

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393067 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.29

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

(22) Дата подачи заявки
2022.05.17

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ КОНЬЮГИРОВАННЫЕ УСИЛИТЕЛИ ТЕРАПИИ

(31) 63/189,503

(32) 2021.05.17

(33) US

(86) PCT/US2022/029533

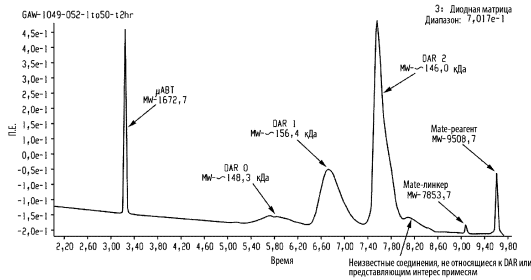
(87) WO 2022/245757 2022.11.24

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

(72) Изобретатель:
Казмиерски Веслав, 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) Композиция, содержащая первое соединение, имеющее структуру P-N-L^{PM}-MOI, где P-N представляет собой фрагмент белкового агента, содержащий остаток лизина, L^{PM} представляет собой линкер и MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент, и второе соединение, имеющее структуру LG-OH, где LG представляет собой группу, содержащую связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью.



A1

202393067

202393067

A1

КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ КОНЬЮГИРОВАННЫЕ УСИЛИТЕЛИ ТЕРАПИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[1] Данная заявка испрашивает приоритет по заявке № 63/189503, поданной 17 мая 2021 г., которая в полном объеме включена посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

[5] В одном варианте осуществления 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; и

второе соединение, имеющее структуру:



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

[6] 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.

Четвертое соединение, имеющее формулу (R-III):



или их комбинацию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[7] Фиг. 1. Репрезентативная кривая УВЭЖХ/УФ280 нм приведена для соединения I-36 (реагент MATE I-20, конъюгированный с IVIG). Условия УВЭЖХ приведены в примере 2. uABT означает универсальный связывающий антитело конец, DAR представляет собой соотношение лекарственный препарат – антитело.

[8] Фиг. 2. Кривые УВЭЖХ для неконъюгированного IVIG (Фиг. 2A), объединенного стандарта с примесями MATE (Фиг. 2B) и конъюгата I-36 (Фиг. 2C).

[9] Фиг. 3. Калибровочные кривые для uABT, объединенных и индивидуальных примесей MATE-линкер и MATE-реагент. Образцы готовят и анализируют способами, приведенными в примере 2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[10] Следующее подробное описание приведено, чтобы помочь специалистам в

данной области техники при практической реализации настоящего изобретения. Типовые варианты осуществления будут подробно описаны далее. Однако эти варианты осуществления являются исключительно иллюстративными, и настоящее изобретение ограничено не ими, а определено объемом прилагаемой формулы изобретения. Специалисты в данной области техники могут осуществлять модификации и вариации в описанных в данном документе вариантах осуществления, не отступая от сущности или объема настоящего изобретения.

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

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

[13] Следует понимать, что хотя термины первый, второй, третий и т. д. можно использовать в данном документе для описания различных элементов, компонентов, участков, слоев и/или разделов, эти элементы, компоненты, участки, слои и/или разделы не ограничиваются этими терминами. Эти термины используют только для того, чтобы отличить один элемент, компонент, участок, слой или раздел от другого элемента, компонента, участка, слоя или раздела. Таким образом, первый элемент, компонент, участок, слой или раздел, обсуждаемые ниже, можно называть вторым элементом, компонентом, участком, слоем или разделом, не отступая от принципов представленных вариантов осуществления.

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

[14] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в области техники, к

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

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

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

[17] В контексте данного документа, если не приведено иное конкретное определение, термин «замещенная» относится к группе, замещенной дейтерием, галогеном (-F, -Cl, -Br, -I), гидроксигруппой (-OH), аминогруппой (-NH₂), карбоксильной группой (-CO₂H), замещенной или незамещенной C1-C10 аминной группой, нитро-группой (-NO₂), C1-C10 алкильной группой, C3-C10 циклоалкильной группой, C6-C12 арильной группой, C1-C10 алкокси-группой, C1-C10 трифторалкильной группой, такой как трифторметильная группа (-CF₃) и т. п., или циано-группой (-CN), вместо по меньшей мере одного атома водорода замещающих группы или соединения.

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

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

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

[21] 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; и

Второе соединение, имеющее структуру:



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

[22] 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.

Четвертое соединение, имеющее формулу (R-III):



или их комбинацию.

[23] Вышеуказанные соединения, имеющие структуру формул (P-II), (LG-I), (R-I) и (R-III), подробно описаны в Международной патентной заявке № PCT/US20/61127, поданной 18 ноября 2020 г., которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

МИШЕНИ

[24] Специалистам в данной области техники после прочтения представленного изобретения станет очевидно, что предложенные в данном документе методики применимы для конъюгации различных агентов-мишеней с многими типами представляющих интерес фрагментов. В некоторых вариантах осуществления предложенные методики в особенности применимы для конъюгации белковых агентов с различными представляющими интерес фрагментами. В некоторых вариантах осуществления агенты-мишени представляют собой или содержат белковый агент, нуклеиновую кислоту или их комбинацию.

[25] В некоторых вариантах осуществления агент-мишень представляет собой или

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

[26] 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).

[27] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой терапевтическое антитело, например одобренное FDA антитело для терапевтических применений. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело применимо для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой адалимумаб, алемтузумаб, атезолизумаб, авелумаб, ипилимумаб, цетуксимаб, даратумумаб, динутуксимаб, элотузумаб,

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

[28] 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).

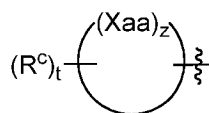
[29] Как понятно специалистам в данной области техники, предложенные методики,

помимо прочего, могут обеспечить направленную конъюгацию с нативными мишенями, например нативными антителами. В некоторых вариантах осуществления агенты-мишени представляют собой или содержат агенты на основе нативных антител. В некоторых вариантах осуществления агенты-мишени представляют собой или содержат сконструированные агенты на основе антител. В некоторых вариантах осуществления агенты-мишени, например антитела, не содержат сконструированные остатки не встречающихся в природе аминокислот.

СВЯЗЫВАЮЩИЕ МИШЕНЬ ФРАГМЕНТЫ

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

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



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

каждый Xaa независимо представляет собой остаток аминокислоты или аминокислотный аналог;

t равно 0–50;

z равно 1–50;

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

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

каждый $-C(R)-$ 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 $-L^{LG1}-$, $-L^{LG1}-L^{LG2}-$, $-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-$ или $-L^{LG1}-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-$;

RG представляет собой $-L^{RG1}-L^{RG2}-$, $-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$, $-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$ или

$-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-L^{RG2}-$;

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

каждый L независимо 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

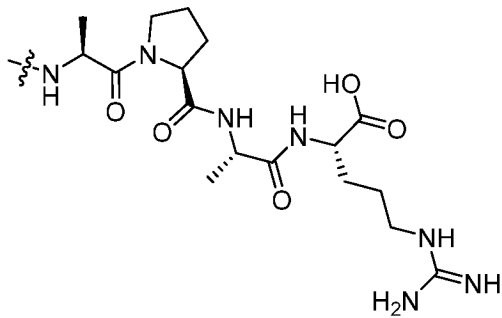
две или более групп R на двух или более атомах необязательно и независимо вместе со своими промежуточными атомами образуют необязательно замещенное 3–30-членное моноциклическое, бициклическое или полициклическое кольцо, имеющее, в дополнение к промежуточным атомам, 0–10 гетероатомов.

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

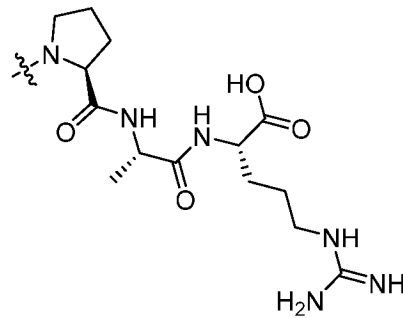
[32] В некоторых вариантах осуществления LG представляет собой или содержит

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

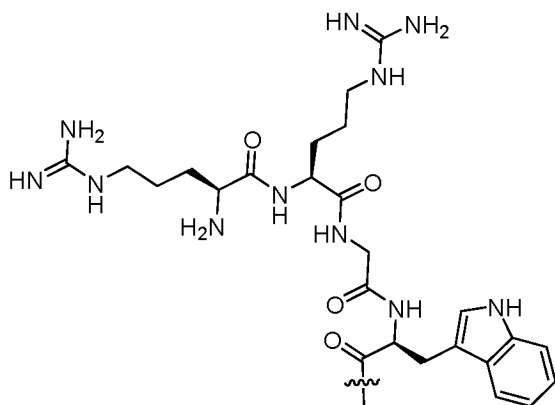
[33] В некоторых вариантах осуществления LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, имеющий структуру от A-1 до A-50:



