), циклические карбонаты, циклические боронаты, этилборонат и фенилборонат.

[50] В некоторых вариантах осуществления гидроксильная защитная группа представляет собой ацетил, *t*-бутил, *t*-бутоксиметил, метоксиметил, тетрагидропиранил, 1-этоксиэтил, 1-(2-хлорэтокси)этил, 2-триметилсилилэтил, *p*-хлорфенил, 2,4-динитрофенил, бензил, бензоил, *p*-фенилбензоил, 2,6-дихлорбензил, дифенилметил, *p*-нитробензил, трифенилметил (тритил), 4,4'-диметокситритил, триметилсилил, триэтилсилил, *t*-бутилдиметилсилил, *t*-бутилдифенилсилил, трифенилсилил, триизопропилсилил, бензоилформиат, хлорацетил, трихлорацетил, трифторацетил, пивалоил, 9-флуоренилметилкарбонат, мезилат, тозилат, трифлат, тритил, монометокситритил (MMTr), 4,4'-диметокситритил, (DMTr) и 4,4',4''-триметокситритил (TMTTr), 2-цианоэтил (CE или Cne), 2-(триметилсилил)этил (TSE), 2-(2-нитрофенил)этил, 2-(4-цианофенил)этил 2-(4-нитрофенил)этил (NPE), 2-(4-нитрофенилсульфонил)этил, 3,5-дихлорфенил, 2,4-диметилфенил, 2-нитрофенил, 4-нитрофенил, 2,4,6-триметилфенил, 2-(2-нитрофенил)этил,

бутилтиокарбонил, 4,4',4''-трис(бензоилокси)тритил, дифенилкарбамоил, левулинил, 2-(дибромметил)бензоил (фенилксантен-9-ил (пиксил) или 9-(п-метоксифенил)ксантин-9-ил (МОХ)). В некоторых вариантах осуществления каждая из гидроксильных защитных групп независимо выбрана из ацетила, бензила, т-бутилдиметилсилила, т-бутилдифенилсилила и 4,4'-диметокситритила. В некоторых вариантах осуществления гидроксильная защитная группа выбрана из группы, состоящей из тритильной, монометокситритильной и 4,4'-диметокситритильной групп. В некоторых вариантах осуществления защитная группа фосфорной связи представляет собой группу, присоединенную к фосфорной связи (например, межнуклеотидной связи) в ходе всего синтеза олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления защитная группа присоединена к атому серы фосфоротиоатной группы. В некоторых вариантах осуществления защитная группа присоединена к атому кислорода межнуклеотидной фосфоротиоатной связи. В некоторых вариантах осуществления защитная группа присоединена к атому кислорода межнуклеотидной фосфатной связи. В некоторых вариантах осуществления защитная группа представляет собой 2-цианоэтил (CE или Cne), 2-триметилсилилэтил, 2-нитроэтил, 2-сульфонилэтил, метил, бензил, о-нитробензил, 2-(р-нитрофенил)этил (NPE или Npe), 2-фенилэтил, 3-(N-трет-бутилкарбоксамидо)-1-пропил, 4-оксопентил, 4-метилтио-1-бутил, 2-циано-1,1-диметилэтил, 4-N-метиламинобутил, 3-(2-пиридил)-1-пропил, 2-[N-метил-N-(2-пиридил)]аминоэтил, 2-(N-формил,N-метил)аминоэтил или 4-[N-метил-N-(2,2,2-трифторацетил)амино]бутил.

[51] *Субъект:* В контексте данного документа термин «субъект» относится к любому организму, которому вводят соединение или композицию в соответствии с настоящим изобретением, например, в экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целях. Типичные субъекты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, отличные от человека приматы и люди; насекомые; черви и т. д.) и растения. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект может иметь заболевание, нарушение и/или патологическое состояние и/или быть предрасположенным к ним.

[52] *Практически:* В контексте данного документа термин «практически» относится к качественному условию наличия полной или почти полной степени представляющих интерес характеристики или свойства. Специалисту в данной области техники будет понятно, что биологические и химические явления редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или переходят к завершению или обеспечивают абсолютный результат или его избежание.

Таким образом, термин «практически» используется в данном документе для обозначения потенциального отсутствия завершенности, присущего многим биологическим и/или химическим явлениям.

[53] *Терапевтический агент:* Термин «терапевтический агент» в общем случае относится к любому агенту, который вызывает необходимый эффект (например, необходимый биологический, клинический или фармакологический эффект) при введении субъекту. В некоторых вариантах осуществления агент считается терапевтическим агентом, если он демонстрирует статистически значимый эффект в соответствующей популяции. В некоторых вариантах осуществления соответствующая популяция представляет собой популяцию субъектов, имеющих заболевание, нарушение и/или патологическое состояние и/или предрасположенных к ним. В некоторых вариантах осуществления соответствующая популяция представляет собой популяцию модельных организмов. В некоторых вариантах осуществления соответствующая популяция может быть определена по одному или более критериям, таким как возрастная группа, пол, генетический фон, уже существующие патологические состояния, предшествующее прохождение терапии. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой вещество, которое облегчает, смягчает, ослабляет, ингибирует, предотвращает, замедляет появление, уменьшает тяжесть и/или снижает частоту возникновения одного или более симптомов или признаков заболевания, нарушения и/или патологического состояния у субъекта при введении указанному субъекту в эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления «терапевтический агент» представляет собой агент, который был одобрен или должен быть одобрен государственным органом, прежде чем он может быть выведен на рынок для применения людьми. В некоторых вариантах осуществления «терапевтический агент» представляет собой агент, для введения которого людям необходимо предписание врача. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой соединение, описанное в данном документе.

[54] *Терапевтически эффективное количество:* Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество вещества (например, терапевтического агента, композиции и/или состава), которое вызывает необходимый биологический ответ при введении в рамках терапевтической схемы. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество вещества представляет собой количество, которое является достаточным при введении субъекту, имеющему заболевание, нарушение и/или патологическое состояние или подверженному им, для лечения, диагностики, предотвращения и/или замедления проявления

заболевания, нарушения и/или патологического состояния. Как будет понятно специалистам в данной области техники, эффективное количество вещества может варьироваться в зависимости от таких факторов, как необходимый биологический конечный результат, доставляемое вещество, клетка- или ткань-мишень и т. д. Например, эффективное количество соединения в составе для лечения заболевания, нарушения и/или патологического состояния представляет собой количество, которое облегчает, смягчает, ослабляет, ингибирует, предотвращает, замедляет появление, уменьшает тяжесть и/или снижает частоту возникновения одного или более симптомов или признаков заболевания, нарушения и/или патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество вводят в виде однократной дозы; в некоторых вариантах осуществления для доставки терапевтически эффективного количества необходимо несколько единичных доз.

[55] *Лечение:* Термин «лечить» или «лечение» относится к любому способу, используемому для частичного или полного облегчения, ослабления, смягчения, подавления, предотвращения, замедления проявления, уменьшения тяжести и/или уменьшения частоты возникновения одного или более симптомов или признаков заболевания, нарушения и/или патологического состояния. Лечение может быть назначено субъекту, у которого нет признаков заболевания, нарушения и/или патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может быть назначено субъекту, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, нарушения и/или патологического состояния, например, с целью снижения риска развития патологии, связанной с заболеванием, нарушением и/или патологическим состоянием.

[56] *Ненасыщенный:* В контексте данного документа термин «ненасыщенный» означает, что фрагмент имеет одно или более звеньев ненасыщенности.

[57] Если не указано иное, структуры, описанные в данном документе, также включают все изомерные (например, энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные)) формы структуры; например, R и S конфигурации для каждого асимметричного центра, Z и E изомеры по двойной связи и конформационные изомеры Z и E. Следовательно, одиночные стереохимические изомеры, а также энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные) смеси представленных соединений входят в объем настоящего изобретения. Аналогично, если не указано иное, все таутомерные формы соединений входят в объем настоящего изобретения. Кроме того, если не указано иное, структуры, описанные в данном документе, также включают соединения, которые отличаются только наличием одного или более изотопно обогащенных атомов. Например, соединения,

имеющие представленные структуры, включающие замену водорода на дейтерий или тритий или замену углерода на ^{13}C - или ^{14}C -обогащенный углерод, входят в объем настоящего изобретения. Такие соединения подходят, например, в качестве аналитических инструментов, в качестве зондов в методах биологического анализа или в качестве терапевтических агентов в соответствии с настоящим изобретением.

2. Описание типовых вариантов осуществления:

[58] Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены методики, которые позволяют конъюгировать представляющие интерес фрагменты с мишенями с высокой эффективностью, высокой селективностью и/или меньшим количеством побочных трансформаций (например, благодаря количеству химических реакций и/или условиям/типам химических реакций). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены применимые реагенты и способы для конъюгации и композиции продуктов с повышенной гомогенностью (например, с 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20-кратным повышением модификации/конъюгации в одном или более необходимых сайтах агентов-мишеней и/или с 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20-кратным или более снижением модификации/конъюгации в одном или более нежелательных сайтах агентов-мишеней), чистотой и/или сниженным количеством нежелательных модификаций (например, в определенных белковых остатках в результате побочных реакций). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено соединение формулы R-I или его соль, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы R-I или его соль можно применять для внесения представляющего интерес фрагмента в мишень на одном этапе реакции. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены агенты формулы P-I или P-II или их соли. В некоторых вариантах осуществления композиция продукта содержит множество агентов, имеющих структуру формулы P-I или P-II, или их соли, при этом композиция продукта имеет более высокий уровень гомогенности указанных агентов по сравнению с референтной композицией продукта (например, композицией продукта по способу, в котором соединение формулы R-I или его соль замещено соединением, которое имеет такую же структуру, что и соединение формулы R-I или его соль, за исключением того, что каждый связывающий

мишень фрагмент замещен –Н).

[59] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, включающий следующие этапы:

1) приведение агента-мишени, такого как антитело, в контакт с реакционным партнером, содержащим:

первую группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью,

реактивную группу;

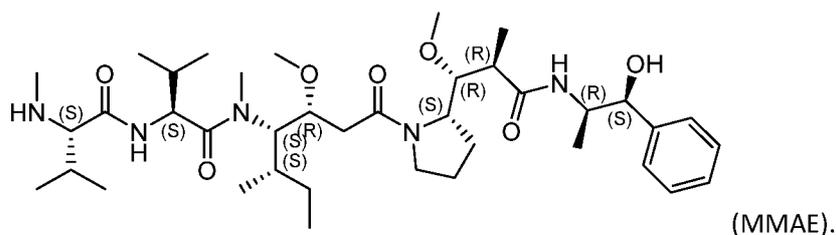
представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAE; и
необязательно один или более линкерных фрагментов;

2) образование агента, содержащего:

фрагмент агента-мишени;

представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAE; и
необязательно один или более линкерных фрагментов.

Монометилауристатин E (MMAE), CAS рег. № 474645-27-7, представляет собой соединение, имеющее химическую формулу:

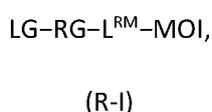


В способе по данному изобретению связывающий мишень фрагмент специфически связывается с агентом-мишенью, а реактивная группа вступает в реакцию с конкретными сайтами агента-мишени, такими как конкретные остатки лизина агента-мишени на основе антитела, так что полученный таким способом агент содержит агент-мишень с MMAE, присоединенным, необязательно посредством линкера, к конкретным сайтам.

[60] В некоторых вариантах осуществления реактивная группа расположена между первой группой и представляющим интерес фрагментом и связана с первой группой и

представляющим интерес фрагментом независимо и необязательно посредством линкерного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления реакционный партнер представляет собой соединение формулы R-I или его соль. В некоторых вариантах осуществления первая группа представляет собой или содержит группу LG, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления первая группа представляет собой или содержит группу LG, как описано в данном документе.

[61] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложено соединение, имеющее структуру формулы R-I:



или ее соли, где:

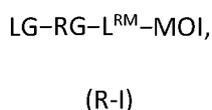
LG представляет собой группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью,

RG представляет собой реактивную группу;

L^{RM} представляет собой линкер; и

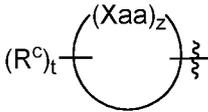
MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, содержащий монометилауристатин E (MMAE).

[62] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложено соединение, имеющее структуру формулы R-I:



или ее соли, где:

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

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

каждый Хаа 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 C₁–C₂₀ алифатического или C₁–C₂₀ алифатического фрагмента, имеющего 1–5 гетероатомов, где одно или более метиленовых звеньев группы необязательно 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 –Cγ– 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}–;

RG представляет собой –L^{RG1}–L^{RG2}–, –L^{LG4}–L^{RG1}–L^{RG2}–, –L^{LG3}–L^{LG4}–L^{RG1}–L^{RG2}–, –L^{LG2}–L^{LG3}–L^{LG4}–L^{RG1}–L^{RG2}–;

каждый из L^{LG1}, L^{LG2}, L^{LG3}, L^{LG4}, L^{RG1}, L^{RG2} и L^{RM} независимо представляет собой L;

каждый L 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–, –Cγ–, –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 $-R$, $-C(O)R$, $-CO_2R$ или $-SO_2R$;

каждый R независимо представляет собой $-H$ или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-30} алифатического, C_{1-30} гетероалифатического фрагмента, имеющего 1–10 гетероатомов, C_{6-30} арильного, C_{6-30} арилалифатического, C_{6-30} арилгетероалифатического фрагмента, имеющего 1–10 гетероатомов, 5–30-членного гетероарила, имеющего 1–10 гетероатомов, и 3–30-членного гетероциклила, имеющего 1–10 гетероатомов, или

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

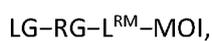
две или более групп R на одном атоме необязательно и независимо вместе с атомом образуют необязательно замещенное 3–30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, имеющее, в дополнение к атому, 0–10 гетероатомов; или

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; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, содержащий монометилауристатин E (ММАЕ).

[63] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ, включающий следующие этапы:

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



(R-I)

или ее соли, где:

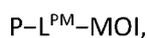
LG представляет собой группу, содержащую связывающий мишень домен, который связывается с агентом-мишенью,

RG представляет собой реактивную группу;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAE; и

2) образование агента, имеющего структуру формулы P-I:



(P-I)

или ее соли, где:

P представляет собой фрагмент агента-мишени;

L^{PM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAE.

[64] В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой антитело IgG. Например, антитело может представлять собой моноклональное антитело к CD30, такое как брентуксимаб, или антитело к нектину-4, такое как энфортумаб. В некоторых вариантах осуществления мишень представляет собой белок, а представляющий интерес фрагмент конъюгирован в одном или более остатках лизина. В некоторых вариантах осуществления агент формулы P-I или его соль представляет собой агент формулы P-II или его соль.

[65] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ производства агента, имеющего структуру P-II:



(P-II)

где:

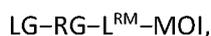
P-N представляет собой фрагмент белкового агента, содержащий остаток лизина;

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:



(R-I)

или ее соли, где:

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

RG представляет собой реактивную группу;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAE.

[66] В некоторых вариантах осуществления, как проиллюстрировано в данном документе, приведение в контакт проводят в условиях и в течение времени, достаточных для реакции остатка лизина N и образования связи с атомом RG и высвобождения LG.

Мишени

[67] 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 нуклеиновые кислоты.

[68] 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 содержит одну тяжелую цепь или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит 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 гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой мышинное антитело.

[69] 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).

[70] 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, базиликсимаб, брентуксимаб, энфортумаб, ипилимумаб, цетуксимаб, даратумумаб, динутуксимаб, элотузумаб, ибритумомаб тиуксетан, имгатузумаб, инфликсимаб, нецитумумаб, обинутузумаб, офатумумаб, пертузумаб, реслизумаб, ритуксимаб, трастузумаб, могамулизумаб, AMP-224, FS-102, GSK-2857916, ARGX-111, ARGX-110, AFM-13, APN-301, BI-836826,

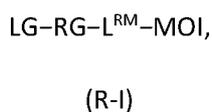
BI-836858, эноблитузумаб, отлртузумаб, велтузумаб, КНК-4083, BIW-8962, ALT-803, каротуксимаб, эпратузумаб, инебилизумаб, изатуксимаб, маргетуксимаб, MOR-208, окаратузумаб, талакотузумаб, тремелимуаб, бенрализумаб, лумиликсимаб, MOR-208, ифибатузумаб, GSK2831781, SEA-CD40, КНК-2823 или BI836858. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой силтуксимаб, даклизумаб, паливизумаб, омализумаб, эфализумаб, бевацизумаб, натализумаб, тоцилизумаб, экулизумаб, ведолизумаб, пембролизумаб, меполизумаб, иксекизумаб, панитумумаб, голимуаб, устекинумаб, канакинумаб, деносумаб, белимуаб, раксибакумаб, рамуцирумаб, ниволумаб, секукинумаб, эволокумаб, алирокумаб, бродалумаб или оларатумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой брентуксимаб или энфортумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой цетуксимаб. В некоторых вариантах осуществления предложенные соединения или агент, содержащий фрагмент агента на основе антитела, применимы для лечения патологического состояния, нарушения или заболевания, которое можно лечить агентом на основе антитела.

[71] 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).

[72] 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.

Соединения-партнеры

[73] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены соединения, каждое из которых независимо содержит первую группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью, реактивную группу, представляющий интерес фрагмент и, необязательно, один или более линкерных фрагментов, связывающих такие группы/фрагменты. В некоторых вариантах осуществления такое соединение применимо в качестве реакционного партнера для конъюгации представляющих интерес фрагментов с мишенями. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены соединения для конъюгации различных представляющих интерес фрагментов с мишенями, например, различными белками. В некоторых вариантах осуществления каждое из предложенных соединений содержит представляющий интерес фрагмент, реактивную группу, связывающий мишень фрагмент и, необязательно, один или более линкерных фрагментов (линкеров), связывающих такие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент является частью уходящей группы, которая высвобождается после контакта такого соединения с мишенью и реакции реактивной группы соединения с реактивной группой мишени (например, $-NH_2$ остатка Lys белка-мишени). Как продемонстрировано в данном документе, предложенные соединения могут, помимо прочего, обеспечить улучшенную эффективность конъюгации, высокую селективность и меньшее количество этапов (в некоторых случаях, один этап) для конъюгации продуктов. В некоторых вариантах осуществления предложенное соединение имеет структуру формулы R-I или ее соли:



или ее соли, где:

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

RG представляет собой реактивную группу;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAE.

[74] В некоторых вариантах осуществления первая группа представляет собой LG.

[75] В некоторых вариантах осуществления LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который может связываться с агентом-мишенью, и, необязательно, линкерный фрагмент.

[76] В контексте настоящего изобретения фрагмент в общем случае относится к части молекулы, например, в сложном эфире RCOOR' спиртовым фрагментом является RO-. В некоторых вариантах осуществления фрагмент соединения (например, целевого агента, белкового агента, агента на основе антитела и т. д.) сохраняет один или более или все необходимые структурные признаки, свойства, функции и/или виды активности соединения. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент может связываться с мишенью, необязательно сравнимым образом с соответствующим ему связывающим мишень соединением; в некоторых вариантах осуществления фрагмент агента-мишени сохраняет один или более необходимых структурных признаков, свойств, функций и/или свойств по сравнению с соответствующим ему соединением агента-мишени; в некоторых вариантах осуществления фрагмент агента на основе антитела сохраняет один или более необходимых структурных признаков, свойств, функций и/или свойств (например, 3-мерную структуру, антигенную специфичность, антигенсвязывающую способность и/или иммунологические функции и т. д.) по сравнению с соответствующим ему соединением на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагмент соединения, например, фрагмент агента-мишени, фрагмент белкового агента, фрагмент агента на основе антитела и т. д. является одновалентным (в случае одновалентного фрагмента), двухвалентным (в случае двухвалентного фрагмента) или поливалентным (в случае поливалентного фрагмента) радикалом соединения, например, соединения агента-мишени (в случае фрагмента агента-мишени), соединения белкового агента (в случае фрагмента белкового агента), соединения агента на основе антитела (в случае фрагмента агента на основе антитела) и т. д. В некоторых вариантах осуществления одновалентный радикал образуется при удалении одновалентной части (например, водорода, галогена, другой одновалентной группы, такой как алкил, арил и т. д.) из соединения. В некоторых вариантах осуществления двухвалентный или поливалентный радикал образуется при удалении одной или более одновалентных (например, водорода, галогена, одновалентных групп, таких как алкил, арил и т. д.), двухвалентных и/или поливалентных частей из соединения. В некоторых вариантах осуществления радикалы образуются при удалении атомов водорода. В некоторых вариантах осуществления фрагмент является одновалентным. В некоторых вариантах

осуществления фрагмент является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления фрагмент является поливалентным.

[77] В некоторых вариантах осуществления LG представляет собой или содержит $R^{LG}-L^{LG-}$, где R^{LG} представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, а L^{LG} представляет собой L^{LG1} , как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^{LG} представляет собой $-L^{LG1}-L^{LG2-}$, где каждый из L^{LG1} и L^{LG2} независимо является таким, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^{LG} представляет собой $-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3-}$, где каждый из L^{LG1} , L^{LG2} и L^{LG3} независимо является таким, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^{LG} представляет собой $-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4-}$, где каждый из L^{LG1} , L^{LG2} , L^{LG3} и L^{LG4} независимо является таким, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} связан с R^{LG} . В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} связан с представляющим интерес фрагментом. В некоторых вариантах осуществления L^{LG} представляет собой $-L^{LG1-}$, а реактивная группа содержит L^{LG2} , L^{LG3} и L^{LG4} . В некоторых вариантах осуществления L^{LG} представляет собой $-L^{LG1}-L^{LG2-}$, а реактивная группа содержит L^{LG3} и L^{LG4} . В некоторых вариантах осуществления L^{LG} представляет собой $-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3-}$, а реактивная группа содержит L^{LG4} .

[78] В некоторых вариантах осуществления связывающие мишень фрагменты, первые группы и/или LG высвобождаются после реакций, например после того, как соединения-партнеры вступают в реакцию с агентами-мишенями. В некоторых вариантах осуществления первая группа высвобождается после реакции. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент высвобождается после реакции. В некоторых вариантах осуществления LG высвобождается после реакции. В некоторых вариантах осуществления первая группа высвобождается как часть соединения, имеющего структуру $LG-H$, или его соли. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент высвобождается как часть соединения, имеющего структуру $LG-H$, или его соли. В некоторых вариантах осуществления LG высвобождается как часть соединения, имеющего структуру $LG-H$, или его соли. В некоторых вариантах осуществления первая группа высвобождается как часть соединения, имеющего структуру $R^{LG}-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-H$, или его соли. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент высвобождается как часть соединения, имеющего структуру $R^{LG}-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-H$, или его соли. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент высвобождается как часть соединения, имеющего структуру $R^{LG}-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-H$, или его соли, где R^{LG} представляет собой или содержит связывающий

мишень фрагмент. В некоторых вариантах осуществления LG высвобождается как часть соединения, имеющего структуру $R^{LG}-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-H$, или его соли, где LG представляет собой $R^{LG}-L^{LG}$, а L^{LG} представляет собой $-L^{LG1}-$, $-L^{LG1}-L^{LG2}-$, $-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-$ или $-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-$. В некоторых вариантах осуществления LG высвобождается как часть соединения, имеющего структуру $R^{LG}-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-H$, или его соли, где LG представляет собой $R^{LG}-L^{LG1}-$. В некоторых вариантах осуществления LG высвобождается как часть соединения, имеющего структуру $R^{LG}-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-H$, или его соли, где LG представляет собой $R^{LG}-L^{LG1}-L^{LG2}$. В некоторых вариантах осуществления LG высвобождается как часть соединения, имеющего структуру $R^{LG}-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-H$, или его соли, где LG представляет собой $R^{LG}-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}$. В некоторых вариантах осуществления LG высвобождается как часть соединения, имеющего структуру $R^{LG}-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-H$, или его соли, где LG представляет собой $R^{LG}-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}$.

[79] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой ковалентную связь или двухвалентную необязательно замещенную линейную или разветвленную C_{1-100} 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 C_{1-6} алкиленом, C_{1-6} алкениленом, двухвалентной C_{1-6} гетероалифатической группой, имеющей 1–5 гетероатомов, $-C\equiv C-$, $-C_6H_5-$, $-C(R')_2-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-C(O)C(R')_2N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$, $-C(O)O-$, $-P(O)(OR')-$, $-P(O)(SR')-$, $-P(O)(R')-$, $-P(O)(NR')-$, $-P(S)(OR')-$, $-P(S)(SR')-$, $-P(S)(R')-$, $-P(S)(NR')-$, $-P(R')-$, $-P(OR')-$, $-P(SR')-$, $-P(NR')-$, аминокислотным остатком или $-[(-O-C(R')_2-C(R')_2)_n]-$, где n равно 1–20. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой ковалентную связь или двухвалентную необязательно замещенную линейную или разветвленную C_{1-100} алифатическую или гетероалифатическую группу, имеющую 1–20 гетероатомов, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $-C\equiv C-$, $-C_6H_5-$, $-C(R')_2-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-C(O)C(R')_2N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$, $-C(O)O-$, $-P(O)(OR')-$, $-P(O)(SR')-$, $-P(O)(R')-$, $-P(O)(NR')-$, $-P(S)(OR')-$, $-P(S)(SR')-$, $-P(S)(R')-$, $-P(S)(NR')-$, $-P(R')-$, $-P(OR')-$, $-P(SR')-$, $-P(NR')-$ или $-[(-O-C(R')_2-C(R')_2)_n]-$, где n равно 1–20. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой ковалентную связь или двухвалентную необязательно замещенную линейную или

разветвленную C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₁₀, C₁₅, C₂₀, C₂₅, C₃₀, C₄₀, C₅₀, C₆₀, C₁₋₂, C₁₋₅, C₁₋₁₀, C₁₋₁₅, C₁₋₂₀, C₁₋₃₀, C₁₋₄₀, C₁₋₅₀, C₁₋₆₀, C₁₋₇₀, C₁₋₈₀ или C₁₋₉₀ алифатическую или гетероалифатическую группу, имеющую 1–10 гетероатомов, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{C}_y-$, $-\text{C}(\text{R}')_2-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{S})-$, $-\text{C}(\text{NR}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{R}')_2\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}')-$, $-\text{P}(\text{O})(\text{SR}')-$, $-\text{P}(\text{O})(\text{R}')-$, $-\text{P}(\text{O})(\text{NR}')-$, $-\text{P}(\text{S})(\text{OR}')-$, $-\text{P}(\text{S})(\text{SR}')-$, $-\text{P}(\text{S})(\text{R}')-$, $-\text{P}(\text{S})(\text{NR}')-$, $-\text{P}(\text{R}')-$, $-\text{P}(\text{OR}')-$, $-\text{P}(\text{SR}')-$, $-\text{P}(\text{NR}')-$, аминокислотными остатками или $-\text{[}(-\text{O}-\text{C}(\text{R}')_2-\text{C}(\text{R}')_2-\text{)}_n\text{]}-$, где n равно 1–20. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой ковалентную связь или двухвалентную необязательно замещенную линейную или разветвленную C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₁₀, C₁₅, C₂₀, C₂₅, C₃₀, C₄₀, C₅₀, C₆₀, C₁₋₂, C₁₋₅, C₁₋₁₀, C₁₋₁₅, C₁₋₂₀, C₁₋₃₀, C₁₋₄₀, C₁₋₅₀, C₁₋₆₀, C₁₋₇₀, C₁₋₈₀ или C₁₋₉₀ алифатическую или гетероалифатическую группу, имеющую 1–10 гетероатомов, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{C}_y-$, $-\text{C}(\text{R}')_2-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{S})-$, $-\text{C}(\text{NR}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{R}')_2\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, аминокислотными остатками или $-\text{[}(-\text{O}-\text{C}(\text{R}')_2-\text{C}(\text{R}')_2-\text{)}_n\text{]}-$, где n равно 1–10. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой ковалентную связь или двухвалентную необязательно замещенную линейную или разветвленную C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₁₀, C₁₅, C₂₀, C₂₅, C₃₀, C₄₀, C₅₀, C₆₀, C₁₋₂, C₁₋₅, C₁₋₁₀, C₁₋₁₅, C₁₋₂₀, C₁₋₃₀, C₁₋₄₀, C₁₋₅₀, C₁₋₆₀, C₁₋₇₀, C₁₋₈₀ или C₁₋₉₀ алифатическую группу, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $-\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{R}')_2\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$, аминокислотными остатками или $-\text{[}(-\text{O}-\text{C}(\text{R}')_2-\text{C}(\text{R}')_2-\text{)}_n\text{]}-$, где n равно 1–10. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой ковалентную связь или двухвалентную необязательно замещенную линейную или разветвленную C₁₋₁₀ алифатическую группу, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $-\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{R}')_2\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}_y-$ или $-\text{[}(-\text{O}-\text{C}(\text{R}')_2-\text{C}(\text{R}')_2-\text{)}_n\text{]}-$, где n равно 1–10. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой ковалентную связь или

двухвалентную необязательно замещенную линейную или разветвленную C_{1-10} алифатическую группу, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $-O-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(O)N(R')-$, $-C(O)C(R')_2N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$ или $-[(-O-C(R')_2-C(R')_2-)_n]-$, где n равно 1–10. В некоторых вариантах осуществления L не содержит $-C(O)O-$. В некоторых вариантах осуществления L не содержит $-C(O)-N(R')-$. В некоторых вариантах осуществления L не содержит $-S-$. В некоторых вариантах осуществления L не содержит $-S-Cy-$. В некоторых вариантах осуществления L не содержит $-S-S-$. В некоторых вариантах осуществления L не содержит одно или более или любое из $-C(O)O-$, $-C(O)-N(R')-$, $-S-$ и $-S-S-$. В некоторых вариантах осуществления L не содержит одно или более или любое из $-C(O)O-$, $-C(O)-N(R')-$, $-S-Cy-$ и $-S-S-$. В некоторых вариантах осуществления L не содержит одно или более или любое из $-C(O)O-$, $-S-$ и $-S-S-$. В некоторых вариантах осуществления L не содержит одно или более или любое из $-C(O)O-$, $-S-Cy-$ и $-S-S-$. В некоторых вариантах осуществления L не содержит ни одно из $-C(O)O-$, $-S-$ и $-S-S-$. В некоторых вариантах осуществления L не содержит ни одно из $-C(O)O-$, $-S-Cy-$ и $-S-S-$. В некоторых вариантах осуществления L не содержит ни одно из $-C(O)O-$ и $-S-S-$.

[80] В некоторых вариантах осуществления каждый аминокислотный остаток независимо представляет собой остаток аминокислоты, имеющий структуру формулы A-I, или его соль. В некоторых вариантах осуществления каждый аминокислотный остаток независимо имеет структуру $-N(R^{a1})-L^{a1}-C(R^{a2})(R^{a3})-L^{a2}-CO-$ или полученной из нее соли. В некоторых вариантах осуществления каждый аминокислотный остаток независимо имеет структуру $-N(R^{a1})-C(R^{a2})(R^{a3})-CO-$ или полученной из нее соли.

[81] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L не представляет собой ковалентную связь.

[82] В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} не представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} представляет собой или содержит $-(CH_2CH_2O)_n-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} представляет собой или содержит $-(CH_2)_n-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_n-$, где каждое n независимо является таким, как описано в данном документе, а каждый $-CH_2-$ независимо необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} представляет собой $-(CH_2)_n-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_n-$, где каждое n независимо является таким, как описано в данном документе, а каждый $-CH_2-$ независимо необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} представляет собой $-(CH_2)_2-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_2-$, где n является таким, как

[90] В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} представляет собой $-CH_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} представляет собой $-CH_2C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} представляет собой $-CH_2C(O)NH-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG1} представляет собой $-CH_2(CO)NHCH_2-$. В некоторых вариантах осуществления $-CH_2-C(O)-$ связан со связывающим мишень фрагментом в $-CH_2-$.

[91] В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} не представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-N(R')C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-NH C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-(CH_2)_n-N(R')C(O)-$, где $-(CH_2)_n-$ необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-(CH_2)_n-OC(O)-$, где $-(CH_2)_n-$ необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-(CH_2)_n-OC(O)N(R')-$, где $-(CH_2)_n-$ необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-(CH_2)_n-OC(O)NH-$, где $-(CH_2)_n-$ необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-(CH_2)_n-OC(O)N(R')-$, где $-(CH_2)_n-$ необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-CH_2N(CH_2CH_2CH_2S(O)_2OH)-C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-C(O)-NHCH_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-C(O)-NHCH_2CH_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-C(O)O-CH_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-NH-C(O)O-CH_2-$. В некоторых вариантах осуществления $-C(O)-$ связан с L^{LG3} . В некоторых вариантах осуществления $-N(R')$, $-NH-$ или необязательно замещенное звено $-CH_2-$ (необязательно замещенного $-(CH_2)_n-$) связаны с L^{LG3} .

[92] В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-N(R')$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-N(R)$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-NH-$.

[93] В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой необязательно замещенный двухвалентный C_{1-6} алифатический фрагмент. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-CH_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-CH_2NH-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-CH_2NH-C(O)-$. В

некоторых вариантах осуществления L^{LG2} представляет собой $-\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$.

[94] В некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой или содержит необязательно замещенное арильное кольцо. В некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой или содержит необязательно замещенное фенильное кольцо. В некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой фенильное кольцо, замещенное одной или более электроноакцепторными группами. Как очевидно для специалистов в данной области техники, различные электроноакцепторные группы известны в данной области техники и применимы в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления электроноакцепторная группа представляет собой галоген. В некоторых вариантах осуществления электроноакцепторная группа представляет собой $-\text{F}$. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой $-\text{Cl}$. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой $-\text{Br}$. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой $-\text{I}$. В некоторых вариантах осуществления электроноакцепторная группа содержит двойную связь $\text{X}=\text{Y}$, где X связан с группой, для которой электроноакцепторная группа является заместителем, и по меньшей мере один из X и Y представляет собой гетероатом. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой гетероатом. В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой гетероатом. В некоторых вариантах осуществления каждый из X и Y независимо представляет собой гетероатом. В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой O . В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой S . В некоторых вариантах осуществления X представляет собой C . В некоторых вариантах осуществления X представляет собой N . В некоторых вариантах осуществления X представляет собой P . В некоторых вариантах осуществления X представляет собой S . В некоторых вариантах осуществления $\text{X}=\text{Y}$ представляет собой $\text{C}=\text{O}$. В некоторых вариантах осуществления $\text{X}=\text{Y}$ представляет собой $\text{N}=\text{O}$. В некоторых вариантах осуществления $\text{X}=\text{Y}$ представляет собой $\text{S}=\text{O}$. В некоторых вариантах осуществления $\text{X}=\text{Y}$ представляет собой $\text{P}=\text{O}$. В некоторых вариантах осуществления электроноакцепторная группа представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{L}-\text{R}'$. В некоторых вариантах осуществления электроноакцепторная группа представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{R}'$. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой $-\text{NO}_2$. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой $-\text{S}(\text{O})-\text{L}-\text{R}'$. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой $-\text{S}(\text{O})-\text{R}'$. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой $-\text{S}(\text{O})_2-\text{L}-\text{R}'$. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой $-\text{S}(\text{O})_2-\text{O}-\text{R}'$. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой $-\text{S}(\text{O})_2-\text{N}(\text{R}')_2$. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой $-\text{P}(\text{O})\{-\text{L}-\text{R}'\}_2$. В некоторых вариантах

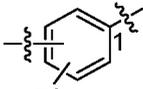
осуществления она представляет собой $-P(O)(R')_2$. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой $-P(O)(OR')_2$. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой $-P(O)[N(R')_2]_2$.

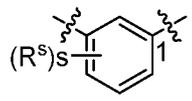
[95] В некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой $-L^{LG3a}-L^{LG3b}-$, где L^{LG3a} представляет собой ковалентную связь или $-C(O)O-CH_2-$, где $-CH_2-$ необязательно замещен, а L^{LG3b} представляет собой необязательно замещенное арильное кольцо. В некоторых вариантах осуществления L^{LG3a} связан с L^{LG2} , и L^{LG3b} связан с L^{LG4} .

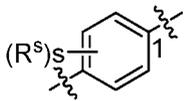
[96] В некоторых вариантах осуществления L^{LG3a} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^{LG3a} представляет собой $-C(O)O-CH_2-$, где $-CH_2-$ необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{LG3a} представляет собой $-C(O)O-CH_2-$, где $-CH_2-$ замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{LG3a} представляет собой $-C(O)O-CH_2-$, где $-CH_2-$ незамещен.

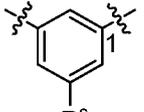
[97] В некоторых вариантах осуществления первая группа, связывающий мишень фрагмент и/или LG высвобождается как часть соединения, имеющего структуру $R^{LG}-L^{LG1}-L^{LG2}-H$, или его соли.

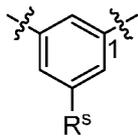
[98] В некоторых вариантах осуществления L^{LG3b} представляет собой необязательно замещенное фенильное кольцо. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один заместитель представляет собой электроноакцепторную группу, как описано в данном документе.

[99] В некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой , где s равно 0–4, каждый R^s независимо представляет собой галоген, $-NO_2$, $-L-R'$, $-C(O)-L-R'$, $-S(O)-L-R'$, $-S(O)_2-L-R'$ или $-P(O)(-L-R')_2$. В некоторых вариантах осуществления C1 связан с L^{LG4} . В некоторых

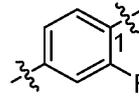
вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой . В некоторых вариантах

осуществления L^{LG3} представляет собой . В некоторых вариантах осуществления L^{LG3}

представляет собой . В некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой

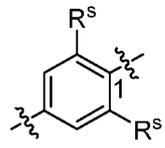


. В некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой

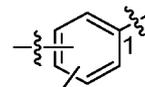


. В

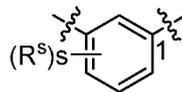
некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой



[100] В некоторых вариантах осуществления L^{LG3b} представляет собой $(R^S)_s$, где s равно 0–4, каждый R^S независимо представляет собой галоген, $-NO_2$, $-L-R'$, $-C(O)-L-R'$, $-S(O)-L-R'$, $-S(O)_2-L-R'$ или $-P(O)(-L-R')_2$. В некоторых вариантах осуществления $C1$ связан с L^{LG4} . В некоторых

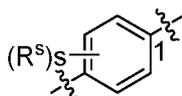


вариантах осуществления L^{LG3b} представляет собой



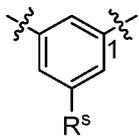
. В некоторых вариантах

осуществления L^{LG3b} представляет собой



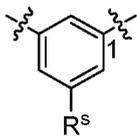
. В некоторых вариантах осуществления

L^{LG3b} представляет собой

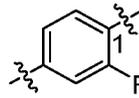


. В некоторых вариантах осуществления L^{LG3b} представляет

собой

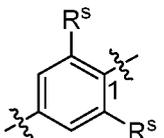


. В некоторых вариантах осуществления L^{LG3b} представляет собой



. В

некоторых вариантах осуществления L^{LG3b} представляет собой

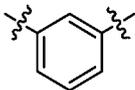


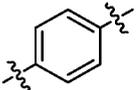
[101] В некоторых вариантах осуществления s равно 0. В некоторых вариантах осуществления s равно 1–4. В некоторых вариантах осуществления s равно 1. В некоторых вариантах осуществления s равно 2. В некоторых вариантах осуществления s равно 3. В некоторых вариантах осуществления s равно 4.

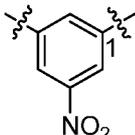
[102] В некоторых вариантах осуществления s равно 1–4, а по меньшей мере один R^S представляет собой электроноакцепторную группу, например электроноакцепторную группу,

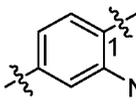
описанную выше. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^5 представляет собой $-\text{NO}_2$. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^5 представляет собой $-\text{F}$. В некоторых вариантах осуществления каждый R^5 независимо представляет собой электроноакцепторную группу. В некоторых вариантах осуществления каждый R^5 представляет собой $-\text{NO}_2$. В некоторых вариантах осуществления каждый R^5 представляет собой $-\text{F}$.

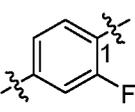
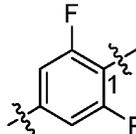
[103] В некоторых вариантах осуществления электроноакцепторная группа или R^5 находится в C2. В некоторых вариантах осуществления электроноакцепторная группа или R^5 находится в C3. В некоторых вариантах осуществления электроноакцепторная группа или R^5 находится в C4. В некоторых вариантах осуществления электроноакцепторная группа или R^5 находится в C2 и C5.

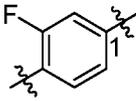
[104] В некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой  . В

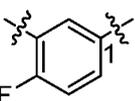
некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой  . В некоторых вариантах

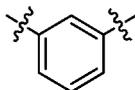
осуществления L^{LG3} представляет собой  . В некоторых вариантах осуществления L^{LG3}

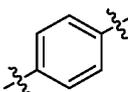
представляет собой  . В некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет

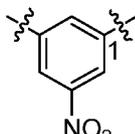
собой  . В некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой  . В

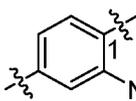
некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой  . В некоторых вариантах

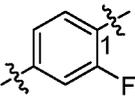
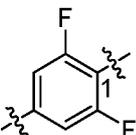
осуществления L^{LG3} представляет собой  .

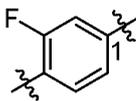
[105] В некоторых вариантах осуществления L^{LG3b} представляет собой  . В

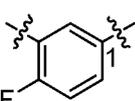
некоторых вариантах осуществления L^{LG3b} представляет собой  . В некоторых вариантах

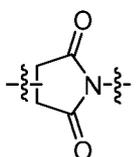
осуществления L^{LG3b} представляет собой  . В некоторых вариантах осуществления L^{LG3b}

представляет собой  . В некоторых вариантах осуществления L^{LG3b} представляет

собой  . В некоторых вариантах осуществления L^{LG3b} представляет собой  . В

некоторых вариантах осуществления L^{LG3b} представляет собой  . В некоторых вариантах

осуществления L^{LG3b} представляет собой  .

[106] В некоторых вариантах осуществления L^{LG3b} необязательно замещен  . В

некоторых вариантах осуществления атом азота связан с L^{LG4} , который представляет собой $-O-$. В некоторых вариантах осуществления атом азота связан с L^{LG4} , который представляет собой $-O-$, а $-L^{RG1}-L^{RG2}-$ представляет собой $-C(O)-$.

[107] В некоторых вариантах осуществления $-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$ представляет собой $-O-C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления $-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$ представляет собой $-S-C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления $-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$ представляет собой $-S-C(O)-$.

[108] В некоторых вариантах осуществления L^{LG4} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^{LG4} не представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^{LG4} представляет собой $-O-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG4} представляет собой $-N(R')-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG4} представляет собой $-NH-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG4} представляет собой $-N(CH_3)-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG4} представляет собой $-N(R')-$, а L^{LG3} представляет собой $-O-$. В некоторых

вариантах осуществления R' представляет собой необязательно замещенный C₁₋₆ алкил. В некоторых вариантах осуществления L^{LG4} представляет собой –S–.

Связывающие мишень фрагменты

[109] Как очевидно для специалистов в данной области техники, различные связывающие мишень фрагменты можно использовать в соответствии с настоящим изобретением. В данной области техники также доступны различные методики для разработки и оценки связывающих мишень фрагментов, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением.

[110] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит фрагмент малой молекулы. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит полимерный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит нуклеиновую кислоту или ее фрагменты. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит пептидный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой полипептидный фрагмент.

[111] В некоторых вариантах осуществления предложенные методики включают применение одного и не более одного связывающего мишень фрагмента. В некоторых вариантах осуществления предложенные методики включают применение двух или более связывающих мишень фрагментов. Например, в некоторых вариантах осуществления предложенные соединения могут содержать два или более связывающих мишень фрагментов, которые могут связываться с агентами-мишенями на основе антител.

а. Малые молекулы

[112] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит фрагмент малой молекулы, который может селективно связываться с агентом-мишенью. Низкомолекулярные связывающие агенты-мишени фрагменты, включая различные белковые агенты, широко известны в данной области техники и применимы в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный связывающий фрагмент представляет собой или содержит фрагмент

терапевтического агента, например, лекарственного препарата, конъюгата антитело – лекарственный препарат и т. д.

[113] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой фрагмент малой молекулы. В некоторых вариантах осуществления фрагмент малой молекулы имеет молекулярную массу не более чем 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700 или 600. В некоторых вариантах осуществления фрагмент малой молекулы имеет молекулярную массу не более чем 8000. В некоторых вариантах осуществления фрагмент малой молекулы имеет молекулярную массу не более чем 7000. В некоторых вариантах осуществления фрагмент малой молекулы имеет молекулярную массу не более чем 6000. В некоторых вариантах осуществления фрагмент малой молекулы имеет молекулярную массу не более чем 5000. В некоторых вариантах осуществления фрагмент малой молекулы имеет молекулярную массу не более чем 4000. В некоторых вариантах осуществления фрагмент малой молекулы имеет молекулярную массу не более чем 3000. В некоторых вариантах осуществления фрагмент малой молекулы имеет молекулярную массу не более чем 2000. В некоторых вариантах осуществления фрагмент малой молекулы имеет молекулярную массу не более чем 1500. В некоторых вариантах осуществления фрагмент малой молекулы имеет молекулярную массу не более чем 1000. В некоторых вариантах осуществления фрагмент малой молекулы имеет молекулярную массу не более чем 900.

b. Пептидные агенты

[114] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит пептидный агент. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой пептидный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент может быть линейным или циклическим. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит циклический пептидный фрагмент. Различные пептидные связывающие мишень фрагменты известны в данной области техники и применимы в соответствии с настоящим изобретением.

[115] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит пептидный аптамерный агент.

[116] Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления R^{LG} представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент. В некоторых вариантах осуществления R^{LG} представляет собой или содержит связывающий белок фрагмент. В некоторых

вариантах осуществления R^{LG} представляет собой или содержит связывающий антитело фрагмент. В некоторых вариантах осуществления R^{LG} представляет собой связывающий мишень фрагмент. В некоторых вариантах осуществления R^{LG} представляет собой связывающий белок фрагмент. В некоторых вариантах осуществления R^{LG} представляет собой связывающий антитело фрагмент.

с. Аптамерные агенты

[117] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит агент на основе нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит олигонуклеотидный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит аптамерный агент. В данной области техники известны различные аптамерные агенты, или же их можно легко разработать, используя общепринятые методики, и можно использовать в предложенных методиках в соответствии с настоящим изобретением.

[118] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой связывающий антитело фрагмент. Такие связывающие мишень фрагменты предназначены, помимо прочего, для конъюгации представляющих интерес фрагментов с агентами на основе антител.

Связывающие антитело фрагменты

[119] В некоторых вариантах осуществления мишени представляют собой агенты на основе антител. В некоторых вариантах осуществления связывающие мишень фрагменты представляют собой связывающие антитело фрагменты. В некоторых вариантах осуществления предложенные соединения и/или агенты содержат связывающие антитело фрагменты. Различные связывающие антитело фрагменты можно использовать в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления связывающие антитело фрагменты представляет собой универсальные связывающие антитело фрагменты, которые могут связываться с антителами, имеющими разные Fab-области и разную специфичность. Помимо прочего, соединения, содержащие такие связывающие антитело фрагменты, можно использовать для конъюгации с антителами, имеющими разную специфичность. В некоторых вариантах осуществления связывающие антитело фрагменты по настоящему изобретению, например

группу, выбранную из C_{1-6} алифатического, 3–8-членного насыщенного или частично ненасыщенного моноциклического карбоциклического кольца, фенила 8–10-членного бициклического ароматического карбоциклического кольца, 4–8-членного насыщенного или частично ненасыщенного моноциклического гетероциклического кольца, имеющего 1–2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, а 5–6-членного моноциклического гетероароматического кольца, имеющего 1–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, или 8–10-членного бициклического гетероароматического кольца, имеющего 1–5 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы; или:

R^1 и $R^{1'}$ необязательно вместе со своим промежуточным атомом углерода образуют 3–8-членное необязательно замещенное насыщенное или частично ненасыщенное спироциклическое карбоциклическое кольцо или 3–8-членное насыщенное или частично ненасыщенное спироциклическое гетероциклическое кольцо, имеющее 1–2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы;

R^3 и $R^{3'}$ необязательно вместе со своим промежуточным атомом углерода образуют 3–8-членное необязательно замещенное насыщенное или частично ненасыщенное спироциклическое карбоциклическое кольцо или 3–8-членное насыщенное или частично ненасыщенное спироциклическое гетероциклическое кольцо, имеющее 1–2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы;

группа R^5 и группа $R^{5'}$, присоединенные к одному атому углерода, необязательно вместе со своим промежуточным атомом углерода образуют 3–8-членное необязательно замещенное насыщенное или частично ненасыщенное спироциклическое карбоциклическое кольцо или 3–8-членное насыщенное или частично ненасыщенное спироциклическое гетероциклическое кольцо, имеющее 1–2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы; или

две группы R^5 необязательно вместе со своими промежуточными атомами образуют C_{1-10} необязательно замещенную двухвалентную линейную или разветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, при этом 1–3 метиленовых звена цепи независимо и необязательно замещены $-S-$, $-SS-$, $-N(R)-$, $-O-$, $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-C(O)O-$, $-C(O)N(R)-$, $-N(R)C(O)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$ или $-Cy^1-$, где каждый $-Cy^1-$

независимо представляет собой 5–6-членный гетероариленил с 1–4 гетероатомами, независимо выбранными из азота, кислорода или серы;

каждый из $R^{1'}$, $R^{3'}$ и $R^{5'}$ независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-3} алифатический фрагмент;

каждый из R^2 , R^4 и R^6 независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-4} алифатический фрагмент; или

R^2 и R^1 необязательно вместе со своими промежуточными атомами образуют 4–8-членное необязательно замещенное насыщенное или частично ненасыщенное моноциклическое гетероциклическое кольцо, имеющее 1–2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы;

R^4 и R^3 необязательно вместе со своими промежуточными атомами образуют 4–8-членное необязательно замещенное насыщенное или частично ненасыщенное моноциклическое гетероциклическое кольцо, имеющее 1–2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы; или

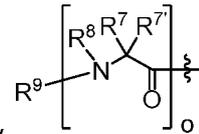
группа R^6 и ее смежная группа R^5 необязательно вместе со своими промежуточными атомами образуют 4–8-членное необязательно замещенное насыщенное или частично ненасыщенное моноциклическое гетероциклическое кольцо, имеющее 1–2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы;

L^1 представляет собой трехвалентный линкерный фрагмент; и

каждое из m и n независимо равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

[122] В некоторых вариантах осуществления L^1 представляет собой необязательно замещенную трехвалентную группу, выбранную из C_{1-20} алифатического или C_{1-20} 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 $-C(O)O-$.

[123] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например связывающий белок фрагмент (например, связывающий антитело фрагмент (например,



универсальный связывающий антитело фрагмент)), имеет структуру

образованной из нее соли, где:

каждый из R^7 независимо представляет собой водород или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-6} алифатического, 3–8-членного насыщенного или частично ненасыщенного моноциклического карбоциклического кольца, фенила 8–10-членного бициклического ароматического карбоциклического кольца, 4–8-членного насыщенного или частично ненасыщенного моноциклического гетероциклического кольца, имеющего 1–2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, а 5–6-членного моноциклического гетероароматического кольца, имеющего 1–4 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, или 8–10-членного бициклического гетероароматического кольца, имеющего 1–5 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы; или:

группа R^7 и группа R^7 , присоединенные к одному атому углерода, необязательно вместе со своим промежуточным атомом углерода образуют 3–8-членное необязательно замещенное насыщенное или частично ненасыщенное спироциклическое карбоциклическое кольцо или 3–8-членное необязательно замещенное насыщенное или частично ненасыщенное спироциклическое гетероциклическое кольцо, имеющее 1–2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы;

каждый из R^7 независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-3} алифатический фрагмент;

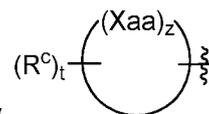
каждый из R^8 независимо представляет собой водород или необязательно замещенный C_{1-4} алифатический фрагмент, или:

группа R^8 и ее смежная группа R^7 необязательно вместе со своими промежуточными атомами образуют 4–8-членное необязательно замещенное насыщенное или частично ненасыщенное моноциклическое гетероциклическое кольцо, имеющее 1–2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода или серы; и

R^9 представляет собой водород, необязательно замещенный C_{1-3} алифатический фрагмент или – C(O)–.

[124] В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент, например универсальный связывающий антитело фрагмент, представляет собой или содержит пептидный фрагмент, например, фрагмент, имеющий структуру $R^c-(Xaa)_z-$ или ее соли, где каждый из R^c , z и Xaa независимо является таким, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления один или более Xaa независимо представляют собой неприродный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления боковые цепи двух или более аминокислотных остатков могут быть связаны вместе с образованием мостиков. Например, в некоторых вариантах осуществления боковые цепи двух остатков цистеина могут образовывать дисульфидный мостик, содержащий $-S-S-$ (который, как во многих белках, может быть образован двумя группами $-SH$).

[125] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например связывающий белок фрагмент (например, связывающий антитело фрагмент (например, универсальный связывающий антитело фрагмент)), представляет собой или содержит



циклический пептидный фрагмент, например фрагмент, имеющий структуру $(R^c)_t-(Xaa)_z-$ или образованной из нее соли, где:

каждый Xaa независимо представляет собой остаток аминокислоты или аминокислотный аналог;

t равно 0–50;

z равно 1–50;

L представляет собой линкерный фрагмент;

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 $-C_1-$ независимо представляет собой необязательно замещенную двухвалентную

моноциклическую, бициклическую или полициклическую группу, где каждое моноциклическое кольцо независимо выбрано из C_{3-20} циклоалифатического кольца, C_{6-20} арильного кольца, 5–20-членного гетероарильного кольца, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3–20-членного гетероциклического кольца, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния;

каждый R' независимо представляет собой $-R$, $-C(O)R$, $-CO_2R$ или $-SO_2R$;

каждый R независимо представляет собой $-H$ или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-30} алифатического, C_{1-30} гетероалифатического фрагмента, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, C_{6-30} арильного, C_{6-30} ариллифатического, C_{6-30} арилгетероалифатического фрагмента, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, 5–30-членного гетероарила, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3–30-членного гетероциклила, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, или

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

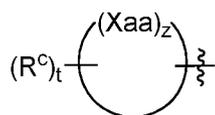
две или более групп R на одном атоме необязательно и независимо вместе с этим атомом образуют необязательно замещенное 3–30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, имеющее, в дополнение к атому, 0–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния; 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.

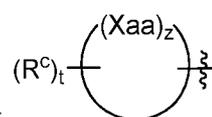
[126] В некоторых вариантах осуществления гетероатом независимо выбран из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния.

[127] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит $R^c-(Xaa)_z-$ или образованную из нее соль, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок фрагмент представляет собой или содержит $R^c-(Xaa)_z-$ или

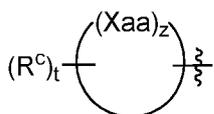
образованную из нее соль, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент, например универсальный связывающий антитело фрагмент, представляет собой или содержит $R^c-(Xaa)_z-$ или образованную из нее соль, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет



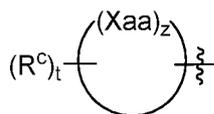
собой или содержит или образованную из нее соль, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления



связывающий белок фрагмент представляет собой или содержит образованную из нее соль, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент, например универсальный связывающий антитело фрагмент, представляет собой или содержит



или образованную из нее соль, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент, например универсальный связывающий антитело фрагмент, представляет собой



$R^c-(Xaa)_z-$ или или образованную из них соль, и представляет собой или содержит пептидное звено. В некоторых вариантах осуществления $-(Xaa)_z-$ представляет собой или содержит пептидное звено. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки могут образовывать мостики, например соединения, образуемые боковыми цепями, необязательно посредством линкерных фрагментов (например, L); например, как во многих полипептидах, остатки цистеина могут образовывать дисульфидные мостики. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит аминокислотный остаток (например, при физиологическом pH около 7,4, «положительно заряженный аминокислотный остаток, Xaa^P), например остаток аминокислоты формулы **A-I**, который имеет положительно заряженную боковую цепь. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит R. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один Xaa представляет собой R. В некоторых

вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит APAR. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит RAPA. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит аминокислотный остаток, например остаток аминокислоты формул **A-I**, который имеет боковую цепь, содержащую ароматическую группу («ароматический аминокислотный остаток», Хаа^A). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит положительно заряженный аминокислотный остаток и ароматический аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит W. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит положительно заряженный аминокислотный остаток и ароматический аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит Хаа^AХааХаа^PХаа^P. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит Хаа^PХаа^PХааХаа^A. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит Хаа^PХаа^AХаа^P. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит два или более Хаа^PХаа^AХаа^P. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит Хаа^PХаа^AХаа^PХааХаа^PХаа^AХаа^P. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит Хаа^PХаа^PХаа^AХаа^AХаа^P. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит Хаа^PХаа^PХаа^PХаа^A. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит два или более Хаа^AХаа^AХаа^P. В некоторых вариантах осуществления пептидный остаток содержит один или более остатков пролина. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит HWRGWA (SEQ ID NO:1). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит WGRR (SEQ ID NO:2). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит RRGW (SEQ ID NO:3). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит NKFRGKYK (SEQ ID NO:4). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит NRFRGKYK (SEQ ID NO:5). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит NARKFYK (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит NARKFYKG (SEQ ID NO:7). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит HWRGWV (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит KHFRNKD (SEQ ID NO:9). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит положительно заряженный аминокислотный остаток, ароматический

аминокислотный остаток и аминокислотный остаток, например остаток аминокислоты формулы **A-I**, который имеет отрицательно заряженную боковую цепь (например, при физиологическом pH около 7,4, «отрицательно заряженный аминокислотный остаток, Хаа^N). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит RHRFNKD (SEQ ID NO:10). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой RHRFNKD (SEQ ID NO:10). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит TY. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой TY. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит TYK. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой TYK. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит RTY. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой RTY. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит RTYK (SEQ ID NO:11). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой RTYK (SEQ ID NO:11). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из PAM. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит WHL. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой WHL. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит WXL, где X представляет собой аминокислотный остаток, описанный в данном документе, например, подходящий для соединения с другим фрагментом (например, аминокислотный остаток, содержащий –COOH, или его соль или активированная форма, такая как D, E и т. д.). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит WDL. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой WDL. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит ELVW (SEQ ID NO:12). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой ELVW (SEQ ID NO:12). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит GELVW (SEQ ID NO:13). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой GELVW (SEQ ID NO:13). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из AWHLGELVW (SEQ ID NO:14). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит AWHLGELVW (SEQ ID NO:14). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из AWDLGELVW (SEQ ID NO:15). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит AWDLGELVW (SEQ ID NO:15). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит AWWLGELVW (SEQ ID NO:16), где X представляет собой аминокислотный остаток, описанный в

данном документе, например, подходящий для соединения с другим фрагментом (например, аминокислотный остаток, содержащий –COOH, или его соль или активированная форма, такая как D, E и т. д.). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:17), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:17), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из DCAWXLGELVWCT (SEQ ID NO:18), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках, а X представляет собой аминокислотный остаток, описанный в данном документе, например, подходящий для соединения с другим фрагментом (например, аминокислотный остаток, содержащий –COOH, или его соль или активированная форма, такая как D, E и т. д.). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит DCAWXLGELVWCT (SEQ ID NO:18), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках, а X представляет собой аминокислотный остаток, описанный в данном документе, например, подходящий для соединения с другим фрагментом (например, аминокислотный остаток, содержащий –COOH, или его соль или активированная форма, такая как D, E и т. д.). В некоторых вариантах осуществления X содержит –COOH, или его соль или активированную форму в своей боковой цепи. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из DCAWDLGELVWCT (SEQ ID NO:19), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит DCAWDLGELVWCT (SEQ ID NO:19), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из Fc-III. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит Fc-III. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из DrLpAWXLGELVW (SEQ ID NO:20), где X представляет собой аминокислотный остаток, описанный в данном документе, например, подходящий для соединения с другим фрагментом (например, аминокислотный остаток, содержащий –COOH, или его соль или активированная форма, такая как

D, E и т. д.). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит DpLpAWXLGELVW (SEQ ID NO:20), где X представляет собой аминокислотный остаток, описанный в данном документе, например, подходящий для соединения с другим фрагментом (например, аминокислотный остаток, содержащий –COOH, или его соль или активированная форма, такая как D, E и т. д.). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из DpLpAWDLGELVW (SEQ ID NO:21). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит DpLpAWDLGELVW (SEQ ID NO:21). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из DpLpAWHLGELVW (SEQ ID NO:22), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит DpLpAWHLGELVW (SEQ ID NO:22) (например, FcBP-1), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из FcBP-1. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из DpLpDCAWXLGELVWCT (SEQ ID NO:23), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках, а X представляет собой аминокислотный остаток, описанный в данном документе, например, подходящий для соединения с другим фрагментом (например, аминокислотный остаток, содержащий –COOH, или его соль или активированная форма, такая как D, E и т. д.). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит DpLpDCAWXLGELVWCT (SEQ ID NO:23), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках, а X представляет собой аминокислотный остаток, описанный в данном документе, например, подходящий для соединения с другим фрагментом (например, аминокислотный остаток, содержащий –COOH, или его соль или активированная форма, такая как D, E и т. д.). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из DpLpDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:24), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит DpLpDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:24) (например, FcBP-2), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено

представляет собой или содержит последовательность, выбранную из DpLpDCAWDLGELVWCT (SEQ ID NO:25), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит DpLpDCAWDLGELVWCT (SEQ ID NO:25), где два остатка цистеина могут образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из FcBP-2. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из CDCAWXLGELVWCTC (SEQ ID NO:26), где первый и последний остатки цистеина и два цистеина в середине последовательности, каждый, могут независимо образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках, а X представляет собой аминокислотный остаток, описанный в данном документе, например, подходящий для соединения с другим фрагментом (например, аминокислотный остаток, содержащий –COOH, или его соль или активированная форма, такая как D, E и т. д.). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит CDCAWXLGELVWCTC (SEQ ID NO:26), где первый и последний остатки цистеина и два цистеина в середине последовательности, каждый, могут независимо образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках, а X представляет собой аминокислотный остаток, описанный в данном документе, например, подходящий для соединения с другим фрагментом (например, аминокислотный остаток, содержащий –COOH, или его соль или активированная форма, такая как D, E и т. д.). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из CDCAWHLGELVWCTC (SEQ ID NO:27), где первый и последний остатки цистеина и два цистеина в середине последовательности, каждый, могут независимо образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит CDCAWHLGELVWCTC (SEQ ID NO:27), где первый и последний остатки цистеина и два цистеина в середине последовательности, каждый, могут независимо образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из CDCAWDLGELVWCTC (SEQ ID NO:28), где первый и последний остатки цистеина и два цистеина в середине последовательности, каждый, могут независимо образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит CDCAWDLGELVWCTC (SEQ ID NO:28), где первый и последний остатки цистеина и два цистеина в середине последовательности,

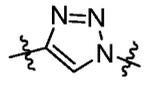
каждый, могут независимо образовывать дисульфидную связь, встречающуюся в природных белках. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из Fc-III-4с. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит последовательность, выбранную из FcRM. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено представляет собой или содержит циклическое пептидное звено. В некоторых вариантах осуществления циклическое пептидное звено содержит амидную группу, образованную аминогруппой боковой цепи и С-концевой группой –COOH. Для специалистов в данной области техники очевидно, что в различных вариантах осуществления, когда пептидное звено соединено с другим фрагментом, аминокислотный остаток пептидного звена может быть соединен в различных положениях, например, в его остове, боковой цепи и т. д. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток модифицирован для соединения. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток замещен другим подходящим остатком для соединения с сохранением при этом одного или более свойств и/или видов активности пептидного звена (например, связывания с антителом, как описано в данном документе). Например, в некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком с боковой цепью, содержащей –COOH, или ее солью или активированной формой (например, боковой цепью, представляющей собой –CH₂–COOH или ее соль или активированную форму). Как проиллюстрировано в данном документе, в различных последовательностях H может быть замещен D (например, в различных пептидных звеньях, содержащих WHL). В некоторых вариантах осуществления пептидное звено соединено с другим фрагментом посредством –COOH, или ее соли или активированной формы, например, посредством образования, например, –CON(R')–. В некоторых вариантах осуществления R' представляет собой –H. В некоторых вариантах осуществления –COOH находится в боковой цепи аминокислотного остатка. В некоторых вариантах осуществления в описанной в данном документе последовательности (например, DCAWHLGELVWCT, SEQ ID NO:17), 1–5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных остатков могут быть независимо и необязательно замещены другим аминокислотным остатком, 1–5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных остатков могут быть независимо и необязательно удалены и/или 1–5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных остатков могут быть независимо и необязательно вставлены. В некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент соединен с остатком молекулы через свой N-конец. В некоторых вариантах осуществления он соединен с остатком молекулы через свой С-конец. В некоторых вариантах осуществления он соединен с остатком молекулы через боковую цепь

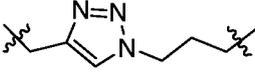
аминокислотного остатка (например, различных остатков X, как описано в настоящем изобретении). В некоторых вариантах осуществления два остатка цистеина могут независимо и необязательно образовывать дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления общее число замещений, делеций и вставок составляет не более 10 (например, 0 или не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10). В некоторых вариантах осуществления общее число равно 0. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 1. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 2. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 3. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 4. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 5. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 6. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 7. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 8. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 9. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 10. В некоторых вариантах осуществления отсутствуют вставки. В некоторых вариантах осуществления отсутствуют делеции.

[128] В некоторых вариантах осуществления $-(Xaa)_z-$ представляет собой или содержит $[X^1]_{p1}[X^2]_{p2}-X^3X^4X^5X^6X^7X^8X^9X^{10}X^{11}X^{12}-[X^{13}]_{p13}-[X^{14}]_{p14}[X^{15}]_{p15}[X^{16}]_{p16}$, где каждый из $X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8, X^9, X^{10}, X^{11}, X^{12}$ и X^{13} независимо представляет собой аминокислотный остаток, например аминокислоты формулы **A-I**, а каждое из $p1, p2, p13, p14, p15$ и $p16$ независимо равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления каждый из $X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8, X^9, X^{10}, X^{11}, X^{12}$ и X^{13} независимо представляет собой аминокислотный остаток аминокислоты формулы **A-I**. В некоторых вариантах осуществления каждый из $X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8, X^9, X^{10}, X^{11}, X^{12}$ и X^{13} независимо представляет собой природный аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления один или более из $X^1, X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8, X^9, X^{10}, X^{11}, X^{12}$ и X^{13} независимо представляют собой неприродный аминокислотный остаток, как описано в настоящем изобретении.

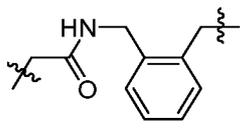
[129] В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит функциональную группу в аминокислотном остатке, которая может реагировать с функциональной группой другого аминокислотного остатка. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит аминокислотный остаток с боковой цепью, которая содержит функциональную группу, которая может реагировать с другой функциональной группой боковой цепи другого аминокислотного остатка с образованием связи (например, смотрите

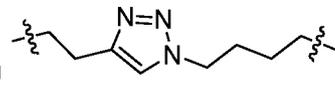
фрагменты, описанные в таблице А-1, примере 8 и т. д.). В некоторых вариантах осуществления функциональная группа одного аминокислотного остатка соединена с функциональной группой другого аминокислотного остатка с образованием связи (или мостика). Связи соединены с атомами остова пептидных звеньев и не содержат атомы остова. В некоторых вариантах осуществления пептидное звено содержит связь, образованную двумя боковыми цепями несоседних аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления связь соединена с двумя атомами остова двух несоседних аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления оба атома остова, соединенные со связью, представляют собой атомы углерода. В некоторых вариантах осуществления связь имеет структуру L^b , где L^b представляет собой L^a , описанный в настоящем изобретении, где L^a не представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^a содержит $-Su-$. В некоторых вариантах осуществления L^a содержит $-Su-$, где $-Su-$ представляет собой необязательно замещенный гетероарил. В некоторых

вариантах осуществления $-Su-$ представляет собой . В некоторых вариантах

осуществления L^a представляет собой . В некоторых вариантах

осуществления такой L^a может быть образован группой $-N_3$ боковой цепи одного аминокислотного остатка и $-≡-$ боковой цепи другого аминокислотного остатка. В некоторых вариантах осуществления связь образована посредством соединения двух тиольных групп, например, двух остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления L^a содержит $-S-S-$. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой $-CH_2-S-S-CH_2-$. В некоторых вариантах осуществления связь образована посредством соединения аминогруппы (например, $-NH_2$ в боковой цепи остатка лизина) и карбоксильной группы (например, $-COOH$ в боковой цепи остатка аспарагиновой кислоты или глутаминовой кислоты). В некоторых вариантах осуществления L^a содержит $-C(O)-N(R')-$. В некоторых вариантах осуществления L^a содержит $-C(O)-NH-$. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой $-CH_2CONH-(CH_2)_3-$. В некоторых вариантах осуществления L^a содержит $-C(O)-N(R')-$, где R' представляет собой R и вместе с группой R на пептидном остове образует кольцо (например, в А-34). В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой $-(CH_2)_2-N(R')-CO--(CH_2)_2-$. В некоторых вариантах осуществления $-Su-$ представляет собой необязательно замещенный фенилен. В некоторых вариантах осуществления $-Su-$ представляет собой необязательно замещенный 1,2-фенилен. В

некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой . В некоторых

вариантах осуществления L^a представляет собой . В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой необязательно замещенный двухвалентный C_{2-20} алифатический фрагмент. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой необязательно замещенный $-(CH_2)_9-CH=CH-(CH_2)_9-$. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой $-(CH_2)_3-CH=CH-(CH_2)_3-$.

[130] В некоторых вариантах осуществления два аминокислотных остатка, соединенных со связью, разделены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более чем 15 аминокислотными остатками между ними (за исключением двух аминокислотных остатков, соединенных со связью). В некоторых вариантах осуществления число равно 1. В некоторых вариантах осуществления число равно 2. В некоторых вариантах осуществления число равно 3. В некоторых вариантах осуществления число равно 4. В некоторых вариантах осуществления число равно 5. В некоторых вариантах осуществления число равно 6. В некоторых вариантах осуществления число равно 7. В некоторых вариантах осуществления число равно 8. В некоторых вариантах осуществления число равно 9. В некоторых вариантах осуществления число равно 10. В некоторых вариантах осуществления число равно 11. В некоторых вариантах осуществления число равно 12. В некоторых вариантах осуществления число равно 13. В некоторых вариантах осуществления число равно 14. В некоторых вариантах осуществления число равно 15.

[131] В некоторых вариантах осуществления каждое из $p_1, p_2, p_{13}, p_{14}, p_{15}$ и p_{16} равно 0. В некоторых вариантах осуществления $-(X_{aa})_z-$ представляет собой или содержит $-X^3X^4X^5X^6X^7X^8X^9X^{10}X^{11}X^{12}-$, где:

каждый из $X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8, X^9, X^{10}, X^{11}$ и X^{12} независимо представляет собой аминокислотный остаток;

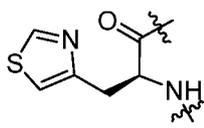
X^6 представляет собой X_{aa}^A или X_{aa}^P ;

X^9 представляет собой X_{aa}^N ; и

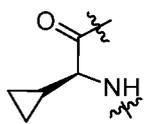
X^{12} представляет собой X_{aa}^A или X_{aa}^P .

В некоторых вариантах осуществления каждый из $X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8, X^9, X^{10}, X^{11}$ и X^{12} независимо представляет собой аминокислотный остаток аминокислоты формулы **A-I**, как описано в настоящем

изобретении. В некоторых вариантах осуществления X^5 представляет собой Xaa^A или Xaa^P . В некоторых вариантах осуществления X^5 представляет собой Xaa^A . В некоторых вариантах осуществления X^5 представляет собой Xaa^P . В некоторых вариантах осуществления X^5 представляет собой аминокислотный остаток, чья боковая цепь содержит необязательно замещенное насыщенное, частично насыщенное или ароматическое кольцо. В некоторых вариантах

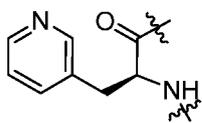


осуществления X^5 представляет собой . В некоторых вариантах осуществления X^5

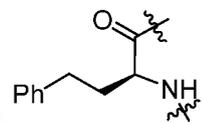


представляет собой . В некоторых вариантах осуществления X^6 представляет собой Xaa^A .

В некоторых вариантах осуществления X^6 представляет собой Xaa^P . В некоторых вариантах осуществления X^6 представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления X^{12} представляет собой Xaa^A . В некоторых вариантах осуществления X^{12} представляет собой Xaa^P . В некоторых вариантах осуществления X^9 представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления X^9 представляет собой Glu. В некоторых вариантах осуществления X^{12} представляет собой

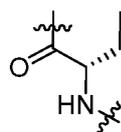


. В некоторых вариантах осуществления X^{12} представляет собой



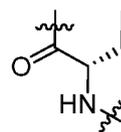
. В

некоторых вариантах осуществления каждый из X^7 , X^{10} и X^{11} независимо представляет собой аминокислотный остаток с гидрофобной боковой цепью («гидрофобный аминокислотный остаток», Xaa^H). В некоторых вариантах осуществления X^7 представляет собой Xaa^H . В некоторых вариантах



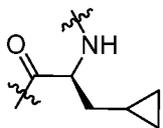
осуществления X^7 представляет собой . В некоторых вариантах осуществления X^7

представляет собой Val. В некоторых вариантах осуществления X^{10} представляет собой Xaa^H . В некоторых вариантах осуществления X^{10} представляет собой Met. В некоторых вариантах



осуществления X^{10} представляет собой . В некоторых вариантах осуществления X^{11}

представляет собой Xaa^H . В некоторых вариантах осуществления X^{11} представляет собой



. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления X^4 представляет собой Pro. В некоторых вариантах осуществления X^3 представляет собой Lys. В некоторых вариантах осуществления $-\text{COOH}$ из X^{12} образует амидную связь с аминогруппой боковой цепи Lys (X^3), а другая аминогруппа Lys (X^3) соединена с линкерным фрагментом, а затем со связывающим мишень фрагментом.

[132] В некоторых вариантах осуществления $-(\text{Xaa})_z-$ представляет собой или содержит $-\text{X}^3\text{X}^4\text{X}^5\text{X}^6\text{X}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{X}^{12}-$, где:

каждый из X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , X^7 , X^8 , X^9 , X^{10} , X^{11} и X^{12} независимо представляет собой аминокислотный остаток;

по меньшей мере два аминокислотных остатка соединены посредством одной или более связей L^b ;

L^b представляет собой 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 $-\text{C}(\text{R}')_2-$, $-\text{C}_y-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{S})-$, $-\text{C}(\text{NR}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ или $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, где L^b связан с атомом остова одного аминокислотного остатка и атомом остова другого аминокислотного остатка и не содержит атомов остова;

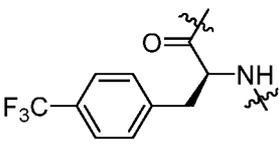
X^6 представляет собой Xaa^A или Xaa^P ;

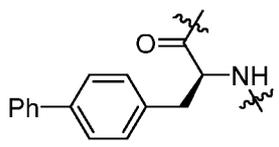
X^9 представляет собой Xaa^N ; и

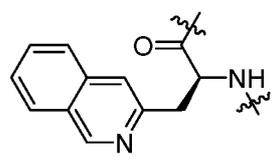
X^{12} представляет собой Xaa^A или Xaa^P .

В некоторых вариантах осуществления каждый из X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , X^7 , X^8 , X^9 , X^{10} , X^{11} и X^{12} независимо представляет собой аминокислотный остаток аминокислоты формулы **A-I**, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления два несоседних аминокислотных остатка соединены L^b . В некоторых вариантах осуществления X^5 и X^{10} соединены L^b . В некоторых вариантах осуществления присутствует одна связь L^b . В некоторых вариантах осуществления X^6 представляет собой Xaa^A . В некоторых вариантах осуществления X^6 представляет собой Xaa^P . В некоторых вариантах осуществления X^6 представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления X^9

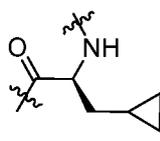
представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления X^9 представляет собой Glu. В некоторых вариантах осуществления X^{12} представляет собой Хаа^А. В некоторых вариантах

осуществления X^{12} представляет собой . В некоторых вариантах

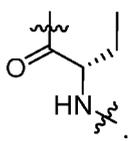
осуществления X^{12} представляет собой . В некоторых вариантах

осуществления X^{12} представляет собой . В некоторых вариантах

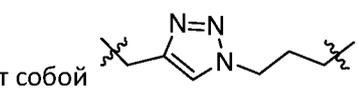
осуществления каждый из X^4 , X^7 и X^{11} независимо представляет собой Хаа^Н. В некоторых вариантах осуществления X^4 представляет собой Хаа^Н. В некоторых вариантах осуществления X^4 представляет собой Ala. В некоторых вариантах осуществления X^7 представляет собой Хаа^Н. В некоторых

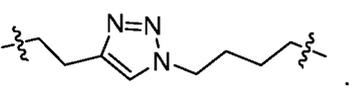
вариантах осуществления X^7 представляет собой . В некоторых вариантах

осуществления X^{11} представляет собой Хаа^Н. В некоторых вариантах осуществления X^{11}

представляет собой . В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления X^3 представляет собой Lys. В некоторых вариантах

осуществления $-COOH$ из X^{12} образует амидную связь с аминогруппой боковой цепи Lys (X^3), а другая аминогруппа Lys (X^3) соединена с линкерным фрагментом, а затем со связывающим мишень

фрагментом. В некоторых вариантах осуществления L^b представляет собой . В

некоторых вариантах осуществления L^b представляет собой . В

некоторых вариантах осуществления L^b соединяет два альфа-атома углерода двух разных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления как X^5 , так и X^{10} представляют собой Cys, а две группы $-SH$ их боковых цепей образуют $-S-S-$ (L^b представляет собой

-CH₂-S-S-CH₂-).

[133] В некоторых вариантах осуществления -(Xaa)_z- представляет собой или содержит -X²X³X⁴X⁵X⁶X⁷X⁸X⁹X¹⁰X¹¹X¹²-, где:

каждый из X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷, X⁸, X⁹, X¹⁰, X¹¹ и X¹² независимо представляет собой аминокислотный остаток;

по меньшей мере два аминокислотных остатка соединены посредством одной или более связей L^b;

L^b представляет собой необязательно замещенную двухвалентную группу, выбранную из C₁-C₂₀ алифатического или C₁-C₂₀ алифатического фрагмента, имеющего 1-5 гетероатомов, где одно или более метиленовых звеньев группы необязательно 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-, где L^b связан с атомом остова одного аминокислотного остатка и атомом остова другого аминокислотного остатка и не содержит атомов остова;

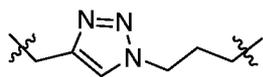
X⁴ представляет собой Xaa^A;

X⁵ представляет собой Xaa^A или Xaa^P;

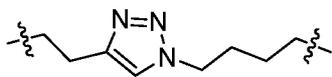
X⁸ представляет собой Xaa^N; и

X¹¹ представляет собой Xaa^A.

В некоторых вариантах осуществления каждый из X², X³, X⁴, X⁵, X⁶, X⁷, X⁸, X⁹, X¹⁰, X¹¹ и X¹² независимо представляет собой аминокислотный остаток аминокислоты формулы **A-I**, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления два несоседних аминокислотных остатка соединены L^b. В некоторых вариантах осуществления присутствует одна связь L^b. В некоторых вариантах осуществления X² и X¹² соединены L^b. В некоторых вариантах осуществления L^b представляет собой -CH₂-S-S-CH₂-. В некоторых вариантах осуществления L^b представляет собой -CH₂-CH₂-S-CH₂-. В некоторых вариантах осуществления L^b представляет собой



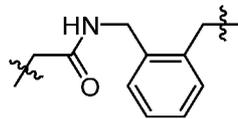
. В некоторых вариантах осуществления L^b представляет собой



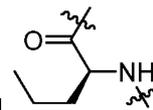
. В некоторых вариантах осуществления L^b представляет собой

-CH₂CH₂CO-N(R')-CH₂CH₂-. В некоторых вариантах осуществления R' вместе с группой R на атоме

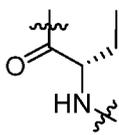
остова, так что $-N(R')-CH_2CH_2-$ является связанным, образуют кольцо, например, как в А-34. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо является 3-, 4-, 5-, 6-, 7- или 8-членным. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо является моноциклическим. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо является насыщенным. В некоторых



вариантах осуществления L^b представляет собой . В некоторых вариантах осуществления L^b соединяет два альфа-атома углерода двух разных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления X^4 представляет собой Хаа^А. В некоторых вариантах осуществления X^4 представляет собой Туг. В некоторых вариантах осуществления X^5 представляет собой Хаа^А. В некоторых вариантах осуществления X^5 представляет собой Хаа^Р. В некоторых вариантах осуществления X^5 представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Glu. X^{11} представляет собой Туг. В некоторых вариантах осуществления как X^2 , так и X^{12} представляют собой Cys, а две группы $-SH$ их боковых цепей образуют $-S-S-$ (L^b представляет собой $-CH_2-S-S-CH_2-$). В некоторых вариантах осуществления каждый из X^3 , X^6 , X^9 и X^{10} независимо представляет собой Хаа^Н. В некоторых вариантах осуществления X^3 представляет собой Хаа^Н. В некоторых вариантах осуществления X^3 представляет собой Ala. В некоторых вариантах осуществления X^6 представляет собой Хаа^Н. В некоторых вариантах осуществления X^6 представляет собой Leu. В некоторых вариантах осуществления X^9 представляет собой Хаа^Н. В некоторых вариантах осуществления X^9



представляет собой Leu. В некоторых вариантах осуществления X^9 представляет собой . В некоторых вариантах осуществления X^{10} представляет собой Хаа^Н. В некоторых вариантах осуществления X^{10} представляет собой Val. В некоторых вариантах осуществления X^{10} представляет



собой . В некоторых вариантах осуществления X^7 представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления r_1 равно 1. В некоторых вариантах осуществления X^1 представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления r_{13} равно 1. В некоторых вариантах осуществления r_{14} , r_{15} и r_{16} равны 0. В некоторых вариантах осуществления X^{13} представляет собой аминокислотный остаток, содержащий полярную незаряженную боковую цепь (например при физиологическом pH, «полярный незаряженный аминокислотный остаток, Хаа^Л). В некоторых вариантах осуществления

X^{13} представляет собой Thr. В некоторых вариантах осуществления X^{13} представляет собой Val. В некоторых вариантах осуществления p_{13} равно 0. В некоторых вариантах осуществления R^c представляет собой $-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$. В некоторых вариантах осуществления R^c представляет собой $(R)-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$. В некоторых вариантах осуществления R^c представляет собой $(S)-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$.

[134] В некоторых вариантах осуществления $-(\text{Xaa})_z-$ представляет собой или содержит $-\text{X}^2\text{X}^3\text{X}^4\text{X}^5\text{X}^6\text{X}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{X}^{12}-$, где:

каждый из $X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8, X^9, X^{10}, X^{11}$ и X^{12} независимо представляет собой аминокислотный остаток;

по меньшей мере два аминокислотных остатка соединены посредством одной или более связей L^b ;

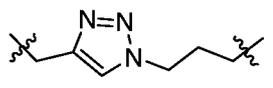
L^b представляет собой необязательно замещенную двухвалентную группу, выбранную из C_{1-20} алифатического или C_1-C_{20} алифатического фрагмента, имеющего 1–5 гетероатомов, где одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $-\text{C}(\text{R}')_2-$, $-\text{C}\gamma-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{S})-$, $-\text{C}(\text{NR}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ или $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, где L^b связан с атомом остова одного аминокислотного остатка и атомом остова другого аминокислотного остатка и не содержит атомов остова;

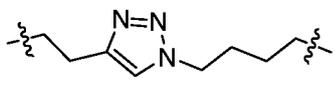
X^5 представляет собой Xaa^A или Xaa^P ;

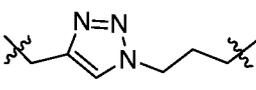
X^8 представляет собой Xaa^N ; и

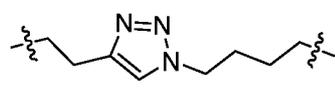
X^{11} представляет собой Xaa^A .

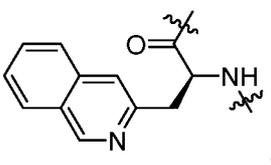
В некоторых вариантах осуществления каждый из $X^2, X^3, X^4, X^5, X^6, X^7, X^8, X^9, X^{10}, X^{11}$ и X^{12} независимо представляет собой аминокислотный остаток аминокислоты формулы **A-I**, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления два несоседних аминокислотных остатка соединены L^b . В некоторых вариантах осуществления присутствует одна связь L^b . В некоторых вариантах осуществления присутствуют две или более связей L^b . В некоторых вариантах осуществления присутствуют две связи L^b . В некоторых вариантах осуществления X^2 и X^{12} соединены L^b . В некоторых вариантах осуществления X^4 и X^9 соединены L^b . В некоторых вариантах осуществления X^4 и X^{10} соединены L^b . В некоторых вариантах осуществления L^b представляет собой

$-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^b представляет собой 

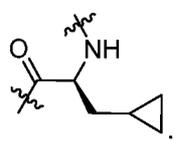
. В некоторых вариантах осуществления L^b представляет собой . В некоторых вариантах осуществления как X^2 , так и X^{12} представляют собой Cys, а две группы $-\text{SH}$ их боковых цепей образуют $-\text{S}-\text{S}-$ (L^b представляет собой $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-$). В некоторых вариантах осуществления как X^4 , так и X^{10} представляют собой Cys, а две группы $-\text{SH}$ их боковых цепей образуют $-\text{S}-\text{S}-$ (L^b представляет собой $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-$). В некоторых вариантах осуществления X^4 и

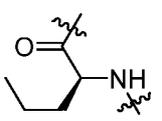
X^9 соединены L^b , где L^b представляет собой . В некоторых вариантах

осуществления X^4 и X^9 соединены L^b , где L^b представляет собой . В некоторых вариантах осуществления X^5 представляет собой Хаа^A. В некоторых вариантах осуществления X^5 представляет собой Хаа^P. В некоторых вариантах осуществления X^5 представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Glu. В некоторых вариантах осуществления X^{11} представляет

собой Tug. В некоторых вариантах осуществления X^{11} представляет собой . В

некоторых вариантах осуществления X^2 и X^{12} соединены L^b , где L^b представляет собой $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^b соединяет два альфа-атома углерода двух разных аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления каждый из X^3 , X^6 и X^9 независимо представляет собой Хаа^H. В некоторых вариантах осуществления X^3 представляет собой Хаа^H. В некоторых вариантах осуществления X^3 представляет собой Ala. В некоторых вариантах осуществления X^6 представляет собой Хаа^H. В некоторых вариантах осуществления X^6 представляет

собой Leu. В некоторых вариантах осуществления X^6 представляет собой . В некоторых вариантах осуществления X^9 представляет собой Хаа^H. В некоторых вариантах осуществления X^9

представляет собой Leu. В некоторых вариантах осуществления X^9 представляет собой 

. В некоторых вариантах осуществления X^{10} представляет собой Xaa^H . В некоторых вариантах осуществления X^{10} представляет собой Val. В некоторых вариантах осуществления X^7 представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления p_1 равно 1. В некоторых вариантах осуществления X^1 представляет собой Xaa^N . В некоторых вариантах осуществления X^1 представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления X^1 представляет собой Glu. В некоторых вариантах осуществления p_{13} равно 1. В некоторых вариантах осуществления p_{14} , p_{15} и p_{16} равны 0. В некоторых вариантах осуществления X^{13} представляет собой Xaa^L . В некоторых вариантах осуществления X^{13} представляет собой Thr. В некоторых вариантах осуществления X^{13} представляет собой Val.

[135] В некоторых вариантах осуществления $-(Xaa)_z-$ представляет собой или содержит $-X^2X^3X^4X^5X^6X^7X^8X^9X^{10}X^{11}X^{12}X^{13}X^{14}X^{15}X^{16}-$, где:

каждый из X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , X^7 , X^8 , X^9 , X^{10} , X^{11} , X^{12} , X^{13} , X^{14} , X^{15} и X^{16} независимо представляет собой аминокислотный остаток;

по меньшей мере два аминокислотных остатка соединены посредством связи L^b ;

L^b представляет собой необязательно замещенную двухвалентную группу, выбранную из C_{1-20} 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 $-C(O)O-$, где L^b связан с атомом остова одного аминокислотного остатка и атомом остова другого аминокислотного остатка и не содержит атомов остова;

X^3 представляет собой Xaa^N ;

X^6 представляет собой Xaa^A ;

X^7 представляет собой Xaa^A или Xaa^P ;

X^9 представляет собой Xaa^N ; и

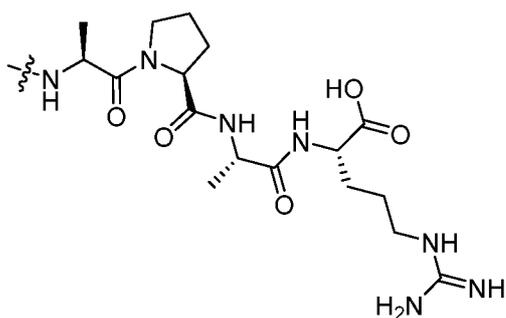
X^{13} представляет собой Xaa^A .

В некоторых вариантах осуществления каждый из X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , X^6 , X^7 , X^8 , X^9 , X^{10} , X^{11} и X^{12} независимо представляет собой аминокислотный остаток аминокислоты формулы **A-I**, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления два несоседних аминокислотных остатка

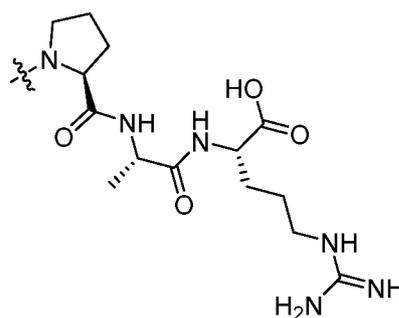
соединены L^b. В некоторых вариантах осуществления присутствует одна связь L^b. Как очевидно для специалистов в данной области техники, аминокислотный остаток может быть замещен другим аминокислотным остатком, имеющих сходные свойства, например, один Хаа^H (например, Val, Leu и т. д.) может быть замещен другим Хаа^H (например, Leu, Ile, Ala и т. д.), один Хаа^A может быть замещен другим Хаа^A, один Хаа^P может быть замещен другим Хаа^P, один Хаа^N может быть замещен другим Хаа^N, один Хаа^L может быть замещен другим Хаа^L и т. д.

[136] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит необязательно замещенный фрагмент из таблицы A-1. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок фрагмент представляет собой или содержит необязательно замещенный фрагмент из таблицы A-1. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент, например универсальный связывающий антитело фрагмент, представляет собой или содержит необязательно замещенный фрагмент из таблицы A-1. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент выбран из таблицы A-1. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок фрагмент выбран из таблицы A-1. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент, например универсальный связывающий антитело фрагмент, выбран из таблицы A-1. В некоторых вариантах осуществления С-конец и/или N-конец необязательно кэпированы (например, в случае С-конца, путем преобразования -COOH в -C(O)N(R')₂, такой как -C(O)NH₂; в случае N-конца — путем добавления R'C(O)-, такого как CH₃C(O)-, к аминогруппе).

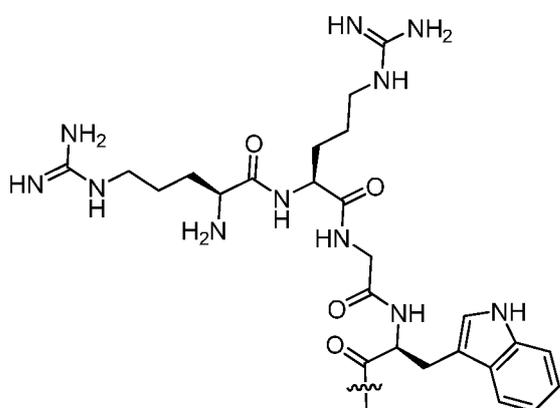
[137] Таблица A-1. Типовые связывающие антитело фрагменты.



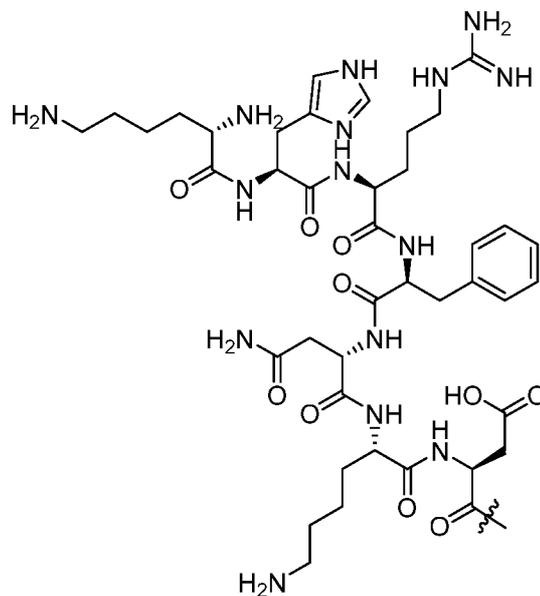
A-1



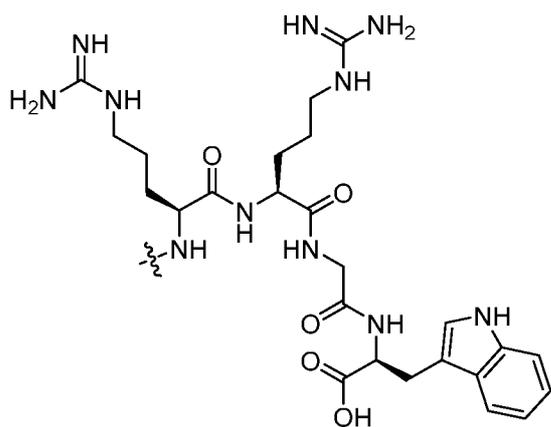
A-2



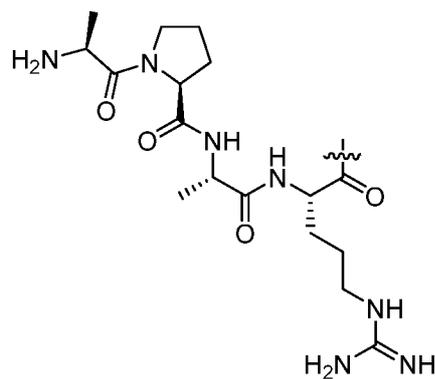
A-3



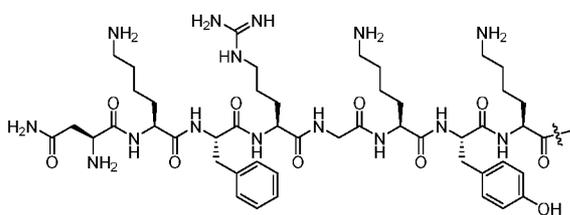
A-4



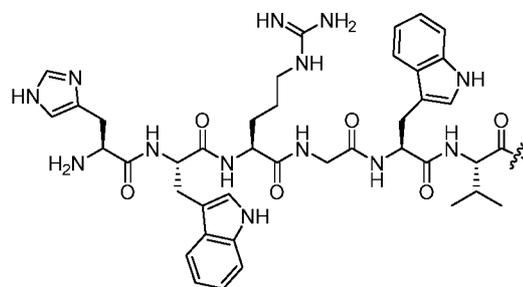
A-5



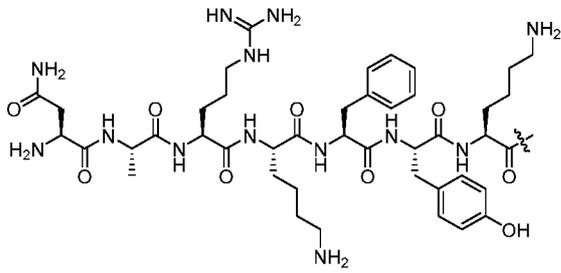
A-6



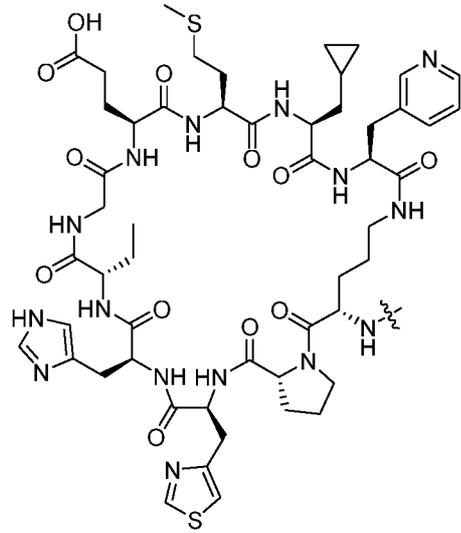
A-7



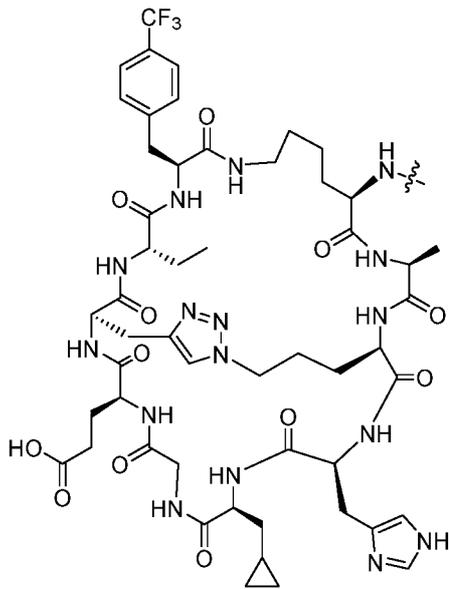
A-8



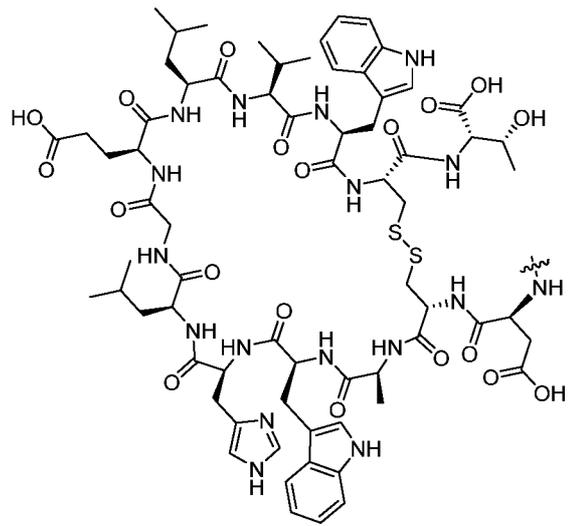
A-9



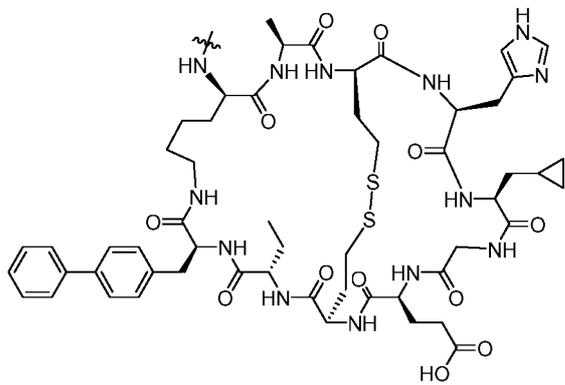
A-10



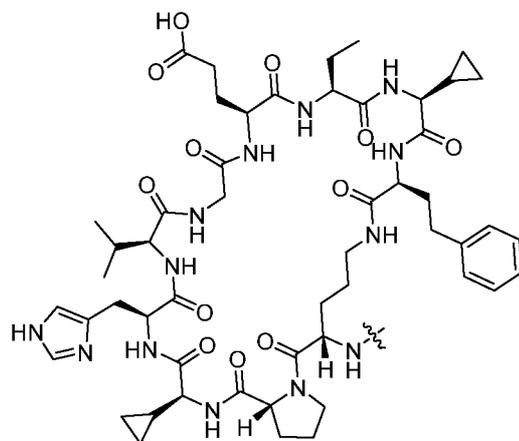
A-11



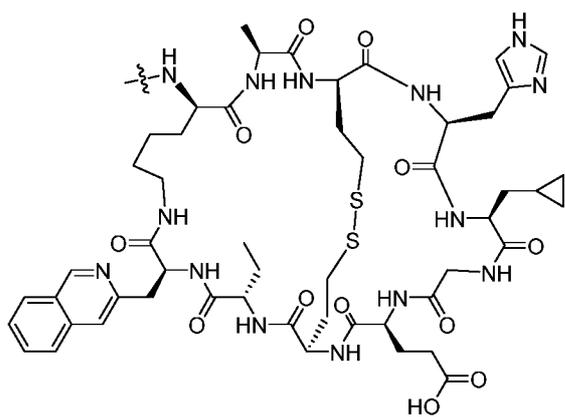
A-12



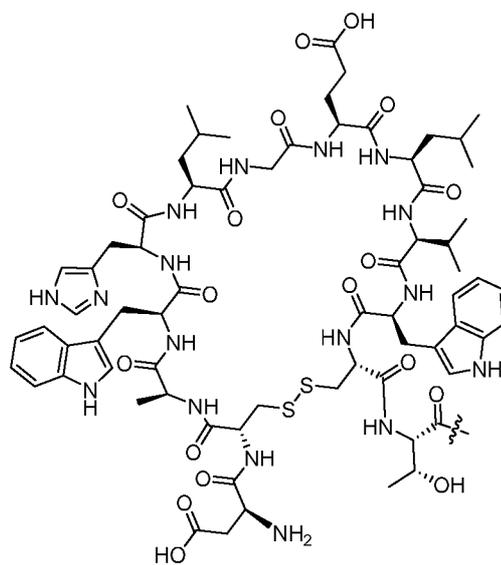
A-13



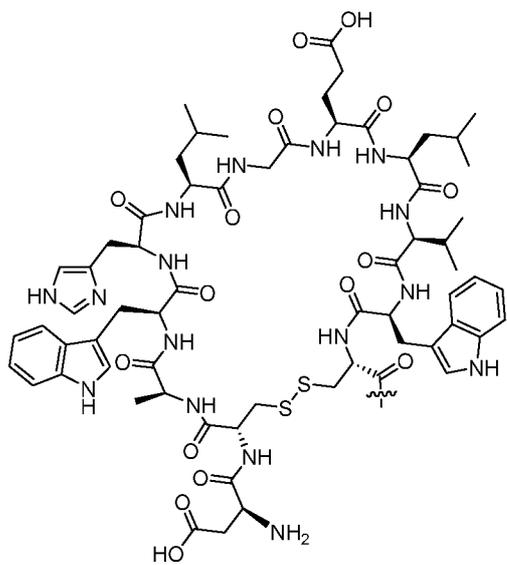
A-14



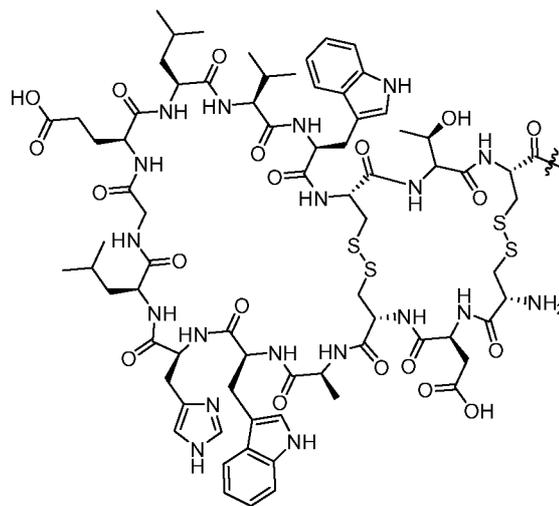
A-15



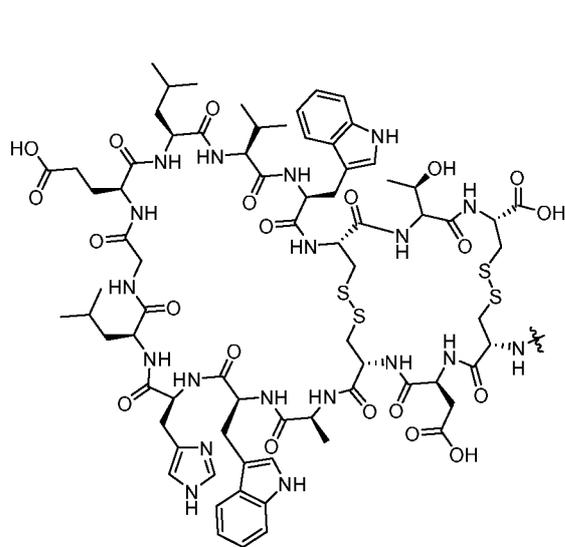
A-16



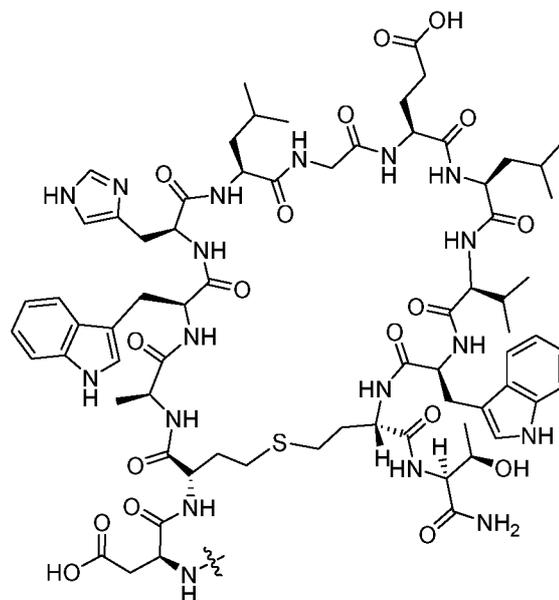
A-17



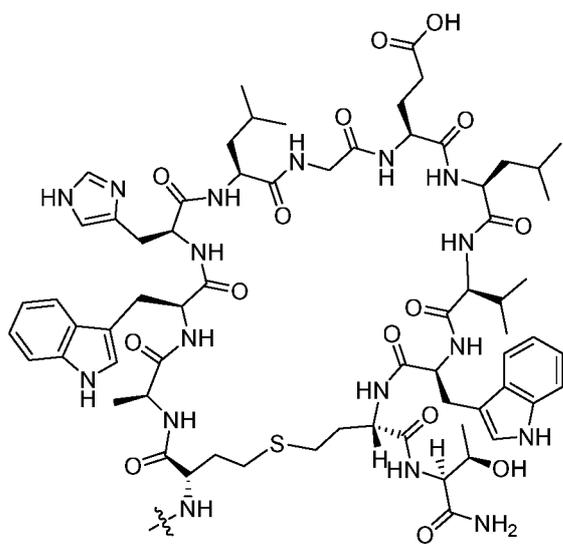
A-18



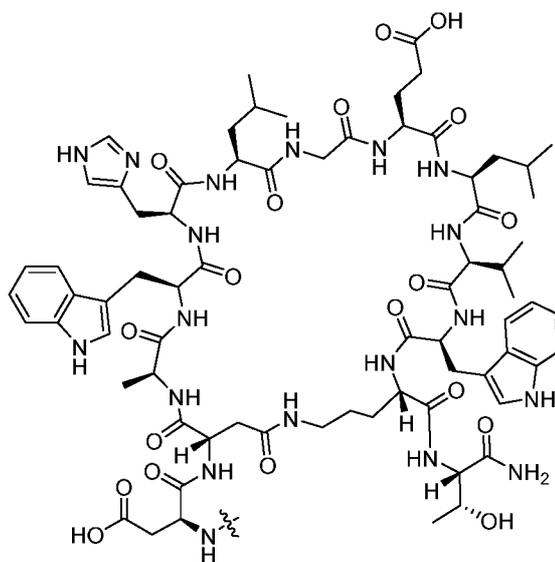
A-19



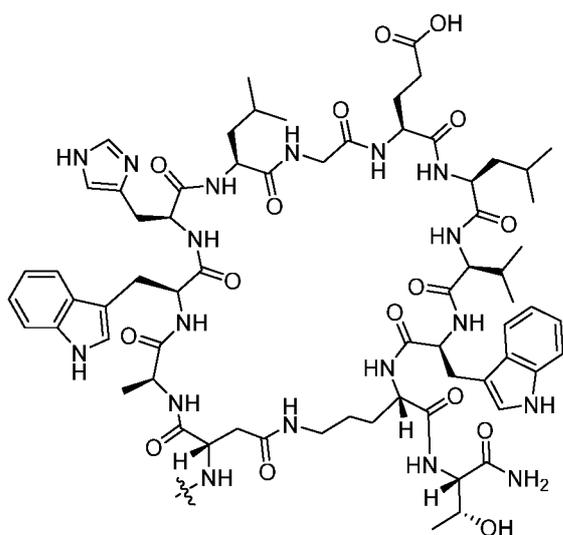
A-20



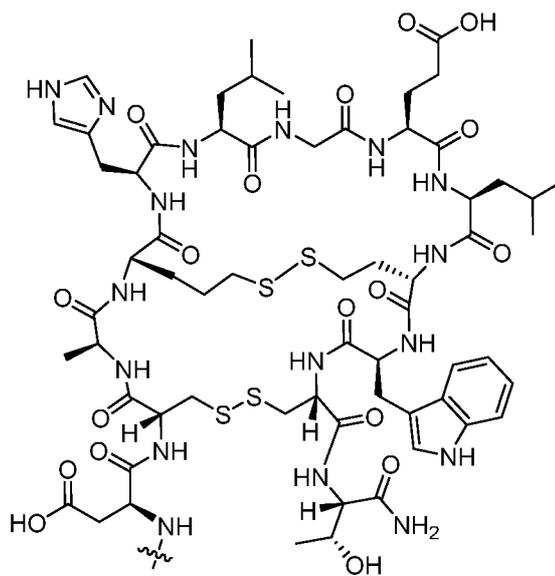
A-21



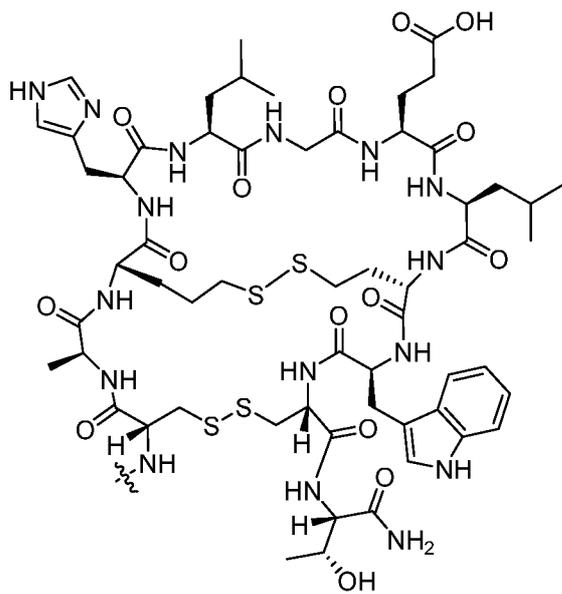
A-22



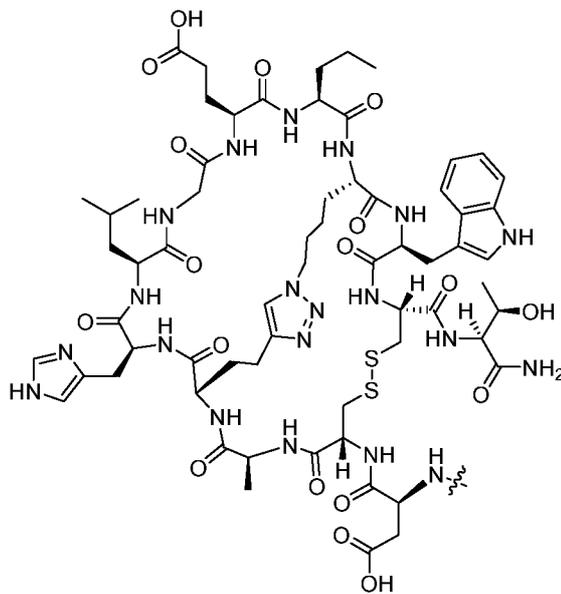
A-23



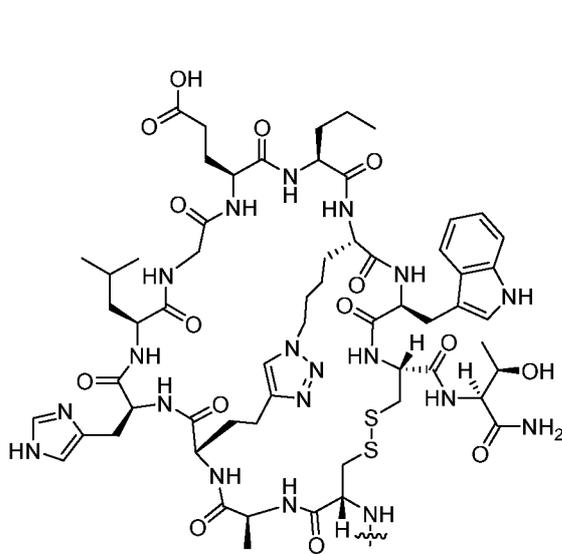
A-24



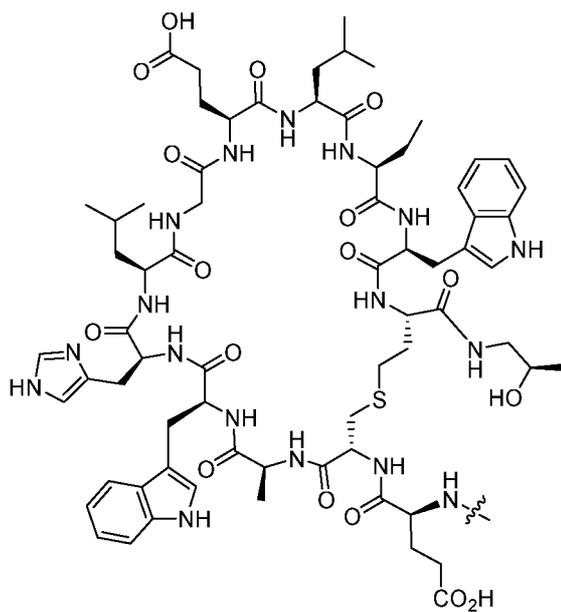
A-25



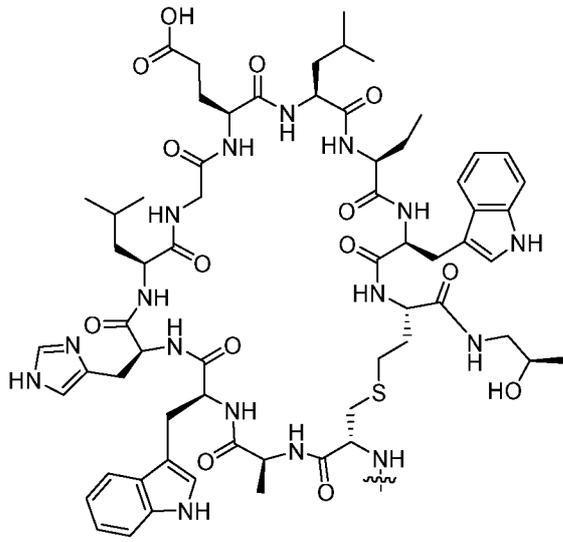
A-26



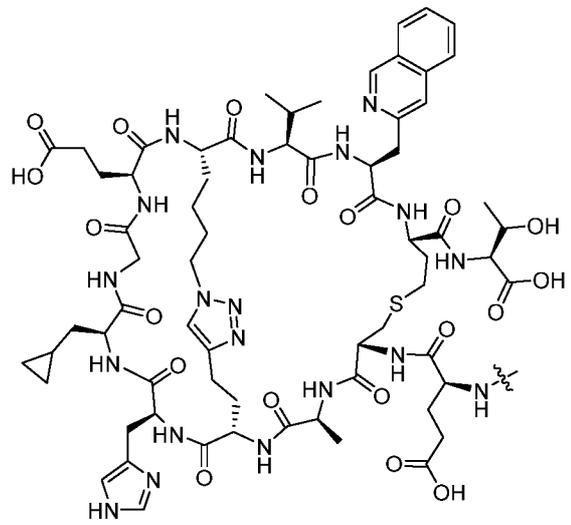
A-27



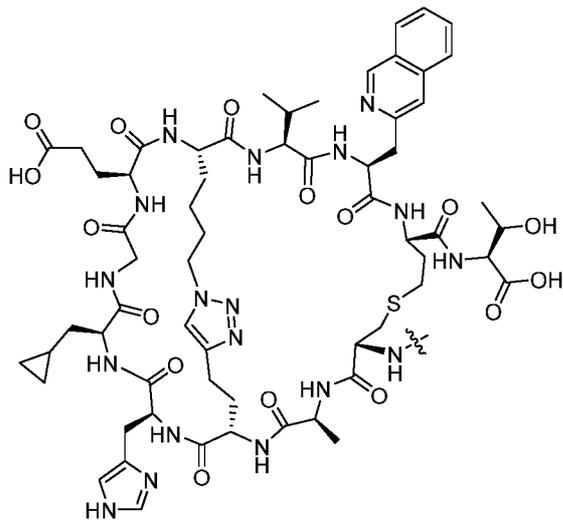
A-28



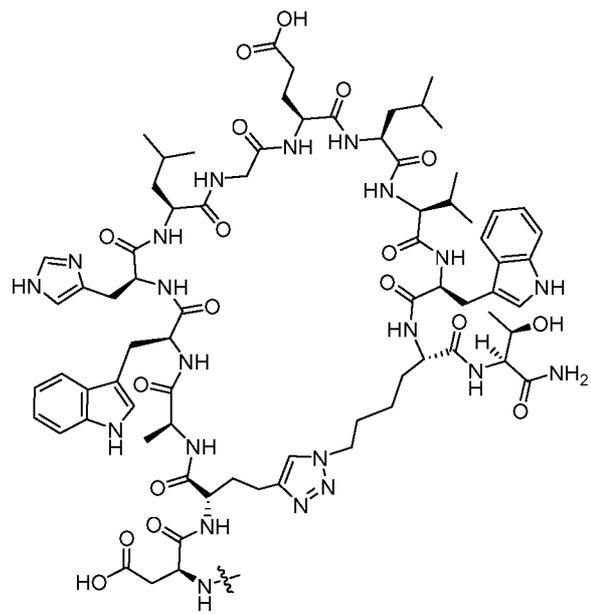
A-29



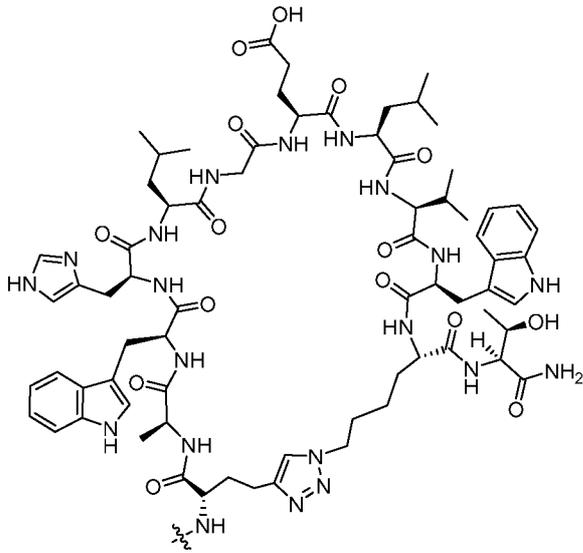
A-30



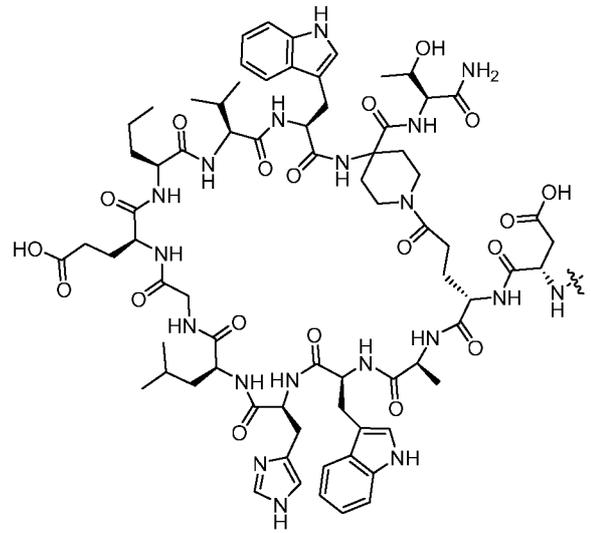
A-31



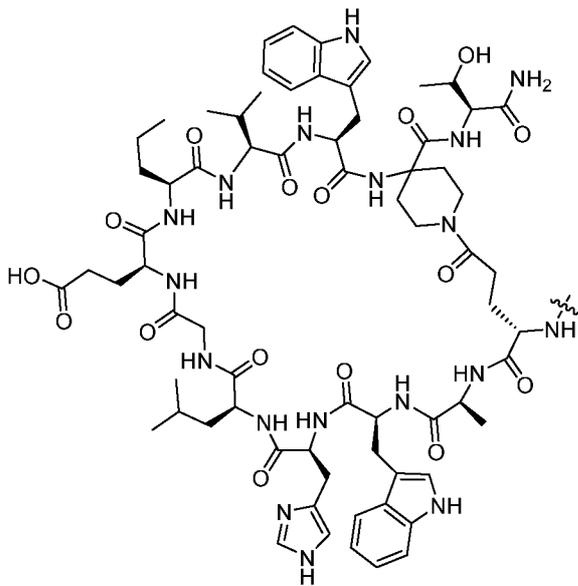
A-32



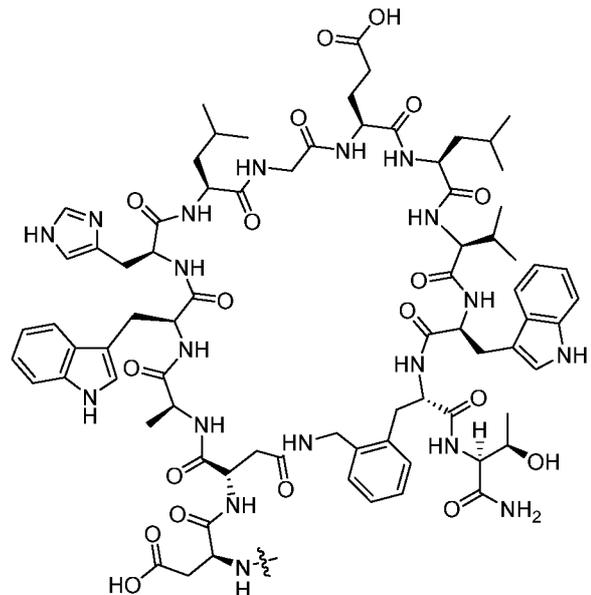
A-33



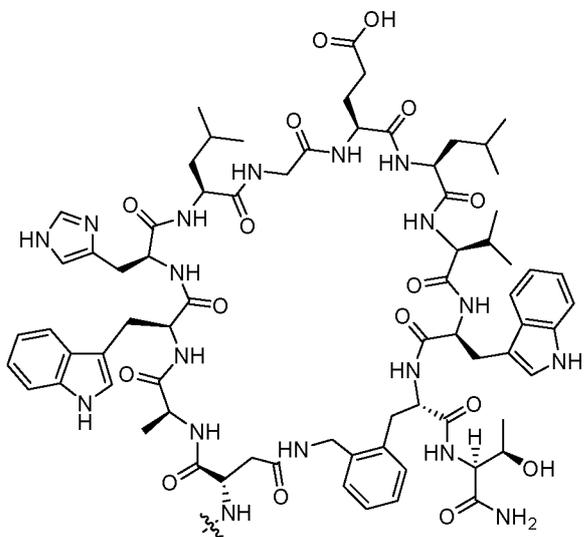
A-34



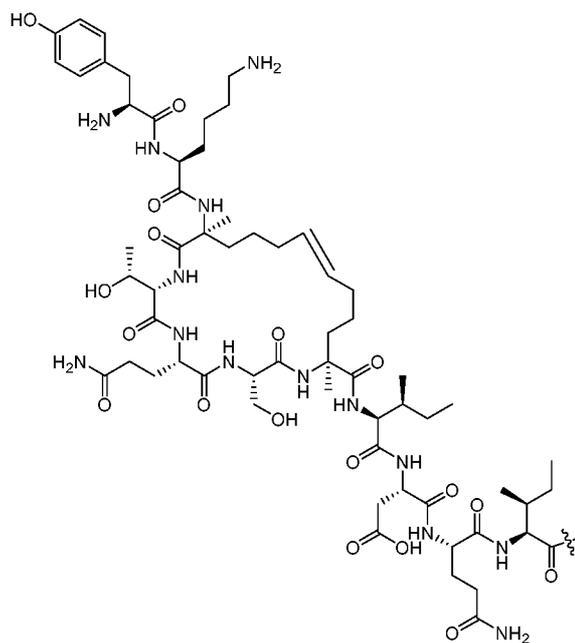
A-35



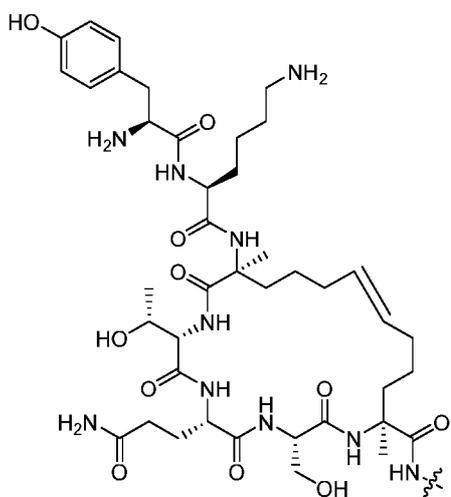
A-36



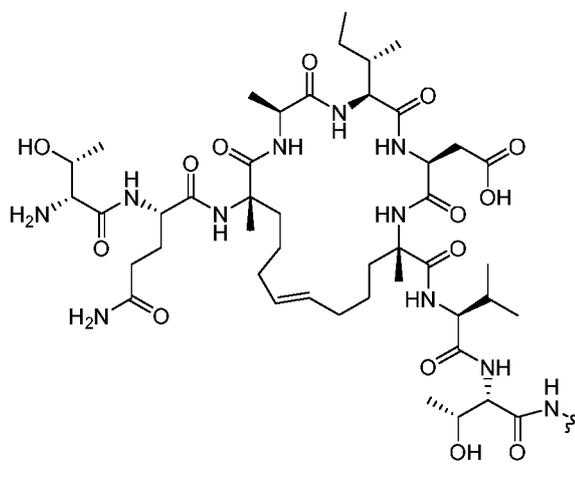
A-37



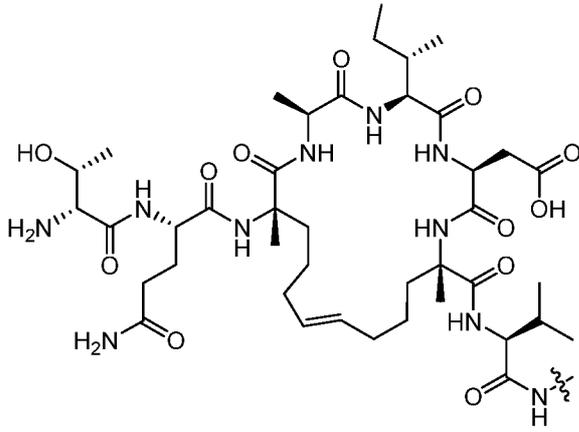
A-38



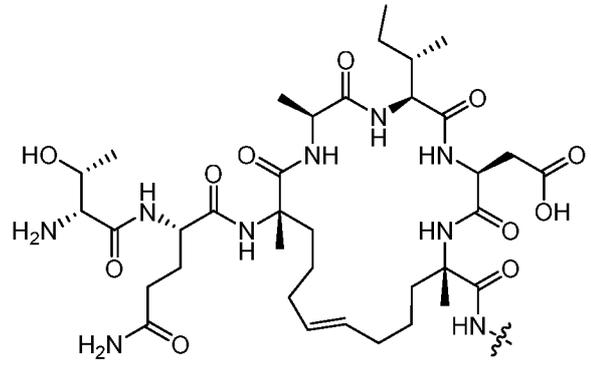
A-39



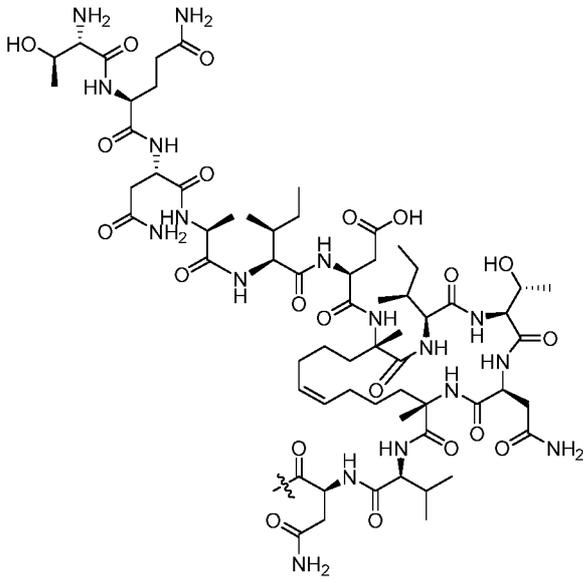
A-40



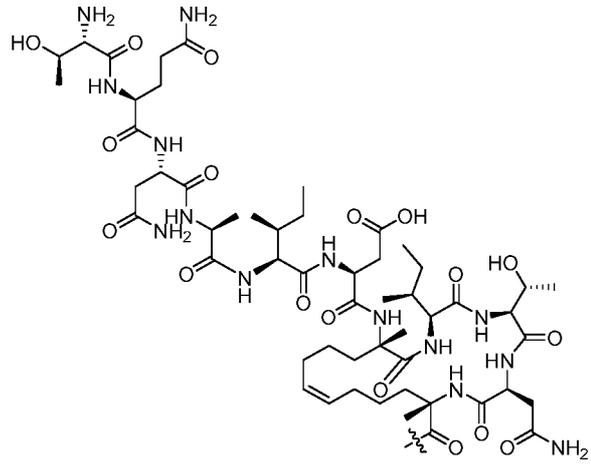
A-41



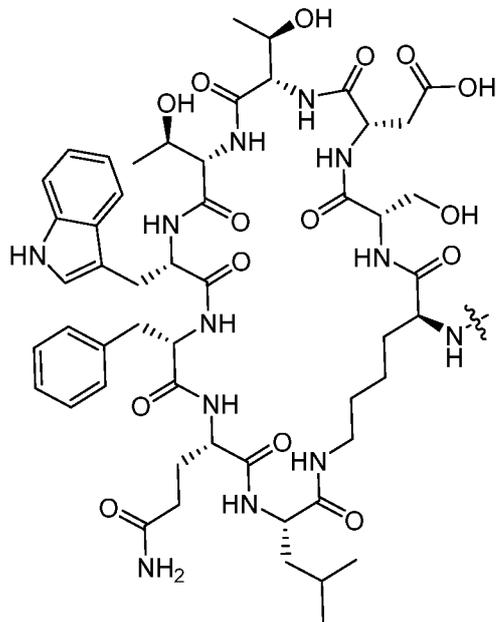
A-42



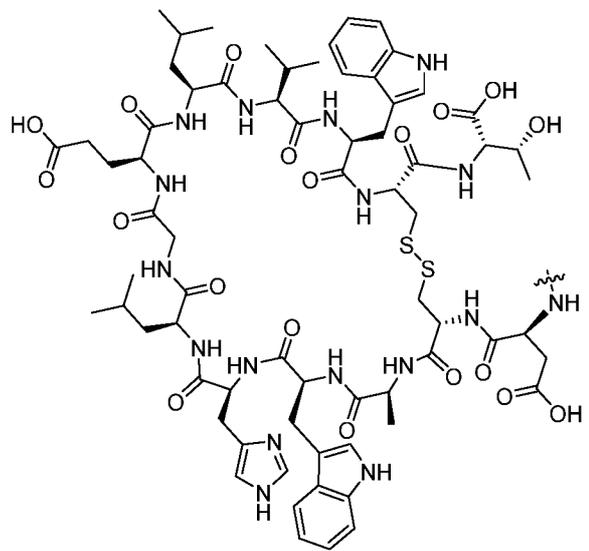
A-43



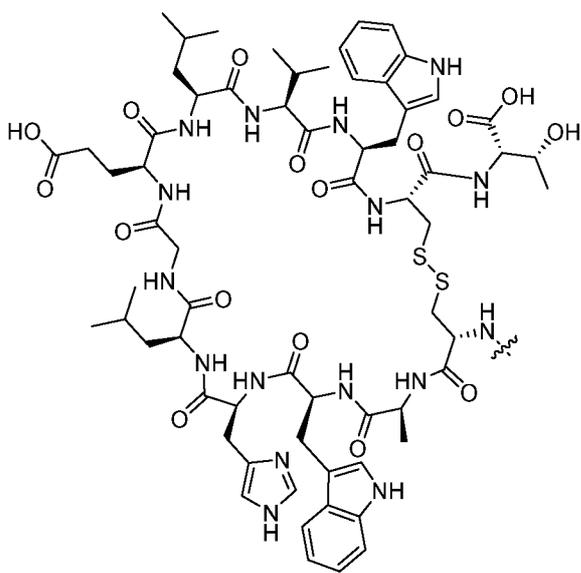
A-44



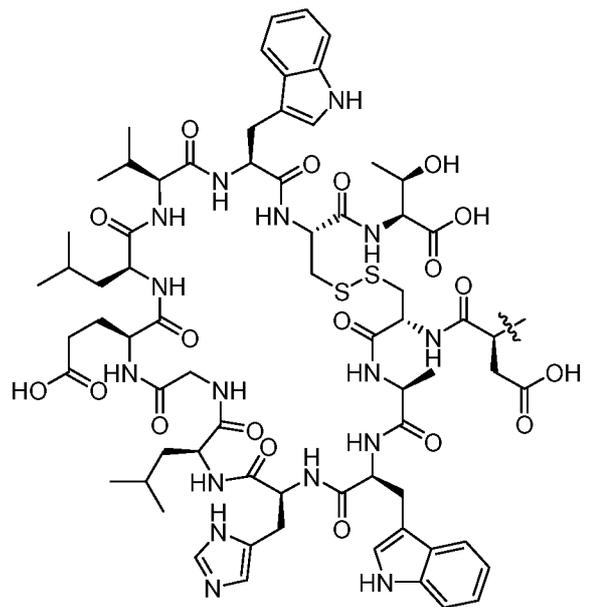
A-45



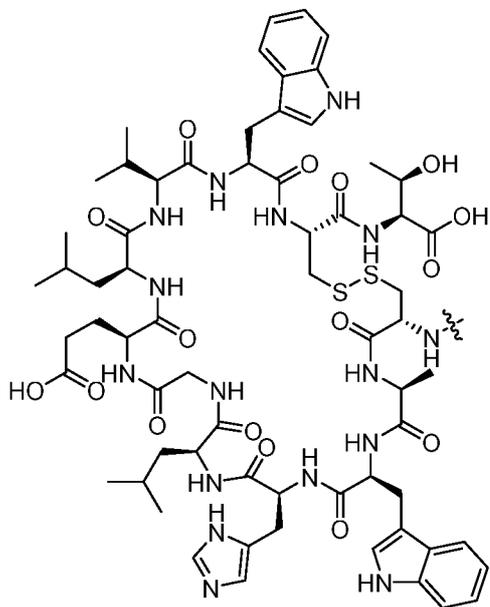
A-46



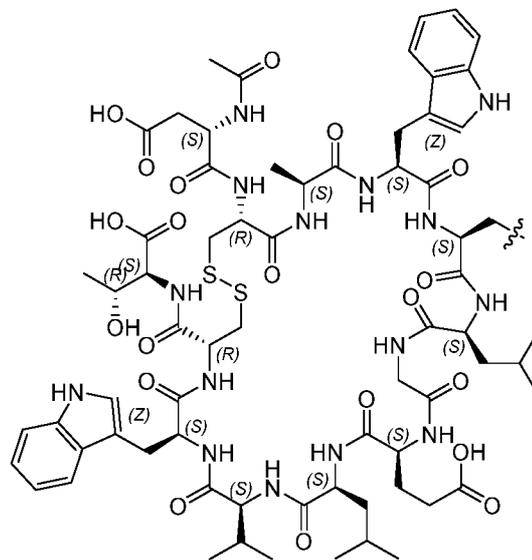
A-47



A-48



A-49



A-50

[138] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой связывающий антитело фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок фрагмент представляет собой связывающий антитело фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления –COOH и/или аминогруппы аминокислотных остатков, например, на С-конце или N-конце, необязательно кэпированы. Например, в некоторых вариантах осуществления, группа –COOH (например, С-конец –COOH) является амидированной (например, преобразованной в –CON(R')₂, например, –C(O)NHR (например, –C(O)NH₂)), а в некоторых вариантах осуществления аминогруппа, например –NH₂ (например, N-концевой –NH₂) кэпирована R'– или R'C(O)– (например, в некоторых вариантах осуществления, путем преобразования –NH₂ в –NHR' (например, –NHC(O)R, (например, –NHC(O)CH₃))).

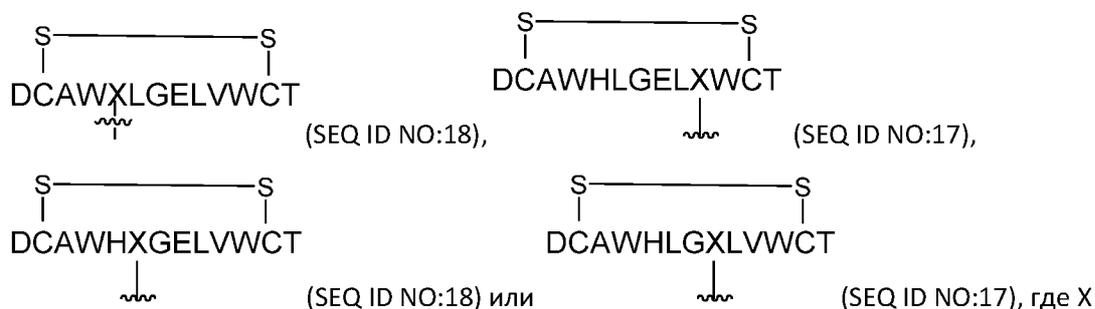
[139] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит необязательно замещенный A-1, A-2, A-3, A-4, A-5, A-6, A-7, A-8, A-9, A-10, A-11, A-12, A-13, A-14, A-15, A-16, A-17, A-18, A-19, A-20, A-21, A-22, A-23, A-24, A-25, A-26, A-27, A-28, A-29, A-30, A-31, A-32, A-33, A-34, A-35, A-36, A-37, A-38, A-39, A-40, A-41, A-42, A-43, A-44,

A-45, A-46, A-47, A-48, A-49 или A-50, каждый из которых необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления такой связывающий мишень фрагмент представляет собой связывающий антитело фрагмент. В некоторых вариантах осуществления такой связывающий мишень фрагмент представляет собой универсальный связывающий антитело фрагмент.

[140] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например связывающий белок фрагмент (например, связывающий антитело фрагмент (например, универсальный связывающий антитело фрагмент)), содержит пептидное звено и соединен с линкерным фрагментом через С-конец пептидного звена. В некоторых вариантах осуществления он соединен с линкерным фрагментом через N-конец пептидного звена. В некоторых вариантах осуществления он соединен с линкером через группу боковой цепи пептидного звена. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент, например универсальный связывающий антитело фрагмент, содержит пептидное звено и соединен со связывающим мишень фрагментом, необязательно посредством линкерного фрагмента, через С-конец пептидного звена. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например связывающий белок фрагмент (например, связывающий антитело фрагмент (например, универсальный связывающий антитело фрагмент)), содержит пептидное звено и соединен со связывающим мишень фрагментом, необязательно посредством линкерного фрагмента, через N-конец пептидного звена. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например связывающий белок фрагмент (например, связывающий антитело фрагмент (например, универсальный связывающий антитело фрагмент)), содержит пептидное звено и соединен со связывающим мишень фрагментом, необязательно посредством линкерного фрагмента, через боковую цепь пептидного звена.

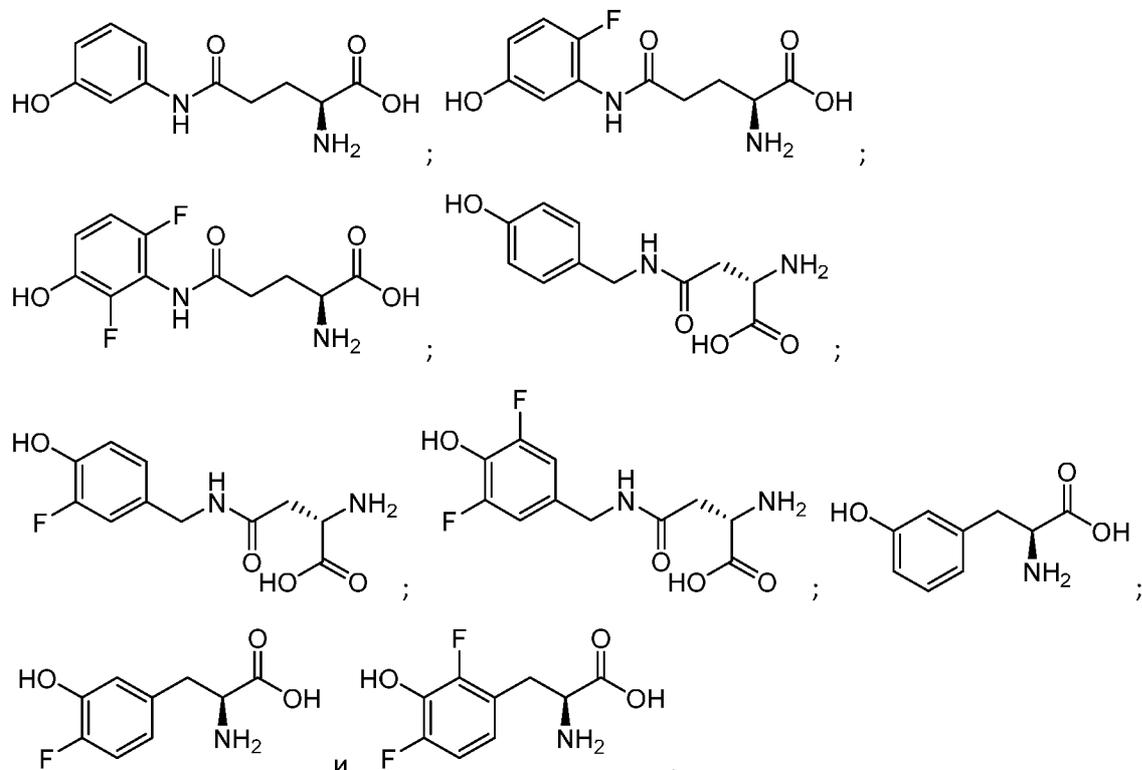
[141] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит (DCAWHLGELVWCT, (SEQ ID NO:17)), где 1–5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных остатков могут быть независимо и необязательно замещены другим аминокислотным остатком, 1–5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных остатков могут быть независимо и необязательно удалены и/или 1–5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных остатков могут быть независимо и необязательно вставлены. В некоторых вариантах осуществления он соединен с остатком молекулы через свой N-конец. В некоторых вариантах осуществления он соединен с остатком молекулы через свой С-конец. В некоторых вариантах осуществления он соединен с остатком молекулы через боковую цепь аминокислотного остатка (например, различных остатков X, как описано в настоящем изобретении). В некоторых вариантах

осуществления два остатка цистеина образуют дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит



представляет собой аминокислотный остаток, связанный с остатком соединения или агента, и где 1-5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных остатков могут быть независимо и необязательно замещены другим аминокислотным остатком, 1-5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных остатков могут быть независимо и необязательно удалены и/или 1-5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных остатков могут быть независимо и необязательно вставлены. В некоторых вариантах осуществления общее число замещений, делеций и вставок составляет не более 10 (например, 0 или не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10). В некоторых вариантах осуществления общее число равно 0. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 1. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 2. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 3. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 4. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 5. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 6. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 7. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 8. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 9. В некоторых вариантах осуществления общее число равно не более чем 10. В некоторых вариантах осуществления отсутствуют вставки. В некоторых вариантах осуществления отсутствуют делеции. В некоторых вариантах осуществления отсутствуют замены. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой аминокислотный остаток, связанный с остатком соединения или агента. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $-\text{N}(\text{R}')-\text{CH}(-)-\text{C}(\text{O})-$. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $-\text{N}(\text{R}')-\text{CH}(-\text{L}^{\text{LG}1})-\text{C}(\text{O})-$. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $-\text{N}(\text{R}')-\text{CH}(-\text{L}^{\text{LG}1}-\text{L}^{\text{LG}2})-\text{C}(\text{O})-$. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $-\text{N}(\text{R}')-\text{CH}(-\text{L}^{\text{LG}1}-\text{L}^{\text{LG}2}-\text{L}^{\text{LG}3})-\text{C}(\text{O})-$. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $-\text{N}(\text{R}')-\text{CH}(-\text{L}^{\text{LG}1}-\text{L}^{\text{LG}2}-\text{L}^{\text{LG}3}-\text{L}^{\text{LG}4})-\text{C}(\text{O})-$.

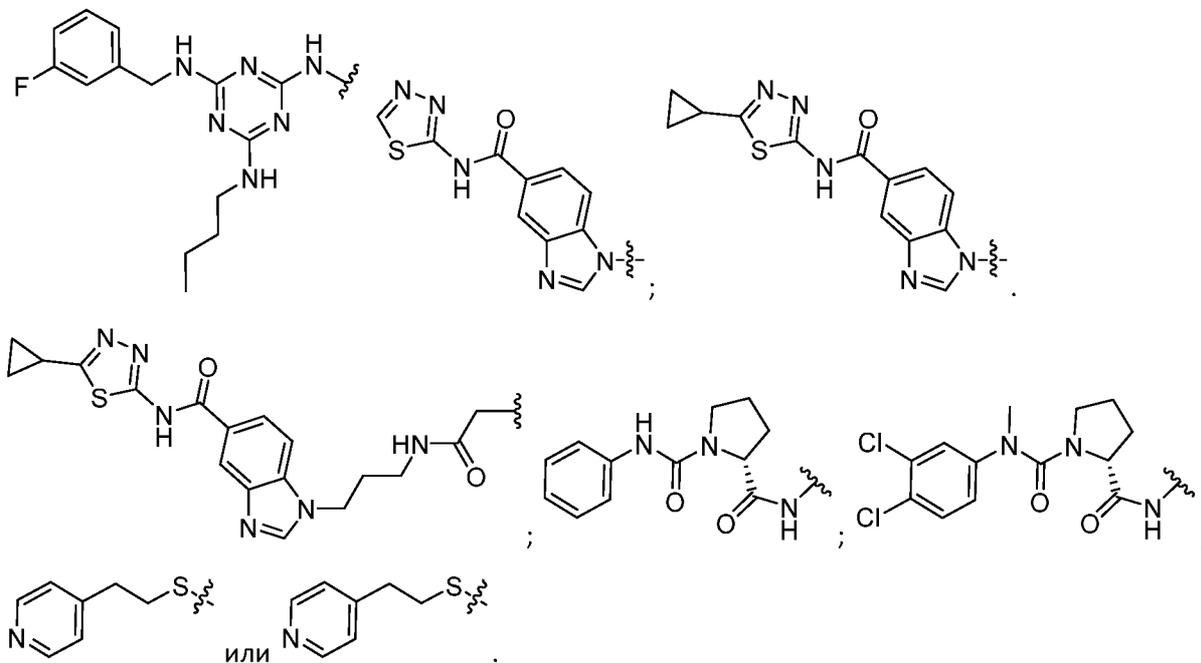
[142] В некоторых вариантах осуществления X представляет собой любое из следующего:



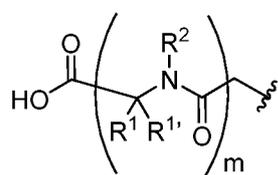
[143] В некоторых вариантах осуществления X представляет собой K. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой D. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой остаток Dab. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой E.

[144] В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент, например универсальный связывающий антитело фрагмент, представляет собой или содержит низкомолекулярное соединения с молекулярной массой, например, менее 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000 и т. д. Подходящие такие связывающие антитело фрагменты включают низкомолекулярные Fc-связывающие фрагменты, например, описанные в US 9745339, US 201/30131321 и т. д. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент имеет такую структуру, что его соответствующее соединение представляет собой соединение, описанное в US 9745339 или US 2013/0131321, соединения из которых независимо включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент АВТ имеет такую структуру, что Н-АВТ представляет собой соединение, описанное в US 9745339 или US 2013/0131321, соединения из которых независимо включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления такое

[147] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит любое из следующего:

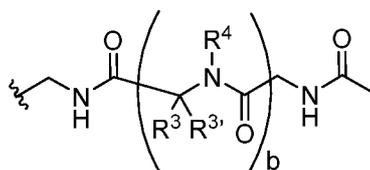


[148] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой или содержит



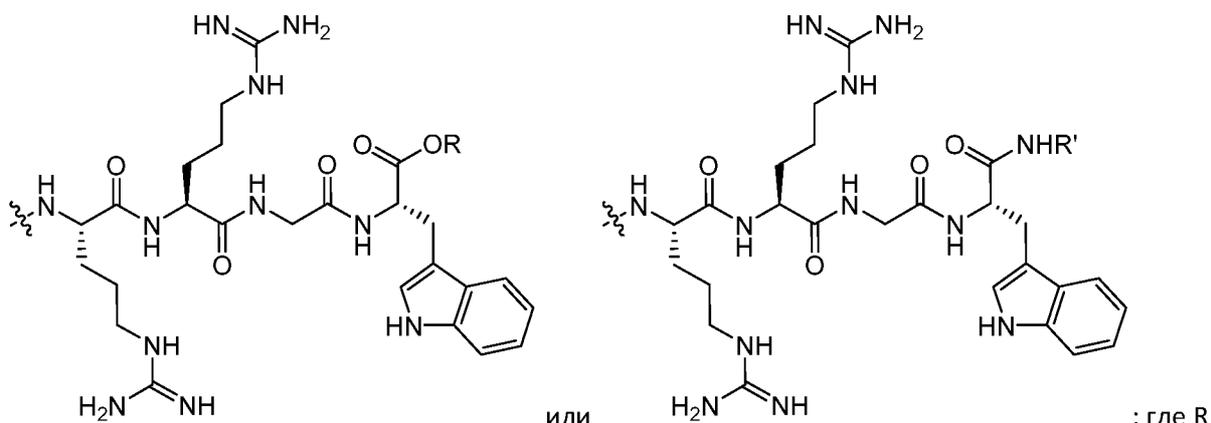
, где каждая переменная независимо является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления m равно от 4 до 13.

[149] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент



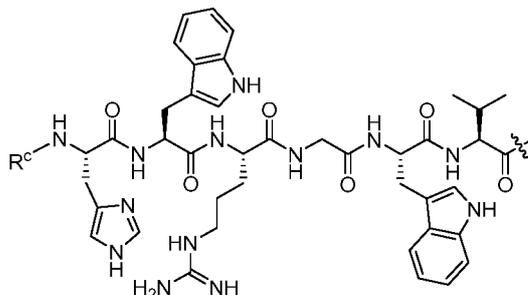
представляет собой или содержит , где b равно 1–20, а каждая другая переменная независимо является такой, как описано в данном документе.

[150] В некоторых вариантах осуществления b равно 4–13. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например $\text{R}^c-(\text{Xaa})_z-$, представляет собой или содержит любое из следующего:



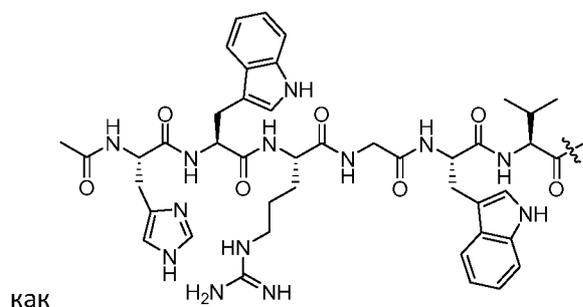
представляет собой, например, H или C₁-C₄ алкил, а R' представляет собой, например, H или C₁-C₄ алкил.

[151] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например

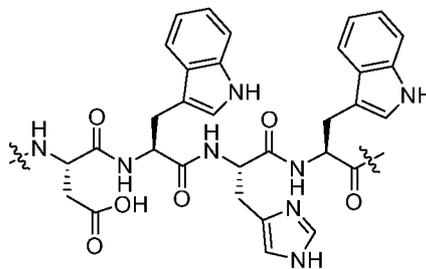


R^c-(Xaa)_z-, представляет собой или содержит

, такой

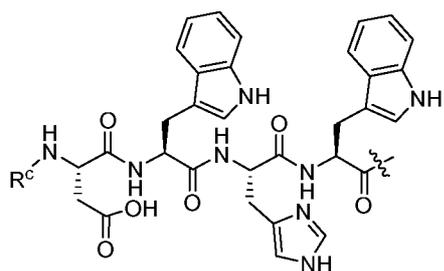


[152] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например

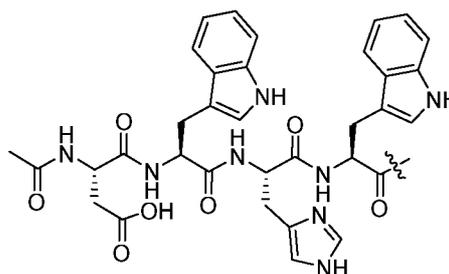


R^c-(Xaa)_z-, представляет собой или содержит

, такой как



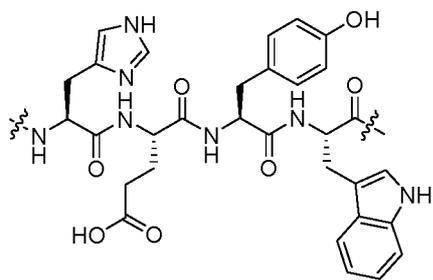
[153] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например



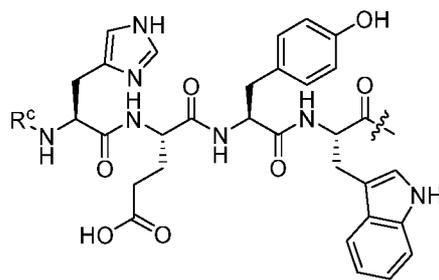
R^c -(Xaa) z -, представляет собой или содержит

[154] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например

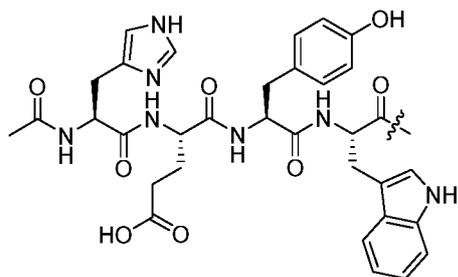
R^c -(Xaa) z -, представляет собой или содержит любое из следующего:



, например

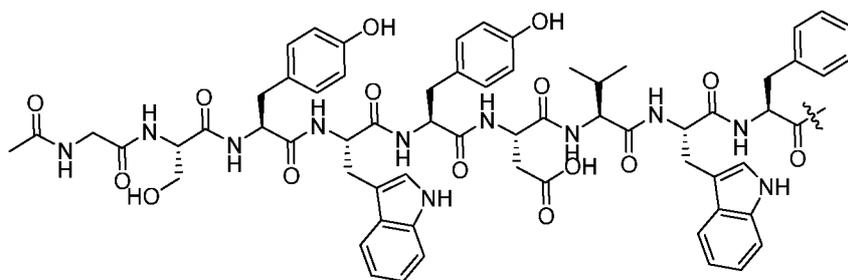
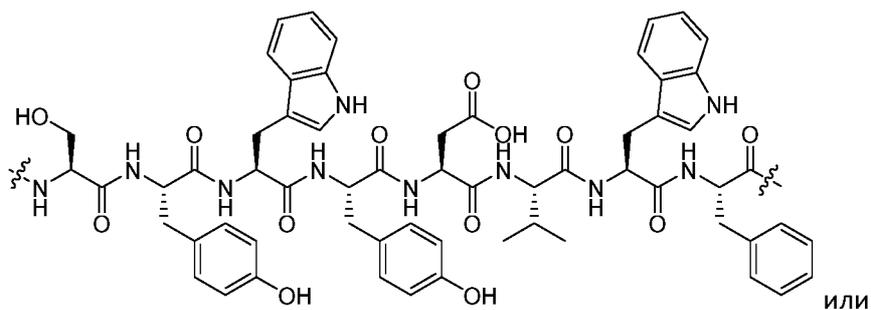
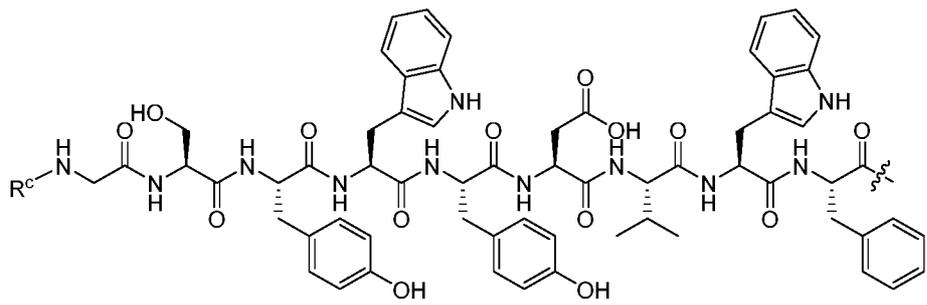
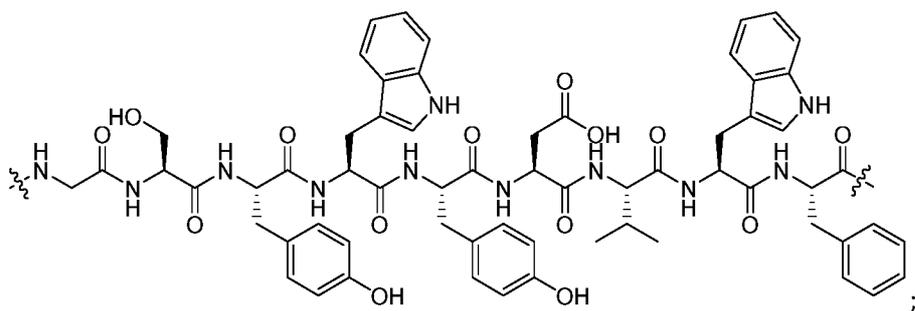


; или

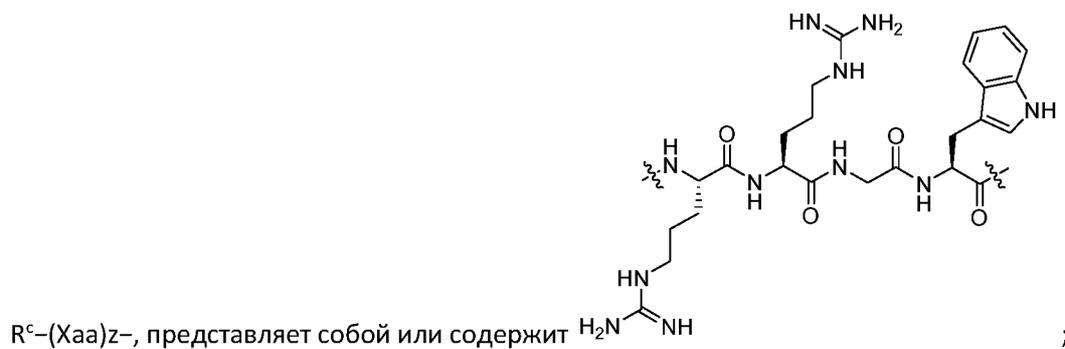


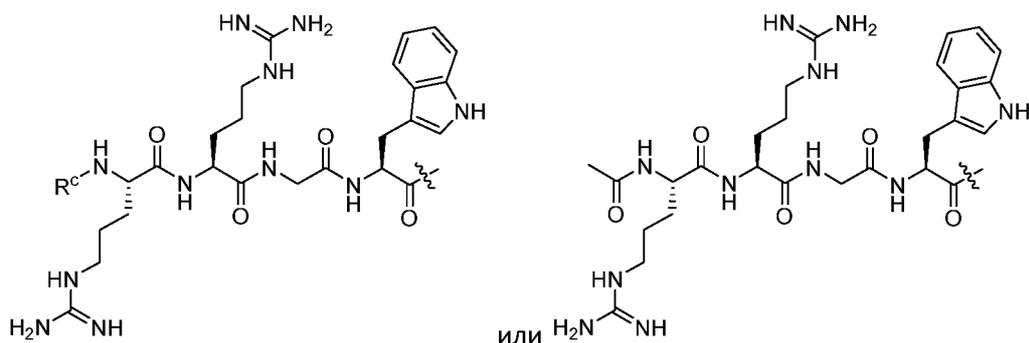
[155] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например

R^c -(Xaa) z -, представляет собой или содержит



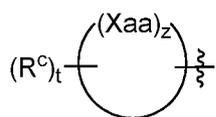
[156] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например



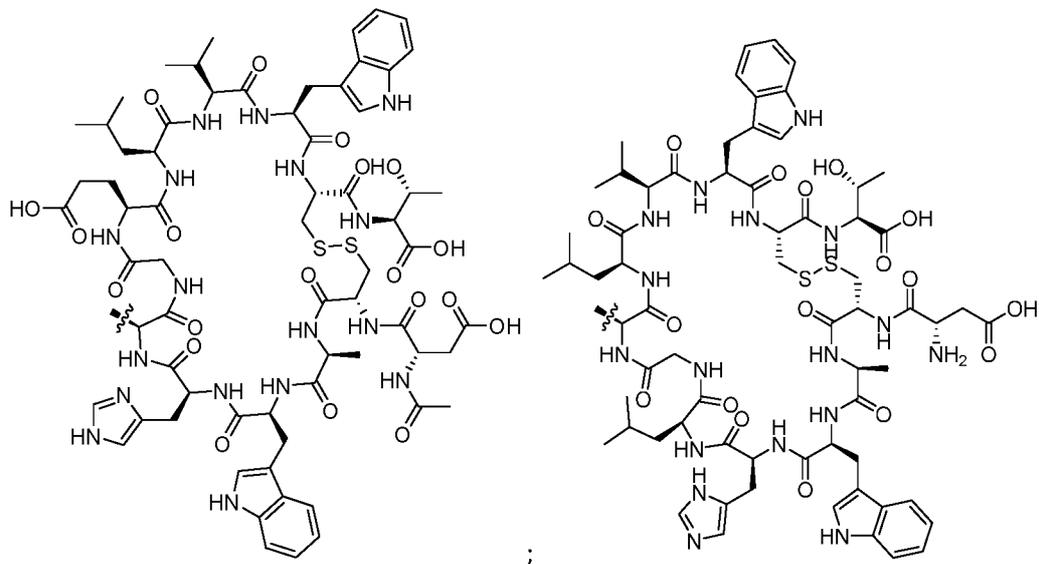


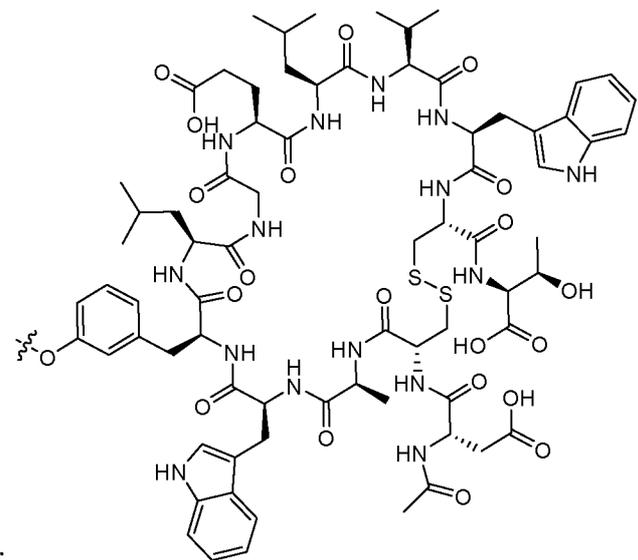
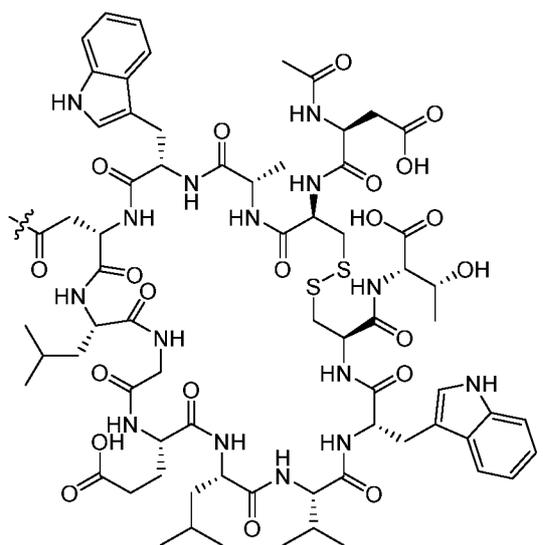
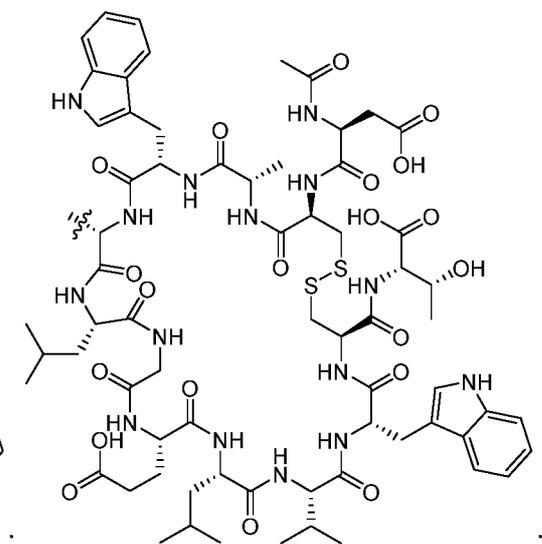
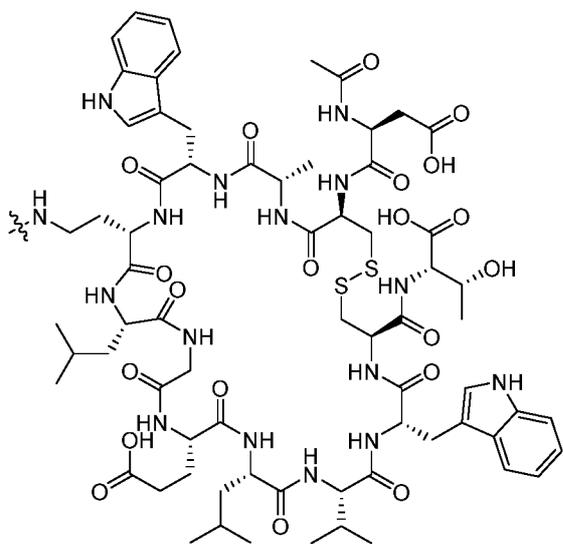
[157] В некоторых вариантах осуществления $-\text{NH}-$ связан с группой R^c . В некоторых вариантах осуществления R^c представляет собой $\text{R}-\text{C}(\text{O})-$. В некоторых вариантах осуществления R^c представляет собой $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$. В некоторых вариантах осуществления такие связывающие мишень фрагменты представляют собой связывающие антитело фрагменты.

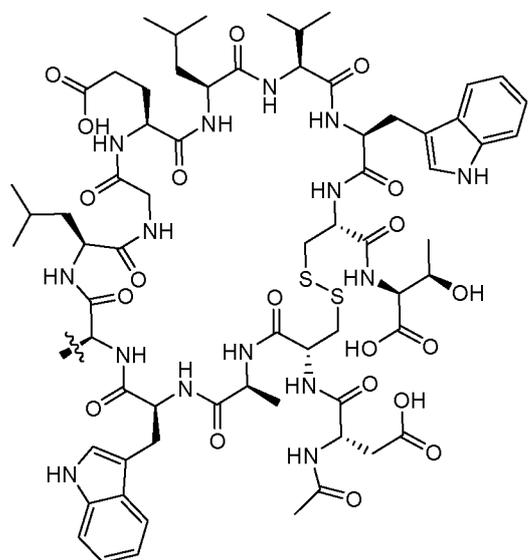
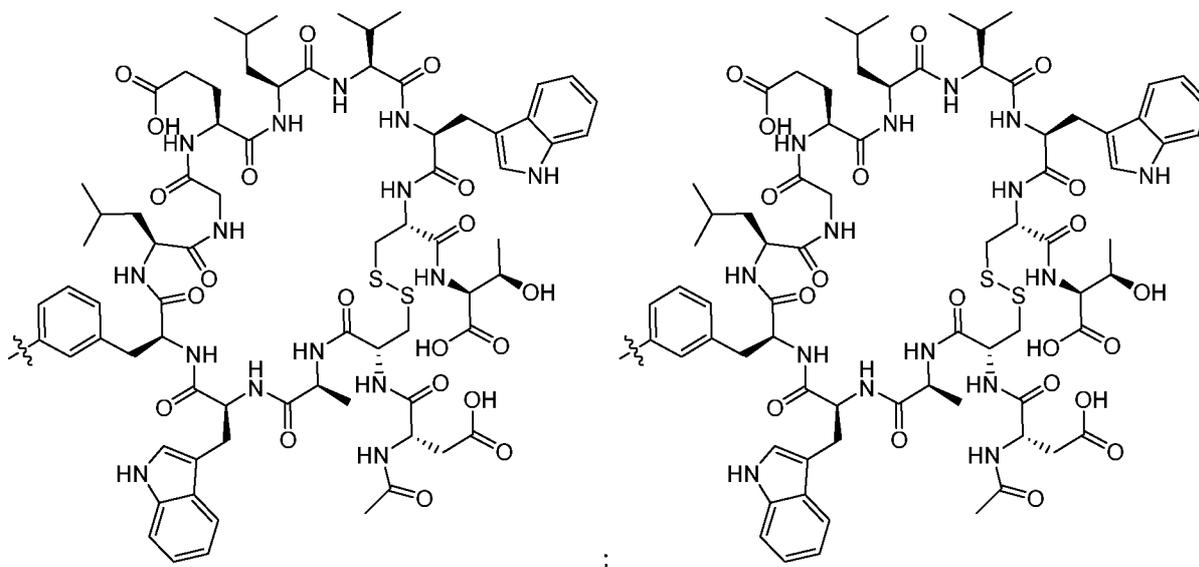
[158] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например



или $\text{R}^c-(\text{Xaa})_z-$, представляет собой или содержит любое из следующего:

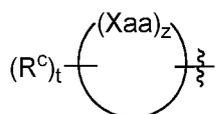






или

[159] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например $R^c-(Xaa)_z-$, представляет собой или содержит пептидный фрагмент Z33. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например $R^c-(Xaa)_z-$, представляет собой или содержит $-FNMQQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDD-NH_2$ (SEQ ID NO: 29) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например $R^c-(Xaa)_z-$, представляет собой или содержит $FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDC$ (SEQ ID NO:30) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например



или $R^c-(Xaa)_z-$, представляет собой или содержит фрагмент пептида, такой как

FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDC (SEQ ID NO:30), RGNCAYHRGQLVWCTYH (SEQ ID NO:31),
 RGNCAYHKGQLVWCTYH, RGNCYHRGQLVWCTYH (SEQ ID NO:32), RGNCAWHRGKLVWCTYH (SEQ ID
 NO:33), RGNCAWHRGKLVWCTYH (SEQ ID NO:34), RGNCWHRGELVWCTYH (SEQ ID NO:35),
 RGNCWHRGQLVWCTYH (SEQ ID NO:36), RGNCYHLGELVWCTYH (SEQ ID NO:37),
 RGNCYHLGQLVWCTYH (SEQ ID NO:38), DCKWHLGELVWCT (SEQ ID NO:39), DCKYHLGELVWCT (SEQ ID
 NO:40), DCKWHRGELVWCT (SEQ ID NO:41), DCKWHLGQLVWCT (SEQ ID NO:42), DCKYHRGELVWCT (SEQ
 ID NO:43), DCKYHLGQLVWCT (SEQ ID NO:44), DCKWHRGQLVWCT (SEQ ID NO:45), DCKYHRGQLVWCT
 (SEQ ID NO:46), FNKQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:47),
 FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC (SEQ ID NO:48),
 FNMQCQRRFYALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:49),
 FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:50), RGNCAWHLGQLVWCKYH (SEQ ID NO:51),
 RGNCAWHLGELVWCKYH (SEQ ID NO:52), RGNCAYHLGQLVWCTKH (SEQ ID NO:53),
 RGNCAYHLGQLVWCTYK (SEQ ID NO:54), RGNCAYHRGQLVWCTKH (SEQ ID NO:55),
 KNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:56),
 FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:57),
 FNMQCQRRFYALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:58),
 FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC (SEQ ID NO:59),
 FNMQCQRRFYALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:49),
 FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC (SEQ ID NO:48),
 FNKQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:47),
 FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:60),
 FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC (SEQ ID NO:61), Fc-III, FcBP-2, Fc-III-4C,


 $\text{Ac-GPDCAYHXGELVWCTFH-NH}_2$ (X = K или R, SEQ ID NO:62) и т. д., где два остатка

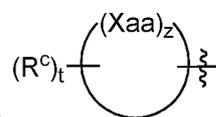
цистеина могут независимо образовывать дисульфидную связь. В некоторых вариантах
 осуществления в описанном в данном документе пептиде два остатка цистеина образуют
 дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления пептид, такой как Z33,
 FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDC (SEQ ID NO:30), RGNCAYHRGQLVWCTYH (SEQ ID NO:31),
 RGNCYHRGQLVWCTYH (SEQ ID NO:33), RGNCAYHKGQLVWCTYH (SEQ ID NO:32),
 RGNCAWHRGKLVWCTYH (SEQ ID NO:34), RGNCWHRGQLVWCTYH (SEQ ID NO:36),
 RGNCWHRGELVWCTYH (SEQ ID NO:34), RGNCYHLGELVWCTYH (SEQ ID NO:37),
 RGNCYHLGQLVWCTYH (SEQ ID NO:38), DCKWHLGELVWCT (SEQ ID NO:39), DCKYHLGELVWCT (SEQ ID

NO:40), DCKWHRGELVWCT (SEQ ID NO:41), DCKWHLGQLVWCT (SEQ ID NO:42), DCKYHRGELVWCT (SEQ ID NO:43), DCKYHLGQLVWCT (SEQ ID NO:44), DCKWHRGQLVWCT (SEQ IDNO:45), DCKYHRGQLVWCT (SEQ ID NO:46), FNKQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:47), FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC (SEQ ID NO:48), FNMQCQRRFYALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:49), FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:50), RGNCAWHLGQLVWCKYH (SEQ ID NO:51), RGNCAYHLGELVWCKYH (SEQ ID NO:52), RGNCAYHLGQLVWCTKH (SEQ ID NO:53), RGNCAYHLGQLVWCTYK (SEQ ID NO:54), RGNCAYHRGQLVWCTKH (SEQ ID NO:55), KNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:56), FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:57), FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:58), FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:59), FNMQCQRRFYALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:49), FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC (SEQ ID NO:48), FNKQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:47), FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:60), FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC (SEQ ID NO:61), Fc-III, FcBP-2, Fc-III-4C,

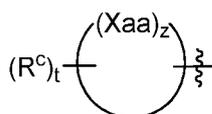
Ac-GPDCAYHXGELVWCTFH-NH₂ (X = К или R, SEQ ID NO:62) и т. д., соединен через

свой N-конец, C-конец или боковую цепь (например, К (например, подчеркнутые остатки К в RGNCAYHКGQLVWCTYH (SEQ ID NO:32), RGNCКYHRGQLVWCTYH (SEQ ID NO:33), RGNCAWHRGКLWCTYH (SEQ ID NO:34), RGNCКWHRGELVWCTYH (SEQ ID NO:35), RGNCКWHRGQLVWCTYH (SEQ IDNO:36), RGNCКYHLGELVWCTYH (SEQ ID NO:37), RGNCКYHLGQLVWCTYH (SEQ ID NO:38), DCKWHLGELVWCT (SEQ ID NO:39), DCKYHLGELVWCT (SEQ ID NO:40), DCKWHRGELVWCT (SEQ ID NO:41), DCKWHLGQLVWCT (SEQ ID NO:42), DCKYHRGELVWCT (SEQ ID NO:43), DCKYHLGQLVWCT (SEQ ID NO:44), DCKWHRGQLVWCT (SEQ ID NO:45), DCKYHRGQLVWCT (SEQ ID NO:46), RGNCAWHLGQLVWCKYH (SEQ ID NO:51), FNКQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:47), FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIКDDC (SEQ ID NO:48), FNMQCQRRFYALHDPNLNКEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:49), RGNCAWHLGELVWCKYH (SEQ ID NO:52), RGNCAYHLGQLVWCTКH (SEQ ID NO:53), RGNCAYHLGQLVWCTYК (SEQ ID NO:54), RGNCAYHRGQLVWCTКH (SEQ ID NO:55), КNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:56), FNMQCQКRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:57),

FNMQCRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:58),
 FNMQCRRFYEALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC (SEQ ID NO:59),
 FNMQCRRFYEALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:49),
 FNMQCRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC (SEQ ID NO:48),
 FNKQCRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:47),
 FNMQCRRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:60),
 FNMQCRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC (SEQ ID NO:61) и т. д.)). В некоторых вариантах осуществления один или более аминокислотных остатков последовательности могут быть независимо и необязательно замещены (например, 1–5), удалены (например, 1–5) и/или вставлены (например, 1–5), как описано в данном документе. В некоторых вариантах



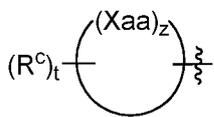
осуществления связывающий мишень фрагмент, например $(R^c)_t$ или $R^c-(Xaa)_z-$, представляет собой или содержит $-CXHXXXLVWC-$ (SEQ ID NO:63), $-XCXHXHXXXLVWC-$ (SEQ ID NO:64), $-CXHXXXLVWCX-$ (SEQ ID NO:65), $-X_{0-3}CXHXXXLVWCX_{0-3}-$ (SEQ ID NO:66), $-XCXHXHXXXLVWCXXX$ (SEQ ID NO:67), $--XXXCXHXXXLVWCXXX$ (SEQ ID NO:66)–, где каждый X независимо представляет собой аминокислотный остаток, а два остатка C независимо образуют дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления X^8 (X после H) представляет собой Orn. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Dab. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Lys(Ac). В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Orn(Ac). В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Dab(Ac). В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Arg. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Nle. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Nva. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Val. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Tle. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Leu. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Ala(tBu). В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Cha. В некоторых вариантах осуществления X^8 представляет собой Phe. В некоторых вариантах осуществления связывающий



мишень фрагмент, например $(R^c)_t$ или $R^c-(Xaa)_z-$, представляет собой или содержит DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:17). В некоторых вариантах осуществления C-конец и/или N-конец

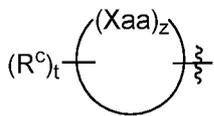
фрагмента белкового агента/пептидного агента необязательно кэппированы (например, $RC(O)-$, таким как $CH_3C(O)-$, в случае N-конца, $-N(R')_2$, таким как $-NH_2$, в случае C-конца и т. д.). В некоторых вариантах осуществления такие связывающие мишень фрагменты представляют собой связывающие антитело фрагменты. В некоторых вариантах осуществления, как описано в данном документе, остаток можно модифицировать или замещать для соединения с другим фрагментом, например, в некоторых вариантах осуществления, Н можно замещать аминокислотным остатком, который содержит боковую цепь, которая содержит $-COOH$ или ее соль или активированную форму (например, D).