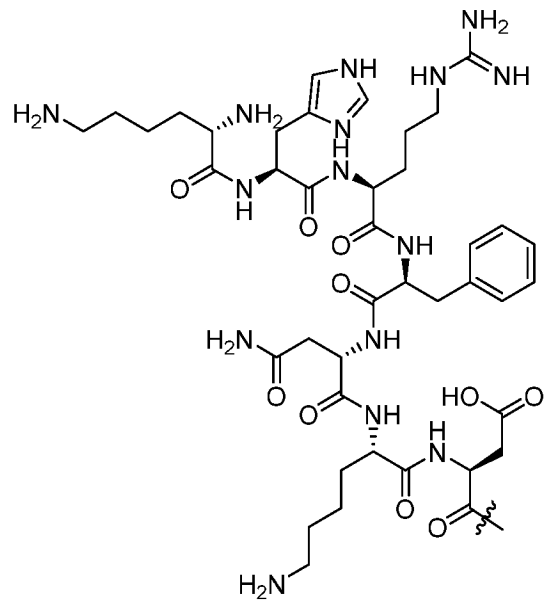
A-1



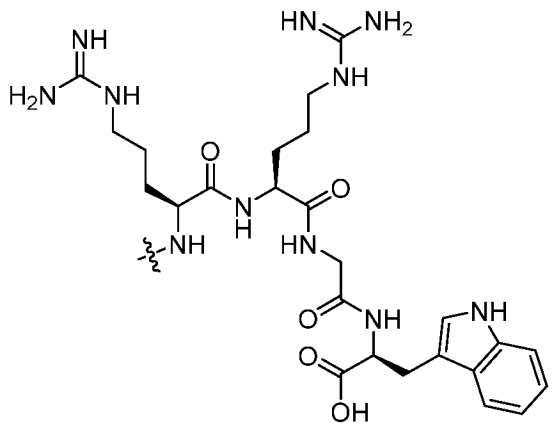
A-2



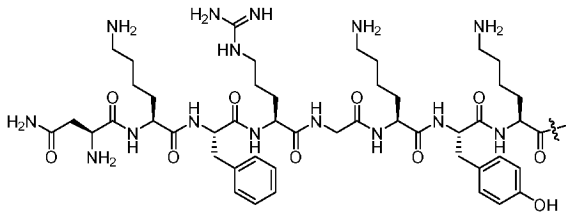
A-3



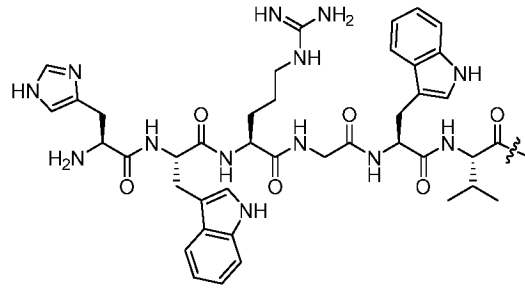
A-4



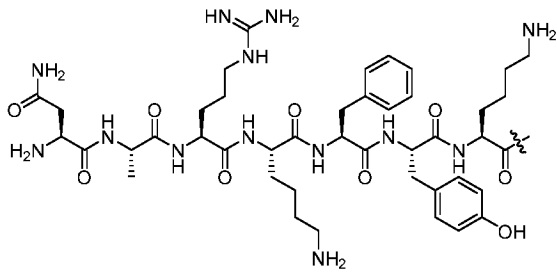
A-5



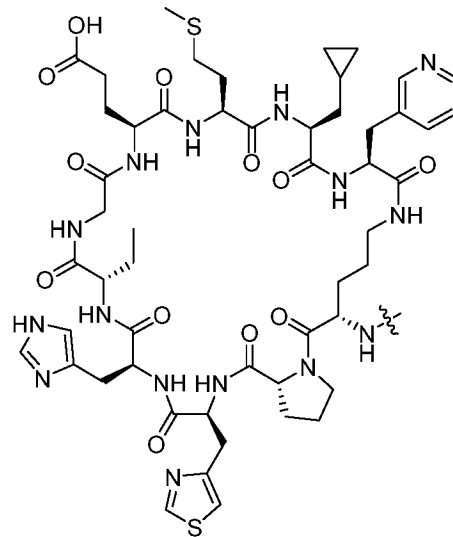
A-6



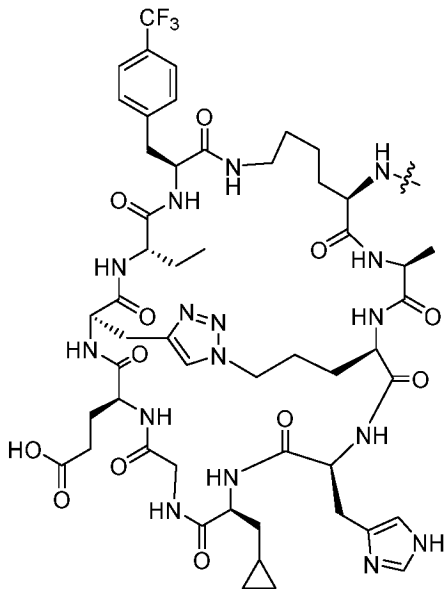
A-7



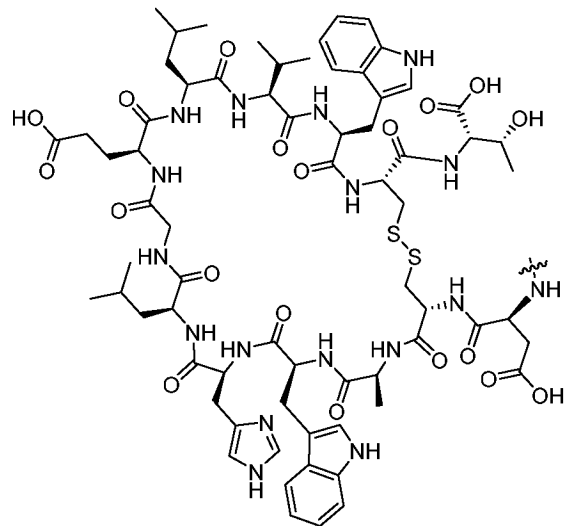
A-8



A-9

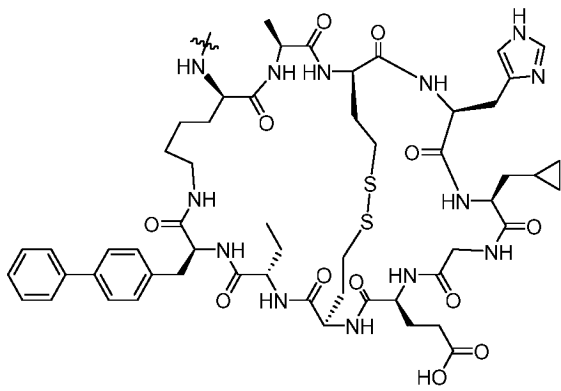


A-10

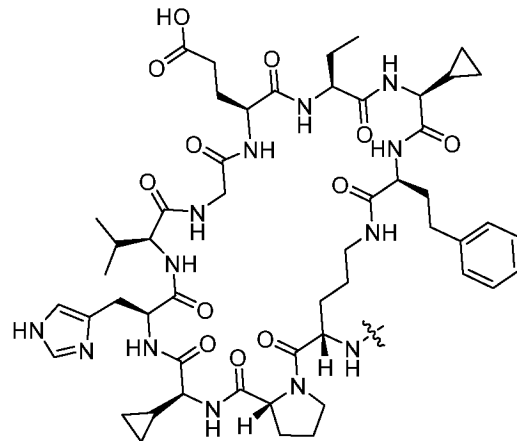


A-11

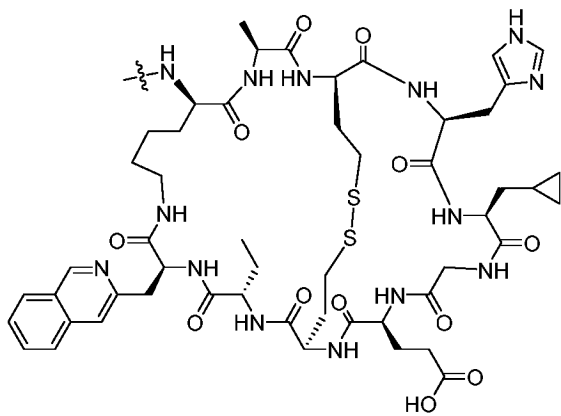
A-12



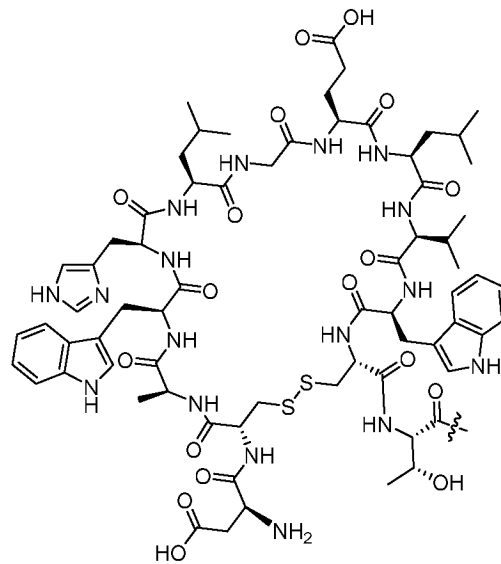
A-13



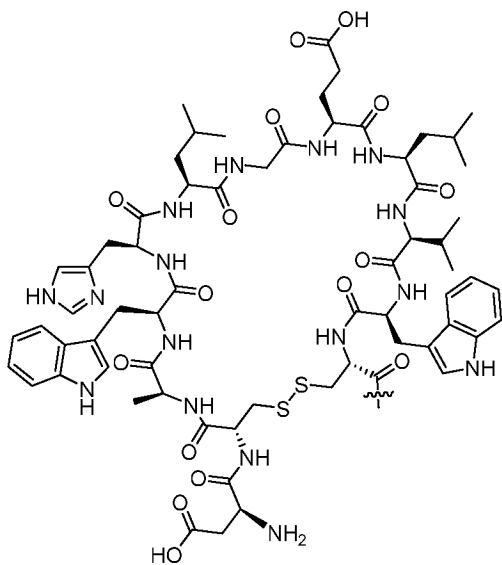
A-14



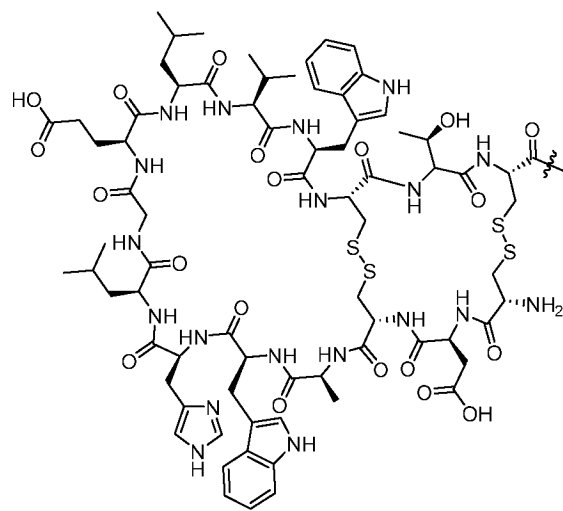
A-15



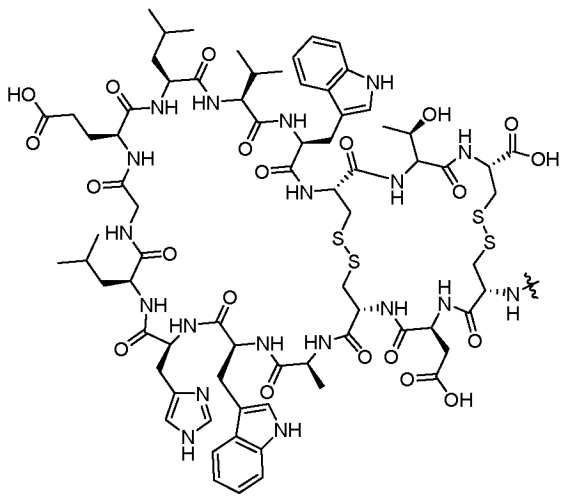
A-16



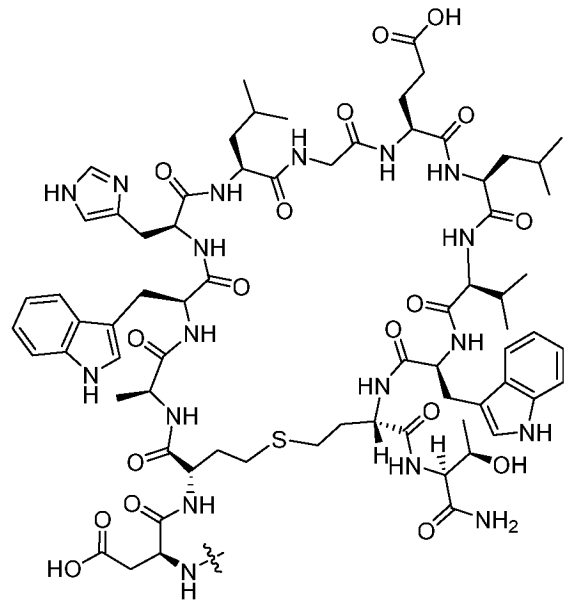
A-17



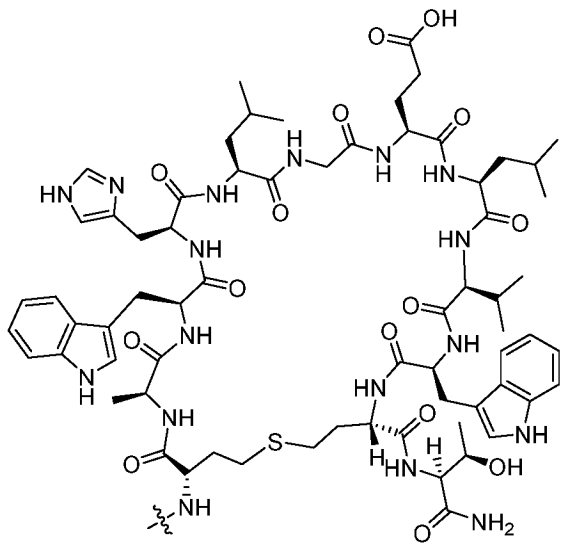
A-18



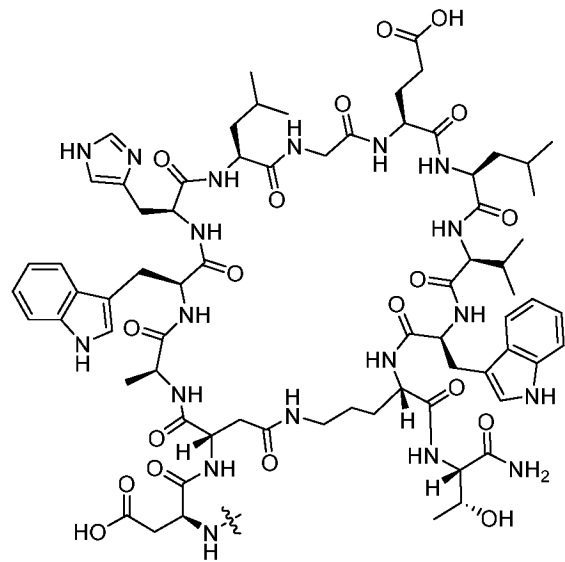
A-19



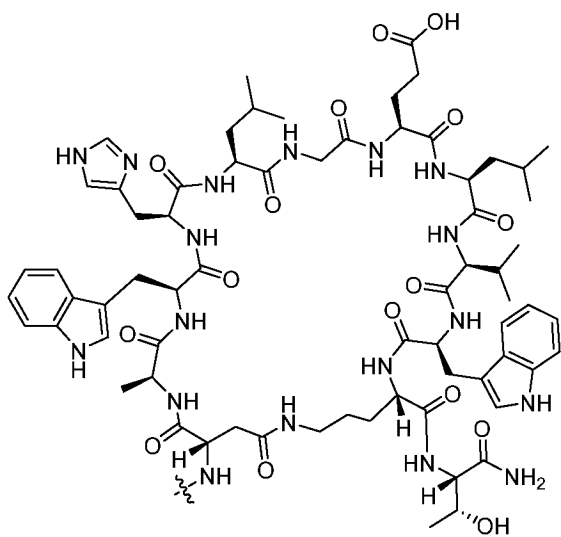
A-20



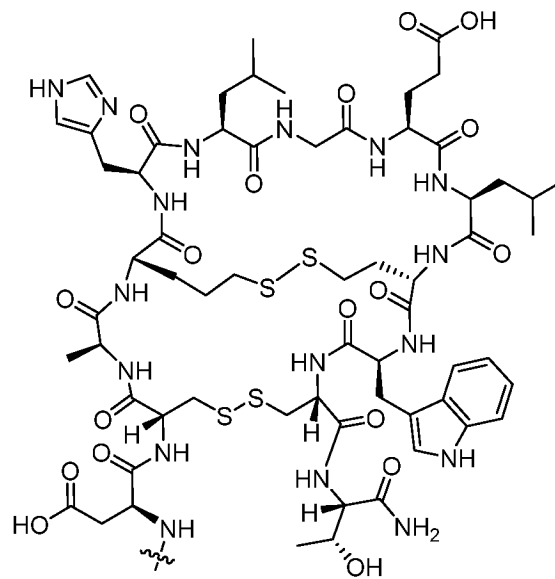
A-21



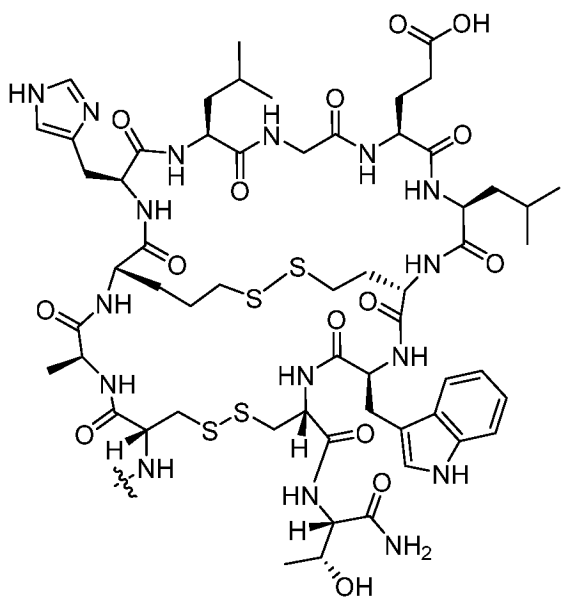
A-22



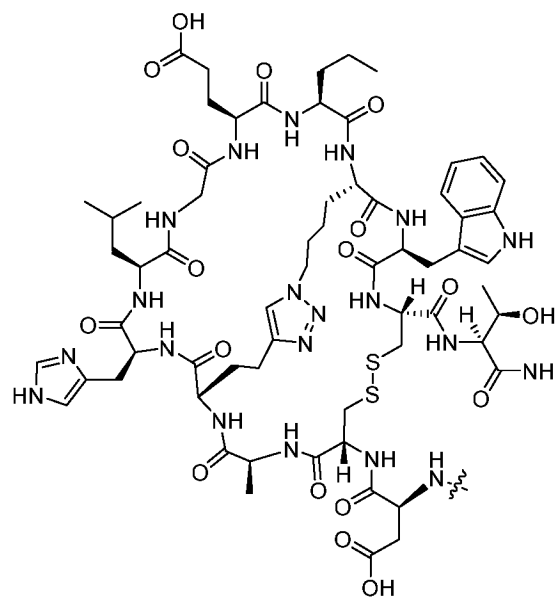
A-23



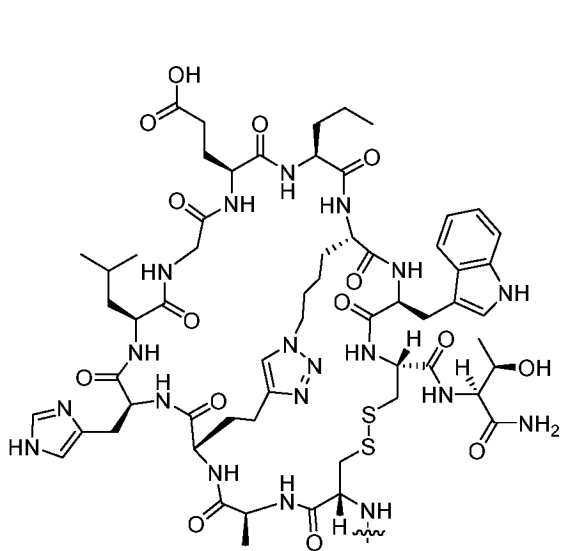
A-24



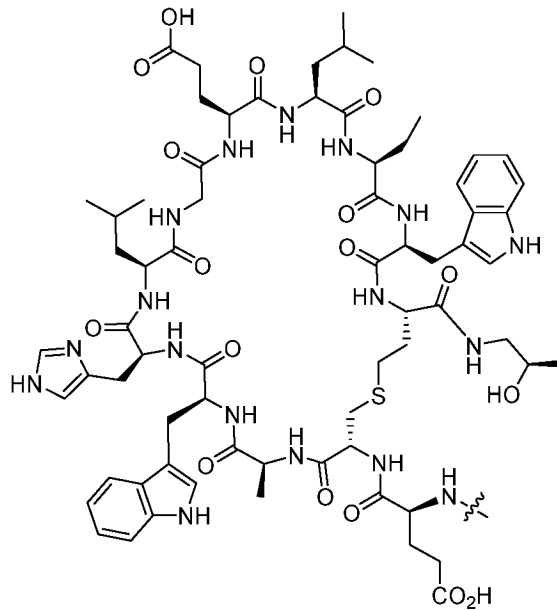
A-25



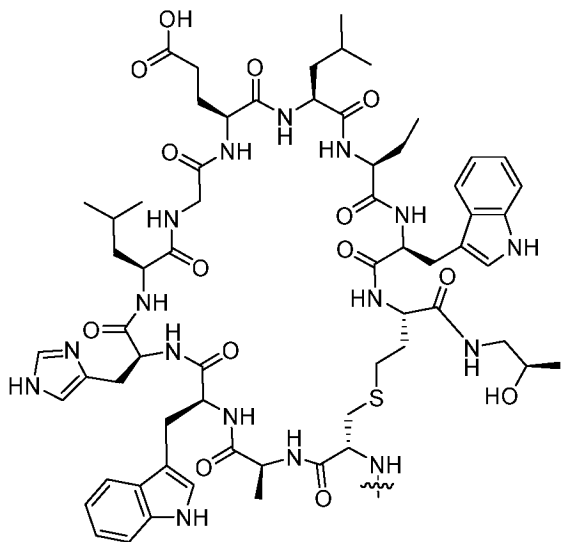
A-26



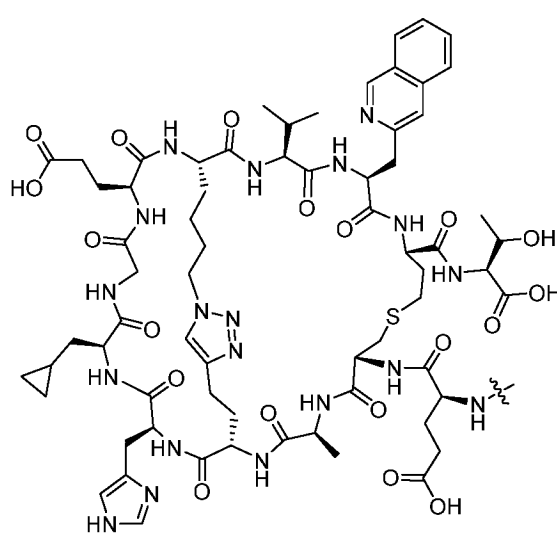
A-27



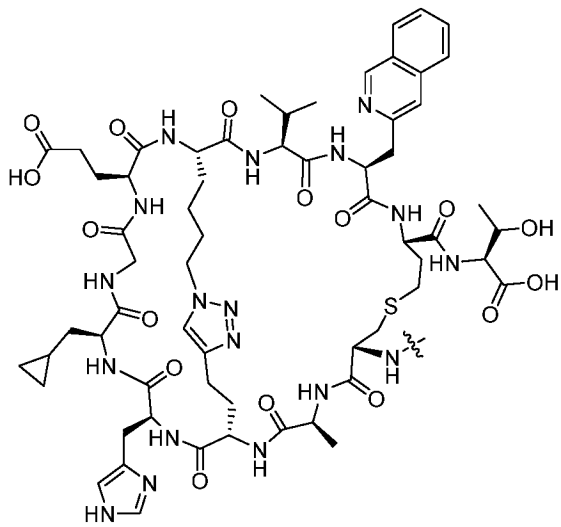
A-28



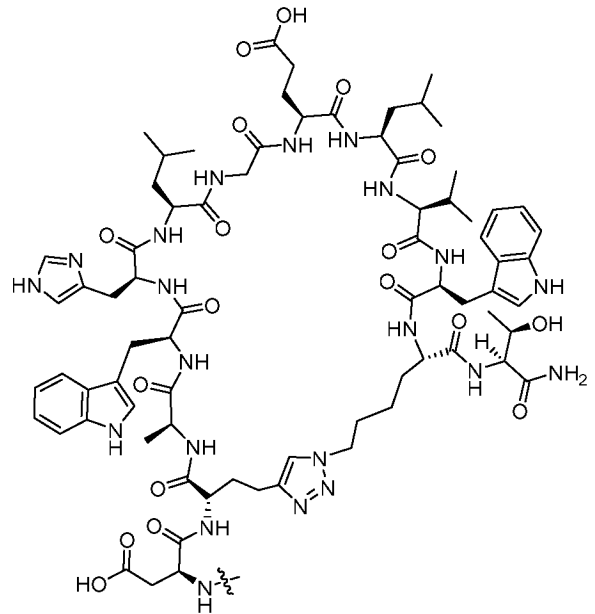
A-29



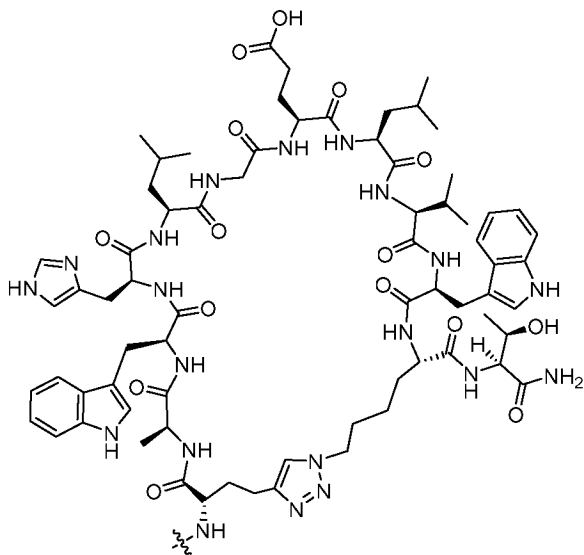
A-30



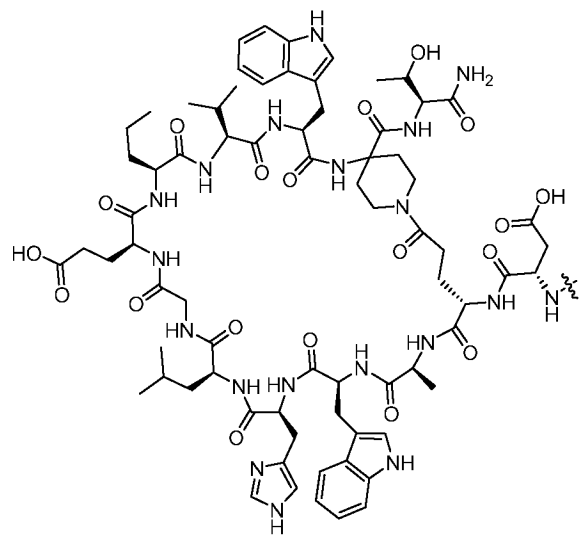
A-31



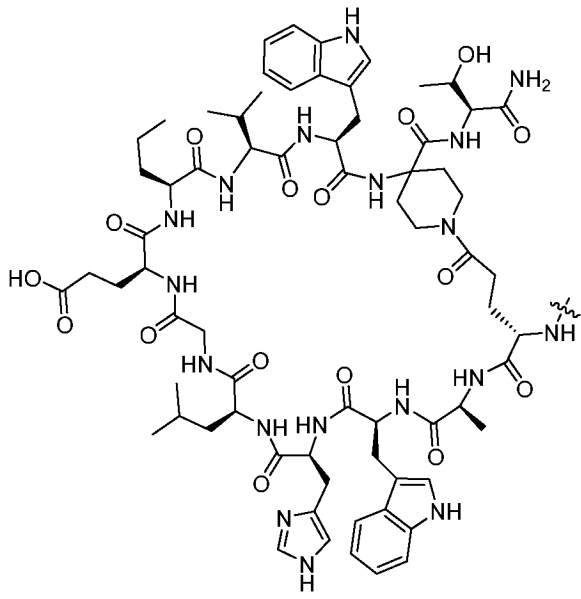
A-32



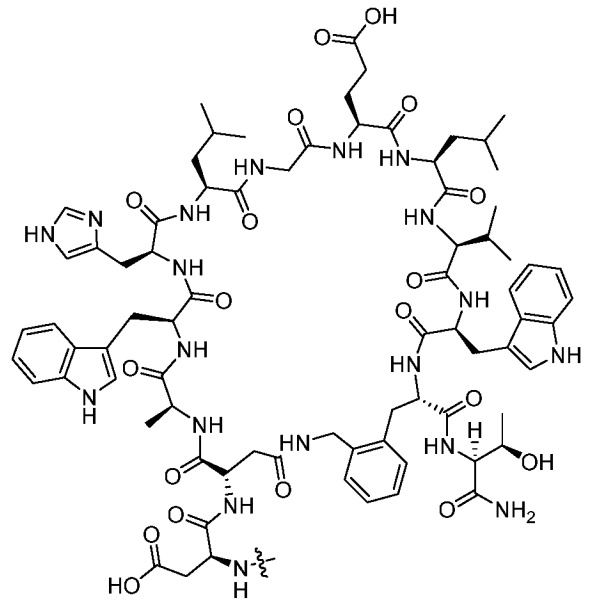
A-33



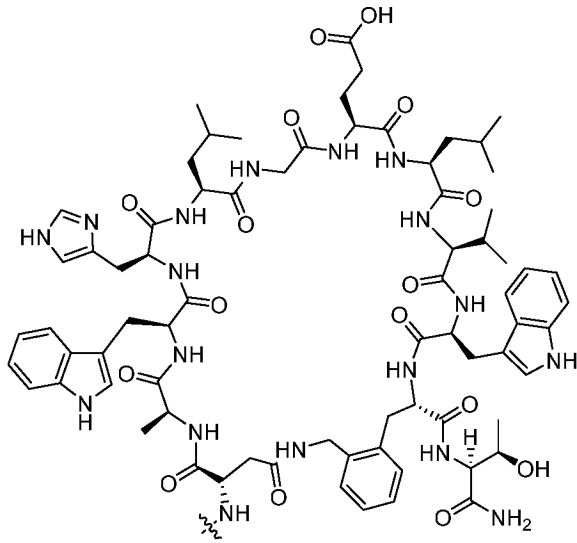
A-34



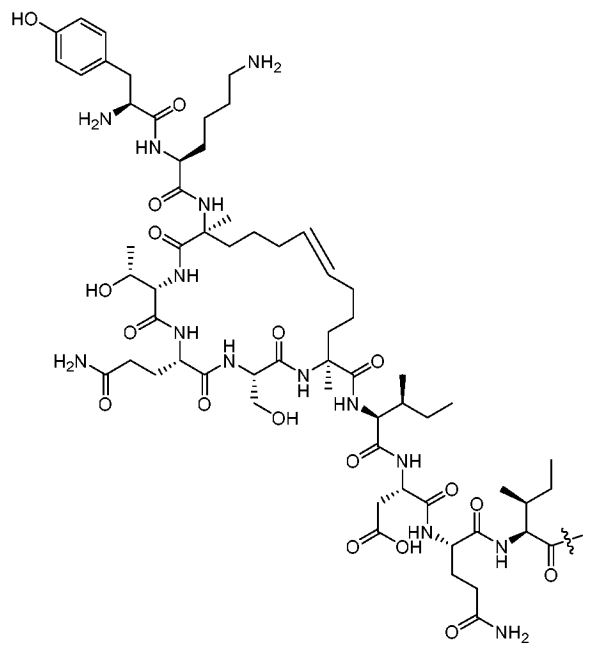
A-35



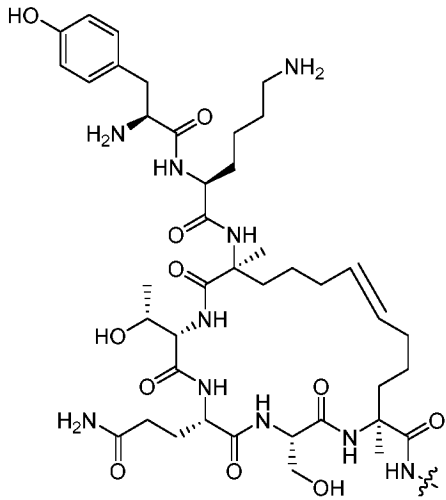
A-36



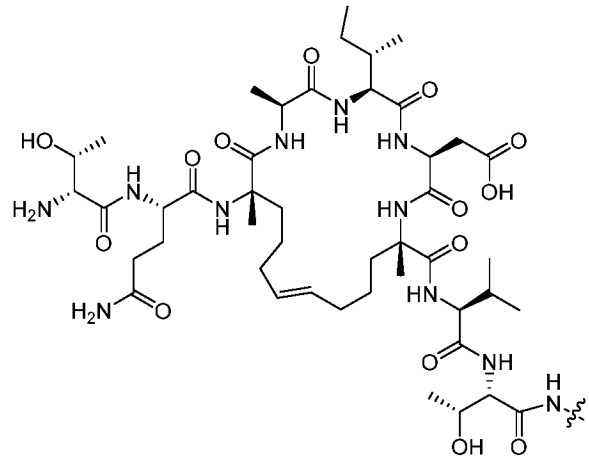
A-37



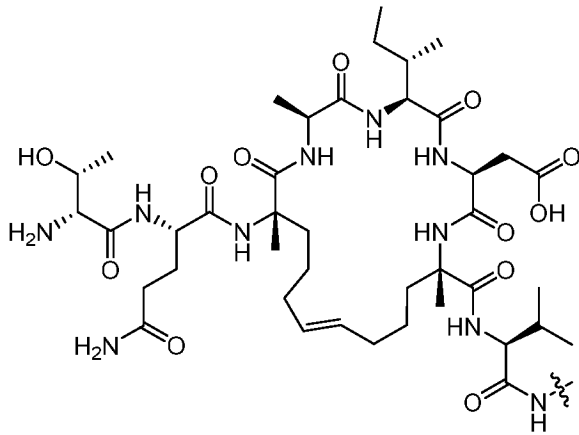
A-38



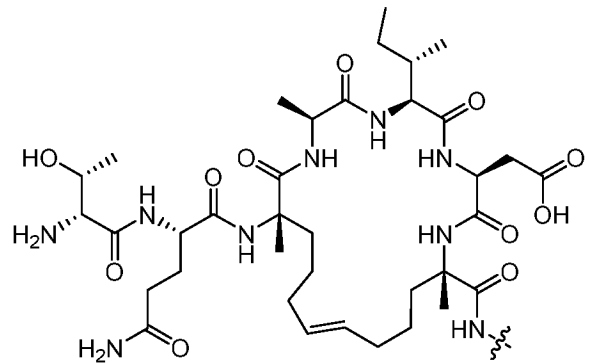
A-39



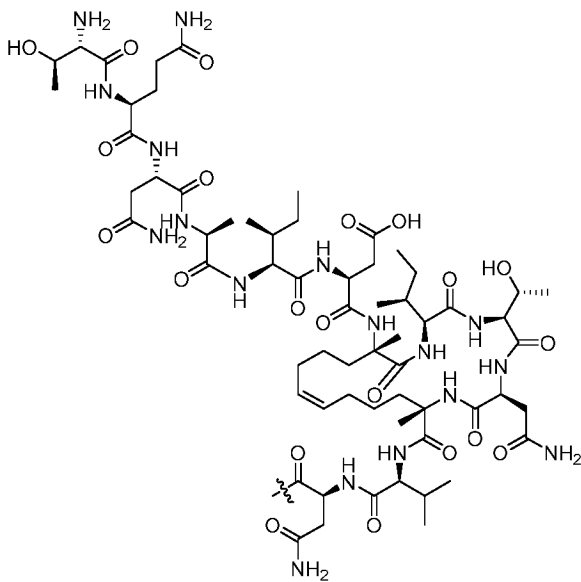
A-40



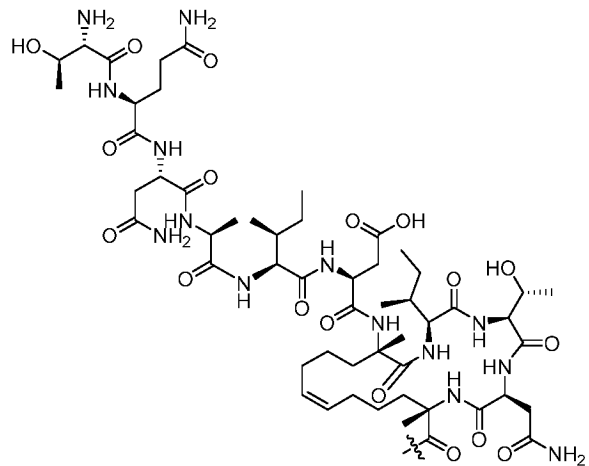