[160] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например



или $R^c-(Xaa)_z-$, представляет собой или содержит $(X_{1-3})-C-(X_2)-N-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3})$ (SEQ ID NO:68), где каждый X и Xaa независимо представляет собой аминокислотный остаток и, необязательно, это не остаток цистеина. В некоторых вариантах осуществления Xaa1 представляет собой R, L, I, D, E, остаток 2-аминосубериновой кислоты или остаток диаминопропионовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления Xaa2 представляет собой L, D, E, N или Q. В некоторых вариантах осуществления Xaa1 остаток лизина, остаток цистеина, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, остаток 2-аминосубериновой кислоты или остаток диаминопропионовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления Xaa2 представляет собой остаток глутаминовой кислоты или остаток аспарагиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления Xaa1 представляет собой остаток аргинина или остаток лейцина. В некоторых вариантах осуществления Xaa2 представляет собой остаток лизина, остаток глутамина или остаток аспарагиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления такие связывающие мишень фрагменты представляют собой связывающие антитело фрагменты.

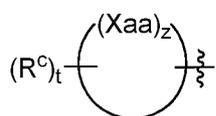
[161] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например



или $R^c-(Xaa)_z-$, представляет собой или содержит $(X_{1-3})-C-(Xaa3)-(Xaa4)-N-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7)$ (SEQ ID NO:68), где каждый X и Xaa независимо представляет собой аминокислотный остаток и, необязательно, это не остаток цистеина. В некоторых вариантах осуществления Xaa3 представляет собой остаток аланина или остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления Xaa4 представляет собой остаток триптофана или остаток тирозина. В

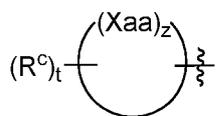
некоторых вариантах осуществления Хаа1 представляет собой остаток аргинина, остаток лейцина, остаток лизина, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, остаток 2-аминосуBERиновой кислоты или остаток диаминопропионовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления Хаа2 представляет собой остаток лизина, остаток глутаминА, остаток глутаминовой кислоты, остаток аспарагина или остаток аспарагиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления Хаа5 представляет собой остаток треонина или остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления Хаа6 представляет собой остаток тирозина, остаток лизина или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления Хаа7 представляет собой остаток гистидина, остаток лизина или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления такие связывающие мишень фрагменты представляют собой связывающие антитело фрагменты.

[162] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например



или R^c-(Хаа)_z-, представляет собой или содержит D-C-(Хаа3)-(Хаа4)-Н-(Хаа1)-G-(Хаа2)-L-V-W-C-(Хаа5)-(Хаа6)-(Хаа7) (SEQ ID NO:69), где каждый X и Хаа независимо представляет собой аминокислотный остаток и, необязательно, это не остаток цистеина. В некоторых вариантах осуществления Хаа3 представляет собой остаток аланина или остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления Хаа4 представляет собой остаток триптофана или остаток тирозина. В некоторых вариантах осуществления Хаа1 представляет собой остаток аргинина, остаток лейцина, остаток лизина, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, остаток 2-аминосуBERиновой кислоты или остаток диаминопропионовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления Хаа2 представляет собой остаток лизина, остаток глутаминА, остаток глутаминовой кислоты, остаток аспарагина или остаток аспарагиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления Хаа5 представляет собой остаток треонина или остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления Хаа6 представляет собой остаток тирозина, остаток лизина или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления Хаа7 представляет собой остаток гистидина, остаток лизина или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления такие связывающие мишень фрагменты представляют собой связывающие антитело фрагменты.

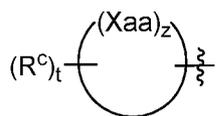
[163] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например



или R^c-(Хаа)_z-, представляет собой или содержит D-C-(Хаа3)-(Хаа4)-Н-(Хаа1)-G-

(Хаа2)-L-V-W-C-T (SEQ ID NO:70), где каждый X и Хаа независимо представляет собой аминокислотный остаток и, необязательно, это не остаток цистеина. В некоторых вариантах осуществления Хаа3 представляет собой остаток аланина или остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления Хаа4 представляет собой остаток триптофана или остаток тирозина. В некоторых вариантах осуществления Хаа1 представляет собой остаток аргинина, остаток лейцина, остаток лизина, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, остаток 2-аминосубериновой кислоты или остаток диаминопропионовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления Хаа2 представляет собой остаток лизина, остаток глутамина, остаток глутаминовой кислоты, остаток аспарагина или остаток аспарагиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления такие связывающие мишень фрагменты представляют собой связывающие антитело фрагменты.

[164] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например



или $R^c-(Хаа)_z-$, представляет собой или содержит R-G-N-C-(Хаа3)-(Хаа4)-H-(Хаа1)-G-(Хаа2)-L-V-W-C-(Хаа5)- (Хаа6)-(Хаа7) (SEQ ID NO:71), где каждый X и Хаа независимо представляет собой аминокислотный остаток и, необязательно, это не остаток цистеина. В некоторых вариантах осуществления Хаа3 представляет собой остаток аланина или остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления Хаа4 представляет собой остаток триптофана или остаток тирозина. В некоторых вариантах осуществления Хаа1 представляет собой остаток аргинина, остаток лейцина, остаток лизина, остаток аспарагиновой кислоты, остаток глутаминовой кислоты, остаток 2-аминосубериновой кислоты или остаток диаминопропионовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления Хаа2 представляет собой остаток лизина, остаток глутамина, остаток глутаминовой кислоты, остаток аспарагина или остаток аспарагиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления Хаа5 представляет собой остаток треонина или остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления Хаа6 представляет собой остаток тирозина, остаток лизина или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления Хаа7 представляет собой остаток гистидина, остаток лизина или отсутствует. В некоторых вариантах осуществления такие связывающие мишень фрагменты представляют собой связывающие антитело фрагменты.

[165] В некоторых вариантах осуществления такие связывающие мишень фрагменты, например различные связывающие мишень фрагменты, описанные в данном документе, представляют собой связывающие белок фрагменты. В некоторых вариантах осуществления

связывающие мишень фрагменты представляют собой связывающие антитело фрагменты. В некоторых вариантах осуществления LG представляет собой или содержит такой связывающий мишень фрагмент. В некоторых вариантах осуществления LG представляет собой или содержит связывающий белок фрагмент. В некоторых вариантах осуществления LG представляет собой или содержит связывающий антитело фрагмент.

[166] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, представляет собой или содержит агент на основе адаптерного белка, например, как описано в Hui, et al., *Bioconjugate Chem.* 2015, 26, 1456–1460, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00275. В некоторых вариантах осуществления при применении в соответствии с настоящим изобретением для адаптерных белков не нужны реактивные остатки (например, ВРА) для обеспечения одного или более, или всех преимуществ.

[167] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, представляет собой или содержит фрагмент триазина, например, описанный в US 2009/0286693. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, имеет такую структуру, что его соответствующее соединение представляет собой соединение, описанное в US 2009/0286693, соединения которых независимо включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, представляет собой АВТ. В некоторых вариантах осуществления АВТ имеет такую структуру, что Н-АВТ представляет собой соединение, описанное в US 2009/0286693, соединения которых независимо включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления такое соединение может связываться с антителом. В некоторых вариантах осуществления такое соединение может связываться с Fc-областью антитела.

[168] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, представляет собой или содержит фрагмент триазина, например, описанный в Teng, et al., *A strategy for the generation of biomimetic ligands for affinity chromatography. Combinatorial synthesis and biological evaluation of an IgG binding ligand, J. Mol. Recognit.* 1999;**12**:67–75 («Teng»). В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, имеет такую структуру, что его соответствующее соединение представляет собой соединение, описанное в Teng, соединения которой независимо включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, АВТ

имеет такую структуру, что Н-АВТ представляет собой соединение, описанное в Teng, соединения которой независимо включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления такое соединение может связываться с антителом. В некоторых вариантах осуществления такое соединение может связываться с Fc-областью антитела.

[169] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, представляет собой фрагмент триазина, например, описанный в Uttamchandani, et al., Microarrays of Tagged Combinatorial Triazine Libraries in the Discovery of Small-Molecule Ligands of Human IgG, *J Comb Chem.* 2004 Nov-Dec;6(6):862-8 («Uttamchandani»). В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, имеет такую структуру, что его соответствующее соединение представляет собой соединение, описанное в Uttamchandani, соединения которой независимо включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, АВТ имеет такую структуру, что Н-АВТ представляет собой соединение, описанное в Uttamchandani, соединения которой независимо включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления такое соединение может связываться с антителом. В некоторых вариантах осуществления такое соединение может связываться с Fc-областью антитела.

[170] В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент связывается с одним или более сайтами связывания белка А. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент связывается с одним или более сайтами связывания белка G. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент связывается с одним или более сайтами связывания белка L. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент связывается с одним или более сайтами связывания белка Z. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент связывается с одним или более сайтами связывания белка LG. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент связывается с одним или более сайтами связывания белка LA. В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент связывается с одним или более сайтами связывания белка AG.

[171] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, может связываться с нуклеотид-связывающим сайтом. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, представляет собой низкомолекулярный фрагмент, который может

связываться с нуклеотид-связывающим сайтом. В некоторых вариантах осуществления малая молекула представляет собой триптамин. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, АВТ имеет такую структуру, что Н-АВТ представляет собой триптамин.

[172] В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент представляет собой фрагмент (например, низкомолекулярный фрагмент, пептидный фрагмент, фрагмент нуклеиновой кислоты и т. д.), который может селективно связываться с IgG и при применении в предложенных технологиях может обеспечивать и/или стимулировать АЗКЦ и/или АЗКФ. В некоторых вариантах осуществления для идентификации связывающих антитело фрагментов можно использовать технологии пептидного дисплея (например, фагового дисплея, неклеточного дисплея и т. д.). В некоторых вариантах осуществления связывающий антитело фрагмент представляет собой фрагмент (например, низкомолекулярный фрагмент, пептидный фрагмент, фрагмент нуклеиновой кислоты и т. д.), который может связываться с IgG и, необязательно, может конкурировать с известными связывающими антитело фрагментами, например, протеином А, протеином G, протеином L и т. д.

[173] Как очевидно для специалистов в данной области техники, описанные в настоящем изобретении связывающие антитело фрагменты можно нацеливать на антитела с различными свойствами и видами активности (например, антитела, распознающие разные антигены, имеющие необязательные модификации и т. д.). В некоторых вариантах осуществления такие антитела включают антитела, вводимые субъекту, например, в терапевтических целях. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе связывающие антитело фрагменты могут связывать антитела к разным антигенам и применимы для конъюгации представляющих интерес фрагментов с различными антителами.

[174] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, представляет собой или содержит фрагмент агента медитоба. В некоторых вариантах осуществления агент медитоба описано, например, в US 2019/0111149.

[175] В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, может связываться с IgG человека. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, может связываться с IgG кролика. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, связывается с IgG1. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент,

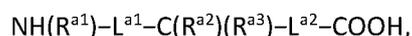
связывается с IgG2. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, связывается с IgG3. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, связывается с IgG4. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, связывается с IgG1, IgG2 и/или IgG4. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент, например, связывающий антитело фрагмент, связывается с IgG1, IgG2 и IgG4.

[176] В некоторых вариантах осуществления связывающие мишень фрагменты (например, связывающие антитело фрагменты) связываются с мишенями (например, агентами на основе антител для связывающих антитело фрагментов) с Kd около 1 мМ – 1 пМ или менее. В некоторых вариантах осуществления а Kd составляет около 1 мМ, 0,5 мМ, 0,2 мМ, 0,1 мМ, 0,05 мМ, 0,02 мМ, 0,01 мМ, 0,005 мМ, 0,002 мМ, 0,001 мМ, 500 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 1 мМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 0,5 мМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 0,1 мМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 0,05 мМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 0,01 мМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 0,005 мМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 0,001 мМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 500 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 200 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 100 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 50 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 20 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 10 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 5 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 2 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления Kd составляет около 1 нМ или менее. Например, в некоторых вариантах осуществления, связывающие антитело фрагменты связываются с агентами на основе антитела IgG с Kd, описанной в данном документе.

Аминокислоты

[177] В некоторых вариантах осуществления предложенные соединения и агенты могут

содержать один или более аминокислотных фрагментов, например, в связывающих антитело фрагментах, линкерных фрагментах и т. д. Аминокислотные фрагменты могут быть получены из природных аминокислот или неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления аминокислота имеет структуру формулы **A-I**:



A-I

или ее соли, где:

каждый из R^{a1} , R^{a2} и R^{a3} независимо представляет собой $-\text{L}^{\text{a}}-\text{R}'$ или аминокислотную боковую цепь;

каждый из L^{a1} и L^{a2} независимо представляет собой L^{a} ;

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 $-\text{C}(\text{R}')_2-$, $-\text{C}_y-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{S})-$, $-\text{C}(\text{NR}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')-$, $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ или $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$;

каждый $-\text{C}_y-$ независимо представляет собой необязательно замещенную двухвалентную моноциклическую, бициклическую или полициклическую группу, где каждое моноциклическое кольцо независимо выбрано из C_{3-20} циклоалифатического кольца, C_{6-20} арильного кольца, 5–20-членного гетероарильного кольца, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3–20-членного гетероциклического кольца, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния;

каждый R' независимо представляет собой $-\text{R}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}$, $-\text{CO}_2\text{R}$ или $-\text{SO}_2\text{R}$;

каждый R независимо представляет собой $-\text{H}$ или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-30} алифатического, C_{1-30} гетероалифатического фрагмента, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, C_{6-30} арильного, C_{6-30} арилалифатического, C_{6-30} арилгетероалифатического фрагмента, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, 5–30-

членного гетероарила, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3–30-членного гетероциклила, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, 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 этим атомом образуют необязательно замещенное 3–30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, имеющее, в дополнение к атому, 0–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния; 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, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток, например аминокислоты, имеющей структуру формулы **A-I**, имеет структуру $-N(R^{a1})-L^{a1}-C(R^{a2})(R^{a3})-L^{a2}-CO-$. В некоторых вариантах осуществления каждый аминокислотный остаток в пептиде независимо имеет структуру $-N(R^{a1})-L^{a1}-C(R^{a2})(R^{a3})-L^{a2}-CO-$.

[178] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено производное аминокислоты формулы **A-I** или его соль. В некоторых вариантах осуществления производное представляет собой сложный эфир. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено соединение формулы $NH(R^{a1})-L^{a1}-C(R^{a2})(R^{a3})-L^{a2}-COOR^{CT}$ или его соль, где R^{CT} представляет собой R' , а каждая другая переменная независимо является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления R^{CT} представляет собой R. В некоторых вариантах осуществления R^{CT} представляет собой необязательно замещенный алифатический фрагмент. В некоторых вариантах осуществления R^{CT} представляет собой трет-бутил.

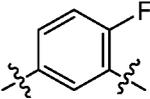
[179] В некоторых вариантах осуществления L^{a1} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы **A-I** имеет структуру $NH(R^{a1})-C(R^{a2})(R^{a3})-L^{a2}-COOH$. В некоторых вариантах осуществления L^{a2} представляет собой $-CH_2SCH_2-$.

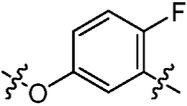
[180] В некоторых вариантах осуществления L^{a2} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы A-I имеет структуру $NH(R^{a1})-L^{a1}-C(R^{a2})(R^{a3})-COOH$. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток имеет структуру $-N(R^{a1})-L^{a1}-C(R^{a2})(R^{a3})-CO-$. В некоторых вариантах осуществления L^{a1} представляет собой $-CH_2CH_2S-$. В некоторых вариантах осуществления L^{a1} представляет собой $-CH_2CH_2S-$, где CH_2 связан с $NH(R^{a1})$.

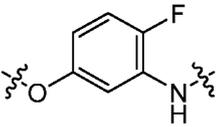
[181] В некоторых вариантах осуществления L^{a1} представляет собой ковалентную связь и L^{a2} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы A-I имеет структуру $NH(R^{a1})-C(R^{a2})(R^{a3})-COOH$; $NH(R^{a1})-CH(R^{a2})-COOH$; $NH(R^{a1})-CH(R^{a3})-COOH$; $NH_2-CH(R^{a2})-COOH$; $NH_2-CH(R^{a3})-COOH$; $-N(R^{a1})-C(R^{a2})(R^{a3})-CO-$; $N(R^{a1})-CH(R^{a2})-CO-$; $-N(R^{a1})-CH(R^{a3})-CO-$; $-NH-CH(R^{a2})-CO-$ или $-NH-CH(R^{a3})-CO-$.

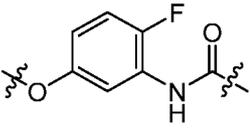
[182] В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой ковалентную связь; L^a представляет собой двухвалентный необязательно замещенный C_{1-6} алифатический фрагмент; L^a представляет собой необязательно замещенный C_{1-6} алкилен; L^a представляет собой $-CH_2-$; L^a представляет собой $-CH_2CH_2-$; или L^a представляет собой $-CH_2CH_2CH_2-$.

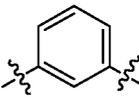
[183] В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой двухвалентный необязательно замещенный C_{1-20} алифатический фрагмент, в котором одно или более метиленовых звеньев независимо замещены $-C(O)-$, $-N(R')$, $-S-$ и/или $-O-$. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой двухвалентный необязательно замещенный C_{1-20} алифатический фрагмент, в котором одно или более метиленовых звеньев независимо замещены $-C(O)N(R')$, $-S-$ и/или $-O-$. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой двухвалентный необязательно замещенный C_{1-20} алифатический фрагмент, в котором два или более метиленовых звеньев независимо замещены $-C(O)N(R')$ и $-S-$ в дополнение к другим необязательным замещениям. В некоторых вариантах осуществления $-S-$ необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления $-S-$ необязательно замещен электроноакцепторной группой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления $-S-$ замещен одним или более $-F$. В некоторых вариантах осуществления $-S-$ представляет собой необязательно замещенный 1,3-фенилен. В некоторых вариантах осуществления $-S-$ представляет собой необязательно замещенный 1,4-фенилен. В некоторых

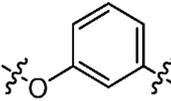
вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит . В некоторых

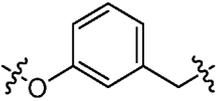
вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит  . В некоторых

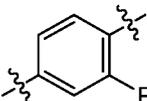
вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит  . В некоторых

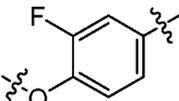
вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит  . В некоторых

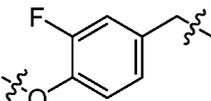
вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит  . В некоторых

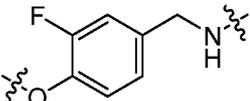
вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит  . В некоторых

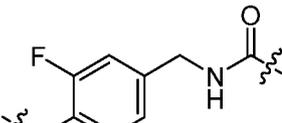
вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит  . В некоторых

вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит  F . В некоторых

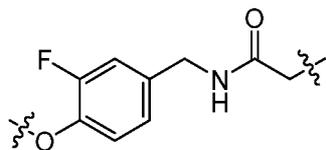
вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит  . В некоторых

вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит  . В некоторых

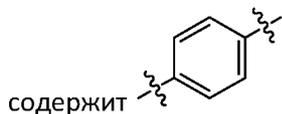
вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит  . В некоторых

вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит  . В

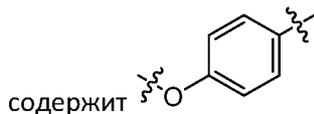
некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит



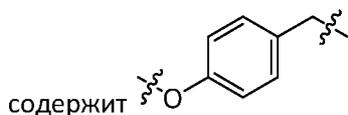
. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой или



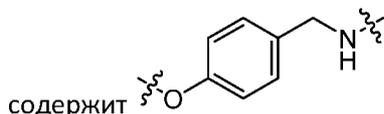
. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой или



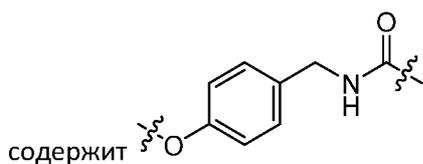
. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой или



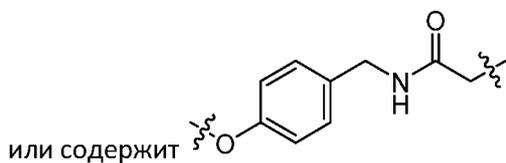
. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой или



. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой или



. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой



[184] В некоторых вариантах осуществления R' представляет собой R . В некоторых вариантах осуществления R^{a1} представляет собой R , где R является таким, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления R^{a1} представляет собой R , где R представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления R^{a2} представляет собой R , где R является таким, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления R^{a3} представляет собой R , где R является таким, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления каждый из R^{a1} , R^{a2} и R^{a3} независимо представляет собой R , где R является таким, как описано в настоящем изобретении.

[185] В некоторых вариантах осуществления R^{a1} представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления R^{a1} представляет собой защитную группу. В некоторых вариантах осуществления R^{a1} представляет собой $-Fmoc$. В некоторых вариантах осуществления

R^{a1} представляет собой $-Dde$.

[186] В некоторых вариантах осуществления каждый из R^{a1} , R^{a2} и R^{a3} независимо представляет собой $-L^a-R'$.

[187] В некоторых вариантах осуществления R^{a2} представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления R^{a3} представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления R^{a1} представляет собой водород и по меньшей мере один из R^{a2} и R^{a3} представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления R^{a1} представляет собой водород, один из R^{a2} и R^{a3} представляет собой водород, а другой не представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления R^{a2} представляет собой $-L^a-R$ и R^{a3} представляет собой $-H$. В некоторых вариантах осуществления R^{a3} представляет собой $-L^a-R$ и R^{a2} представляет собой $-H$. В некоторых вариантах осуществления R^{a2} представляет собой $-CH_2-R$ и R^{a3} представляет собой $-H$. В некоторых вариантах осуществления R^{a3} представляет собой $-CH_2-R$ и R^{a2} представляет собой $-H$. В некоторых вариантах осуществления R^{a2} представляет собой R и R^{a3} представляет собой $-H$. В некоторых вариантах осуществления R^{a3} представляет собой R и R^{a2} представляет собой $-H$.

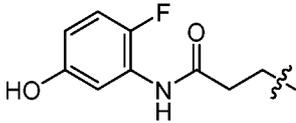
[188] В некоторых вариантах осуществления R^{a2} представляет собой $-L^a-R$, где R является таким, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления R^{a2} представляет собой $-L^a-R$, где R представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{3-30} циклоалифатического фрагмента, C_{5-30} арила, 5–30-членного гетероарила, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3–30-членного гетероциклила, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах осуществления R^{a2} представляет собой $-L^a-R$, где R представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{6-30} арила и 5–30-членного гетероарила, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах осуществления R^{a2} представляет собой боковую цепь аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления R^{a2} представляет собой боковую цепь стандартной аминокислоты.

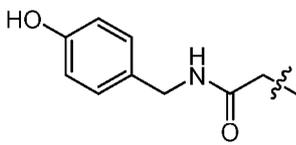
[189] В некоторых вариантах осуществления R^{a3} представляет собой $-L^a-R$, где R является таким, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления R^{a3} представляет собой $-L^a-R$, где R представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{3-30} циклоалифатического фрагмента, C_{5-30} арила, 5–30-членного гетероарила, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния, и 3–30-членного гетероциклила, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных

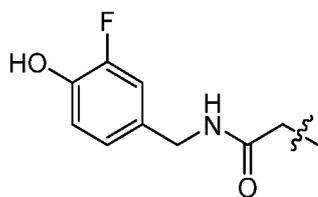
из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах осуществления R^{a3} представляет собой $-L^a-R$, где R представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из C_{6-30} арила и 5–30-членного гетероарила, имеющего 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах осуществления R^{a3} представляет собой боковую цепь аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления R^{a3} представляет собой боковую цепь стандартной аминокислоты.

[190] В некоторых вариантах осуществления один из R^{a2} и R^{a3} представляет собой $-H$. В некоторых вариантах осуществления один из R^{a2} и R^{a3} представляет собой $-L^a-R$, где L^a является таким, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^a не представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления одно или более метиленовых звеньев L^a независимо и необязательно замещены, как описано в данном документе, например, $-C(O)-$, $-N(R')-$, $-O-$, $-C(O)-N(R')-$ и/или $-C\equiv$ и т. д. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит $-C(O)-$, $-N(R')-$ и $-C\equiv$. В некоторых вариантах осуществления L^a представляет собой или содержит $-C(O)N(R')-$ и $-C\equiv$. В некоторых вариантах осуществления, как описано в данном документе, $-C\equiv$ замещен, и при этом один или более заместителей независимо представляют собой электроноакцепторную группу.

[191] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная боковая цепь представляет собой R^{a2} или R^{a3} . В некоторых вариантах осуществления аминокислотная боковая цепь представляет собой или содержит $-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-H$. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная боковая цепь представляет собой или содержит $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-H$. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная боковая цепь представляет собой или содержит $-L^{LG3}-L^{LG4}-H$. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная боковая цепь представляет собой или содержит $-L^{LG4}-H$. В некоторых вариантах осуществления такая боковая цепь

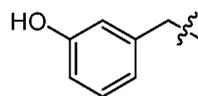
представляет собой . В некоторых вариантах осуществления такая боковая

цепь представляет собой . В некоторых вариантах осуществления такая



боковая цепь представляет собой

. В некоторых вариантах

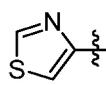


осуществления такая боковая цепь представляет собой

[192] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенный C_{1-6} алифатический фрагмент. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенный C_{1-6} алкил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой $-CH_3$. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенный пентил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой n-пентил.

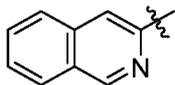
[193] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой циклическую группу. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенную C_{3-30} циклоалифатическую группу. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой циклопропил.

[194] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенную ароматическую группу, и при этом аминокислотный остаток аминокислоты формулы **A-I** представляет собой Хаа^A. В некоторых вариантах осуществления R^{a2} или R^{a3} представляет собой $-CH_2-R$, где R представляет собой необязательно замещенную арильную или гетероарильную группу. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенный фенил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой фенил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенный фенил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой 4-трифторметилфенил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой 4-фенилфенил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенный 5–30-членный гетероарил, имеющий 1–10 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенный 5–14-членный гетероарил, имеющий 1–5 гетероатомов, независимо выбранных из кислорода, азота и серы. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой



. В некоторых

вариантах осуществления R представляет собой необязательно замещенный пиридинил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой 1-пиридинил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой 2-пиридинил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой 3-пиридинил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой



[195] В некоторых вариантах осуществления R' представляет собой –COOH. В некоторых вариантах осуществления соединения аминокислотного остатка аминокислоты формулы **A-I** представляет собой Хаа^N.

[196] В некоторых вариантах осуществления R' представляет собой –NH₂. В некоторых вариантах осуществления соединения аминокислотного остатка аминокислоты формулы **A-I** представляет собой Хаа^P.

[197] В некоторых вариантах осуществления R^{a2} или R^{a3} представляет собой R, где R представляет собой C₁₋₂₀ алифатический фрагмент, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления соединения аминокислотного остатка аминокислоты формулы **A-I** представляет собой Хаа^H. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой –CH₃. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой этил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой пропил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой n-пропил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой бутил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой n-бутил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой пентил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой n-пентил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой циклопропил.

[198] В некоторых вариантах осуществления два или более из R^{a1}, R^{a2} и R^{a3} представляют собой R и вместе образуют необязательно замещенное кольцо, как описано в настоящем изобретении.

[199] В некоторых вариантах осуществления R^{a1} и один из R^{a2} и R^{a3} представляют собой R и вместе образуют необязательно замещенное 3–6-членное кольцо, не имеющее дополнительного кольцевого гетероатома, отличного от атома азота, с которым связан R^{a1}. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо представляет собой 5-членное кольцо, как в пролине.

[200] В некоторых вариантах осуществления R^{a2} и R^{a3} представляют собой R и вместе

образуют необязательно замещенное 3–6-членное кольцо, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления R^{a2} и R^{a3} представляют собой R и вместе образуют необязательно замещенное 3–6-членное кольцо, имеющее один или более кольцевых атомов азота. В некоторых вариантах осуществления R^{a2} и R^{a3} представляют собой R и вместе образуют необязательно замещенное 3–6-членное кольцо, имеющее один и не более одного кольцевого гетероатома, который представляет собой атом азота. В некоторых вариантах осуществления кольцо представляет собой насыщенное кольцо.

[201] В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой природную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой неприродную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой альфа-аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой бета-аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы **A-I** представляет собой природную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы **A-I** представляет собой неприродную аминокислоту.

[202] В некоторых вариантах осуществления аминокислота содержит гидрофобную боковую цепь. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с гидрофобной боковой цепью представляет собой A, V, I, L, M, F, Y или W. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с гидрофобной боковой цепью представляет собой A, V, I, L, M или F. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с гидрофобной боковой цепью представляет собой A, V, I, L или M. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с гидрофобной боковой цепью представляет собой A, V, I или L. В некоторых вариантах осуществления гидрофобная боковая цепь представляет собой R, где R представляет собой C_{1-10} алифатический фрагмент. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой C_{1-10} алкил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой этил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой пропил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой бутил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой пентил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой n-пентил. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с гидрофобной боковой цепью представляет собой $NH_2CH(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3)COOH$. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с гидрофобной боковой цепью представляет собой (S)- $NH_2CH(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3)COOH$. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с гидрофобной боковой цепью представляет собой (R)- $NH_2CH(CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3)COOH$. В некоторых вариантах осуществления гидрофобная боковая цепь

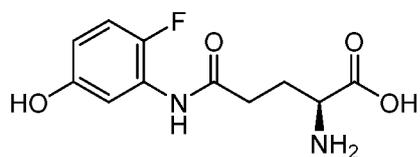
представляет собой $-\text{CH}_2\text{R}$, где R представляет собой необязательно замещенный фенил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой фенил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой фенил, замещенный одной или более углеводородными группами. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой 4-фенилфенил. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с гидрофобной боковой цепью представляет собой $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{-4-фенилфенил})\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с гидрофобной боковой цепью представляет собой (S)- $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{-4-фенилфенил})\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления аминокислота с гидрофобной боковой цепью представляет собой (R)- $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{-4-фенилфенил})\text{COOH}$.

[203] В некоторых вариантах осуществления аминокислота содержит положительно заряженную боковую цепь (например, при физиологическом pH), как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота содержит основной атом азота в боковой цепи. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой Arg, His или Lys. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой Arg. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой Lys.

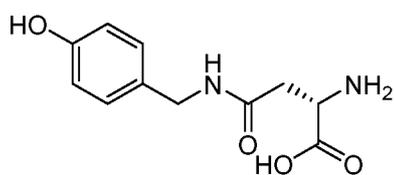
[204] В некоторых вариантах осуществления аминокислота содержит отрицательно заряженную боковую цепь (например, при физиологическом pH), как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота содержит $-\text{COOH}$ в боковой цепи. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой Glu.

[205] В некоторых вариантах осуществления аминокислота содержит боковую цепь, содержащую ароматическую группу, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой Phe, Tyr, Trp или His. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой Phe. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой Tyr. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой His. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-4-фенилфенил})\text{-COOH}$. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой (S)- $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-4-фенилфенил})\text{-COOH}$. В некоторых вариантах осуществления такая аминокислота представляет собой (R)- $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-4-фенилфенил})\text{-COOH}$.

[206] В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой



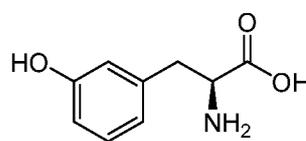
или ее соль. В некоторых вариантах осуществления



аминокислота представляет собой

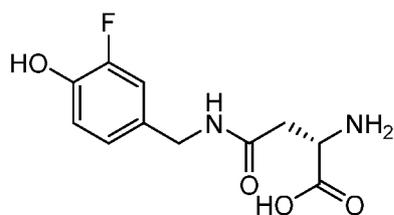
или ее соль. В некоторых

вариантах осуществления аминокислота представляет собой



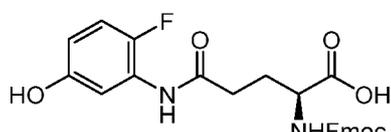
или ее

соль. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой



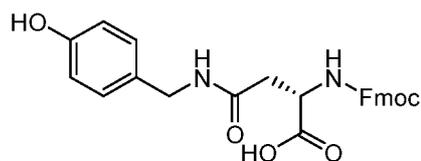
или ее соль. В некоторых вариантах осуществления аминокислота

представляет собой



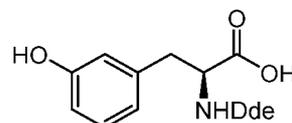
или ее соль. В некоторых вариантах

осуществления аминокислота представляет собой

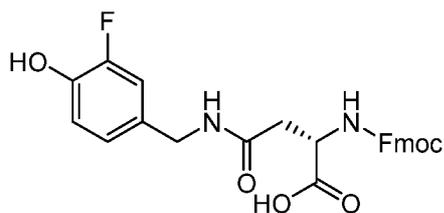


или ее соль.

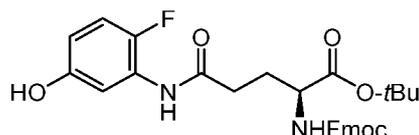
В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой



или ее соль. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой



или ее соль. В некоторых вариантах осуществления



предложенное соединение представляет собой . В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены полипептидные агенты, содержащие один или более аминокислотных остатков, описанных в настоящем изобретении.

Реактивная группа

[207] 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.

[208] 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).

[209] 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, одним 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 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 (например, смотрите Фиг. 15).

[210] 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.

[211] В некоторых вариантах осуществления реактивная группа, например RG, представляет собой или содержит $-L^{RG1}-L^{RG2}-$, где каждый из L^{RG1} и L^{RG2} независимо представляет собой L, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа, например RG, представляет собой или содержит $-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$, где каждая переменная

является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа, например RG, представляет собой или содержит $-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа, например RG, представляет собой или содержит $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа, например RG, представляет собой или содержит $-L^{LG4}-L^{RG2}-$, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа, например RG, представляет собой или содержит $-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG2}-$, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа, например RG, представляет собой или содержит $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG2}-$, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе.

[212] В некоторых вариантах осуществления, как описано в данном документе, L^{LG4} представляет собой $-O-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG4} представляет собой $-N(R)-$. В некоторых вариантах осуществления L^{LG4} представляет собой $-NH-$.

[213] В некоторых вариантах осуществления, как описано в данном документе, L^{LG3} представляет собой или содержит необязательно замещенное арильное кольцо. В некоторых вариантах осуществления L^{LG3} представляет собой или содержит фенильное кольцо. В некоторых вариантах осуществления арильное или фенильное кольцо является замещенным. В некоторых вариантах осуществления заместитель представляет собой электроноакцепторную группу, как описано в данном документе, например, $-NO_2$, $-F$ и т. д.

[214] В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} не представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-S(O)_2-$.

[215] В некоторых вариантах осуществления L^{RG2} представляет собой $-C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа представляет собой или содержит $-L^{LG4}-C(O)-$, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа, представляет собой или содержит $-L^{LG3}-L^{LG4}-C(O)-$, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа, представляет собой или содержит $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-C(O)-$, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе.

[216] В некоторых вариантах осуществления L^{RG2} представляет собой

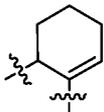
$-L^{RG3}-C(=CR^{RG1}R^{RG2})-CR^{RG3}R^{RG4}-$, где каждый из R^{RG1} , R^{RG2} , R^{RG3} и R^{RG4} независимо представляет собой $-L-R'$, а L^{RG3} представляет собой $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-C(O)N(R')-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-P(O)(OR')-$, $-P(O)(SR')-$ или $-P(O)(N(R')_2)-$. В некоторых вариантах осуществления каждый из R^{RG1} , R^{RG2} , R^{RG3} и R^{RG4} независимо представляет собой R' . В некоторых вариантах осуществления один или более из R^{RG1} , R^{RG2} , R^{RG3} и R^{RG4} независимо представляет собой $-H$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG3} представляет собой $-C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG3} представляет собой $-C(O)O-$. В некоторых вариантах осуществления $-O-$, $-N(R')-$ и т. д. в L^{RG3} связан с L^{PM} .

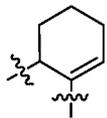
[217] В некоторых вариантах осуществления R^{RG1} представляет собой $-H$. В некоторых вариантах осуществления R^{RG3} представляет собой $-H$.

[218] В некоторых вариантах осуществления L^{RG2} представляет собой необязательно замещенный $-L^{RG3}-C(=CHR^{RG2})-CHR^{RG4}-$, где каждая переменная является такой, как описано в данном документе.

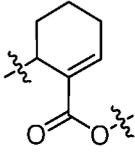
[219] В некоторых вариантах осуществления R^{RG2} и R^{RG4} вместе со своими промежуточными атомами образуют необязательно замещенное кольцо, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо представляет собой необязательно замещенное 3–10-членное моноциклическое или бициклическое кольцо, имеющее 0–5 гетероатомов. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо представляет собой необязательно замещенное 3–10-членное циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо представляет собой необязательно замещенное 3–8-членное циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо представляет собой необязательно замещенное 5–8-членное циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо представляет собой необязательно замещенное 5-членное циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо представляет собой необязательно замещенное 6-членное циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо представляет собой необязательно замещенное 7-членное циклоалифатическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо является замещенным. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо не является замещенным. В некоторых вариантах осуществления образованное кольцо не содержит дополнительной ненасыщенности в двойной связи в $C(=CHR^{RG2})$ или $C(=CR^{RG1}R^{RG2})$.

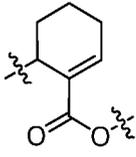
[220] В некоторых вариантах осуществления $-C(=CHR^{RG2})-CHR^{RG4}$ или

$-C(=CR^{RG1}R^{RG2})-CR^{RG3}R^{RG4}$ представляет собой необязательно замещенный . В некоторых вариантах осуществления $-C(=CHR^{RG2})-CHR^{RG4}$ или $-C(=CR^{RG1}R^{RG2})-CR^{RG3}R^{RG4}$ представляет собой



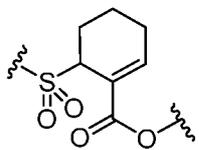
. В некоторых вариантах осуществления $-C(=CHR^{RG2})-CHR^{RG4}-L^{RG3}$ или

$-C(=CR^{RG1}R^{RG2})-CR^{RG3}R^{RG4}-L^{RG3}$ представляет собой необязательно замещенный . В некоторых вариантах осуществления $-C(=CHR^{RG2})-CHR^{RG4}-L^{RG3}$ или $-C(=CR^{RG1}R^{RG2})-CR^{RG3}R^{RG4}-L^{RG3}$

представляет собой . В некоторых вариантах осуществления

$-L^{RG1}-C(=CHR^{RG2})-CHR^{RG4}-L^{RG3}$ или $-L^{RG1}-C(=CR^{RG1}R^{RG2})-CR^{RG3}R^{RG4}-L^{RG3}$ представляет собой

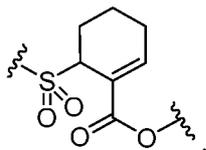
необязательно замещенный



. В некоторых вариантах осуществления

$-L^{RG1}-C(=CHR^{RG2})-CHR^{RG4}-L^{RG3}$ или $-L^{RG1}-C(=CR^{RG1}R^{RG2})-CR^{RG3}R^{RG4}-L^{RG3}$ представляет собой

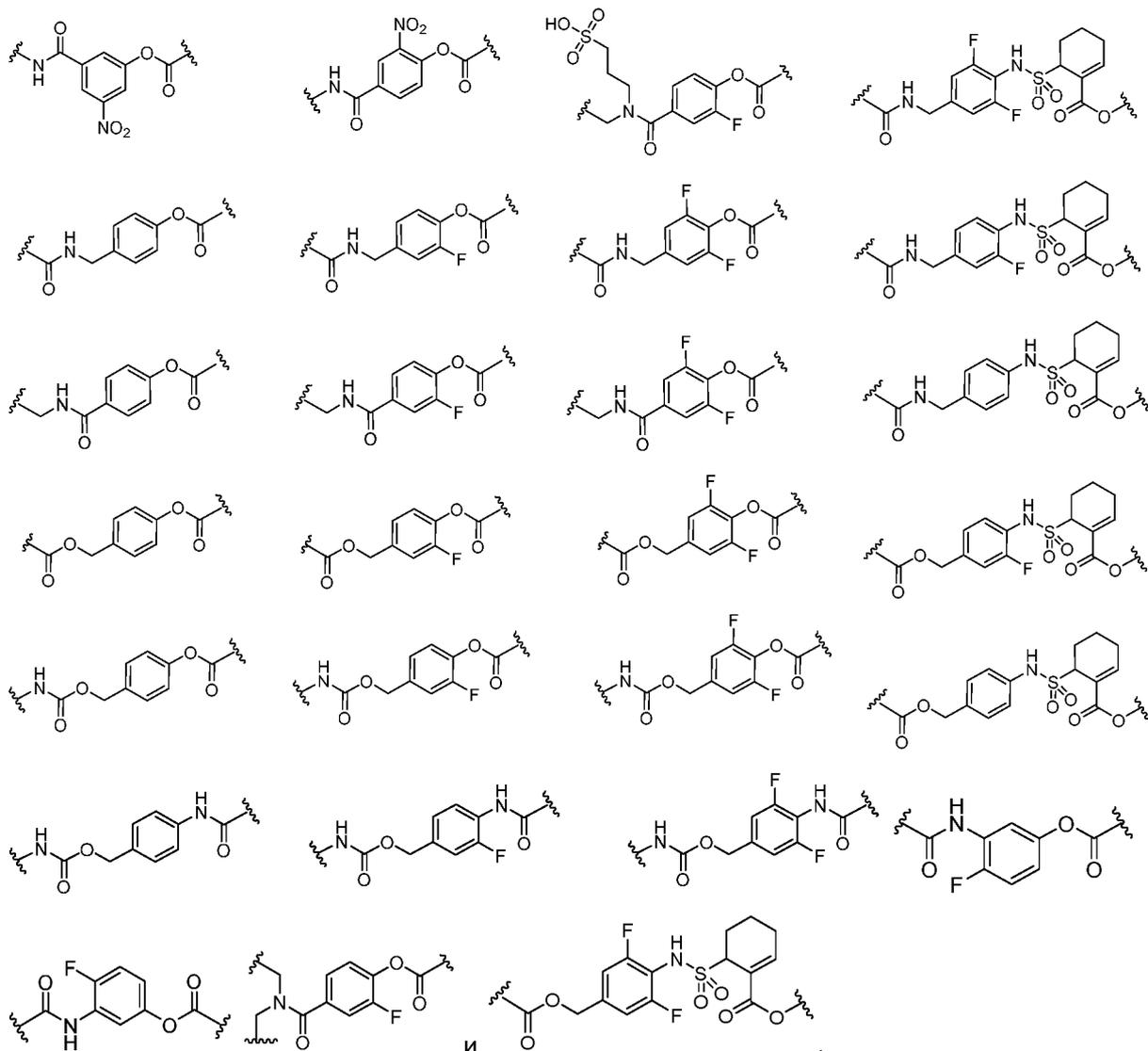
необязательно замещенный



[221] В некоторых вариантах осуществления реактивная группа представляет собой структуру, выбранную из таблицы ниже. В некоторых вариантах осуществления

$-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}$ представляет собой структуру, выбранную из таблицы ниже. В некоторых вариантах осуществления $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-RG$ представляет собой структуру, выбранную из таблицы ниже.

Таблица RG-1. Некоторые структуры в качестве примеров.



[222] В некоторых вариантах осуществления $-L^{LG4}-L^{RG2}-$ представляет собой $-O-C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления $-L^{LG4}-L^{RG2}-$ представляет собой $-S-C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления $-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$ представляет собой $-S-C(O)-$.

[223] В некоторых вариантах осуществления $-L^{LG4}-L^{RG2}-$ представляет собой $-N(-)-C(O)-$, где N представляет собой кольцевой атом необязательно замещенного гетероарильного кольца. В некоторых вариантах осуществления $-L^{LG4}-L^{RG2}-$ представляет собой $-N(-)-C(O)-$, где N представляет собой кольцевой атом L^{LG4} , который представляет собой или содержит необязательно замещенное гетероарильное кольцо. В некоторых вариантах осуществления $-L^{LG4}-L^{RG2}-$ представляет собой $-N(-)-C(O)-O-$, где N представляет собой кольцевой атом L^{LG4} , который представляет собой или содержит необязательно замещенное гетероарильное кольцо.

[224] В некоторых вариантах осуществления L^{RG2} представляет собой необязательно замещенный $-CH_2-C(O)-$, где $-CH_2-$ связан с электроноакцепторной группой, содержащей связывающий мишень фрагмент или соединенной с ним. В некоторых вариантах осуществления L^{RG2} представляет собой необязательно замещенный $-CH_2-$, связанный с электроноакцепторной группой, содержащей связывающий мишень фрагмент или соединенной с ним. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой электроноакцепторную группу. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-S(O)-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-S(O)_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-P(O(OR))-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-P(O(SR))-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-P(O(N(R)_2))-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-OP(O(OR))-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-OP(O(SR))-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-OP(O(N(R)_2))-$.

[225] В некоторых вариантах осуществления L^{RG2} представляет собой необязательно замещенный $-CH_2-C(O)-$, где $-CH_2-$ связан с уходящей группой, содержащей связывающий мишень фрагмент или соединенной с ним. В некоторых вариантах осуществления L^{RG2} представляет собой необязательно замещенный $-CH_2-$, связанный с уходящей группой, содержащей связывающий мишень фрагмент или соединенной с ним. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-O-C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-OS(O)_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-OP(O(OR))-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-OP(O(SR))-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG1} представляет собой $-OP(O(N(R)_2))-$.

[226] В некоторых вариантах осуществления реактивная группа вступает в реакцию с аминогруппой целевого агента. В некоторых вариантах осуществления аминогруппа представляет собой $-NH_2$ боковой цепи остатка лизина.

[227] В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой белковый агент. В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой агент на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа вступает в реакцию с аминокислотным остатком такого белкового агента или агента на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток представляет собой остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа вступает в реакцию с $-NH_2$ боковой цепи остатка лизина. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа представляет собой или

содержит $-C(O)-O-$, она вступает в реакцию с $-NH_2$ (например, боковой цепи остатка лизина) и образует амидную группу $-C(O)-O-$ с $-NH_2$.

Линкерные фрагменты

[228] 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.

[229] 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.

[230] 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.

[231] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент, например L^z (где z представляет текст верхнего индекса; например L^{PM} , L^{RM} , L^{LG} , L^{LG1} и т. д.), представляет собой или содержит L.

[232] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой ковалентную связь или двухвалентную или поливалентную необязательно замещенную линейную или разветвленную C_{1-100} группу, содержащую один или более алифатических, арильных, гетероалифатических фрагментов, имеющих 1–20 гетероатомов, гетероароматических фрагментов, имеющих 1–20 гетероатомов, или любые их комбинации, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены C_{1-6} алкиленом, C_{1-6} алкениленом, двухвалентной C_{1-6} гетероалифатической группой, имеющей 1–5 гетероатомов, $-C\equiv C-$, $-C_2-$, $-C(R')_2-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-C(O)C(R')_2N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$, $-C(O)O-$, $-P(O)(OR')-$, $-P(O)(SR')-$, $-P(O)(R')-$, $-P(O)(NR')-$, $-P(S)(OR')-$, $-P(S)(SR')-$, $-P(S)(R')-$, $-P(S)(NR')-$, $-P(R')-$, $-P(OR')-$, $-P(SR')-$, $-P(NR')-$, аминокислотным остатком или $-[(-O-C(R')_2-C(R')_2)_n]-$, где n равен 1–20. В некоторых вариантах осуществления каждый аминокислотный остаток независимо представляет собой остаток аминокислоты, имеющий структуру формулы A-I, или его соль. В некоторых вариантах осуществления каждый аминокислотный остаток независимо имеет структуру $-N(R^{a1})-L^{a1}-C(R^{a2})(R^{a3})-L^{a2}-CO-$ или полученной из нее соли.

[233] В некоторых вариантах осуществления L является двухвалентным. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой ковалентную связь.

[234] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой двухвалентную или необязательно замещенную линейную или разветвленную группу, выбранную из C_{1-100} алифатического и C_{1-100} гетероалифатического фрагментов, имеющих 1–50 гетероатомов, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены C_{1-6} алкиленом, C_{1-6} алкениленом, двухвалентной C_{1-6} гетероалифатической группой, имеющей 1–5 гетероатомов, $-C\equiv C-$, $-C_2-$, $-C(R')_2-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-C(O)C(R')_2N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$, $-C(O)O-$, $-P(O)(OR')-$, $-P(O)(SR')-$, $-P(O)(R')-$, $-P(O)(NR')-$, $-P(S)(OR')-$, $-P(S)(SR')-$, $-P(S)(R')-$, $-P(S)(NR')-$, $-P(R')-$, $-P(OR')-$, $-P(SR')-$, $-P(NR')-$, аминокислотным остатком или $-[(-O-C(R')_2-C(R')_2)_n]-$.

[235] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой двухвалентную или необязательно замещенную линейную или разветвленную группу, выбранную из C_{1-20} алифатического и C_{1-20} гетероалифатического фрагментов, имеющих 1–10 гетероатомов, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены C_{1-6} алкиленом, C_{1-6} алкениленом, двухвалентной C_{1-6} гетероалифатической группой, имеющей 1–5

гетероатомов, $\text{—C}\equiv\text{C—}$, $\text{—C}_y\text{—}$, $\text{—C(R')}_2\text{—}$, —O— , —S— , —S—S— , —N(R')— , —C(O)— , —C(S)— , —C(NR')— , —C(O)N(R')— , $\text{—C(O)C(R')}_2\text{N(R')—}$, —N(R')C(O)N(R')— , —N(R')C(O)O— , —S(O)— , $\text{—S(O)}_2\text{—}$, $\text{—S(O)}_2\text{N(R')—}$, —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 $\text{—}[(\text{—O—C(R')}_2\text{—C(R')}_2\text{—})_n]\text{—}$.

[236] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой двухвалентную или необязательно замещенную линейную или разветвленную группу, выбранную из C_{1-20} алифатического фрагмента, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $\text{—C}\equiv\text{C—}$, $\text{—C}_y\text{—}$, $\text{—C(R')}_2\text{—}$, —O— , —S— , —S—S— , —N(R')— , —C(O)— , —C(S)— , —C(NR')— , —C(O)N(R')— , $\text{—C(O)C(R')}_2\text{N(R')—}$, —N(R')C(O)N(R')— , —N(R')C(O)O— , —S(O)— , $\text{—S(O)}_2\text{—}$, $\text{—S(O)}_2\text{N(R')—}$, —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 $\text{—}[(\text{—O—C(R')}_2\text{—C(R')}_2\text{—})_n]\text{—}$.

[237] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой двухвалентную или необязательно замещенную линейную или разветвленную группу, выбранную из C_{1-20} алифатической группы, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $\text{—C}\equiv\text{C—}$, $\text{—C}_y\text{—}$, $\text{—C(R')}_2\text{—}$, —O— , —S— , —S—S— , —N(R')— , —C(O)— , —C(S)— , —C(NR')— , —C(O)N(R')— , $\text{—C(O)C(R')}_2\text{N(R')—}$, —N(R')C(O)N(R')— , —N(R')C(O)O— , —S(O)— , $\text{—S(O)}_2\text{—}$, $\text{—S(O)}_2\text{N(R')—}$, —C(O)S— , —C(O)O— , аминокислотным остатком или $\text{—}[(\text{—O—C(R')}_2\text{—C(R')}_2\text{—})_n]\text{—}$.

[238] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой двухвалентную или необязательно замещенную линейную или разветвленную группу, выбранную из C_{1-20} алифатической группы, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $\text{—C}\equiv\text{C—}$, $\text{—C}_y\text{—}$, $\text{—C(R')}_2\text{—}$, —O— , —N(R')— , —C(O)— , —C(S)— , —C(NR')— , —C(O)N(R')— , $\text{—C(O)C(R')}_2\text{N(R')—}$, —N(R')C(O)N(R')— , —N(R')C(O)O— , —S(O)— , $\text{—S(O)}_2\text{—}$, $\text{—S(O)}_2\text{N(R')—}$, аминокислотным остатком или $\text{—}[(\text{—O—C(R')}_2\text{—C(R')}_2\text{—})_n]\text{—}$.

[239] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент, например L, L^{PM} , L^{RM} и т. д., содержит кислую группу, например $\text{—S(O)}_2\text{OH}$.

[240] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой или содержит $\text{—}[(\text{—O—C(R')}_2\text{—C(R')}_2\text{—})_n]\text{—}$. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой или содержит $\text{—}[(\text{—O—CH}_2\text{—CH}_2\text{—})_n]\text{—}$. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой $\text{—}[(\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—O})_6]\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—}$. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой $\text{—}[(\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—O})_8]\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—}$. В некоторых вариантах осуществления $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—O—}$ связан со

связывающим мишень фрагментом в $-\text{CH}_2-$. В некоторых вариантах осуществления $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ связан с представляющим интерес фрагментом в $-\text{CH}_2-$. В некоторых вариантах осуществления L^{PM} представляет собой такой L, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления L^{RM} представляет собой такой L, как описано в данном документе.

[241] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент является трехвалентным или поливалентным. Например, в некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент представляет собой L, как описано в данном документе, и при этом L является трехвалентным или поливалентным. В некоторых вариантах осуществления L является трехвалентным. Например, в некоторых вариантах осуществления L представляет собой $-\text{CH}_2-\text{N}(-\text{CH}_2-)-\text{C}(\text{O})-$.

[242] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой или содержит фрагмент продукта биоортогональной или ферментативной реакции. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой или содержит необязательно замещенный триазоловый фрагмент (который необязательно является частью би- или полициклической кольцевой системы). В некоторых вариантах осуществления L представляет собой или содержит LPXTG. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой или содержит LPETG. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой или содержит LPXT(G) $_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой или содержит LPET(G) $_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

[243] В некоторых вариантах осуществления предложенные соединения/агенты (например, реакционные партнеры, агенты (например, продукты предложенных способов и/или их этапов) не содержат расщепляемых групп (за исключением одной или более реактивных групп и/или их фрагментов), которые могут расщепляться в условиях, которые не приводят к существенным повреждению или трансформации целевых агентов и/или агентов, содержащих фрагменты целевых агентов (например, продуктов конъюгации, содержащих фрагменты целевых агентов). В некоторых вариантах осуществления предложенные соединения/агенты (например, реакционные партнеры, агенты (например, продукты предложенных способов и/или их этапов) не содержат расщепляемых групп (за исключением одной или более реактивных групп и/или их фрагментов), которые могут расщепляться в условиях, которые не приводят к получению агентов-мишеней и/или агентов, содержащих фрагменты агентов-мишеней (например, продуктов конъюгации, содержащих фрагменты агентов-мишеней), неэффективных для одного или более применений (например, для применения в качестве диагностических агентов, терапевтических

агентов и т. д.). В некоторых вариантах осуществления предложенные соединения/агенты (например, реакционные партнеры, агенты (например, продукты предложенных способов и/или их этапов) не содержат расщепляемых групп, которые могут расщепляться в биоортогональных условиях. В некоторых вариантах осуществления предложенные соединения/агенты (например, реакционные партнеры, агенты (например, продукты предложенных способов и/или их этапов) не содержат расщепляемых групп, которые могут расщепляться без существенного повреждения и/или трансформации белков. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа представляет собой или содержит $-S-$, $-S-S-$, $-S-Cy-$, $-C(O)-O-$, $-C(O)-S-$, фрагмент ацеталя, $-N=N-$, фрагмент имида, $-CH=N-$, фрагмент $-P(O)(OR)O-$, фрагмент $-P(O)(OR)-N(R)-$, фрагмент $--C(O)-CH_2-C(COOH)=CHC(O)-$, фрагмент $-CHOH-CHOH-$, фрагмент $-Se$, Si , связанный с двумя атомами кислорода, $-C(O)-CH_2-$, где $-CH_2-$ связан с бензильным атомом углерода, при этом фенильное кольцо бензильной группы замещено $-NO_2-$, $-C(O)-CH_2-$, где $-CH_2-$ связан с бензильным атомом углерода, при этом фенильное кольцо бензильной группы замещено $-NO_2-$ в *o*-положении, или фрагмент $-C(O)-N(-)$, где N представляет собой кольцевой атом гетероарильного кольца. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая группа представляет собой или содержит $-S-S-$, $-S-CH_2-Cy-$, $-S-Cy-$, $-C(O)-O-$, $-C(O)-S-$, фрагмент ацеталя, $-N=N-$, фрагмент имида, $-CH=N-$, фрагмент $-P(O)(OR)O-$, фрагмент $-P(O)(OR)-N(R)-$, фрагмент $--C(O)-CH_2-C(COOH)=CHC(O)-$, фрагмент $-CHOH-CHOH-$, фрагмент $-Se$, Si , связанный с двумя атомами кислорода, $-C(O)-CH_2-$, где $-CH_2-$ связан с бензильным атомом углерода, при этом фенильное кольцо бензильной группы замещено $-NO_2-$, $-C(O)-CH_2-$, где $-CH_2-$ связан с бензильным атомом углерода, при этом фенильное кольцо бензильной группы замещено $-NO_2-$ в *o*-положении, или фрагмент $-C(O)-N(-)$, где N представляет собой кольцевой атом гетероарильного кольца.

[244] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит расщепляемую группу, описанную выше. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит один или более или любой из следующих фрагментов: $-S-$, $-S-S-$, $-S-CH_2-Cy-$, $-S-Cy-$, $-C(O)-O-$, $-C(O)-S-$, фрагмент ацеталя, $-N=N-$, фрагмент имида, $-CH=N-$, фрагмент $-P(O)(OR)O-$, фрагмент $-P(O)(OR)-N(R)-$, фрагмент $--C(O)-CH_2-C(COOH)=CHC(O)-$, фрагмент $-CHOH-CHOH-$, фрагмент $-Se$, Si , связанный с двумя атомами кислорода, $-C(O)-CH_2-$, где $-CH_2-$ связан с бензильным атомом углерода, при этом фенильное кольцо бензильной группы замещено $-NO_2-$, $-C(O)-CH_2-$, где $-CH_2-$ связан с бензильным атомом углерода, при этом фенильное кольцо бензильной группы замещено $-NO_2-$ в *o*-положении, или фрагмент

$-C(O)-N(-)$, где N представляет собой кольцевой атом гетероарильного кольца. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит один или более или любой из следующих фрагментов: $-S-S-$, $-S-CH_2-Cy-$, $-S-Cy-$, $-C(O)-O-$, $-C(O)-S-$, фрагмент ацеталя, $-N=N-$, фрагмент имида, $-CH=N-$, фрагмент $-P(O)(OR)O-$, фрагмент $-P(O)(OR)-N(R)-$, фрагмент $--C(O)-CH_2-C(COOH)=CHC(O)-$, фрагмент $-CHOH-CHOH-$, фрагмент $-Se$, Si , связанный с двумя атомами кислорода, $-C(O)-CH_2-$, где $-CH_2-$ связан с бензильным атомом углерода, при этом фенильное кольцо бензильной группы замещено $-NO_2-$, $-C(O)-CH_2-$, где $-CH_2-$ связан с бензильным атомом углерода, при этом фенильное кольцо бензильной группы замещено $-NO_2-$ в *o*-положении, или фрагмент $-C(O)-N(-)$, где N представляет собой кольцевой атом гетероарильного кольца. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит $-S-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит $-S-S-$ (необязательно, за исключением дисульфидного фрагмента, образуемого двумя аминокислотными остатками, в некоторых вариантах осуществления, необязательно, за исключением дисульфидного фрагмента, образуемого двумя остатками цистеина). В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит $-S-Cy-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит $-S-CH_2-Cy-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит $-C(O)-O-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит $-C(O)-S-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит фрагмент ацеталя. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит $-N=N-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит фрагмент имида. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит $-CH=N-$ (необязательно, за исключением находящегося в кольце, в некоторых вариантах осуществления, необязательно, за исключением находящегося в гетероарильном кольце). В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит фрагмент $-P(O)(OR)O-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит фрагмент $-P(O)(OR)-N(R)-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит фрагмент $--C(O)-CH_2-C(COOH)=CHC(O)-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит фрагмент $-CHOH-CHOH-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит фрагмент $-Se-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит Si , связанный с двумя атомами кислорода. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит $-C(O)-CH_2-$, при этом $-CH_2-$ связан с бензильным атомом углерода, при этом фенильное кольцо бензильной группы

замещено $-\text{NO}_2-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$, при этом $-\text{CH}_2-$ связан с бензильным атомом углерода, при этом фенильное кольцо бензильной группы замещено $-\text{NO}_2-$ в *o*-положении. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит фрагмент $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(-)$, где N представляет собой кольцевой атом гетероарильного кольца. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент не содержит любую из этих групп. В некоторых вариантах осуществления L^{RM} представляет собой такой линкерный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления L^{PM} представляет собой такой линкерный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления L^{LG} представляет собой такой линкерный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления агент по настоящему изобретению не содержит один или более или все такие фрагменты.

[245] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой двухвалентную необязательно замещенную, линейную или разветвленную C_{1-100} алифатическую группу, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой двухвалентную необязательно замещенную, линейную или разветвленную C_{6-100} ариалифатическую группу, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой двухвалентную необязательно замещенную, линейную или разветвленную C_{5-100} гетероаралифатическую группу, имеющую 1–20 гетероатомов, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой двухвалентную необязательно замещенную, линейную или разветвленную C_{1-100} гетероалифатическую группу, имеющую 1–20 гетероатомов, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены.

[246] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент (например, L) представляет собой или содержит одно или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) полиэтиленгликолевых звеньев. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент представляет собой или содержит $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$, где n является таким, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления одно или более метиленовых звеньев L независимо замещены $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$.

[247] Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления n равно 1. В некоторых вариантах осуществления n равно 2. В некоторых вариантах осуществления n равно 3. В некоторых вариантах осуществления n равно 4. В некоторых вариантах осуществления n

равно 5. В некоторых вариантах осуществления n равно 6. В некоторых вариантах осуществления n равно 7. В некоторых вариантах осуществления n равно 8. В некоторых вариантах осуществления n равно 9. В некоторых вариантах осуществления n равно 10. В некоторых вариантах осуществления n равно 11. В некоторых вариантах осуществления n равно 12. В некоторых вариантах осуществления n равно 13. В некоторых вариантах осуществления n равно 14. В некоторых вариантах осуществления n равно 15. В некоторых вариантах осуществления n равно 16. В некоторых вариантах осуществления n равно 17. В некоторых вариантах осуществления n равно 18. В некоторых вариантах осуществления n равно 19. В некоторых вариантах осуществления n равно 20.

[248] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент (например, L) представляет собой или содержит одно или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислотных остатков. В контексте настоящего изобретения «один или более» может составлять 1–100, 1–50, 1–40, 1–30, 1–20, 1–10, 1–5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или более. В некоторых вариантах осуществления одно или более метиленовых звеньев L независимо замещены аминокислотным остатком. В некоторых вариантах осуществления одно или более метиленовых звеньев L независимо замещены аминокислотным остатком, при этом аминокислотный остаток получен из аминокислоты формулы A-I или ее соли. В некоторых вариантах осуществления одно или более метиленовых звеньев L независимо замещены аминокислотным остатком, при этом каждый аминокислотный остаток независимо имеет структуру $-N(R^{a1})-L^{a1}-C(R^{a2})(R^{a3})-L^{a2}-CO-$ или образованной из нее соли.

[249] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент содержит один или более фрагментов, например amino, карбонил и т. д., которые можно использовать для соединения с другими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент содержит один или более $-NR'-$, где R' является таким, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления $-NR'-$ улучшает растворимость. В некоторых вариантах осуществления $-NR'-$ служит точками соединения с другим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления R' представляет собой $-H$. В некоторых вариантах осуществления одно или более метиленовых звеньев L независимо замещены $-NR'-$, где R' является таким, как описано в настоящем изобретении.

[250] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент, например L, содержит группу $-C(O)-$, которую можно использовать для соединения с фрагментом. В некоторых вариантах осуществления одно или более метиленовых звеньев L независимо замещены $-C(O)-$.

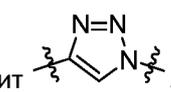
[251] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент, например L, содержит группу $-NR'$, которую можно использовать для соединения с фрагментом. В некоторых вариантах осуществления одно или более метиленовых звеньев L независимо замещены $-N(R')$.

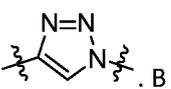
[252] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент, например L, содержит группу $-C(O)NR'$, которую можно использовать для соединения с фрагментом. В некоторых вариантах осуществления одно или более метиленовых звеньев L независимо замещены $-C(O)N(R')$.

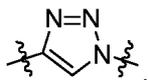
[253] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент, например L, содержит группу $-C(R')_2$. В некоторых вариантах осуществления одно или более метиленовых звеньев L независимо замещены $-C(R')_2$. В некоторых вариантах осуществления $-C(R')_2$ представляет собой $-CHR'$. В некоторых вариантах осуществления R' представляет собой $-(CH_2)_2C(O)NH(CH_2)_{11}COOH$. В некоторых вариантах осуществления R' представляет собой $-(CH_2)_2COOH$. В некоторых вариантах осуществления R' представляет собой $-COOH$.

[254] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент представляет собой или содержит один или более кольцевых фрагментов, например, одно или более метиленовых звеньев L замещены $-Su-$. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент, например L, содержит арильное кольцо. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент, например L, содержит гетероарильное кольцо. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент, например L, содержит алифатическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент, например L, содержит гетероциклическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент, например L, содержит полициклическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления кольцо в линкерном фрагменте, например L, является 3–20-членным. В некоторых вариантах осуществления кольцо является 5-членным. В некоторых вариантах осуществления кольцо является 6-членным. В некоторых вариантах осуществления кольцо в линкере является продуктом реакции добавления цикла (например, клик-химии или ее вариантов), используемой для связывания вместе разных фрагментов.

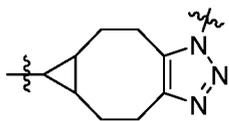
[255] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент (например L)

представляет собой или содержит . В некоторых вариантах осуществления

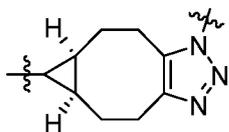
метиленовое звено L замещено . В некоторых вариантах осуществления метиленовое звено L замещено $-Su-$. В некоторых вариантах осуществления $-Su-$ представляет собой



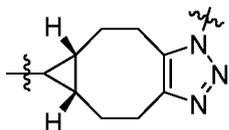
[256] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент (например L) представляет собой или содержит –Су–. В некоторых вариантах осуществления метиленовое звено L замещено –Су–. В некоторых вариантах осуществления –Су– представляет собой



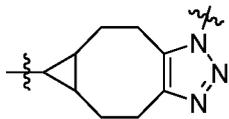
. В некоторых вариантах осуществления –Су– представляет собой



. В некоторых вариантах осуществления –Су– представляет собой



[257] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент, например L, содержит



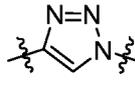
[258] В некоторых вариантах осуществления L^{RM} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^{RM} не представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^{RM} представляет собой или содержит $-(CH_2CH_2O)_n-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RM} представляет собой или содержит $-(CH_2)_n-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_n-$, где каждое n независимо является таким, как описано в данном документе, а каждый $-CH_2-$ независимо необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{RM} представляет собой $-(CH_2)_n-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_n-$, где каждое n независимо является таким, как описано в данном документе, а каждый $-CH_2-$ независимо необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{RM} представляет собой $-(CH_2)_2-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_2-$, где n является таким, как описано в данном документе, а каждый $-CH_2-$ независимо необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{RM} представляет собой $-(CH_2)_2-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_2-$, где n является таким, как описано в данном документе.

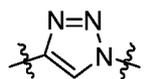
[259] В некоторых вариантах осуществления L^{PM} представляет собой ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления L^{PM} не представляет собой ковалентную связь. В некоторых

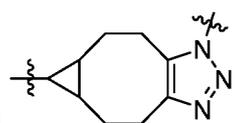
вариантах осуществления L^{PM} представляет собой или содержит $-(CH_2CH_2O)_n-$. В некоторых вариантах осуществления L^{PM} представляет собой или содержит $-(CH_2)_n-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_n-$, где каждое n независимо является таким, как описано в данном документе, а каждый $-CH_2-$ независимо необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{PM} представляет собой $-(CH_2)_n-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_n-$, где каждое n независимо является таким, как описано в данном документе, а каждый $-CH_2-$ независимо необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{PM} представляет собой $-(CH_2)_2-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_2-$, где n является таким, как описано в данном документе, а каждый $-CH_2-$ независимо необязательно замещен. В некоторых вариантах осуществления L^{PM} представляет собой $-(CH_2)_2-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_2-$, где n является таким, как описано в данном документе.

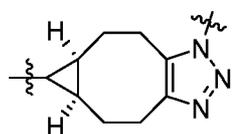
[260] В некоторых вариантах осуществления L^{PM} (например, в продукте первого и второго агентов) представляет собой или содержит фрагмент продукта реакции, образованный первым реактивным фрагментом и вторым реактивным фрагментом.

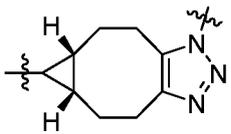
[261] В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент (например, L^{PM} в

продукте первого и второго агентов) представляет собой или содержит . В некоторых вариантах осуществления метиленовое звено линкерного фрагмента, например L или линкерного фрагмента, который может представлять собой L (например, L^{RM} , L^{PM} , и т. д.), замещено $-Su-$. В некоторых вариантах осуществления $-Su-$ представляет собой необязательно замещенный

. В некоторых вариантах осуществления $-Su-$ представляет собой

некоторых вариантах осуществления $-Su-$ представляет собой . В некоторых

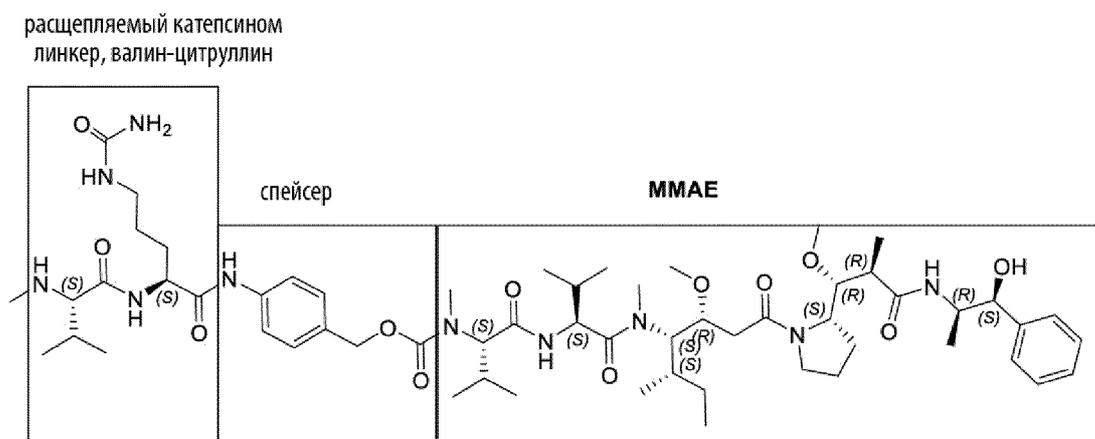
вариантах осуществления $-Su-$ представляет собой . В некоторых вариантах

осуществления $-Su-$ представляет собой .

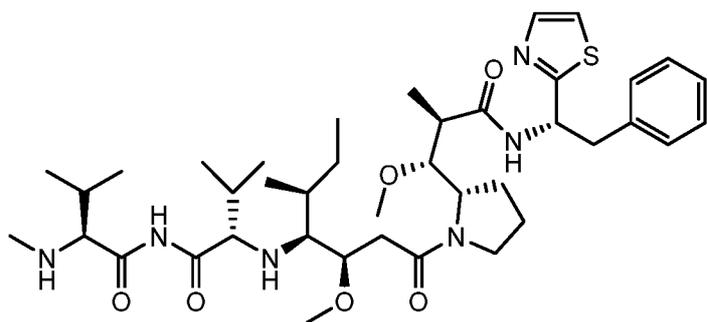
Представляющие интерес фрагменты

[262] 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. В случае настоящего изобретения представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит монометилауристин Е (ММАЕ) или близкий аналог ММАЕ.

[263] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит ММАЕ. ММАЕ представляет собой антинеопластический агент, который используют в конъюгатах антитело – лекарственный препарат, например, конъюгате МАВ-ММАЕ. ММАЕ соединен с моноклональным антителом посредством связывающей структуры, которая может расщепляться после присоединения конъюгата антитело – лекарственный препарат к опухолевой клетке. Связывающая структура включает расщепляемую катепсином последовательность (валин-цитруллин) и спейсер. Спейсер может варьироваться.

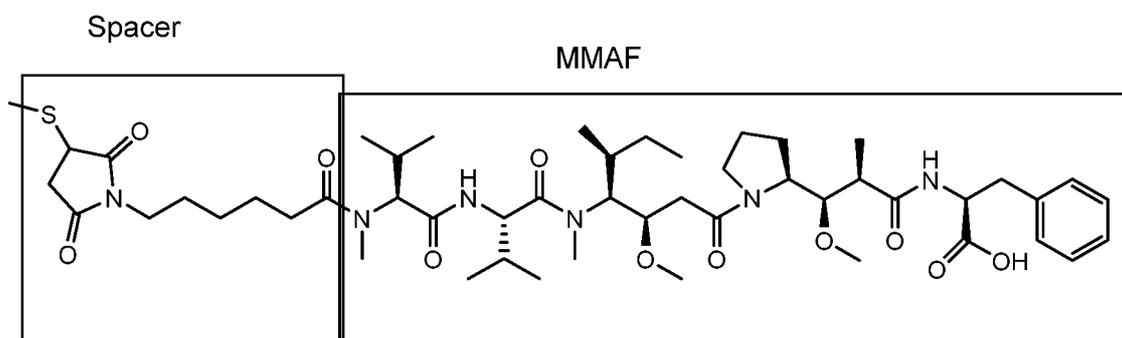


[264] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит MMAD.



(MMAD)

[265] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит MMAF, который представляет собой монометилауристатин F или диметилауристатин F, показанные ниже с их связывающей структурой.



[266] В некоторых вариантах осуществления предложенный способ дополнительно включает:

реакцию первого агента, содержащего первый реактивный фрагмент, например, в первом представляющем интерес фрагменте, со вторым агентом, содержащим второй реактивный фрагмент. В различных вариантах осуществления первый реактивный фрагмент находится в первом представляющем интерес фрагменте, например, который может быть включен посредством способа, описанного в данном документе (например, посредством контакта с соединением, имеющим структуру формулы R-I или ее соли).

[267] В некоторых вариантах осуществления второй представляющий интерес фрагмент находится в соединении, которое не содержит связывающих мишень фрагментов. В некоторых вариантах осуществления второй представляющий интерес фрагмент находится в соединении формулы P-I или P-II или их соли. В некоторых вариантах осуществления второй представляющий интерес фрагмент находится в соединении формулы R-I или ее соли. В некоторых вариантах осуществления второй агент имеет структуру формулы P-I или P-II или их соли. В некоторых

вариантах осуществления второй реактивный фрагмент находится в представляющем интерес фрагменте второго агента. В некоторых вариантах осуществления второй агент содержит фрагмент агента-мишени, как описано в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления фрагмент агента-мишени во втором агенте представляет собой или содержит пептидный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента-мишени во втором агенте представляет собой или содержит фрагмент агента на основе антитела, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления он содержит фрагмент scFv. В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента-мишени во втором агенте обеспечивает отличную специфичность по сравнению с первым агентом. В некоторых вариантах осуществления такие первый и второй агенты реагируют друг с другом с получением различных агентов-продуктов, содержащих фрагменты, обладающие различной специфичностью, как описано в данном документе.

[268] В некоторых вариантах осуществления реакция между первым реактивным фрагментом и вторым реактивным фрагментом представляет собой биоортогональную реакцию. В некоторых вариантах осуществления реакция представляет собой реакцию циклоприсоединения. В некоторых вариантах осуществления реакция представляет собой реакцию [3+2]. Подходящие такие реакции и соответствующие первый и второй реактивные фрагменты широко известны в данной области техники и могут применяться в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления первый реактивный фрагмент представляет собой или содержит $-N_3$, а второй реактивный фрагмент представляет собой или содержит $-C\equiv$ (например, алкиновый фрагмент, подходящий для клик-химии, включая фрагменты, подходящие для безметалловой клик-химии). В некоторых вариантах осуществления второй реактивный фрагмент представляет собой или содержит $-N_3$, а первый реактивный фрагмент представляет собой или содержит $-C\equiv$ (например, алкиновый фрагмент, подходящий для клик-химии, включая фрагменты, подходящие для безметалловой клик-химии).

[269] Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления реакция между первым реактивным фрагментом и вторым реактивным фрагментом представляет собой ферментативную реакцию. В некоторых вариантах осуществления реакция представляет собой реакцию, опосредованную сортазой. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго реактивных фрагментов независимо представляет собой или содержит субстратный фрагмент для реакции, например ферментативной реакции. Например, в некоторых вариантах осуществления, для конъюгации, опосредованной сортазой, реактивный фрагмент представляет

собой или содержит (G)_n (например, n равно 3, 4, 5 и т. Д.) и при этом реактивный фрагмент представляет собой или содержит LPXTG (например, LPETG). В некоторых вариантах осуществления реактивный фрагмент представляет собой или содержит LPXTG-(X)_n (например, LPETG-(X)_n, LPETG-XX и т. д.). Специалистам в данной области техники, читающим настоящее изобретение, станет понятно, что в соответствии с настоящим изобретением для конъюгации можно применять различные реактивные фрагменты, либо ферментативным, либо неферментативным путем.

[270] В некоторых вариантах осуществления второй агент представляет собой или содержит второй представляющий интерес фрагмент, который представляет собой представляющий интерес фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления второй реактивный фрагмент и второй представляющий интерес фрагмент соединены посредством линкера (например, линкера, описанного в данном документе (например, L^{PM}, L и т. д., как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления второй представляющий интерес фрагмент является таким, как описано в данном документе (например, представляющим интерес фрагментом, терапевтическим фрагментом, представляющим интерес фрагментом, который может взаимодействовать, распознавать и/или связывать белки, нуклеиновые кислоты, иммунные клетки, патологические клетки и т. д.). В некоторых вариантах осуществления второй представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит агент на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления второй представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит агент на основе антитела scFv. В некоторых вариантах осуществления такой агент на основе антитела имеет отличную специфичность по сравнению с исходным агентом-мишенью на основе антитела. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены агенты на основе биспецифических антител, композиции и способы их применения. В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой или содержит первый агент на основе антитела и конъюгирован с представляющим интерес фрагментом, содержащим первый реактивный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления агент, содержащий первый агент на основе антитела и первый реактивный фрагмент, приводят в реакцию со вторым агентом, содержащим второй реактивный фрагмент и второй представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит второй агент на основе антитела, с получением агента, содержащего первый и второй агенты на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления первый и второй агенты на основе антитела являются разными. В некоторых вариантах осуществления они

являются одинаковыми.

[271] В некоторых вариантах осуществления агент содержит два или более фрагментов агентов на основе антител. В некоторых вариантах осуществления фрагменты агентов на основе антител в одной молекуле агента имеют разную специфичность в отношении мишени. В некоторых вариантах осуществления некоторые или все фрагменты агентов на основе антител в одной молекуле агента имеют одинаковую специфичность в отношении мишени. В некоторых вариантах осуществления агент, описанный в данном документе, представляет собой или содержит фрагменты, имеющие разную специфичность в отношении мишени (например, фрагменты антител, имеющие разную специфичность в отношении мишени). В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой агент на основе биспецифического антитела. В некоторых вариантах осуществления агент содержит первый фрагмент (например, фрагмент агента на основе первого антитела) и второй фрагмент (например, фрагмент агента на основе второго антитела). В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент (например, фрагмент агента на основе первого антитела) представляет собой или содержит IgG или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент (например, фрагмент агента на основе первого антитела) представляет собой или содержит фрагмент агента на основе антитела или его фрагмент (например, Fc-область или ее фрагмент), с которым может связываться связывающий мишень фрагмент. В некоторых вариантах осуществления второй фрагмент (например, фрагмент агента на основе второго антитела) представляет собой или содержит IgG или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления второй фрагмент (например, фрагмент агента на основе второго антитела) представляет собой или содержит фрагмент агента на основе антитела или его фрагмент (например, Fc-область или ее фрагмент), с которым может связываться связывающий мишень фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента на основе антитела, например фрагмент агента на основе второго антитела, не содержит фрагмент, с которым может связываться связывающий мишень фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента на основе антитела, например фрагмент агента на основе второго антитела, не содержит Fc-фрагмент, с которым может связываться связывающий мишень фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента на основе антитела, например фрагмент агента на основе второго антитела, представляет собой или содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент представляет собой или содержит фрагмент первого агента. В некоторых вариантах осуществления второй фрагмент представляет собой или содержит представляющий интерес фрагмент второго агента. В некоторых вариантах осуществления первый

агент, например, содержащий фрагмент агента на основе первого антитела, приводят в контакт со вторым агентом, например, содержащим фрагмент агента на основе второго антитела, с получением агента, содержащего два или более фрагментов, обладающих специфичностью в отношении мишени (например, фрагментов агента на основе антитела).

[272] В некоторых вариантах осуществления фрагмент, например, первый фрагмент, представляет собой или содержит фрагмент агента на основе антитела, который связывается с мишенью (например, белком, липидом, углеводом, объектом и т. д.), связанной с патологическим состоянием, нарушением или заболеванием (например, раком). В некоторых вариантах осуществления фрагмент, например, первый фрагмент, представляет собой или содержит фрагмент агента на основе антитела, подходящий для предотвращения или лечения патологического состояния, нарушения или заболевания, например, рака. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, например, первый фрагмент, представляет собой или содержит фрагмент агента на основе антитела, который нацелен на раковые клетки, ткани, органы и т. д. Например, в некоторых вариантах осуществления первый фрагмент представляет собой или содержит фрагмент антитела к CD20 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент представляет собой или содержит ритуксимаб или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, например, второй фрагмент, представляет собой второй представляющий интерес фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, например, второй фрагмент, представляет собой или содержит фрагмент агента на основе антитела, который может рекрутировать и/или активировать иммунную активность, например, одну или более иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, например, второй фрагмент, представляет собой или содержит фрагмент агента на основе антитела, который может рекрутировать и/или активировать Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, например, второй фрагмент, представляет собой или содержит фрагмент антитела к CD3 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 представляет собой CD3-направленный scFv. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, например, первый фрагмент, представляет собой фрагмент агента-мишени. В некоторых вариантах осуществления предложенный агент содержит фрагмент антитела к CD20 и фрагмент антитела к CD3. В некоторых вариантах осуществления предложенный агент содержит фрагмент антитела к CD20 и фрагмент антитела к CD3, при этом эти два фрагмента связаны линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагменты, которые не являются аминокислотными остатками. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагменты, которые не являются

природными протеиногенными аминокислотными остатками. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкерный фрагмент, описанный в данном документе. Специалистам в данной области техники будет понятно, что агенты, содержащие два или более фрагментов, специфических в отношении мишени (например, фрагментов агента на основе антитела), можно получать с различными преимуществами и характеристиками в соответствии с настоящим изобретением, например, с высокой сайт-специфичностью, высокой гомогенностью, низким уровнем повреждения, низкими уровнями или практическим отсутствием снижения необходимых свойств и/или активности (например, связывания мишени, рекрутирования и/или активации иммунной активности и т. д.) и т. д. Специалистам в данной области техники также будет понятно, что с помощью предложенных методик можно легко конъюгировать агенты на основе антител, например, те, которые являются доступными (например, имеющиеся в наличии терапевтические антитела), с другими фрагментами, например, в некоторых вариантах осуществления, другими агентами на основе антител, например, для получения биспецифических агентов. В некоторых вариантах осуществления первый и второй фрагменты связаны линкером, как описано в данном документе.

[273] В некоторых вариантах осуществления предложенный продукт-агент содержит линкерный фрагмент, соединяющий фрагмент агента-мишени и второй представляющий интерес фрагмент (например, два фрагмента агента на основе антитела). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой или содержит один или более из L^{RG2} , L^{PM} или их фрагментов и один или более фрагментов, образованных первым и вторым реактивными фрагментами (например, в случае клик-химии, триазольный фрагмент). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой или содержит линкерный фрагмент-продукт, например, линкер, образованный посредством реакции между первым и вторым реактивными фрагментами. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент-продукт представляет собой или содержит LPXTG. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент-продукт представляет собой или содержит LPXT(G) $_n$, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент-продукт представляет собой или содержит фрагмент-продукт биоортогональной реакции, например, фрагмент-продукт реакции клик-химии.

[274] В некоторых вариантах осуществления агент, содержащий второй реактивный фрагмент и второй представляющий интерес фрагмент, получают с помощью методики, предложенной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления второй представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит фрагмент белкового агента.

В некоторых вариантах осуществления второй представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит фрагмент агента на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления второй представляющий интерес фрагмент (например, белковый агент (например, агент на основе антитела)) может служить в качестве агента-мишени, а второй реактивный фрагмент может служить в качестве представляющего интерес фрагмента (например, MOI в соединении формулы R-I или ее соли) для применения некоторых предложенных способов (например, включающих проведение реакции агентов-мишеней (например, белковых агентов (например, агентов на основе антител и т. д.)) с реакционными партнерами, содержащими представляющие интерес фрагменты (например, те, которые представляют собой или содержат вторые реактивные фрагменты), реактивные группы и связывающие мишень фрагменты, которые могут связываться с агентами-мишенями с образованием вторых агентов).

[275] В некоторых вариантах осуществления каждый из первого агента и второго агента независимо и необязательно представляет собой агент формулы P-I или P-II или их соль. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого агента и второго агента независимо представляет собой агент формулы P-I или P-II или их соль. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого агента и второго агента получают с помощью способа по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого агента и второго агента независимо получают с помощью способа по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента-мишени первого агента представляет собой агент на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент первого агента представляет собой или содержит первый реактивный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента-мишени второго агента представляет собой агент на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент второго агента представляет собой или содержит второй реактивный фрагмент. Как описано в данном документе, во многих вариантах осуществления первый реактивный фрагмент и второй реактивный фрагмент могут вступать в реакцию друг с другом с получением агента-продукта. В некоторых вариантах осуществления реакция между первым и вторым реактивными фрагментами представляет собой или включает реакцию, совместимую с агентами-мишенями в первом и втором агентах, например, совместимую с белковыми агентами (например, агентами на основе антител). В некоторых вариантах осуществления такая реакция представляет собой биоортогональную реакцию. В некоторых вариантах осуществления такая реакция представляет собой реакцию циклоприсоединения. В некоторых вариантах осуществления такая реакция

представляет собой клик-реакцию. В некоторых вариантах осуществления такая реакция представляет собой безметалловую клик-реакцию. В некоторых вариантах осуществления агент-продукт имеет формулу P-I или P-II или их соли. В некоторых вариантах осуществления в агенте-продукте формулы P-I или P-II или их соли фрагмент агента-мишени представляет собой белковый агент (например, агент на основе антитела), а в некоторых вариантах осуществления – фрагмент агента-мишени первого агента. В некоторых вариантах осуществления в агенте-продукте формулы P-I или P-II или их соли представляющий интерес фрагмент представляет собой белковый агент (например, агент на основе антитела), а в некоторых вариантах осуществления – фрагмент агента-мишени второго агента. В некоторых вариантах осуществления агент-продукт содержит два или более агентов на основе антител. В некоторых вариантах осуществления два или более агентов на основе антител имеют разную антигенную специфичность. В некоторых вариантах осуществления два или более агентов на основе антител направлены на разные антигены. В некоторых вариантах осуществления предложенный способ включает:

реакцию первого агента, имеющего структуру формулы P-I или P-II или их соли, со вторым агентом, который имеет структуру формулы P-I или P-II или их соли, с получением агента-продукта.

Способы и продукты

[276] В некоторых вариантах осуществления предложенные методики включают приведение агента-мишени (например, к которому должен быть присоединен представляющий интерес фрагмент) в контакт с реакционным партнером. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят в таких условиях и в течение такого времени, чтобы агент-мишень реагировал с реакционным партнером с образованием агента в качестве продукта. В данной области техники можно оценивать и использовать многие условия реакций/времена реакций, если они подходят для необходимых целей в соответствии с настоящим изобретением; некоторые такие условия, времена реакций, оценка и т. д. описаны в примерах.