A-41



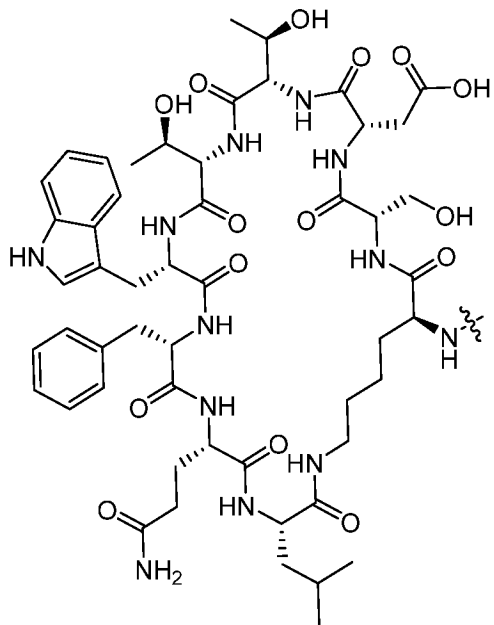
A-42



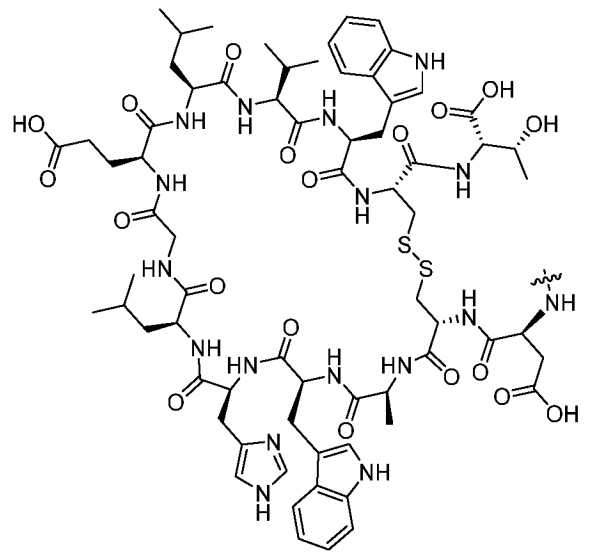
A-43



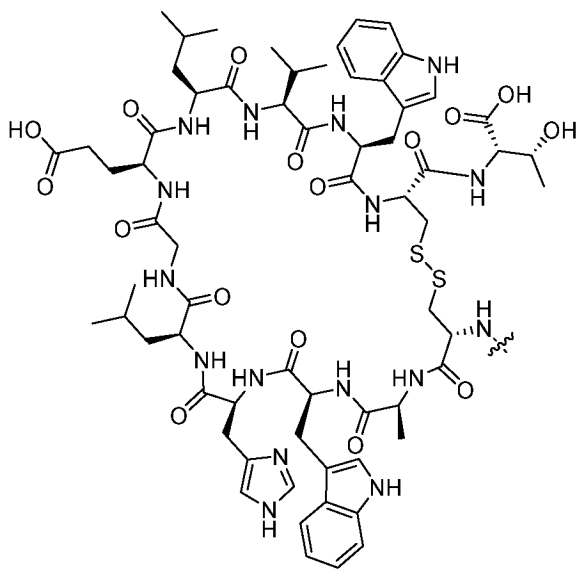
A-44



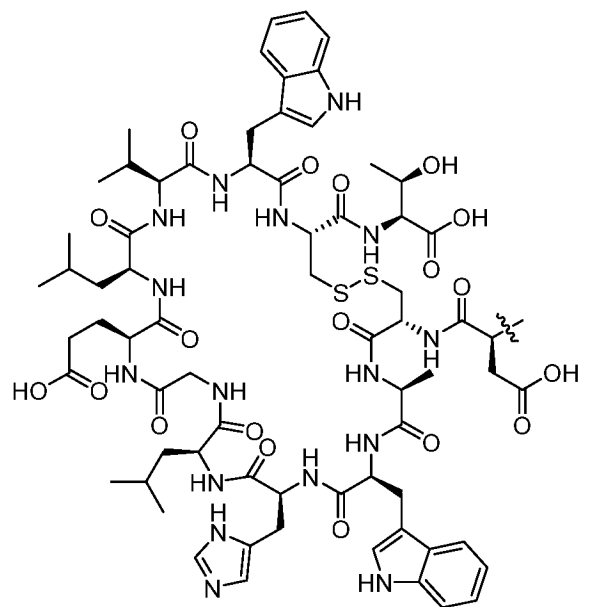
A-45



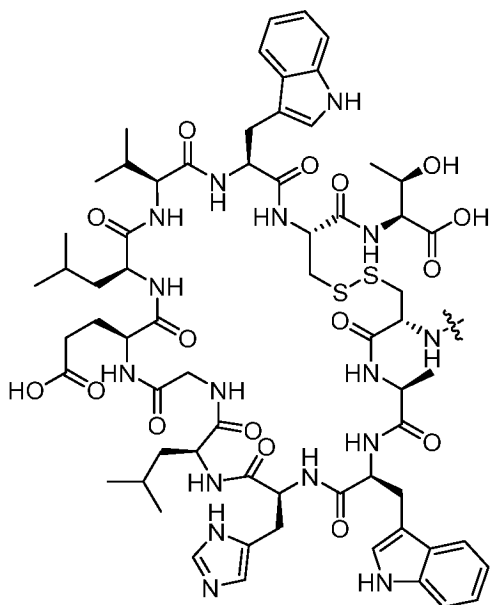
A-46



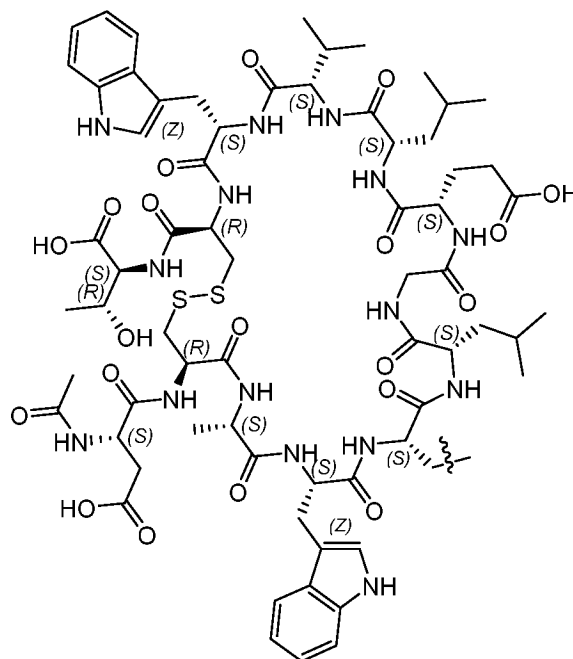
A-47



A-48



A-49



A-50

ПРЕДСТАВЛЯЮЩИЕ ИНТЕРЕС ФРАГМЕНТЫ

[34] 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.

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

[36] Представляющий интерес фрагмент может представлять собой фрагмент, имеющий аффинность в отношении конкретной мишени, связанной с медицинским состоянием, нарушением или заболеванием. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес фрагменты представляют собой или содержат фрагменты терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит

лекарственный фрагмент, например лекарственный фрагмент в конъюгате антитело – лекарственный препарат. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит токсический агент. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит цитотоксический агент. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит противораковый агент. В некоторых вариантах осуществления противораковый агент представляет собой химиотерапевтический агент.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- (a) представляющий интерес фрагмент представляет собой или содержит

терапевтический агент;

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

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

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

СВЯЗЫВАЮЩИЕ ГРУППЫ

[49] 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.

[50] 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.

[51] 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.

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

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

РЕАКТИВНЫЕ ГРУППЫ

[54] 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.

[55] 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).

[56] 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 сайт представляет собой K253 тяжелой цепи IgG2. В некоторых вариантах осуществления сайты представляют собой K239 и/или K241 тяжелой цепи IgG4. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K239 тяжелой цепи IgG4. В некоторых вариантах осуществления сайт представляет собой K241 тяжелой цепи IgG4. В некоторых вариантах осуществления конъюгация селективно происходит в одном или более сайтах тяжелой цепи по сравнению с сайтами легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, в случае методик без связывающих мишень фрагментов, конъюгация происходит в сайтах легкой цепи больше, чем в сайтах тяжелой цепи (например, смотрите Фиг. 15).

[57] 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.

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

L^{LG2} представляет собой $-NH-$, $-NHC(O)-$, $-(CH_2)_n-NHC(O)-$, $-(CH_2)_n-OC(O)-$, $-(CH_2)_n-OC(O)NH-$, $-C(O)-NHCH_2-$, $-C(O)-NHCH_2CH_2-$, $-C(O)O-CH_2-$ или $NH-C(O)O-CH_2-$;

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

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

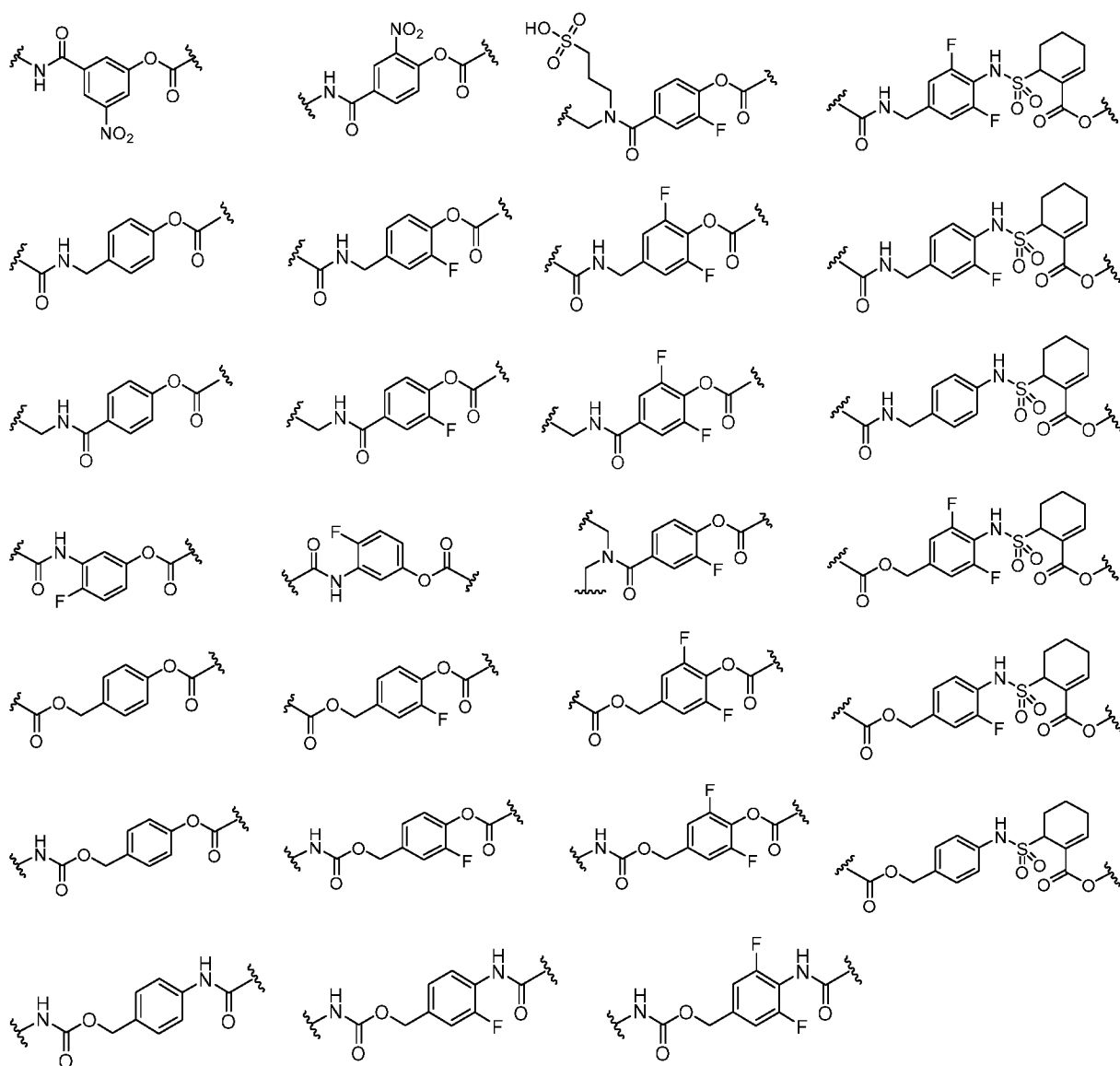
L^{RG1} представляет собой $-O-C(O)-$, $-C(O)-$, $-S(O)-$, $-OS(O)_2-$ или $-OP(O(OR))-$;

L^{RG2} представляет собой $-CH_2-C(O)-$, $-C(O)-$ или $-CH_2-$;

L^{LG} представляет собой $-(O)C-[(CH_2)_nO]_m(CH_2)_nNH-$, $-(O)C-[(CH_2)_nO]_m(CH_2)_nNH-$,
 $-[(CH_2)_nO]_mNHC(O)[(CH_2)_nO]_mNH-$, $-[(CH_2)_nO]_m\{NHC(O)[(CH_2)_nO]\}_pNH-$,
 $-[(CH_2)_nO]_mCy[(CH_2)_nO]_mNH-$, $-[(CH_2)_nO]_mCy[(CH_2)_nO]_mNHC(O)[(CH_2)_nO]_mNH-$ или
 $-[(CH_2)_nO]_mCy[(CH_2)_nO]_m\{NHC(O)[(CH_2)_nO]\}_pNH-$,

где n , m и p представляют собой целые числа, в каждом случае независимо выбранные из 1–12, а Cy представляет собой необязательно замещенную циклическую группу.