[277] В некоторых вариантах осуществления образованный агент содержит фрагмент агента-мишени, представляющий интерес фрагмент и, необязательно, линкерный фрагмент, соединяющий фрагмент агента-мишени и представляющий интерес фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента-мишени получают из агента-мишени (например, путем удаления одного или более –H из агента-мишени). В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента-мишени сохраняет одну или более, большинство или практически все

структурные признаки и/или биологические функции агента-мишени. Например, в некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой агент на основе антитела, а фрагмент агента-мишени в образованном агенте представляет собой соответствующий фрагмент агента на основе антитела и сохраняет основные функции агента на основе антитела, например, взаимодействует с различными рецепторами (например, Fc-рецепторами, такими как FcRn), специфически распознает антиген, иницирует, стимулирует и/или усиливает иммунологическую активность в отношении пораженных клеток и т. д., как и агент на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления образованный агент обеспечивает одну или более функций помимо функций агента-мишени, например, представляющего интерес фрагмента и/или образованного агента в целом.

[278] В некоторых вариантах осуществления образованный агент имеет структуру формулы P-I или P-II или их соли. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент в образуемом агенте (например, MOI формулы P-I или P-II или их соли) является таким же, как и представляющий интерес фрагмент в реакционном партнере (например, MOI формулы R-I или ее соли), используемом для получения образуемого агента. В некоторых вариантах осуществления P представляет собой белковый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления P представляет собой фрагмент на основе антитела.

[279] В некоторых вариантах осуществления линкерные фрагменты (или их части), соединенные с представляющими интерес фрагментами, также могут быть перенесены от реакционных партнеров (например, L^{RM} формулы R-I или ее соли). В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент в образованном агенте (например, L^{PM}) представляет собой или содержит линкерный фрагмент реакционного партнера (например, между реактивной группой и представляющим интерес фрагментом, например, L^{RM}). В некоторых вариантах осуществления L^{PM} представляет собой или содержит L^{RM} . В некоторых вариантах осуществления L^{PM} представляет собой $-L^{RM}-L^{RG2}-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG2} представляет собой $-C(O)-$. В некоторых вариантах осуществления L^{RG2} представляет собой $-C(O)-$ и связан с $-NH-$ фрагмента целевого агента, например, $-NH-$ в боковой цепи остатка лизина белкового фрагмента, который в некоторых вариантах осуществления представляет собой фрагмент антитела.

[280] Реакционные партнеры, например, соединения формулы R-I или их соли, как правило, не содержат фрагментов, которые могут вступать в реакцию с реактивными группами в условиях, в которых реактивные группы вступают в реакцию с целевыми агентами. В некоторых вариантах осуществления, в случае если некоторые фрагменты реакционных партнеров могут

вступать в реакцию с реактивными группами в условиях, в которых реактивные группы вступают в реакцию с целевыми агентами, реакции между такими фрагментами и реактивными группами являются значительно замедленными и/или менее эффективными по сравнению с реакциями между реактивными группами и целевыми агентами. В некоторых вариантах осуществления реакции между такими фрагментами и реактивными группами значительно не снижают (например, снижают не более чем на около 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % и т. д.) эффективность, выход, скорость и/или преобразование и т. д. реакций между реактивными группами и целевыми агентами. В некоторых вариантах осуществления реактивные группы (например, сложноэфирные группы, активированные производные карбоновых кислот и т. д.) вступают в реакцию с аминогруппами (например, группами $-NH_2$) целевых агентов (например, белковых агентов, таких как агенты на основе антитела). В некоторых вариантах осуществления реакционные партнеры, например соединения формулы R-I или их соли, не содержат аминогруппы. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы R-I или их соли (или их части, такие как R^{LG} , L^{LG} , L^{LG1} , L^{LG2} , L^{LG3} , L^{LG4} , L^{RG1} , L^{RG2} , L^{RM} и/или MOI) не содержат аминогруппы. В некоторых вариантах осуществления они не содержат первичные аминогруппы ($-NH_2$). В некоторых вариантах осуществления они не содержат $-CH_2NH_2$. В некоторых вариантах осуществления они не содержат $-CH_2CH_2NH_2$. В некоторых вариантах осуществления они не содержат $-CH_2CH_2CH_2NH_2$. В некоторых вариантах осуществления они не содержат $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$. В некоторых вариантах осуществления аминогруппы, например первичные аминогруппы, являются кэпированными (например, путем внесения ацильных групп (например, R-C(O)- (например, ацетил)) для образования амидных групп) для предотвращения или снижения нежелательных реакций.

[281] В некоторых вариантах осуществления реакции проводят в буферных системах. В некоторых вариантах осуществления буферные системы по настоящему изобретению сохраняют структуру и/или функции агентов-мишеней, представляющего интерес фрагмента и т. д. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой фосфатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой буфер ФСБ. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой боратный буфер. В некоторых вариантах осуществления буферы по настоящему изобретению обеспечивают и, необязательно, поддерживают определенное значение или диапазон pH. Например, в некоторых вариантах осуществления применимый pH составляет около 7–9, например, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 9,0 и т. д. В некоторых вариантах осуществления pH составляет 7,4. В

некоторых вариантах осуществления pH составляет 7,5. В некоторых вариантах осуществления pH составляет 7,8. В некоторых вариантах осуществления pH составляет 8,0. В некоторых вариантах осуществления pH составляет 8,2. В некоторых вариантах осуществления pH составляет 8,3.

[282] Предложенные технологии могут обеспечить различные преимущества. Помимо прочего, в некоторых вариантах осуществления соединение представляющего интерес фрагмента предложенного реакционного партнера (например, соединения, содержащее реактивную группу, расположенную между первой группой и представляющим интерес фрагментом (например, соединения формулы R-I или ее соли)) с агентом-мишенью и высвобождение связывающего мишень фрагмента предложенного реакционного партнера можно обеспечить в одной реакции и/или в одном сосуде. Таким образом, во многих вариантах осуществления не проводят отдельные реакции/этапы для удаления связывающих мишень фрагментов. Как очевидно для специалистов в данной области техники, за счет осуществления соединения представляющего интерес фрагмента и высвобождения связывающего мишень фрагмента за одну реакцию/операцию предложенные методики позволяют избежать проведения отдельных этапов для удаления связывающего мишень фрагмента и могут улучшить общую эффективность (например, за счет упрощения операций, повышения общего выхода и т. д.), снизить стоимость производства, улучшить чистоту продукта (например, за счет избегания воздействия условий для удаления связывающего мишень фрагмента, которые, как правило, включают одно или более из восстановления, окисления, гидролиза (например, сложноэфирных групп) и т. д. и могут повреждать фрагменты агента-мишени (например, в случае фрагментов белковых агентов, белковых аминокислотных остатков, общих структур и/или посттрансляционных модификаций (например, гликаны антител). Действительно, как продемонстрировано в данном документе, предложенные методики, помимо прочего, могут обеспечивать повышенную эффективность (например, в терминах скорости реакции и/или процента конверсии), повышенный выход, повышенную чистоту/гомогенность и/или повышенную селективность, в частности, по сравнению с референтными методиками, в которых используют реакционный партнер, не содержащий связывающие мишень фрагменты, без внесения этапа(ов) для удаления связывающего мишень фрагмента (например, связывающий мишень фрагмент удаляют на том же этапе, на котором проводят конъюгацию представляющего интерес фрагмента).

[283] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены продукты предложенных способов, которые, помимо прочего, характеризуются низкими уровнями повреждения фрагментов агентов-мишеней по сравнению со способами, включающими

этапы, которые проводят для удаления связывающего мишень фрагмента, но не для конъюгации представляющего интерес фрагмента. В некоторых вариантах осуществления предложенные композиции продукта имеют высокую гомогенность по сравнению с референтными композициями продукта (например, полученными методиками без использования связывающих мишень фрагментов или с применением экстра-этапа(ов) для удаления связывающего мишень фрагмента (например, без использования реактивных партнеров, описанных в данном документе, которые содержат реактивную группу, расположенную между связывающим мишень фрагментом и представляющим интерес фрагментом).

[284] В некоторых вариантах осуществления агент-продукт представляет собой агент, содержащий:

фрагмент агента-мишени;

представляющий интерес фрагмент, такой как MMAD; и

необязательно один или более линкерных фрагментов.

[285] В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента-мишени представляет собой фрагмент белкового агента. В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента-мишени представляет собой фрагмент агента на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента на основе антитела содержит Fc-область IgG. В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента-мишени связан с представляющей интерес фрагментом посредством аминокислотной группы, необязательно посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления соединение обеспечено через остаток лизина, при этом аминокислотная группа боковой цепи соединена с представляющим интерес фрагментом, необязательно посредством линкера (например, с образованием $-NH-C(O)-$ как части амидной группы, карбаматной группы и т. д.).

[286] В некоторых вариантах осуществления для конъюгации используют выбранные участки агентов-мишеней. Например, в некоторых вариантах осуществления K246 или K248 агента на основе антитела (нумерация EU или соответствующие остатки) являются участками конъюгации. В некоторых вариантах осуществления положением конъюгации является K246 тяжелой цепи (если не указано иное, участки в данном документе включают соответствующие остатки, например, в модифицированной последовательности (например, более длинные, более короткие, перестроенные и т. д. последовательности)). В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K248 тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K288 или K290 тяжелой цепи. В некоторых вариантах

осуществления положение представляет собой K288 тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K290 тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K317.

[287] В некоторых вариантах осуществления, когда агенты-мишени представляют собой агенты на основе антител, тяжелые цепи селективно метят относительно легких цепей.

[288] Помимо прочего, настоящее изобретение может обеспечить контролируемые соотношения представляющий интерес фрагмент/агент-мишень (например, в случае конъюгатов антитело – лекарственный препарат, соотношение лекарственный препарат/антитело (DAR)). В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет около 0,5–6, например, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 и т. д.). В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет около 0,5–2,5. В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет около 0,5–2. В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет около 1–2. В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет около 1,5–2. В некоторых вариантах осуществления соотношение представляет собой соотношение представляющих интерес фрагментов, конъюгированных с фрагментами агента-мишени, и фрагментов агента-мишени, конъюгированных с представляющими интерес фрагментами. В некоторых вариантах осуществления указанное соотношение представляет собой соотношение представляющих интерес фрагментов, конъюгированных с фрагментами агента-мишени, и всех фрагментов агента-мишени в композиции.

[289] В некоторых вариантах осуществления в предложенных агентах (например, агентах формулы P-I или P-II или их соли) практически все сайты конъюгации фрагментов агентов-мишеней имеют одинаковые модификации (например, все имеют одинаковые представляющие интерес фрагменты, необязательно соединенные посредством одинаковых линкерных фрагментов). В некоторых вариантах осуществления никакие из сайтов конъюгации не имеют разные модификации (например, разные представляющие интерес фрагменты, и/или никакие из представляющих интерес фрагментов, и/или разные линкерные фрагменты).

[290] В некоторых вариантах осуществления в предложенных композициях, содержащих совокупность предложенных агентов (например, агентов формулы P-I или P-II или их соли), практически все сайты конъюгации фрагментов агентов-мишеней имеют одинаковые модификации (например, все имеют одинаковые представляющие интерес фрагменты, необязательно соединенные посредством одинаковых линкерных фрагментов). В некоторых

вариантах осуществления никакие из сайтов конъюгации не имеют разные модификации (например, разные представляющие интерес фрагменты, и/или никакие из представляющих интерес фрагментов, и/или разные линкерные фрагменты). В некоторых вариантах осуществления такие композиции не содержат агенты, которые имеют одинаковые (или практически одинаковые) фрагменты агентов-мишеней, но разные модификации (например, разные представляющие интерес фрагменты, и/или никакие из представляющих интерес фрагментов, и/или разные линкерные фрагменты). В некоторых вариантах осуществления агенты, которые имеют одинаковые (или практически одинаковые) фрагменты агентов-мишеней, но разные модификации (например, разные представляющие интерес фрагменты, и/или никакие из представляющих интерес фрагментов, и/или разные линкерные фрагменты), представляют собой промежуточные соединения при многоэтапном получении (например, включающем этапы для удаления связывающих мишень фрагментов помимо этапов для конъюгации представляющего интерес фрагмента) конечных продуктов-агентов.

[291] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая совокупность агентов, каждый из которых независимо содержит:

фрагмент агента-мишени,

представляющий интерес фрагмент и

необязательно, линкерный фрагмент, связывающий фрагмент агента-мишени и

представляющий интерес фрагмент;

при этом агенты совокупности имеют одинаковый или практически одинаковый фрагмент агента-мишени и общую модификацию независимо по меньшей мере в одном общем участке; и

при этом около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента-мишени и представляющий интерес фрагмент, являются агентами совокупности.

[292] В некоторых вариантах осуществления фрагмент агента-мишени представляет собой или содержит белковый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления агенты совокупности имеют общие модификации (например, конъюгацию представляющих интерес фрагментов, необязательно, посредством линкерных фрагментов) независимо по меньшей мере в одном аминокислотном остатке. В некоторых вариантах осуществления каждый из агентов совокупности независимо имеет формулу P-I или P-II или их соли.

[293] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая совокупность агентов, каждый из которых независимо содержит:

фрагмент белкового агента,

представляющий интерес фрагмент и
необязательно, линкерный фрагмент, связывающий фрагмент белкового агента и
представляющий интерес фрагмент;
при этом фрагменты белковых агентов совокупности имеют общую аминокислотную
последовательность, а агенты совокупности независимо имеют общую модификацию по меньшей
мере в одном общем аминокислотном остатке фрагментов белковых агентов; и

при этом около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент белкового агента,
который содержит общую аминокислотную последовательность и представляющий интерес
фрагмент, являются агентами совокупности.

[294] В некоторых вариантах осуществления каждый из агентов совокупности
независимо имеет формулу P-I или P-II или их соли. В некоторых вариантах осуществления
каждый фрагмент белкового агента независимо представляет собой фрагмент агента на основе
антитела.

[295] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена
композиция, содержащая совокупность агентов, каждый из которых независимо содержит:

фрагмент агента на основе антитела,
представляющий интерес фрагмент и
необязательно, линкерный фрагмент, связывающий фрагмент агента на основе антитела и
представляющий интерес фрагмент;
при этом фрагменты агентов на основе антител совокупности имеют общую аминокислотную
последовательность или могут связываться с общим антигеном, а агенты совокупности
независимо имеют общую модификацию по меньшей мере в одном общем аминокислотном
остатке фрагментов белковых агентов; и

при этом около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента на основе
антитела, который содержит общую аминокислотную последовательность или может связываться
с общим антигеном, и представляющий интерес фрагмент, являются агентами совокупности.

[296] В некоторых вариантах осуществления каждый из агентов совокупности
независимо имеет формулу P-I или P-II или их соли. В некоторых вариантах осуществления
фрагменты агентов на основе антител совокупности содержат общую аминокислотную
последовательность. В некоторых вариантах осуществления фрагменты агентов на основе антител
совокупности содержат общую аминокислотную последовательность в Fc-области. В некоторых
вариантах осуществления фрагменты агентов на основе антител совокупности содержат общую Fc-

область. В некоторых вариантах осуществления фрагменты агентов на основе антител совокупности могут специфически связывать общий антиген. В некоторых вариантах осуществления фрагменты агентов на основе антител представляют собой фрагменты моноклональных антител. В некоторых вариантах осуществления фрагменты агентов на основе антител представляют собой фрагменты поликлональных антител. В некоторых вариантах осуществления фрагменты агентов на основе антител связываются с двумя или более разными антигенами. В некоторых вариантах осуществления фрагменты агентов на основе антител связываются с двумя или более разными белками. В некоторых вариантах осуществления фрагменты агентов на основе антител представляют собой фрагменты IVIG.

[297] В контексте данного документа в некоторых вариантах осуществления «по меньшей мере один» или «один или более» составляет 1–1000, 1–500, 1–200, 1–100, 1–90, 1–80, 1–70, 1–60, 1–50, 1–40, 1–30, 1–20, 1–10, 1–5 или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более. В некоторых вариантах осуществления это составляет один. В некоторых вариантах осуществления это составляет два или более. В некоторых вариантах осуществления это составляет около 3. В некоторых вариантах осуществления это составляет около 4. В некоторых вариантах осуществления это составляет около 5. В некоторых вариантах осуществления это составляет около 6. В некоторых вариантах осуществления это составляет около 7. В некоторых вариантах осуществления это составляет около 8. В некоторых вариантах осуществления это составляет около 9. В некоторых вариантах осуществления это составляет около 10. В некоторых вариантах осуществления это составляет около 10 или более.

[298] В некоторых вариантах осуществления общая аминокислотная последовательность содержит 1–1000, 1–500, 1–400, 1–300, 1–200, 1–100, 1–50, 10–1000, 10–500, 10–400, 10–300, 10–200, 10–100, 10–50, 20–1000, 20–500, 20–400, 20–300, 20–200, 20–100, 20–50, 50–1000, 50–500, 50–400, 50–300, 50–200, 50–100, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600 или более аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления длина составляет по меньшей мере 5 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления длина составляет по меньшей мере 10 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления длина составляет по меньшей мере 50 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления длина составляет по меньшей мере 100 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления длина составляет по меньшей мере 150 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления длина составляет по меньшей мере 200 аминокислотных остатков. В

некоторых вариантах осуществления длина составляет по меньшей мере 300 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления длина составляет по меньшей мере 400 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления длина составляет по меньшей мере 500 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления длина составляет по меньшей мере 600 аминокислотных остатков.

[299] В некоторых вариантах осуществления общая аминокислотная последовательность составляет по меньшей мере 10 %-100 %, 50 %-100 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % аминокислотной последовательности фрагмента агента-мишени, фрагмента белкового агента, фрагмента агента на основе антитела и т. д. В некоторых вариантах осуществления она составляет 100 %.

[300] В некоторых вариантах осуществления фрагменты белковых агентов имеют высокий процент гомологии аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления он составляет 50 %-100 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 50 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 60 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 70 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 80 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 90 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 91 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 50 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 92 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 93 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 94 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 95 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 96 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 97 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 98 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 99 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 100 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 50 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 60 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 70 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 80 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 90 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 91 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 50 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 92 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 93 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 94 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 95 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 96 %.

В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 97 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 98 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 99 %.

[301] В некоторых вариантах осуществления фрагмент белкового агента или фрагмент агента на основе антитела представляет собой или содержит белковый комплекс. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или каждая отдельная цепь имеет общую аминокислотную последовательность и/или обладает гомологией, как описано в данном документе.

[302] В некоторых вариантах осуществления агенты совокупности имеют общий представляющий интерес фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый агент совокупности независимо представляет собой агент формулы P-I или P-II или их соли. В некоторых вариантах осуществления каждый агент совокупности независимо представляет собой агент формулы P-I или P-II или их соли, при этом MOI является одинаковым для каждого агента совокупности. В некоторых вариантах осуществления агенты совокупности являются продуктами способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие агенты совокупности, являются продуктами способов, описанных в данном документе.

[303] В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой или содержит представляющий интерес фрагмент и, необязательно, линкер. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой или содержит $-L^{PM}-MOI$.

[304] В некоторых вариантах осуществления агенты совокупности имеют общую модификацию независимо по меньшей мере в одном положении. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой или содержит представляющий интерес фрагмент и, необязательно, линкер, соединяющий представляющий интерес фрагмент. Как описано в данном документе, каждое положение независимо имеет общую модификацию. В некоторых вариантах осуществления общие модификации в двух или более положениях содержат общий представляющий интерес фрагмент. В некоторых вариантах осуществления общие модификации являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления агенты совокупности имеют общую модификацию в каждом положении, которое имеет модификацию, которая представляет собой или содержит представляющий интерес фрагмент и, необязательно, линкер. В некоторых вариантах осуществления агенты совокупности имеют общую модификацию в каждом положении, которое имеет модификацию, которая представляет собой или содержит

-L^{PM}-MOI.

[305] В некоторых вариантах осуществления белковые агенты (например, агенты на основе антител) имеют общую модификацию в по меньшей мере одном аминокислотном остатке. В некоторых вариантах осуществления агенты совокупности имеют общую модификацию в каждом положении, которое имеет модификацию, которая представляет собой или содержит представляющий интерес фрагмент и, необязательно, линкер. В некоторых вариантах осуществления агенты совокупности имеют общую модификацию в каждом положении, которое имеет модификацию, которая представляет собой или содержит -L^{PM}-MOI.

[306] В некоторых вариантах осуществления положение выбрано из K246, K248, K288, K290, K317 агентов на основе антител и соответствующих положений. В некоторых вариантах осуществления положение выбрано из K246 и K248 и соответствующих положений. В некоторых вариантах осуществления положение выбрано из K288 и K290 и соответствующих положений. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K246 или соответствующее положение. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K248 или соответствующее положение. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K288 или соответствующее положение. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K290 или соответствующее положение. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K317 или соответствующее положение. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K185 легкой цепи или соответствующее положение. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K187 легкой цепи или соответствующее положение. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K133 тяжелой цепи или соответствующее положение. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K246 или K248 тяжелой цепи или соответствующее положение. В некоторых вариантах осуществления положение представляет собой K414 тяжелой цепи или соответствующее положение.

[307] В некоторых вариантах осуществления около 1 %-100 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента-мишени и представляющий интерес фрагмент, являются агентами совокупности. В некоторых вариантах осуществления около 1 %-100 % всех агентов, которые содержат фрагмент белкового агента, который содержит общую аминокислотную последовательность и представляющий интерес фрагмент, являются агентами совокупности. В некоторых вариантах осуществления около 1 %-100 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента на основе антитела, который содержит общую аминокислотную последовательность или

может связываться с общим антигеном, и представляющий интерес фрагмент, являются агентами совокупности. В некоторых вариантах осуществления около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента-мишени, являются агентами совокупности. В некоторых вариантах осуществления около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент белкового агента, который содержит общую аминокислотную последовательность, являются агентами совокупности. В некоторых вариантах осуществления около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента на основе антитела, который содержит общую аминокислотную последовательность или может связываться с общим антигеном, являются агентами совокупности. В некоторых вариантах осуществления он составляет 50 %–100 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 50 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 60 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 70 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 80 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 90 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 91 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 50 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 92 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 93 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 94 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 95 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 96 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 97 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 98 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 99 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 100 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 50 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 60 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 70 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 80 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 90 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 91 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 50 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 92 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 93 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 94 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 95 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 96 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 97 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 98 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 99 %.

[308] В некоторых вариантах осуществления предложенные агенты, соединения и т. д.,

например формулы R-I, P-I, P-II и т. д. и их соли, имеют высокую чистоту. В некоторых вариантах осуществления он составляет 50 %–100 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 50 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 60 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 70 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 80 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 90 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 91 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 92 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 93 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 94 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 95 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 96 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 97 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 98 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 99 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет 100 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 50 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 60 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 70 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 80 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 90 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 91 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 50 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 92 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 93 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 94 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 95 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 96 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 97 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 98 %. В некоторых вариантах осуществления он составляет по меньшей мере 99 %.

[309] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены композиции продукта-агента, содержащие продукты-агенты (например, агенты формулы P-I или P-II или их соль). В некоторых вариантах осуществления композиция агента-продукта (например, композиция агента-продукта, полученная определенными способами) содержит агент-продукт, содержащий фрагмент агента-мишени и представляющий интерес фрагмент (например, агент формулы P-I или P-II или его соль), высвобождаемый связывающий мишень фрагмент (например, соединение, содержащее $R^{LG}-(L^{LG1})_{0-1}-(L^{LG2})_{0-1}-(L^{LG3})_{0-1}-(L^{LG4})_{0-1}-$), или соединение, содержащее высвобождаемый связывающий мишень фрагмент (например, соединение, имеющее структуру

$R^{LG}-(L^{LG1})_{0-1}-(L^{LG2})_{0-1}-(L^{LG3})_{0-1}-(L^{LG4})_{0-1}-H$, или его соль), и реакционный партнер (например, соединение формулы R-I или его соль). В некоторых вариантах осуществления высвобождаемые связывающие мишень фрагменты могут связываться с фрагментами агентов-мишеней в агентах-мишенях и/или образованных агентах-продуктах. Различные технологии доступны для разделения высвобождаемых связывающих мишень фрагментов из фрагментов агентов-мишеней в соответствии с настоящим изобретением, например, в некоторых вариантах осуществления это приведение композиции в контакт с композицией, содержащей глицин, при определенном pH.

Некоторые варианты осуществления переменных

[310] В качестве примеров, в тексте настоящего изобретения описаны типовые варианты осуществления переменных. Как понятно специалистам в данной области техники, варианты осуществления для разных переменных можно необязательно комбинировать.

[311] В некоторых вариантах осуществления АВТ представляет собой связывающий антитело фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления АВТ представляет собой АВТ соединения, выбранного из MMAE-1, MMAE-2, MMAE-3, MMAE-4, MMAE-5, MMAE-6 и MMAE-7. В некоторых вариантах осуществления АВТ представляет собой фрагмент, выбранный из таблицы А-1.

[312] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой линкерный фрагмент соединения, выбранного из проиллюстрированных в соединениях MMAE-1, MMAE-2, MMAE-3, MMAE-4, MMAE-5, MMAE-6 и MMAE-7.

Общие способы, реагенты и условия

[313] В соответствии с настоящим изобретением для обеспечения соединений и агентом по данному документу можно использовать различные методики.

[314] В некоторых вариантах осуществления, где приведены конкретные защитная группа («PG»), уходящая группа («LG») или условие преобразования, для специалиста в данной области техники будет очевидно, что также подходят и предусмотрены другие защитные группы, уходящие группы и условия преобразования. Такие группы и преобразования подробно описаны в *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, M. B. Smith and J. March, 5th Edition, John Wiley & Sons, 2001, *Comprehensive Organic Transformations*, R. C. Larock, 2nd Edition, John Wiley & Sons, 1999, и *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd

edition, John Wiley & Sons, 1999, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

[315] В некоторых вариантах осуществления уходящие группы включают, но не ограничиваются этим, галогены (например, фтор, хлор, бром, йод), сульфонаты (например, мезилат, тозилат, бензолсульфонат, брозилат, нозилат, трифлат), диазоний и т. п.

[316] В некоторых вариантах осуществления кислород-защитные группы включают, например, карбонил-защитные группы, гидроксил-защитные группы и т. д. Гидроксил-защитные группы хорошо известны в данной области техники и включают группы, подробно описанные в *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Примеры подходящих гидроксил-защитных групп включают, но не ограничиваются этим, сложные эфиры, аллил-эфиры, эфиры, силлил-эфиры, алкил-эфиры, арилалкил-эфиры и алкоксиалкил-эфиры. Примеры таких сложных эфиров включают формиаты, ацетаты, карбонаты и сульфонаты. Конкретные примеры включают формиат, бензоилформиат, хлорацетат, трифторацетат, метоксиацетат, трифенилметоксиацетат, п-хлорфеноксиацетат, 3-фенилпропионат, 4-оксопентаноат, 4,4-(этилендитио)пентаноат, пивалоат (триметилацетил), кротонат, 4-метоксикротонат, бензоат, п-бензилбензоат, 2,4,6-триметилбензоат, карбонаты, такие как метил, 9-флуоренилметил, этил, 2,2,2-трихлорэтил, 2-(триметилсилил)этил, 2-(фенилсульфонил)этил, винил, аллил и п-нитробензил. Примеры таких силлил-эфиров включают триметилсилил-, триэтилсилил-, трет-бутилдиметилсилил-, трет-бутилдифенилсилил-, триизопропилсилил- и другие триалкилсилил-эфиры. Алкил-эфиры включают метил-, бензил-, п-метоксибензил-, 3,4-диметоксибензил-, тритил-, трет-бутил-, аллил- и аллилоксикарбонил-эфиры или их производные. Алкоксиалкил-эфиры включают ацетали, такие как метоксиметил-, метилтиометил-, (2-метоксиэтокси)метил-, бензилоксиметил-, бета-(триметилсилил)этоксиметил- и тетрагидропиранил-эфиры. Примеры арилалкил-эфиров включают бензил, п-метоксибензил (МРМ), 3,4-диметоксибензил, О-нитробензил, п-нитробензил, п-галогенбензил, 2,6-дихлорбензил, п-цианобензил и 2- и 4-пиколил.

[317] Амино-защитные группы хорошо известны в данной области техники и включают группы, подробно описанные в *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Подходящие амино-защитные группы включают, но не ограничиваются этим, аралкиламины, карбаматы, циклические имидазы, аллиламины, амиды и т. п. Примеры таких групп

включают трет-бутилоксикарбонил (BOC), этилоксикарбонил, метилоксикарбонил, трихлорэтилоксикарбонил, аллилоксикарбонил (Alloc), бензилоксокарбонил (CBZ), аллил, фталимид, бензил (Bn), флуоренилметилкарбонил (Fmoc), формил, ацетил, хлорацетил, дихлорацетил, трихлорацетил, фенилацетил, трифторацетил, бензоил и т. д.

[318] Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что соединения/агенты могут содержать один или более стереоцентров и могут присутствовать в виде рацемической или диастереомерной смеси. Для специалиста в данной области техники также будет очевидно, что существует много способов, известных в данной области техники, для разделения изомеров для получения стереобогащенных или стереочистых изомеров соединений, включая, но не ограничиваясь этим, ВЭЖХ, хиральную ВЭЖХ, фракционную кристаллизацию диастереомерных солей, кинетическое ферментативное разрешение (например, грибовыми, бактериальными или животными липазами или эстеразами) и образование ковалентных диастереомерных производных с использованием энантиобогащенного реагента.

[319] Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что различные функциональные группы, присутствующие в соединениях по настоящему изобретению, такие как алифатические группы, спирты, карбоновые кислоты, сложные эфиры, амиды, альдегиды, галогены и нитрилы, можно взаимопревращать способами, хорошо известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, восстановление, окисление, эстерификацию, гидролиз, частичное окисление, частичное восстановление, галогенирование, дегидратацию, частичную гидратацию и гидратацию. "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Для таких взаимопревращений могут быть необходимы один или более из вышеуказанных способов, при этом некоторые способы синтеза соединений по настоящему изобретению описаны ниже в примерах.

Применения, составление и введение

[320] Соединения, агенты, композиции и т. д. по настоящему изобретению могут быть предоставлены в различных формах в соответствии с необходимым применением. В некоторых вариантах осуществления они предоставлены в виде фармацевтических композиций. Как будет понятно специалистам в данной области техники, во многих случаях фармацевтические композиции содержат контролируемые количества и произведены для введения субъектам,

таким как пациенты-люди. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая соединение, агент и/или композицию, описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемое производное, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение, агент или композицию по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество соединения, агента или композиции по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция упакована для хранения, транспортировки, введения и т. д. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция не содержит значительное количество органических растворителей (например, общее количество органических растворителей составляет не более 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % или 1 % по массе и/или объему фармацевтической композиции).

[321] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель представляет собой или содержит нетоксичные носитель, адъювант или несущую среду, которые не нарушают фармакологическую активность соединения, с которыми он составлен.

Фармацевтически приемлемые носители, адъюванты или несущие среды могут включать, но не ограничиваются этим, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу натрия, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилен-полиоксипропилен, полиэтиленгликоль и шерстяной жир.

[322] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемое производное представляет собой нетоксичные соль, сложный эфир, соль сложного эфира или другое производное соединения, которое при введении реципиенту способно прямо или косвенно обеспечивать соединение или его активный метаболит или остаток.

[323] Композиции можно вводить перорально, парентерально, с помощью спрея для ингаляции, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или через имплантируемый

резервуар. В некоторых вариантах осуществления парентеральное введение включает подкожные, внутривенные, внутримышечные, внутрисуставные, интрасиновиальные, интрастернальные, интратекальные, внутripеченочные, внутриочаговые и внутричерепные способы инъекции или инфузии. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят перорально, внутривентрально или внутривенно. Стерильные инъекционные формы композиций могут представлять собой водные или масляные суспензии. Эти суспензии можно составлять в соответствии со способами, известными в данной области техники, с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный препарат для инъекций может иметь форму стерильного раствора для инъекций или суспензии в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. К приемлемым применимым носителям и растворителям относятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды традиционно используют стерильные нелетучие масла.

[324] В некоторых вариантах осуществления можно использовать мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные применимы при изготовлении инъекционных растворов, также как и натуральные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно в форме их полиоксиэтилированных производных. Эти масляные растворы или суспензии могут также содержать разбавитель или диспергирующий агент на основе длинноцепочечного спирта, такие как карбоксиметилцеллюлоза или аналогичные диспергирующие агенты, которые обычно используют при составлении фармацевтически приемлемых лекарственных форм, включая эмульсии и суспензии. Другие обычно используемые поверхностно-активные вещества, такие как Твин, Спан и другие эмульгаторы или усилители биодоступности, которые обычно используют при изготовлении фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других лекарственных форм, также можно использовать в целях составления.

[325] Фармацевтически приемлемые композиции можно вводить перорально в любой приемлемой для перорального применения лекарственной форме, включая, но не ограничиваясь этим, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для перорального применения обычно используемые носители включают лактозу и кукурузный крахмал. Также обычно добавляют смазывающие агенты, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсулы применимые разбавители включают лактозу и сушеный кукурузный крахмал.

Когда водные суспензии необходимы для перорального применения, активный ингредиент объединяют с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При необходимости можно добавлять некоторые подслащивающие, ароматизирующие или красящие вещества.

[326] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые композиции можно вводить в виде суппозиториев для ректального введения. В некоторых вариантах осуществления их можно изготавливать путем смешивания агента с подходящим не раздражающим эксципиентом, который является твердым при комнатной температуре, но жидким при ректальной температуре и, следовательно, будет плавиться в прямой кишке с высвобождением лекарственного препарата. К таким материалам относятся масло какао, пчелиный воск и полиэтиленгликоли.

[327] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые композиции можно вводить местно, особенно когда цель лечения включает участки или органы, легко доступные для местного применения, включая заболевания глаз, кожи или нижнего отдела кишечного тракта. Подходящие местные составы легко изготавливают для каждого из этих участков или органов.

[328] Местное применение для нижних отделов кишечного тракта можно осуществлять с помощью ректальных суппозиториев (смотрите выше) или подходящих составов для клизмы. Также можно использовать трансдермальные пластыри для местного применения.

[329] Для местного применения фармацевтически приемлемые композиции можно составлять в виде подходящей мази, содержащей активный компонент, суспендированный или растворенный в одном или более носителях. Носители для местного введения соединений по данному изобретению включают, но не ограничиваются этим, минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, соединение полиоксипропилена, эмульгирующий воск и воду. В альтернативном варианте предложенные фармацевтически приемлемые композиции можно составлять в виде подходящего лосьона или крема, содержащего активные компоненты, суспендированные или растворенные в одном или более фармацевтически приемлемых носителях. Подходящие носители включают, но не ограничиваются этим, минеральное масло, моностеарат сорбитана, полисорбат 60, воск цетиловых эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

[330] Для офтальмологического применения фармацевтически приемлемые композиции можно составлять в виде микронизированных суспензий в изотоническом стерильном физиологическом растворе с отрегулированным рН или, предпочтительно, в виде

растворов в изотоническом стерильном физиологическом растворе с отрегулированным рН, как с консервантом, таким как хлорид бензилалкония, так и без него. В альтернативном варианте для офтальмологического применения фармацевтически приемлемые композиции можно составлять в виде мази, такой как вазелин.

[331] Фармацевтически приемлемые композиции также можно вводить с помощью назального аэрозоля или путем ингаляции. Такие композиции получают в соответствии со способами, хорошо известными в области изготовления фармацевтических составов, и можно получать в виде растворов в солевом растворе с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, стимуляторов всасывания для повышения биодоступности, фторуглеродов и/или других традиционных солюбилизующих или диспергирующих агентов.

[332] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые композиции составлены для перорального введения. Такие составы можно вводить с пищей или без нее. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые композиции вводят без пищи. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые композиции вводят с пищей.

[333] Количества соединений, которые можно комбинировать с материалами-носителями для получения композиции в единичной лекарственной форме, будут варьироваться в зависимости от подлежащего лечению хозяина и конкретного способа введения. В некоторых вариантах осуществления предложенные композиции составлены так, чтобы вводить пациенту, получающему эти композиции, дозу соединения от 0,01 до 100 мг/кг массы тела/сутки.

[334] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, которые содержат агенты-усилители терапии, содержащие представляющие интерес фрагменты, конъюгированные с фрагментами агента-мишени в конкретных участках.

[335] В одном варианте осуществления предложена 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, содержащий монометилауристатин E (ММАЕ); и

второе соединение, имеющее структуру:



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

[336] В другом варианте осуществления композиция дополнительно содержит 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;

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

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, содержащий монометилауристатин E (ММАЕ).

четвертое соединение, имеющее формулу (R-III):



или их комбинацию.

[337] В некоторых вариантах осуществления композиции могут содержать первое и второе соединения в эквимольном 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.

[338] 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.

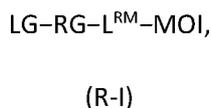
[339] Следует также понимать, что конкретная дозировка и схема лечения для любого конкретного пациента будут зависеть от множества факторов, включая активность конкретно применяемого соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, рацион, время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных средств и мнение лечащего врача, а также степень тяжести конкретного заболевания, подлежащего лечению. Количество соединения по настоящему изобретению в композиции также будет зависеть от конкретного соединения в композиции.

[340] Методики (например, соединения, агенты, композиции) по настоящему изобретению можно применять в различных целях, например, для выявления, диагностики,

терапии и т. д. В некоторых вариантах осуществления предложенные методики применимы для лечения патологических состояний, нарушений или заболеваний, например, различных видов рака. В некоторых вариантах осуществления предложенные методики включают связывающие мишень фрагменты, например фрагменты агентов на основе антител, которые могут связывать антигены раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления связывающий мишень фрагмент представляет собой фрагмент агента на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления агент на основе антитела представляет собой терапевтический агент. Помимо прочего, различные агенты на основе антител, включая многие из разработанных и/или одобренных (например, FDA, EMA и т. д.) в качестве терапевтических средств, можно использовать в соответствии с настоящим изобретением для обеспечения терапевтических средств против различных заболеваний.

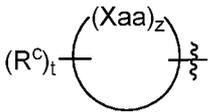
[341] Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены следующие варианты осуществления:

1. Соединение, имеющее структуру формулы R-I:



или ее соли, где:

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

R^{LG} представляет собой , $\text{R}^{\text{c}}\text{-(Xaa)}_z\text{-}$, 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 $\text{-L}^{\text{a}}\text{-R}'$;

каждое из a и b независимо равно 1–200;

каждый L^{a} независимо представляет собой ковалентную связь или необязательно

замещенную двухвалентную группу, выбранную из C₁-C₂₀ алифатического или C₁-C₂₀ алифатического фрагмента, имеющего 1–5 гетероатомов, где одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены –C(R')₂–, –C_y–, –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 –C_y– 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}–;

RG представляет собой –L^{RG1}–L^{RG2}–, –L^{LG4}–L^{RG1}–L^{RG2}–, –L^{LG3}–L^{LG4}–L^{RG1}–L^{RG2}–, –L^{LG2}–L^{LG3}–L^{LG4}–L^{RG1}–L^{RG2}–;

каждый из L^{LG1}, L^{LG2}, L^{LG3}, L^{LG4}, L^{RG1}, L^{RG2} и L^{RM} независимо представляет собой L;

каждый L 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_y–, –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 гетероциклила, 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; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит ведотин (MMAD, MMAE или MMAF), ведотин, озогамин, мафодотин, дерукстекан, эмтанзин, говитекан, тезилин, дуокармазин, соравтанзин, равтанзин.

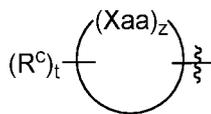
2. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью, при этом агент-мишень представляет собой белковый агент.

3. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью, при этом агент-мишень представляет собой агент на основе антитела.

4. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который связывается с Fc-областью агента на основе антитела.

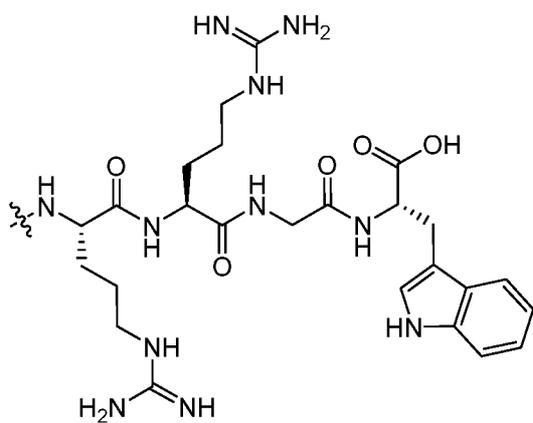
5. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью, при этом агент-мишень представляет собой агент на основе антитела, который представляет собой или содержит энфортумаб, брентуксимаб, белантамаб, ворсетуумаб, инотуумаб, трастуумаб, гемтуумаб, полатуумаб, сацитуумаб, тизотумаб, лонкастуксимаб, датопотамаб, депатуксизумаб, мирветуксимаб, тусамитамаб, анетумаб, камиданлумаб, колтуксимаб, дизитамаб, лобетуумаб, ладиратуумаб, лифастуумаб, наратуксимаб, цирмтуумаб, патритуумаб, пинатуумаб, полатуумаб, энапотатамаб, анетумаб или омбуртатамаб.

6. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где каждый L независимо представляет собой ковалентную связь или двухвалентную необязательно замещенную линейную или разветвленную алифатическую группу или гетероалифатическую группу, имеющую 1–10 гетероатомов, при этом одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $\text{—C}\equiv\text{C—}$, —Cy— , $\text{—C(R')}_2\text{—}$, —O— , —S— , —S—S— , —N(R')— , —C(O)— , —C(S)— , —C(NR')— , —C(O)N(R')— , $\text{—C(O)C(R')}_2\text{N(R')—}$, —N(R')C(O)N(R')— , —N(R')C(O)O— , —S(O)— , $\text{—S(O)}_2\text{—}$, $\text{—S(O)}_2\text{N(R')—}$, —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 $\text{—}[(\text{—O—C(R')}_2\text{—C(R')}_2\text{—})_n\text{—}$, где n равно 1–20.
7. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где LG представляет собой $\text{R}^{\text{LG}}\text{—L}^{\text{LG}}\text{—}$, где R^{LG} представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, где L^{LG} представляет собой L^{LG1} , где L^{LG1} представляет собой L.
8. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где RG представляет собой или содержит $\text{—L}^{\text{LG2}}\text{—L}^{\text{LG3}}\text{—L}^{\text{LG4}}\text{—L}^{\text{RG1}}\text{—L}^{\text{RG2}}\text{—}$, где каждый L^{LG2} , L^{LG3} , L^{LG4} , L^{RG1} , L^{RG2} независимо представляет собой L.
9. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где LG представляет собой $\text{R}^{\text{LG}}\text{—L}^{\text{LG}}\text{—}$, где R^{LG} представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, где L^{LG} представляет собой $\text{L}^{\text{LG1}}\text{—L}^{\text{LG2}}\text{—}$.
10. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где RG представляет собой или содержит $\text{—L}^{\text{LG3}}\text{—L}^{\text{LG4}}\text{—L}^{\text{RG1}}\text{—L}^{\text{RG2}}\text{—}$.
11. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где LG представляет собой $\text{R}^{\text{LG}}\text{—L}^{\text{LG}}\text{—}$, где R^{LG} представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, где L^{LG} представляет собой $\text{L}^{\text{LG1}}\text{—L}^{\text{LG2}}\text{—L}^{\text{LG3}}\text{—}$.
12. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где RG представляет собой или содержит $\text{—L}^{\text{LG4}}\text{—L}^{\text{RG1}}\text{—L}^{\text{RG2}}\text{—}$.
13. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где LG представляет собой $\text{R}^{\text{LG}}\text{—L}^{\text{LG}}\text{—}$, где R^{LG} представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, где L^{LG} представляет собой $\text{L}^{\text{LG1}}\text{—L}^{\text{LG2}}\text{—L}^{\text{LG3}}\text{—L}^{\text{LG4}}\text{—}$.
14. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где RG представляет собой или содержит $\text{—L}^{\text{RG1}}\text{—L}^{\text{RG2}}\text{—}$.
15. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где R^{LG}

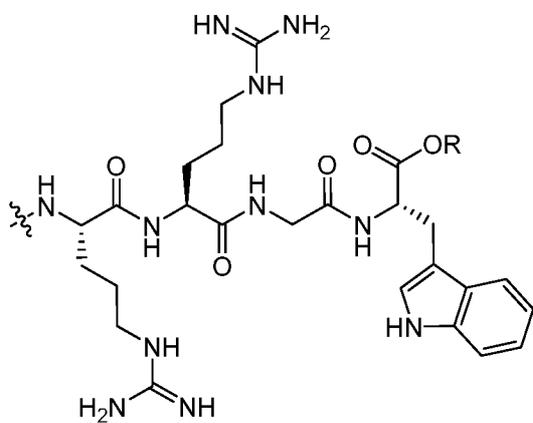


представляет собой или $R^c-(Xaa)_z-$.

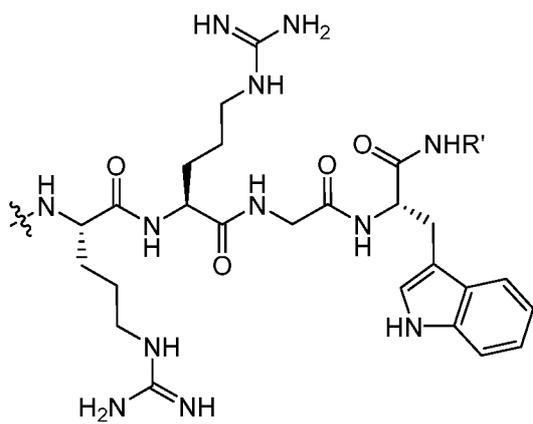
16. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где R^{LG} представляет собой или содержит WXL, где X представляет собой аминокислотный остаток.
17. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где R^{LG} представляет собой или содержит AWXLGELVW (SEQ ID NO:16), где X представляет собой аминокислотный остаток.
18. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где R^{LG} представляет собой или содержит DpLpAWXLGELVW (SEQ ID NO:20), где X представляет собой аминокислотный остаток.
19. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где R^{LG} представляет собой или содержит DCAWXLGELVWCT (SEQ ID NO:18), где два остатка цистеина необязательно образуют дисульфидную связь, а X представляет собой аминокислотный остаток.
20. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где R^{LG} представляет собой или содержит DpLpDCAWXLGELVWCT (SEQ ID NO:23), где два остатка цистеина необязательно образуют дисульфидную связь, а X представляет собой аминокислотный остаток.
21. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где R^{LG} представляет собой или содержит CDCAWXLGELVWCTC (SEQ ID NO:26), где первый и последний остатки цистеина и два цистеина в середине последовательности, каждый, независимо и необязательно образуют дисульфидную связь, а X представляет собой аминокислотный остаток.
22. Соединение по любому из вариантов осуществления 16–21, где R^{LG} представляет собой или содержит WXL, где X представляет собой аминокислотный остаток.
23. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{LG} выбран из фрагментов от A-1 до A-50 из таблицы A-1.
24. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{LG} представляет собой



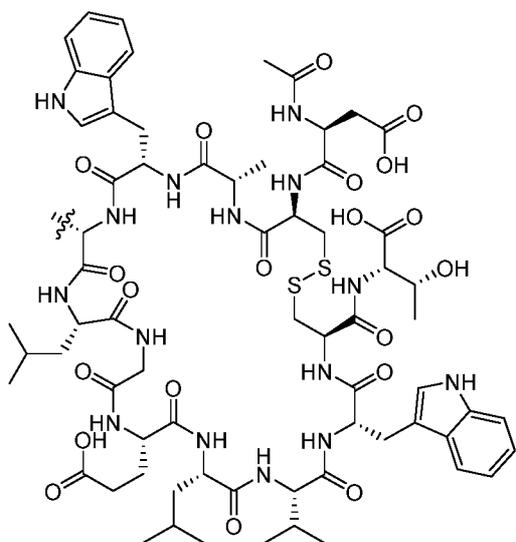
25. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{LG} представляет собой



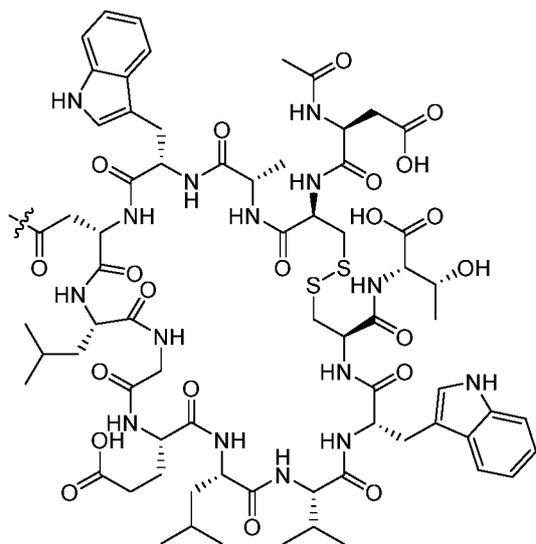
26. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{LG} представляет собой



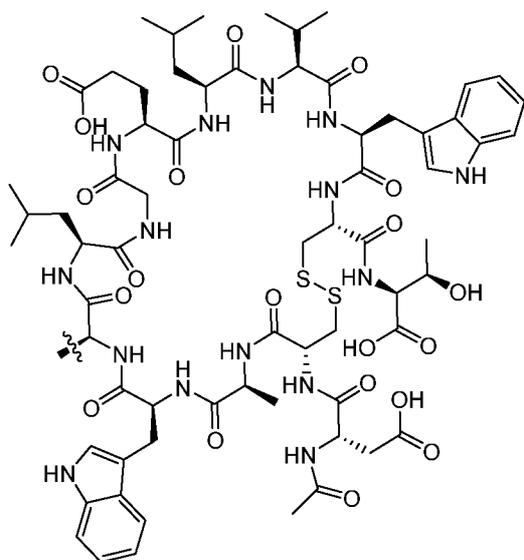
27. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{LG} представляет собой



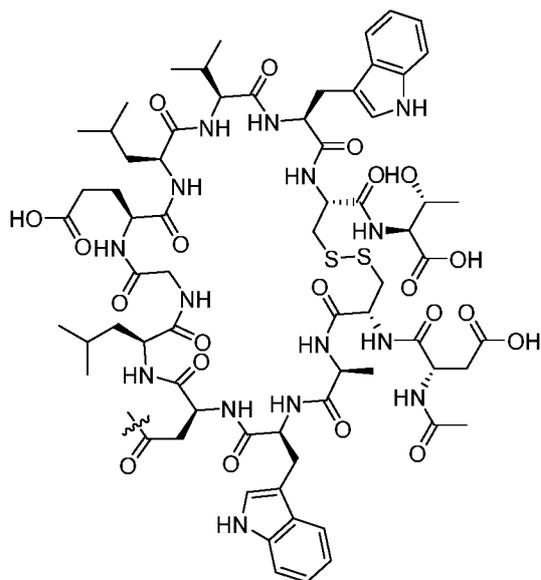
30. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{LG} представляет собой



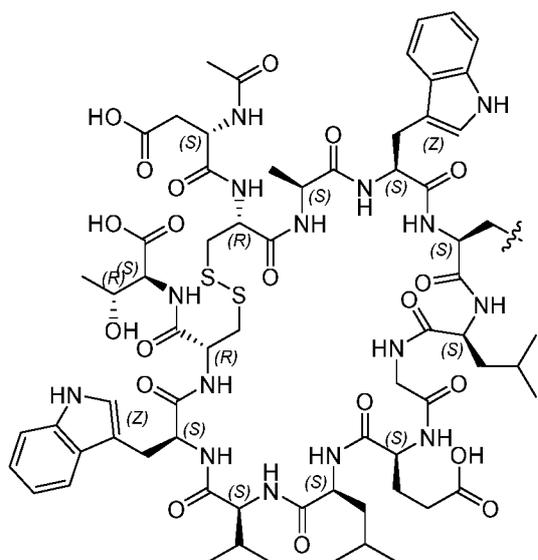
31. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{LG} представляет собой



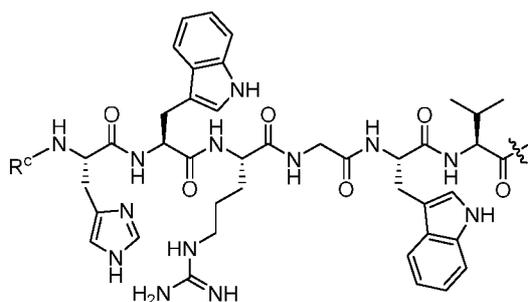
32. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{LG} представляет собой



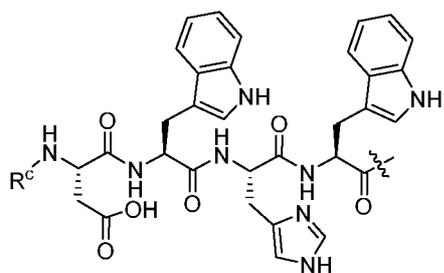
33. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{LG} представляет собой



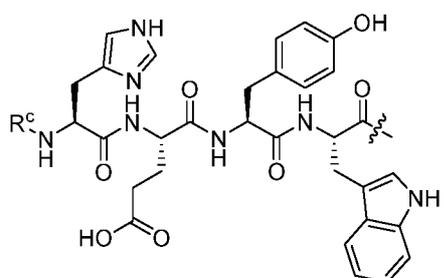
34. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{L6} представляет собой



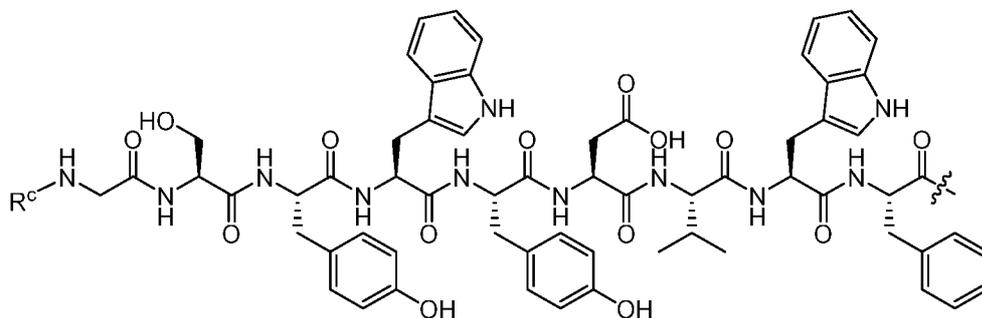
35. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{L6} представляет собой



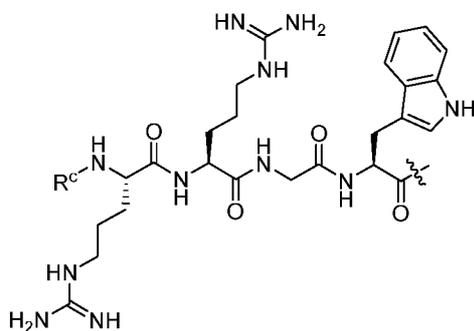
36. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{L6} представляет собой



37. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{LG} представляет собой



38. Соединение по варианту осуществления 15, где R^{LG} представляет собой



39. Соединение по любому из вариантов осуществления 33–37, где R^c представляет собой $R-C(O)-$, где R представляет собой необязательно замещенный C_{1-6} алифатический фрагмент.

40. Соединение по любому из вариантов осуществления 33–37, где R^c представляет собой $CH_3C(O)-$.

41. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–14, где R^{LG} представляет собой фрагмент малой молекулы.

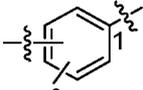
42. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{LG1} представляет собой ковалентную связь.

43. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–14, где L^{LG1} представляет собой или содержит $-(CH_2CH_2O)_n-$.

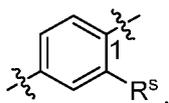
44. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–14, где L^{LG1} представляет собой или содержит $-(CH_2)_n-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_n-$, где каждое n независимо равно 1–10, а каждый $-CH_2-$ независимо необязательно замещен.

45. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{LG2} представляет собой или содержит $-NR'-$.

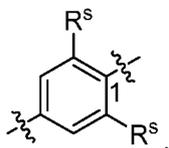
46. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{LG2} представляет собой или содержит $-C(O)-$.

47. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{LG2} представляет собой или содержит $-NR'C(O)-$.
48. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{LG2} представляет собой или содержит $-(CH_2)_n-OC(O)N(R')-$, где $-(CH_2)_n-$ необязательно замещен.
49. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–60, где L^{LG2} представляет собой ковалентную связь.
50. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–60, где L^{LG2} представляет собой $-CH_2N(CH_2CH_2CH_2S(O)_2OH)-C(O)-$.
51. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–60, где L^{LG2} представляет собой $-C(O)-NHCH_2-$.
52. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–60, где L^{LG2} представляет собой $-C(O)O-CH_2-$.
53. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–60, где L^{LG2} представляет собой $-NH-C(O)O-CH_2-$.
54. Соединение по любому из вариантов осуществления 62–63 и 66–69, где $-C(O)-$ связан с L^{LG3} .
55. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{LG3} представляет собой или содержит необязательно замещенное арильное кольцо.
56. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{LG3} представляет собой или содержит необязательно замещенное фенильное кольцо.
57. Соединение по любому из вариантов осуществления 71–72, где кольцо замещено, и при этом один или более заместителей независимо представляют собой электроноакцепторную группу.
58. Соединение по варианту осуществления 73, где заместитель представляет собой $-F$.
59. Соединение по варианту осуществления 73, где заместитель представляет собой $-NO_2$.
60. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–75, где L^{LG3} представляет собой
- 

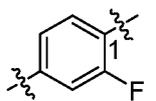
$(R^s)_s$, где s равно 0–4, каждый R^s независимо представляет собой галоген, $-NO_2$, $-L-R'$, $-C(O)-L-R'$, $-S(O)-L-R'$, $-S(O)_2-L-R'$ или $-P(O)(-L-R')_2$.
61. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–75, где L^{LG3} представляет собой



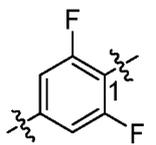
62. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–75, где L^{LG3} представляет собой



63. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–71, где L^{LG3} представляет собой



64. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–71, где L^{LG3} представляет собой



65. Соединение по любому из вариантов осуществления 76–80, где $C1$ связан с L^{LG4} .

66. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–70, где L^{LG3} представляет собой ковалентную связь.

67. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{LG4} представляет собой или содержит $-O-$.

68. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{LG4} представляет собой или содержит $-NR'-$.

69. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–83, где L^{LG4} представляет собой $-O-$.

70. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–83, где L^{LG4} представляет собой $-NH-$.

71. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–83, где L^{LG4} представляет собой ковалентную связь.

72. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{RG1} представляет собой ковалентную связь.

73. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–88, где L^{RG1} представляет собой или содержит $-S(O)_2-$.

74. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{RG2}

представляет собой или содержит $-C(O)-$.

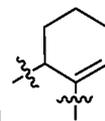
75. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{RG2} представляет собой или содержит $-L^{RG3}-C(=CR^{RG1}R^{RG2})-CR^{RG3}R^{RG4}-$, где каждый из R^{RG1} , R^{RG2} , R^{RG3} и R^{RG4} независимо представляет собой $-L-R'$, а L^{RG3} представляет собой $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-C(O)N(R')$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-P(O)(OR')$, $-P(O)(SR')$ или $-P(O)(N(R')_2)-$.

76. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{RG2} представляет собой или содержит необязательно замещенный $-L^{RG3}-C(=CHR^{RG2})-CHR^{RG4}-$.

77. Соединение по варианту осуществления 91 или 92, где R^{RG2} и R^{RG4} вместе со своими промежуточными атомами образуют необязательно замещенное 3–10-членное моноциклическое или бициклическое кольцо, имеющее 0–5 гетероатомов.

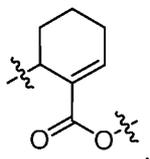
78. Соединение по варианту осуществления 91 или 92, где $-C(=CHR^{RG2})-CHR^{RG4}$ или

$-C(=CR^{RG1}R^{RG2})-CR^{RG3}R^{RG4}$ представляет собой необязательно замещенный



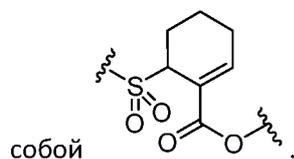
79. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–89, где L^{RG2} представляет собой $-C(O)-$.

80. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–89, где L^{RG2} представляет собой



81. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–89, где $-L^{LG1}-L^{RG2}-$ представляет собой $-C(O)-$.

82. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–89, где $-L^{LG1}-L^{RG2}-$ представляет



83. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{PM} представляет собой или содержит $-(CH_2CH_2O)n-$.

84. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где L^{PM} представляет собой или содержит $-(CH_2)_n-O-(CH_2CH_2O)n-(CH_2)_n-$, где каждое n независимо равно 1–10, а каждый $-CH_2-$ независимо необязательно замещен.

85. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит цитотоксический агент, такой как MMAD, MMAE и MMAF.

86. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит пептидный фрагмент, который представляет собой или содержит MMAD, MMAE или MMAF.

87. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит реактивный фрагмент в дополнение к MMAD, MMAE или MMAF.

88. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, где представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит реактивный фрагмент, подходящий для биоортогональной реакции.

89. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающееся тем, что соединение не содержит расщепляемые группы, чье расщепление может привести к высвобождению LG, за исключением одной или более, необязательно в RG.

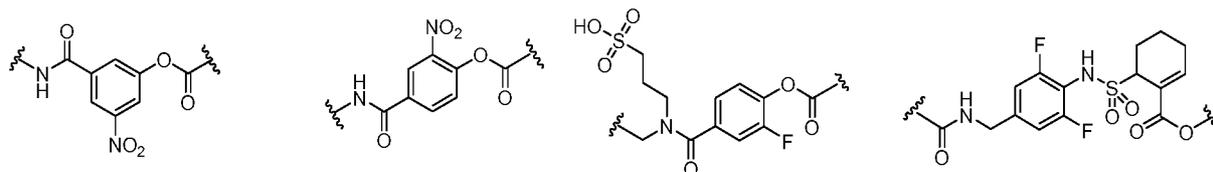
90. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающееся тем, что соединение не содержит $-S-S-$, ацетальных или иминных групп за исключением находящихся в RG или MOI.

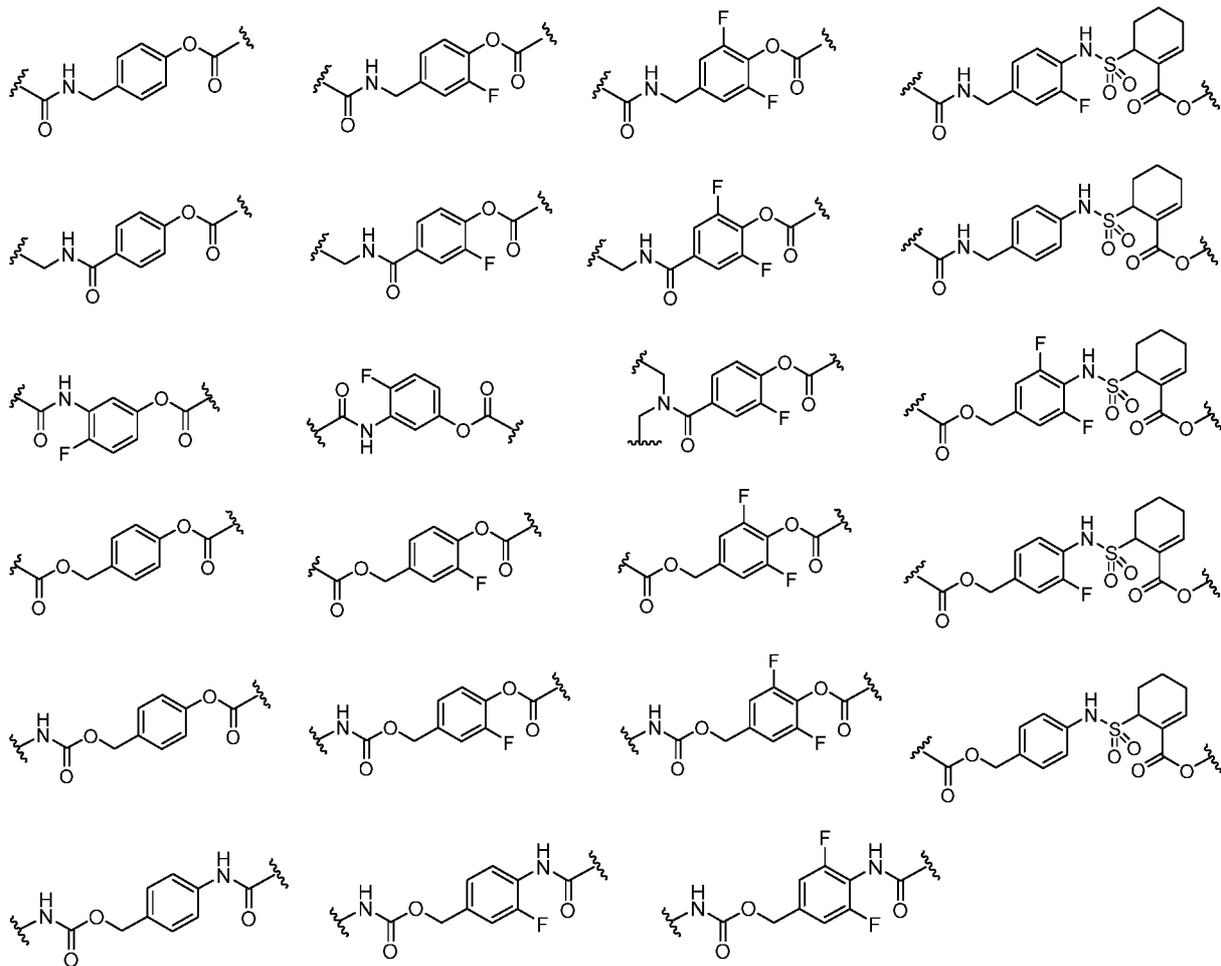
91. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающееся тем, что соединение не содержит $-S-S-$, ацетальных или иминных групп за исключением того, что соединение может иметь $-S-S-$, образованную двумя аминокислотными остатками.

92. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающееся тем, что соединение не содержит $-S-S-$, ацетальных или иминных групп за исключением того, что соединение может иметь $-S-S-$, образованную двумя остатками цистеина.

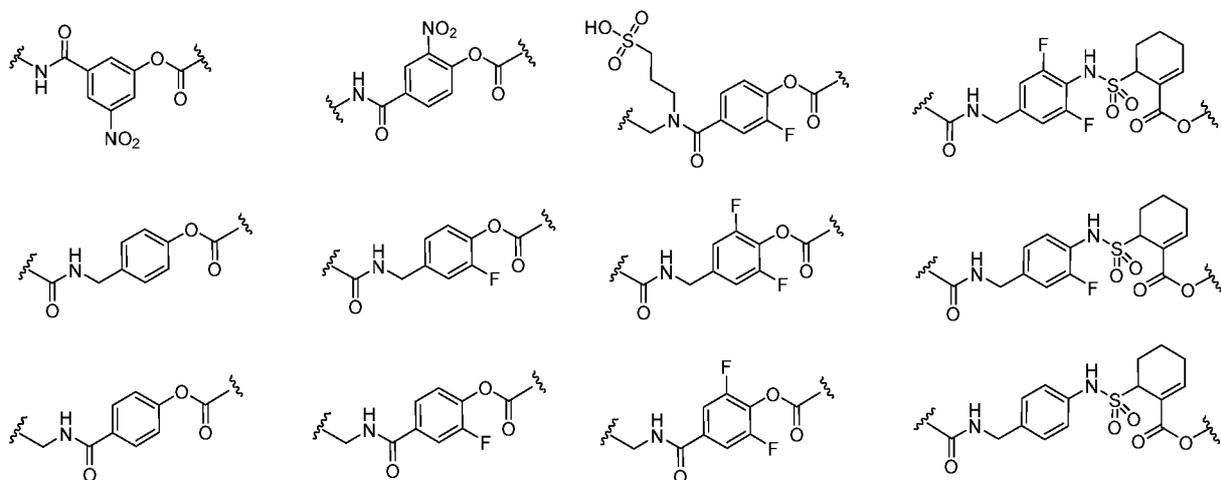
93. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающееся тем, что соединение не содержит $-S-S-$, ацетальных или иминных групп.

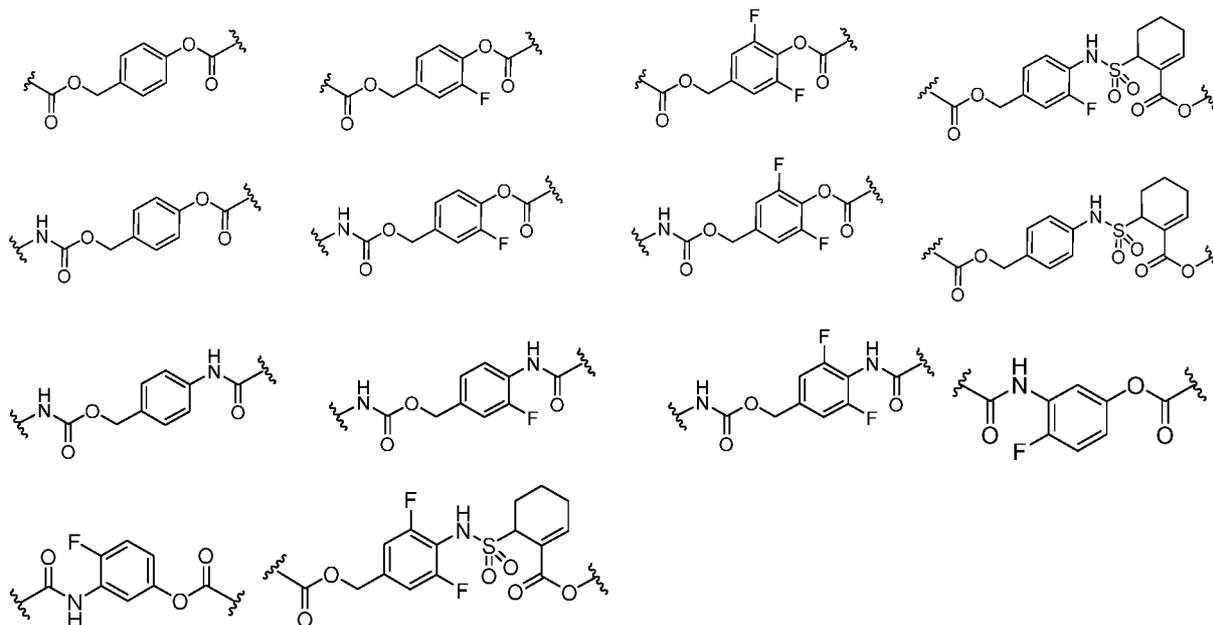
94. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающееся тем, что соединение содержит одну или более групп, выбранных из:





95. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающееся тем, что соединение содержит структуру, выбранную из:





96. Соединение по любому из вариантов осуществления 1–94, содержащее реактивную группу, причем реактивная группа содержит или представляет собой группу, проиллюстрированную в варианте осуществления 95.

97. Соединение по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающееся тем, что соединение содержит два или более связывающих мишень фрагментов.

98. Способ, включающий следующие этапы:

1) приведение агента-мишени в контакт с реакционным партнером, содержащим:

первую группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью,

реактивную группу;

представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAD, MMAE или MMAF; и

необязательно один или более линкерных фрагментов;

2) образование агента, содержащего:

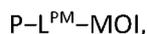
фрагмент агента-мишени;

представляющий интерес фрагмент; и

необязательно один или более линкерных фрагментов.

99. Способ по варианту осуществления 98, где реактивная группа расположена между первой группой и представляющим интерес фрагментом и связана с первой группой и представляющим интерес фрагментом независимо и необязательно посредством линкерного фрагмента.

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



(P-I)

или ее соли, где:

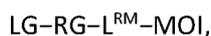
P представляет собой фрагмент агента-мишени;

L^{PM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAD, MMAE или MMAF.

включающий такие этапы:

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



(R-I)

или ее соли, где:

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

RG представляет собой реактивную группу;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAD, MMAE или MMAF; и

2) образование агента, имеющего структуру формулы P-I.

101. Способ получения агента, имеющего структуру P-II:



(P-II)

где:

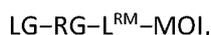
P-N представляет собой фрагмент белкового агента, содержащий остаток лизина;

L^{PM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAD, MMAE или MMAF;

при этом способ включает:

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



(R-I)

или ее соли, где:

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

RG представляет собой реактивную группу;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAD, MMAE или MMAF.

102. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что агент-мишень представляет собой или содержит белковый агент.

103. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что агент-мишень представляет собой или содержит агент на основе антитела, такой как энфортумаб, брентуксимаб, белантамаб, ворсетуумаб, инотуумаб, трастуумаб, гемтуумаб, полатуумаб, сацитуумаб, тизотумаб, лонкастуксимаб, датопотамаб, депатуксизумаб, мирветуксимаб, тусамитамаб, анетумаб, камиданлумаб, колтуксимаб, дизитамаб, лабетуумаб, ладиратуумаб,

лифастузумаб, наратуксимаб, цирмтузумаб, патритумаб, пинатузумаб, полатузумаб, энапотамаб, анетумаб или омбуртамаб.

104. Способ по варианту осуществления 103, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент селективно присоединен к агенту на основе антитела в K246 или K248 или соответствующем положении.

105. Способ по варианту осуществления 103, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент селективно присоединен к агенту на основе антитела в K288 или K290 или соответствующем положении.

106. Способ по варианту осуществления 103, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент селективно присоединен к агенту на основе антитела в K251 или K253 тяжелой цепи IgG2 или соответствующем положении.

107. Способ по варианту осуществления 103, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент селективно присоединен к агенту на основе антитела в K239 или K241 тяжелой цепи IgG4 или соответствующем положении.

108. Способ по варианту осуществления 103, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент селективно присоединен к агенту на основе антитела в K317 или соответствующем положении.

109. Способ по варианту осуществления 103, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент селективно присоединен к агенту на основе антитела в остатке(ах) тяжелой цепи по сравнению с остатком(ами) легкой цепи.

110. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что агент-мишень представляет собой или содержит агент на основе антитела IgG.

111. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что агент-мишень представляет собой или содержит Fc-область.

112. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что реакционный партнер представляет собой соединение по любому из вариантов осуществления 1–98.

113. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что этапы приведения в контакт и образования проводят в одном сосуде.

114. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что этапы приведения в контакт и образования проводят в ходе одной химической реакции.

115. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что

способ не включает реакции, которые направлены главным образом на расщепление функциональной группы в агенте, содержащем фрагмент агента-мишени.

116. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что способ не включает реакции, которые направлены главным образом на расщепление функциональной группы в L^{RM} или L^{PM} .

117. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что способ не включает реакции, которые направлены главным образом на восстановление функциональной группы в агенте, содержащем фрагмент агента-мишени.

118. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что способ не включает реакции, которые направлены главным образом на восстановление функциональной группы в L^{RM} или L^{PM} .

119. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что способ не включает реакции, которые направлены главным образом на окисление функциональной группы в агенте, содержащем фрагмент агента-мишени.

120. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что способ не включает реакции, которые направлены главным образом на окисление функциональной группы в L^{RM} или L^{PM} .

121. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что способ не включает реакции, которые направлены главным образом на гидролиз функциональной группы в агенте, содержащем фрагмент агента-мишени.

122. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что способ не включает реакции, которые направлены главным образом на гидролиз функциональной группы в L^{RM} или L^{PM} .

123. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что способ не включает реакции, которые направлены главным образом на гидролиз сложноэфирной группы в L^{RM} или L^{PM} .

124. Способ по любому из вариантов осуществления 164–172, отличающийся тем, что фрагмент агента-мишени представляет собой фрагмент белкового агента.

125. Способ по любому из вариантов осуществления 164–172, отличающийся тем, что фрагмент агента-мишени представляет собой фрагмент агента на основе антитела.

126. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что приведение в контакт проводят в условиях и в течение времени, достаточных для того, чтобы

остаток лизина агента-мишени вступил в реакцию с реактивной группой реакционного партнера.

127. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что приведение в контакт проводят в условиях и в течение времени, достаточных для того, чтобы остаток лизина агента-мишени вступил в реакцию и образовал связь с атомом RG с высвобождением LG.

128. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что агент и реакционный партнер имеют одинаковый представляющий интерес фрагмент.

129. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит агент на основе антитела.

130. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит реактивный фрагмент.

131. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, включающий проведение реакции первого агента, содержащего первый реактивный фрагмент в первом представляющем интерес фрагменте, со вторым агентом, содержащим второй реактивный фрагмент.

132. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что второй агент содержит второй реактивный фрагмент и пептидный фрагмент.

133. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что второй агент содержит второй реактивный фрагмент и белковый фрагмент.

134. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающийся тем, что второй агент содержит второй реактивный фрагмент и фрагмент агента на основе антитела.

135. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, включающий проведение реакции первого агента, содержащего первый реактивный фрагмент в первом представляющем интерес фрагменте, со вторым агентом, содержащим второй реактивный фрагмент во втором представляющем интерес фрагменте.

136. Способ по любому из вариантов осуществления 132–135, отличающийся тем, что первый агент представляет собой продукт способа по любому из вариантов осуществления 99–131.

137. Способ по любому из вариантов осуществления 132–135, отличающийся тем, что второй агент представляет собой продукт способа по любому из вариантов осуществления 99–131.

138. Способ по любому из вариантов осуществления 132–135, отличающийся тем, что каждый из первого и второго агентов независимо представляет собой продукт способа по любому из вариантов осуществления 99–131.

139. Способ, включающий проведение реакции первого агента, содержащего первый реактивный фрагмент в первом представляющем интерес фрагменте, со вторым агентом, содержащим второй реактивный фрагмент во втором представляющем интерес фрагменте, при этом первый агент получен способом по любому из вариантов осуществления 99–131.
140. Способ, включающий проведение реакции первого агента, содержащего первый реактивный фрагмент в первом представляющем интерес фрагменте, со вторым агентом, содержащим второй реактивный фрагмент во втором представляющем интерес фрагменте, при этом второй агент получен способом по любому из вариантов осуществления 99–131.
141. Способ, включающий проведение реакции первого агента, содержащего первый реактивный фрагмент в первом представляющем интерес фрагменте, со вторым агентом, содержащим второй реактивный фрагмент во втором представляющем интерес фрагменте, при этом каждый из первого и второго агентов независимо получен способом по любому из вариантов осуществления 99–131.
142. Способ по любому из вариантов осуществления 132–141, отличающийся тем, что каждый из первого и второго агентов независимо имеет структуру формулы P-I или P-II или их соли.
143. Способ по любому из вариантов осуществления 132–142, отличающийся тем, что фрагмент агента-мишени первого агента представляет собой фрагмент агента на основе антитела.
144. Способ по любому из вариантов осуществления 132–143, отличающийся тем, что фрагмент агента-мишени второго агента представляет собой фрагмент агента на основе антитела.
145. Способ по любому из вариантов осуществления 143–144, отличающийся тем, что первый и второй фрагменты-мишени независимо представляют собой фрагменты агентов на основе антител к разным антигенам.
146. Способ по любому из вариантов осуществления 143–144, отличающийся тем, что первый и второй фрагменты-мишени независимо представляют собой фрагменты агентов на основе антител к разным белками.
147. Способ по любому из вариантов осуществления 132–146, отличающийся тем, что первый агент содержит антитело к CD30, такое как брентуксимаб, или моноклональное антитело к нектину-4, такое как энфортумаб.
148. Способ по любому из вариантов осуществления 132–147, отличающийся тем, что второй агент содержит фрагмент агента против CD3.
149. Способ по любому из вариантов осуществления 132–147, отличающийся тем, что второй агент содержит scFv.

150. Способ по любому из вариантов осуществления 184–202, отличающийся тем, что второй агент содержит цетуксимаб.
151. Продукт по варианту осуществления 224, отличающийся тем, что продукт представляет собой или содержит агент формулы P-I или P-II или их соли.
152. Продукт по варианту осуществления 224, отличающийся тем, что продукт находится в композиции, содержащей агент формулы P-I или P-II или их соли.
153. Продукт по любому из вариантов осуществления 151–152, отличающийся тем, что агент не содержит –S–Су–, где –Су– представляет собой необязательно замещенное 5-членное моноциклическое кольцо, не содержит –S–S–, который не образован остатками цистеина, и не содержит –SH или его соль, который не относится к остатку цистеина.
154. Продукт по любому из вариантов осуществления 151–153, отличающийся тем, что продукт представляет собой фармацевтическую композицию.
155. Композиция обеспечивает совокупность агентов, каждый из которых независимо содержит:
- фрагмент агента-мишени,
 - представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAD, MMAE или MMAF, и
 - необязательно, линкерный фрагмент, связывающий фрагмент агента-мишени и представляющий интерес фрагмент;
- при этом агенты совокупности имеют одинаковый или практически одинаковый фрагмент агента-мишени и общую модификацию независимо по меньшей мере в одном общем участке; и
- при этом около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента-мишени и представляющий интерес фрагмент, являются агентами совокупности.
156. Композиция обеспечивает совокупность агентов, каждый из которых независимо содержит:
- фрагмент белкового агента,
 - представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAD, MMAE или MMAF, и
 - необязательно, линкерный фрагмент, связывающий фрагмент белкового агента и представляющий интерес фрагмент;
- при этом фрагменты белковых агентов совокупности имеют общую аминокислотную

последовательность, а агенты совокупности независимо имеют общую модификацию по меньшей мере в одном общем аминокислотном остатке фрагментов белковых агентов; и

при этом около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент белкового агента, который содержит общую аминокислотную последовательность и представляющий интерес фрагмент, являются агентами совокупности.

157. Композиция обеспечивает совокупность агентов, каждый из которых независимо содержит:

фрагмент агента на основе антитела,
представляющий интерес фрагмент, например, который представляет собой или содержит MMAD, MMAE или MMAF, и

необязательно, линкерный фрагмент, связывающий фрагмент агента на основе антитела и представляющий интерес фрагмент;

при этом фрагменты агентов на основе антител совокупности имеют общую аминокислотную последовательность или могут связываться с общим антигеном, а агенты совокупности независимо имеют общую модификацию по меньшей мере в одном общем аминокислотном остатке фрагментов белковых агентов; и

при этом около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента на основе антитела, которые содержат общую аминокислотную последовательность или могут связываться с общим антигеном, и представляющий интерес фрагмент, являются агентами совокупности.

158. Композиция по варианту осуществления 157, отличающаяся тем, что фрагменты агентов на основе антител совокупности могут связываться с общим антигеном.

159. Композиция по варианту осуществления 157, отличающаяся тем, что фрагменты агентов на основе антител совокупности могут связываться с двумя или более разными антигенами.

160. Композиция по любому из вариантов осуществления 157–159, отличающаяся тем, что фрагменты агентов на основе антител совокупности содержат общую аминокислотную последовательность.

161. Композиция по любому из вариантов осуществления 157–159, отличающаяся тем, что фрагменты агентов на основе антител совокупности содержат общую аминокислотную последовательность в Fc-области.

162. Композиция по любому из вариантов осуществления 157–159, отличающаяся тем, что фрагменты агентов на основе антител совокупности содержат общую Fc-область.

163. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся

тем, что фрагмент агента-мишени, агента на основе белка или антитела представляет собой или содержит фрагмент агента против CD30 или против нектина-4.

164. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что фрагмент агента-мишени, агента на основе белка или антитела представляет собой или содержит брентуксимаб или энфортумаб.

165. Композиция по любому из вариантов осуществления 159–162, отличающаяся тем, что фрагменты агентов на основе антител совокупности представляют собой фрагменты IVIG.

166. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что агенты совокупности содержат общий представляющий интерес фрагмент.

167. Композиция по любому из вариантов осуществления 155–166, отличающаяся тем, что каждый агент совокупности независимо представляет собой агент формулы P-I или P-II или их соли.

168. Композиция по любому из вариантов осуществления 155–167, отличающаяся тем, что представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит выявляемый фрагмент.

169. Композиция по любому из вариантов осуществления 155–167, отличающаяся тем, что представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит реактивный фрагмент.

170. Композиция по любому из вариантов осуществления 155–167, отличающаяся тем, что представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит реактивный фрагмент, который не вступает в реакцию с фрагментом агента-мишени, фрагментом белкового агента или фрагментом агента на основе антитела.

171. Композиция по любому из вариантов осуществления 155–167, отличающаяся тем, что представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит реактивный фрагмент, который не вступает в реакцию с фрагментом агента на основе антитела.

172. Композиция по любому из вариантов осуществления 155–167, отличающаяся тем, что представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит фрагмент терапевтического агента, такой как цитотоксический фрагмент, такой как MMAD, MMAE или MMAF.

173. Композиция по любому из вариантов осуществления 155–172, отличающаяся тем, что линкер не представляет собой пептидный линкер из природных аминокислот.

174. Композиция по любому из вариантов осуществления 155–173, отличающаяся тем, что линкер содержит один или более $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$.

175. Композиция по варианту осуществления 174, где линкер представляет собой или содержит $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$, где n независимо в каждом случае выбрано из целых чисел 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8.

176. Композиция по варианту осуществления 174, где линкер представляет собой или содержит $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-$, $-[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}(\text{O})]_m-(\text{CH}_2)_n-$ и $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_n-\text{N}((\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_n)-((\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_n)-$ где m независимо в каждом случае выбрано из целых чисел 1, 2, 3 и 4.

177. Композиция по любому из вариантов осуществления 156–176, отличающаяся тем, что общая аминокислотная последовательность фрагмента белкового агента содержит один или более аминокислотных остатков, выбранных из K246 и K248 тяжелой цепи IgG1 и соответствующих аминокислотных остатков, K251 и K253 тяжелой цепи IgG2 и соответствующих аминокислотных остатков и K239 и K241 тяжелой цепи IgG4 и соответствующих аминокислотных остатков.

178. Композиция по любому из вариантов осуществления 156–177, отличающаяся тем, что общая аминокислотная последовательность составляет по меньшей мере 10 %–100 % от последовательности фрагмента агента на основе белка или антитела.

179. Композиция по любому из вариантов осуществления 156–177, отличающаяся тем, что общая аминокислотная последовательность составляет по меньшей мере 50 %–100 % от последовательности фрагмента агента на основе белка или антитела.

180. Композиция по любому из вариантов осуществления 156–177, отличающаяся тем, что фрагменты белковых агентов или фрагменты агентов на основе антител совокупности имеют по меньшей мере 50 % гомологию аминокислотной последовательности.

181. Композиция по любому из вариантов осуществления 156–177, отличающаяся тем, что фрагменты белковых агентов или фрагменты агентов на основе антител совокупности имеют по меньшей мере 80 % гомологию аминокислотной последовательности.

182. Композиция по любому из вариантов осуществления 156–177, отличающаяся тем, что фрагменты белковых агентов или фрагменты агентов на основе антител совокупности имеют по меньшей мере 90 % гомологию аминокислотной последовательности.

183. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что общая модификация представляет собой или содержит представляющий интерес фрагмент и, необязательно, линкер.

184. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что все общие модификации содержат общий представляющий интерес фрагмент и, необязательно, общий линкер.

185. Композиция по любому из вариантов осуществления 156–184, отличающаяся тем, что общий аминокислотный остаток представляет собой K246 тяжелой цепи антитела или

общий аминокислотный остаток представляет собой K253 тяжелой цепи антитела IgG2 или соответствующий ему аминокислотный остаток.

197. Композиция по любому из вариантов осуществления 156–196, отличающаяся тем, что общий аминокислотный остаток представляет собой K239 тяжелой цепи антитела IgG4 или соответствующий ему аминокислотный остаток.

198. Композиция по любому из вариантов осуществления 156–197, отличающаяся тем, что общий аминокислотный остаток представляет собой K241 тяжелой цепи антитела IgG4 или соответствующий ему аминокислотный остаток.

199. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что по меньшей мере около 2 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента-мишени и представляющий интерес фрагмент, являются агентами совокупности, или по меньшей мере около 2 % всех агентов, которые содержат фрагмент белкового агента, который содержит общую аминокислотную последовательность и представляющий интерес фрагмент, являются агентами совокупности, или по меньшей мере около 2 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента на основе антитела, который содержит общую аминокислотную последовательность или может связываться с общим антигеном, и представляющий интерес фрагмент, являются агентами совокупности.

200. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента-мишени, являются агентами совокупности, или по меньшей мере около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент белкового агента, который содержит общую аминокислотную последовательность, являются агентами совокупности, или около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента на основе антитела, который содержит общую аминокислотную последовательность или может связываться с общим антигеном, являются агентами совокупности.

201. Композиция по любому из вариантов осуществления 199–200, отличающаяся тем, что процент составляет по меньшей мере около 5 %.

202. Композиция по любому из вариантов осуществления 199–200, отличающаяся тем, что процент составляет по меньшей мере около 10 %.

203. Композиция по любому из вариантов осуществления 199–200, отличающаяся тем, что процент составляет по меньшей мере около 20 %.

204. Композиция по любому из вариантов осуществления 199–200, отличающаяся тем, что процент составляет по меньшей мере около 25 %.