[59] В некоторых вариантах осуществления RG представляет собой группу формулы $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-$ и выбран из:

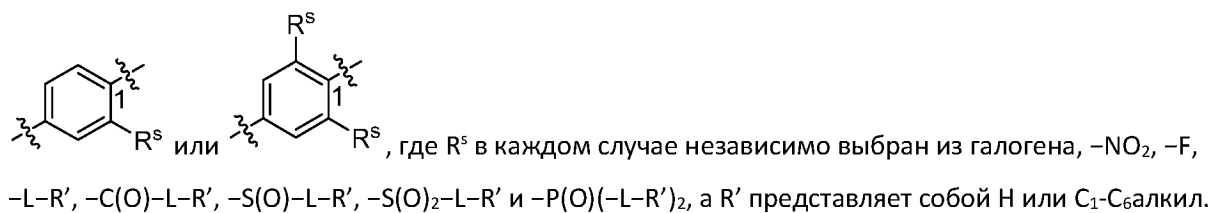


[60] В некоторых вариантах осуществления n равен 2 в каждом случае.

[61] В некоторых вариантах осуществления реактивная группа представляет собой или содержит $-C(O)-O-$ или $-O-C(O)-$.

[62] В некоторых вариантах осуществления реактивная группа содержит арильную группу, необязательно связанную с $-C(O)-O-$ или $-O-C(O)-$ и замещенную одной или более электроноакцепторными группами.

[63] В некоторых вариантах осуществления арильная группа имеет структуру



КОМПОЗИЦИИ

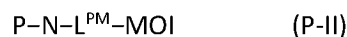
[64] В некоторых вариантах осуществления композиции могут содержать первое и второе соединения в эквимольном количестве. В некоторых вариантах осуществления количество второго соединения может составлять 50 мольных процентов (моль %) или менее в расчете на общее число молей первого и второго соединений 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.

[65] 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.

[66] В другом 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; и по меньшей мере

одно

второе соединение, имеющее структуру:



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

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.

[67] В другом варианте осуществления композиция может дополнительно содержать: четвертое соединение, имеющее формулу (R-III):



или их комбинацию.

[68] Данное изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Некоторые методики для получения агентов: I-29, I-30, I-31, I-32, I-33, I-34, I-35, I-36.

[69] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены методики для получения агентов МАТЕ и их композиций. В некоторых вариантах осуществления предложенные методики включают проведение реакции композиции, содержащей множество агентов на основе антител (например, композиций IVIG, таких как Gamunex-C), с композицией, содержащей множество агентов, каждый из которых содержит связывающий мишень фрагмент, связывающий антитело фрагмент и реактивную группу между ними (и необязательные линкерные фрагменты, связывающие такие фрагменты) (например, I-3, I-7, I-8, I-15, I-19, I-20, I-21, I-22, I-23, и т. д.). Ниже в качестве примеров описаны варианты получения некоторых агентов МАТЕ и их композиций.

1. Протокол реакции/конъюгации.

1.1 Замена буфера IVIG

[70] Проводили замену буфера Gamunex-C (1 мл, ~100 мг/мл) на 50 мМ бората, pH 8,2, используя Amicon-15 мл звено с НОММ 30 кДа. Концентрацию белка IVIG после замены буфера определяли с помощью УФ-видимой спектроскопии, используя коэффициент экстинкции 1,41 мл·мг⁻¹·см⁻¹, на 280 нм. IVIG после замены буфера доводили до 20 мг/мл, используя 50 мМ боратный буфер, pH 8,2.

1.2 Получение исходного раствора реагентов

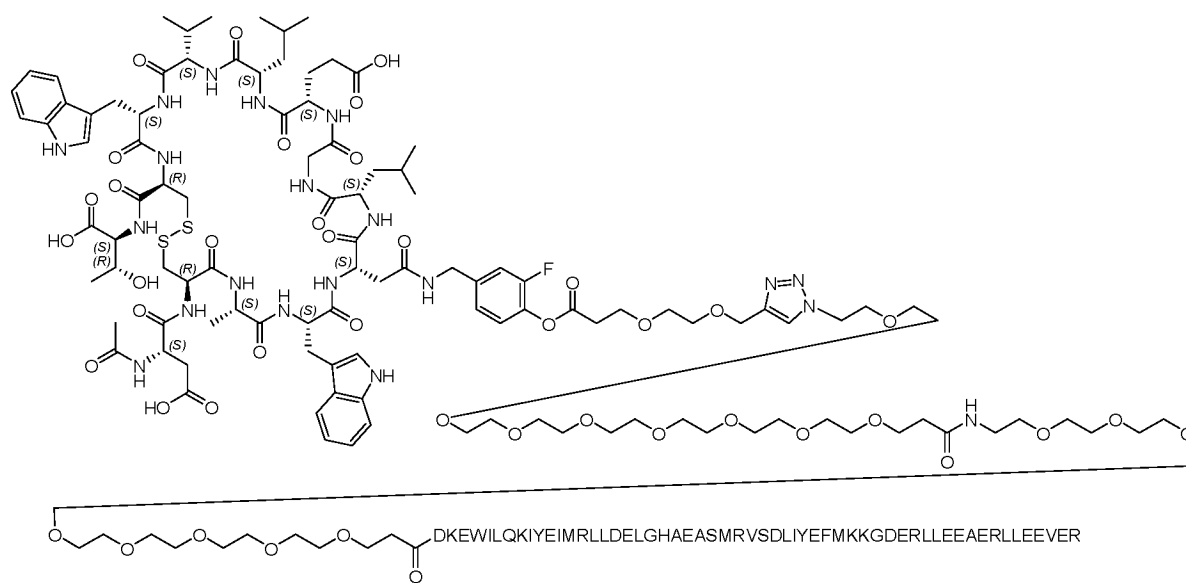
[71] Реагенты взвешивали по отдельности, а объем ДМСО, используемый для получения исходного раствора, рассчитывали следующим образом:

объем ДМСО (мл) = (масса твердого вещества (мг)/молекулярная масса) x чистота (%) / 5 мМ x 10⁶.

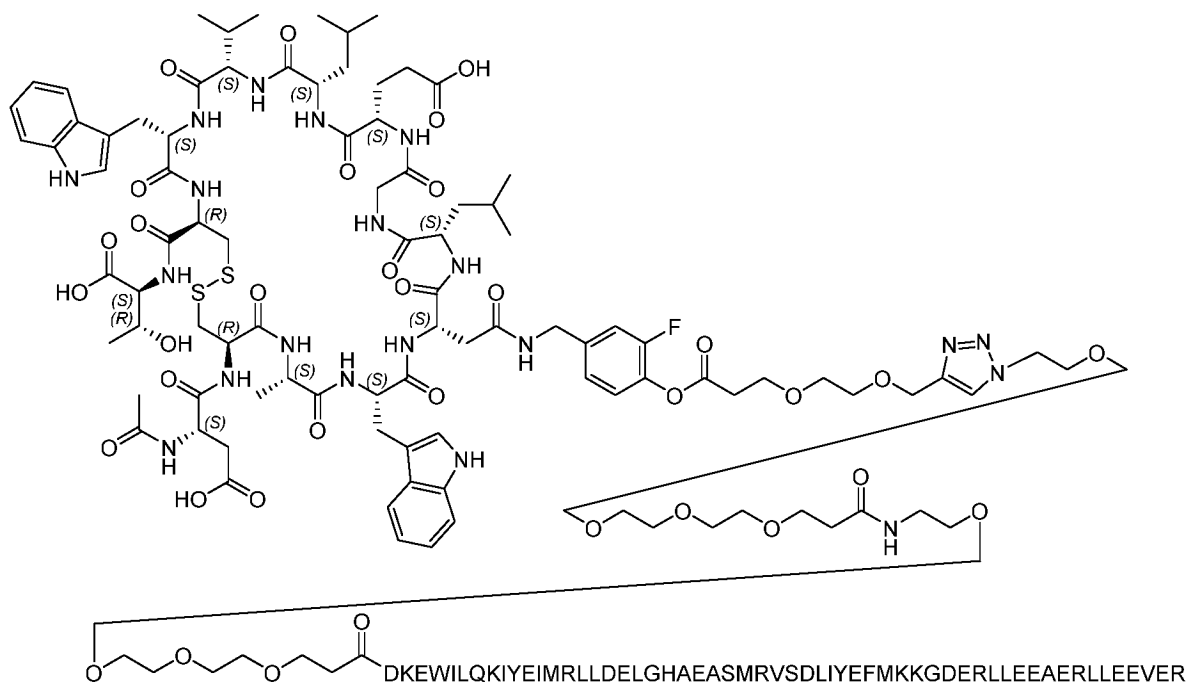
[72] Данные для некоторых препаратов реагентов представлены ниже:

Реагент	Количество твердого вещества (мг)	Чистота (%)	Молекулярная масса	ДМСО объем (мкл)	Конечная концентрация реагента
I-8	4,05	77,1	9159,31	68,2	5 мМ
I-7	2,17	87,1	9511,73	39,7	
I-15	1,85	86,0	9510,75	33,4	
I-19	1,44	86,4	10084,38	24,7	
I-21	0,65	60,3	9049,24	8,7	
I-22	2,42	91,8	9472,74	46,9	
I-23	1,50	91,5	9091,28	30,2	
I-20	2,39	97,9	9514,78	49,2	

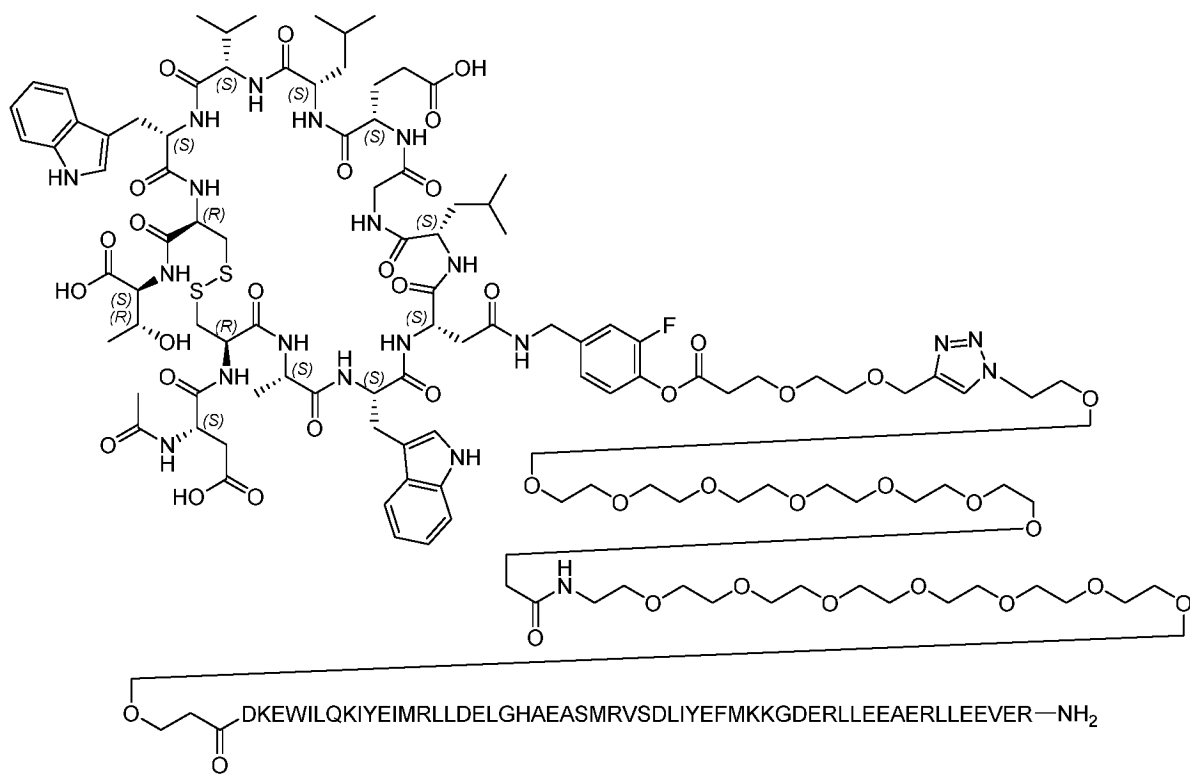
[73] Структуры реагентов I-7, I-8, I-15, I-19, I-20, I-21, I-22 и I-23 приведены ниже:



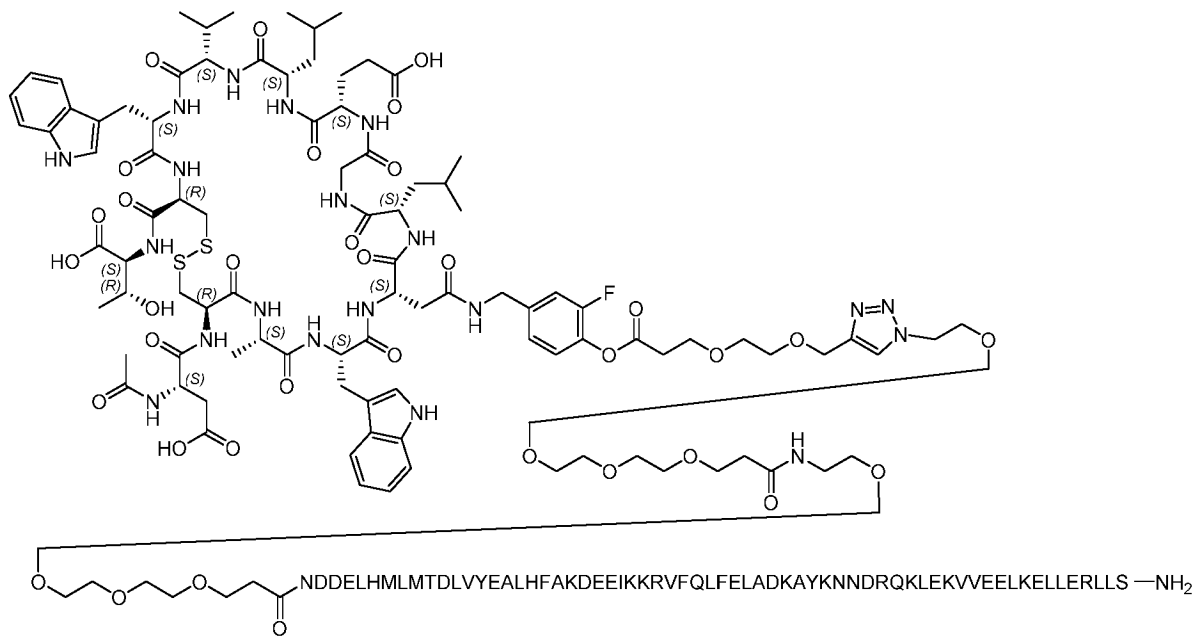
I-7 (SEQ ID NO:2)