205. Композиция по любому из вариантов осуществления 199–200, отличающаяся тем, что процент составляет по меньшей мере около 50 %.
206. Композиция по любому из вариантов осуществления 199–200, отличающаяся тем, что процент составляет по меньшей мере около 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % или 95 %.
207. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что каждый агент совокупности не содержит –S–Су–, где –Су– представляет собой необязательно замещенное 5-членное моноциклическое кольцо, не содержит –S–S–, который не образован остатками цистеина, и не содержит –SH или его соль, который не относится к остатку цистеина.
208. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что каждый агент совокупности не содержит –S–CH₂–CH₂–.
209. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что каждый агент совокупности не содержит фрагмент, который может специфически связываться с агентом на основе антитела.
210. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что каждый агент совокупности независимо содержит фрагмент агента на основе антитела, и при этом каждый агент может независимо связываться с Fc-рецептором.
211. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что композиция представляет собой продукт способа по любому из предшествующих вариантов осуществления.
212. Композиция по любому из предшествующих вариантов осуществления, отличающаяся тем, что композиция представляет собой фармацевтическую композицию.
213. Агент, отличающийся тем, что агент представляет собой агент совокупности по любому из вариантов осуществления 155–211.
214. Фармацевтическая композиция, содержащая агент по варианту осуществления 213 и фармацевтически приемлемый носитель.
215. Композиция по варианту осуществления 212 или 214, отличающаяся тем, что композиция находится в твердой форме.
216. Композиция по варианту осуществления 212 или 214, отличающаяся тем, что композиция находится в жидкой форме и содержит не более чем 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % или 50 % (об./об.) органических растворителей.
217. Способ, продукт, композиция или агент по любому из предшествующих вариантов

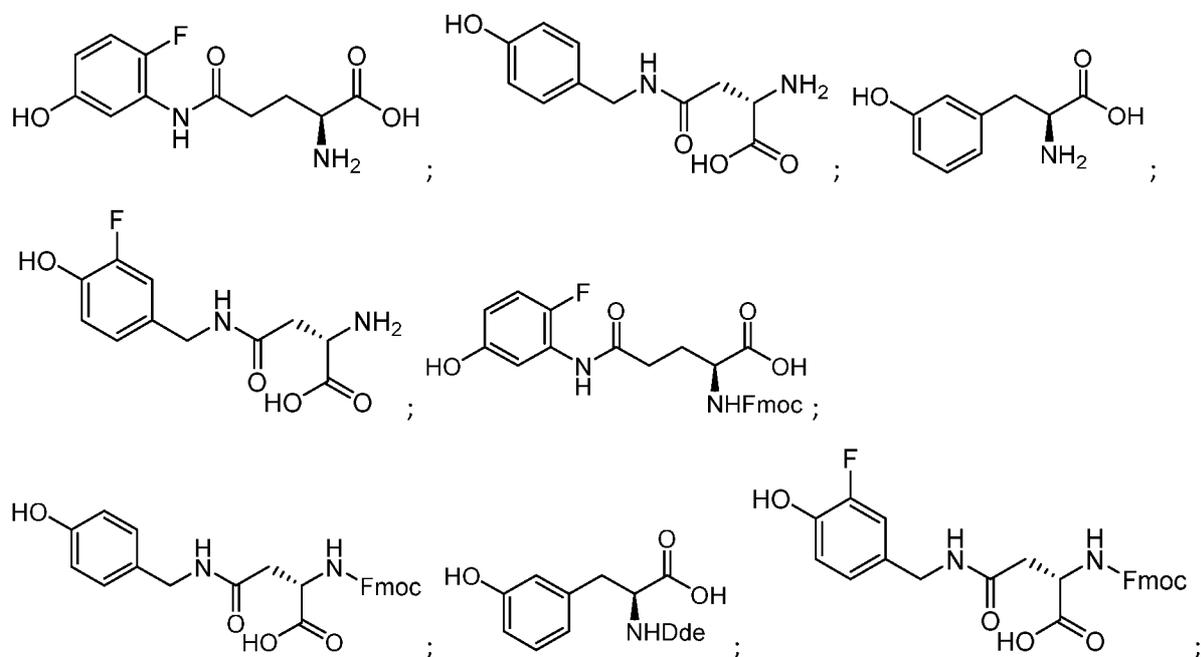
осуществления, отличающиеся тем, что соотношение представляющих интерес фрагментов, конъюгированных с фрагментами агентов-мишеней, и фрагментов агентов-мишеней, или соотношение представляющих интерес фрагментов, конъюгированных с фрагментами белковых агентов, и фрагментов белковых агентов, или соотношение представляющих интерес фрагментов, конъюгированных с фрагментами агентов на основе антител, и фрагментов агентов на основе антител составляет около 0,5–6.

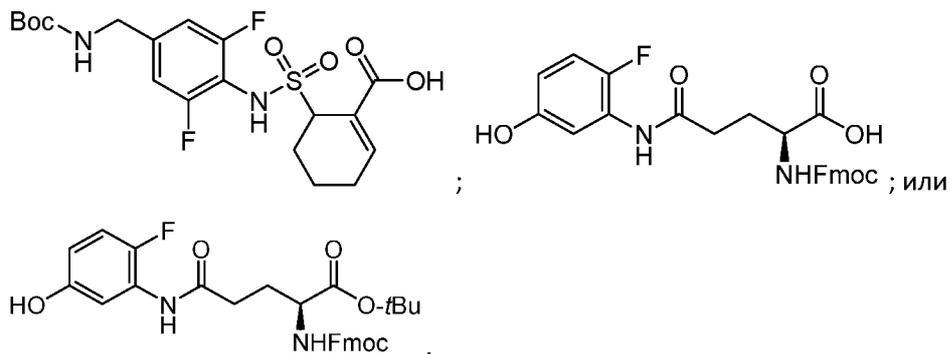
218. Способ, продукт, композиция или агент по варианту осуществления 217, отличающиеся тем, что соотношение составляет около 0,5–2,5.

219. Способ, продукт, композиция или агент по варианту осуществления 217, отличающиеся тем, что соотношение составляет около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5 или 3.

220. Соединение, способ, продукт, композиция или агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где каждый гетероатом независимо выбран из кислорода, азота, серы, фосфора и кремния.

221. Агент, содержащий аминокислотный остаток любого из следующих соединений или аминокислотный остаток сложного эфира любого из следующих соединений:



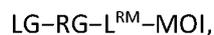


222. Агент по варианту осуществления 221, отличающийся тем, что агент имеет структуру формулы R-I или ее соли.

223. Полипептидный агент, содержащий аминокислотный остаток соединения по варианту осуществления 221.

224. Способ получения соединения, включающий обеспечение соединения по варианту осуществления 221.

225. Соединение, имеющее структуру формулы R-I:



(R-I)

или ее соли, где:

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

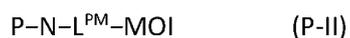
RG представляет собой реактивную группу;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, содержащий монометилауростатин E (ММАЕ).

226. 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, содержащий монометилауристатин E (ММАЕ); и

второе соединение, имеющее структуру:



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

227. Композиция по варианту осуществления 226, 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;

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

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, содержащий монометилауристатин E (ММАЕ).

четвертое соединение, имеющее формулу (R-III):



или их комбинацию.

ПРИМЕРЫ

[342] Как проиллюстрировано в примерах ниже, в определенных вариантах осуществления соединения, агенты, композиции и т. д. получают и/или оценивают в соответствии со следующими приведенными в качестве примера процедурами. Очевидно, что, хотя общие

способы иллюстрируют синтез определенных соединений, агентов, композиций по настоящему изобретению, можно применять нижеприведенные общие способы, а также другие способы, известные специалисту в данной области техники, в соответствии с настоящим изобретением для обеспечения методик по настоящему изобретению.

Сокращения

[343] Следующие сокращения используются в нижеприведенных примерах.

ДХМ дихлорметан

ДИК N,N'-диизопропилкарбодиимид

ДИЭА N,N-диизопропилэтиламин

ДМАП 4-диметиламинопиридин

ДМФ диметилфуран

ЭДКИ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид

Fmoc флуоренилметилоксикарбонила хлорид

ГАТУ гексафторфосфат азабензотриазолтетраметилуроний

ГБТУ (1H-бензотриазол-1-илокси)диметиламино)-N,N-диметилметанимина гексафторфосфат

HOBT гидроксibenзотриазол

NMM N-метилморфолин

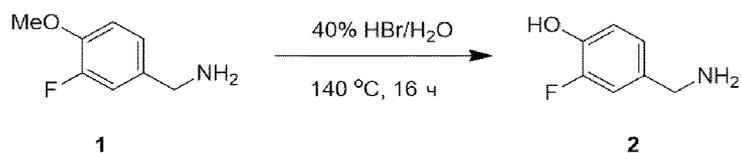
SPPS твердофазный пептидный синтез

ТЭА триэтиламин

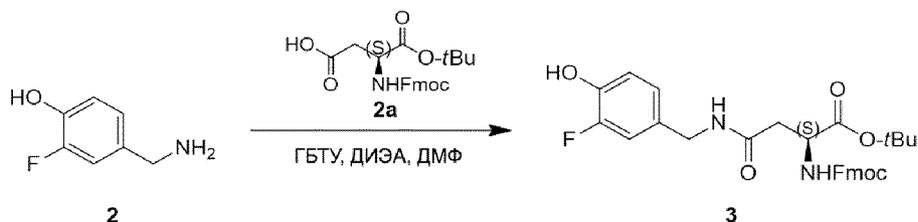
ТГФ тетрагидрофуран

ТФУ трифторуксусная кислота

ПРИМЕР 1. Синтез 3-фтор-4-гидроксibenзиламин-содержащей реактивной группы (соед. 4)



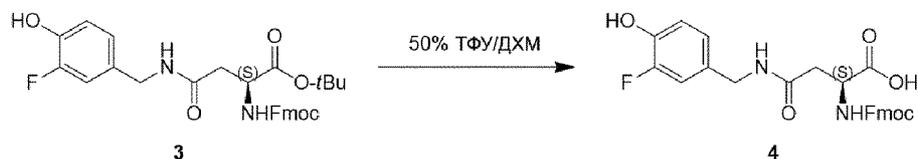
[344] Смесь промежуточного соединения 1 (10 г, 64,45 ммоль) в HBr/H₂O (40 % HBr, 300 мл всего) перемешивали при 140 °С в течение 16 ч. Растворитель удаляли при 70 °С при пониженном давлении, остаток растирали в MeCN (50 мл) в течение 10 мин. После фильтрации твердое вещество сушили в условиях лиофилизации с получением промежуточного соединения 2 (13,0 г, 58,5 ммоль, 90,8 % выход, соль HBr) в виде коричневого твердого вещества. ¹H ЯМР: (400 МГц ДМСО-*d*₆) δ м. д. 10,04 (с, 1 H) 8,18 (с, 3 H) 7,32 (дд, *J* = 12,17, 1,88 Гц, 1 H) 7,11 (дд, *J* = 8,28, 1,51 Гц, 1 H) 6,96–7,03 (м, 1 H) 3,93 (к, *J* = 5,52 Гц, 2 H).



[345] В смесь промежуточного соединения 2 (13,0 г, 58,5 ммоль, 1 экв., HBr), промежуточного соединения 2а (24,1 г, 58,5 ммоль, 1 экв.), ДИЭА (3,78 г, 29,2 ммоль, 5,10 мл, 0,5 экв.) и НОВт (11,87 г, 87,8 ммоль, 1,5 экв.) в ДМФ (200 мл) добавляли ЭДКИ (12,35 г, 64,4 ммоль, 1,1 экв.) при 15 °С, смесь перемешивали при 15 °С в течение 3 ч. Смесь каплями добавляли в 0,5 М HCl (холодная, 1 л) и осаждали твердое вещество. После фильтрации твердое вещество сушили в условиях лиофилизации с получением промежуточного соединения 3 (31 г, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

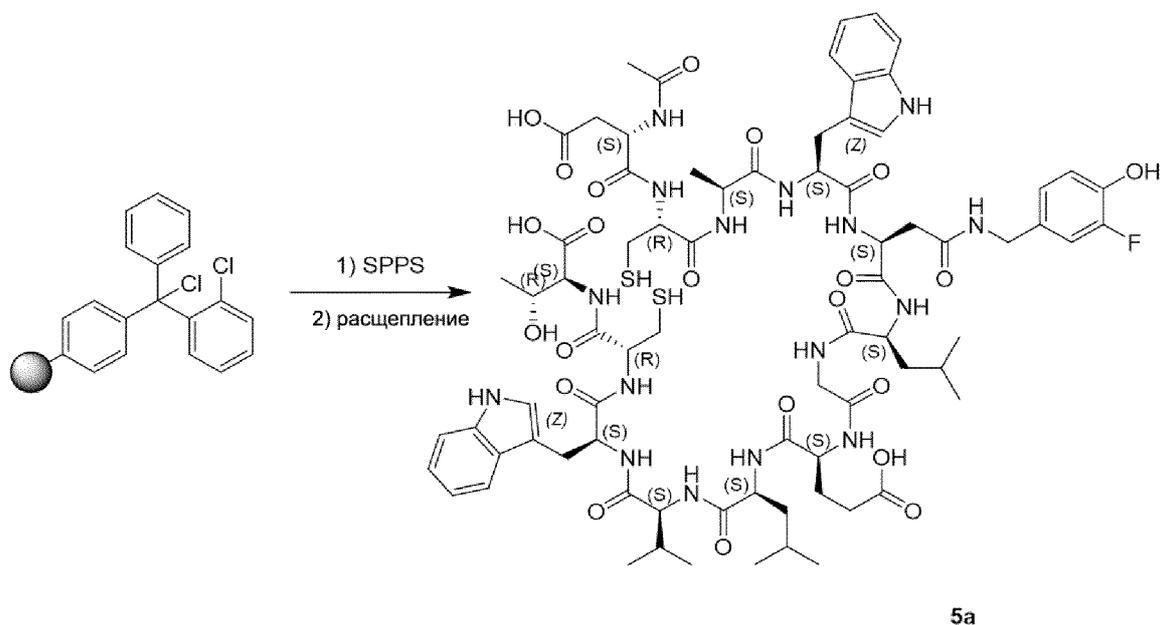
[346] В альтернативном варианте реакцию можно проводить с 60,0 г соединения 2 в качестве исходного материала при 20 °С. После осаждения HCl и фильтрации твердое вещество можно растворять в ДХМ (2 л), промывать 0,5 М HCl (800 мл), H₂O (800 мл), соевым раствором (800 мл), сушить над безводным Na₂SO₄ и концентрировать при пониженном давлении. Остаток очищали посредством силикагелевой колонки (ДХМ/MeOH = от 1/0 до 20/1) с получением **промежуточного соединения 3** (120,0 г, 90 % чистота, содержащего небольшое количество ДМФ, 83,3 % выход) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ м. д. 9,70 (с, 1 H) 8,34 (т, *J* = 5,77 Гц, 1 H) 7,90 (д, *J* = 7,53 Гц, 2 H) 7,71 (д, *J* = 7,53 Гц, 2 H) 7,61 (д, *J* = 8,28 Гц, 1 H) 7,39–

7,47 (м, 2 Н) 7,29–7,36 (м, 2 Н) 7,02 (д, $J = 12,30$ Гц, 1 Н) 6,85–6,92 (м, 2 Н) 4,20–4,39 (м, 4 Н) 4,11–4,19 (м, 2 Н) 1,36 (с, 9 Н).



[347] Смесь соединения 3 (30 г, 56,12 ммоль, 1,0 экв.) в ТФУ (300 мл) и ДХМ (300 мл) перемешивали при 15 °С в течение 0,5 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш C18 (ISCO®; 120 г флэш-колонка SepaFlash® C18, элюент 0~90 % градиента MeCN/H₂O при 75 мл/мин) напрямую с получением соединения 4 (18 г, 37,6 ммоль, 67,0 % выход) в виде белого твердого вещества. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ м. д. 9,69 (с, 1 Н) 8,34 (т, $J = 5,90$ Гц, 1 Н) 7,90 (д, $J = 7,28$ Гц, 2 Н) 7,71 (д, $J = 7,53$ Гц, 2 Н) 7,54 (д, $J = 6,53$ Гц, 1 Н) 7,42 (т, $J = 7,40$ Гц, 2 Н) 7,27–7,37 (м, 1 Н) 7,27–7,37 (м, 1 Н) 7,02 (д, $J = 12,05$ Гц, 1 Н) 6,82–6,93 (м, 2 Н) 4,35–4,43 (м, 1 Н) 4,20–4,31 (м, 3 Н) 4,13–4,19 (м, 2 Н).

ПРИМЕР 2. Процедура для получения связывающего антитело фрагмента, связанного с реактивной группой (промежуточное соединение соед. 5а)



[348] Пептид синтезировали, используя стандартную химию Fmoc.

- 1) Получение смолы: В сосуд, содержащий смолу СТС (3,0 ммоль, 3,0 г, 1,00 ммоль/г) и Fmoc-Thr(tBu)-ОН (1,19 г, 3,0 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (30 мл) каплями добавляли ДИЭА (4,00 экв.) и смешивали в течение 2 ч с барботированием N₂ при 15 °С. Затем добавляли MeOH (3,0 мл) и барботировали N₂ еще в течение 30 мин. Смолу промывали ДМФ (60 мл) с последующим добавлением 20 % пиперидина в ДМФ (60 мл) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 15 °С для снятия защиты Fmoc. Смесь фильтровали, а смолу промывали ДМФ (60 мл) перед переходом к следующему этапу. В альтернативном варианте реакцию можно проводить при 20 °С.
- 2) Сочетание: Раствор Fmoc-Cys(Trt)-ОН (5,25 г, 3,0 экв.), ГБТУ (3,24 г, 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 15 °С (или 20 °С). Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (60 мл) .
- 3) Снятие защиты: В смолу добавляли 20 % пиперидин в ДМФ (20 мл) и барботировали смесь N₂ в течение 30 мин при 15 °С. Реакцию снятия защиты отслеживали по тесту с нингидрином, если он был синим или коричнево-красным, реакция была завершена. Затем смолу промывали ДМФ (60 мл) .
- 4) Этапы 2 и 3 повторяли для аминокислот: (3–13 в таблице ниже).
- 5) Сочетание для соединения: Раствор соединения 4 (2,87 г, 2,00 экв.), ДИК (0,76 г, 2,00 экв.) и НОВт (0,82 г, 2,00 экв.) в ДМФ (30 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂ в течение 60 мин при 15 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (60 мл) .
- 6) Повторяли этап 3 для снятия защиты Fmoc.
- 7) Этапы 5 и 6 повторяли для аминокислот (10–13 в таблице ниже).
- 8) Ацетилирование: Раствор 10 % Ac₂O/5 % NMM/85 % ДМФ (60 мл) добавляли в смолу и барботировали смесь N₂ в течение 20 мин. Реакцию ацетилирования отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (60 мл) с получением промежуточного соединения 5a.
- 9) 3 % гидразин в ДМФ (60 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂ в течение 15 мин для освобождения гидроксильной группы на соединении 4, а затем смолу промывали ДМФ (60 мл).

ТАБЛИЦА 1. Перечень аминокислот и соответствующие реагенты, используемые на SPPS

№	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(O <i>t</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	Промежуточное соединение 4 (2,00 экв.)	ДИК (2,00 экв.) и НОВт (2,00 экв.)
10	Fmoc-Trp-OH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и НОВт (3,00 экв.)
11	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и НОВт (3,00 экв.)
12	Fmoc-Cys(Trt)-OH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и НОВт (3,00 экв.)
13	Fmoc-Asp(O <i>t</i> Bu)-OH (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.) и НОВт (3,00 экв.)
14	Ацетилирование	As ₂ O/NMM/ДМФ (10/5/85, 60 мл)
15	3-(2-(проп-2-ин-1-илокси)этокси)пропановая кислота (3,00 экв.)	ДИК (3,00 экв.), НОВт (3,00 экв.) и ДМАП (3,00 экв.)

[349] Расщепление и очистка пептида:

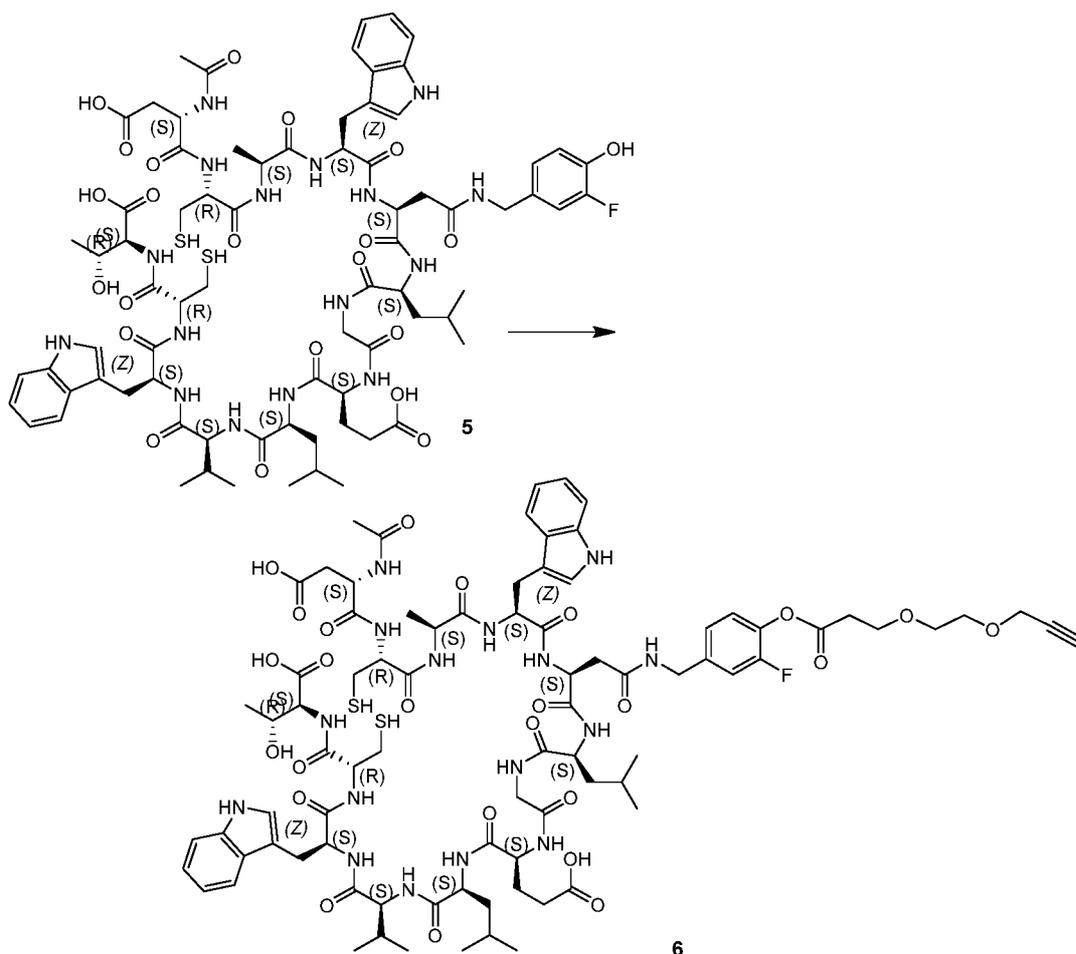
- 1) Буфер для расщепления (95 % ТФУ/2,5 % ТИС/2,5 % Н₂О, 60,0 мл) добавляли в колбу, содержащую смолу пептида с защищенными боковыми цепями, при комнатной температуре и перемешивали в течение 1 ч.
- 2) Фильтрат собирали.
- 3) Пептид осаждали холодным изопропиловым эфиром (300 мл) и центрифугировали (3 мин при 3000 об/мин).

4) Изопропиловый эфир дополнительно промывали два раза, а неочищенный пептид сушили в вакууме в течение 2 ч.

5) Соединение 5а (4,2 г, неочищенное) получали в виде белого твердого вещества.

ПРИМЕР 3. Сочетание соед. 5а с этокси-содержащим линкером

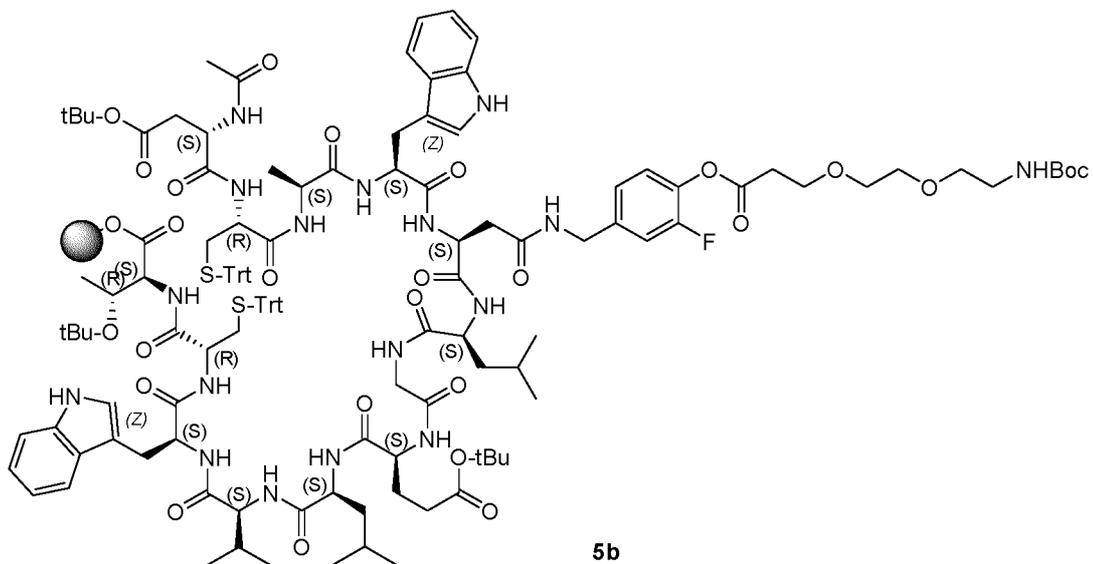
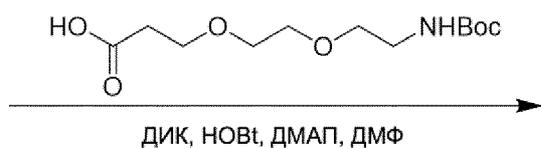
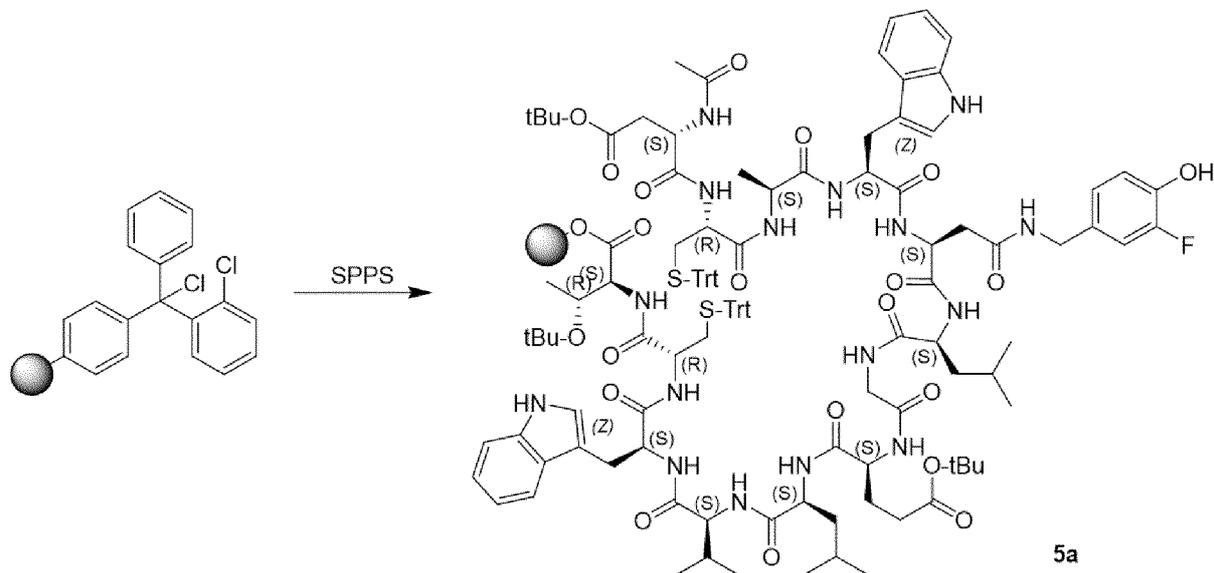
[350] Следуя этапу 9 выше, когда пептид все еще связан с твердофазной подложкой, или после расщепления и очистки пептида линкер 3-(2-(проп-2-ин-1-илокси)этокси)этиловый линкер можно сочетать с 5. Раствор 3-(2-(проп-2-ин-1-илокси)этокси)пропановой кислоты (1,54 г, 9,0 ммоль, 3,00 экв.), ДИК (1,13 г, 3,00 экв.), НОВт (1,23 г, 3,00 экв.) и ДМАП (1,10 г, 3,00 экв.) добавляли в смолу и барботировали смесь N₂ в течение 36 ч. Реакцию сочетания отслеживали посредством ЖХМС, после мини-расщепления практически 50 % соответствовало необходимой МС. Затем смолу промывали ДМФ (60 мл), MeOH (60 мл), а затем сушили в вакууме.

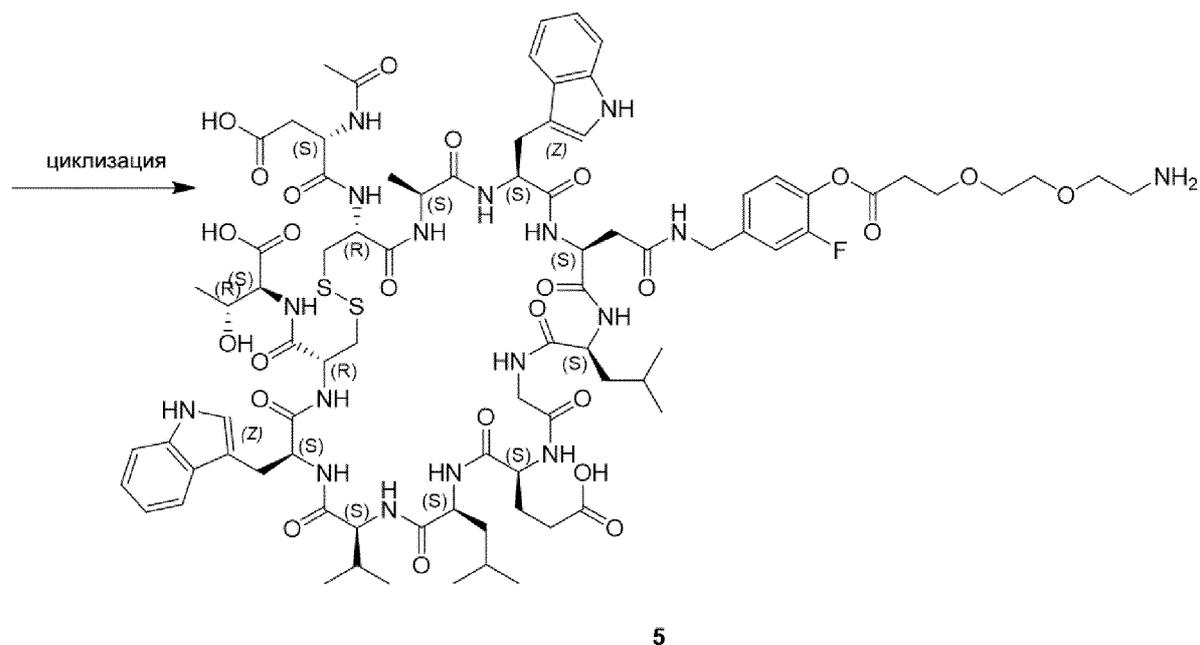
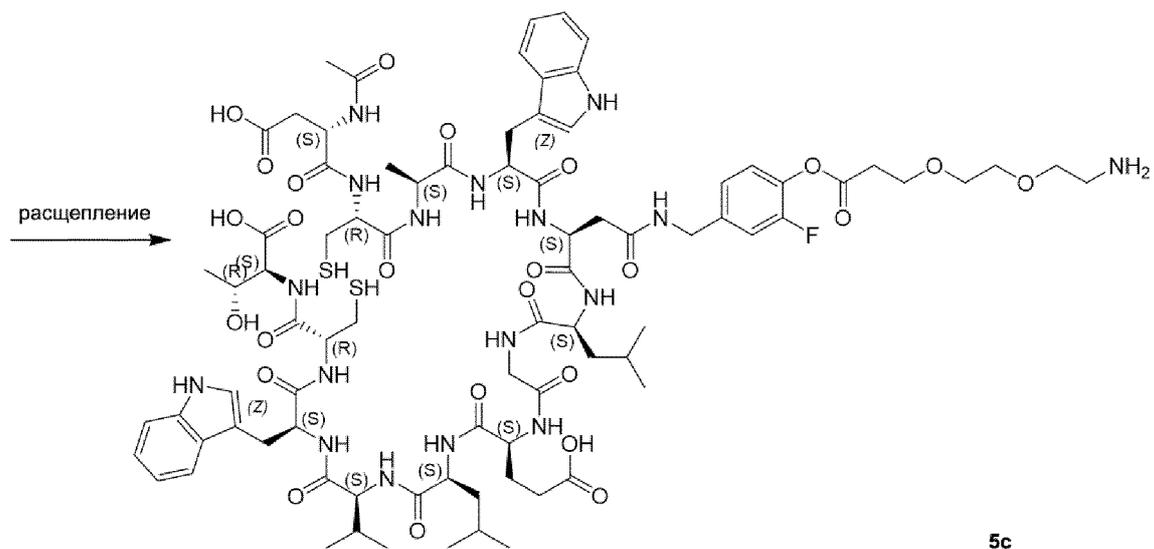


ПРИМЕР 4. Процедура для получения ММАЕ1/соединения 1100

[351] Полная схема реакции для получения соединения 1100 показана на Фиг. 4

А. Получение промежуточного соединения 5





[352] Промежуточное соединение 5a получают, используя этапы получения смолы (1), сочетания (2) и снятия защиты (3) из примера 1.

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

4) Ацетилирование: В смолу добавляли раствор $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NMM}/\text{DMF}$ (10/5/85, об./об./об., 2 л) и барботировали смесь N_2 в течение 20 мин. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, который был бесцветным, что указывает на то, что сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (2 л) с получением **промежуточного соединения 5a**.

5) 3 % гидразин в ДМФ (2 л) добавляли в смолу с барботированием N₂ в течение 15 мин для освобождения гидроксильной группы на **промежуточном соединении 5a**, а затем смолу промывали ДМФ (2 л).

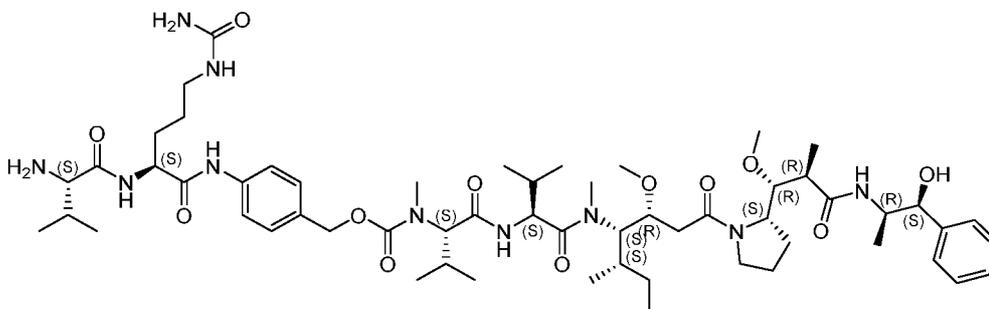
6) Сочетание с фенолом: Раствор Вос-NH-PEG₂-CH₂CH₂COOH (55,4 г, 200,0 ммоль, 2,00 экв.), ДИК (25,2 г, 200,0 ммоль, 2,00 экв.), НОВт (27,0 г, 200,0 ммоль, 2,00 экв.) и ДМАП (12,2 г, 200,0 ммоль, 2,00 экв.) добавляли в смолу и барботировали смесь N₂ в течение 36 ч. Реакцию сочетания отслеживали посредством ЖХМС, после мини-расщепления практически 70 % соответствовало необходимой МС. Затем смолу промывали ДМФ (2 л), MeOH (2 л) и сушили при пониженном давлении с получением **промежуточного соединения 5b** (смола СТС, 100,0 ммоль).

[354] Расщепление и циклизация пептида:

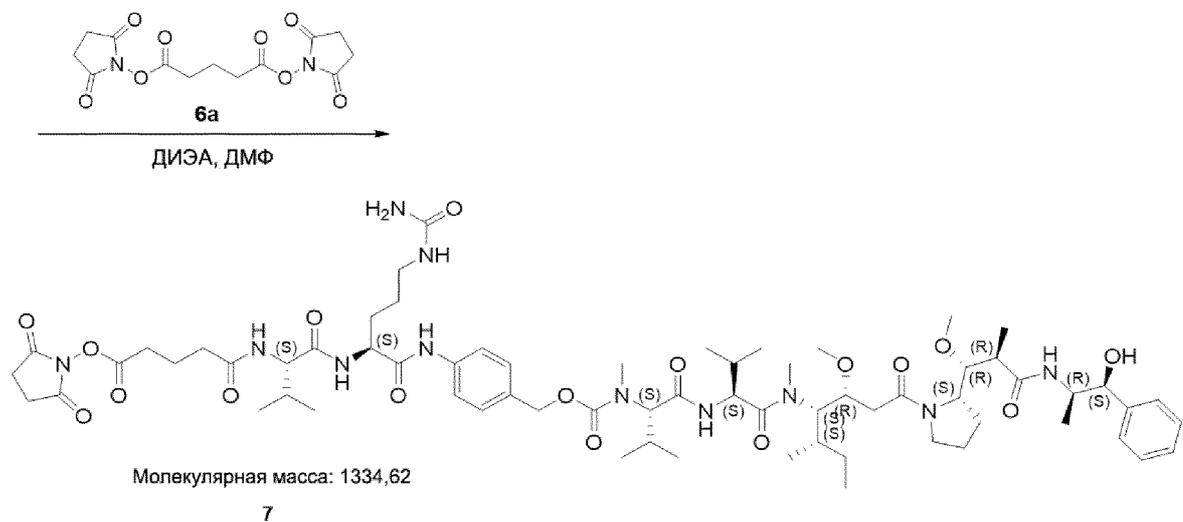
1) Расщепление: Раствор для расщепления (ТФУ/Tis/H₂O, 95/2,5/2,5, об./об./об., 2 л) добавляли в колбу, содержащую пептид с защищенными боковыми цепями, при комнатной температуре и перемешивали в течение 1 ч. После фильтрации фильтрат осаждали изопропиловым эфиром (холодный, 10 л). После фильтрации твердое вещество промывали изопропиловым эфиром (холодный, 1 л) еще два раза и сушили при пониженном давлении в течение 2 ч с получением **промежуточного соединения 5c** (140,5 г, неочищенное) в виде белого твердого вещества.

2) Циклизация: В смесь неочищенного пептида (**промежуточное соединение 5c**) в НОAc/MeCN/H₂O (4/3/3, об./об./об., 80 л) каплями добавляли 0,1 М I₂/AcOH до стойкого желтого цвета, затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 5 мин. Смесь гасили 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 **5** (22,0 г, 93,3 % чистота, 12,0 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 0,907 мин, МС рассчит.: M_{av} = 1833,02, полученная масса: [M + H]⁺ = 1833,81, [M + 2H]²⁺ = 917,00.

В. Получение промежуточного соединения 7

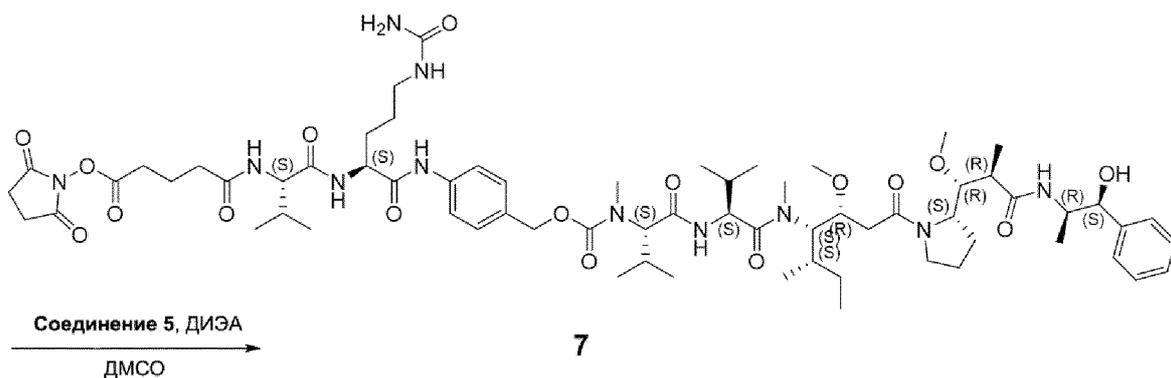


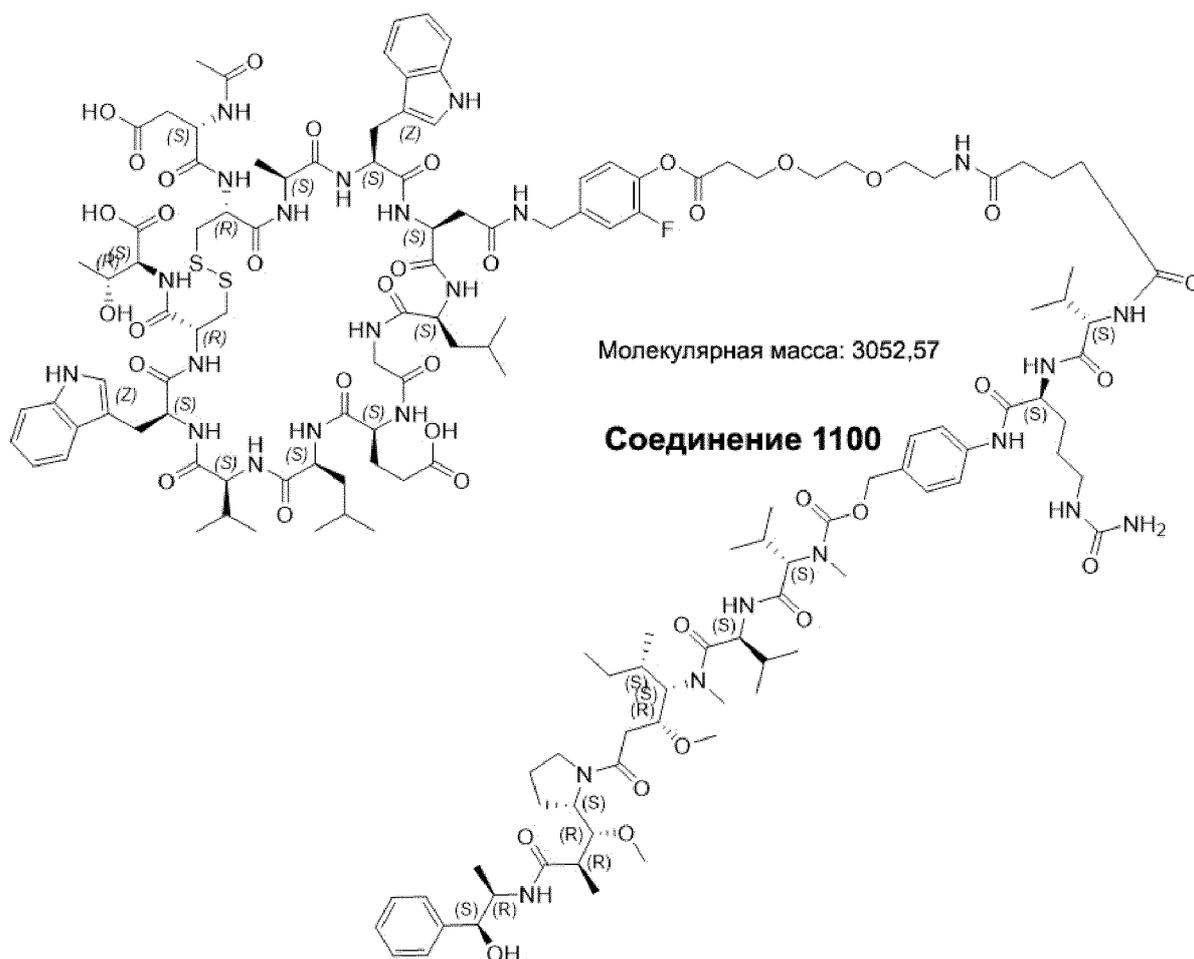
6



[355] Смесь **промежуточного соединения 6** (500,0 мг, 44,5 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (11,5 мг, 89,0 мкмоль, 2,00 экв.) в ДМФ (10,0 мл) каплями добавляли в раствор **соединения 6a** (700,0 мг, 2,15 ммоль, 4,80 экв.) в ДМФ (10,0 мл) при 0 °С. Смесь перемешивали при 20 °С в течение 10 мин. ЖХМС показала, что исходный материал был полностью израсходован. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) напрямую с получением **соединения 7** (490,0 мг, 36,8 мкмоль, 82,6 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 0,942 мин, МС расчит.: $M_{av} = 1334,6$, $[M + 2H]^{2+} = 668,3$.

С. Получение соединения 1100





[356] В раствор промежуточного соединения **5** (14,42 мг, 7,87 мкмоль, 1,05 экв.), промежуточного соединения **7** (10 мг, 7,49 мкмоль, 1,00 экв.) в ДМСО (500 мкл) добавляли ДИЭА (4,84 мг, 37,46 мкмоль, 6,53 мкл, 5,00 экв.). Затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. ЖХМС показала, что промежуточное соединение **7** было полностью израсходовано, а один главный пик соответствовал необходимому *m/z*. Реакционную смесь фильтровали, а фильтрат очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) напрямую с последующей лиофилизацией с получением соединения **1100** (9,7 мг, 3,18 мкмоль, 42,4 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,16 мин, MC рассчит.: $M_{av} = 3052,53$, $[M + 2H]^{2+} = 1526,5$.

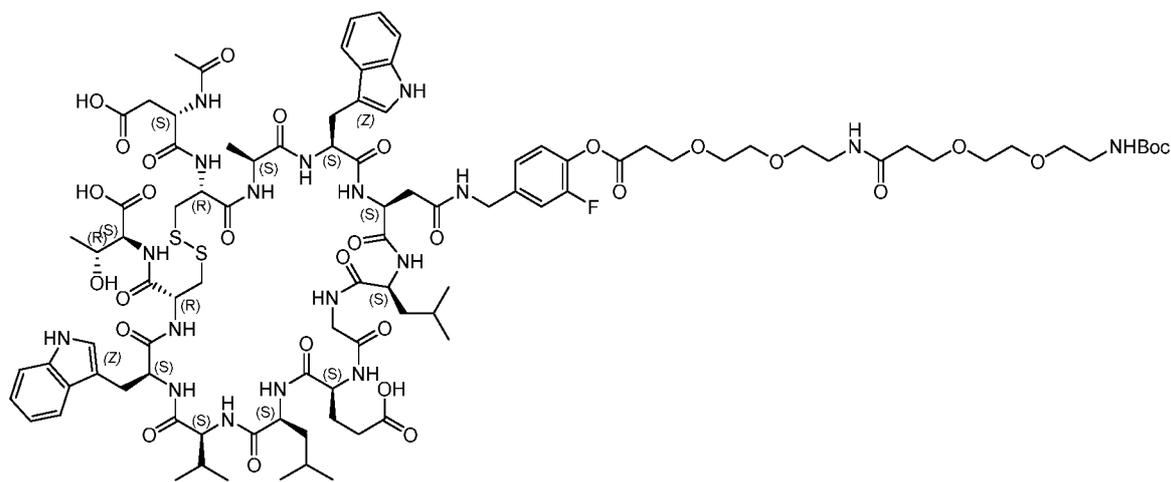
ПРИМЕР 5. Процедура для получения соединения **1101**

[357] Полная схема реакции для получения соединения **1101** показана на Фиг. 5.

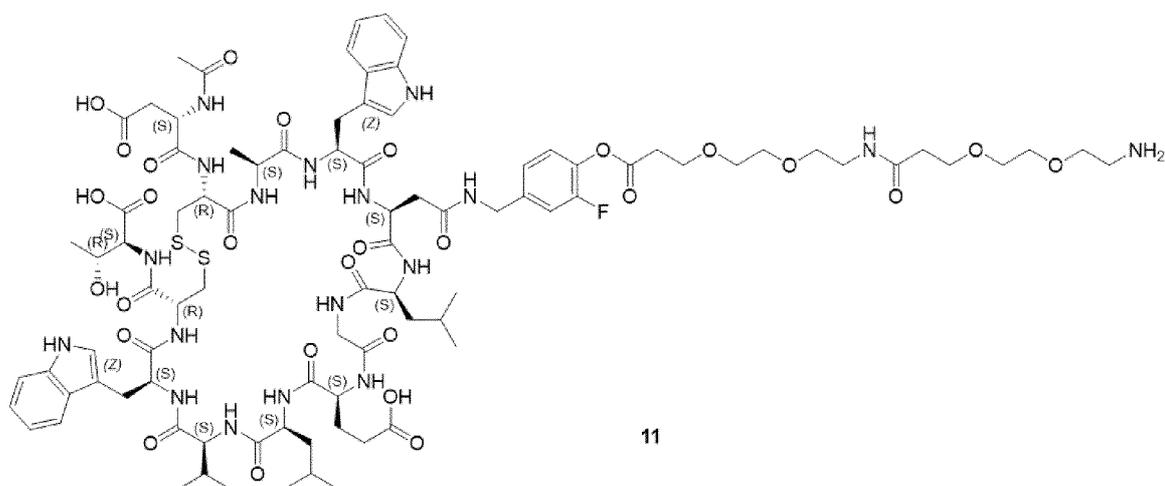
А. Получение промежуточного соединения **9**

флэш-колонка SepaFlash® C18, элюент 0–90 % градиента MeCN/H₂O при 75 мл/мин) напрямую с получением **промежуточного соединения 10** (200,0 мг, 95,59 мкмоль, 58,40 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,05 мин, МС расчит.: M_{av} = 2092,32, [M + 2H]²⁺ = 1046,60.

С. Получение промежуточного соединения 11



10



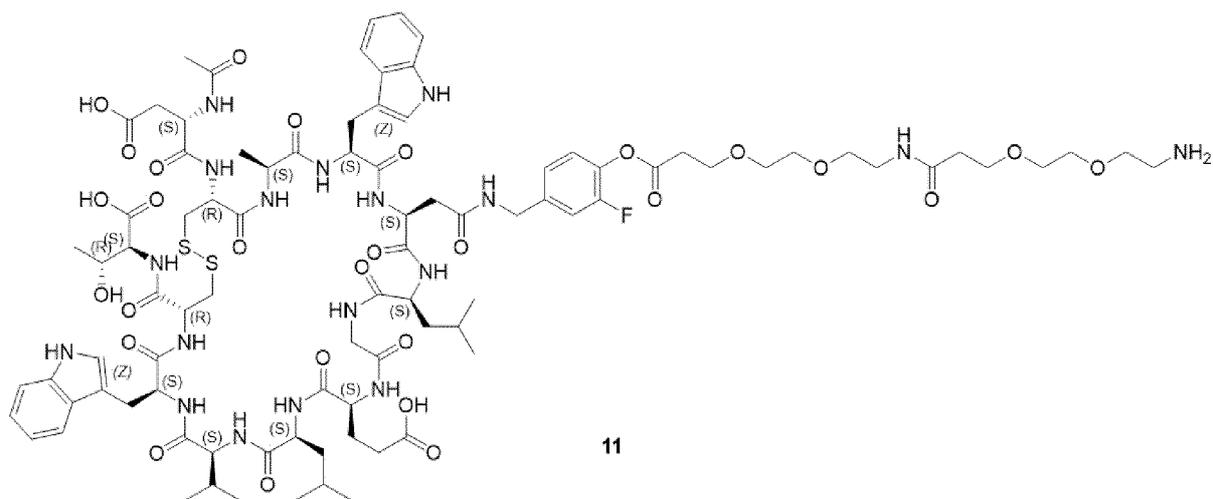
11

[360] Смесь **промежуточного соединения 10** (200,0 мг, 95,59 мкмоль, 1,00 экв.) в ТФУ/ДХМ (3/7, 4 мл) перемешивали при 0 °С в течение 0,5 ч. ЖХМС показала, что **промежуточное соединение 10** было полностью израсходовано, и что главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) напрямую с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 11** (120,0 мг, 60,23 мкмоль, 63,0 %

выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 0,95 мин, МС расчит.: $M_{av} = 1992,20$, $[M + 2H]^{2+} = 996,60$.

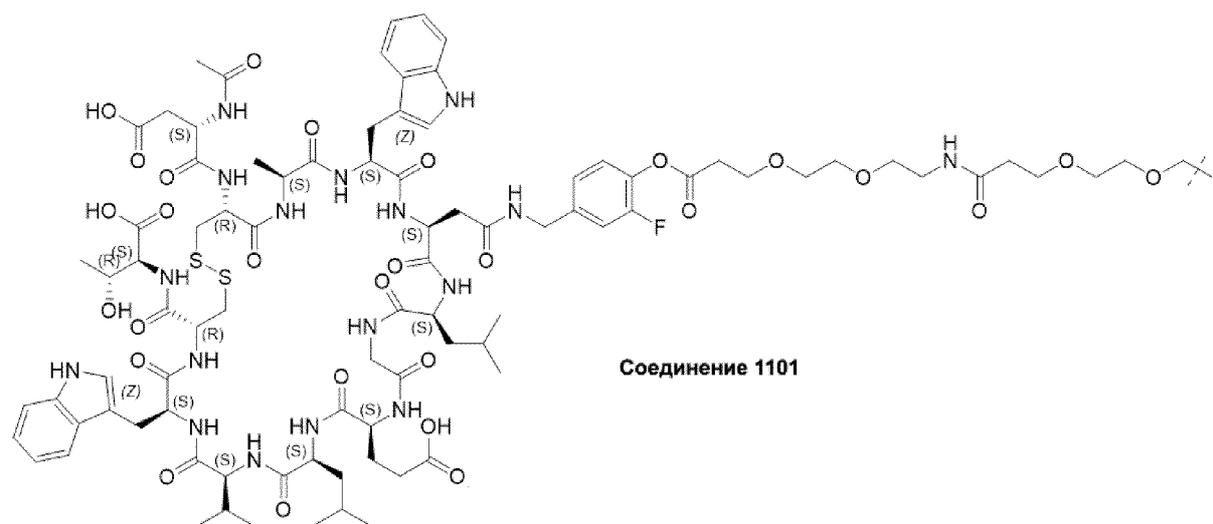
D. Получение соединения 1101

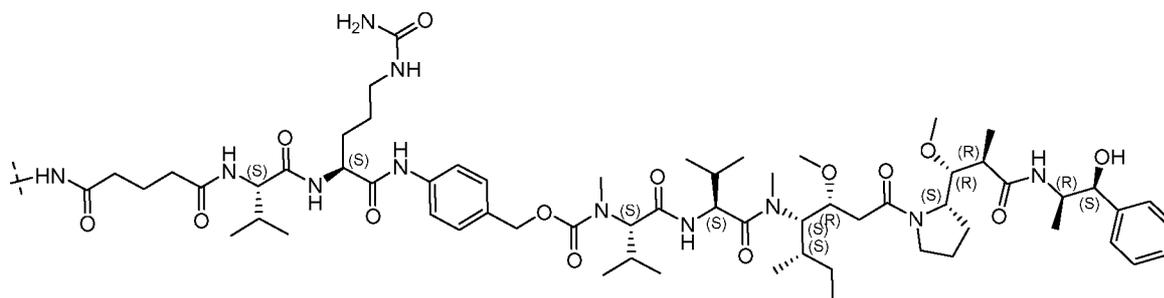
[361] Структура соединения 1101 разбита на две части. Пунктирные линии показывают ковалентную связь, которая является общей между верхней и нижней частью структуры 1101.



промежуточное
соединение 7, ДИЭА

DMCO



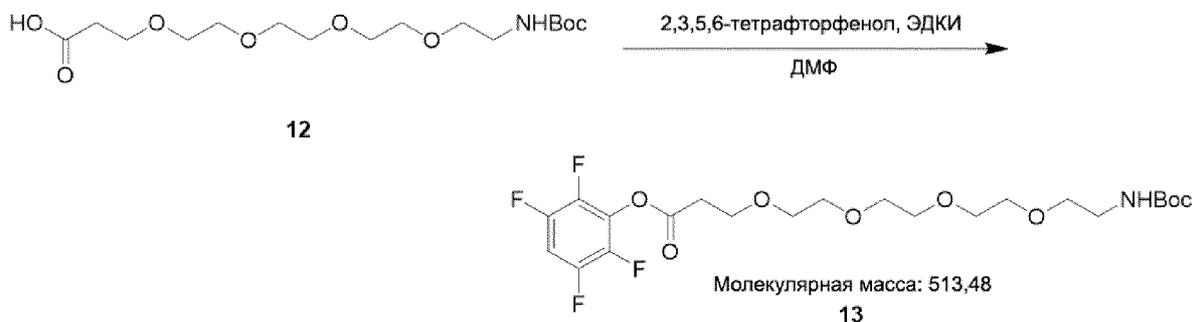


[362] В смесь **промежуточного соединения 11** (29,85 мг, 14,99 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (9,68 мг, 74,93 мкмоль, 13,05 мкл, 5,00 экв.) в ДМСО (1,0 мл) добавляли **промежуточное соединение 7** (20,0 мг, 14,99 мкмоль, 1,00 экв.) при 20 °С. Затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. ЖХМС показала, что **промежуточное соединение 7** было полностью израсходовано, а один главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) с получением **соединения 1101** (22,8 мг, 98,6 % чистота, 47,3 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,10 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 3211,71$, $[M + 2H]^{2+} = 1606,50$.

ПРИМЕР 6. Процедура для получения соединения 1102

[363] Полная схема реакции для получения соединения 1102 показана на Фиг. 6.

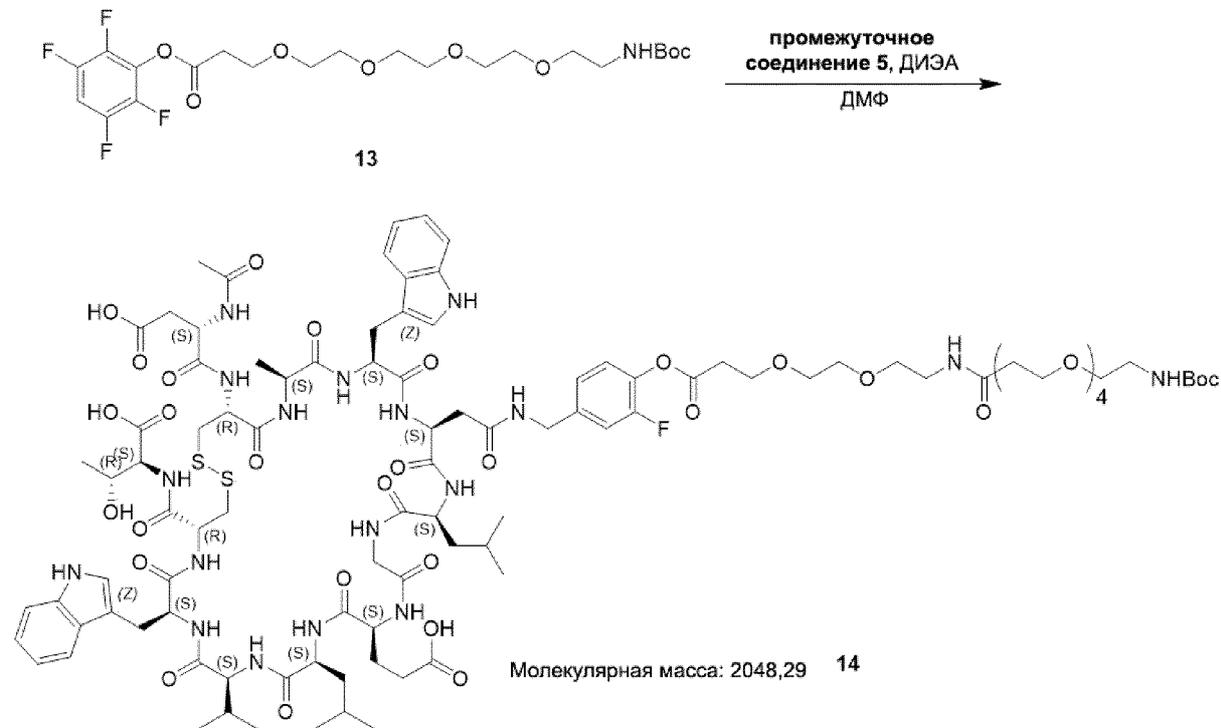
Получение промежуточного соединения 13



[364] В раствор **промежуточного соединения 12** (0,50 г, 1,37 ммоль, 1,00 экв.) в ДМФ (3 мл) добавляли **2,3,4,6-тетрафторфенол** (568,09 мг, 3,42 ммоль, 2,50 экв.), ЭДКИ (393,46 мг, 2,05 ммоль, 1,50 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 16 ч. ЖХМС показала, что **промежуточное соединение 12** было полностью израсходовано, а один главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной флэш-хроматографии (C18, условия ТФУ) с получением **промежуточного соединения 13** (0,625 г, 1,22 ммоль, 88,96 % выход) в виде желтого масла. ЖХМС: RT = 1,16 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 513,48$, $[M +$

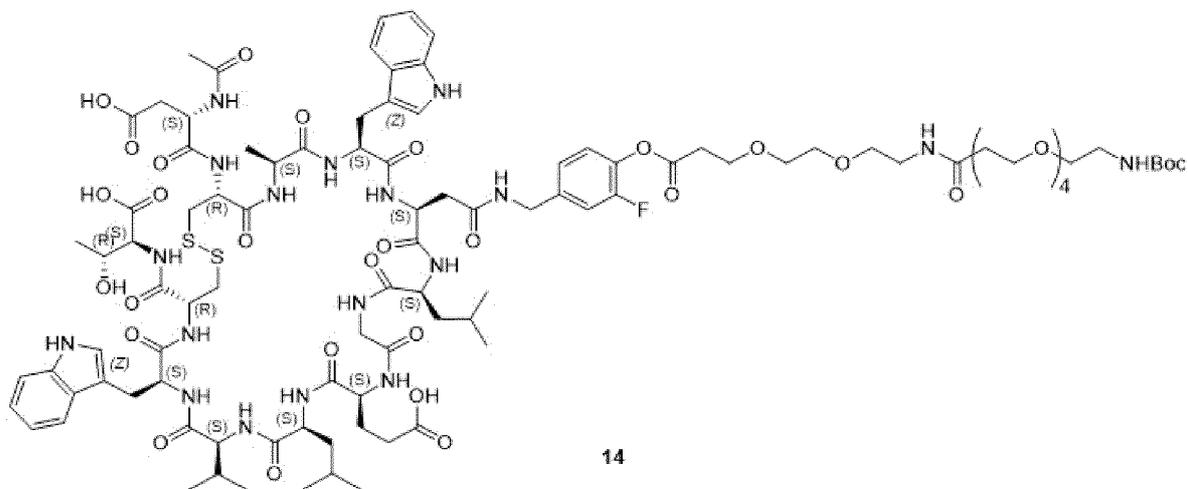
$Na]^+ = 536,1$, $[M + H]^+ = 514,1$.

Получение промежуточного соединения 14:

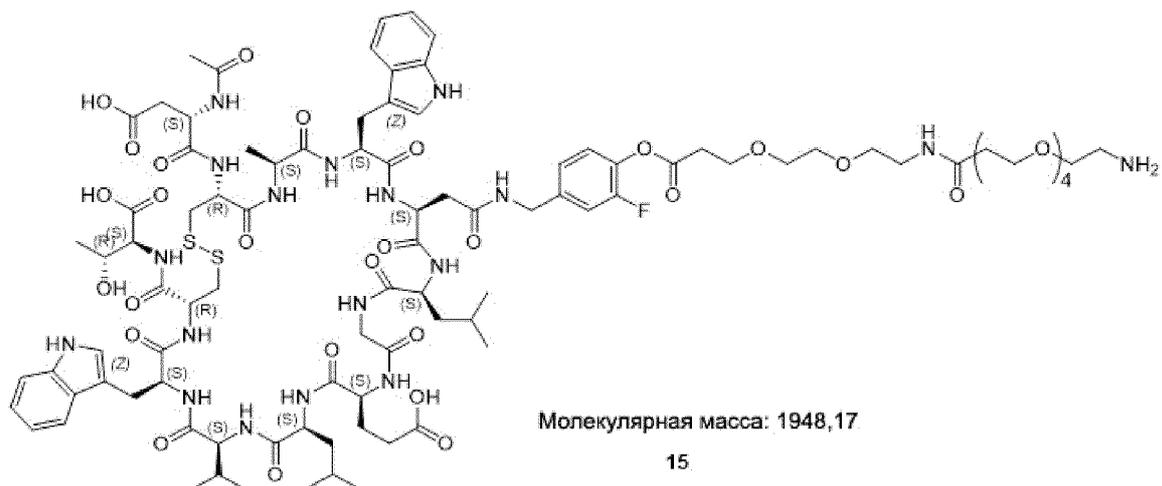


[365] Промежуточное соединение 5 (300,0 мг, 163,66 мкмоль, 1,00 экв.), промежуточное соединение 13 (9,25 мг, 212,76 мкмоль, 1,30 экв.), ДИЭА (105,76 мг, 818,32 мкмоль, 142,54 мкл, 5,00 экв.) в ДМСО (9 мл) перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. ЖХМС показала, что главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством флэш С18 (ISCO®; 120 г флэш-колонка SepaFlash® С18, элюент 0–90 % градиента MeCN/H₂O при 75 мл/мин) напрямую с получением промежуточного соединения 14 (200,0 мг, 86,22 мкмоль, 52,6 % выход, 94,0 % чистота) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,013 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 2180,42$, $[M - \text{Boc} + 2H]^+ = 1090,60$, $[M - \text{Boc} + 2H]^+ = 1040,50$.

Получение промежуточного соединения 15:

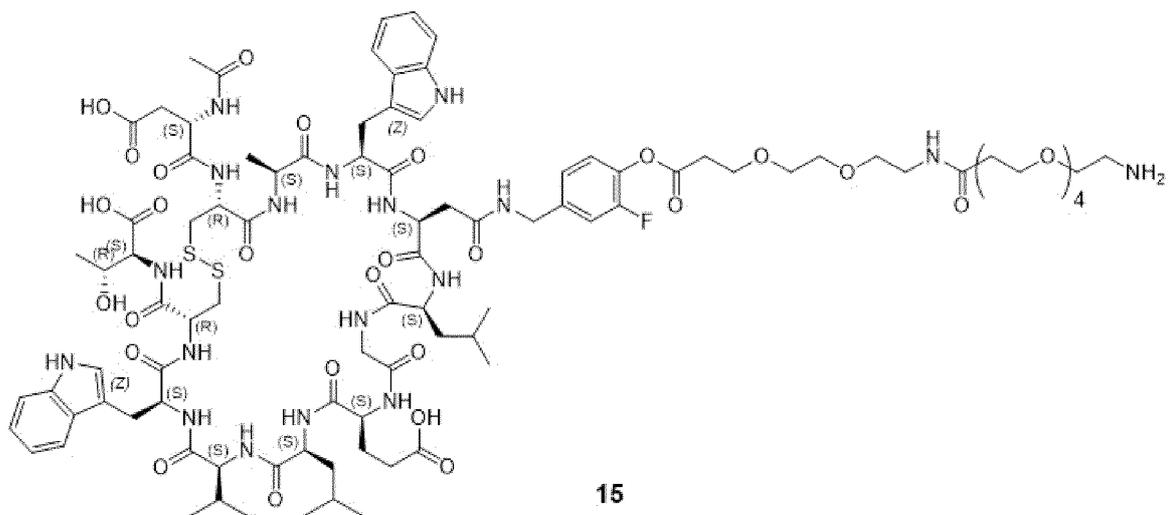


30% ТФУ/ДХМ
→



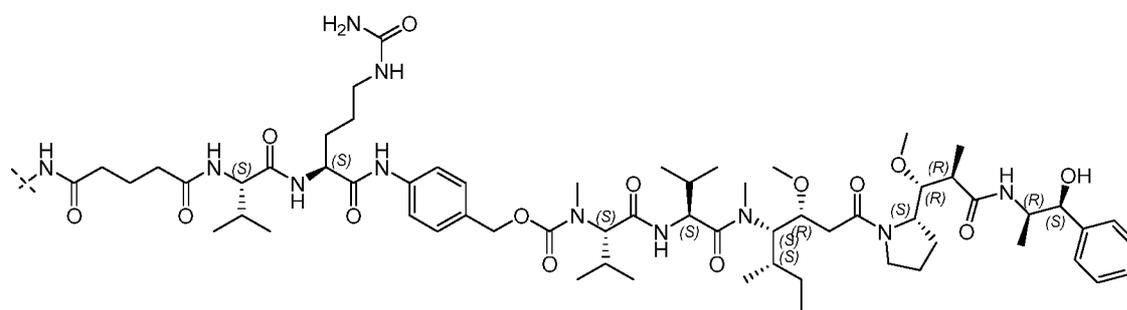
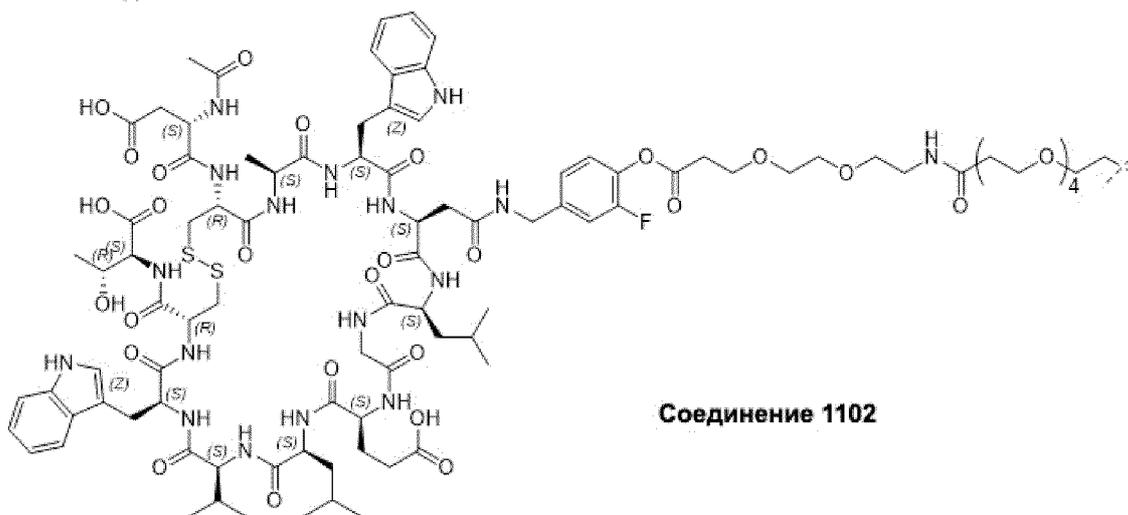
[366] Смесь **промежуточного соединения 14** (200,0 мг, 95,59 мкмоль, 1,00 экв.) в ТФУ/ДХМ (3/7, 4 мл) перемешивали при 0 °С в течение 0,5 ч. ЖХМС показала, что **промежуточное соединение 14** было полностью израсходовано, и что главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) напрямую с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 15** (150,0 мг, 68,36 мкмоль, 74,5 % выход, соль ТФУ) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 0,95 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 2080,31$, $[M + 2H]^{2+} = 1040,59$.

Получение соединения 1102:



промежуточное
соединение 7, ДИЭА

DMCO



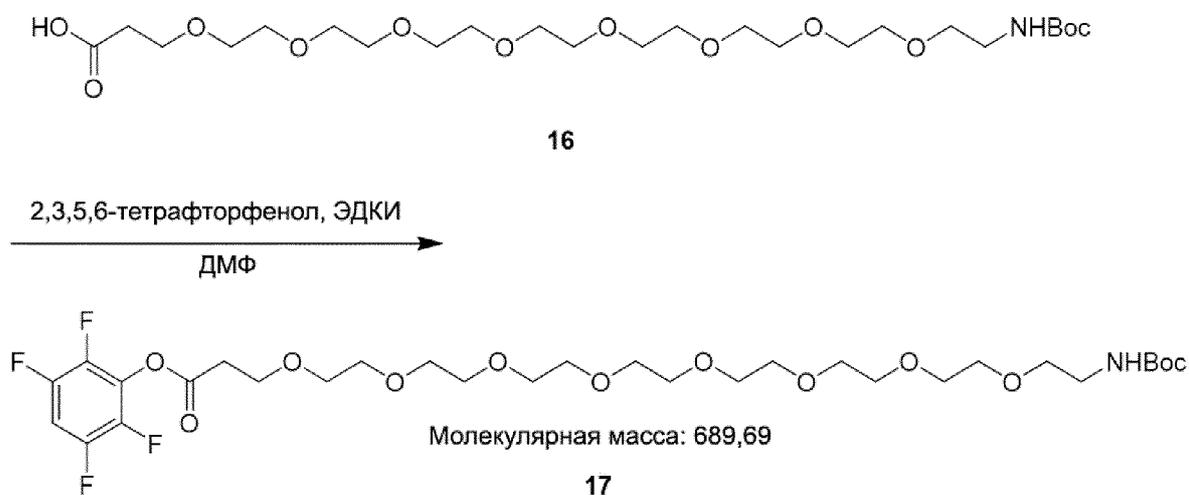
[367] В смесь **промежуточного соединения 15** (29,85 мг, 14,99 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (9,68 мг, 74,93 мкмоль, 13,05 мкл, 5,00 экв.) в ДМСО (1,0 мл) добавляли **промежуточное соединение 7** (20,0 мг, 14,99 мкмоль, 1,00 экв.) при 20 °С. Затем смесь перемешивали при 20 °С в

течение 1 ч. ЖХМС показала, что **промежуточное соединение 7** было полностью израсходовано, а один главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) с получением **соединения 1102** (30,5 мг, 98,6 % чистота, 63,2 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,10 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 3299,82$, $[M + 2H]^{2+} = 1650,41$, $[M + 3H]^{3+} = 1100,50$. Пунктирные линии в структуре соединения 1102 показывают одну ковалентную связь между верхней и нижней структурами.

ПРИМЕР 7. Процедура для получения соединения 1103

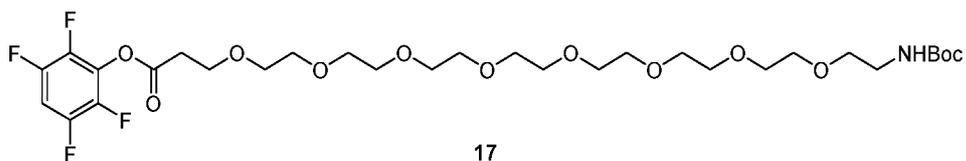
[368] Полная схема реакции для получения соединения 1103 показана на Фиг. 7.

Получение промежуточного соединения 17:



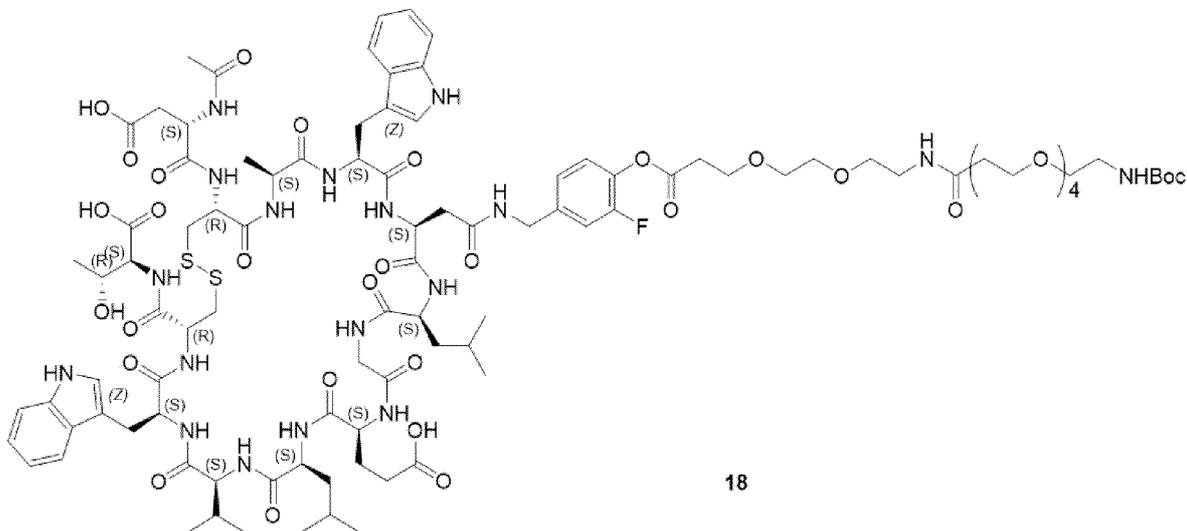
[369] В раствор **промежуточного соединения 16** (1,00 г, 1,85 ммоль, 1,00 экв.) в ДМФ (3 мл) добавляли **2,3,4,6-тетрафторфенол** (919,86 мг, 5,54 ммоль, 3,00 экв.), ЭДКИ (530,91 мг, 2,77 ммоль, 1,50 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 16 ч. ЖХМС показала, что **промежуточное соединение 16** было полностью израсходовано, а один главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной флэш-хроматографии (С18, условия ТФУ) с получением **промежуточного соединения 17** (1,10 г, 1,59 ммоль, 86,4 % выход) в виде бесцветного масла. ЖХМС: RT = 1,152 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 689,69$, $[M + H]^+ = 690,1$, $[M + Na]^+ = 707,2$.

Получение промежуточного соединения 18:



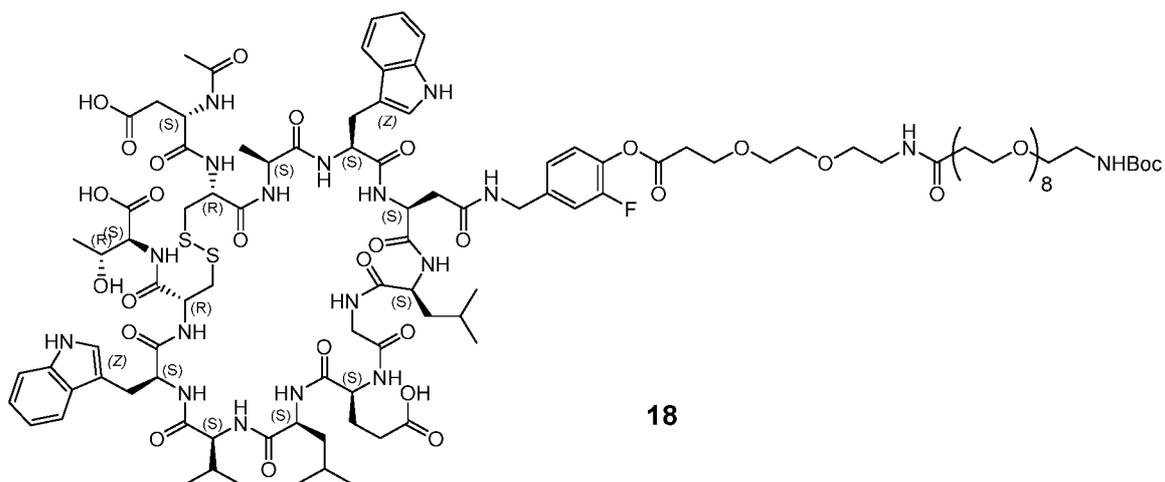
промежуточное соединение 5, ДИЭА

DMF

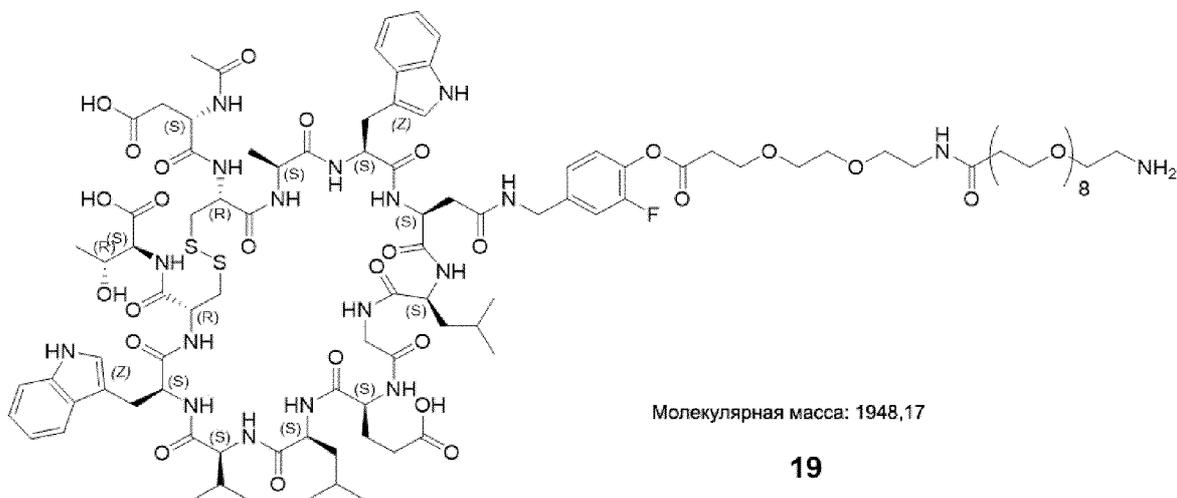


[370] Промежуточное соединение 5 (300,0 мг, 163,66 мкмоль, 1,00 экв.), промежуточное соединение 17 (112,8 мг, 163,66 мкмоль, 1,10 экв.), ДИЭА (105,76 мг, 818,32 мкмоль, 142,54 мкл, 5,00 экв.) в ДМСО (9 мл) перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. ЖХМС показала, что главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством флэш С18 (ISCO®; 120 г флэш-колонка SepaFlash® C18, элюент 0–90 % градиента MeCN/H₂O при 75 мл/мин) напрямую с получением промежуточного соединения 18 (200,0 мг, 84,87 мкмоль, 51,8 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,05 мин, МС расчит.: M_{av} = 2356,63, [M + 2H]²⁺ = 1179,10, [M – Boc + 2H]²⁺ = 1129,20.

Получение промежуточного соединения 19:

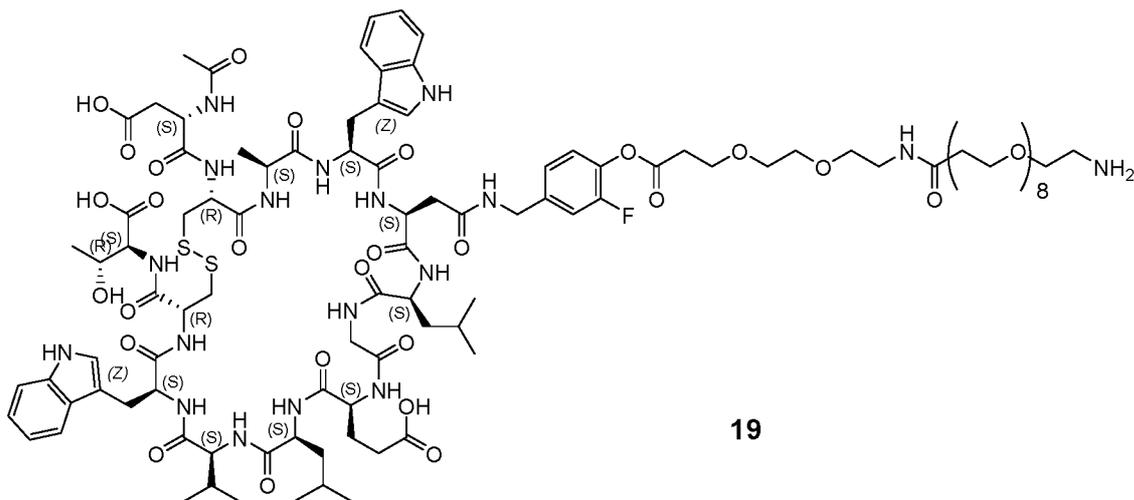


30% ТФУ/ДХМ



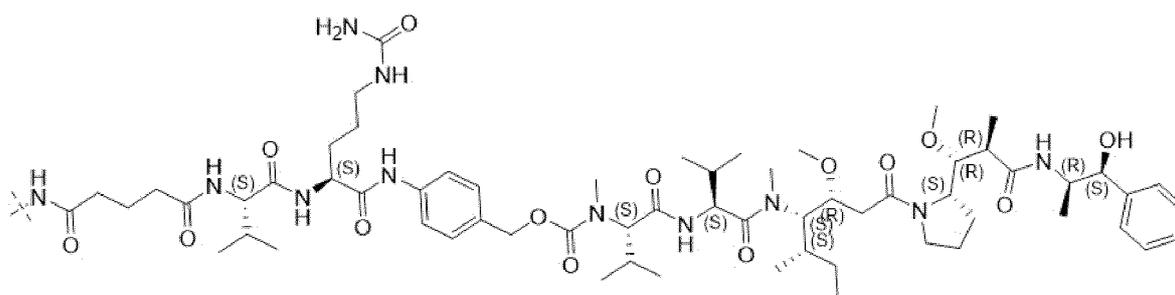
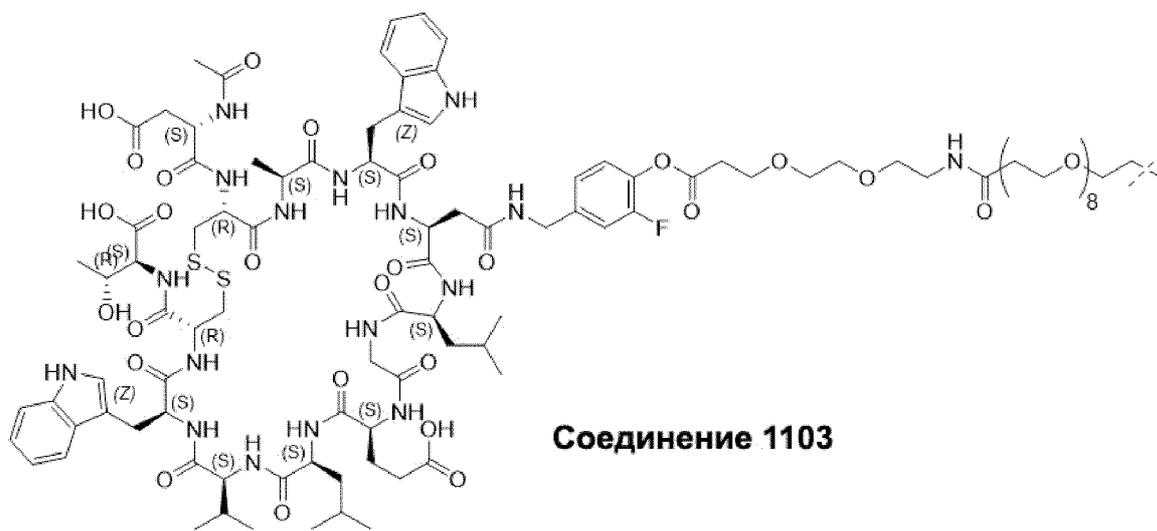
[371] Смесь **промежуточного соединения 18** (200,0 мг, 84,87 мкмоль, 1,00 экв.) в ТФУ/ДХМ (3/7, 4 мл) перемешивали при 0 °С в течение 0,5 ч. ЖХМС показала, что **промежуточное соединение 18** было полностью израсходовано, и что главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) напрямую с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 19** (160,0 мг, 67,50 мкмоль, 79,5 % выход, соль ТФУ) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 0,95 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 2256,52$, $[M + 2H]^{2+} = 1128,79$, $[M + 3H]^{3+} = 752,89$.

Получение соединения 1103:



промежуточное соединение 7, ДИЭА

DMCO



[372] В смесь **промежуточного соединения 19** (37,20 мг, 16,48 мкмоль, 1,10 экв.), ДИЭА (9,68 мг, 74,93 мкмоль, 13,05 мкл, 5,00 экв.) в ДМСО (1,0 мл) добавляли **промежуточное соединение 7** (20,0 мг, 14,99 мкмоль, 1,00 экв.) при 20 °С. Затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. ЖХМС показала, что **промежуточное соединение 7** было полностью израсходовано, а один главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) с получением **соединения 1103** (31,4 мг, 9,03 мкмоль, 60,2 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,09 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 3476,03$, $[M + 2H]^{2+} = 1738,51$, $[M + 3H]^{3+} = 1159,23$. Пунктирные линии в структуре соединения 1103 показывают одну ковалентную связь между верхней и нижней структурами.

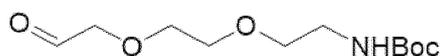
ПРИМЕР 8. Процедура для получения соединения 1104

[373] Полная схема реакции для получения соединения 1104 показана на Фиг. 8.

Получение промежуточного соединения 21



20



Молекулярная масса: 247,29

21

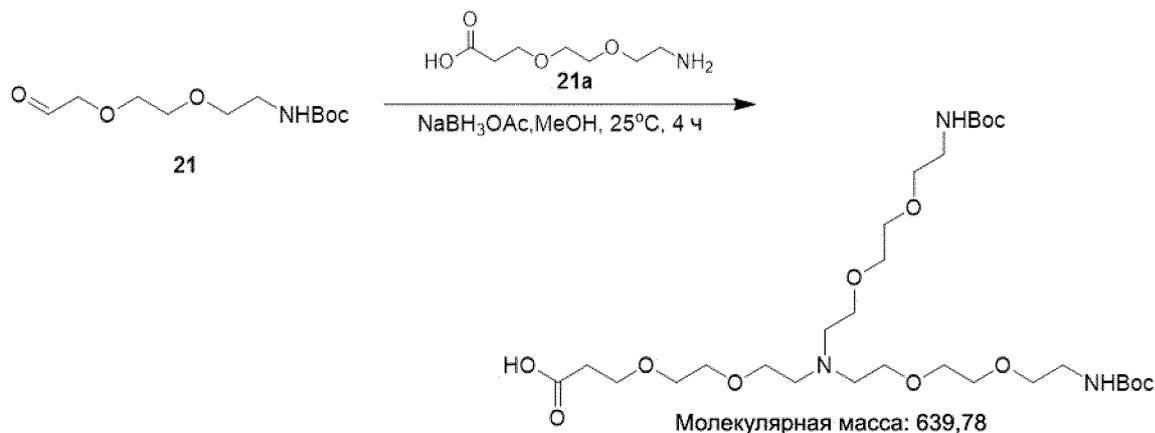
[374] В раствор ДМСО (7,84 г, 100 ммоль, 2,50 экв.) в ДХМ (150 мл) добавляли раствор оксалилхлорида (10,20 г, 80,2 ммоль, 2,00 экв.) в ДХМ (50 мл), затем реакционную смесь перемешивали при -70 °С в течение 10 мин, затем каплями добавляли раствор **промежуточного соединения 20** (10,0 г, 40,1 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (50 мл). После перемешивания при -70 °С в течение 50 мин добавляли ТЭА (32,5 г, 320 ммоль, 8,00 экв.), а реакционную смесь оставляли нагреваться до 20 °С и перемешивали в течение 15 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 10: 1, R_f = 0,48) показала, что реагент был полностью израсходован и образовалось одно новое пятно.

Реакционную смесь гасили Н₂О (50 мл), водную фазу экстрагировали ДХМ (300 мл).

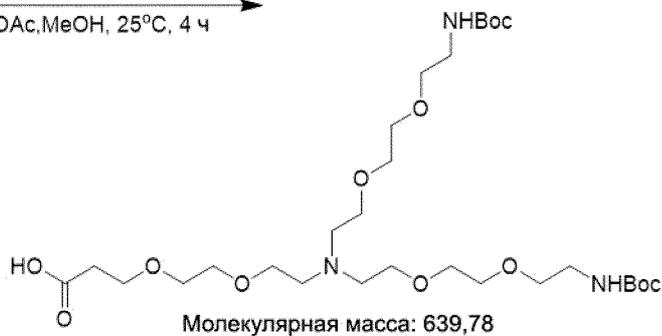
Объединенные органические слои промывали солевым раствором (300 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток

очищали посредством силикагелевой колонки (ДХМ/EtOAc от 95/5 до 50/50) с получением **промежуточного соединения 21** (5,10 г, 20,6 ммоль, 51,4 % выход) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-*d*) δ м. д. 9,71–9,77 (м, 1 Н) 3,39–3,90 (м, 8 Н) 3,25–3,36 (м, 2 Н) 1,40–1,52 (м, 9 Н).

Получение промежуточного соединения 22:



21

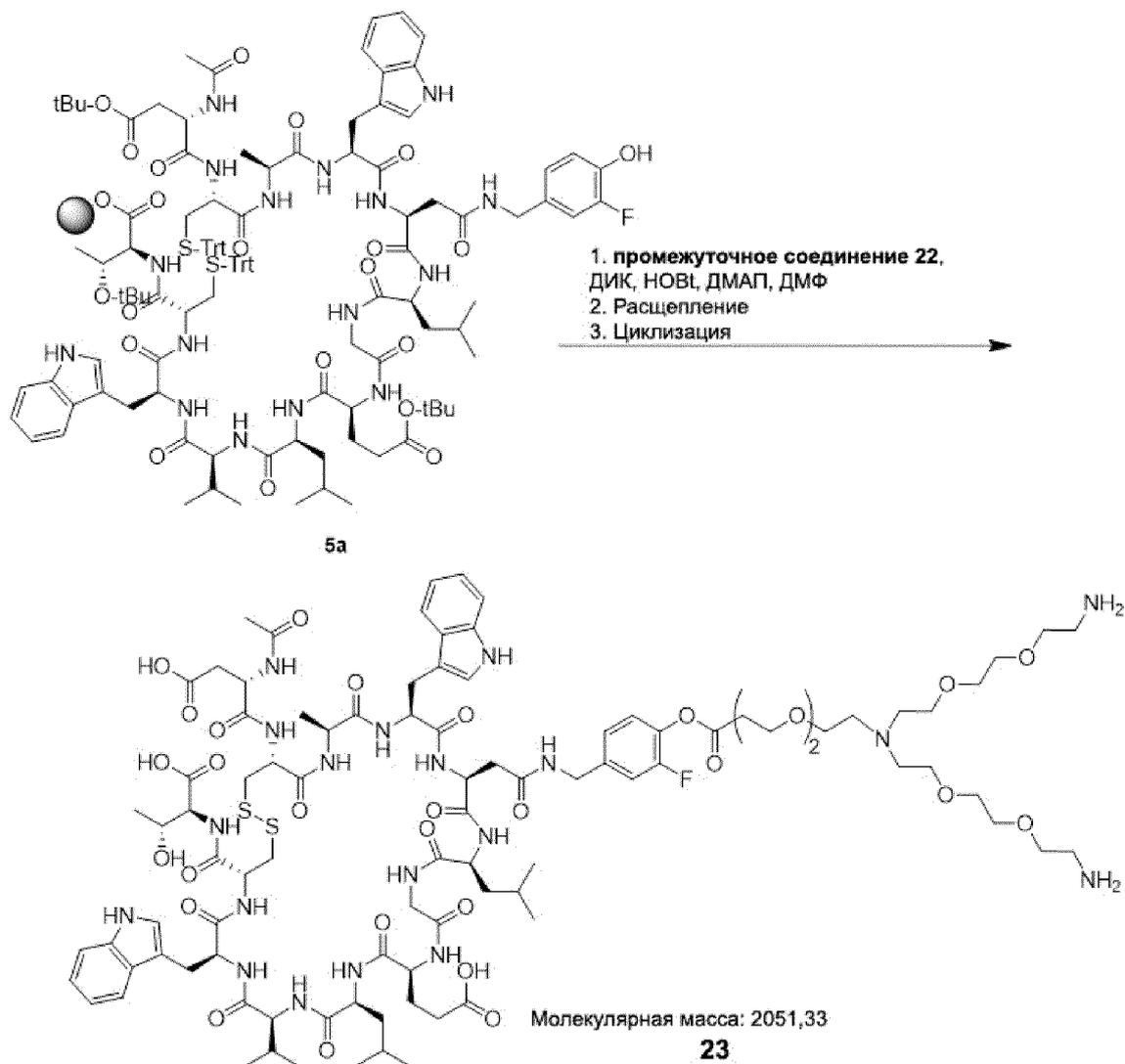


Молекулярная масса: 639,78

22

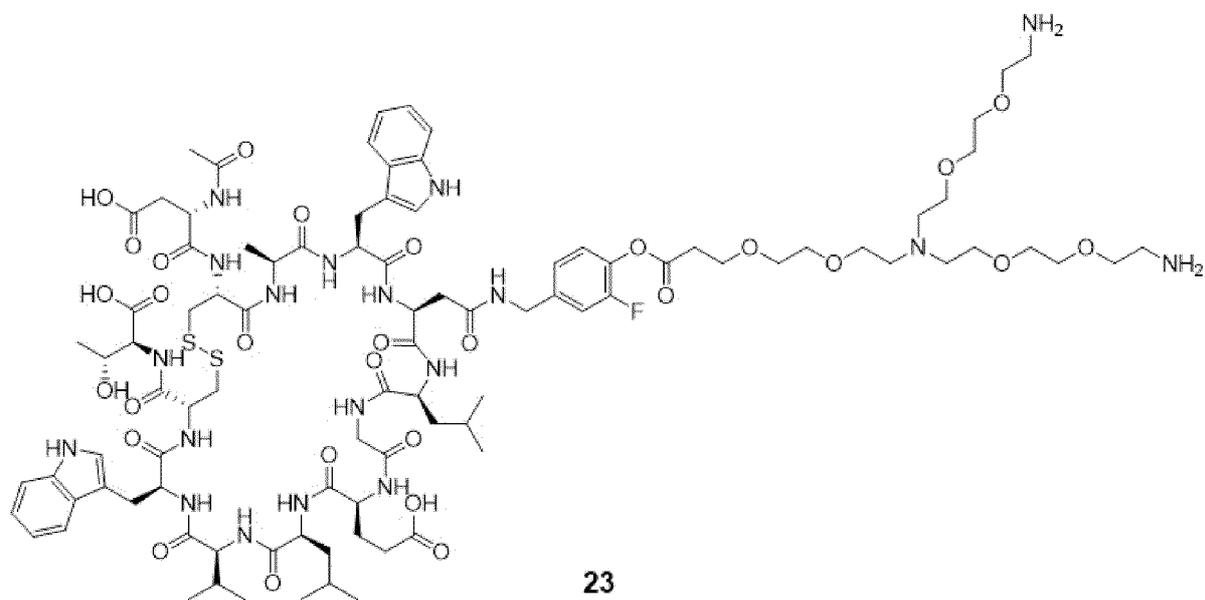
[375] В раствор **промежуточного соединения 21** (5,02 г, 20,3 ммоль, 1,00 экв.), **промежуточного соединения 21a** (1,20 г, 6,77 ммоль, 0,40 экв.) в MeOH (40 мл) медленно добавляли NaBH₃OAc (2,15 г, 10,2 ммоль, 0,60 экв.) при 20 °С. После добавления реакцию смесь перемешивали при 20 °С в течение 4 ч. ЖХМС показала необходимую МС. Реакционную смесь каплями гасили H₂O (10 мл). После фильтрации фильтрат концентрировали. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (колонка: Welch Ultimate XB-C18 250 * 50 мм, 10 мкм, 120А + Welch Ultimate 250 * 50 мм, 10 мкм, 120 А; подвижная фаза: [вода (0,1 % ТФУ) – АЦН]; В %: 24 %–54 %, 24 мин) с получением **промежуточного соединения 22** (0,80 г, 1,25 мкмоль, 18,5 % выход) в виде желтого масла. ЖХМС: RT = 0,833 мин, МС рассчит.: M_{ов} = 639,78, [M + H]⁺ = 640,5. ¹H ЯМР (400 МГц, оксид дейтерия) δ м. д. 7,87 (с, 1 Н) 7,37 (шир. д, J = 7,53 Гц, 1 Н) 3,79–3,91 (м, 4 Н) 3,70–3,79 (м, 4 Н) 3,60–3,70 (м, 12 Н) 3,45–3,58 (м, 8 Н) 2,99–3,40 (м, 6 Н) 2,59 (т, J = 5,52 Гц, 2 Н) 1,36 (с, 18 Н).

Получение промежуточного соединения 23 (связанный со смолой пептид с защищенными боковыми цепями):



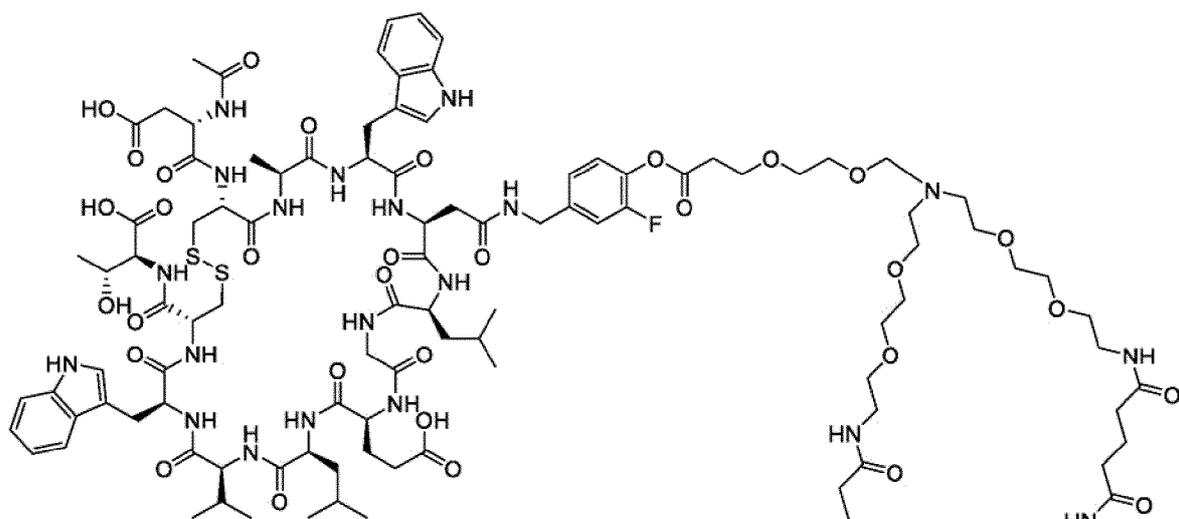
[376] Промежуточное соединение **23** синтезировали, следуя процедуре, описанной в разделе **[0008]-[0009]**, (стр. 3–5), путем обработки промежуточного соединения **22**. 0,50 ммоль смолы СТС дало промежуточное соединение **23** (20,0 мг, 91,4 % чистота, 2,0 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,61 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 2095,37$, $[M + H]^+ = 2095,0$, $[M + 2H]^{2+} = 1048,47$.

Получение КР-0002645/соединения 1104:

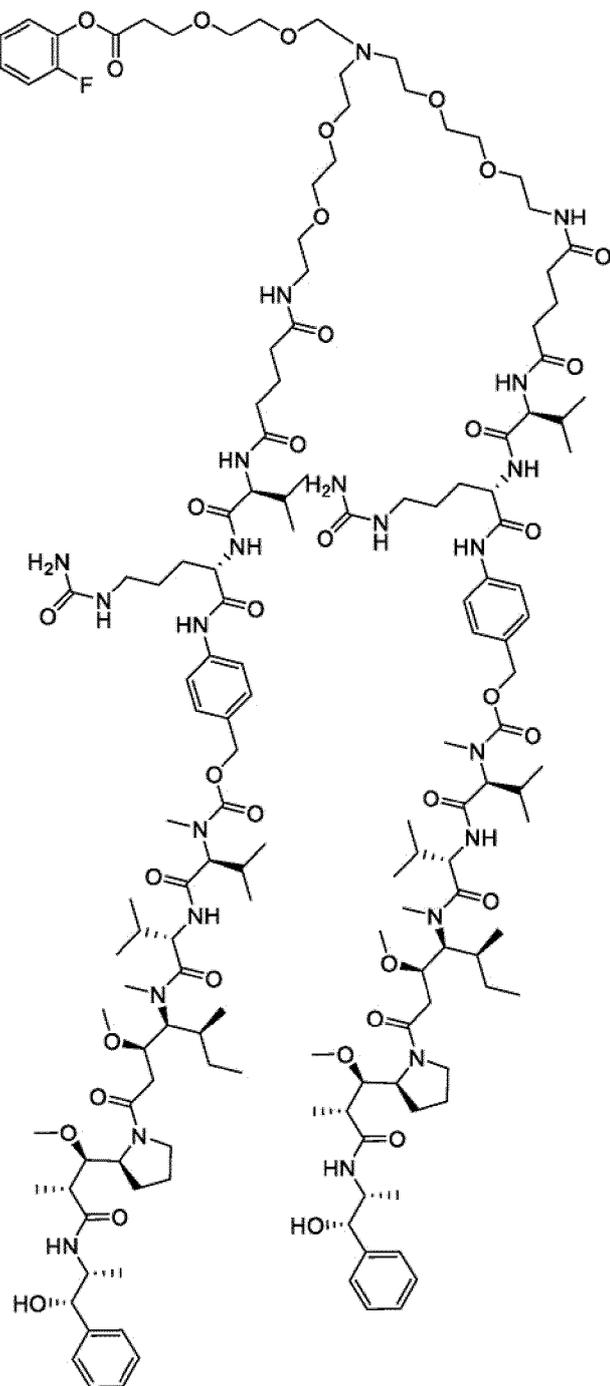


промежуточное
соединение 7, ДИЗА

DMCO



Соединение 1104

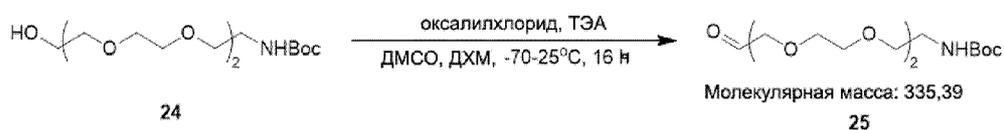


[377] В раствор **промежуточного соединения 23** (17,0 мг, 8,11 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (40,49 мг, 81,13 мкмоль, 14,3 мкл, 10,00 экв.) в ДМСО (500 мкл) добавляли **промежуточное соединение 7** (21,66 мг, 16,23 мкмоль, 2,00 экв.) при 20 °С. Затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. ЖХМС показала полный расход реагента, а один главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) с получением **соединения 1104** (9,1 мг, 1,95 мкмоль, 97,2 % чистота, 24,0 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,092 мин, МС рассчит.: $M_{ov} = 4534,39$, $[M + 3H]^{3+} = 1511,90$, $[M + 4H]^{4+} = 1134,10$.

ПРИМЕР 9. Процедура для получения соединения 1105.

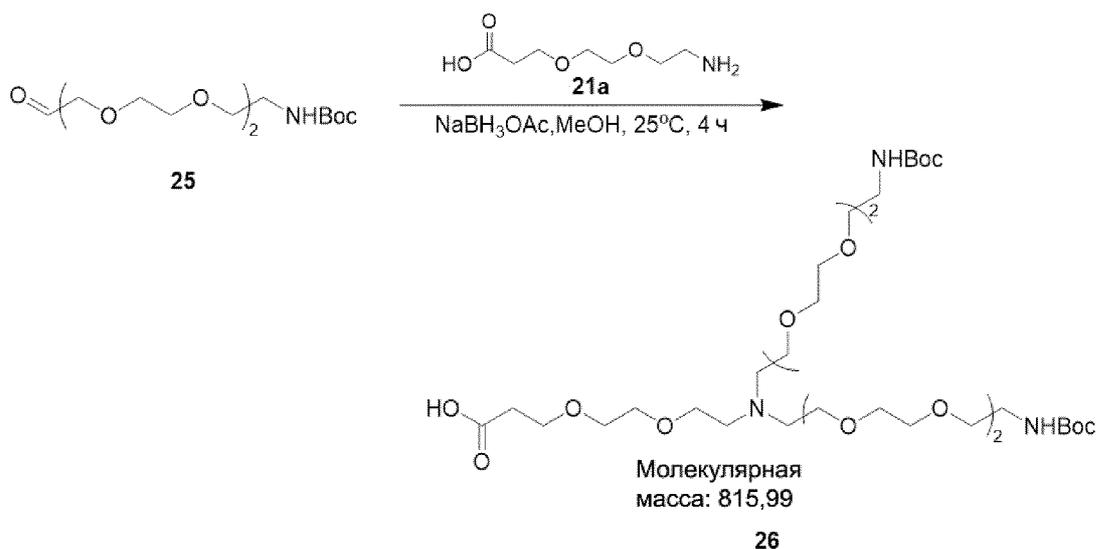
Полная схема реакции для получения соединения 1105 показана на Фиг. 9.

Получение промежуточного соединения 25:



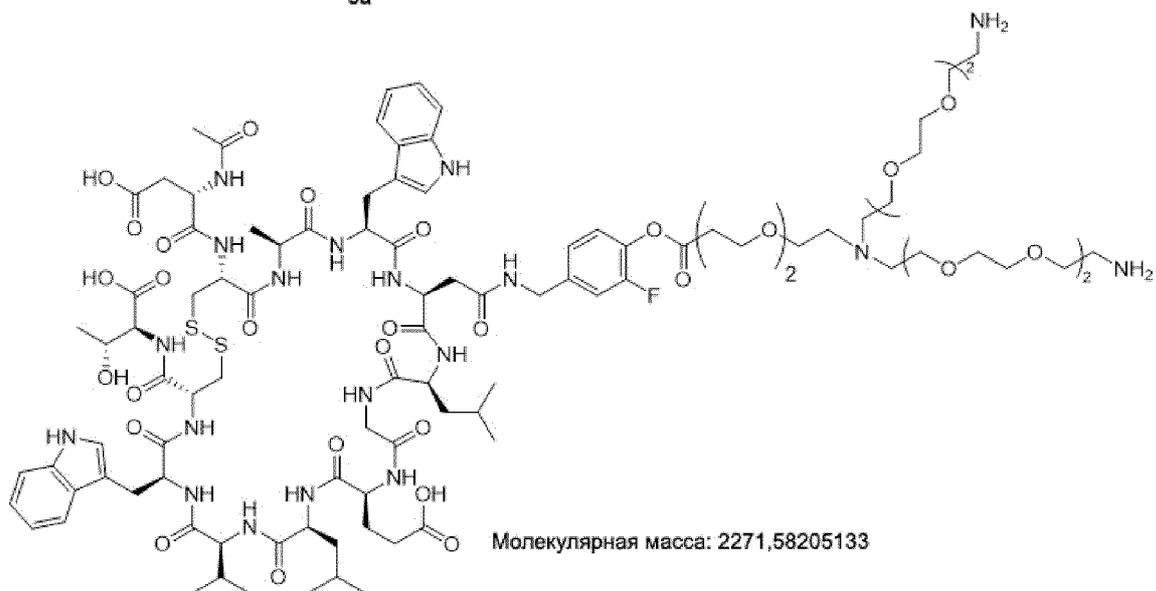
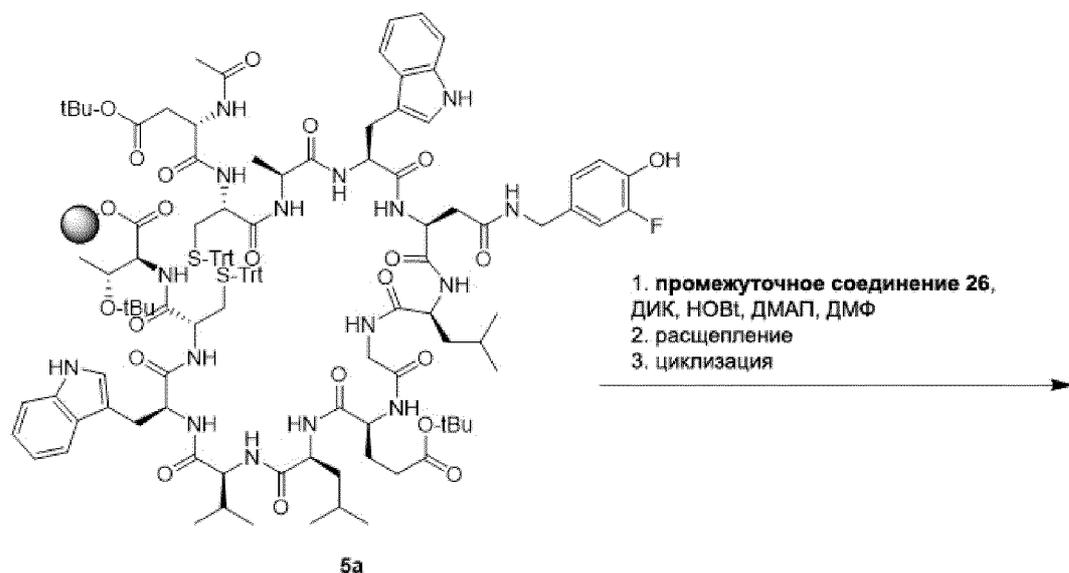
[378] В раствор ДМСО (4,92 г, 62,98 ммоль, 4,92 мл, 2,50 экв.) в ДХМ (50 мл) добавляли раствор оксалилхлорида (6,40 г, 50,38 ммоль, 4,41 мл, 2,00 экв.) в ДХМ (50 мл), затем реакцию смесь перемешивали при -70 °С в течение 10 мин, затем каплями добавляли раствор **промежуточного соединения 24** (8,50 г, 25,19 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (50 мл). После перемешивания при -70 °С в течение 50 мин добавляли ТЭА (20,39 г, 201,54 ммоль, 28,05 мл, 8,00 экв.), а реакцию смесь оставляли нагреваться до 20 °С и перемешивали в течение 15 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 10: 1, $R_f = 0,48$) показала, что реагент был полностью израсходован и образовалось одно новое пятно. Реакционную смесь гасили H_2O (50 мл), водную фазу экстрагировали ДХМ (300 мл * 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (300 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством силикагелевой колонки (ДХМ/EtOAc от 95/5 до 50/50) с получением **промежуточного соединения 25** (3,91 г, 11,66 ммоль, 46,3 % выход) в виде желтого масла. 1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-*d*) δ м. д. 9,71–9,77 (м, 1 H) 3,39–3,90 (м, 8 H) 3,25–3,36 (м, 2 H) 1,40–1,52 (м, 9 H).

Получение промежуточного соединения 26:



[379] В раствор промежуточного соединения **25** (3,79 г, 11,29 ммоль, 2,50 экв.), промежуточного соединения **21a** (0,8 г, 4,51 ммоль, 1,00 экв.) в MeOH (40 мл) медленно добавляли NaBH₃OAc (1,44 г, 6,77 ммоль, 1,50 экв.) при 20 °С. После добавления реакцию смесь перемешивали при 20 °С в течение 4 ч. ЖХМС показала необходимую МС. Реакционную смесь каплями гасили H₂O (10 мл). После фильтрации фильтрат концентрировали. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (колонка: Welch Ultimate XB-C18 250 * 50 мм, 10 мкм, 120А + Welch Ultimate 250 * 50 мм, 10 мкм, 120 А; подвижная фаза: [вода (0,1 % ТФУ) – АЦН]; В %: 24 %–54 %, 24 мин) с получением промежуточного соединения **26** (2,41 г, 2,95 ммоль, 65,4 % выход) в виде желтого масла. ЖХМС: RT = 0,833 мин, МС расчит.: M_{av} = 815,99, [M + H]⁺ = 816,5. ¹H ЯМР (400 МГц, оксид дейтерия) δ м. д. 7,87 (с, 1 Н) 7,37 (шир. д, J = 7,53 Гц, 1 Н) 3,79–3,91 (м, 4 Н) 3,70–3,79 (м, 4 Н) 3,60–3,70 (м, 12 Н) 3,45–3,58 (м, 8 Н) 2,99–3,40 (м, 6 Н) 2,59 (т, J = 5,52 Гц, 2 Н) 1,36 (с, 18 Н).

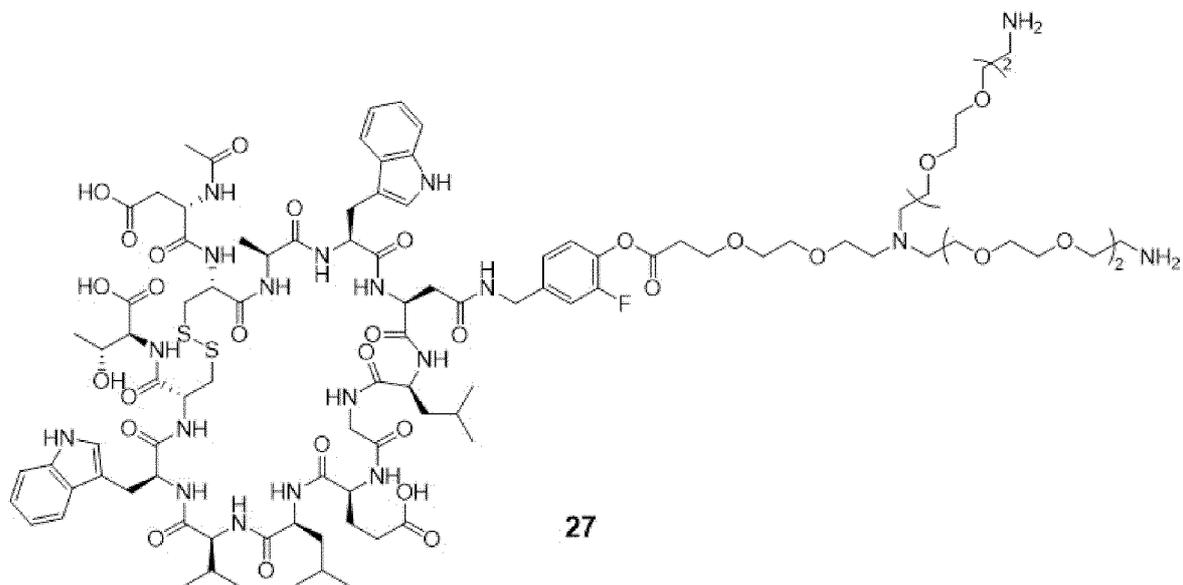
Получение промежуточного соединения 27:



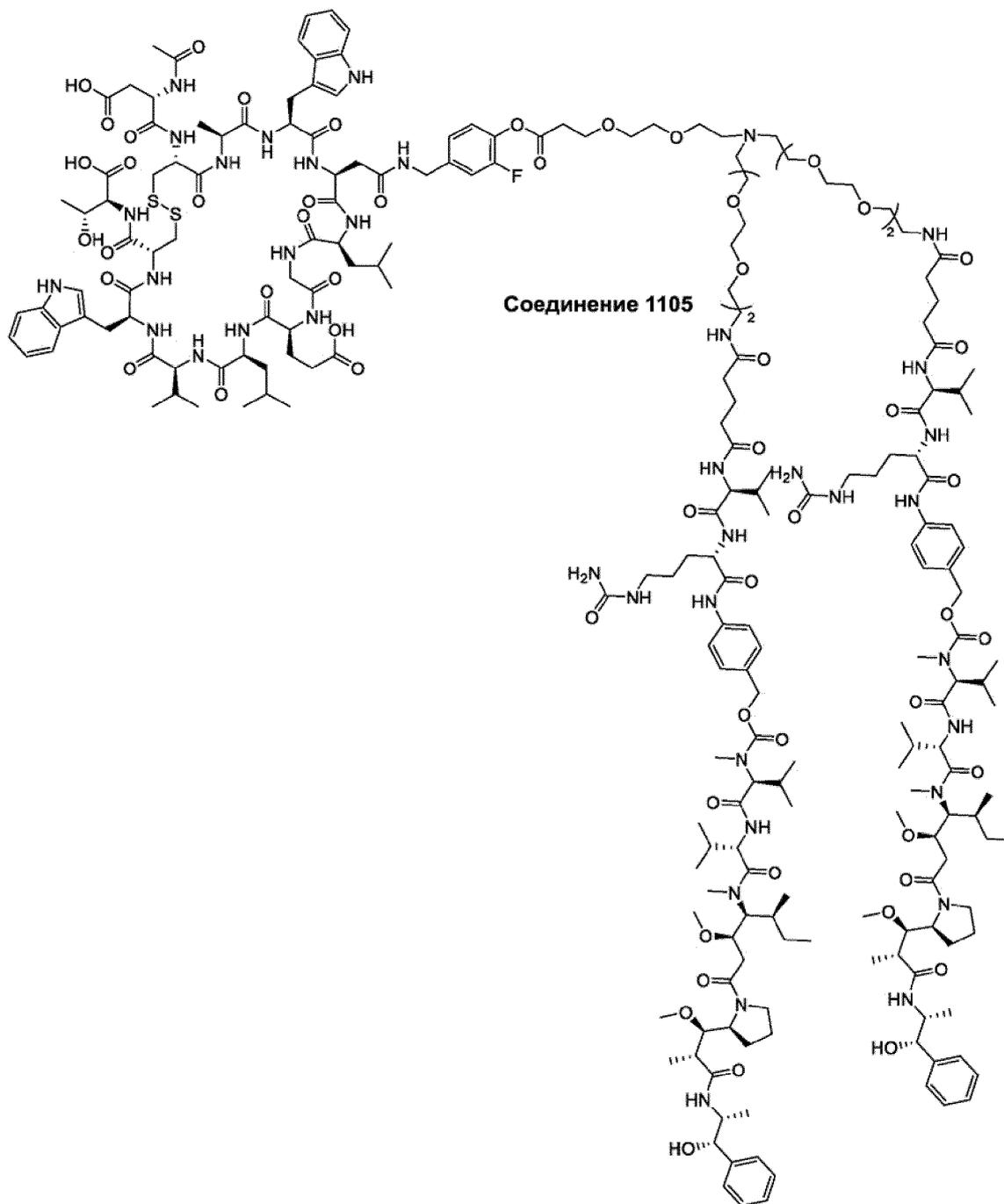
27

[380] Промежуточное соединение 27 синтезировали, следуя процедуре, описанной в разделе [0008]-[0009], (стр. 3–5), с обработкой промежуточного соединения 26. 0,50 ммоль смолы СТС дало промежуточное соединение 27 (50,0 мг, 2,0 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,61 мин, МС расчит.: $M_{av} = 2271,58$, $[M + 2H]^{2+} = 1137,64$, $[M + 3H]^{3+} = 758,50$.

Получение соединения 1105:



промежуточное
соединение 7, ДИЭА
→
ДМСО

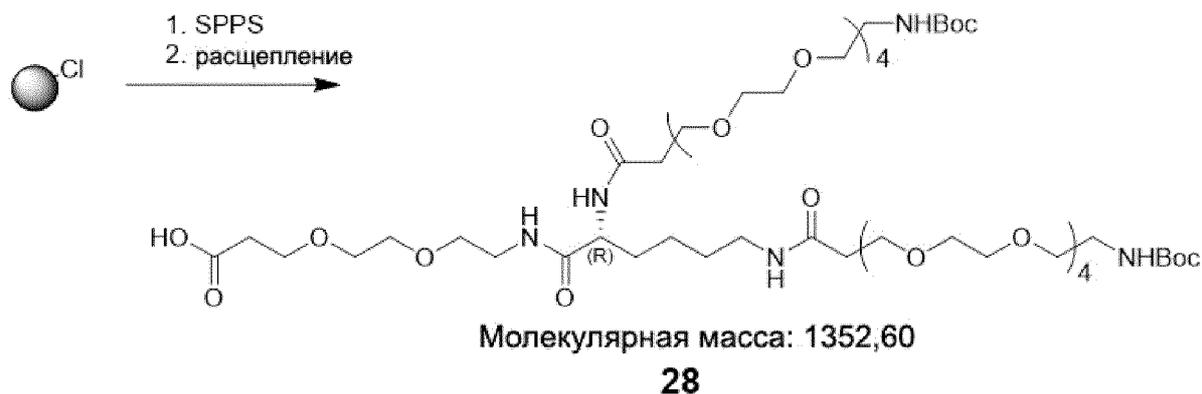


[381] В раствор **промежуточного соединения 27** (17,3 мг, 7,62 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (9,84 мг, 76,16 мкмоль, 13,27 мкл, 10,00 экв.) в ДМСО (600 мкл) добавляли **промежуточное соединение 7** (20,84 мг, 15,61 мкмоль, 2,05 экв.) при 20 °С. Затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. ЖХМС показала полный расход реагента, а один главный пик соответствовал

необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) с получением соединения **1105** (17,1 мг, 47,7 % выход, 97,2 % чистота) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,092 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 4710,60$, $[M + 3H]^{3+} = 1570,71$, $[M + 4H]^{4+} = 1178,40$, $[M + 5H]^{5+} = 942,69$.

ПРИМЕР 7. Процедура для получения соединения 1106.

Получение промежуточного соединения 28:



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

1) Получение смолы: В сосуд, содержащий смолу СТС (2,00 ммоль, 2,00 г, 1,00 ммоль/г) и Fmoc-NH-PEG₂-CH₂CH₂COOH (798,0 мг, 2,00 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (20 мл), каплями добавляли ДИЭА (4,00 экв.) и смешивали в течение 2 ч с барботированием N₂ при 20 °С. Затем добавляли MeOH (2 мл) и барботировали N₂ еще в течение 30 мин. Смолу промывали ДМФ (40 мл). Затем добавляли 20 % пиперидин в ДМФ (40 мл) и барботировали смесь N₂ в течение 30 мин при 20 °С. Затем смесь фильтровали с получением смолы. Смолу промывали ДМФ (40 мл) перед переходом к следующему этапу.

2) Сочетание: Раствор Fmoc-D-Lys(Fmoc)-OH (2,21 г, 6,00 ммоль, 3,00 экв.), ГБТУ (2,19 г, 2,85 экв.) в ДМФ (20 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИЭА (6,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 20 °С. Реакцию сочетания отслеживали по тесту с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (40 мл).

3) Снятие защиты: В смолу добавляли 20 % пиперидин в ДМФ (40 мл) и барботировали смесь N₂ в течение 30 мин при 20 °С. Затем смолу промывали ДМФ (40 л). Реакцию снятия защиты отслеживали с помощью теста с нингидрином, если он был синим или коричнево-красным, реакция была завершена.

4) Сочетание: Раствор Fmoc-HN-PEG₈-CH₂CH₂COOH (5,30 г, 8,00 ммоль, 4,00 экв.), ГАТУ (2,93 г, 3,80 экв.) в ДМФ (20 мл) добавляли в смолу с барботированием N₂. Затем в смесь каплями добавляли ДИЭА (8,00 экв.) и барботировали N₂ в течение 30 мин при 20 °С. Реакцию сочетания отслеживали с помощью теста с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (20 мл).

5) Этап 3) повторяли один раз.

6) Защита Вос: Раствор Вос₂O (2,59 г, 12,00 ммоль, 6,00 экв.) и ДИЭА (12,00 экв.) добавляли в смолу и барботировали смесь N₂ в течение 20 мин. Реакцию сочетания отслеживали с помощью теста с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (40 мл), MeOH (40 мл) и сушили при пониженном давлении.

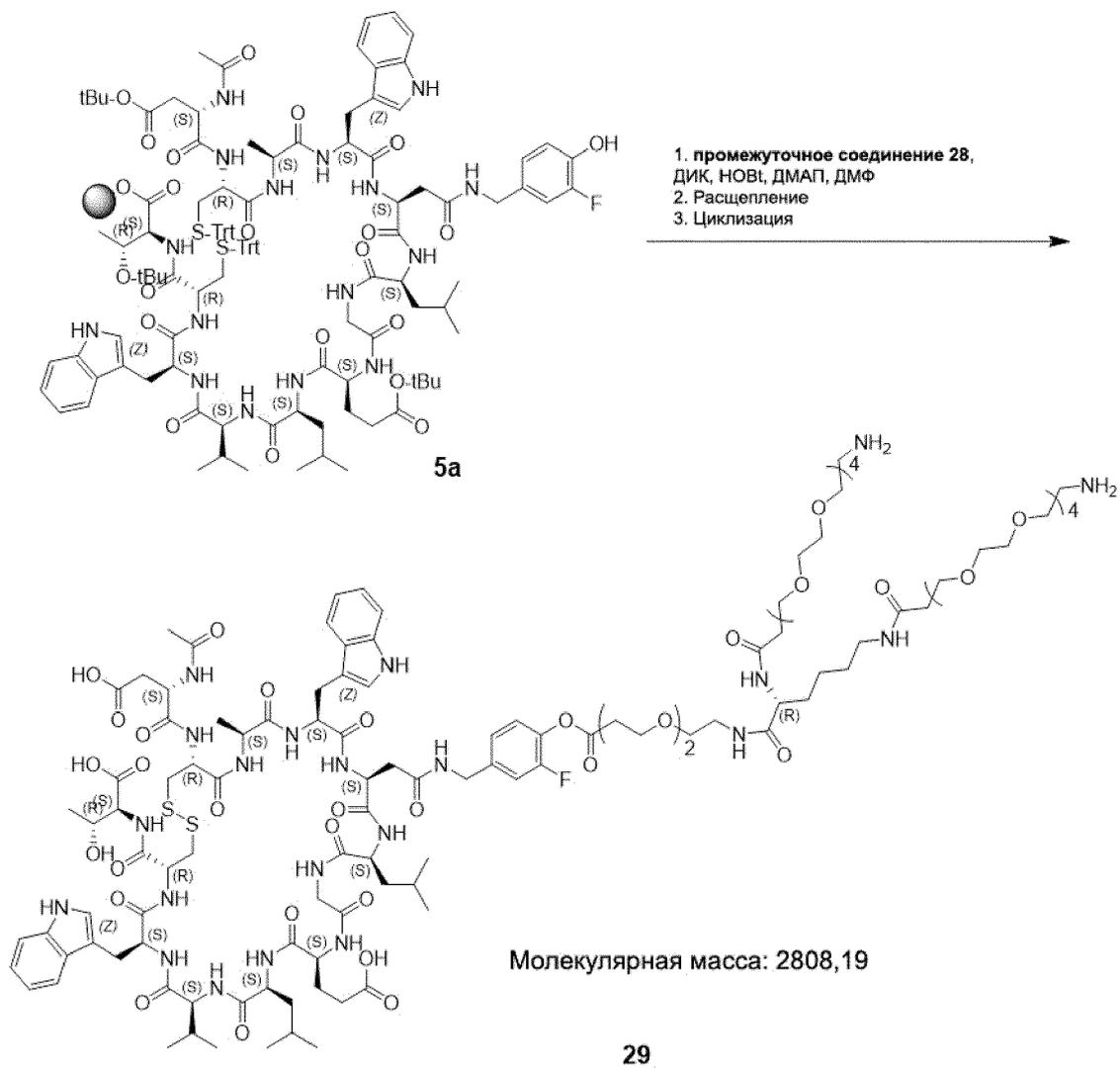
ТАБЛИЦА 2: Перечень аминокислот и соответствующие реагенты, используемые на SPPS.		
№	Материалы	Реагенты для сочетания
1	Fmoc-HN-PEG ₂ -CH ₂ CH ₂ COOH (4,00 экв.)	ДИЭА (4,00 экв.)
2	Fmoc-D-Lys(Fmoc)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
3	Fmoc-HN-PEG ₈ -CH ₂ CH ₂ COOH (4,00 экв.)	НАТУ (3,80 экв.) и ДИЭА (8,00 экв.)
4	Вос ₂ O (6,00 экв.)	ДИЭА (12,00 экв.)

[383] Расщепление пептида:

1) Расщепление: Раствор для расщепления (20 % HFIP/H₂O, об./об., 50 мл) добавляли в колбу, содержащую пептид с защищенными боковыми цепями, при комнатной температуре и перемешивали в течение 1 ч. После фильтрации собирали фильтрат.

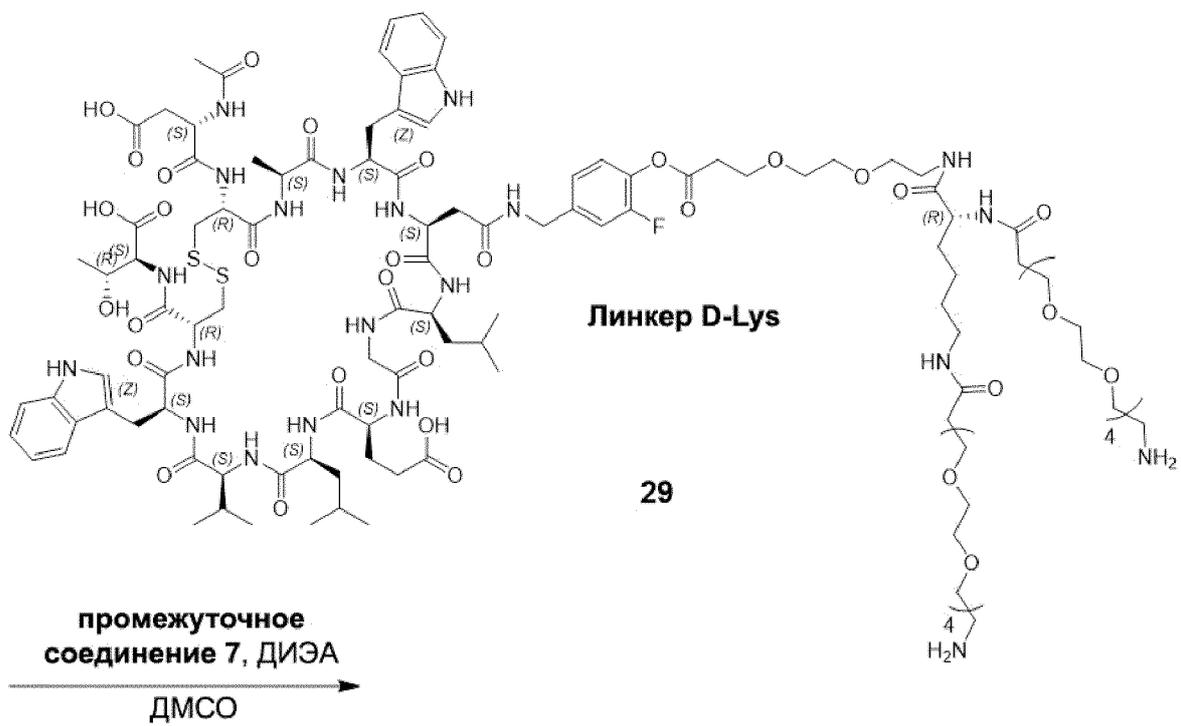
2) Объединенный фильтрат концентрировали при пониженном давлении с последующей лиофилизацией с получением **промежуточного соединения 28** (1,7 г, неочищенное) в виде бесцветного масла. ЖХМС: RT = 0,95 мин, МС рассчит.: M_{av} = 1352,60, [M + H]⁺ = 1352,86.

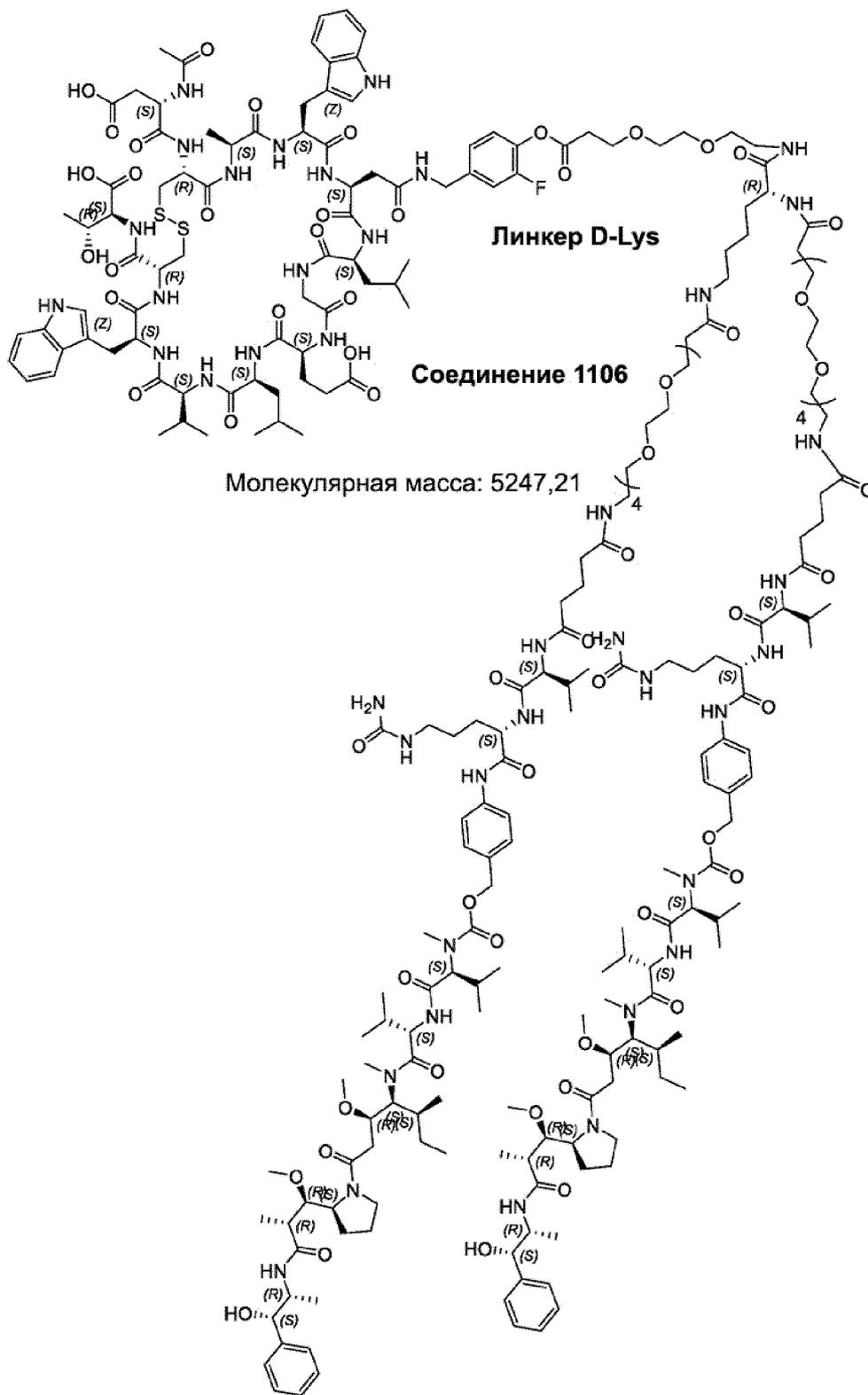
Получение промежуточного соединения 29 (связанный со смолой пептид с защищенными боковыми цепями):



[384] Промежуточное соединение 29 синтезировали, следуя процедуре, описанной в разделе [0008]-[0009], (стр. 3–5), с обработкой промежуточного соединения 28. 0,50 ммоль смолы СТС дало промежуточное соединение 29 (300,0 мг, 91,4 % чистота, 9,7 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 0,872 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 2808,19$, $[M + 2H]^{2+} = 1404,79$, $[M + 3H]^{3+} = 936,52$, $[M + 4H]^{4+} = 702,73$.

Получение соединения 1106:

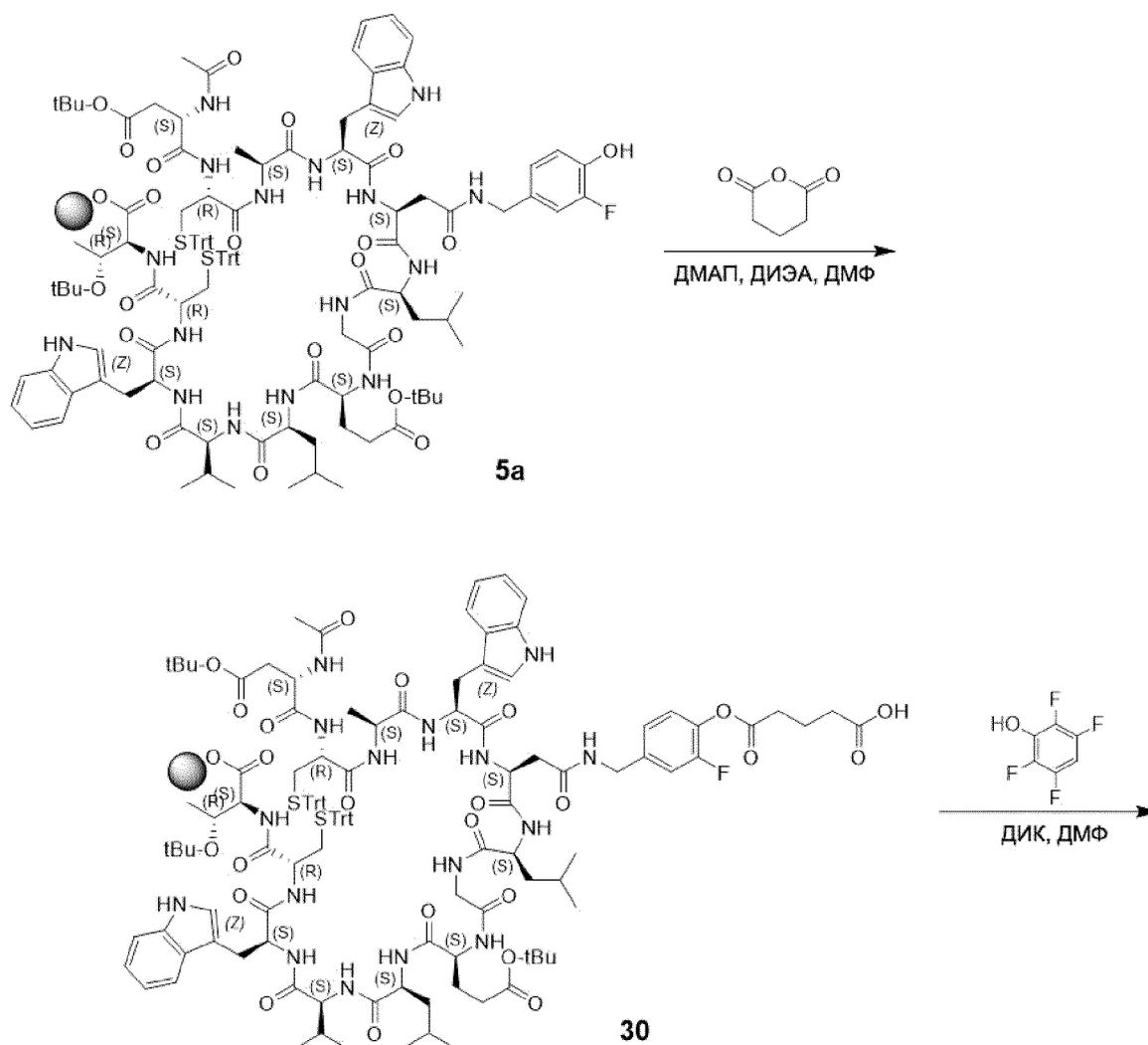


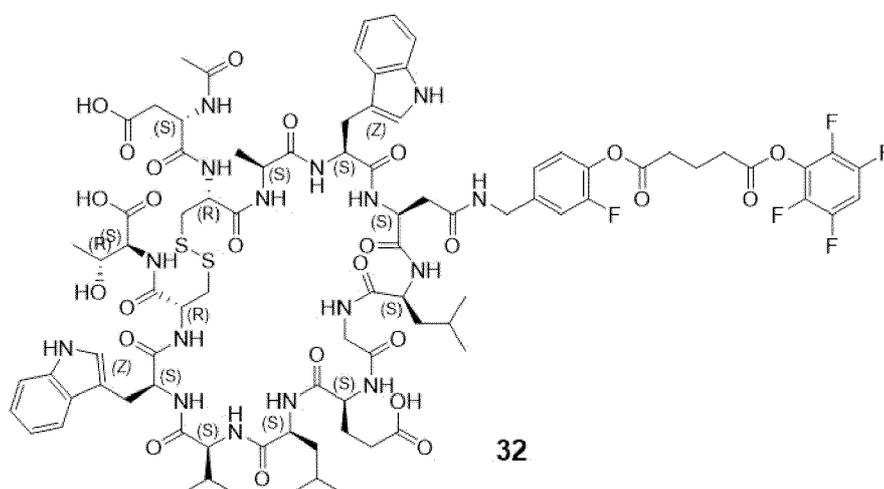
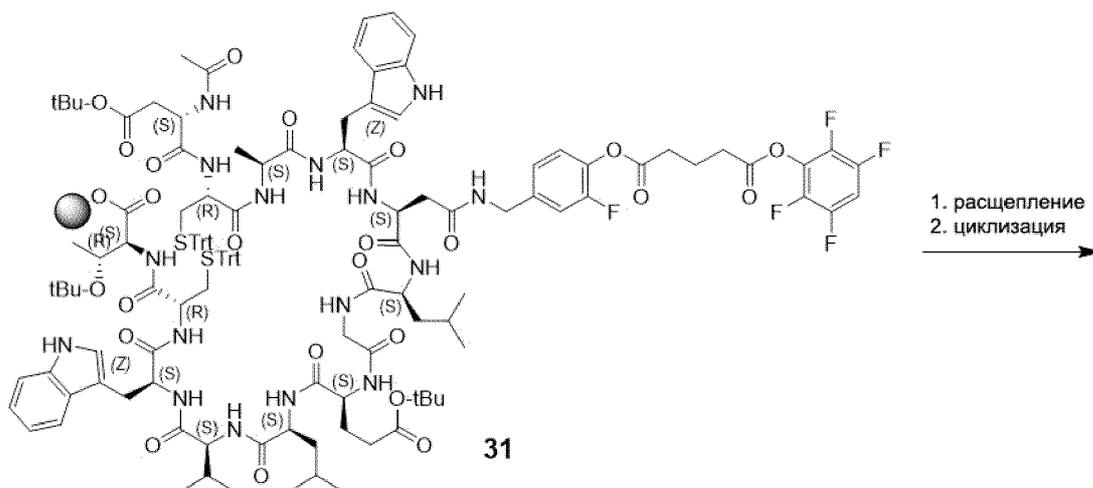


[385] В смесь **промежуточного соединения 29** (20,0 мг, 7,12 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (9,20 мг, 71,22 мкмоль, 12,41 мкл, 10,00 экв.) в ДМСО (400 мкл) добавляли **промежуточное соединение 7** (19,9 мг, 14,96 мкмоль, 2,10 экв.) при 20 °С. Затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. ЖХМС показала полный расход реагента, а один главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) с получением **соединения 1106** (16,7 мг, 3,02 мкмоль, 95,0 % чистота, 42,4 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,61 мин, МС расчет.: $M_{ov} = 5247,21$, $[M + 3H]^{3+} = 1749,87$, $[M + 4H]^{4+} = 1312,53$, $[M + 5H]^{5+} = 1050,28$, $[M + 6H]^{6+} = 875,27$.

ПРИМЕР 10. Процедура для получения соединения 1199.

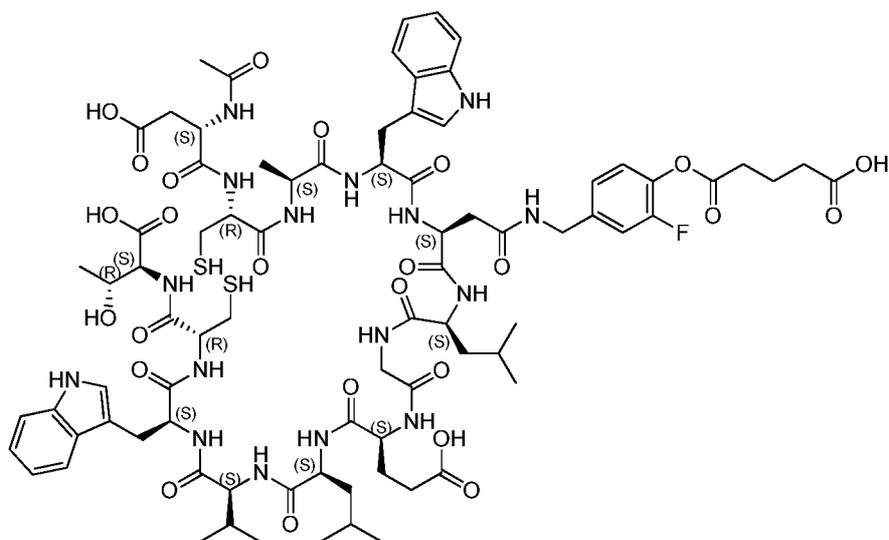
Получение промежуточного соединения 32:





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

- 1) **Промежуточное соединение 5a** (0,50 ммоль, пептидная смола) синтезировали, следуя процедуре, описанной в примере 4.
- 2) Сочетание: В смесь **соединения 5a** (смола СТС, 0,50 ммоль), ДИЭА (387,7 мг, 3,00 ммоль, 522,53 мкл, 6,00 экв.), ДМАП (183,26 мг, 1,50 ммоль, 3,00 экв.) в безводном ДМФ (10 мл) добавляли дигидро-2*H*-пиран-2,6(3*H*)-дион (342,3 мг, 3,00 ммоль, 6,00 экв.) при 20 °С с барботированием N₂. Затем смесь барботировали N₂ в течение 2 ч. После мини-теста расщепления ЖХМС показала, что реакция была завершена. Пептидную смолу (**промежуточное соединение 30**) промывали ДМФ (20 мл) и напрямую использовали для следующего этапа. ЖХМС: RT = 1,21 мин, МС расчит.: M_{av} = 1789,95, [M + 2H]²⁺ = 896,48.



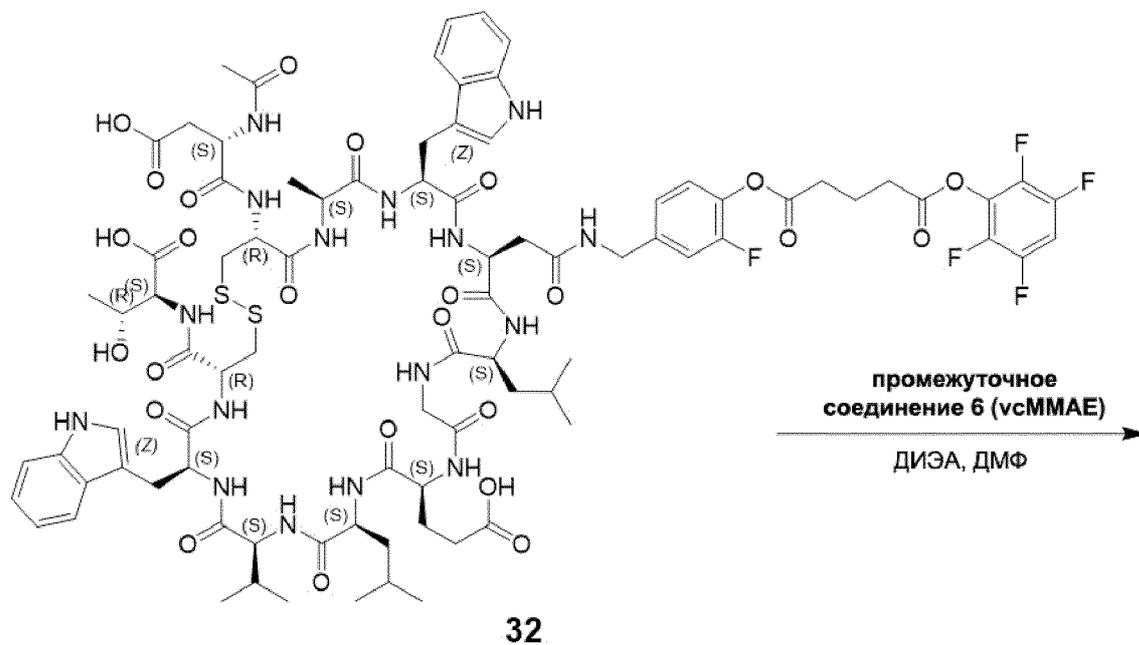
Молекулярная масса: 1789,95

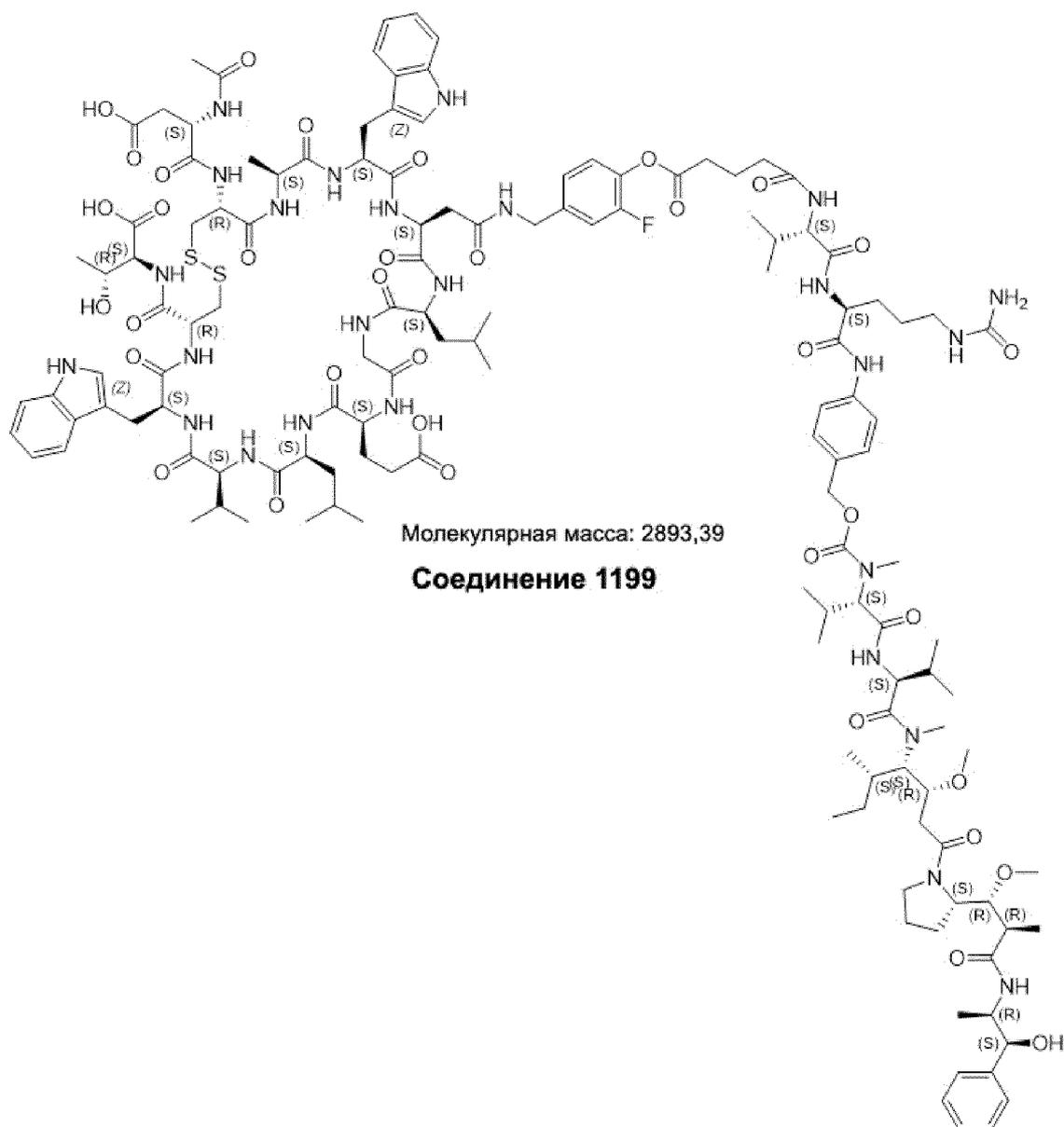
30_после мини-расщепления

- 3) Образование сложного эфира ТФФ: Раствор ТФФ (830,37 мг, 5,00 ммоль, 10,00 экв.) и ДИК (631,00 мг, 5,00 ммоль, 774,23 мкл, 10,00 экв.) в безводном ДМФ (5 мл) добавляли в связанный со смолой пептид (**промежуточное соединение 30**) при 20 °С с барботированием N₂. Затем смесь барботировали N₂ в течение 2 ч. После мини-теста расщепления ЖХМС показала, что реакция была завершена. Смолу промывали ДМФ (20 мл), 2-изопропоксипропаном (20 мл), сушили путем барботирования N₂ с получением **промежуточного соединения 31** (смола СТС, 0,5 ммоль) в виде ярко-желтого твердого вещества.
- 4) Расщепление: Раствор для расщепления (ТФУ/Tis/H₂O, 95/2,5/2,5, об./об./об., 20 мл) добавляли в колбу, содержащую пептид с защищенными боковыми цепями, при комнатной температуре и перемешивали в течение 1 ч. После фильтрации фильтрат осаждали изопропиловым эфиром (холодный, 100 л). После фильтрации твердое вещество промывали изопропиловым эфиром (холодный, 50 мл) еще два раза и сушили при пониженном давлении в течение 2 ч.
- 5) Циклизация: Неочищенный пептид растворяли в HOAc/MeCN/H₂O (4/3/3, об./об./об., 500 мл). Затем в смесь каплями добавляли 0,1 М I₂/AcOH до стойкого желтого цвета, затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 5 мин. Смесь гасили 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 **32** (73,0 мг, 89,2 % чистота, 6,7 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,31 мин, МС расчит.: $M_{av} = 1935,99$, $[M + 2H]^{2+} = 968,03$.

Получение соединения 1199:

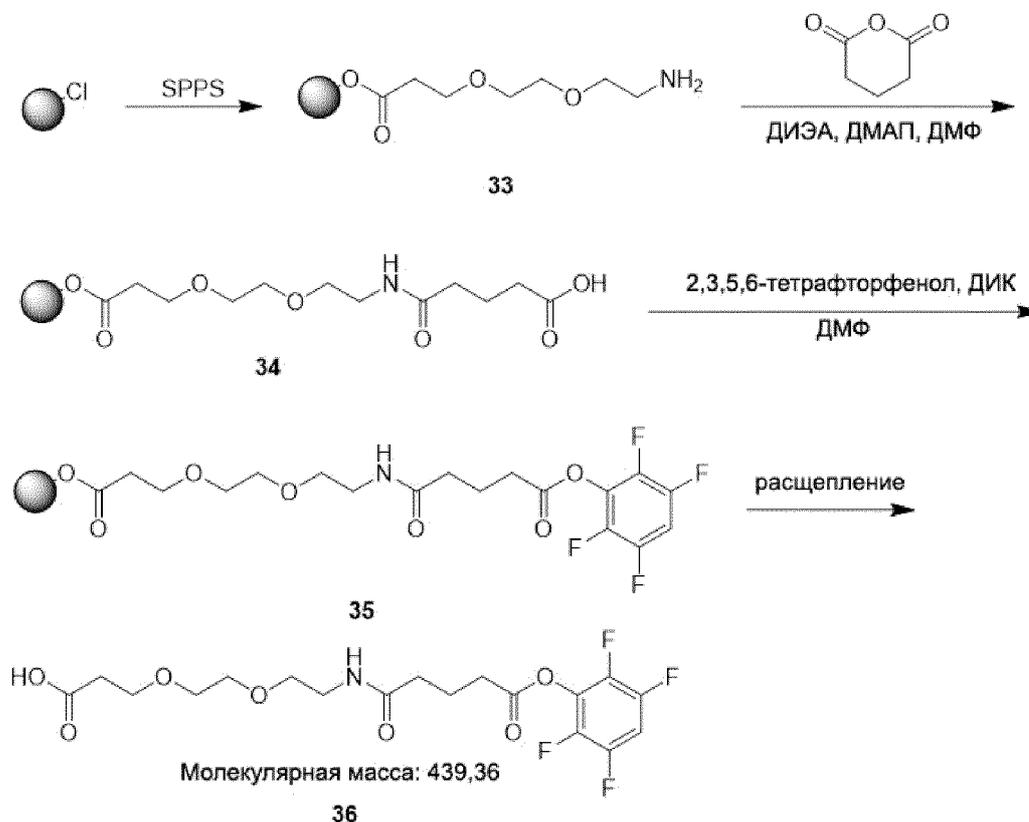




[387] В раствор промежуточного соединения **6** (vcMMAE, 11,9 мг, 10,6 мкмоль, 1,00 экв.) в ДМСО (400 мкл) добавляли промежуточное соединение **32** (20,0 мг, 10,6 мкмоль, 1,00 экв.) и ДИЭА (6,82 мг, 53,0 мкмоль, 5,00 экв.) при 20 °С. Смесь перемешивали при 20 °С в течение 2 ч. ЖХМС показала, что исходный материал был полностью израсходован. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) с получением соединения **1199** (16,8 мг, 5,89 мкмоль, 55,8 % выход, 96,8 % чистота) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,118 мин, МС расчит.: $M_{av} = 2893,35$, $[M + 2H]^{2+} = 1447,20$, $[M + 3H]^{3+} = 965,15$.

ПРИМЕР 11. Процедура для получения соединения 1434

Получение промежуточного соединения 36:



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

1) Получение смолы: В сосуд, содержащий смолу CTC (1,00 ммоль, 1,00 г, 1,00 ммоль/г) и Fmoc-NH-PEG₂-CH₂CH₂COOH (399,0 мг, 1,00 ммоль, 1,00 экв.) в ДХМ (10 мл), каплями добавляли DIEA (4,00 экв.) и смешивали в течение 2 ч с барботированием N₂ при 20 °С. Затем добавляли MeOH (1 мл) и барботировали N₂ еще в течение 30 мин. Смолу промывали ДМФ (20 мл). Затем добавляли 20 % пиперидин в ДМФ (20 мл) и барботировали смесь N₂ в течение 30 мин при 20 °С. Затем смесь фильтровали с получением смолы. Смолу промывали ДМФ (20 мл) перед переходом к следующему этапу.

2) Снятие защиты: В смолу добавляли 20 % пиперидин в ДМФ (20 мл) и барботировали смесь N₂ в течение 30 мин при 20 °С. Затем смолу промывали ДМФ (20 мл). Реакцию снятия защиты отслеживали с помощью теста с нингидрином, если он был синим или коричнево-красным, реакция была завершена с получением **промежуточного соединения 33**.

3) Сочетание: Раствор дигидро-2*H*-пиран-2,6(3*H*)-диона (684,0 мг, 6,00 ммоль, 6,00 экв.) и ДИЭА (12,00 экв.) добавляли в смолу и барботировали смесь N₂ в течение 20 мин. Реакцию сочетания отслеживали с помощью теста с нингидрином, если он был бесцветным, сочетание было завершено. Затем смолу промывали ДМФ (20 мл) с получением **промежуточного соединения 34**.

4) Образование сложного эфира ТФФ: Раствор 2,3,5,6-тетрафторфенола (1,65 г, 10,00 ммоль, 10,00 экв.) и ДИК (1,26 г, 10,00 ммоль, 774,23 мкл, 10,00 экв.) в безводном ДМФ (10 мл) добавляли в пептидную смолу (**промежуточное соединение 34**) при 20 °С с барботированием N₂. Затем смесь барботировали N₂ в течение 2 ч. После мини-теста расщепления ЖХМС показала, что реакция была завершена. Смолу промывали ДМФ (20 мл), 2-изопропоксипропаном (20 мл), изопропиловым эфиром (20 мл), сушили путем барботирования N₂ с получением **промежуточного соединения 35** (смола СТС, 1,0 ммоль).

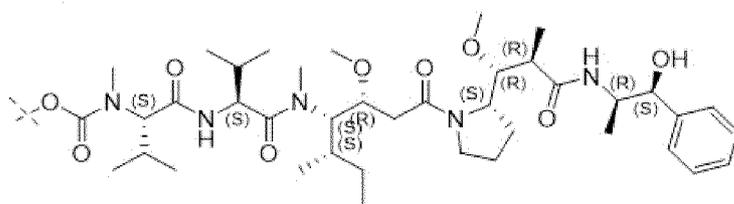
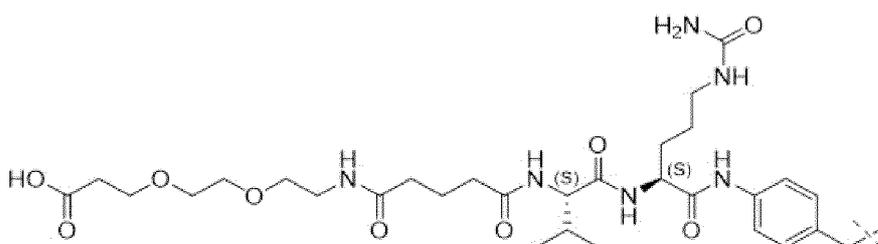
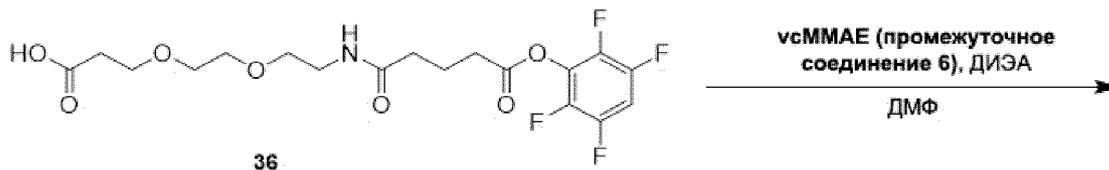
Таблица 3: Перечень аминокислот и соответствующие реагенты, используемые на SPPS.		
	Материалы	Реагенты для сочетания
1	Fmoc-NH-PEG ₂ -CH ₂ CH ₂ COOH (1,00 экв.)	ДИЭА (4,00 экв.)
2	дигидро-2 <i>H</i> -пиран-2,6(3 <i>H</i>)-дион (3,00 экв.)	ДИЭА (6,00 экв.)
3	2,3,5,6-тетрафторфенол (10,00 экв.)	ДИЭА (10,00 экв.)

[389] Расщепление и очистка пептида:

1) Расщепление: Раствор 1 % ТФУ/ДХМ (об./об., 40 мл) добавляли в связанный со смолой пептид (**промежуточное соединение 35**) и перемешивали при 20 °С в течение 5 мин. После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении.

2) Очистка: остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075 % ТФУ/H₂O; В: MeCN) напрямую с получением **промежуточного соединения 36** (250,0 мг, 41,8 % выход) в виде бесцветного масла. ЖХМС: RT = 0,947 мин, МС расчит.: Mav = 439,36, полученная масса: [M + H]⁺ = 440,23, [M + Na]⁺ = 462,11.

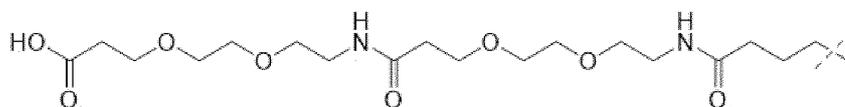
Получение соединения 1434:



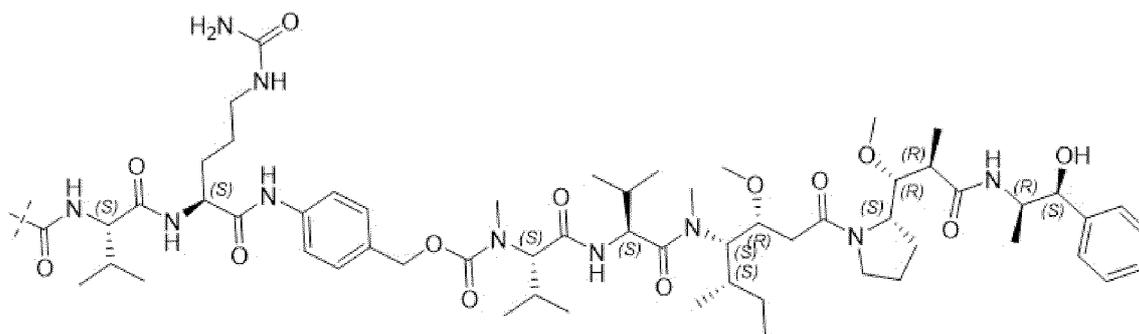
[390] В смесь **промежуточного соединения 36** (39,1 мг, 89,02 мкмоль, 2,00 экв.) и **промежуточного соединения 6** (vsMMAE, 50,0 мг, 44,51 мкмоль, 1,00 экв.) в ДМФ (1 мл) одной частью добавляли ДИЭА (23,01 мг, 178,04 мкмоль, 31,01 мкл, 4,00 экв.) при 20 °С. Смесь перемешивали при 20 °С в течение 30 мин. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075 % ТФУ/Н₂О; В: MeCN) напрямую с последующей лиофилизацией с получением **соединения 1434** (36,9 мг, 26,34 мкмоль, 59,2 % выход, 99,7 % чистота) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,955 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 1396,71$, полученная масса: $[M + H]^+ = 1398,1$, $[M + 2H]^{2+} = 699,6$. Пунктирные линии показывают одну ковалентную связь между верхней и нижней частями соединения 1434.

[391] **Соединение 1435, соединение 1436, соединение 1437** синтезировали, следуя процедуре для соединения 1434. Пунктирные линии показывают одну ковалентную связь между верхней и нижней частями структуры каждого соединения.

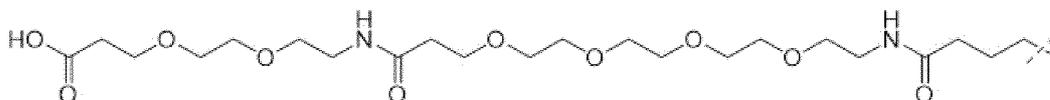
[392] **Соединение 1435** получали (39,9 мг, 25,6 мкмоль, 99,9 % чистота, 50,8 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,941 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 1555,89$, $[M + H]^+ = 1557,0$, $[M + 2H]^{2+} = 778,6$.



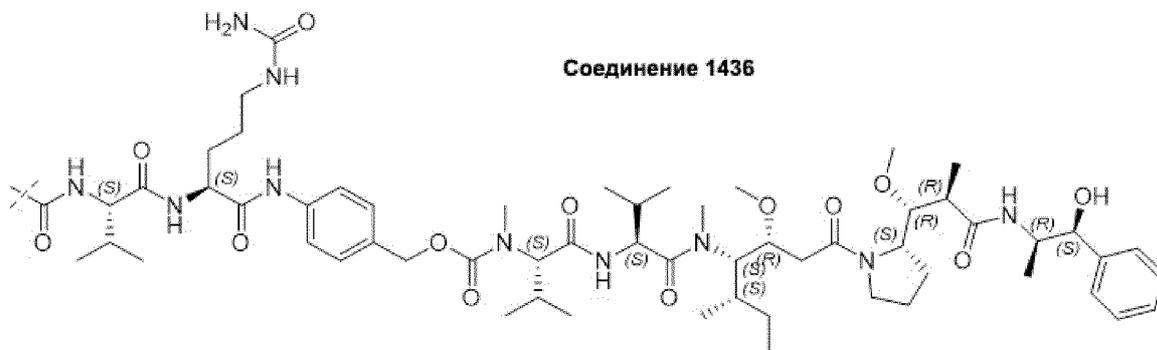
Соединение 1435



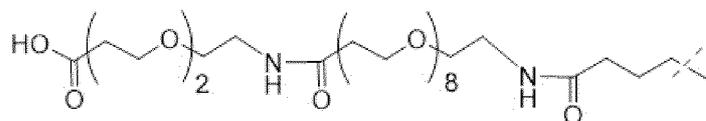
[393] Соединение 1436 получали (41,8 мг, 25,4 мкмоль, 99,6 % чистота, 57,9 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,934 мин, МС расчит.: $M_{av} = 1644,00$, $[M + H]^+ = 1645,3$, $[M + 2H]^{2+} = 822,8$.



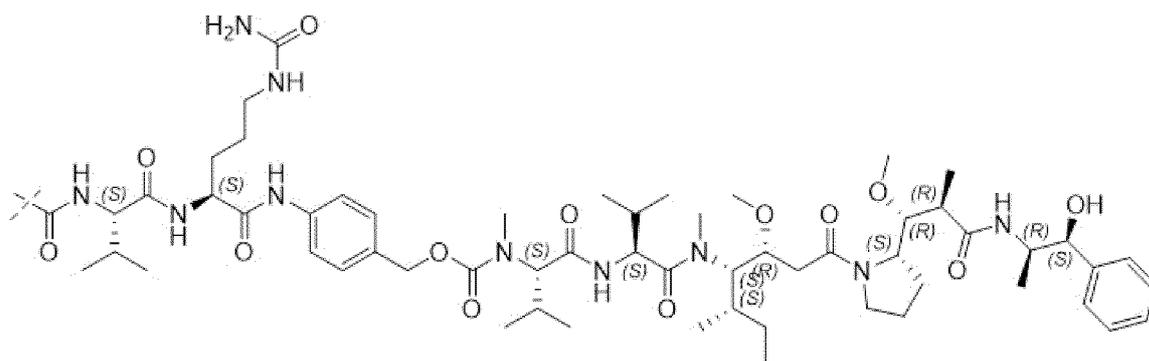
Соединение 1436



[394] Соединение 1437 получали (49,4 мг, 27,1 мкмоль, 99,8 % чистота, 49,9 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,937 мин, МС расчит.: $M_{av} = 1820,21$, $[M + H]^+ = 1821,4$, $[M + 2H]^{2+} = 910,8$, $[M + 3H]^{3+} = 607,7$.

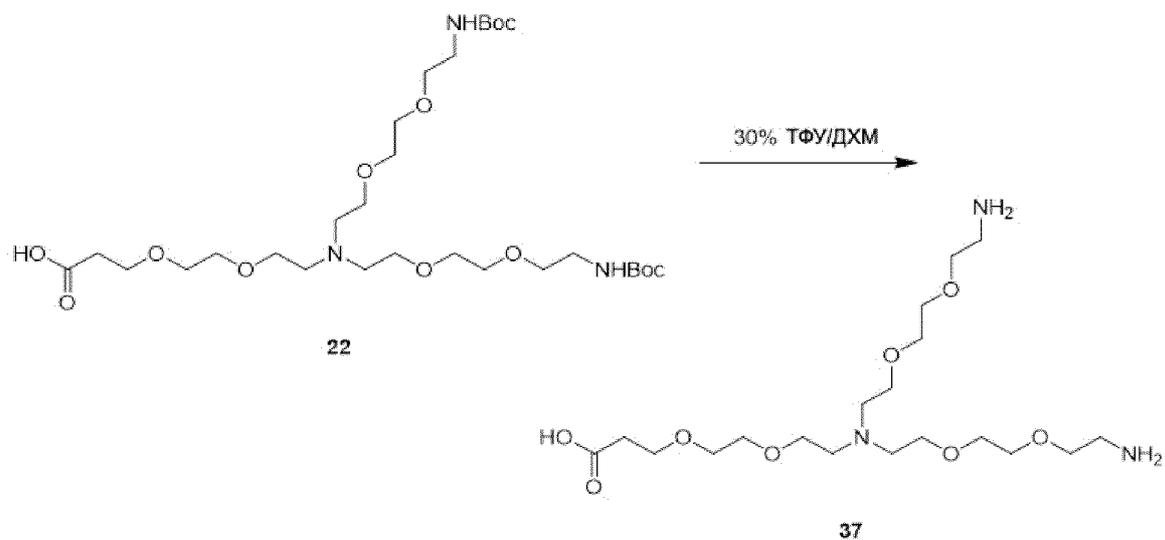


Соединение 1437



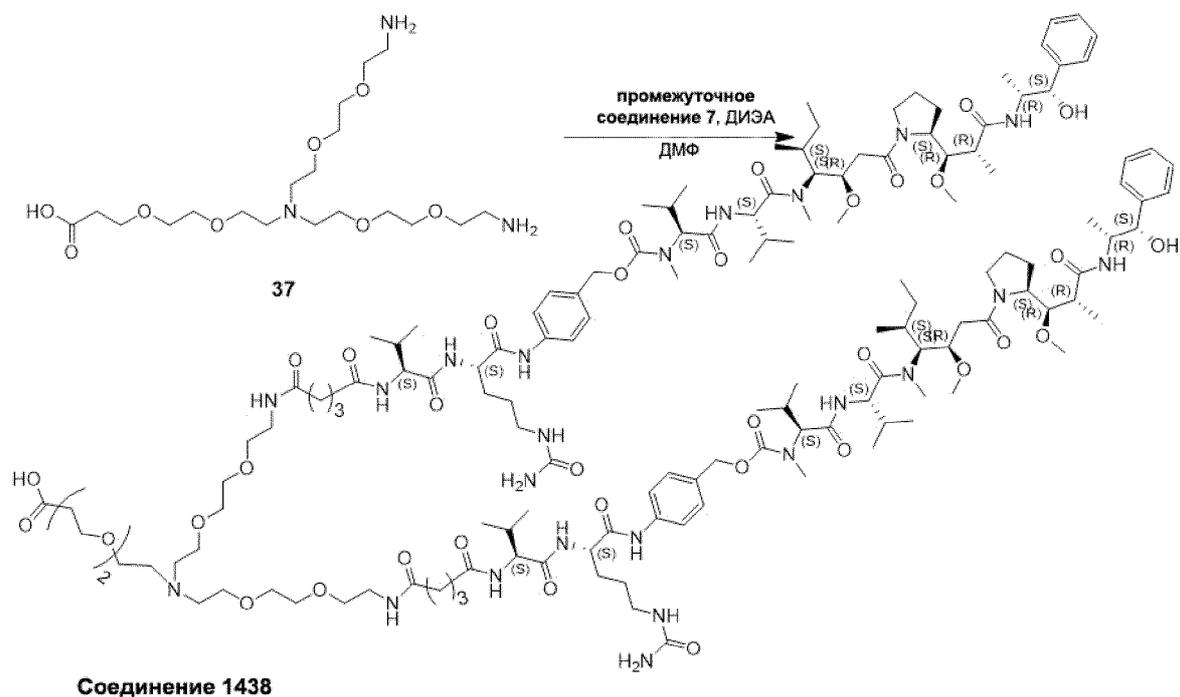
ПРИМЕР 12. Процедура для получения соединения 1438

Получение промежуточного соединения 37:



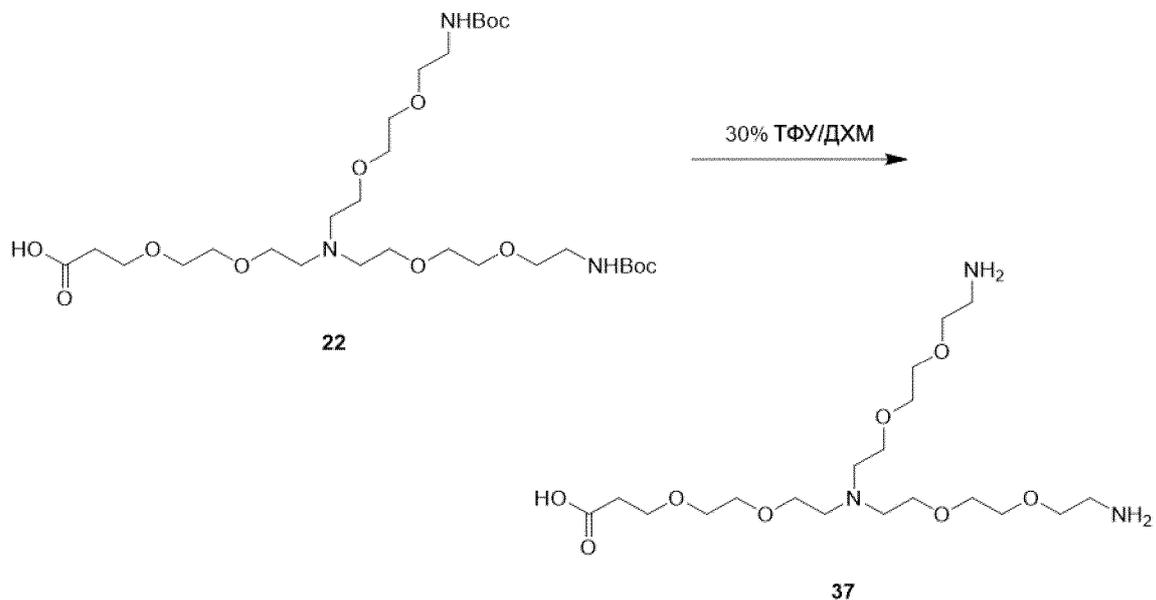
[395] Смесь **промежуточного соединения 22** (0,10 г) в ТФУ/ДХМ (3/7, об./об., 2 мл) перемешивали при 20 °С в течение 0,5 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток лиофилизировали с получением **промежуточного соединения 37** (0,10 г, неочищенное, соль ТФУ) в виде бесцветного масла.

Получение соединения 1438:



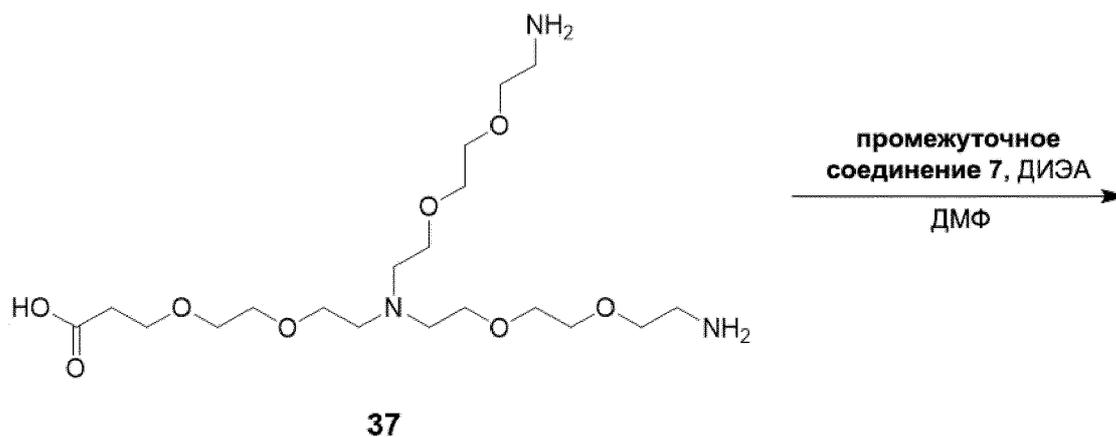
[396] В раствор **промежуточного соединения 37** (3,00 мг, 6,83 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (5,29 мг, 40,95 мкмоль, 7,13 мкл, 6,00 экв.) в ДМФ (0,5 мл) добавляли **промежуточное соединение 7** (27,33 мг, 20,48 мкмоль, 3,00 экв.) при 20 °С. Затем реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075 % ТФУ/Н₂О; В: MeCN) напрямую с последующей лиофилизацией с получением **соединения 1438** (6,3 мг, 2,19 мкмоль, 96,5 % чистота, 32,0 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,709 мин, MS расчит.: M_{av} = 2878,57, [M + 2H]²⁺ = 1440,3, [M + 3H]³⁺ = 960,5.