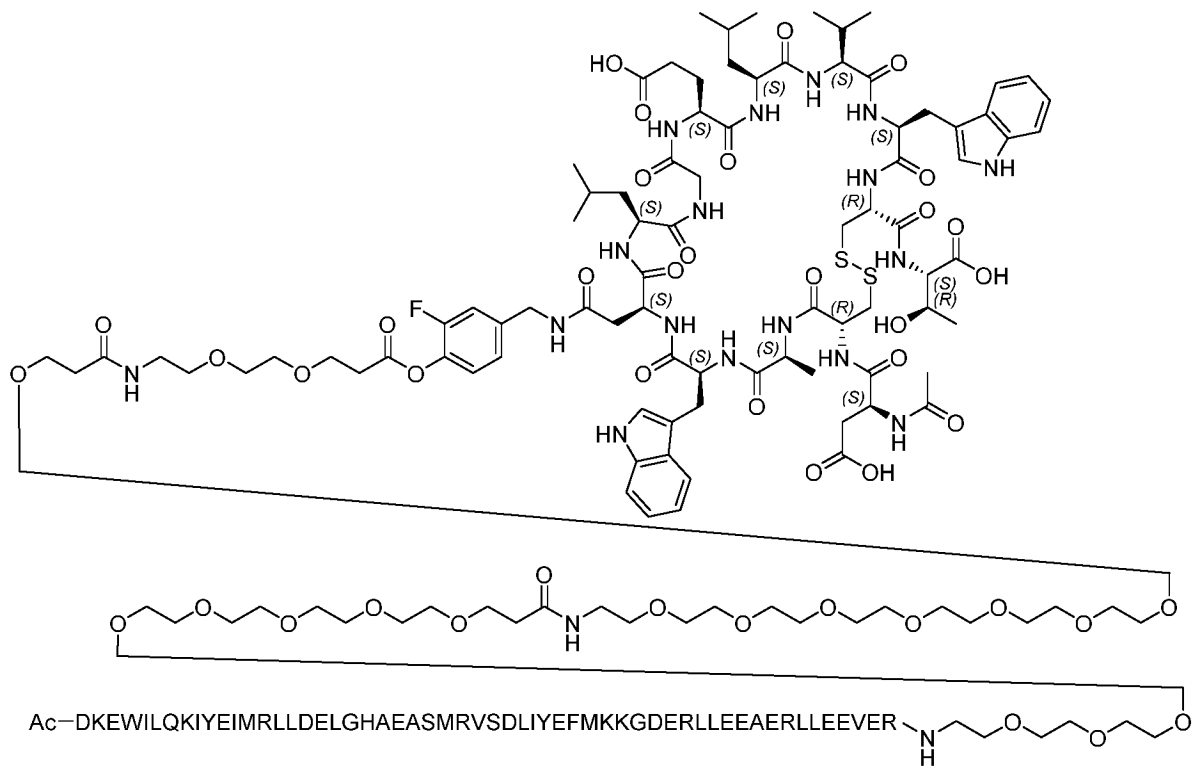
I-8 (SEQ ID NO:2)



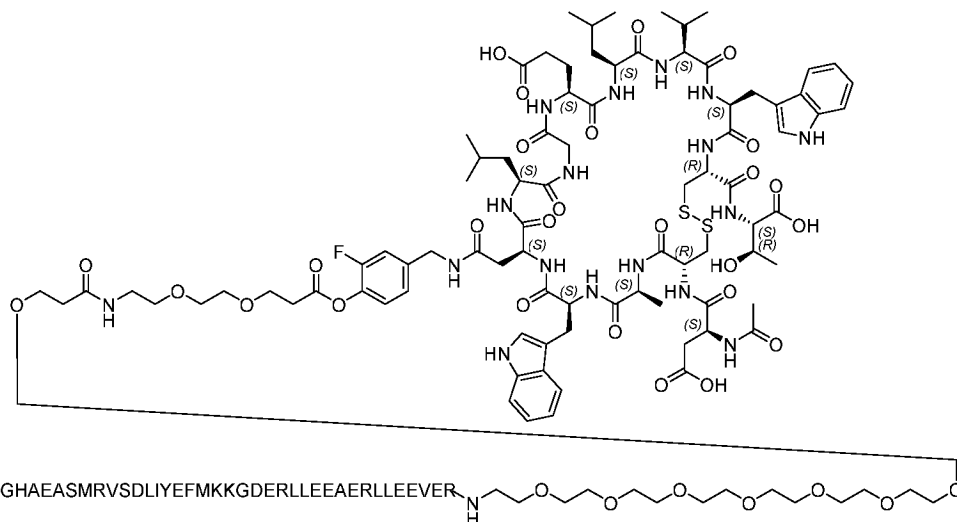
I-15 (SEQ ID NO:2)



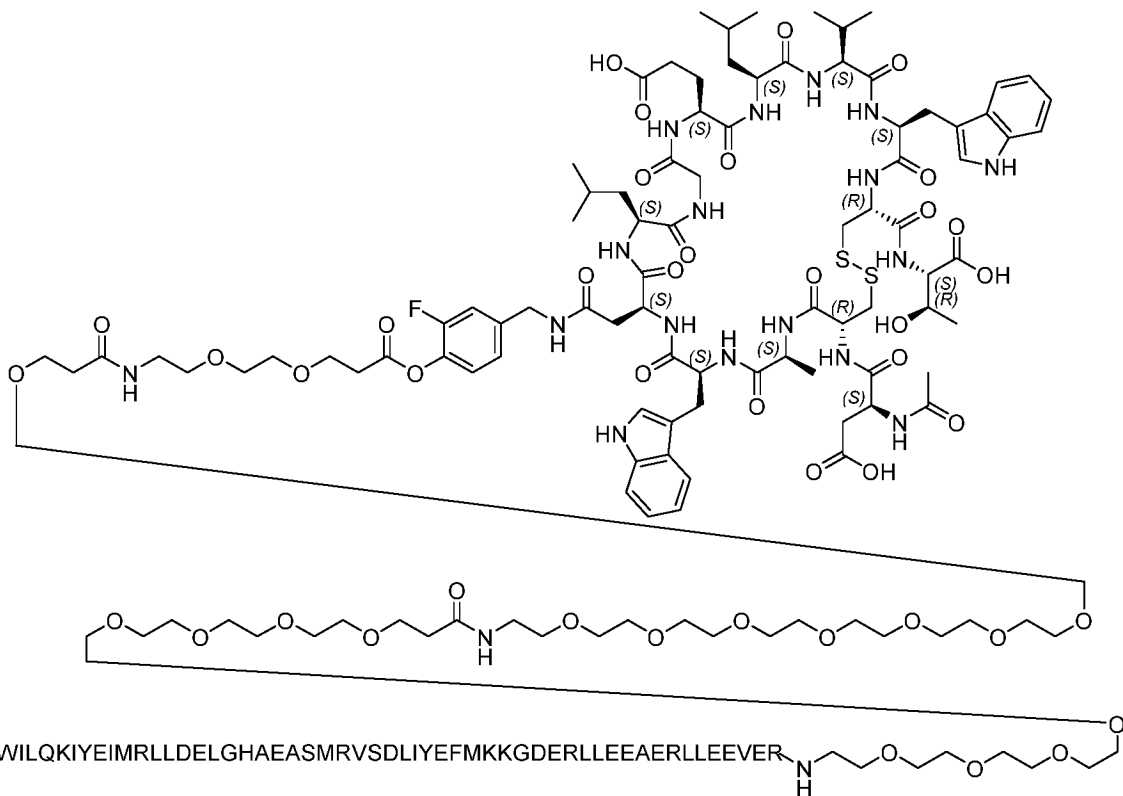
I-19 (SEQ ID NO:3)



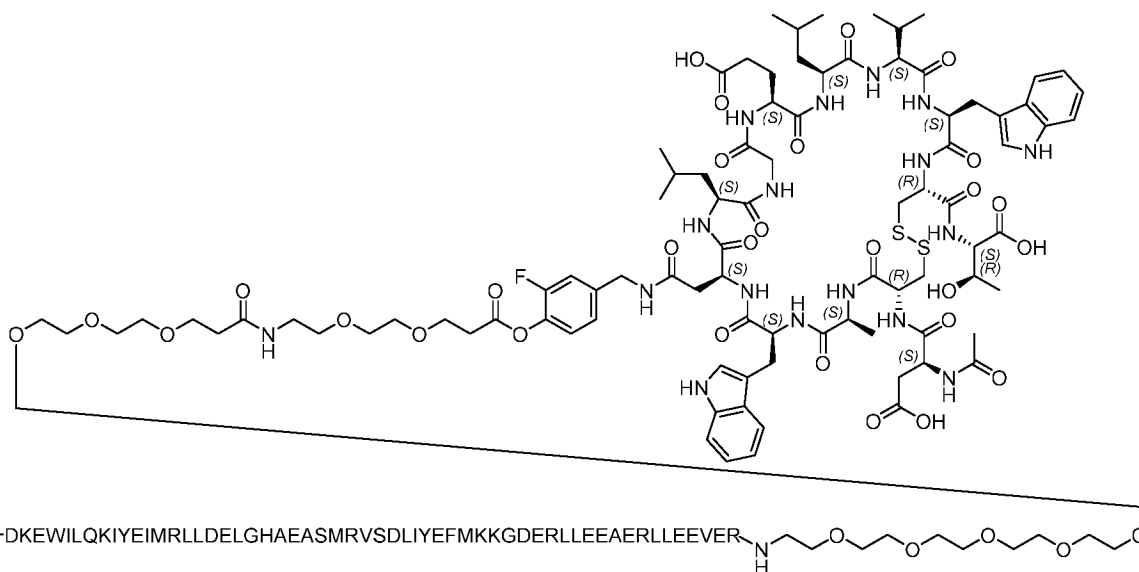
I-20 (SEQ ID NO:2)



I-21 (SEQ ID NO:2)



I-22 (SEQ ID NO:2)



I-23 (SEQ ID NO:2)

1.3 Условия реакции конъюгации

[74] Процедура для I-29, I-30, I-31, I-32, I-34, I-35, I-36:

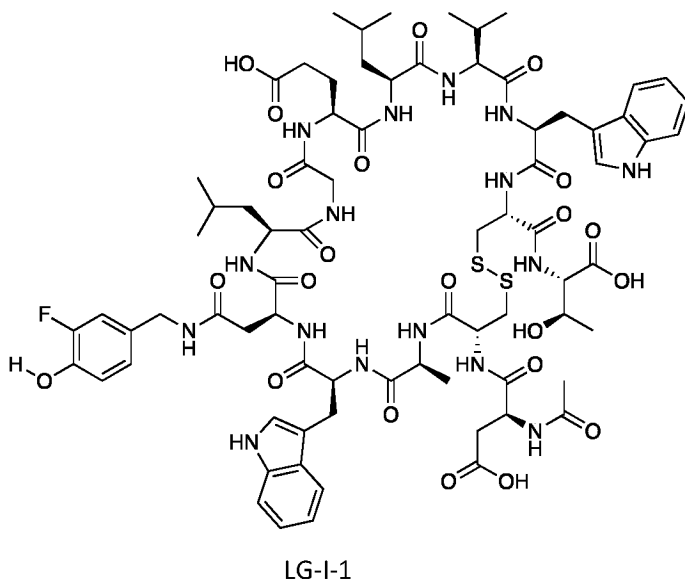
[75] В IVIG в 50 мМ борате, pH 8,2 (4 мг, 20 мг/мл, 200 мкл) добавляли реагент (5 мМ в ДМСО, 13,3 мкл, 2,5 экв.). Реакцию тщательно смешивали и центрифугировали при комнатной температуре в течение ночи.

[76] Процедура для I-33:

[77] В IVIG в 50 мМ борате, pH 8,2 (2,62 мг, 20 мг/мл, 130,8 мкл) добавляли реагент (5 мМ в ДМСО, 8,7 мкл, 2,5 экв.). Реакцию тщательно смешивали и центрифугировали при комнатной температуре в течение ночи. В следующей таблице приведены реагенты MATE, используемые для получения каждого из реагентов MATE, дополнительно подробно обсуждаемых в следующем разделе.

Реагент MATE	Продукт MATE
I-8	I-29
I-7	I-30
I-15	I-31
I-19	I-32
I-22	I-34
I-23	I-35
I-20	I-36

[78] В каждой из вышеописанных процедур помимо агента I-29, I-30, I-31, I-32, I-33, I-34, I-35, I-36 реакционные смеси содержали следующий продукт, который образовывался в эквимольном количестве с агентом I-29, I-30, I-31, I-32, I-33, I-34, I-35 и I-36:



2. Очистка

[79] Проводили замену буфера неочищенной смеси на 50 мМ глицин, pH 2,2, в Amicon-4 мл НОММ 30 кДа в ходе 2 циклов. Затем проводили замену буфера на ФСБ в Amicon-4 мл НОММ 30 кДа в ходе 2 циклов. На дне фильтра наблюдали нерастворимый белый осадок. В некоторых вариантах осуществления высвобождаемые связывающие антитело фрагменты удаляли в кислотных условиях.

[80] Раствор и осадок из восьми образцов собирали в 1,5 мл пробирку, соответственно, и центрифугировали при 16000 г в течение 5 мин. Прозрачный супернатант аккуратно собирали. Концентрацию белковых конъюгатов в супернатанте определяли с помощью прибора Nanodrop для УФ-видимой области, используя коэффициент экстинкции 1,41 мл·мг⁻¹·см⁻¹. Концентрация, объем и выход белковых конъюгатов из некоторых препаратов приведены в таблице ниже.

Агент	Концентрация (мг/мл)	Объем (мл)	Масса продукта (мг)	Выход (%)
I-29	6,29	0,501	3,15	79
I-30	6,86	0,45	3,09	77
I-31	2,25	0,667	1,5	38

I-32	4,83	0,695	3,36	84
I-33	5,55	0,548	3,04	116
I-34	7,35	0,365	2,68	67
I-35	10,7	0,326	3,49	87
I-36	3,03	0,707	2,14	53

[81] Чтобы довести конечную концентрацию агента MATE до диапазона 1,5–3,0 мг/мл, все конъюгаты разводили в ФСБ для достижения 3,0 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления наблюдали, что после добавления ФСБ в некоторых или всех образцах быстро образовывался белый осадок. Чтобы выделить конъюгаты, эти образцы центрифугировали при 16000 g в течение 3 минут. Прозрачные супернатанты аккуратно собирали. Концентрацию белковых конъюгатов в супернатанте определяли с помощью прибора Nanodrop для УФ-видимой области, используя коэффициент экстинкции 1,41 мл·мг⁻¹·см⁻¹. Концентрация, объем и выход конечных конъюгатов из некоторых препаратов приведены в таблице ниже.

Агент	Концентрация (мг/мл)	Объем (мл)	Масса продукта (мг)	Выход (%)
I-29	1,58	0,66	1,04	26
I-30	1,52	0,92	1,39	35
I-31	2,25	0,667	1,5	38
I-32	2,15	1,00	2,15	54
I-33	2,15	0,69	1,16	44
I-34	1,62	0,79	1,28	27
I-35	2,48	0,64	1,58	40
I-36	3,03	0,707	2,14	53

3. Аналитический способ для определения DAR (соотношения связывающий мишень фрагмент/фрагмент антитела)

[82] Конъюгат MATE (50 мкг) инкубировали с 10x гликолевым буфером 2 (0,1 x общий объем), 1 мкл IdeZ и 1 мкл ПНГазы F при 37 °C в течение 1 часа. Затем отбирали 8 мкг образца и разводили 50x водой. Объем введения составлял 2 мкл или 3 мкл в зависимости от необходимого сигнала.