Получение промежуточного соединения 37:

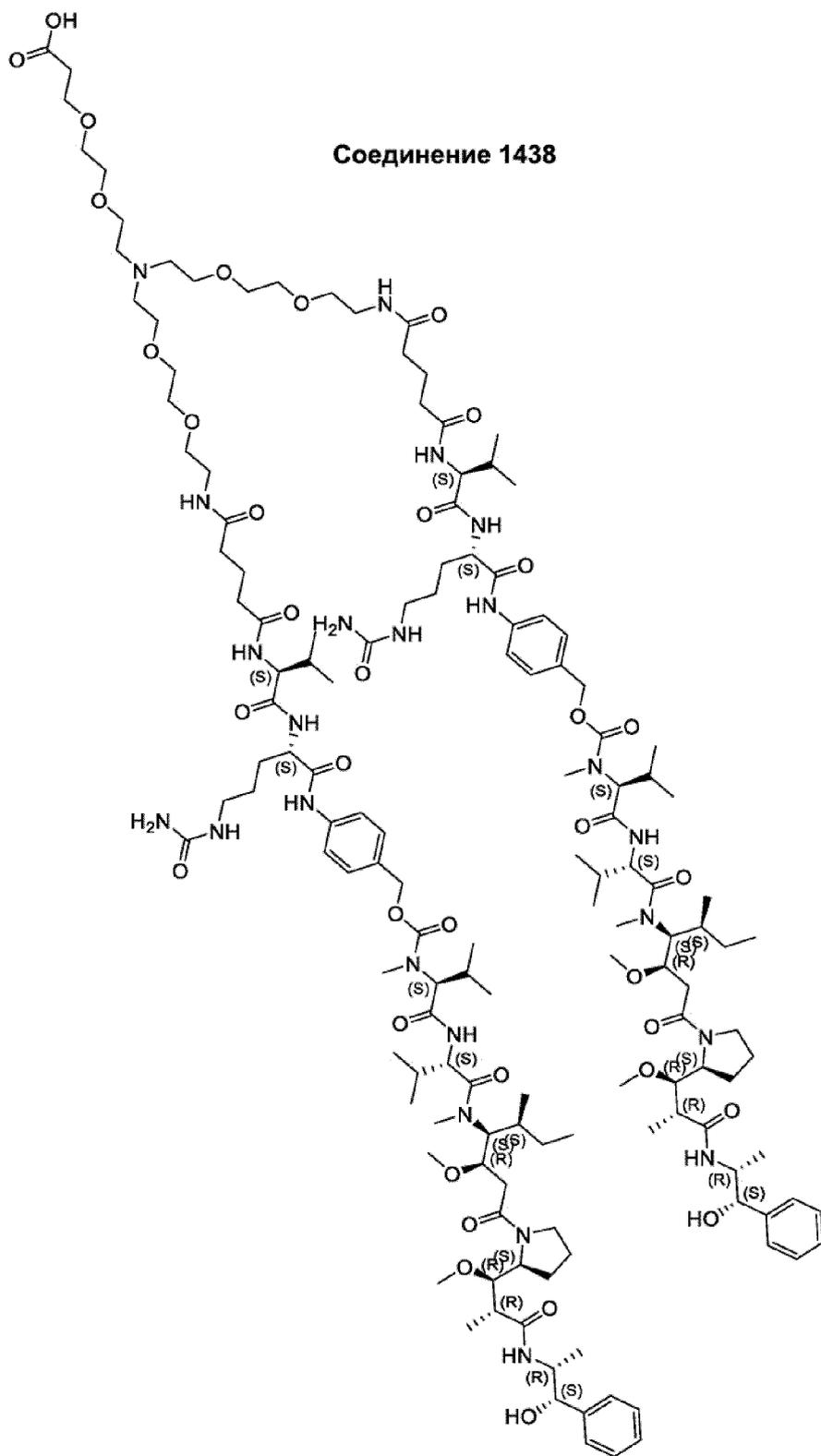


[397] Смесь **промежуточного соединения 22** (0,10 г) в ТФУ/ДХМ (3/7, об./об., 2 мл) перемешивали при 20 °С в течение 0,5 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток лиофилизировали с получением **промежуточного соединения 37** (0,10 г, неочищенное, соль ТФУ) в виде бесцветного масла.

Получение соединения 1438:



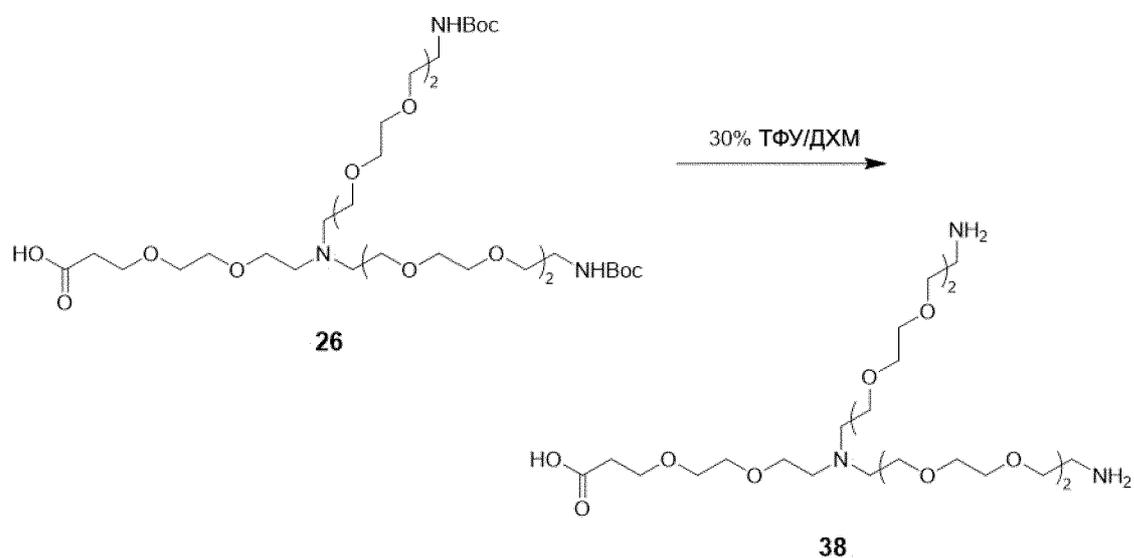
Соединение 1438



[398] В раствор **промежуточного соединения 37** (3,00 мг, 6,83 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (5,29 мг, 40,95 мкмоль, 7,13 мкл, 6,00 экв.) в ДМФ (0,5 мл) добавляли **промежуточное соединение 7** (27,33 мг, 20,48 мкмоль, 3,00 экв.) при 20 °С. Затем реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075 % ТФУ/Н₂О; В: MeCN) напрямую с последующей лиофилизацией с получением **соединения 1438** (6,3 мг, 2,19 мкмоль, 96,5 % чистота, 32,0 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,709 мин, MS расчит.: $M_{av} = 2878,57$, $[M + 2H]^{2+} = 1440,3$, $[M + 3H]^{3+} = 960,5$.

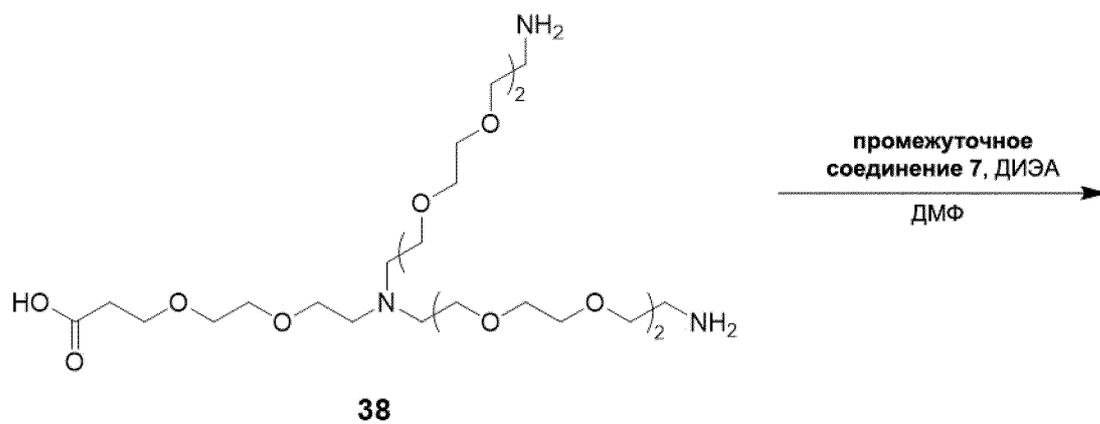
ПРИМЕР 13. Процедура для получения соединения 1439.

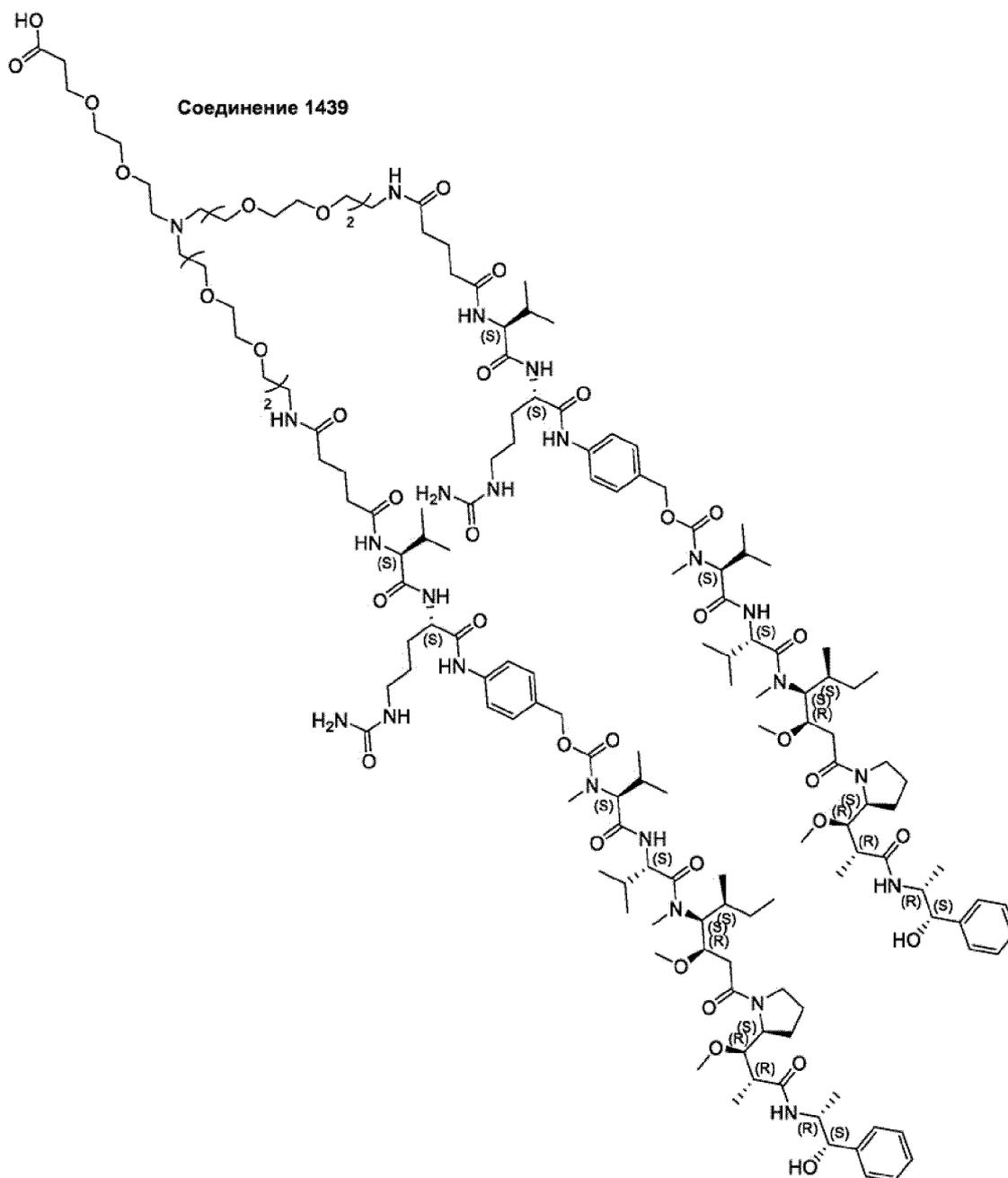
Получение промежуточного соединения 38:



[399] Смесь **промежуточного соединения 26** (0,10 г) в ТФУ/ДХМ (3/7, об./об., 2 мл) перемешивали при 20 °С в течение 0,5 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток лиофилизировали с получением **промежуточного соединения 38** (0,10 г, неочищенное, соль ТФУ) в виде бесцветного масла.

Получения соединения 1439:



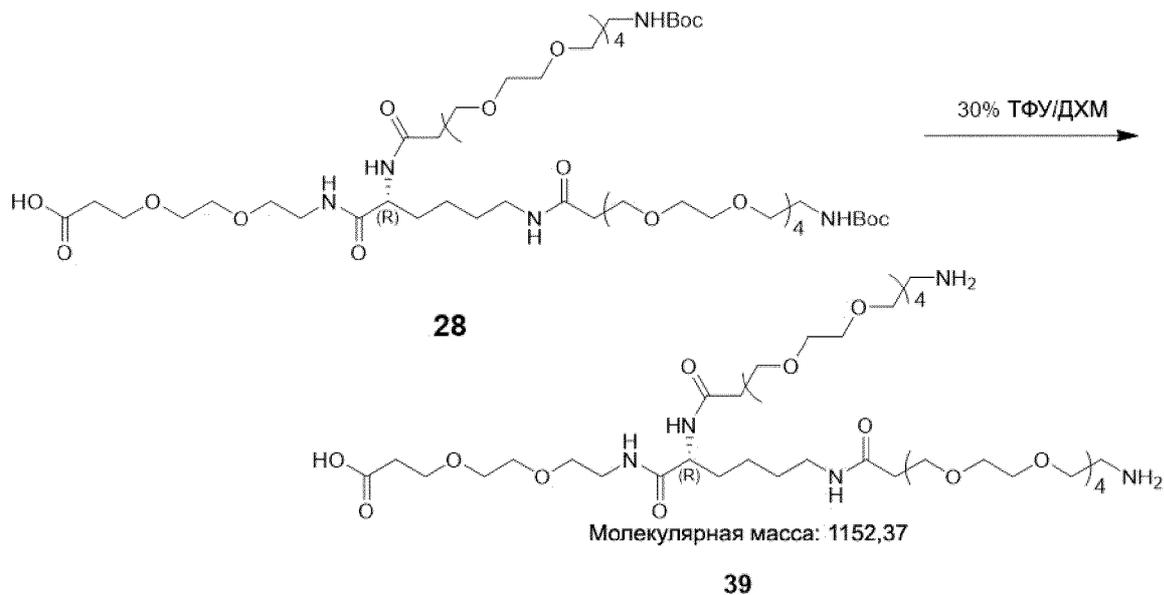


[400] В раствор **промежуточного соединения 38** (20,0 мг, 32,48 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (25,19 мг, 194,88 мкмоль, 33,95 мкл, 6,00 экв.) в ДМФ (2 мл) добавляли **промежуточное соединение 7** (130,0 мг, 97,44 мкмоль, 3,00 экв.) при 20 °С. Затем реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075 % ТФУ/Н₂O; В: MeCN) напрямую с последующей лиофилизацией с получением **соединения 1439** (10,8 мг, 3,54 мкмоль, 97,1 % чистота, 10,8 % выход) в виде белого твердого вещества. ЖХМС:

RT = 2,221 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 3054,78$, $[M + 2H]^{2+} = 1528,4$, $[M + 3H]^{3+} = 1019,1$, $[M + 4H]^{4+} = 764,7$.

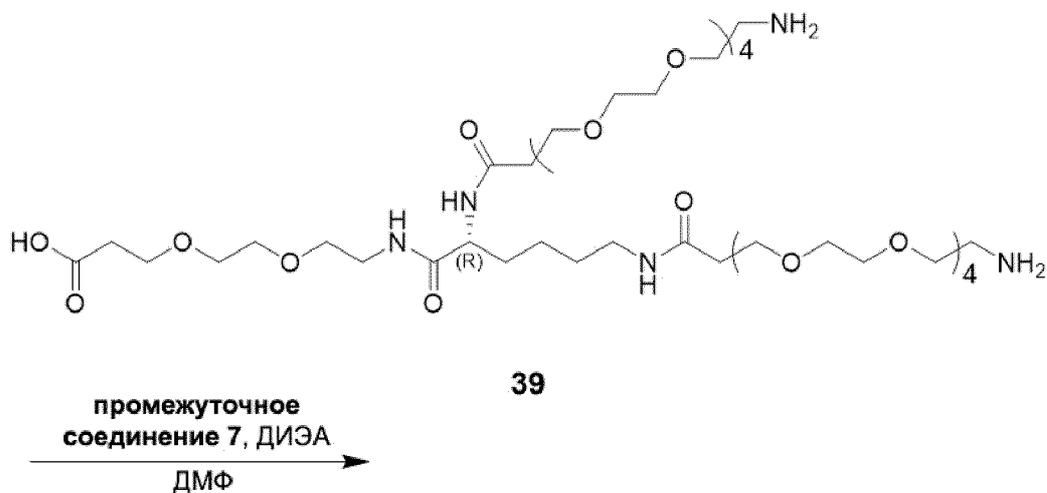
ПРИМЕР 14. Процедура для получения соединения 1440

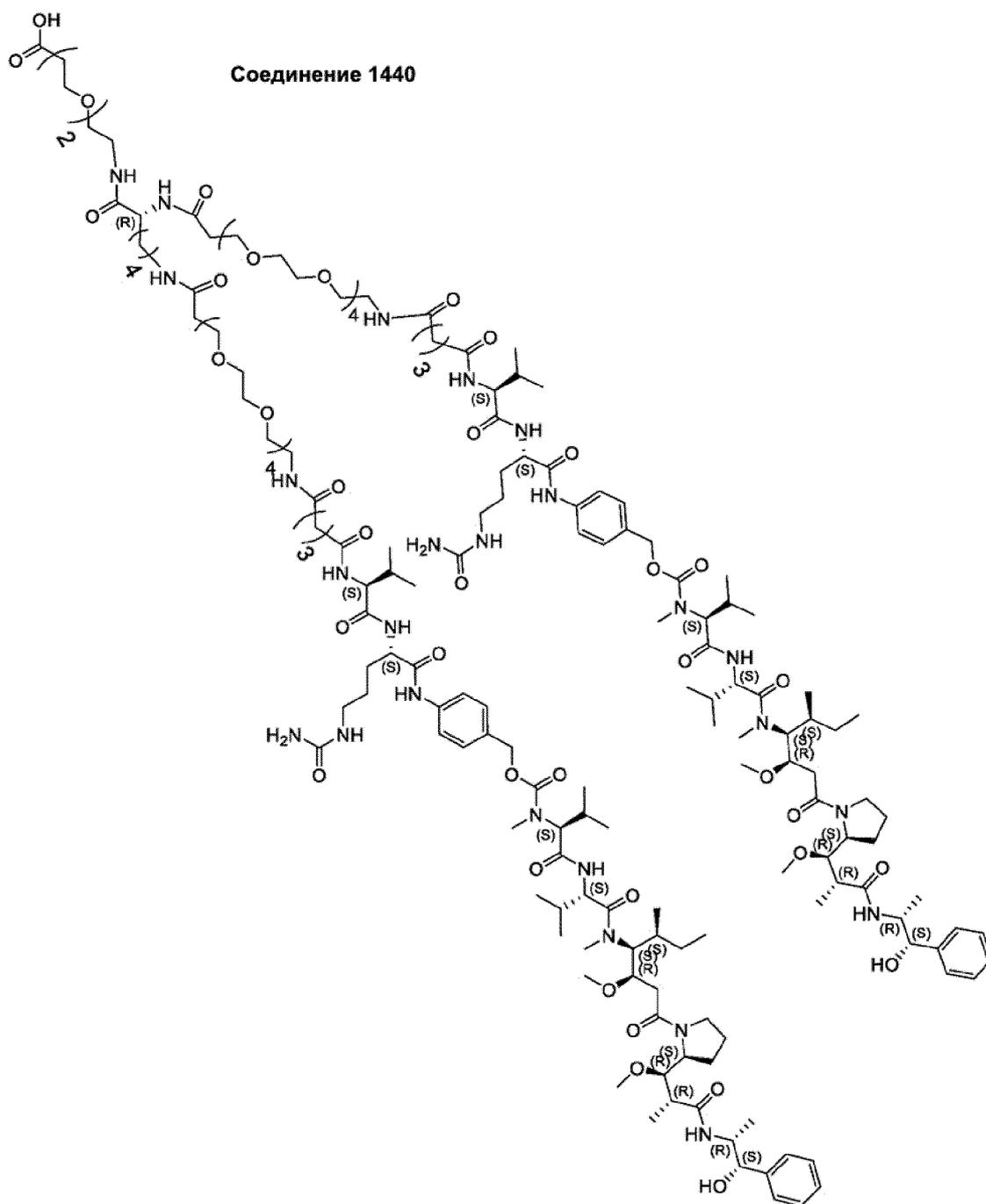
Получение промежуточного соединения 39:



[401] Смесь **промежуточного соединения 28** (0,30 г) в ТФУ/ДХМ (3/7, об./об., 6 мл) перемешивали при 20 °С в течение 0,5 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток лиофилизировали с получением **промежуточного соединения 39** (0,20 г, неочищенное, соль ТФУ) в виде бесцветного масла. ЖХМС: RT = 0,637 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 1152,37$, $[M + H]^+ = 1152,7$, $[M + 2H]^{2+} = 576,99$.

Соединение 1440:

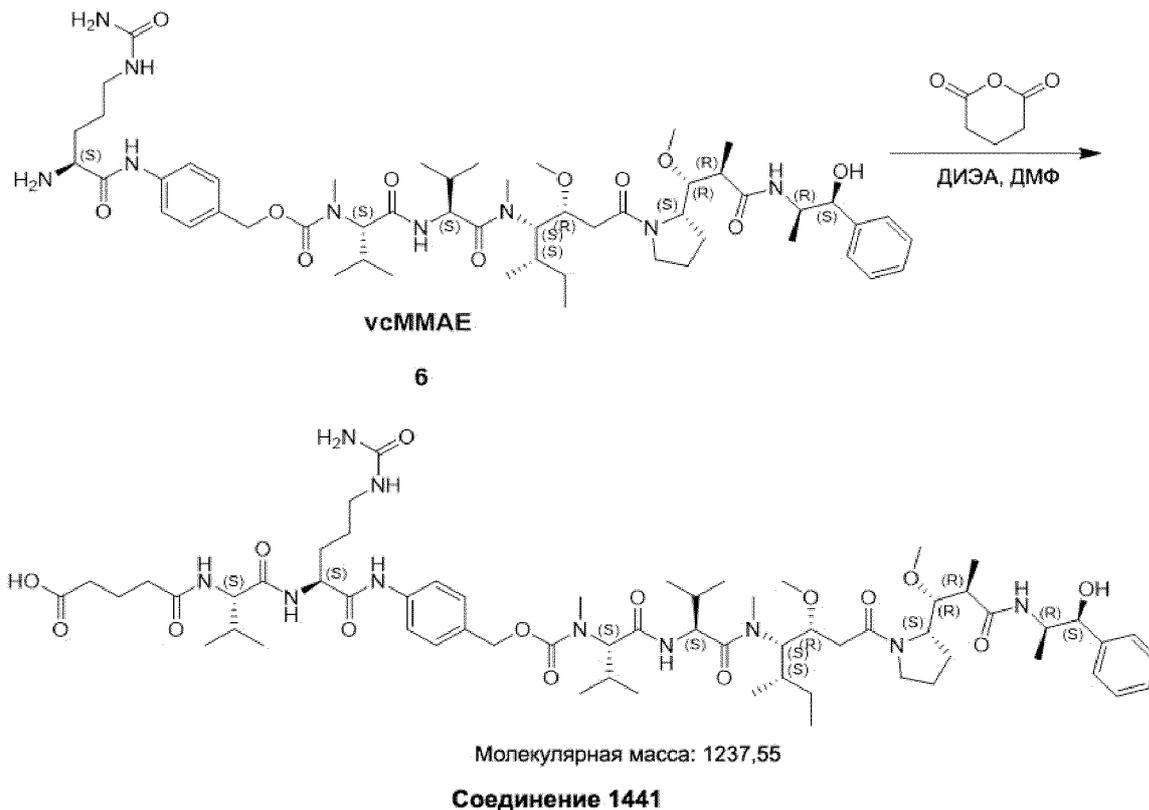




[402] В раствор промежуточного соединения **39** (17,27 мг, 14,99 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (9,68 мг, 74,93 мкмоль, 13,05 мкл, 6,00 экв.) в ДМФ (0,5 мл) добавляли промежуточное соединение **7** (50,0 мг, 37,46 мкмоль, 2,50 экв.) при 20 °С. Затем реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075 % ТФУ/Н₂О; В: MeCN) напрямую с последующей лиофилизацией с получением соединения

1440 (31,7 мг, 8,68 мкмоль, 57,9 % выход, 98,3 % чистота) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,689 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 3591,39$, $[M + 2H]^{2+} = 1797,0$, $[M + 3H]^{3+} = 1197,9$, $[M + 4H]^{4+} = 898,8$, $[M + 5H]^{5+} = 719,8$.

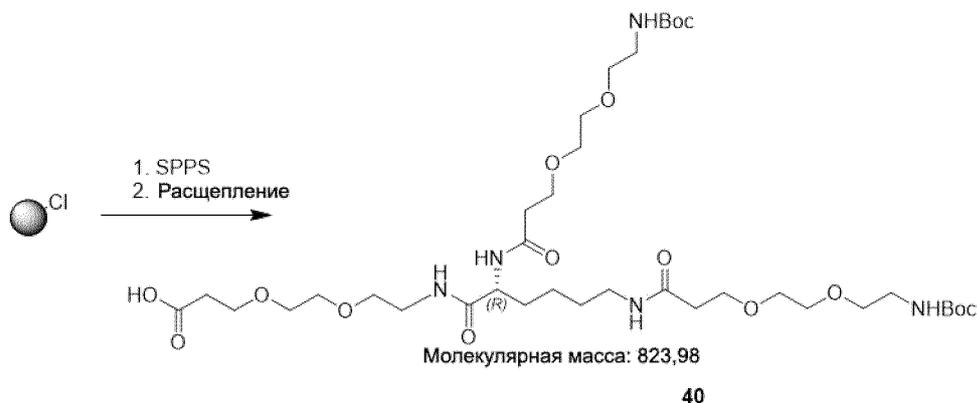
ПРИМЕР 15. Процедура для получения соединения 1441



[403] Смесь дигидро-2*H*-пиран-2,6(3*H*)-диона (6,09 мг, 53,41 мкмоль, 1,50 экв.), промежуточного соединения **6** (vcMMAE, 40,00 мг, 35,61 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (13,81 мг, 106,82 мкмоль, 18,61 мкл, 3,00 экв.) в ДМФ (0,4 мл) перемешивали при 20 °С в течение 0,5 ч. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (А: 0,075 % ТФУ/Н₂О; В: MeCN) напрямую с последующей лиофилизацией с получением соединения **1441** (34,5 мг, 27,26 мкмоль, 76,5 % выход, 97,8 % чистота) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,983 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 1237,83$, $[M + H]^+ = 1238,8$, $[M + 2H]^{2+} = 619,6$.

ПРИМЕР 16. Процедура для получения соединения 1574

Получение промежуточного соединения 40:

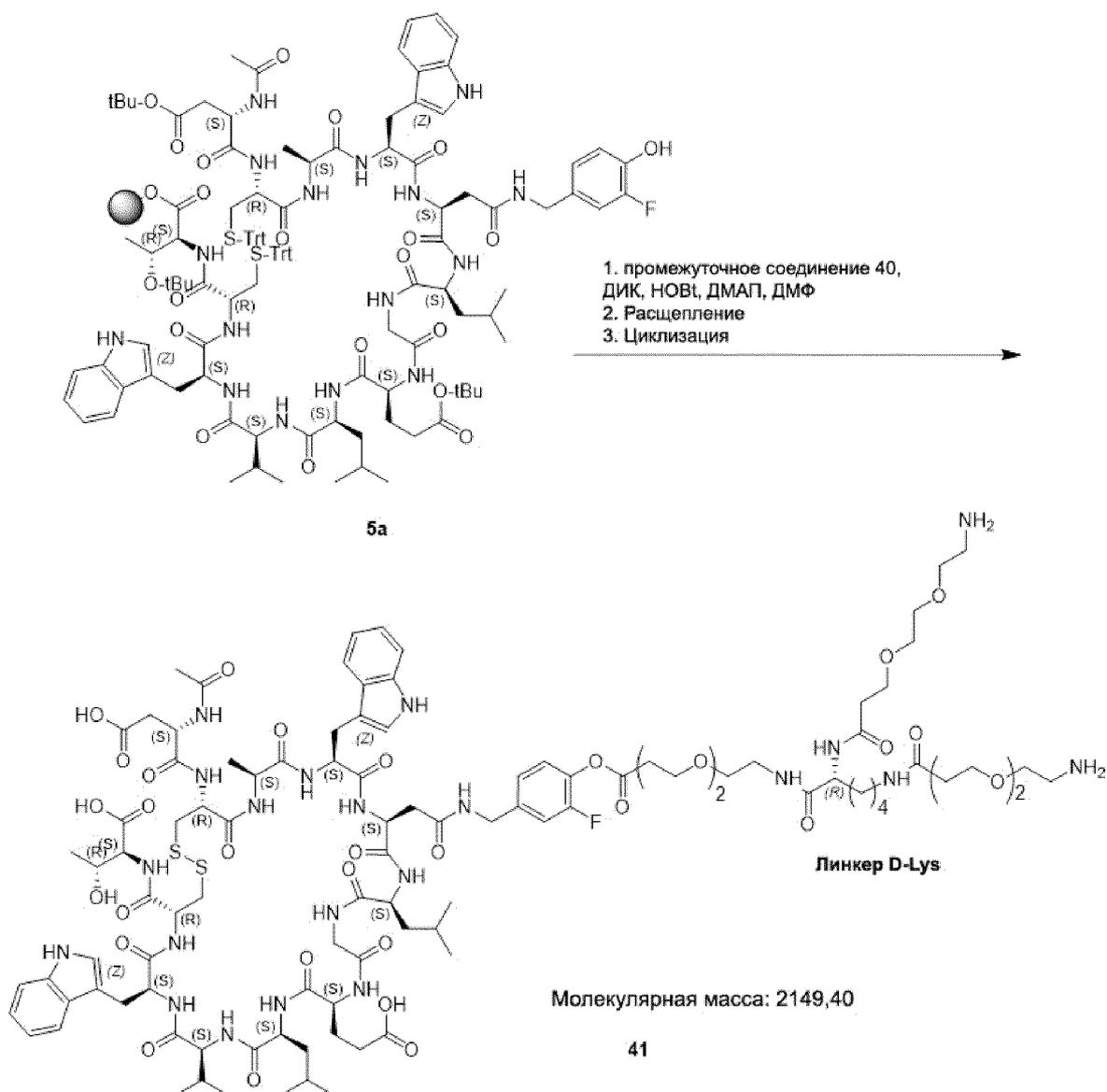


[404] Промежуточное соединение **40** синтезировали, следуя процедуре для синтеза соединения 1106.

Таблица 4: Перечень аминокислот и соответствующие реагенты, используемые на SPPS		
№	Материалы	Реагенты для сочетания
1	Fmoc-HN-PEG ₂ -CH ₂ CH ₂ COOH (1,00 экв.)	ДИЭА (4,00 экв.)
2	Fmoc-D-Lys(Fmoc)-OH (3,00 экв.)	ГБТУ (2,85 экв.) и ДИЭА (6,00 экв.)
3	Fmoc-HN-PEG ₂ -CH ₂ CH ₂ COOH (4,00 экв.)	НАТУ (3,80 экв.) и ДИЭА (8,00 экв.)
4	Вос ₂ O (6,00 экв.)	ДИЭА (12,00 экв.)

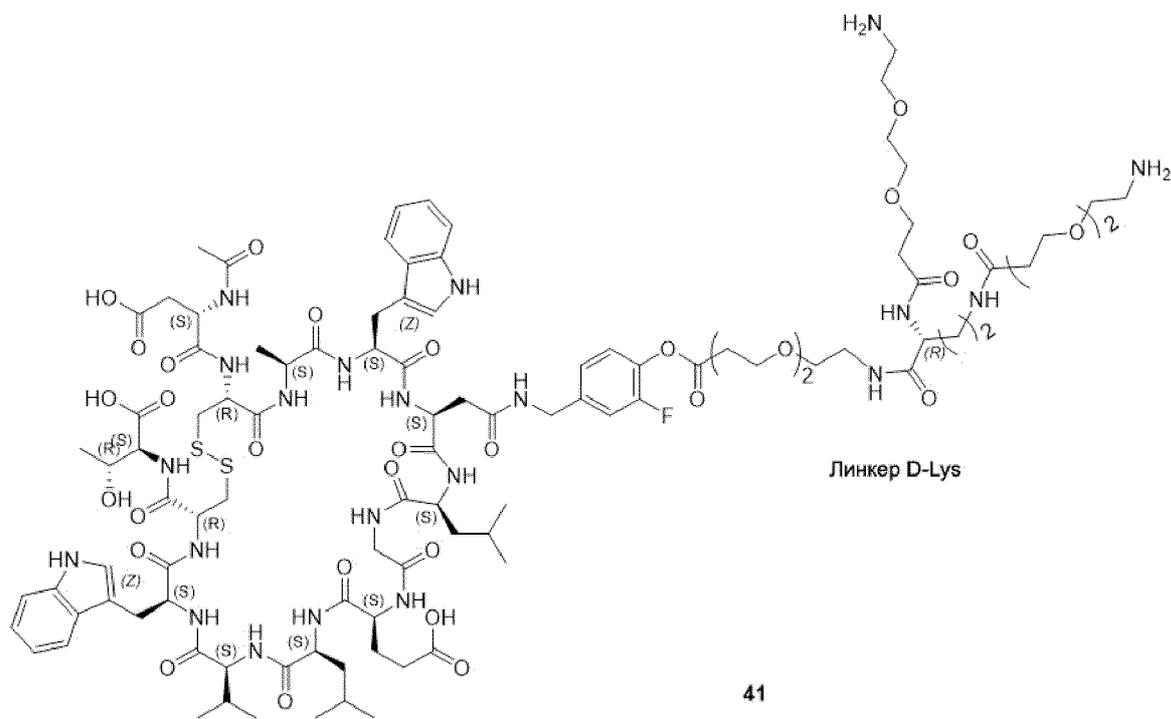
[405] 3,0 ммоль смолы дало промежуточное соединение **40** (2,46 г, неочищенное) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 0,484 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 823,97$, $[M + H]^+ = 825,49$, $[M - \text{Вос} + H]^+ = 724,37$.

Получение промежуточного соединения 41:

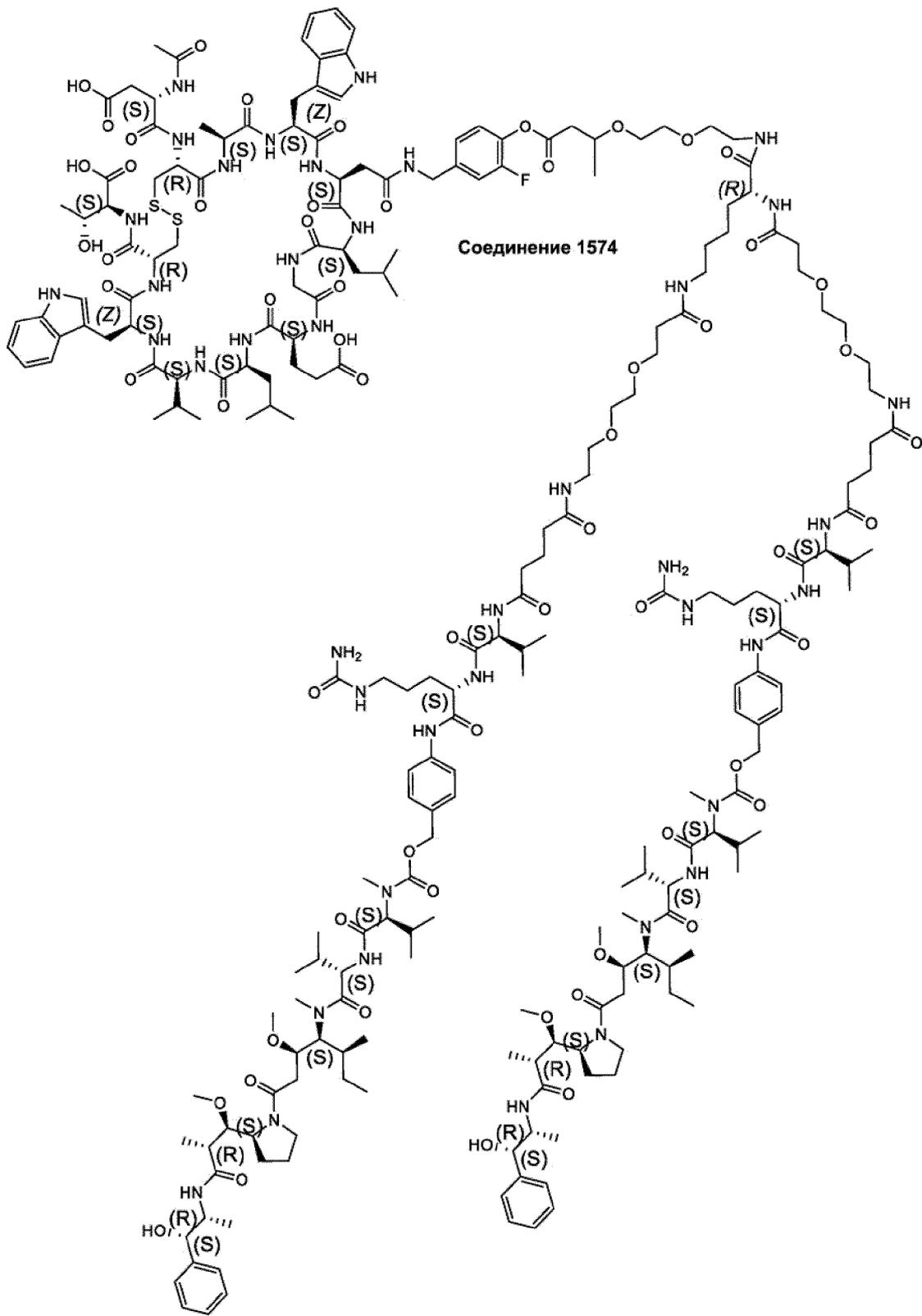


[406] Промежуточное соединение **41** синтезировали, следуя процедуре, описанной в синтезе промежуточного соединения **5**, с обработкой промежуточного соединения **40**. 0,50 ммоль смолы СТС дало промежуточное соединение **41** (148,1 мг, 90,0 % чистота, 12,9 % выход) в виде белого твердого вещества.

Получение соединения 1574:



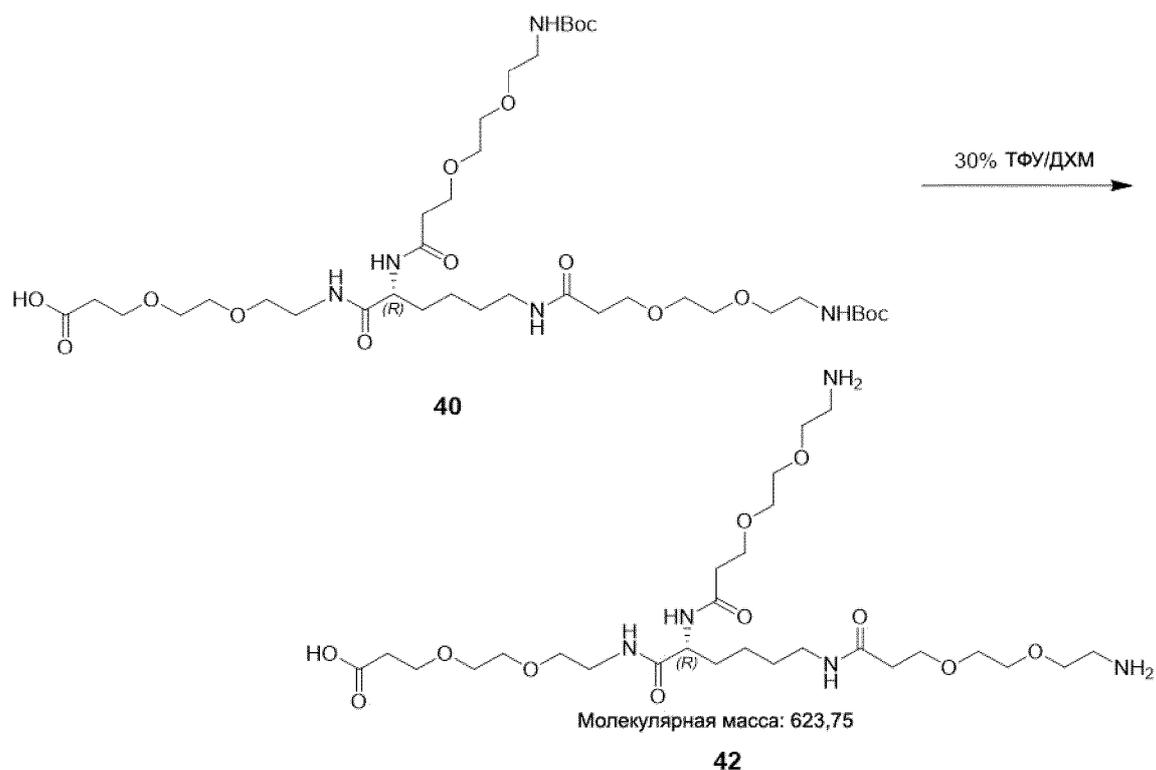
41



[407] В смесь **промежуточного соединения 41** (50,00 мг, 23,58 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (18,29 мг, 141,48 мкмоль, 24,64 мкл, 6,00 экв.) в ДМСО (600 мкл) добавляли **промежуточное соединение 7** (77,49 мг, 51,88 мкмоль, 2,20 экв.) при 20 °С. Затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. ЖХМС показала полный расход реагента, а один главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) с получением **соединения 1574** (85,0 мг, 17,49 мкмоль, 74,1 % выход, 97,1 % чистота) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: RT = 1,856 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 4718,58$, $[M + 3H]^{3+} = 1573,8$, $[M + 4H]^{4+} = 1180,6$, $[M + 5H]^{5+} = 944,7$.

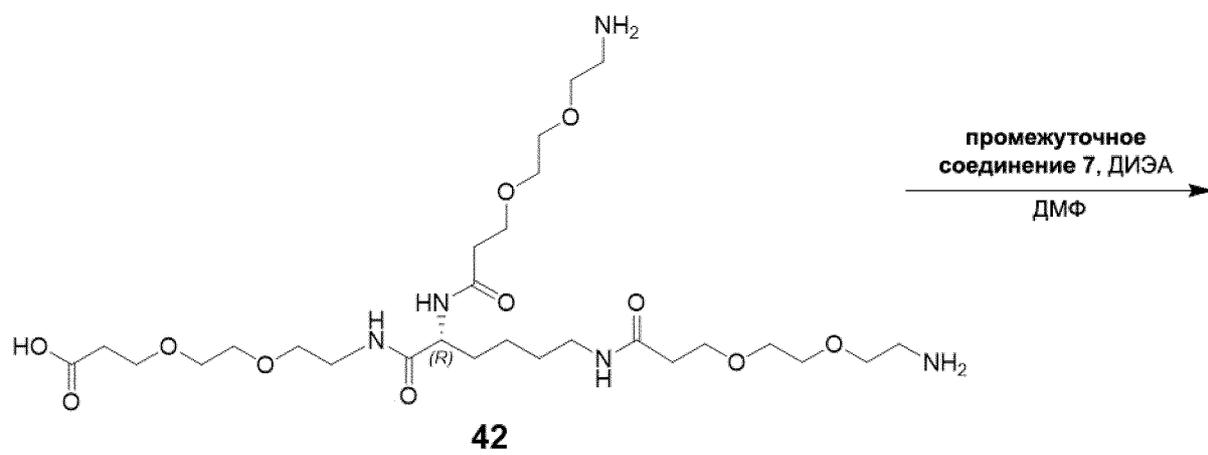
ПРИМЕР 17. Процедура для получения соединения 1575

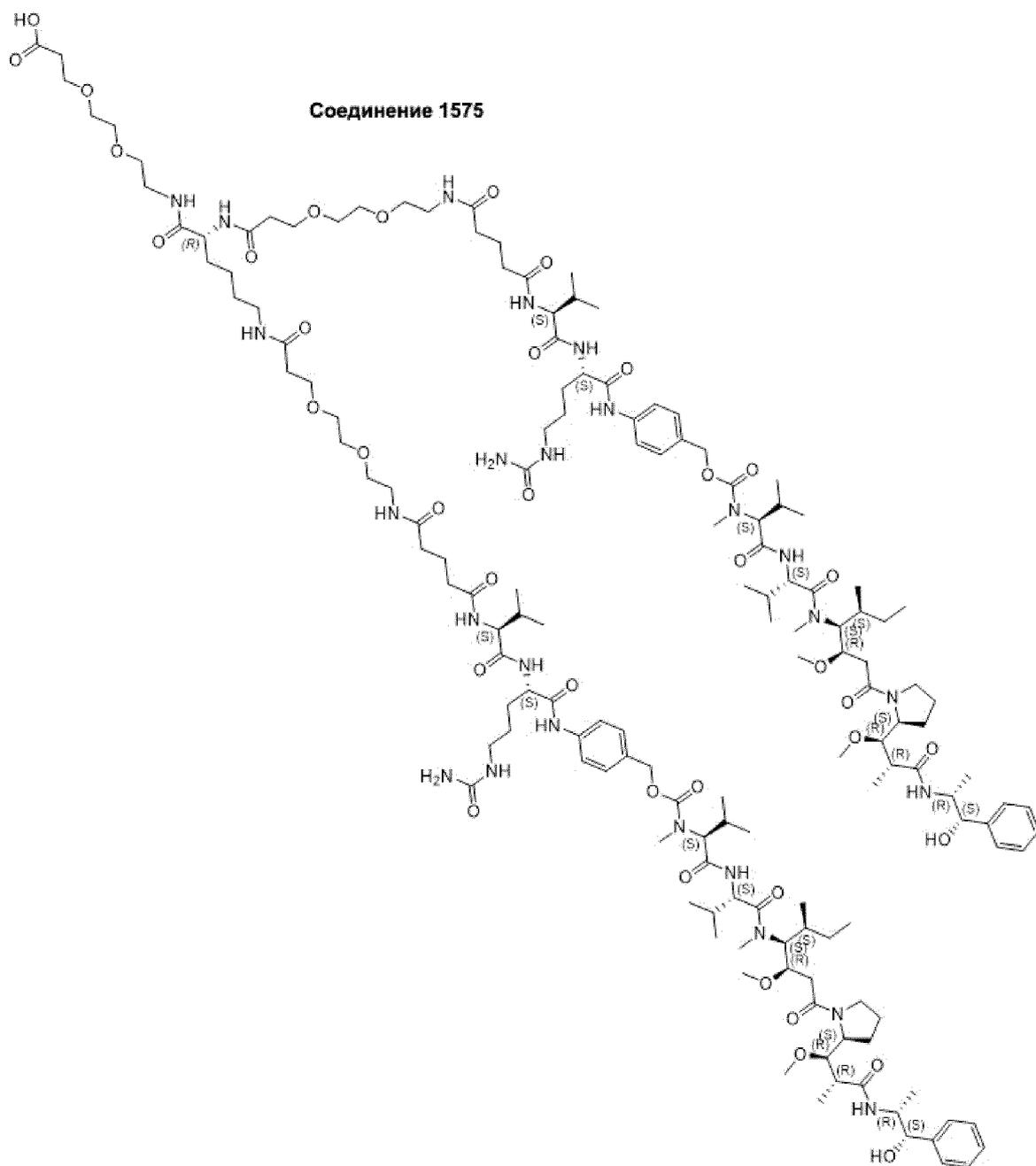
Получение промежуточного соединения 42:



[408] Смесь **промежуточного соединения 40** (0,20 г) в ТФУ/ДХМ (3/7, об./об., 4 мл) перемешивали при 20 °С в течение 0,5 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток лиофилизировали с получением **промежуточного соединения 42** (0,20 г, неочищенное, соль ТФУ) в виде бесцветного масла. ЖХМС: RT = 0,637 мин, МС рассчит.: $M_{av} = 623,74$, $[M + H]^+ = 624,5$.

Получение соединения 1575:

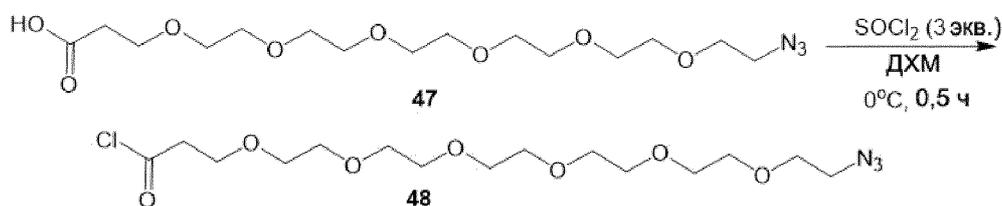




[409] В смесь **промежуточного соединения 42** (10,00 мг, 16,03 мкмоль, 1,00 экв.), ДИЭА (12,43 мг, 96,19 мкмоль, 16,76 мкл, 6,00 экв.) в ДМСО (600 мкл) добавляли **промежуточное соединение 7** (47,07 мг, 35,27 мкмоль, 2,20 экв.) при 20 °С. Затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 ч. ЖХМС показала полный расход реагента, а один главный пик соответствовал необходимой МС. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ) с получением **соединения 1575** (28,90 мг, 9,22 мкмоль, 57,5 % выход, 97,7 % чистота) в виде белого твердого

[413] Три реакции проводили параллельно. В раствор **соединения 46** (6 г, 11,46 ммоль, 1 экв.) в ДХМ (120 мл) добавляли HCl/диоксан (4 М, 48,00 мл, 16,76 экв.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 0,5 ч. ТСХ (дихлорметан: метанол = 10: 1 R_f = 0,1) показала, что реакция была завершена. Три реакции проводили вместе. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, ДХМ: MeOH = от 200/1 до 1/1). **Соединение 7** (10 г, 21,39 ммоль, 62,22 % выход) получали в виде желтого масла.

ПРИМЕР 19. Синтез дополнительных линкеров

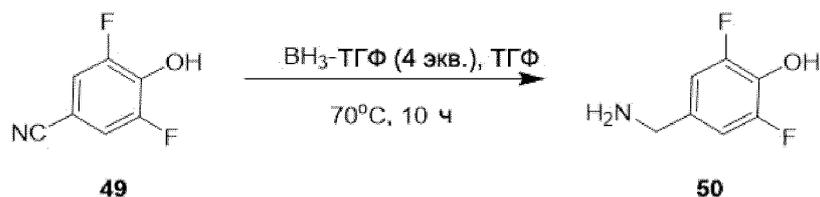


Получение соединения 48:

[414] Смесь **соединения 47** (140 мг, 369,00 мкмоль, 1 экв.), SOCl₂ (131,70 мг, 1,11 ммоль, 80,30 мкл, 3 экв.) в ДХМ (2 мл) при 0 °С дегазировали и продували N₂ 3 раза, а затем смесь перемешивали при 0–20 °С в течение 0,5 ч в атмосфере N₂. ТСХ (дихлорметан: метанол = 10:1 R_f = 0,46) показала, что **соединение 47** было полностью израсходовано. Реакционную смесь концентрировали с получением неочищенного продукта. **Соединение 48** (146,81 мг, неочищенное) получали в виде желтого масла.

ПРИМЕР 6. Получение дифторфенильной реактивной группы с линкером

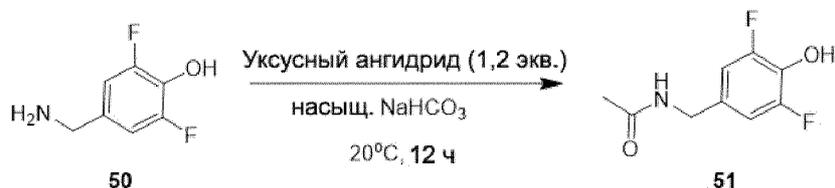
Получение соединения 50:



[415] NH₃-ТГФ (1 М, 25,79 мл, 4 экв.) аккуратно добавляли в раствор **соединения 49** (1 г, 6,45 ммоль, 1 экв.) в безводном ТГФ (70 мл). Полученный раствор перемешивали и нагревали до рефлюкса в течение 10 ч (70 °С). ТСХ (петролейный эфир: этилацетат=1:1, R_f = 0,01) показала, что **соединение 49** было полностью израсходовано и образовалось одно новое пятно. После охлаждения смеси в раствор аккуратно добавляли 6 н. HCl (2 мл) и продолжали нагревание при

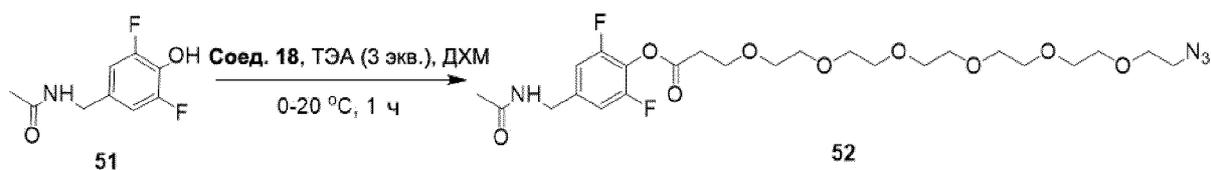
рефлюксе в течение 30 мин. Смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. **Соединение 50** (2,5 г, неочищенное, HCl) получали в виде белого твердого вещества.

Процедура для получения соединения 51:

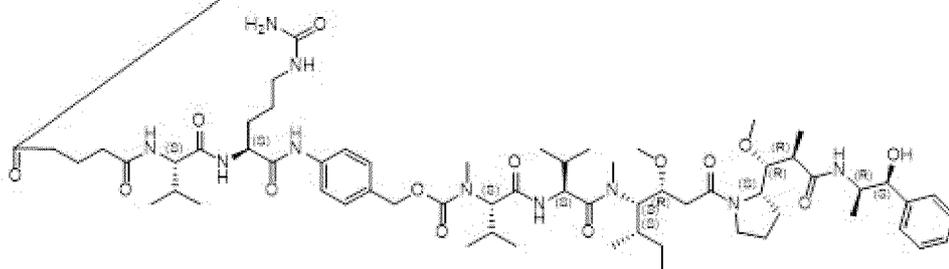
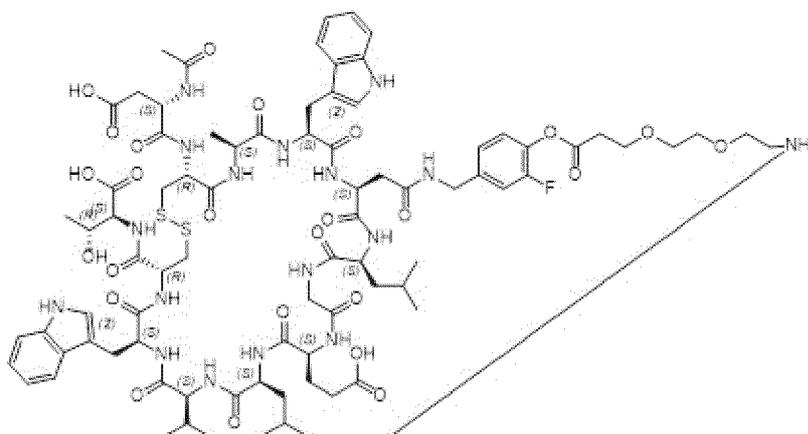


[416] Смесь **соединения 50** (270 мг, 690,20 мкмоль, 1 экв., HCl), уксусного ангидрида (84,55 мг, 828,25 мкмоль, 77,57 мкл, 1,2 экв.) в NaHCO₃ (5 мл) дегазировали и продували N₂ 3 раза, а затем смесь перемешивали при 20 °С в течение 24 ч в атмосфере N₂. ЖХМС показала, что исходный материал был полностью израсходован. ТСХ показала, что **соединение 50** было полностью израсходовано. Реакционную смесь подкисляли до pH 4–5 с помощью 1 М HCl. Реакционную смесь экстрагировали EtOAc (30 мл*2). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (30 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, петролейный эфир: этилацетат = от 10:1 до 1:3). **Соединение 51** (67 мг, 333,05 мкмоль, 48,25 % выход) получали в виде белого твердого вещества. **ЖХМС:** RT = 0,609 мин, МС рассчит.: 201,0, [M+H]⁺ = 202,2. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ м. д. 9,99 (с, 1 H) 8,28 (шир. с, 1 H) 6,83–6,93 (м, 2 H) 4,12 (д, J = 5,95 Гц, 2 H) 1,84 (с, 3 H).

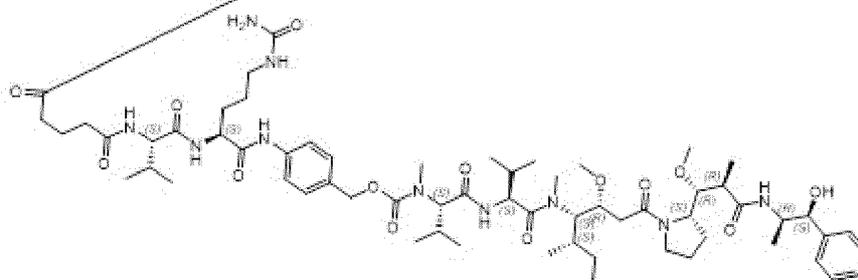
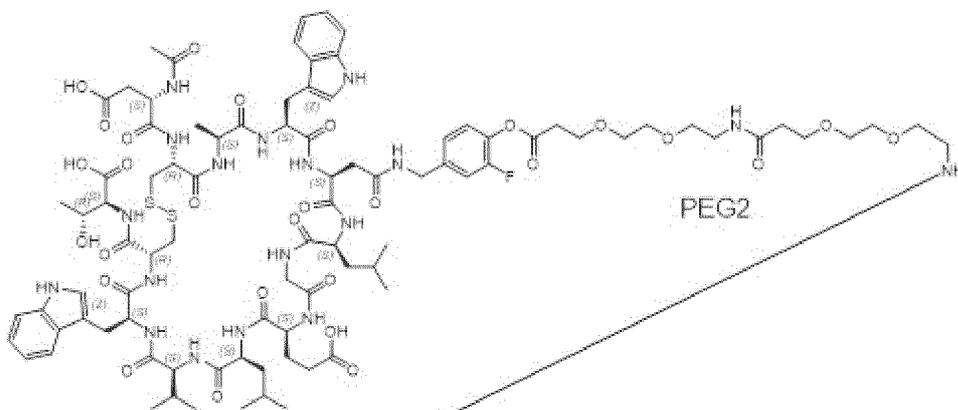
Получение соединения 52:



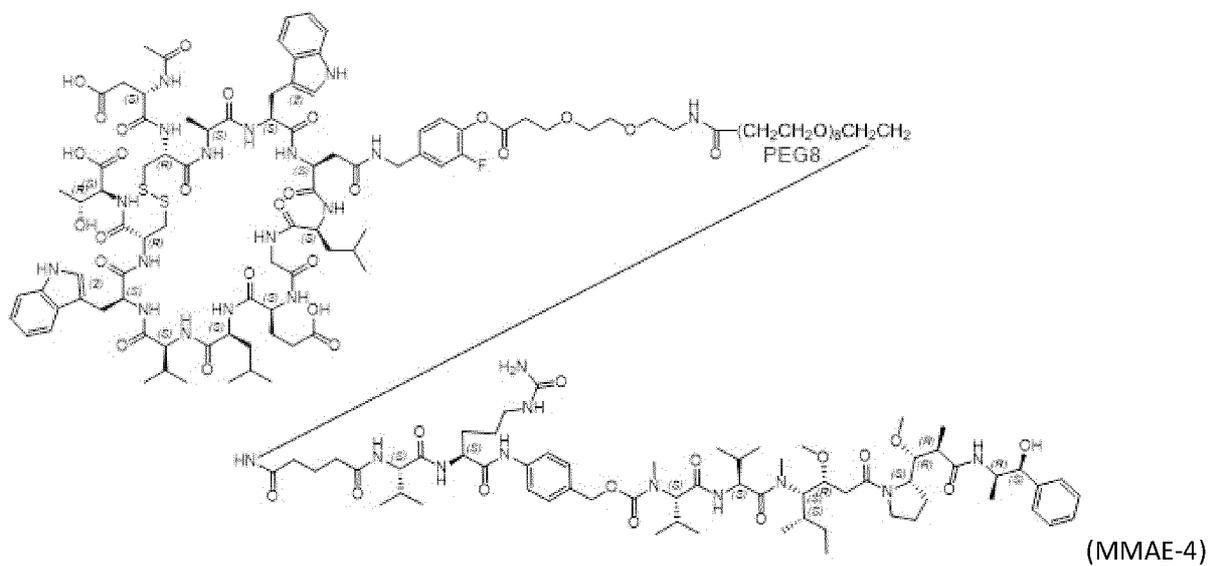
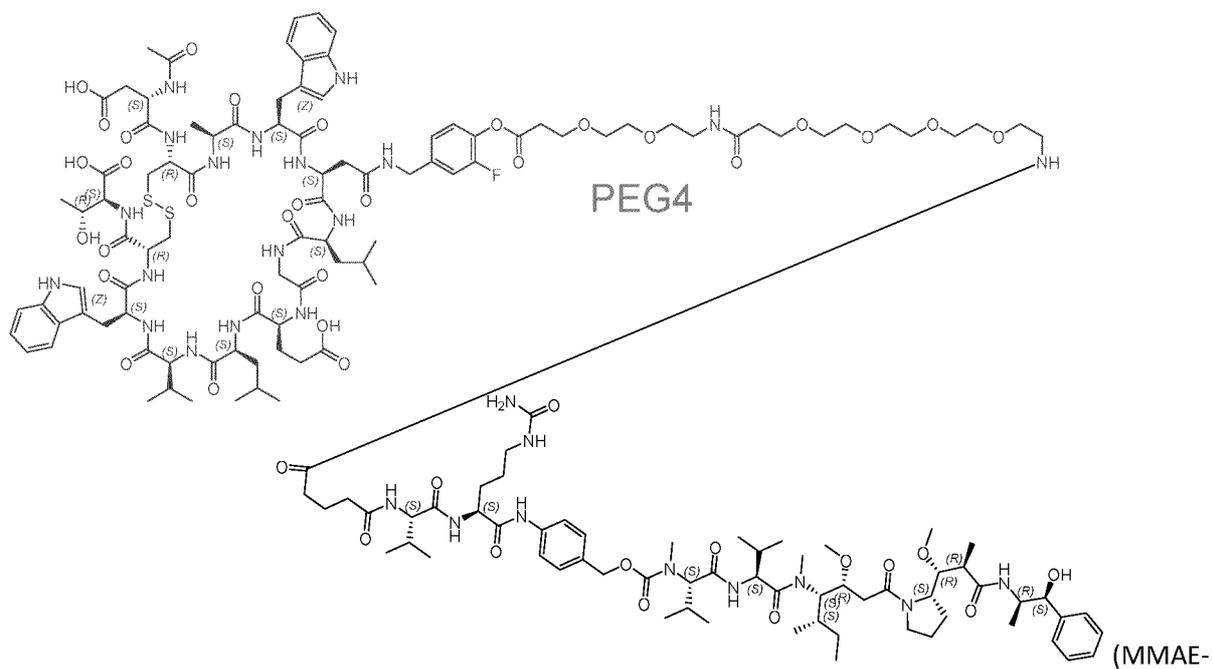
[417] В раствор **соединения 51** (67 мг, 333,05 мкмоль, 1 экв.) в ДХМ (1 мл) добавляли ТЭА (101,10 мг, 999,16 мкмоль, 139,07 мкл, 3 экв.), а затем добавляли **соединение 48** (145,76 мг, 366,36 мкмоль, 1,1 экв.) в ДХМ (1 мл) при 0 °С. Полученную смесь перемешивали при 20 °С в течение 2 ч. ЖХМС показала, что исходный материал был полностью израсходован. Реакционную смесь фильтровали, а фильтрат концентрировали. Неочищенный продукт очищали посредством обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонок: Welch Ultimate AQ-C18 150*30 мм*5 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1 % ТФУ) – АЦН]; В %: 35 %–65 %, 12 мин). **Соединение 52** (100 мг, 177,76 мкмоль, 53,37 % выход) получали в виде белого желтого масла. **ЖХМС:** RT = 2,129 мин, МС рассчит.: 562,2, [M+H]⁺

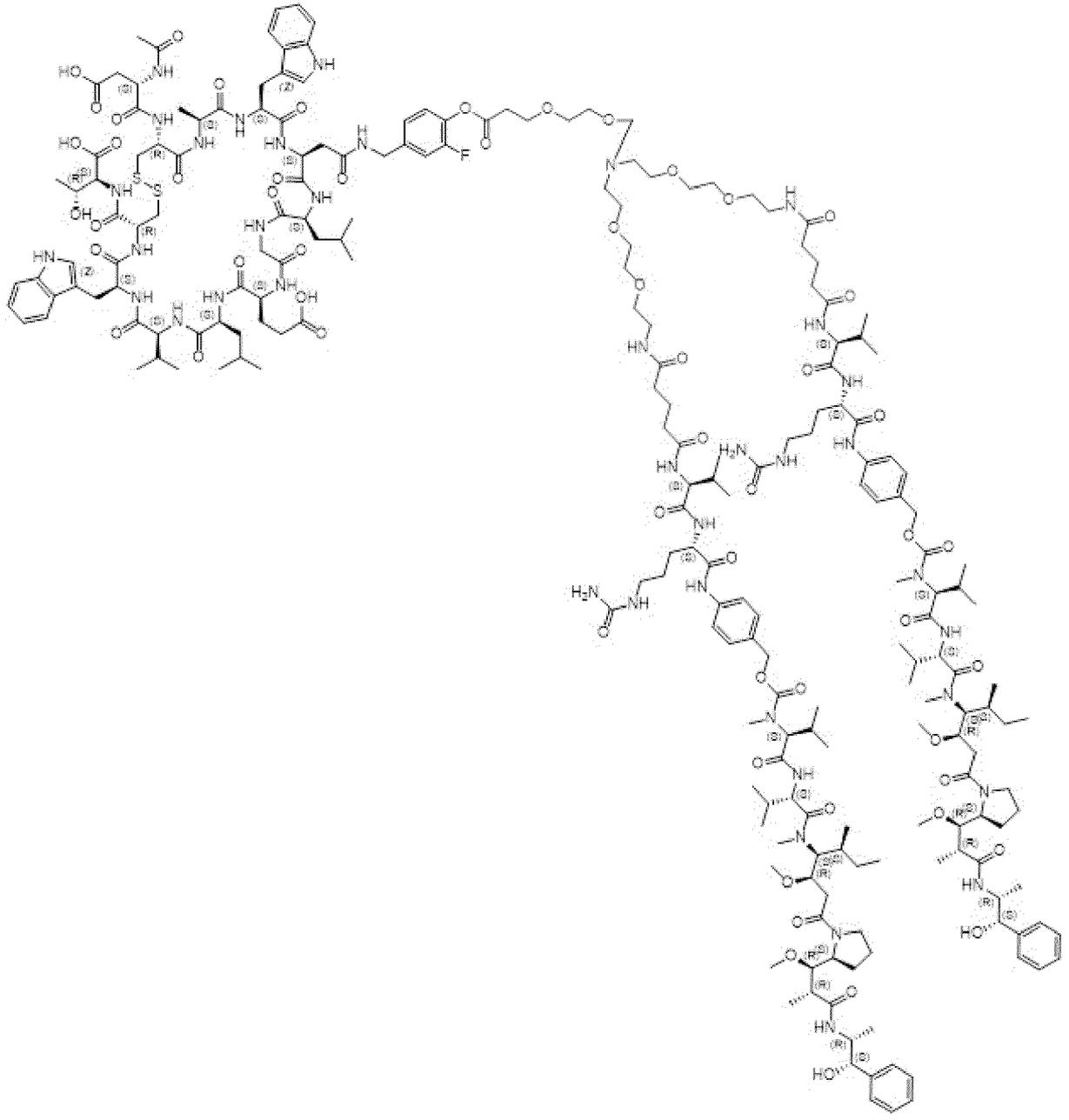


(MMAE-1)

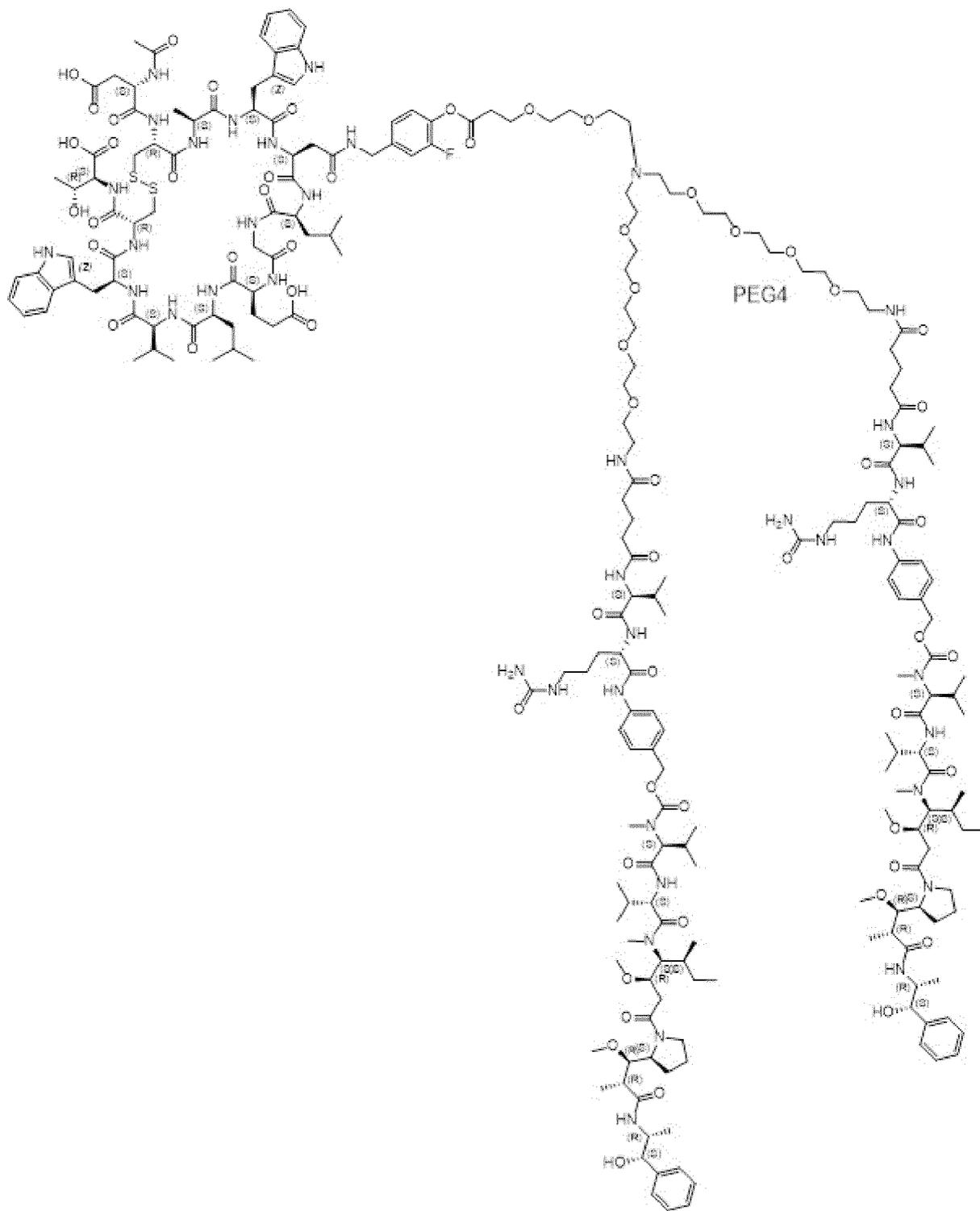


(MMAE-2)

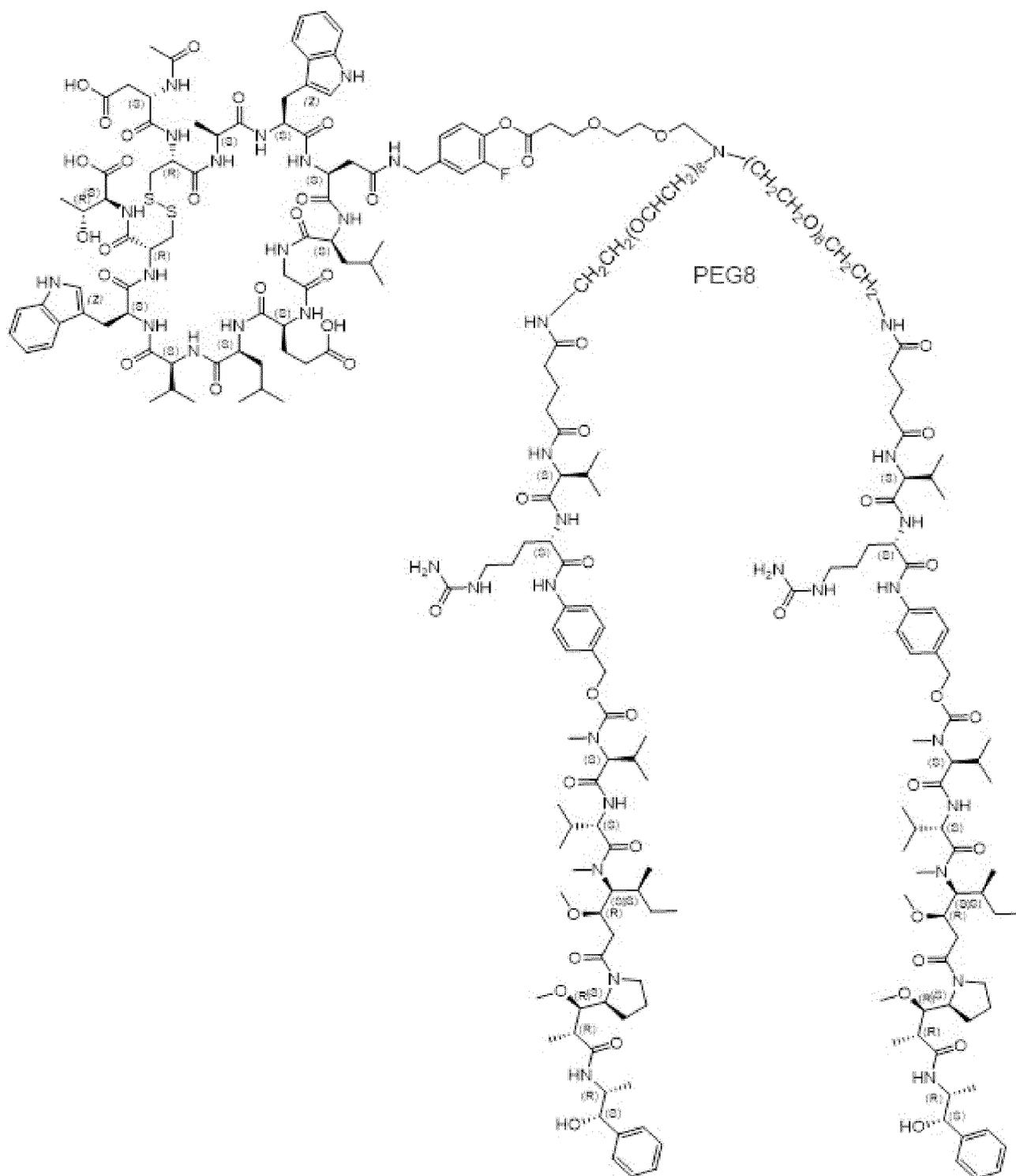




(MMAE-5)



(MMAE-6)



(MMAE-7)

ПРИМЕР 22. Способ оценки соотношения лекарственный препарат – антитело

[422]

Помимо прочего, предложенные методики могут обеспечить повышенную

эффективность (например, более высокие уровни и/или выход) и/или селективность для конъюгации монометилауристатина, такого как ММАЕ, с антигеном-мишенью. Данные некоторых оценок приведены в данном документе в качестве примеров.

[423] В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой белковый агент. В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой агент на основе антитела. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены методики для конъюгации представляющих интерес фрагментов с антителами, например, брентуксимабом, энфортумабом и т. д.

[424] В некоторых вариантах осуществления реакционные партнеры, например соединения формулы R-I или, более конкретно, ММАЕ-1-ММАЕ-7, приведенные в пр. 8 ниже, растворены в ДМСО до 5 мМ исходного раствора.

[425] В некоторых вариантах осуществления реакции проводят с 300 микрограммами антитела. В некоторых вариантах осуществления можно использовать различные условия, включая различные буферы, эквиваленты реагентов, время реакции, температуру реакции и реакционные концентрации.

[426] Как пример, одна реакция представляет собой 300-микролитровую реакцию с 1 мг/мл антитела в ФСБ. Реакционный партнер по изобретению, такой как ММАЕ-1 (1 микролитр 5 мМ исходного раствора в ДМСО, 2,5 молярных эквивалентов относительно даратумумаба), разводят в 284 микролитрах буфера ФСБ (10 мМ фосфат, 150 мМ хлорид натрия, pH 7,4), затем в реакционную смесь добавляют 15 микролитров антитела к CD30, такого как брентуксимаб (20 мг/мл исходный раствор) с последующей инкубацией при комнатной температуре в темноте. Через 4 ч проводят замену реакционного буфера, используя центрифужный фильтр Amicon Ultra (НОММ 30 кДа, объем 0,5 мл). Сначала для замены буфера используют глициновый буфер (100 мМ, pH 2,1), чтобы гарантировать диссоциацию связывающих мишень фрагментов после реакции. Затем для дополнительной замены буфера и хранения используют фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7,4).

[427] В другом примере реакция представляет собой 300-микролитровую реакцию с 1 мг/мл антитела в боратном буфере. Реакционный партнер (1,2 микролитр 5 мМ исходного раствора в ДМСО, 3,0 молярных эквивалентов относительно МАВ) разводят в 284 микролитрах боратного буфера (100 мМ борат, pH 8,3), затем в реакционную смесь добавляют 15 микролитров даратумумаба (20 мг/мл исходный раствор) с последующей инкубацией при комнатной температуре в темноте. Через 20 ч проводят замену реакционного буфера, используя

центрифужный фильтр Amicon Ultra (НОММ 30 кДа, объем 0,5 мл). Сначала для замены буфера используют глициновый буфер (100 мМ, рН 2,1), чтобы гарантировать диссоциацию связывающих мишень фрагментов после реакции. Затем для дополнительной замены буфера и хранения используют фосфатно-солевой буферный раствор (10 мМ фосфат, 150 мМ хлорид натрия, рН 7,4).

[428] В соответствии с настоящим изобретением для оценки результатов реакции можно использовать различные методики.

[429] Предложенные методики, помимо прочего, могут обеспечить повышенную эффективность конъюгации и селективность без лишних этапов реакции. В некоторых вариантах осуществления предложенные методики позволяют селективно конъюгировать необходимые представляющие интерес фрагменты в селективных остатках агентов на основе антител. Помимо прочего, методики по настоящему изобретению могут обеспечить получение агентов с улучшенными свойствами и/или активностью (например, улучшенной чистотой, гомогенностью и т. д.) с высокой эффективностью.

[430] В некоторых вариантах осуществления применимой методикой является анализ DAR на основе поглощения. DAR (соотношение лекарственный препарат – антитело, соотношение представляющих интерес фрагментов и фрагментов агента-мишени (например, фрагментов агента на основе антитела) можно рассчитывать для различных конъюгатов антител, например, в различных способах скрининга/оценки реагента. Различные агенты, содержащие связывающие мишень фрагменты, оценивают в отношении эффективности конъюгации как реакционные партнеры с мишенями, например, белковые агенты, такие как агенты на основе антител, по сравнению с реагентами с такими же самыми реактивными группами, но без связывающих мишень фрагментов. В различных способах определения соотношения «лекарственный препарат»/представляющий интерес фрагмент представляет собой краситель флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), конъюгированный с агентами-мишенями, например, агентами на основе антител. Молярное соотношение DAR определяют как соотношение количества молей лекарственного препарата/представляющего интерес фрагмента к количеству молей агента-мишени/антитела. Молярность рассчитывают по поглощению ФИТЦ (A_{485}) и антитела (A_{280}) конъюгированного продукта и коэффициентов экстинкции ФИТЦ и антитела, используя закон Бэра — Ламберта. Корректировочный коэффициент 0,35 используют для корректировки относительно поглощения ФИТЦ на 280 нм. Для измерений поглощения используют микропланшетный ридер Biotek Synergy H1 и микрообъемный планшет Take3. Концентрация антитела должна составлять по меньшей мере 3 мг/мл для оптимального соотношения сигнала и шума в результатах.

ПРИМЕР 23. Методики для определения сайтов конъюгации антитела

Е. Предложенные методики обеспечивают существенно улучшенную селективность.

[431] Помимо прочего, предложенные методики могут обеспечить существенно улучшенную селективность в отношении сайтов конъюгации, когда агенты-мишени имеют несколько сайтов, доступных для конъюгации. Например, как продемонстрировано в данном документе, в различных условиях различные предложенные методики обеспечивают селективную конъюгацию в определенных цепях агентов на основе антител и/или селективных остатках агентов на основе антител.

[432] В некоторых вариантах осуществления используют вестерн блоттинг для оценки участков конъюгации антител (например, тяжелая цепь, легкая цепь и т. д.). Некоторые данные представлены на фигурах. Как показано, методики по настоящему изобретению могут обеспечивать различные уровни селективности. В некоторых вариантах осуществления различные методики обеспечивают селективность в отношении тяжелых цепей по сравнению с легкими цепями.

[433] В некоторых вариантах осуществления для вестерн блоттинга образцы сначала проводят через денатурирующий гель NuPage (например, Invitrogen, NP0321). Образцы загружают в количестве 50 нг на лунку. После разделения полос гель переносят на нитроцеллюлозную мембрану (Invitrogen, IB23002), используя iBlot. Мембрану блокируют 5 % сухим молоком в буфере ФСБТ (ФСБ, pH 7,4, с 0,1 % Твин 20). В некоторых вариантах осуществления для выявления конъюгированных с флуоресцеином легких и тяжелых цепей первичное антитело представляет собой мышиное антитело к флуоресцеину (EMD Millipore, MAB045) в разведении 1:2500, а вторичное антитело представляет собой козье антитело к мышиному IgG, конъюгированное с HRP (Southern Biotech, 1038-05) в разведении 1:20000. Выявление реагента для антител на нитроцеллюлозной мембране проводят, используя хемилюминесцентный субстрат SuperSignal West Femto (Thermo Fisher, 34096). Мембрану визуализируют на Azure Biosystems c500 для получения хемилюминесцентного сигнала.

[434] В некоторых вариантах осуществления методики для оценки предложенных методик представляют собой или включают масс-спектрометрию, необязательно с хроматографическими методиками (например, ВЭЖХ, УВЭЖХ и т. д.). Например, различные агенты-продукты оценивали методом масс-спектрометрии, например, в некоторых вариантах осуществления, используя систему Sciex X500 QTOF, оснащенную колонкой Agilent ZORBAX RRHD (300SB-C8, 2,1x50 мм, 1,8 мкм). В некоторых вариантах осуществления жидкостную

хроматографию используют вместе с МС. В одном примере: буферами подвижной фазы были А = 0,1 % муравьиная кислота в воде, В = ацетонитрил. Условиями по протоколу были 0–1 мин, 2 % В; 1–7 мин, 2–40 % В; 7–7,5 мин, 40–80 % В; 7,5–9 мин, 80 % В; 9–9,5 мин, 80–2 % В; 9,5–10,5 мин, 2 % В; скорость потока составляла 0,25 мл/мин; концентрация конъюгатов составляла 0,1 мг/мин; объем введения составлял 0,01 мл. В некоторых вариантах осуществления используют набор BioTool для интактного масс-анализа. В некоторых вариантах осуществления массовый диапазон составляет 147000–155000, а m/z — 2200–3400.

[435] В некоторых вариантах осуществления используют анализ пептидного картирования для оценки предложенных технологий. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное и неконъюгированное антитело расщепляют на пептиды, используя трипсин, а пептиды, содержащие конъюгацию, количественно оценивают по ионной массе. В некоторых вариантах осуществления расщепление трипсином проводят, как описано ниже:

1. Аликвотируют 25–50 мкг образца общего белка в чистую пробирку Эппендорфа с низким связыванием.
2. Заменяют буфер для образцов на буфер для расщепления Smart, используя гель-фильтрационные колонки с НОММ 7 кДа и протокол, предоставленный Thermo Scientific.
3. При необходимости в образец с замененным буфером добавляют буфер для расщепления Smart для достижения конечного объема 100 мкл.
4. Добавляют 5 мкл трипсинового раствора Smart в образец с замененным буфером.
5. Проводят расщепление белка в течение 15 мин при 70°C на сухой бане (в лунки добавляют воду, чтобы гарантировать надлежащий теплоперенос в образец).
6. Забирают образец с бани и оставляют охлаждаться до комнатной температуры.
7. В белковый образец добавляют 1 мкл раствора TCEP для разрушения связей.
8. Инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут (с защитой от света).
9. В образец добавляют 10 мкл 5 % водного раствора TФУ для подкисления и перемешивают на вортексе.
10. Образец центрифугируют в течение 3 минут на настольной центрифуге при 12000 оцу.
11. Образец переносят в чистую пробирку автоматического пробоотборника, осторожно, чтобы не взбаламутить какой-либо нерасщепленный белковый осадок.

[436] В некоторых вариантах осуществления установки инструмента для анализа представляют собой:

ЖХ: Waters Acquity I-Class UPLC

Подвижная фаза: А: 0,05 % водный раствор ТФУ; В: 0,05 % ТФУ в ацетонитриле

Колонка: колонка ACQUITY UPLC Peptide BEH C18, 300 Å, 1,7 мкм, 2,1 мм X 100 мм

Градиент: Выдержка 2 % В в течение 1-ой минуты; 2–65 % В в течение 1–60 минут

МС: Thermo LTQ Orbitrap Velos Pro MS1, исходные ионы, разрешение 30000 при 400 Да; диапазон: 300–2000 Да, использование фиксированной массы, чтобы гарантировать точность в пределах 5 м. Д.

Зависимый от данных метод с порогом общего числа ионов 20000 для инициации фрагментации исходного иона. Энергия столкновения 35 еВ (стандартная энергия столкновения для пептидного картирования).

[437] В некоторых вариантах осуществления селективно происходит в K246/K248 тяжелых цепей антитела. В некоторых вариантах осуществления сайты конъюгации включают K246 тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления сайты конъюгации включают K248 тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления сайты конъюгации включают K288/K290 тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления сайты конъюгации включают K288 тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления сайты конъюгации включают K290 тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления сайты конъюгации включают K185 легких цепей. В некоторых вариантах осуществления сайты конъюгации включают K187 легких цепей. В некоторых вариантах осуществления сайты конъюгации включают K414 тяжелых цепей.

[438] Дополнительные данные подтвердили, что предложенные технологии могут обеспечивать эффективную и/или селективную конъюгацию с различными типами агентов на основе антител (например, агентами на основе моноклональных антител, агентами на основе поликлональных антител, агентами на основе пула антител, такими как агенты на основе антител IVIG, IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4, и т. д.). Специалистам в данной области техники, читающим настоящее изобретение, станет очевидно, что различные типы антител также можно конъюгировать с высокой эффективностью и/или селективностью в соответствии с настоящим изобретением (например, используя соединения и способы, которые включают подходящие связывающие мишень фрагменты для таких антител и различные реактивные фрагменты, а также, необязательно, линкерные фрагменты, описанные в данном документе). Применимый протокол для пептидного картирования описан ниже в качестве примера; специалистам в данной области

техники будет понятно, что в соответствии с настоящим изобретением можно также использовать другие протоколы, содержащие различные модификации и вариации описанного ниже протокола:

1. Провести количественную оценку белков, например, с помощью реагента Pierce 660.
2. В пробирках Эппендорфа с низким связыванием развести 10 мкг образца в 100 мкл Трис, 50 мМ, рН 8,0.
3. Восстановить образцы путем добавления 10 мМ ДТТ (дителиотреитола) в течение 15 минут при 60 °С в термостате.
4. Добавить 15 мМ йодацетамида для алкилирования при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте.
5. Погасить реакцию добавлением 10 мМ ДТТ.
6. Провести расщепление белков с помощью 0,33 мкг α -химотрипсина (Sigma) в течение ночи при 37 °С в термошейкере.
7. Подкислить образцы 2 мкл 100 % муравьиной кислоты.
8. Провести очистку образцов на обращенно-фазовой Strata-X SPE (Phenomenex). Элюировать пептиды 60 % ацетонитрилом с 2 % муравьиной кислотой.
9. Высушить элюированные пептиды в потоке азота.
10. Восстановить пептиды в 25 мкл подвижной фазы А.
11. Развести пептиды 1:10 в подвижной фазе А перед проведением ЖХ-МС, например, в соответствии с параметрами ниже.