Прибор:

ЖХ: Waters Acquity UPLC protein BEH C4 колонка (300 Å, 17 мкм x 2,1 мм x 50 мм)

МС: Waters Xevo G2-QTOF

Программное обеспечение для обработки: MassLynx

Подвижная фаза А: вода + 0,1 % муравьиная кислота

Подвижная фаза В: ацетонитрил + 0,1 % муравьиная кислота

[83] Анализ данных: Получают общую ионную хроматограмму (ОИХ). Выбирают область ОИХ для спектрального анализа. Выбирают область, включающую как конъюгированный, так и неконъюгированный Fc без смещения. Профиль МС получают из ОИХ. Для деконволюции выбирают конверт зарядового состояния. Проводят деконволюцию исходного спектра, используя инструмент для деконволюции MaxEnt1, для получения спектра нулевого заряда. DAR (соотношение распределения связывающих фрагментов в Fc x Fc на антитело) рассчитывают, используя следующую формулу:

$$DAR = [1(F_{\text{конъюг}})] / [1(F_{\text{конъюг}}) + 1(F_{\text{неконъюг}})] \times 2$$

[84] Деконволюция m/z 8000-30000, разрешение 1,50. Результаты DAR по данным ЖХ-МС анализа приведены ниже.

Агент	DAR неочищенных конъюгатов	DAR очищенных конъюгатов
I-29	1,08	1,47
I-30	1,64	1,78
I-31	1,75	1,72
I-32	0,90	1,21
I-33	1,81	1,73
I-34	1,58	1,77
I-35	1,76	1,76
I-36	1,49	1,79

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

[86] Специалисты в данной области техники определяют или смогут установить, используя лишь рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретным процедурам, описанным в данном документе. Считается, что такие эквиваленты входят в объем изобретения и охватываются нижеприведенной формулой изобретения. Например, можно использовать фармацевтически приемлемые соли, отличные от конкретно приведенных в описании и примерах в данном документе. Кроме того, подразумевается, что конкретные элементы в рамках перечней элементов или подгруппы элементов в рамках больших групп элементов можно комбинировать с другими конкретными элементами, подгруппами элементов или большими группами элементов, вне зависимости от того, была ли такая комбинация явно определена в данном документе.

Пример 2. Аналитические способы для определения соотношения лекарственный препарат – антитело (DAR), распределения DAR и связанных с реагентом MATE примесей

а. Количественное определение вариантов DAR и идентификация примесей

[87] Следующий аналитический способ УВЭЖХ позволяет проводить одновременное определение вариантов с разными DAR и связанных с реагентом MATE примесей. Распределение лекарственное вещество/лекарственный продукт (DR/DP) и DAR/DAR рассчитывают на основании площади сигнала ВЭЖХ/УФ280 индивидуального компонента DAR. Связанное с реагентом MATE содержание примесей DS/DP (реагент MATE, линкер MATE и универсальный связывающий антитело конец (uABT)) определяют как соотношение концентрации примесей в образце и концентрации белка DS/DP (представляемое как % масс. примеси/масс. белка). Тожественность сигналов УВЭЖХ подтверждали с помощью RS и ЖХМС анализа белка и отдельной примеси. Репрезентативная кривая УВЭЖХ/УФ280 приведена для соединения I-36 на Фиг. 1. DS представляет собой необходимый продукт (MATE), а примесь выражена как массовый % от этого продукта (DS/DP).

[88] Способ УВЭЖХ осуществляют на системе WATERS ACQUITY UPLC с выявление на УФ 280 нм. MS детектор представляет собой детектор WATERS XEVO G2-XS QToF. Этот детектор используют для определения молекулярной массы молекул. Автоматический пробоотборник работает в окружающих условиях, 22–23 °С. Использую 1000 Å дифениловую колонку HALO, 2,7 мкм, 2,1 x 50 мм, с температурой колонки 80 °С. Скорость потока составляет 0,5 мл/мин. Подвижная фаза А представляет собой 0,5 % трифторуксусную кислоту; подвижная фаза В представляет собой ацетонитрил с 0,05 % трифторуксусной кислотой.

ТАБЛИЦА 1. Градиент УВЭЖХ

Время	Скорость потока (мл/мин)	% В
0	0,5	10
1	0,5	20
10	0,5	50
10,1	1,0	100
11	1,0	100
11,1	1,0	10
12	0,5	10

Настройки МС детектора для детектора Waters Xevo G2-XS QToF для способов анализа примесей и анализа DAR приведены в таблице 2.

ТАБЛИЦА 2. Настройки МС детектора		
Параметр	Значение параметра способа МС	
	Анализ примесей	Анализ DAR
Режим ионизации	Ионизация электрораспылением (ИЭР), режим положительных ионов	
Выявление	Время пролета	
Диапазон сканирования	500 – 3000	
Напряжение капилляра	+2 кВ	+1,5 кВ
Пробоотборный конус	100	195
Смещение источника	80	150
Температура источника	150 °С	150 °С
Температура десольватации	500 °С	650 °С
Газ в конусе	50 л/ч	100 л/ч
Газ десольватации	800 л/ч	1000 л/ч

[89] Образец DS/DP разводят до концентрации белка приблизительно 1,5 мг/мл, соответствующей 50-кратному разведению DS/DP в носителе для разведения ДМСО:вода, 6:94 об./об. Образцы, такие как I-36, хранят при -20 °С. Размораживание и уравниванием образца до окружающей температуры в течение приблизительно 2 часов. Смешивание образца на вортексе в течение 1–2 минут. Разведение до необходимой концентрации (1,5 мг/мл белка) в

носителе для разведения (ДМСО:вода = 6:94). Разведенные образец остается при КТ до анализа, который должен быть завершен в течение 4 часов после разведения образца. В альтернативном варианте разведенный образец можно хранить до анализа при 2–8 °С в течение 24 часов. Если разведенный образец хранят при 2–8 °С, образцу следует дать время для уравнивания до КТ в течение получаса, а затем смешать на вортексе в течение 1–2 минут перед использованием.

b. Анализ соотношения лекарственных препарат – антитело (DAR) и распределения DAR для I-36

[90] Используя способ УВЭЖХ, параметры детектора и способы получения образцов, приведенные в предыдущем разделе, определяют DAR и распределение DAR для препаратов I-36. Перед количественным определением вариантов DAR получают УВЭЖХ спектры (i) неконъюгированного IVIG, (ii) объединенного стандарта примесей MATE с неконъюгированным IVIG. эти спектры приведены на Фиг. 2А–С. Данные приведены в таблицах 3 и 4.

ТАБЛИЦА 3						
№	Аналит	Конц. аналита (% общего белка)	Средн. DAR	Аналит	Конц. аналита (% общего белка)	Средн. DAR
1	Общий белок IVIG	100 %	1,55	Общий белок IVIG	100 %	1,58
2	Варианты DAR-0	6,2 %		Варианты DAR-0	6,0 %	
3	Варианты DAR-1	32,8 %		Варианты DAR-1	29,7 %	
4	Варианты DAR-2	61,1 %		Варианты DAR-2	64,3 %	

ТАБЛИЦА 4. МС спектры после деконволюции для индивидуальных вариантов DAR и неконъюгированного IVIG			
Варианты	Время удержания (мин)	ММ	Интенсивность пика
Неконъюгированный IVIG	5,70	~148,9 кДа	148917,9
I-36 DAR 0	5,70	~ 148,3 кДа	148289,0

I-36 DAR 1	6,64	~156,4 кДа (повышение ММ до IVIG ~7,5 кДа)	156418,5
I-36 DAR 2	7,43	~164,0 кДа (повышение ММ до IVIG ~15,1 кДа)	156418,5

b. Способ УВЭЖХ для анализа примесей МАТЕ (1) Получение калибровочной кривой

[91] Объединенный стандартный исходный раствор (PL STOCK) готовят следующим образом. Индивидуальные стандартные (STD) исходные растворы uABT, МАТЕ-реагента (MR) и МАТЕ-линкера готовят в ДМСО при концентрации STD исходного раствора 2,00 мг/мл.

Объединяют эквивалентные объемы индивидуальных 1 мг/мл исходных растворов в ДМСО.

Концентрация полученного индивидуального исходного раствора составляет 0,667 мг/мл (PL Stock). Стандартные исходные растворы в ДМСО хранят при -70 °С в течение периода до одного месяца.

[92] Необходима калибровочная кривая с диапазоном концентрации индивидуальной примеси от 0,004 мг/мл до 0,04 мг/мл (или от 0,02 мкг/введение до 0,2 мкг/введение для 5 мкл объема введения) для количественного определения большинства примесей, образуемых во время реакции МАТЕ. Растворы ДМСО размораживают при окружающей температуре, а затем тщательно смешивают на вортексе. Рабочий исходный раствор IVIG (825, мг/ мл) готовят путем 2-кратного разведения 165 мг/мл референтного материала IVIG водой. Стандарты калибровочной кривой соответствуют таблице 5. 6 % концентрация ДМСО и постоянная IVIG: Соотношение объединенных примесей (масс./масс.) сохраняют для всех калибраторов. Растворы калибраторов хранят при окружающей температуре. Растворы калибраторов имеют ограниченную стабильность; поэтому анализ следует проводить в течение 4 часов после получения калибраторов.

PL STD (мг/мл)	PL Stock (0,667 мг/мл)	Объединенный STD (мкл)	ДМСО (мкл)	Исходный раствор IVIG Stock, 82,5 мг/мл (мкл)	Вода (мкл)	Общий объем (мкл)
0,04	PL Stock	18,0	0	15,0	267,0	300
0,03	PL Stock	13,5	4,5	11,3	270,8	300
0,02	PL Stock	9,0	9,0	7,5	274,5	300
0,01	PL Stock	4,5	13,5	3,8	278,3	300

PL STD (мг/мл)	PL Stock (0,667 мг/мл)	Объединенный STD (мкл)	ДМСО (мкл)	Исходный раствор IVIG Stock, 82,5 мг/мл (мкл)	Вода (мкл)	Общий объем (мкл)
0,004	10x разведенный в ДМСО PL Stock	18	0	1,5	280,5	300

(2) Обработка образцов DS/DP

[93] Разведенные образцы DS/ DP стабильны в течение по меньшей мере 2 часов. 50-кратное разведение образца DS/DP было выбрано для анализа примесей после исследования воспроизводимости разведенных образцов, приведенного в таблице 6.

Конц. белка (мг/мл)	Разведение образца	uABT (% масс./масс. белка)		МАТЕ-линкер (% масс./масс. белка)		МАТЕ-реагент (% масс./масс. белка)	
		T ₀	2 ч	T ₀	2 ч	T ₀	2 ч
7,50	10	1,76 %	1,76 %	0,74 %	0,76 %	3,19 %	3,12 %
1,50	50	1,64 %	1,60 %	0,68 %	0,67 %	2,84 %	2,78 %
0,75	100	1,57 %	1,59 %	0,64 %	0,58 %	2,79 %	2,63 %
0,50	150	1,57 %	1,58 %	0,62 %	0,53 %	2,78 %	2,54 %
0,38	200	1,56 %	1,57 %	0,58 %	0,56 %	2,74 %	2,61 %
0,30	250	1,56 %	1,59 %	0,56 %	0,44 %	2,72 %	2,41 %
0,25	300	1,66 %	1,67 %	0,53 %	0,51 %	2,78 %	2,57 %

[94] Было обнаружено, что калибровочная кривая является воспроизводимой для индивидуальных и объединенных примесей. Данные по калибровочным кривым для образцов uABT, МАТЕ-линкер и МАТЕ-реагент приведены на Фиг. 3. Калькуляторы калибровочных кривых для uABT, МАТЕ-линкер и МАТЕ-реагент для I-36/I-20 были получены из калибровочных кривых и представлены в таблице 7.

Примесь	Индивидуальные калибраторы		Объединенные калибраторы	
	Линейная регрессия	R ²	Линейная регрессия	R ²
uABT	$y = 220251x - 2343,5$	0,9997	$y = 223653x - 1622$	0,9982

ТАБЛИЦА 7				
Примесь	Индивидуальные калибраторы		Объединенные калибраторы	
	Линейная регрессия	R ²	Линейная регрессия	R ²
МАТЕ-линкер	$y = 22668x - 80,552$	1,0000	$y = 25971x - 55,739$	0,9998
МАТЕ-реагент	$y = 40648x - 31,285$	0,9999	$y = 43591x - 8,3333$	0,9999

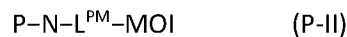
[95] Используя калькуляторы калибровочных кривых, приведенные в таблице 7, проводят расчет для примесей для двух повторов реакции конъюгации I-36. Результаты приведены в таблице 8. Общую концентрацию белка устанавливали, используя калибровочную кривую для белка.

ТАБЛИЦА 8				
	Аналит	Концентрация аналита		
		мг/мл	мг/мг белка	% масс./масс. белка
1	Общий белок IVIG	57,79	н/д	н/д
2	Свободный uABT	0,93	0,0161	1,61 %
3	Свободный МАТЕ-реагент	1,65	0,0286	2,86 %
4	Свободный МАТЕ-линкер	0,35	0,0061	0,61 %
1	Общий белок IVIG	64,52	н/д	н/д
2	Свободный uABT	1,13	0,0175	1,75 %
3	Свободный МАТЕ-реагент	1,38	0,0214	2,14 %
4	Свободный МАТЕ-линкер	0,64	0,0099	0,99 %

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая:

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



где:

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

L^{PM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент; и

второе соединение, имеющее структуру:



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

2. Композиция по п. 1, 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;

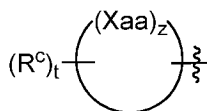
четвертое соединение, имеющее формулу (R-III):



или их комбинацию.

3. Композиция по п. 1 или 2,

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



R^{LG} представляет собой $R^c-(Xaa)_z-$, 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–, –Cy–, –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 –Cy– 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 –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}– или –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≡C–, –Cy–, –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.

4. Композиция по п. 1 или 2, где LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который связывается с агентом-мишенью, при этом агент-мишень представляет собой агент на основе антитела.

5. Композиция п. 3, где LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, который связывается с Fc-областью, и/или R^{LG} представляет собой или содержит DCAWXLGELVWCT (SEQ ID NO:1), где два остатка цистеина необязательно образуют дисульфидную связь, а X представляет собой аминокислотный остаток.

б. Композиция по п. 3, отличающаяся тем, что соблюдено по меньшей мере одно из следующих условий:

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

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

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

7. Композиция п. 1 или 2, где LG представляет собой или содержит связывающий мишень фрагмент, имеющий структуру формулы от А-1 до А-50, приведенную в описании.

8. Композиция по п. 1 или 2, где MOI представляет собой или содержит фрагмент терапевтического агента и/или MOI представляет собой или содержит агент на основе антитела.