[439] Инструмент для анализа в качестве примера:

ЖХ: Eksigent microLC200 (Sciex)

Подвижная фаза: А: 0,2 % муравьиная кислота и 3 % ДМСО в воде; В: 0,2 % муравьиная кислота и 3 % ДМСО в этаноле

Колонка: колонка Luna Omega PS, в. д. 0,3 мм, частицы 3 мкм, 100 мм (Phenomenex)

Градиент: 2–48 % В в течение 25 минут при скорости потока 6 мкл/минута.

МС: ABSciex TripleTOF 6600+

MS1 (диапазон 350–1250 Да), разрешение 35000

Метод DDA с порогом 500 имп./с.

[440] Как описано в данном документе, предложенные методики могут обеспечить высокоэффективную и/или селективную (например, в отношении сайтов конъюгации)

конъюгацию для различных типов агентов на основе антител (например, агентов на основе моноклональных антител, агентов на основе поликлональных антител или агентов на основе пула антител, таких как IVIG). Помимо прочего, в настоящем изобретении представлены данные, подтверждающие, что методики по настоящему изобретению могут обеспечить высокоэффективную и/или селективную конъюгацию антител IgG2 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления реакции проводили в боратном буфере, pH 8,2, 2,5 М экв. реагента к антителу, 20 ч, 25 °С. Специалистам в данной области техники, читающим настоящее изобретение, станет очевидно, что другие типы антител также можно конъюгировать с высокой эффективностью и/или селективностью в соответствии с настоящим изобретением (например, используя соединения и способы, которые включают подходящие связывающие мишень фрагменты для таких антител и различные реактивные фрагменты, а также, необязательно, линкерные фрагменты, описанные в данном документе).

ПРИМЕР 24. Предложенные агенты-продукты сохраняют свойства и функции агентов-мишеней.

[441] Помимо прочего, в предложенных методиках используют мягкие условия, короткие пути (например, отсутствие отдельного удаления связывающих мишень фрагментов) и т. д., обеспечивая конъюгацию в определенных сайтах и агенты-продукты, которые сохраняют одно или более или все необходимые свойства и/или виды активности агентов-мишеней (например, агентов на основе антител). Предложенные агенты, содержащие фрагменты агентов на основе антител, могут сохранять способность взаимодействовать с Fc-рецепторами (например, FcRn).

[442] Различные методики применимы для оценки свойств и/или видов активности агентов-мишеней (например, агентов на основе антител). Например, в некоторых вариантах осуществления можно использовать анализ ELISA, чтобы оценить связывание между предложенными агентами и FcRn-рецептором. Например, 96-луночный планшет с высокой степенью связывания (например, Costar 3922) покрывают нейтравидином (Thermo Fisher, 31000) в буфере ФСБ (pH 7,4), блокируют 5 % бычьим сывороточным альбумином в буфере ФСТБ, pH 7,4 (буфер ФСБ, pH 7,4 с 0,05 % твин 20) с последующей иммобилизацией белка FcRn с Avi-тегом (Acro Biosystems, FCM-H82W4) в буфере ФСТБ, pH 6,0. После промывки ФСБТ, pH 6,0, проводят связывание антитела (например, брентуксимаба и т. д.) и его конъюгатов с FcRn на планшете в ФСБТ, pH 6,0. Выявление всех связанных антител и конъюгатов проводили в ФСБТ, pH 6,0, используя антитело к F(ab)₂ человека, конъюгированное с HRP. Реагентом для выявления был хемилюминесцентный субстрат SuperSignal ELISA Pico (Thermo fisher, 37069) с последующим считыванием люминесценции на микропланшет-ридере Biotek Synergy H1.

ПРИМЕР 25. Предложенные методики обеспечивают эффективные реакции и удаление связывающих мишень фрагментов.

[443] Помимо прочего, в настоящем изобретении предложены методики для удаления агента, содержащего связывающий мишень фрагмент (например, продукта реакции, содержащего связывающий мишень фрагмент, высвобождаемого после реакции), из продукта реакции (например, продукта, содержащего компонент антитела или его фрагмент). В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение композиции, содержащей агент, содержащий связывающий мишень фрагмент и продукт реакции, причем связывающий мишень фрагмент взаимодействует с продуктом реакции, в контакт с кислым раствором. В некоторых вариантах осуществления после контакта с кислым раствором агент, содержащий связывающий мишень фрагмент, отделяется от продукта реакции. В некоторых вариантах осуществления pH раствора составляет около 1, 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления pH составляет 1. В некоторых вариантах осуществления pH составляет 2. В некоторых вариантах осуществления pH составляет 3. В некоторых вариантах осуществления pH составляет 4. Как показано на Фиг. 23, агенты, содержащие связывающий мишень фрагмент, высвобождаемый из реакции между I-44 и даратумумабом, можно эффективно удалять, например, при pH 2. Протокол описан ниже в качестве примера.

[444] В некоторых вариантах осуществления использовали масс-спектрометрический анализ осажденных метанолом конъюгатов антител для оценки конъюгатов антител, полученных согласно предложенным методикам. В некоторых вариантах осуществления использовали буферы с разным pH, чтобы удалить связанную уходящую группу из антитела (например, продуктов конъюгации антител) после конъюгации. В некоторых вариантах осуществления осаждение метанолом проводили, как описано ниже:

1. Объединить один объем очищенного конъюгата антитела и 3 объема метанола.
2. Инкубировать образец при 4 °C в течение 1 часа.
3. Центрифугировать при 15500 x g в течение 10 мин при 4 °C.
4. Восстановить супернатант и высушить в концентраторе SpeedVac.
5. Ресуспендировать в 0,1 % водном растворе муравьиной кислоты до 30 мкл.

[445] В некоторых вариантах осуществления установки инструмента для анализа представляли собой:

ЖХ: ExionLC

Подвижная фаза: А: 0,1 % водный раствор муравьиной кислоты; В: 0,1 % муравьиная кислота в 95 % ацетонитриле

Колонка: колонка Phenomenex Luna C18(2) (100 X 2, 3 мкм, 100 Å)

Градиент: Выдержка 5 % В в течение 1-ой минуты; 5–50 % В в течение 1–7 минут

МС: система Sciex X500B QTOF

Калибровку проводят с позитивным калибратором, используя систему CDS. Напряжение ИЭР 5,5 кВ, газ источника ионов 1 и 2 при 40 фунт/кв. дюйм, газовая завеса 30 (произвольные единицы), газ CAD 7 (произвольные единицы). Температура источника 350 °С, DP 100 В, время накопления 0,25 с, CE 0 В. Полное ВП-МС сканирование от m/z 300 до m/z 5000 в профильном режиме.

Для получения данных использовали Sciex OS 1.4.

ПРИМЕР 26. Способ конъюгации

Проводили замену буфера для необходимых антител (А = брентуксимаб и В = энфортумаб) с более чем 8 объемами разведения (ОР) с помощью 50 мМ буфера ГЭПЕС, pH 7,5. Концентрация антитела-мишени после замены буфера составляла > 14 мг/мл. Затем для каждого конъюгационного реагента готовили 10 мМ исходный раствор в ДМСО. Конъюгацию соответствующего реагента с антителом (А или В) проводили, используя 4 эквивалента реагента при концентрации антитела-мишени 10 мг/мл в 50 мМ буфере ГЭПЕС (pH 7,5) с 20 % (об./об.) ДМСО при 25 °С в течение 1–7 дней. Реакции конъюгации анализировали в отношении соотношения лекарственного препарата к антителу (DAR) методом ЖХ-МС каждые 24 ч. Когда DAR достигало > 1,9 (для линейных реагентов) или > 3,8 (для разветвленных реагентов), проводили замену буфера посредством УФДФ с 30 ОР на ФСБ, pH 7,4, до конечного диапазона концентрации приблизительно 5–9 мг/мл. Затем ADC анализировали в отношении качества в различных условиях. Результаты приведены в таблице 5.

ТАБЛИЦА 5. Результаты конъюгации										
Антитело/ соед.	Исх. (мг)	Агр. %	DAR	Выход %	Кол- во %	Конц., мг/мл	Эндо (EU/мг)	Ост. иАВТ	Ост. Реаг.	Ост. Нагрузка
А-соед. 1100	40	2,67	1,99	74,58	29,83	7,87	0,234	< 2,516	< 2,908	< 3,164
В-соед. 1100	40	1,73	1,99	66,05	26,42	8,81	< 0,091	< 2,515	< 2,907	< 3,163
А-соед. 1101	31,4	0,73	1,98	73,34	23,03	6,45	0,471	0,834	< 0,309	< 1,524
В-соед. 1101	40	1,12	2,04	75,13	30,05	6,94	< 0,086	< 2,516	< 2,907	< 2,907
А-соед. 1102	40	1,29	1,99	86,49	34,59	8,28	< 0,097	< 2,516	< 1,184	< 3,164
В-соед. 1102	42	0,97	2,00	75,5	31,71	6,97	< 0,095	< 2,515	< 1,183	< 3,163
А-соед. 1103	42	1,26	1,97	80,12	33,65	8,03	0,139	< 2,516	2,456	< 3,164
В-соед. 1103	42	0,83	2,01	77,19	32,42	7,11	< 0,098	< 4,191	3,601	< 3,163
А-соед. 1574	40	2,76	4,01	81,80	32,72	6,54	< 0,183	< 1,480	0,880	< 0,700
В-соед. 1574	40	1,23	3,92	76,22	30,49	6,63	< 0,181	< 1,479	< 0,699	< 0,699
А-соед. 1105	49	0,61	3,68	41,47	20,32	5,70	< 0,140	< 2,516	< 2,908	< 3,164

ТАБЛИЦА 5. Результаты конъюгации										
Антитело/ соед.	Исх. (мг)	Агр. %	DAR	Выход %	Кол- во %	Конц., мг/мл	Эндо (EU/мг)	Ост. uABT	Ост. Reag.	Ост. Нагрузка
В-соед. 1105	38	0,60	3,62	68,21	25,92	5,89	< 0,102	< 2,515	< 2,907	< 3,163
А-соед. 1106	38	0,70	3,87	72,95	27,72	6,32	1,165	< 2,516	< 2,908	< 3,164
В-соед. 1106	38	1,68	3,85	83,18	31,61	8,93	< 0,112	< 2,515	< 2,907	< 3,163
А-соед. 1199	40	2,56	2,01	68,65	27,46	7,04	< 0,085	< 4,194	< 2,908	< 2,908
В-соед. 1199	40	0,74	2,04	71,53	28,60	7,15	0,260	< 2,515	< 2,907	< 2,907
Исх. = исходное количество антитела (мг); Ост. uABT= остаточный универсальный связывающий антитело конец (uABT) (% моль/моль mAb); Ост. Reag. = остаточный реагент (% моль/моль от общего реагента); Ост. Нагрузка = остаточная нагрузка (% моль/моль от общей нагрузки)										

ПРИМЕР 27. Репрезентативный пример для анализа остаточной нагрузки

Остаточную нагрузку, количество неконъюгированного реагента МАТЕ после потери направляющей группы («uABT»), но не конъюгированного с антителом после реакции конъюгации, можно количественно оценить следующим образом. Буфер растворителя I готовят путем добавления 2 г NaCl в предварительно смешанный органический растворитель (6 мл MeOH и 10 мл CAN). Буфер смешивают и перемешивают в течение по меньшей мере 1 часа, потом буфер оставляют отстаиваться в течение по меньшей мере 1 часа перед использованием. Супернатант представляет собой насыщенный раствор хлорида натрия. Стандартный буфер II готовят путем смешивания 250 мкл ДМСО, 700 мкл ФСБ, 1000 мкл 6 мг/мл герцептина в ФСБ. ФСБ и ДМСО добавляют в образец до 3 мг/мл (например, соед. 1199 или 1101) или 5 мг/мл с 15 % (об./об.)

ДМСО. Затем смешивают 100 мкл раствора образца с 150 мкл растворителя I (образец:осадитель 1:1,5 об./об.). Раствор перемешивают на вортексе в течение 10 минут при комнатной температуре. Раствор центрифугируют в течение 10 минут при 16000 оцу при комнатной температуре.

Супернатант незамедлительно удаляют в стеклянный флакон для анализа. Стандартный исходный раствор нагрузки (10 мМ) хранят при -80 °С до использования. Разводят референтный стандарт до 1000 мкМ с помощью ДМСО. Добавляют 10 мкл 1000 мкМ иАВТ в 390 мкл буфера II для конечной концентрации 25 мкМ. Стандартные образцы получают, как показано в таблице 6.

Берут 200 мкл каждого стандартного образца и добавляют 300 мкл буфера растворителя I для создания стандартов для конечной стандартной кривой (10 мкМ, 5 мкМ, 2 мкМ 1 мкМ, 0,5 мкМ, 0,2 мкМ, 0,1 мкМ). Раствор перемешивают на вортексе в течение 10 минут при комнатной температуре. Раствор центрифугируют в течение 10 минут при 16000 оцу при комнатной температуре. Супернатант незамедлительно удаляют в стеклянный флакон для анализа.

ТАБЛИЦА 6. Получение образцов для стандартной кривой, анализ остаточной нагрузки				
Стандартная конц. (мкМ)	Объем исходного раствора (мкл)	Объем буфера II (мкл)	Общий объем (мкл)	Конечная конц. (мкМ)
25	200	200	400	12,5
12,5	200	200	400	5
5	200	200	400	2,5
2,5	160	240	400	1,25
1,25	200	200	400	0,5
0,5	120	80	200	0,25

Стандартная кривая для анализа нагрузки приведена на Фиг. 4А. Кривая ВЭЖХ, применимая для анализа нагрузки, и площади пиков для соединения 1101 приведены на Фиг. 5. Данные получали, используя колонку Luna Omega, 1,6 мкм, Polar C18 100А, где подвижная фаза А представляет собой 0,1 % ТФУ в Н₂О, а подвижная фаза В представляет собой 0,1 % ТФУ в АЦН.

Условия ВЭЖХ для стандартной кривой и анализа остаточной нагрузки приведены в таблице 7.

ТАБЛИЦА 7. Условия ВЭЖХ для анализа остаточной нагрузки			
Колонка:	Phenomenex, Luna Omega, 1,6 мкм, Polar C18 100A		
Длина волны выявления:	280 нм, ШП 4, реф. = 360 нм, ШП 4		
Темп. колоночного термостата:	30 °C		
Темп. пробоотборника:	6 ± 2 °C		
Скорость потока:	0,2 мл/мин		
Время остановки:	45 мин		
Максимальное давление:	600 бар		
Вводимое количество:	100 мкл		
Подвижные фазы:	А: 0,1 % ТФУ в воде В: 0,1 % ТФУ в АЦН		
Программа градиента:	Время (мин)	А (%)	В (%)
	0,0	70	30
	30,0	40	60
	31,0	10	90
	33,0	10	90
	35,0	70	30
45,0	70	30	

Остаточную нагрузку количественно оценивают по формуле ниже.

$$\% \text{ моль/моль} = \frac{\frac{C_{\text{свободная нагрузка}}}{MM_{\text{нагрузка}}}}{\frac{C_{\text{свободная нагрузка}}}{MM_{\text{нагрузка}}} + \text{DAR} \times \frac{C_{\text{белок}}}{MM_{\text{белок}}}} \times 10$$

$$C_{\text{остаточная нагрузка}} = \frac{\frac{\text{Площадь}_{\text{СТД}}}{\text{Вводимый объем}_{\text{СТД}}}}{\frac{\text{Площадь}_{\text{остаточн.}}}{\text{Вводимый объем}_{\text{остаточн.}}}} \times C_{\text{СТД}}$$

где СТД = стандартные образцы, самые близкие к площади исследуемого образца, $C_{\text{остаточн.}}$ = концентрация свободной нагрузки (мкмоль/л) и $C_{\text{белок}}$ = концентрация белка (мкмоль/л).

ПРИМЕР 28. Анализ остаточного реагента

Анализ остаточного реагента проводят аналогично анализу остаточной нагрузки. Буфер растворителя I готовят путем добавления 2 г NaCl в предварительно смешанный органический растворитель из 6 мл MeOH и 10 мл CAN. Буфер I смешивают и перемешивают в течение по меньшей мере 1 часа, а раствор оставляют отстаиваться в течение по меньшей мере 1 часа перед использованием, супернатант представляет собой насыщенный раствор хлорида натрия. Буфер растворителя II готовят путем смешивания 250 мкл ДМСО, 700 мкл ФСБ и 1000 мкл 6 мг/мл герцептина. Образцы готовят путем добавления ФСБ и ДМСО в образец до 3 мг/мл с 15 % (об./об.) ДМСО. Затем смешивают 100 мкл 3 мг/мл раствора с 150 мкл растворителя I (образец:осадитель 1:1,5 об./об.). Раствор перемешивают на вортексе в течение 10 минут при комнатной температуре. Раствор центрифугируют в течение 10 минут при 16000 оцу при комнатной температуре. Супернатант незамедлительно удаляют в стеклянный флакон для анализа. Референтные стандарты реагента состоят из стандартного исходного раствора реагента (10 мМ). Стандарты хранят при -80 °С до использования. Референтные стандарты разводят до 1000 мкМ с помощью ДМСО. Добавляют 10 мкл 1000 мкМ иАВТ в 390 мкл буфера II для конечной концентрации 25 мкМ. Образцы для стандартной кривой реагента готовят в соответствии с таблицей 8.

Для создания конечной стандартной кривой берут 200 мкл каждого из стандартных образцов и добавляют 300 мкл буфера растворителя I для точек конечной стандартной кривой (10 мкМ, 5 мкМ, 2 мкМ, 1 мкМ, 0,5 мкМ, 0,2 мкМ, 0,1 мкМ). Раствор перемешивают на вортексе в течение 10 минут при комнатной температуре. Раствор центрифугируют в течение 10 минут при 16000 оцу при комнатной температуре. Супернатант незамедлительно удаляют в стеклянный

флаконе для анализа. Параметры ВЭЖХ для анализа остаточного реагента являются такими же, как и для анализа остаточной нагрузки в предыдущем примере, за исключением градиента. Градиент ВЭЖХ для анализа остаточного реагента приведен в таблице 9. Стандартная кривая для анализа остаточного реагента приведена на Фиг. 4В. Кривая ВЭЖХ для анализа остаточного реагента и площади пиков для соединения 1101 приведены на Фиг. 6.

ТАБЛИЦА 8. Получение образцов для стандартной кривой, анализ остаточного реагента				
Стандартная конц. (мкМ)	Объем исходного раствора (мкл)	Объем буфера II (мкл)	Общий объем (мкл)	Конечная конц. (мкМ)
25	200	200	400	12,5
12,5	200	200	400	5
5	200	200	400	2,5
2,5	160	240	400	1,25
1,25	200	200	400	0,5
0,5	120	80	200	0,25

ТАБЛИЦА 9. Условия ВЭЖХ для анализа остаточного реагента			
Подвижные фазы:	А: 0,1 % ТФУ в воде		
	В: 0,1 % ТФУ в САН		
Программа градиента:	Время (мин)	А (%)	В (%)
	0,0	70	30
	30,0	40	60
	31,0	10	90
33,0	10	90	

ТАБЛИЦА 9. Условия ВЭЖХ для анализа остаточного реагента			
	35,0	70	30
	45,0	70	30

Остаточный реагент рассчитывают, используя следующие формулы.

$$\% \text{ моль/моль} = \frac{\frac{C_{\text{свободный реагент}}}{MM_{\text{реагент}}}}{\frac{C_{\text{свободный реагент}}}{MM_{\text{реагент}}} + DAR \times \frac{C_{\text{белок}}}{MM_{\text{белок}}}} \times 10$$

$$C_{\text{остаточный реагент}} = \frac{\frac{\text{Площадь}_{\text{STD}}}{\text{Вводимый объем}_{\text{STD}}}}{\frac{\text{Площадь}_{\text{остаточн.}}}{\text{Вводимый объем}_{\text{остаточн.}}}} \times C_{\text{STD}}$$

В уравнениях для остаточного реагента STD = стандартный образец, самый близкий к площади исследуемого образца, $C_{\text{остаточн.}}$ = концентрация свободного реагента (мкмоль/л) и $C_{\text{белок}}$ = концентрация белка (мкмоль/л).

ПРИМЕР 29. Анализ остаточного иАВТ для всех конъюгатов антитело – лекарственный препарат (ADS)

Буферы растворителя I и II являются такими же, как и буферы I и II для анализа остаточного реагента. Образцы готовят путем добавления ФСБ и ДМСО для создания образца с 3 мг/мл с 15 % (об./об.) ДМСО. Затем 100 мкл 3 мг/мл раствора смешивают с 150 мкл растворителя I и перемешивают на вортексе в течение 10 минут при комнатной температуре. Раствор центрифугируют в течение 10 минут при 16000 оцу при комнатной температуре. Супернатант незамедлительно удаляют в стеклянный флакон для анализа. Стандартный исходный раствор иАВТ (10 мМ) готовят и хранят при -80 °С до использования. Референтный стандартный исходный раствор разводят до 1400 мкМ с помощью ДМСО. Для референтных стандартов добавляют 10 мкл 1400 мкМ иАВТ в 390 мкл буфера II для конечной концентрации 35 мкМ. В таблице 10 приведена

композиция стандартных образцов из анализа иАВТ. Образцы иАВТ готовят путем объединения 200 мкл каждого из стандартных образцов и 300 мкл буфера растворителя I для получения конечной стандартной кривой (14 мкМ, 7 мкМ, 3,5 мкМ, 1,75 мкМ, 0,7 мкМ, 0,35 мкМ, 0,21 мкМ). Раствор образцов перемешивают на вортексе в течение 10 минут при комнатной температуре и центрифугируют в течение 10 минут при 16000 оцу при комнатной температуре. Супернатант анализируют незамедлительно. Параметры ВЭЖХ для анализа остаточного иАВТ являются такими же, как и для анализа остаточной нагрузки, приведенного в примере 7.

ТАБЛИЦА 10. Стандартные образцы иАВТ				
Стандартная конц. (мкМ)	Объем исходного раствора (мкл)	Объем буфера II (мкл)	Общий объем (мкл)	Конечная конц. (мкМ)
35	200	200	400	17,5
17,5	200	200	400	8,75
8,75	200	200	400	4,38
4,38	160	240	400	1,75
1,75	200	200	400	0,88
0,88	120	80	200	0,53

Остаточный иАВТ рассчитывают, используя следующие формулы.

$$\% \text{ моль/моль} = \frac{C_{\text{остаточн. иАВТ}}}{C_{\text{белок}}} \times 100$$

$$C_{\text{остаточное иАВТ}} = \frac{\frac{\text{Площадь}_{\text{STD}}}{\text{Вводимый объем}_{\text{STD}}}}{\frac{\text{Площадь}_{\text{остаточн.}}}{\text{Вводимый объем}_{\text{остаточн.}}}} \times C_{\text{STD}}$$

В вышеприведенных формулах для иАВТ STD представляет собой стандартный образец, самый близкий к площади исследуемого образца, $C_{\text{остаточн.}}$ представляет собой концентрацию

свободного α АВТ (мкмоль/л) и $C_{\text{белок}}$ представляет собой концентрацию белка (мкмоль/л). Стандартная кривая для анализа остаточного α АВТ приведена на Фиг. 4С. Кривая ВЭЖХ для анализа остаточного α АВТ и площади пиков приведены на Фиг. 7.

ПРИМЕР 30. Способы анализа DAR

Параметры ВЭЖХ и МС для анализа DAR приведены в таблицах 11 и 12, соответственно.

ТАБЛИЦА 11. Параметры ВЭЖХ для анализа DAR			
Колонка:	Agilent, PLRP-S, 150*2,1 мм, 8 мкм		
Длина волны выявления:	280 нм, ШП 4		
Темп. колоночного термостата:	80°C		
Темп. пробоотборника:	6 ± 2 °C		
Скорость потока:	0,5 мл/мин		
Время остановки:	8 мин		
Максимальное давление:	600 бар		
Вводимое количество:	2 мкг		
Подвижные фазы:	А: 0,05 % ТФУ, 0,05 % МК в воде В: 0,05 % ТФУ, 0,05 % МК в АЦН		
Программа градиента:	Время (мин)	А (%)	В (%)
	0,0	75	25
	0,7	70	30
	4,0	40	60
	4,1	10	90
	5,5	10	90
	5,6	75	25

ТАБЛИЦА 11. Параметры ВЭЖХ для анализа DAR			
	8,0	75	25

ТАБЛИЦА 12. Параметры МС для анализа DAR	
Источник ионов	Двойная ИЭР
Полярность ионов	Положительные
Темп. газа	350 °С
Сушильный газ	13 л/мин
Распылитель	45 фт/кв. дюйм изб.
Vcap	5000 В
Мин. диапазон масс	500 m/z
Макс. диапазон масс	8000 m/z

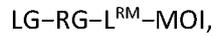
Следующую формулу использовали для анализа DAR.

$$DAR = \frac{1 \times \text{Кол} - \text{во}_{DAR1} + 2 \times \text{Кол} - \text{во}_{DAR2} + \dots + n \times \text{Кол} - \text{во}_{DARn}}{\text{Кол} - \text{во}_{DAR0} + \dots + \text{Кол} - \text{во}_{DARn}}$$

[446] Хотя был описан ряд вариантов осуществления, очевидно, что наши базовые примеры можно изменять с получением других вариантов осуществления, в которых применяются методики (например, соединения, агенты, композиции, способы и т. д.) по настоящему изобретению.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

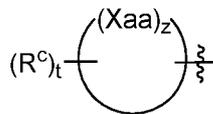
1. Соединение, имеющее структуру формулы R-I:



(R-I)

или ее соли, где:

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



R^{LG} представляет собой $\text{R}^{\text{c}}\text{-(Xaa)}_z\text{-}$, 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 $\text{-L}^{\text{a}}\text{-R}'$;

каждый L^{a} независимо представляет собой ковалентную связь или необязательно замещенную двухвалентную группу, выбранную из $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алифатического или $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алифатического фрагмента, имеющего 1–5 гетероатомов, где одно или более метиленовых звеньев группы необязательно и независимо замещены $\text{-C(R}')_2\text{-}$, -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)- , $\text{-S(O)}_2\text{-}$, $\text{-S(O)}_2\text{N(R')-}$, -C(O)S- или -C(O)O- ;

каждый -Cγ- независимо представляет собой необязательно замещенную двухвалентную моноциклическую, бициклическую или полициклическую группу, где каждое моноциклическое кольцо независимо выбрано из C_{3-20} циклоалифатического кольца, C_{6-20} 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 $\text{-L}^{\text{LG1}}\text{-}$, $\text{-L}^{\text{LG1}}\text{-L}^{\text{LG2}}\text{-}$, $\text{-L}^{\text{LG1}}\text{-L}^{\text{LG2}}\text{-L}^{\text{LG3}}\text{-}$ или $\text{-L}^{\text{LG1}}\text{-L}^{\text{LG2}}\text{-L}^{\text{LG3}}\text{-L}^{\text{LG4}}\text{-}$;

RG представляет собой $-L^{RG1}-L^{RG2}-$, $-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$, $-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$,
 $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$;

каждый из L^{LG1} , L^{LG2} , L^{LG3} , L^{LG4} , L^{RG1} , L^{RG2} и L^{RM} независимо представляет собой L;

каждый L представляет собой ковалентную связь или двухвалентную необязательно замещенную линейную или разветвленную C_{1-100} 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 C_{1-6} алкиленом, C_{1-6} алкениленом, двухвалентной C_{1-6} гетероалифатической группой, имеющей 1–5 гетероатомов, $-C\equiv C-$, $-C\gamma-$, $-C(R')_2-$, $-O-$, $-S-$, $-S-S-$, $-N(R')-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(NR')-$, $-C(O)N(R')-$, $-C(O)C(R')_2N(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2N(R')-$, $-C(O)S-$, $-C(O)O-$, $-P(O)(OR')-$, $-P(O)(SR')-$, $-P(O)(R')-$, $-P(O)(NR')-$, $-P(S)(OR')-$, $-P(S)(SR')-$, $-P(S)(R')-$, $-P(S)(NR')-$, $-P(R')-$, $-P(OR')-$, $-P(SR')-$, $-P(NR')-$, аминокислотным остатком или $-[(-O-C(R')_2-C(R')_2)_n]-$, где n равно 1–20;

каждый R' независимо представляет собой $-R$, $-C(O)R$, $-CO_2R$ или $-SO_2R$;

каждый R независимо представляет собой $-H$ или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-30} алифатического, C_{1-30} гетероалифатического фрагмента, имеющего 1–10 гетероатомов, C_{6-30} арильного, C_{6-30} арилалифатического, C_{6-30} арилгетероалифатического фрагмента, имеющего 1–10 гетероатомов, 5–30-членного гетероарила, имеющего 1–10 гетероатомов, и 3–30-членного гетероциклила, имеющего 1–10 гетероатомов, или

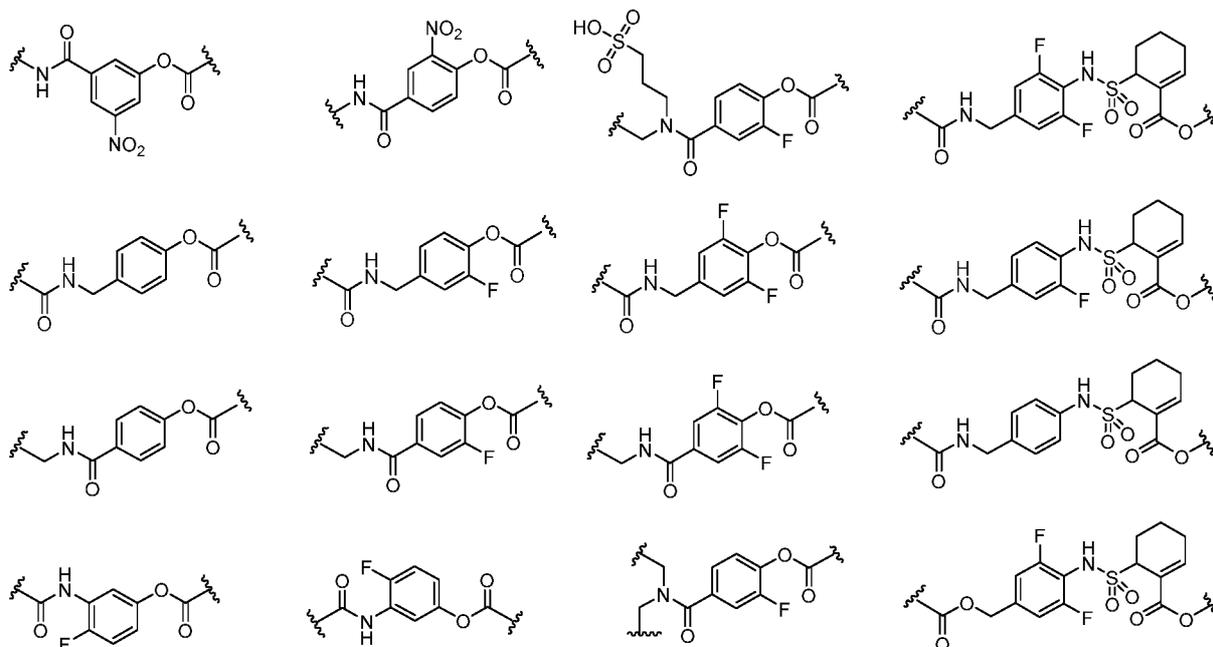
две группы R необязательно и независимо вместе образуют ковалентную связь или:

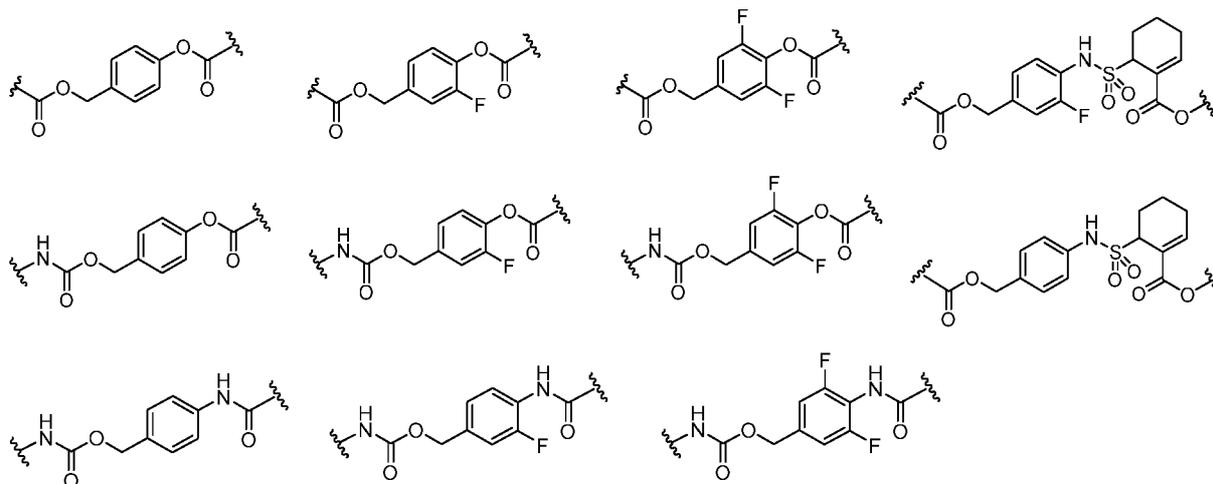
две или более групп R на одном атоме необязательно и независимо вместе с атомом образуют необязательно замещенное 3–30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, имеющее, в дополнение к атому, 0–10 гетероатомов; или

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; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, содержащий монометилауростатин E (ММАЕ).

2. Соединение или соль 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.
3. Соединение или соль по п. 1 или 2, где LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который связывается с Fc-областью агента на основе антитела.
4. Соединение или соль по любому предшествующему пункту, где LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью, при этом агент-мишень представляет собой агент на основе антитела, который представляет собой или содержит энфортумаб, брентуксимаб или трастузумаб.
5. Соединение или соль по любому предшествующему пункту, где LG представляет собой или содержит группу, выбранную из любой из групп от A-1 до A-50 из таблицы A-1.
6. Соединение или соль по любому предшествующему пункту, где R^{LG} представляет собой или содержит DCAWXLGELVWCT (SEQ ID NO:18), где два остатка цистеина необязательно образуют дисульфидную связь, а X представляет собой аминокислотный остаток.
7. Соединение или соль по любому предшествующему пункту, отличающиеся тем, что соединение содержит одну или более групп, выбранных из:

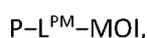




8. Соединение или соль по любому предшествующему пункту, где L^{RM} представляет собой или содержит $-(CH_2CH_2O)_n-$, где n независимо в каждом случае выбрано из целых чисел 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8.

9. Соединение или соль по любому предшествующему пункту, где L^{RM} представляет собой или содержит $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_n-NHC(O)-(CH_2)_n-$, $-[(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_n-NHC(O)]_m-(CH_2)_n-$ и $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_n-N((CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_n)-((CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_n)-$ где m независимо в каждом случае выбран из целых чисел 1, 2, 3 и 4.

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



(P-I)

или ее соли, где:

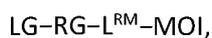
P представляет собой фрагмент агента-мишени;

L^{PM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит монометилауростатин E (MMAE),

включающий такие этапы:

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



(R-I)

или ее соли, где:

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

RG представляет собой реактивную группу;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAE; и

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



(P-II)

где:

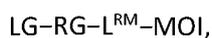
P-N представляет собой фрагмент белкового агента, содержащий остаток лизина;

L^{PM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит монометилауристатин E (MMAE);

при этом способ включает:

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



(R-I)

или ее соли, где:

LG представляет собой группу, содержащую связывающий белок фрагмент, который

связывается с P-N,

RG представляет собой реактивную группу;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит MMAE.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что агент-мишень представляет собой или содержит агент на основе антитела.
12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что агент на основе антитела представляет собой или содержит моноклональное антитело к CD30, такое как брентуксимаб, или моноклональное антитело к нектину-4, такое как энфортумаб.
13. Способ по п. 11 или 12, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент селективно присоединен к агенту на основе антитела в K246 или K248 тяжелой цепи IgG1 или соответствующем положении.
14. Способ по п. 11 или 12, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент селективно присоединен к агенту на основе антитела в K251 или K253 тяжелой цепи IgG2 или соответствующем положении.
15. Способ по п. 11 или 12, отличающийся тем, что представляющий интерес фрагмент селективно присоединен к агенту на основе антитела в K239 или K241 тяжелой цепи IgG4 или соответствующем положении.
16. Способ по любому из пп. 10–12, отличающийся тем, что этапы приведения в контакт и образования проводят в ходе одной химической реакции.
17. Композиция, обеспечивающая совокупность агентов, каждый из которых независимо содержит:

фрагмент агента на основе антитела,

представляющий интерес фрагмент, который представляет собой или содержит

монометилауристатин E (MMAE), и

необязательно, линкерный фрагмент, связывающий фрагмент агента на основе антитела и представляющий интерес фрагмент;

при этом фрагменты агентов на основе антител совокупности агентов имеют общую

аминокислотную последовательность или могут связываться с общим антигеном, и при этом

агенты совокупности независимо имеют общую модификацию по меньшей мере в одном общем аминокислотном остатке фрагментов агентов на основе антител; и

при этом около 1 %–100 % всех агентов, которые содержат фрагмент агента на основе антитела, который содержит общую аминокислотную последовательность или может связываться с общим антигеном, и представляющий интерес фрагмент, являются агентами совокупности.

18. Композиция по п. 17, отличающаяся тем, что фрагменты агентов на основе антител совокупности могут связываться с общим антигеном.

19. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что общий аминокислотный остаток представляет собой K246 или K248 тяжелой цепи антитела IgG1 или соответствующий ему аминокислотный остаток.

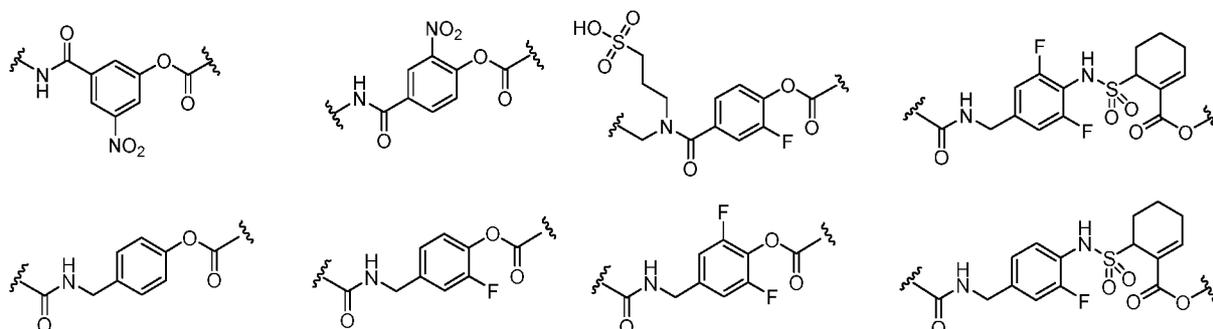
20. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что общий аминокислотный остаток представляет собой K251 или K253 тяжелой цепи антитела IgG2 или соответствующий ему аминокислотный остаток.

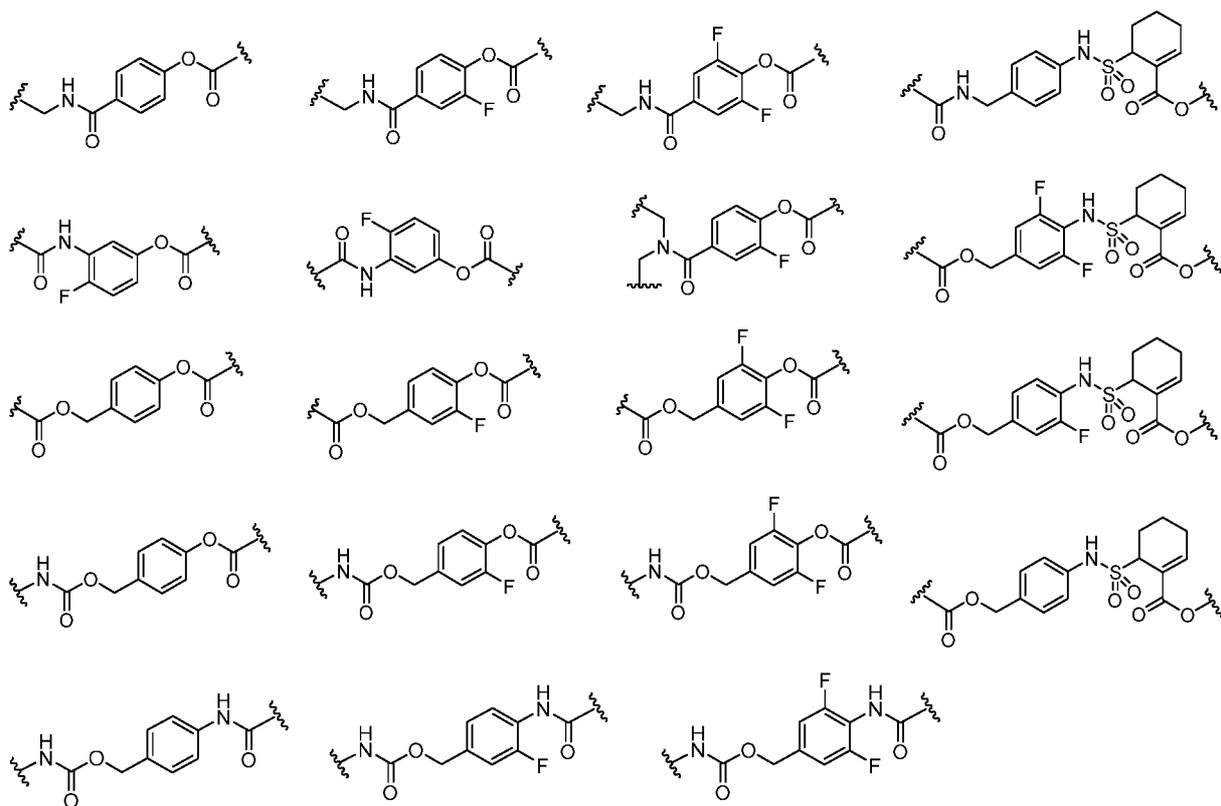
21. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что общий аминокислотный остаток представляет собой K239 или K241 тяжелой цепи антитела IgG4 или соответствующий ему аминокислотный остаток.

22. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что каждый агент совокупности не содержит $-S-Cy-$, где $-Cy-$ представляет собой необязательно замещенное 5-членное моноциклическое кольцо, не содержит $-S-S-$, который не образован остатками цистеина, и не содержит $-SH$ или его соль, который не относится к остатку цистеина.

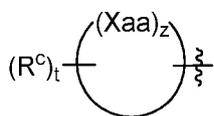
23. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что каждый агент совокупности не содержит $-S-CH_2-CH_2-$.

24. Композиция по п. 18, содержащая одну или более групп, выбранных из

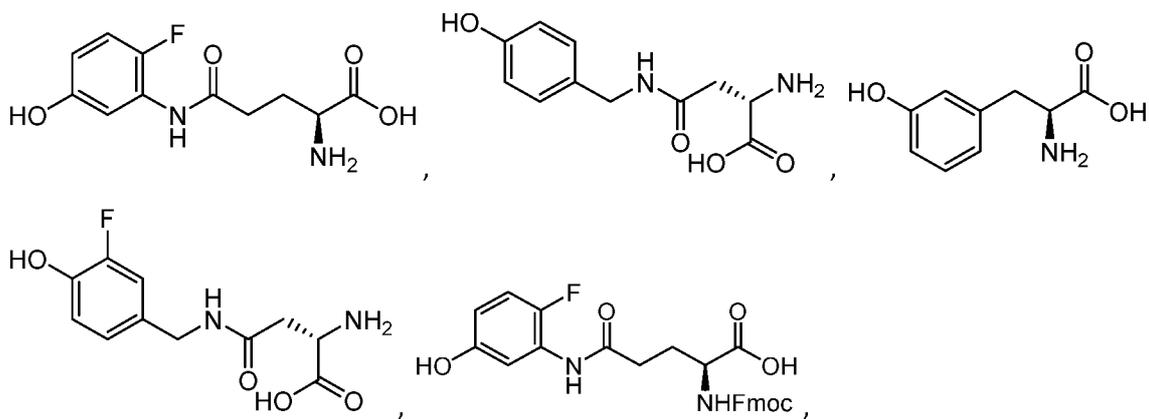


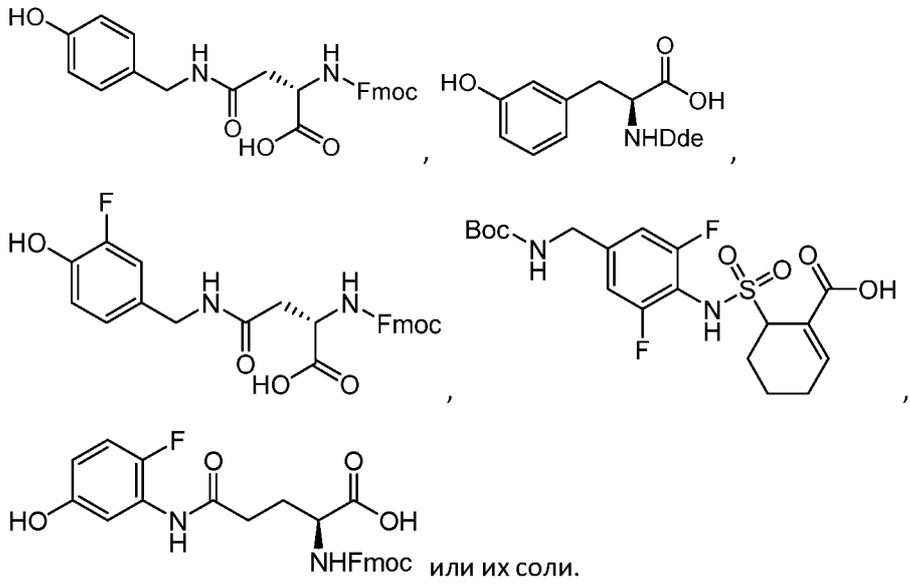


25. Соединение по п. 1 или его соль, где R^{LG} представляет собой

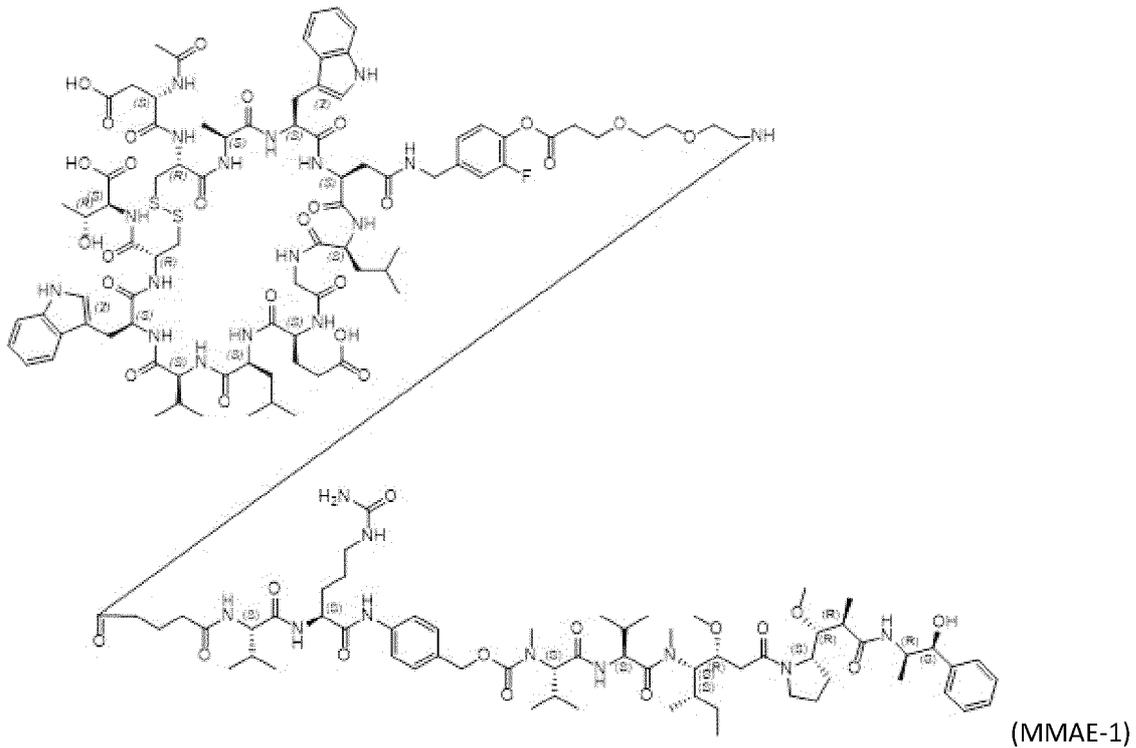


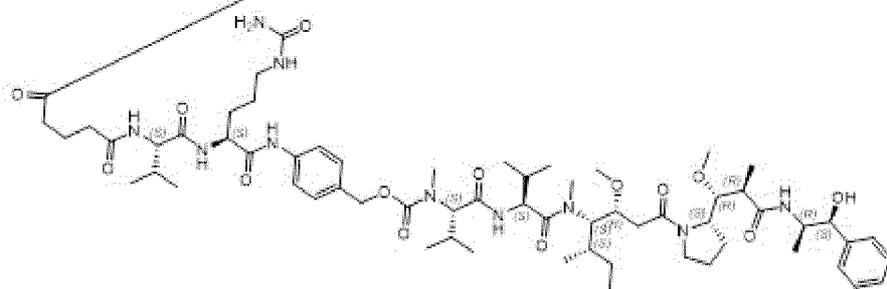
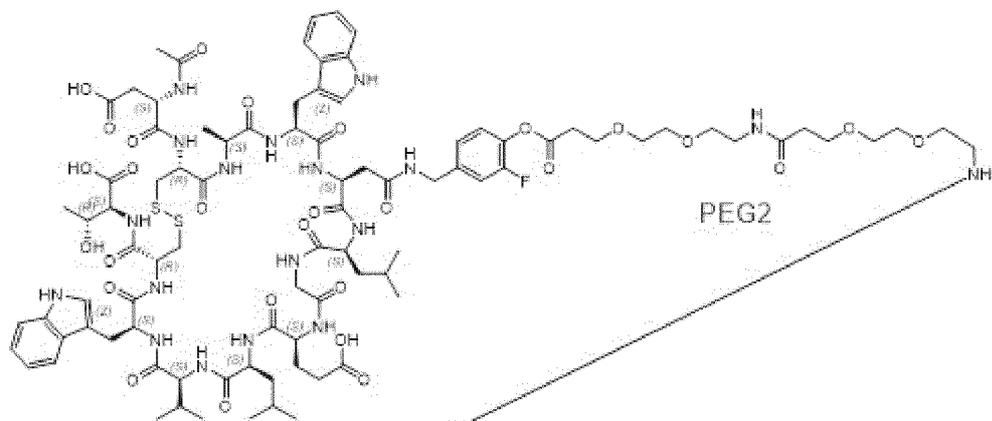
полипептид или R^c-(Xaa)_z-, содержащий аминокислотный остаток по меньшей мере одного из следующих соединений:



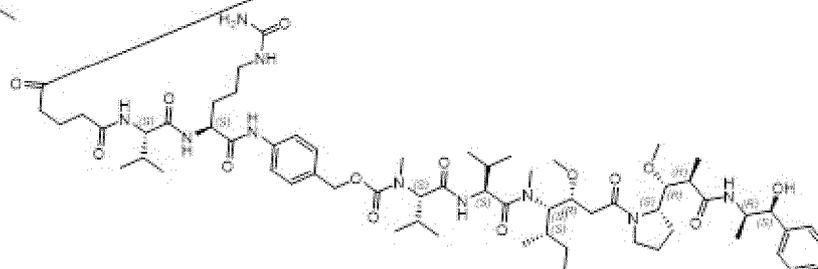
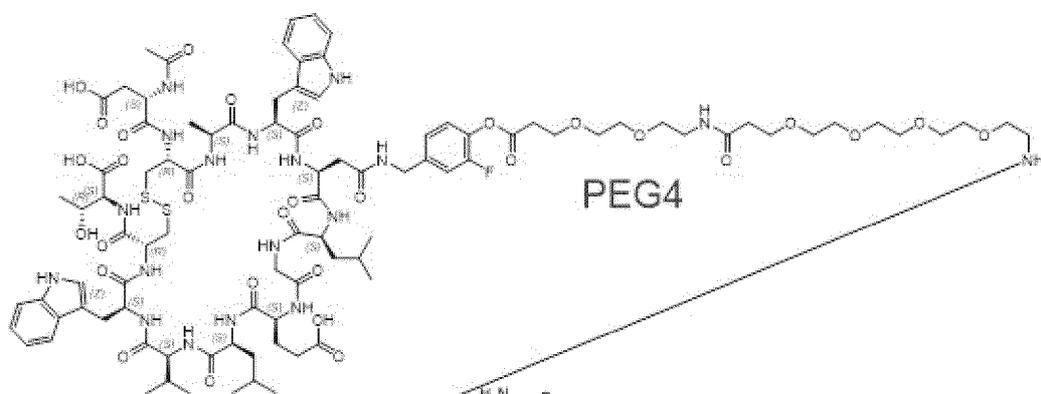


26. Соединение или соль по п. 1, отличающиеся тем, что соединение выбрано из

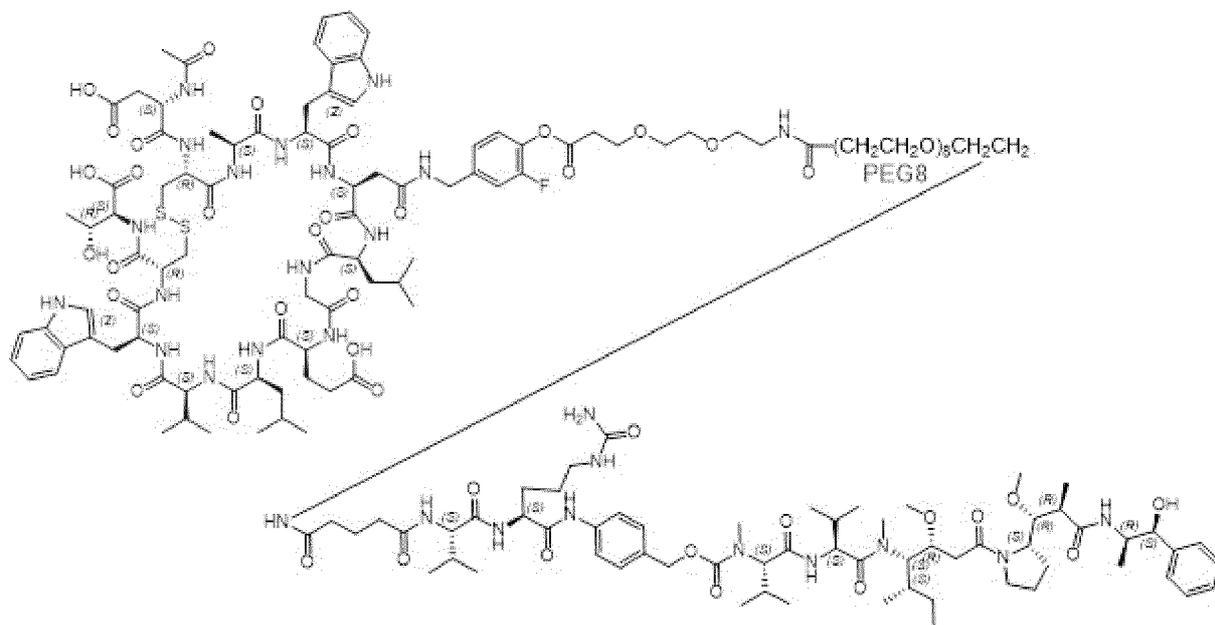




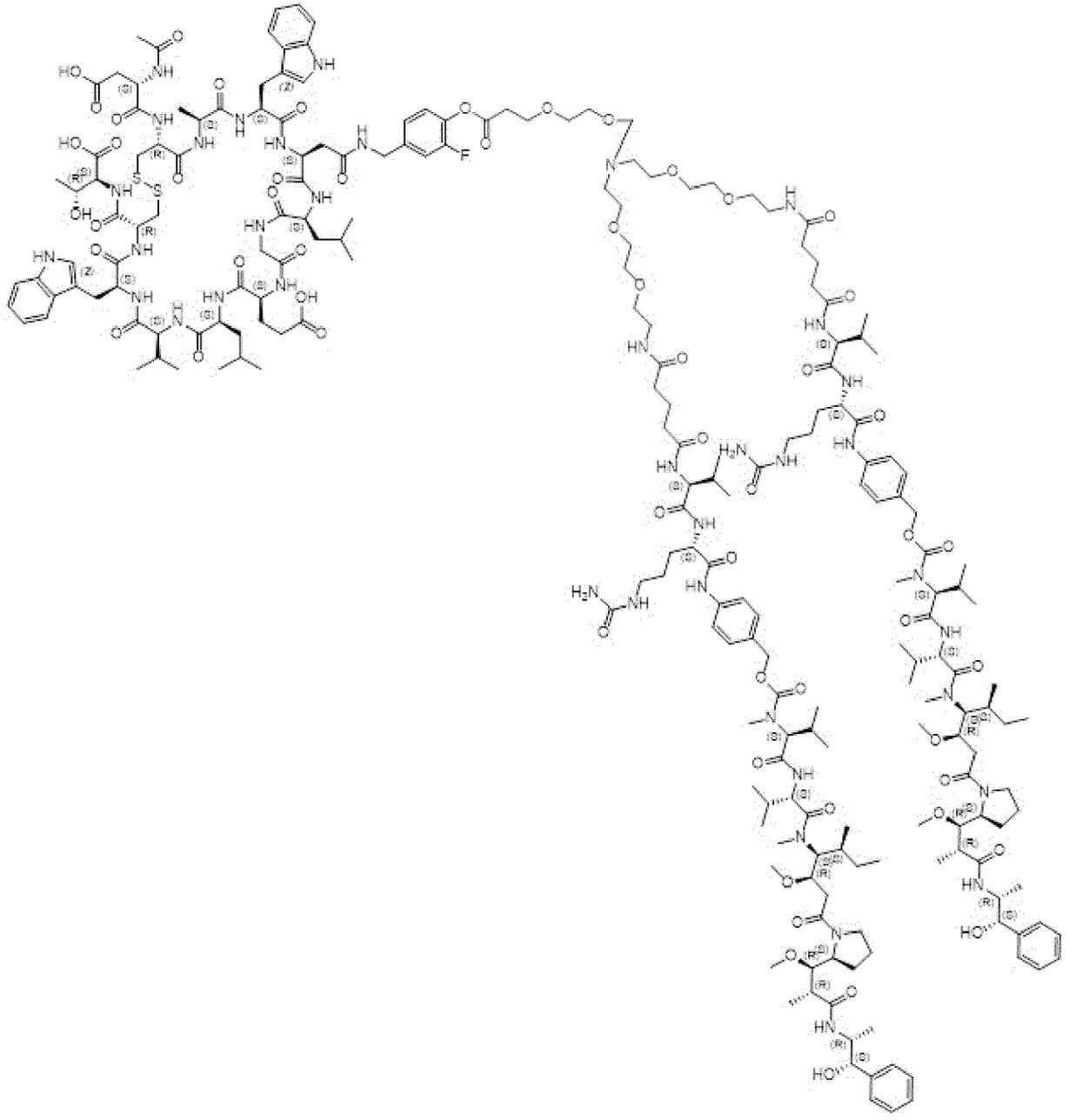
(MMAE-2)



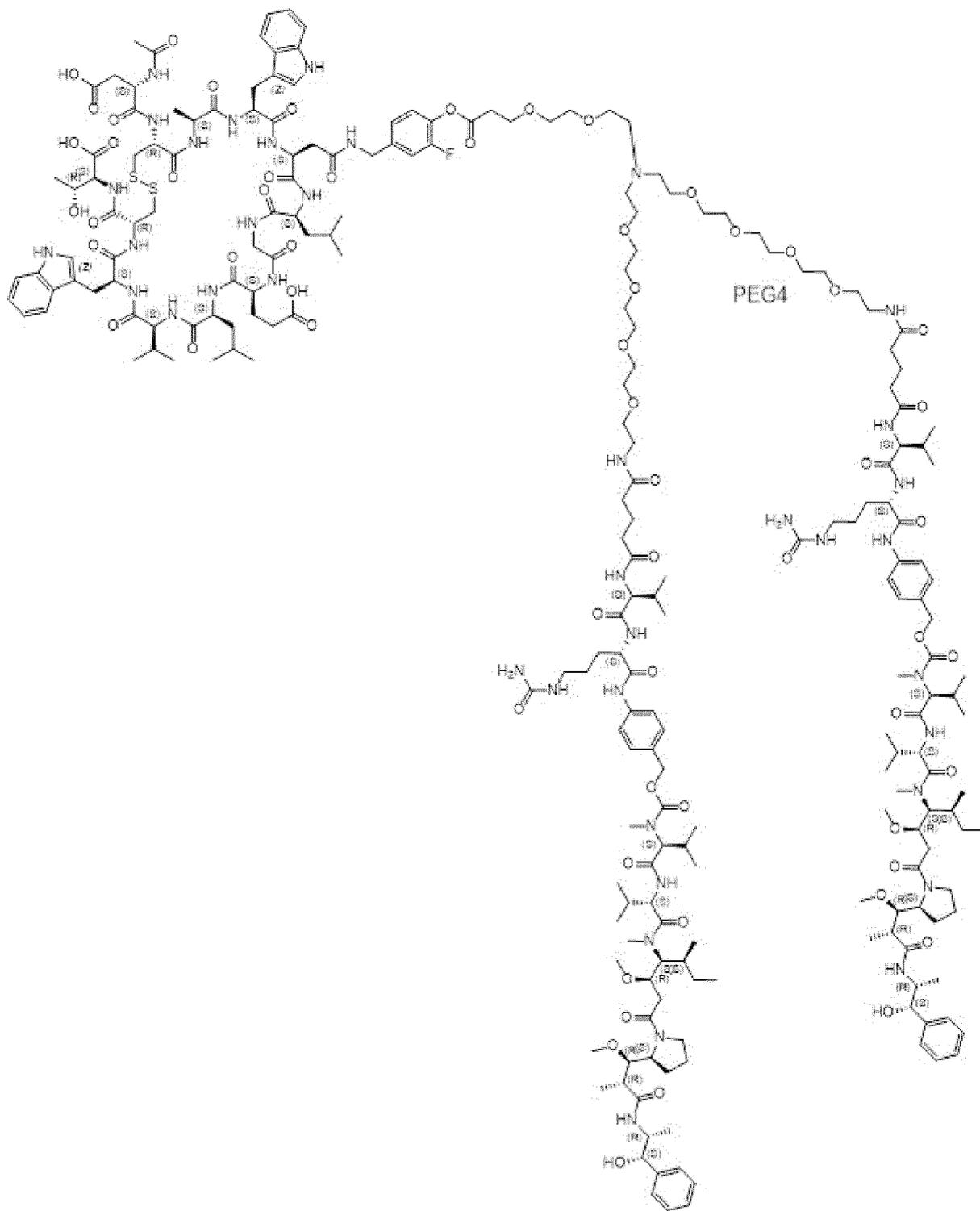
(MMAE-3)



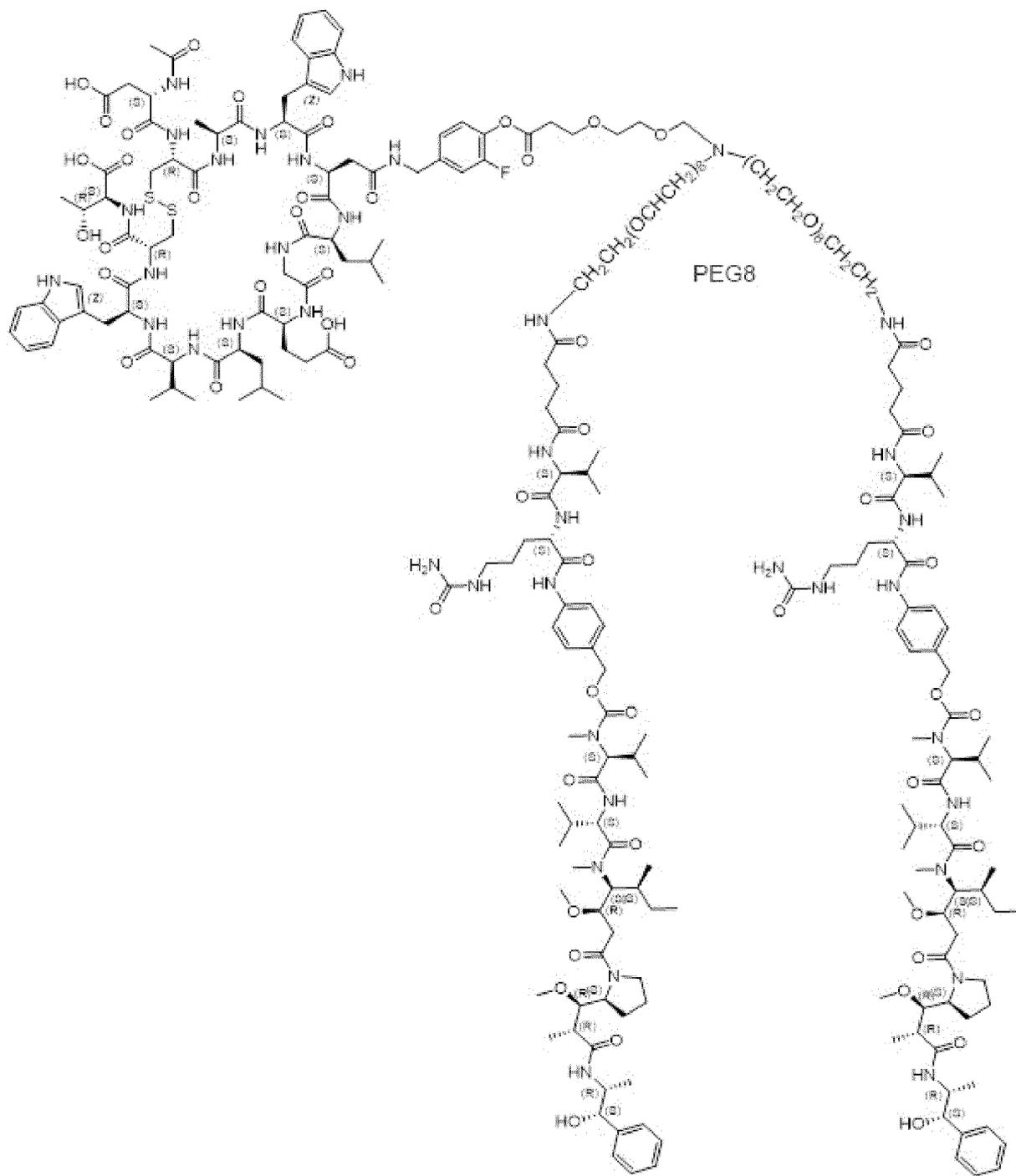
(MMAE-4)



(MMAE-5)

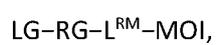


(MMAE-6)



(MMAE-7).

27. Соединение, имеющее структуру формулы R-I:



(R-I)

или ее соли, где:

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

RG представляет собой реактивную группу;

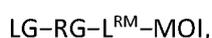
L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, содержащий MMAE,

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

при этом 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.

28. Соединение, имеющее структуру формулы R-I:



(R-I)

или ее соли, где:

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

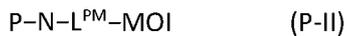
RG представляет собой реактивную группу;

L^{RM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, содержащий монометилауростатин E (MMAE).

29. Композиция, содержащая:

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



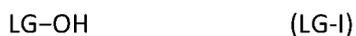
где:

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

L^{PM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, содержащий монометилауристатин E (ММАЕ); и

второе соединение, имеющее структуру:



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

30. Композиция по п. 1, дополнительно содержащая:

третье соединение, имеющее формулу (R-I):



где:

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;

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

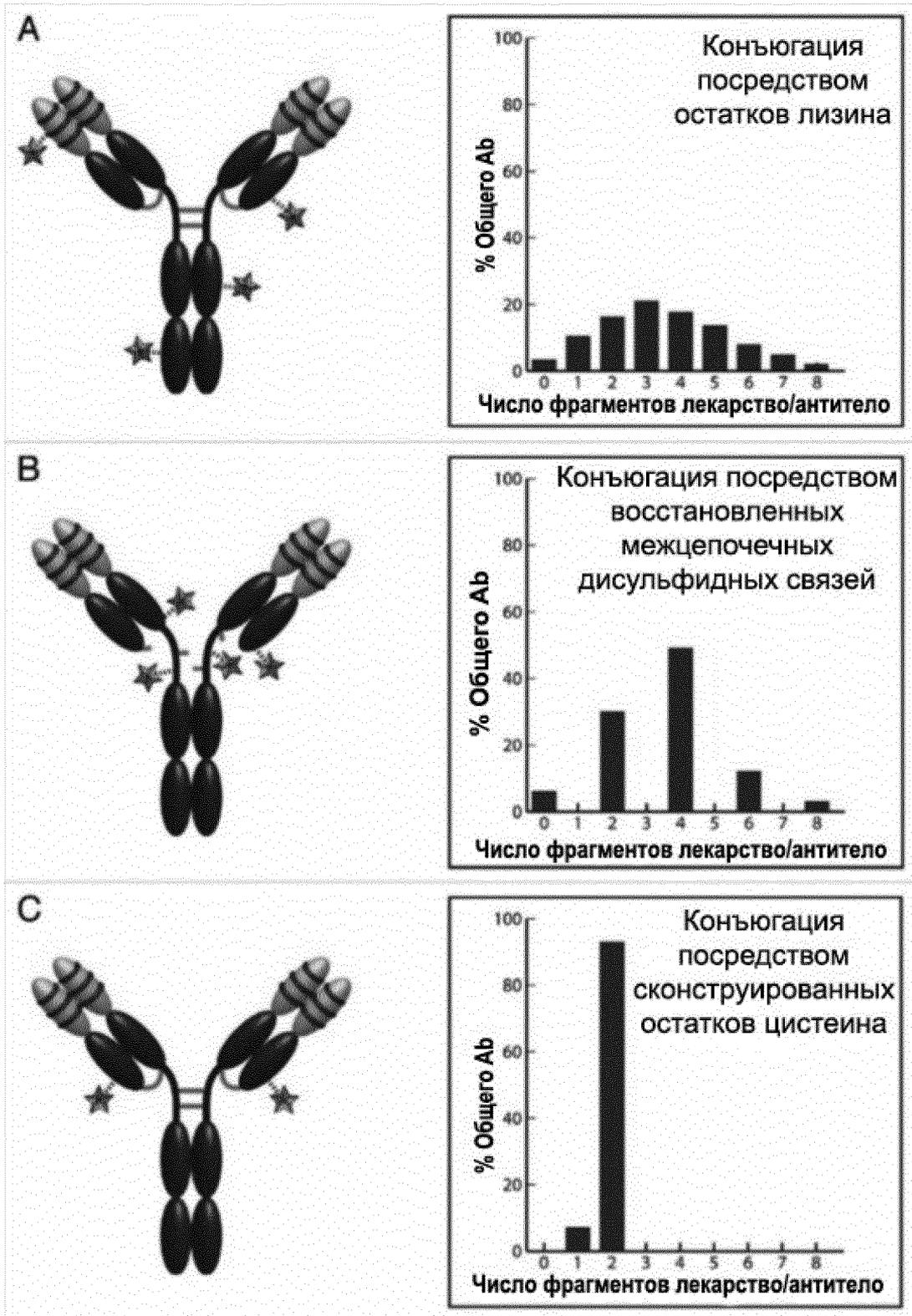
MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, содержащий монометилауристатин E (ММАЕ);

четвертое соединение, имеющее формулу (R-III):

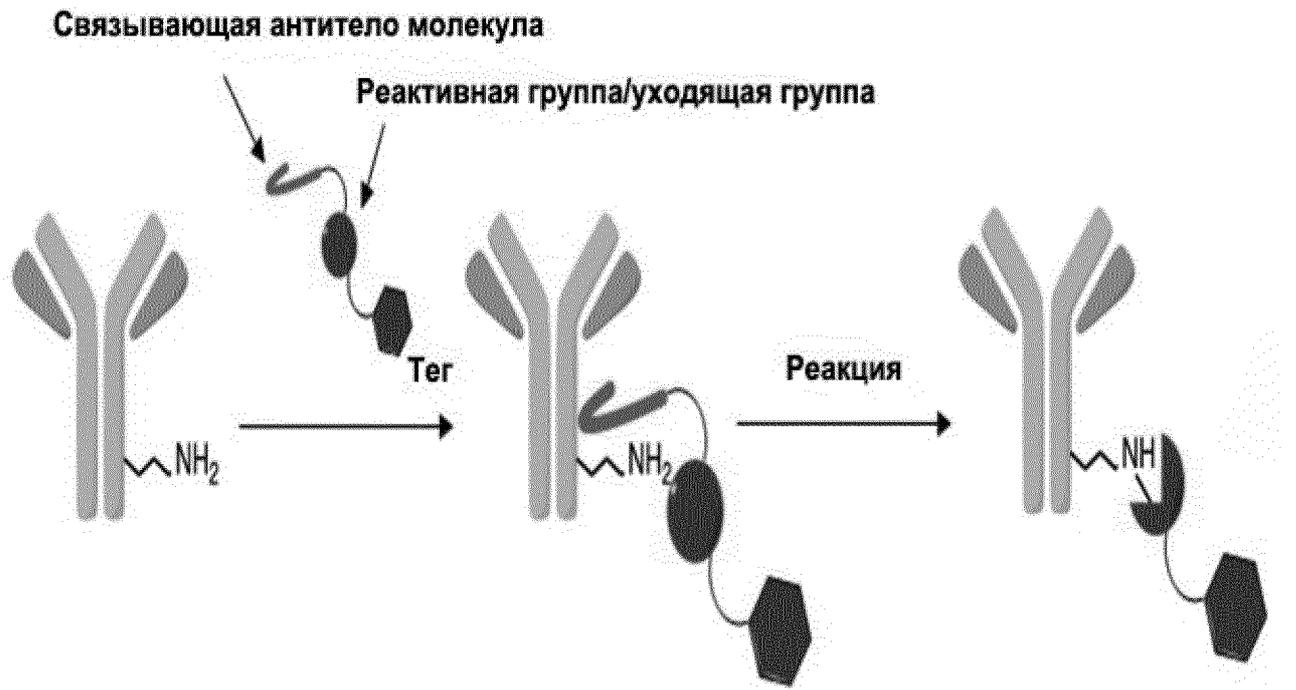


или их комбинацию.

Воспроизведено из Panowski et al. "Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy" mAbs 2014, 6(1), 34-45.

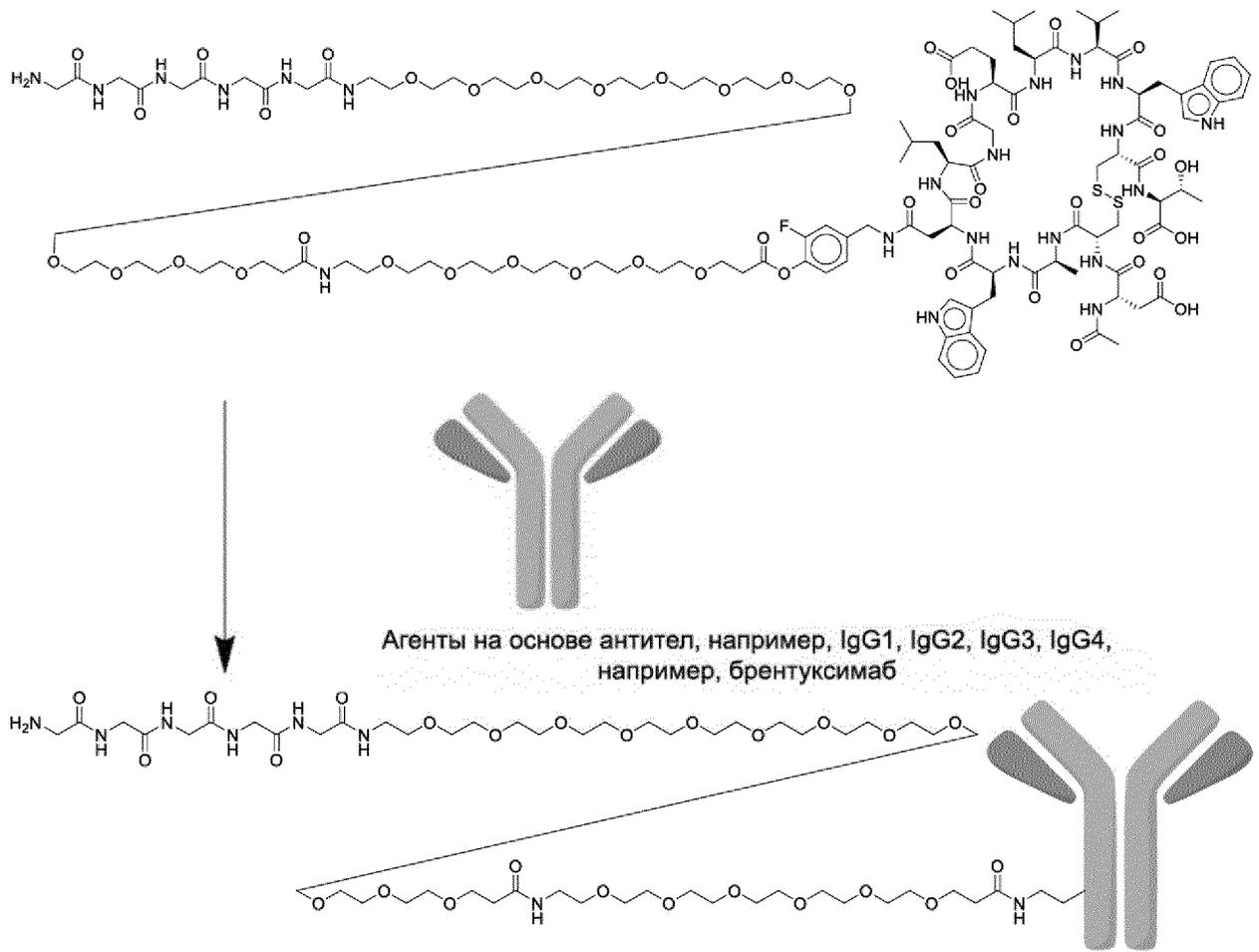


Фиг. 1



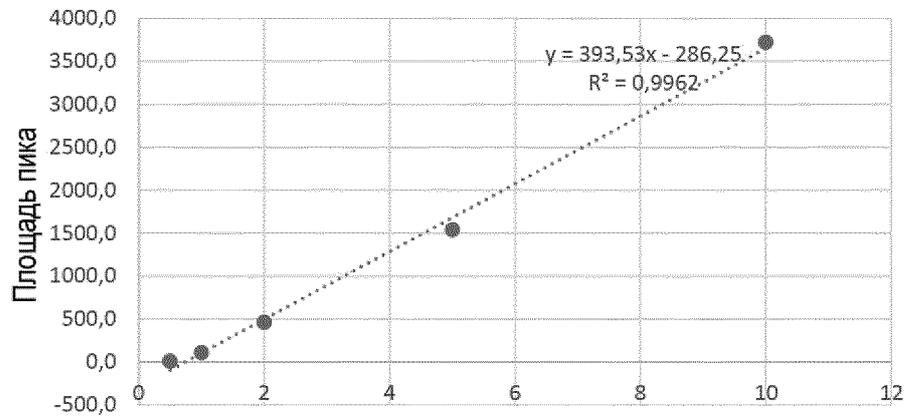
Фиг. 2

В некоторых вариантах осуществления применимая схема проиллюстрирована ниже:



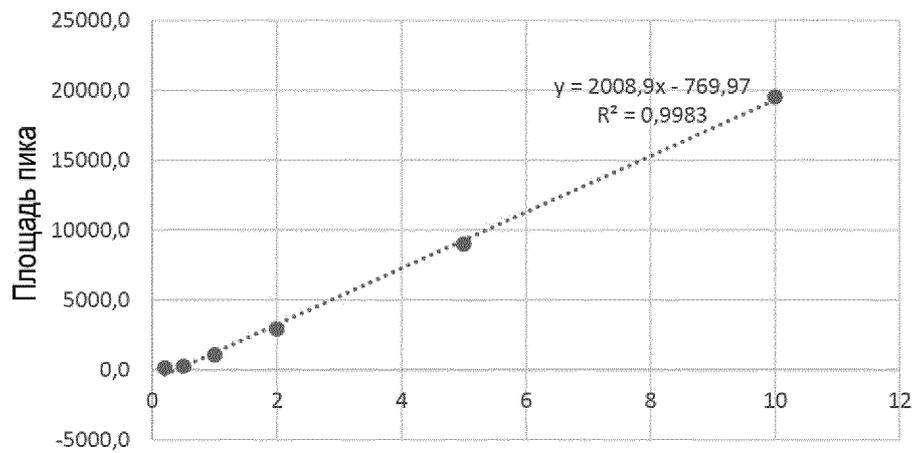
Фиг. 3

Стандартная кривая для нагрузки соед. 1101



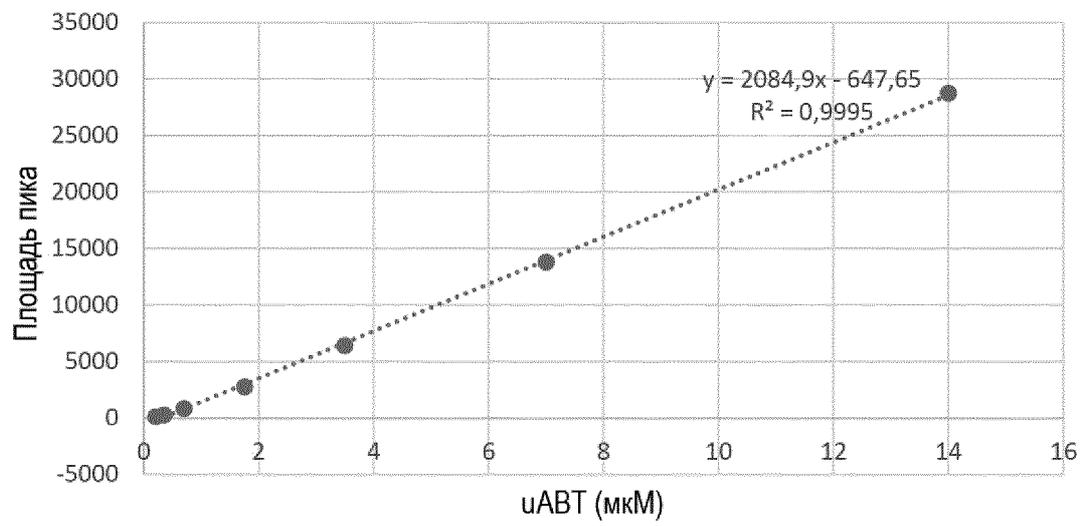
Фиг. 4А

Стандартная кривая для реагента соед. 1101

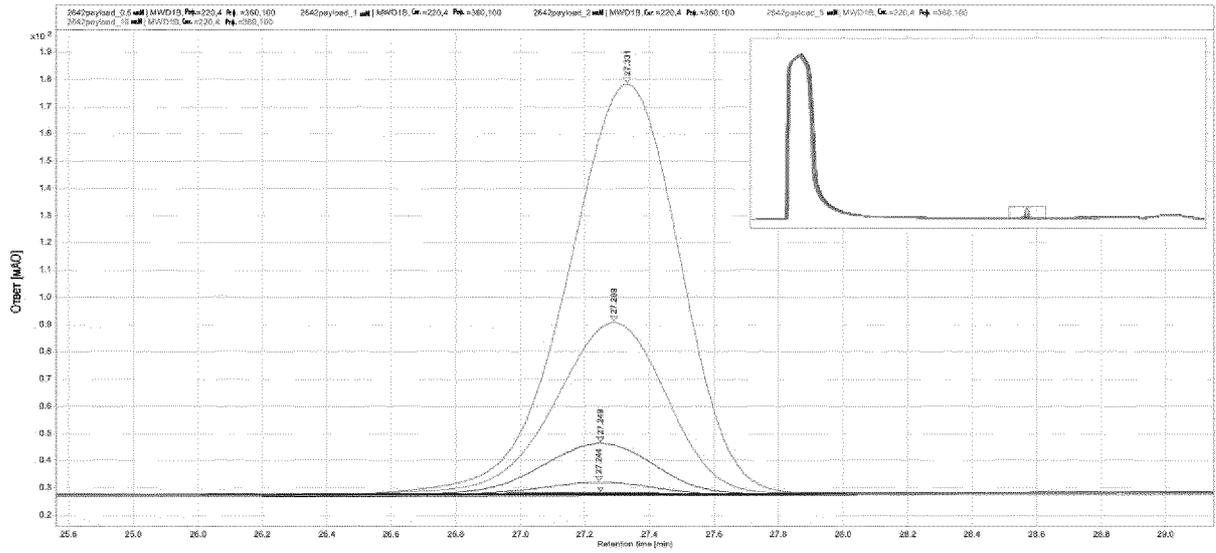


Фиг. 4В

Стандартная кривая uABT

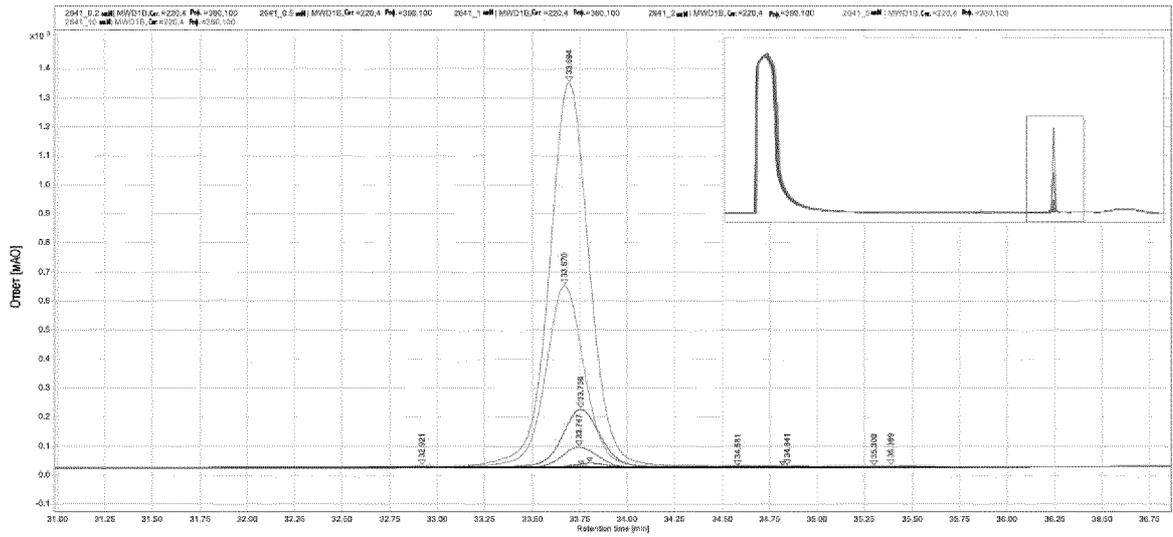


Фиг. 4С



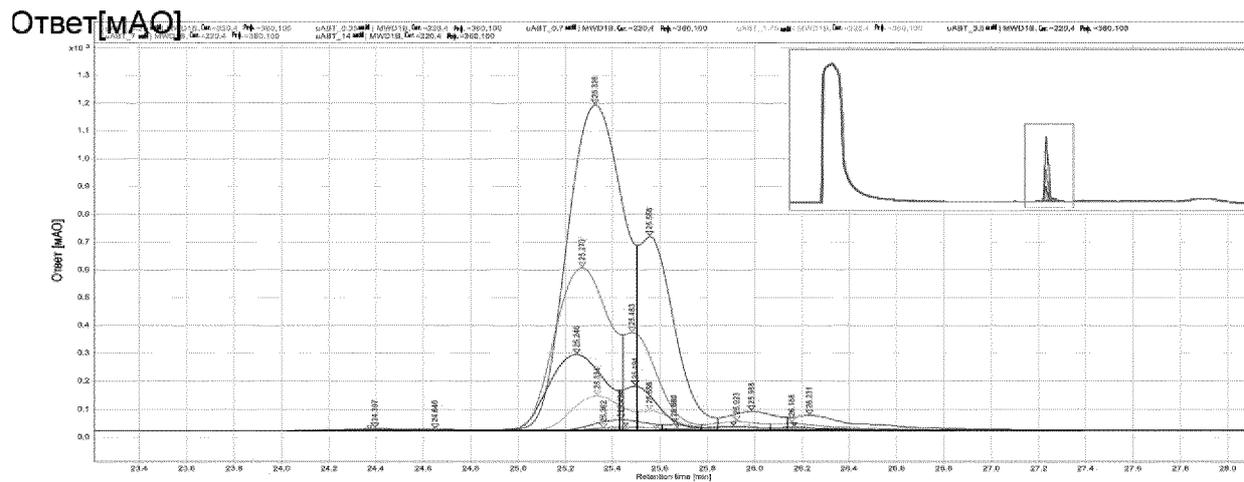
Конц. нагрузки	Площадь пика
10 мкМ	3721,2
5 мкМ	1540,7
2 мкМ	464,0
1 мкМ	113,0
0,5 мкМ	10,1
0,2 мкМ	НД

Фиг. 5



Конц. реагента	Площадь пика
10 мкМ	19521,4
5 мкМ	9004,7
2 мкМ	2929,1
1 мкМ	1087,8
0,5 мкМ	266,4
0,2 мкМ	137,6

Фиг. 6



Конц. иАВТ	Площадь пика
14 мкМ	28710,7
7 мкМ	13780,8
3,5 мкМ	6388,4
1,75 мкМ	2743,1
0,7 мкМ	827,2
0,35 мкМ	271,4
0,21 мкМ	99,7

Фиг. 7