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

10. Композиция по п. 2, где линкер L^{RM} содержит один или более $-[(CH_2)_n-O]_m-$, где каждое n независимо равно 1–20 и m равно 1–100.

11. Композиция по п. 1 или 2, где RG представляет собой группу формулы $-L^{LG2}$, $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-$ или $-L^{RG1}-L^{RG2}-$, где

L^{LG2} представляет собой $-NH-$, $-NHC(O)-$, $-(CH_2)_n-NHC(O)-$, $-(CH_2)_n-OC(O)-$, $-(CH_2)_n-OC(O)NH-$, $-C(O)-NHCH_2-$, $-C(O)-NHCH_2CH_2-$, $-C(O)O-CH_2-$ или $-NH-C(O)O-CH_2-$;

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

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

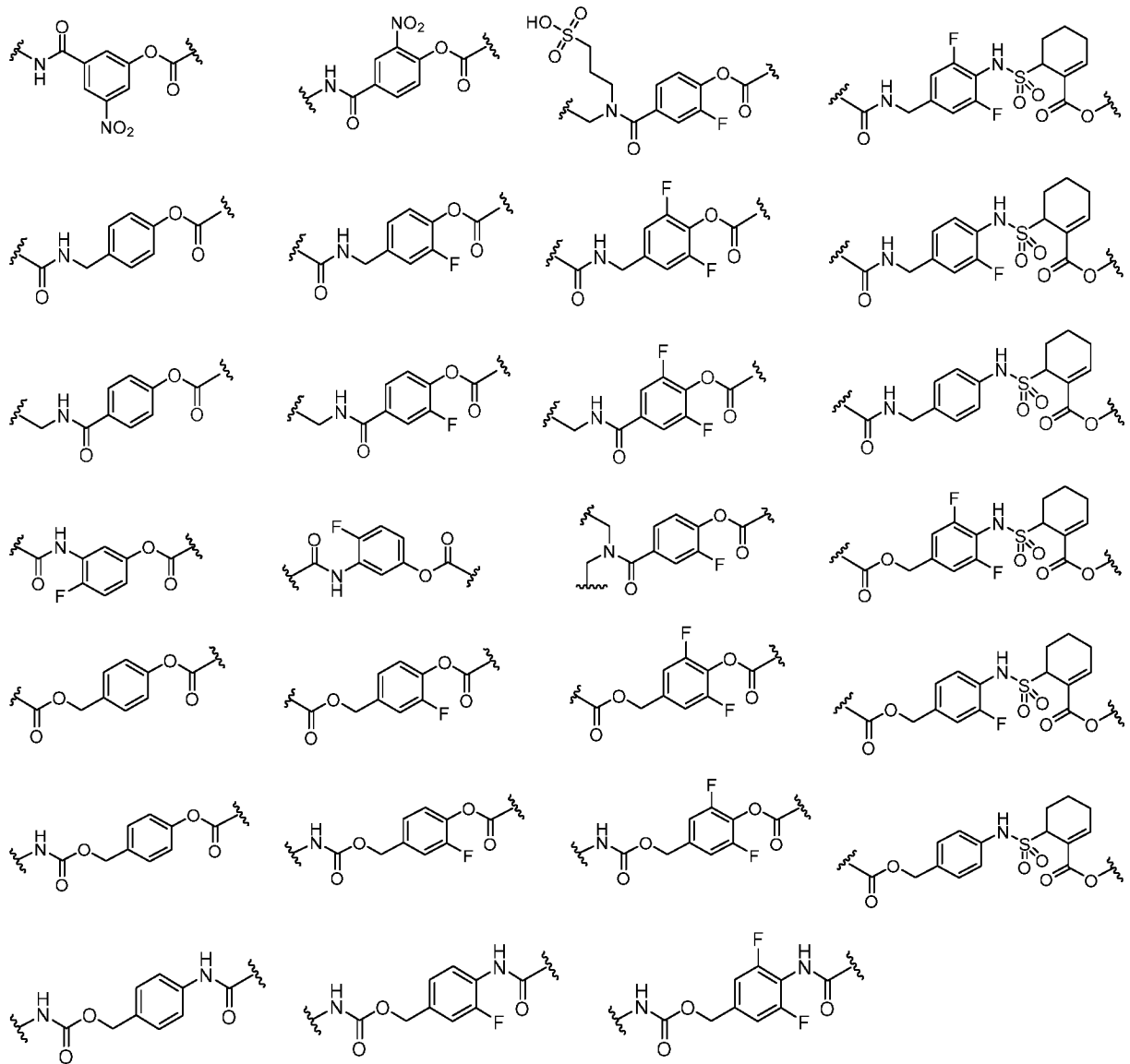
L^{RG1} представляет собой $-O-C(O)-$, $-C(O)-$, $-S(O)-$, $-OS(O)_2-$ или $-OP(O(OR))-$;

L^{RG2} представляет собой $-CH_2-C(O)-$, $-C(O)-$ или $-CH_2-$;

L^{LG} представляет собой $-(O)C-[(CH_2)_nO]_m(CH_2)_nNH-$, $-(O)C-[(CH_2)_nO]_m(CH_2)_nNH-$, $-[(CH_2)_nO]_mNHC(O)[(CH_2)_nO]_mNH-$, $-[(CH_2)_nO]_m\{NHC(O)[(CH_2)_nO]_m\}_pNH-$, $-[(CH_2)_nO]_mCy[(CH_2)_nO]_mNH-$, $-[(CH_2)_nO]_mCy[(CH_2)_nO]_mNHC(O)[(CH_2)_nO]_mNH-$ или $-[(CH_2)_nO]_mCy[(CH_2)_nO]_m\{NHC(O)[(CH_2)_nO]_m\}_pNH-$,

где n, m и p представляют собой целые числа, в каждом случае независимо выбранные из 1–12, а Cy представляет собой необязательно замещенную циклическую группу.

12. Композиция по п. 11, где RG представляет собой группу формулы $-L^{LG2}-L^{LG3}-L^{LG4}-L^{RG1}-$ и выбран из:

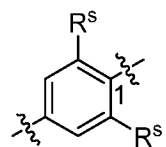
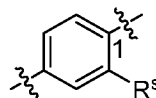


13. Композиция по п. 11, где n в каждом случае равно 2.

14. Композиция по п. 11, где реактивная группа представляет собой или содержит $-C(O)-O-$ или $-O-C(O)-$.

15. Композиция по п. 11, где реактивная группа содержит арильную группу, необязательно связанную с $-C(O)-O-$ или $-O-C(O)-$ и замещенную одной или более электроноакцепторными группами.

16. Композиция по п. 11, где арильная группа имеет структуру



или R^S , где R^S в каждом случае независимо выбран из галогена, $-NO_2$, $-F$, $-L-R'$, $-C(O)-L-R'$, $-S(O)-L-R'$, $-S(O)_2-L-R'$ и $-P(O)(-L-R')_2$, а R' представляет собой H или C_1-C_6 алкил.

17. Композиция по п. 2, где первое соединение и второе соединение присутствуют в эквимольном количестве.

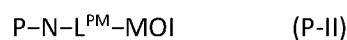
18. Композиция по п. 2, где в формуле (R-I):

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

связывающий мишень фрагмент сконструирован с возможностью связывать антитело так, чтобы реактивная группа оказалась вблизи K246 или K248 тяжелой цепи IgG, чтобы сделать возможной реакцию между K246 или K248 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.

19. Композиция, содержащая:

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



где:

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

L^{PM} представляет собой линкер; и

MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент; и по меньшей мере

одно

второе соединение, имеющее структуру:



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

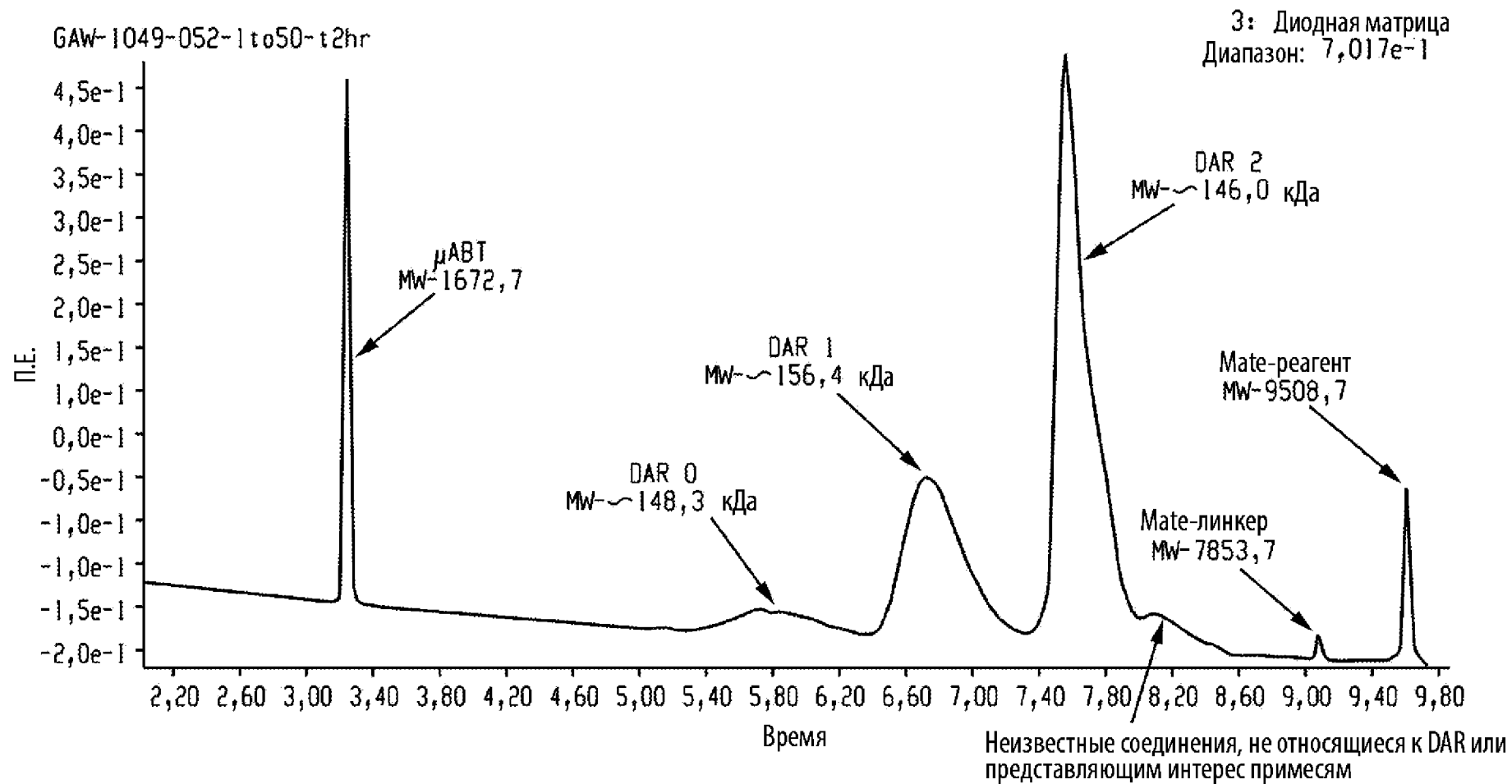
MOI представляет собой представляющий интерес фрагмент.

20. Композиция по п. 19, дополнительно содержащая:

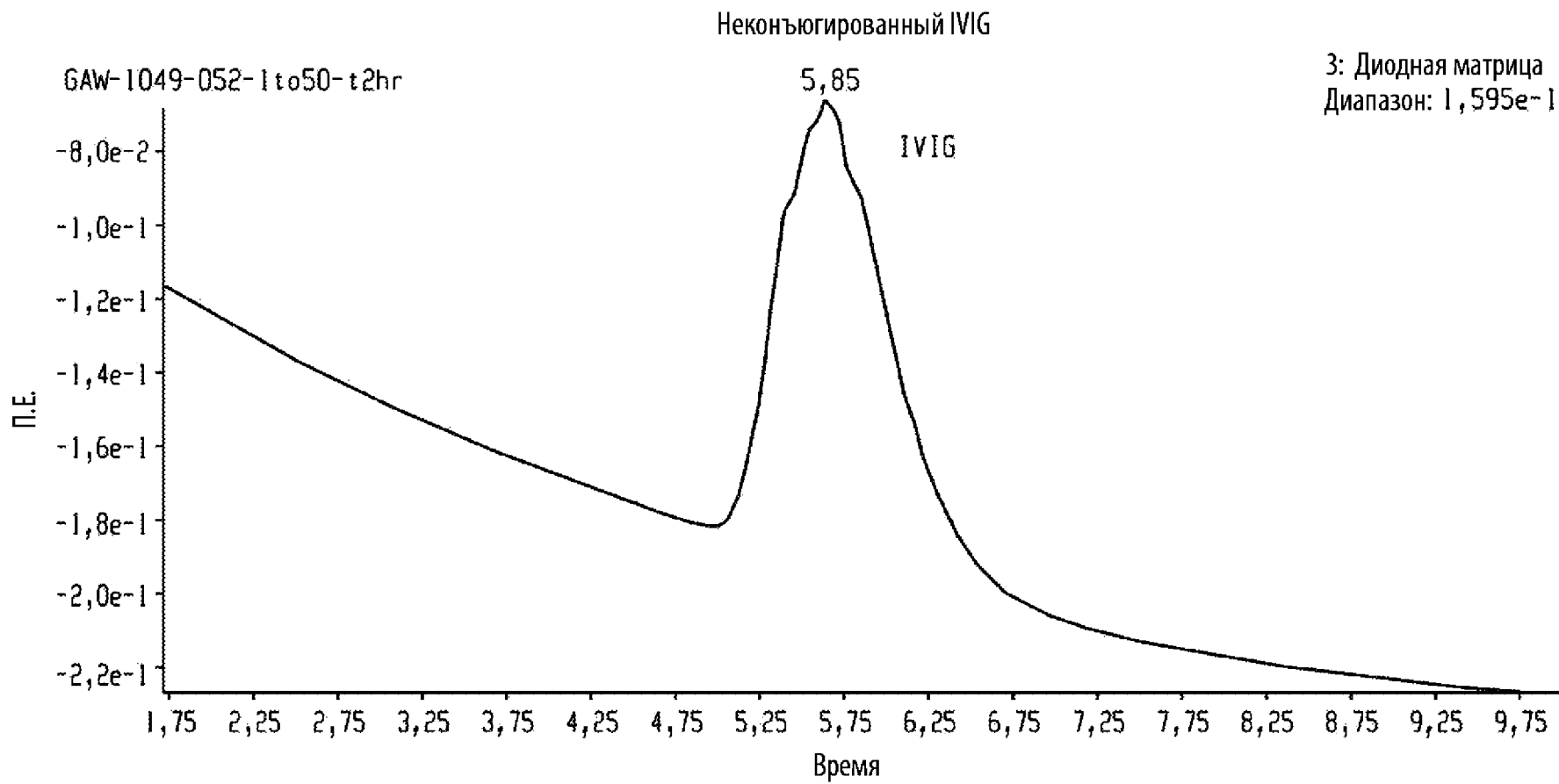
четвертое соединение, имеющее формулу (R-III):



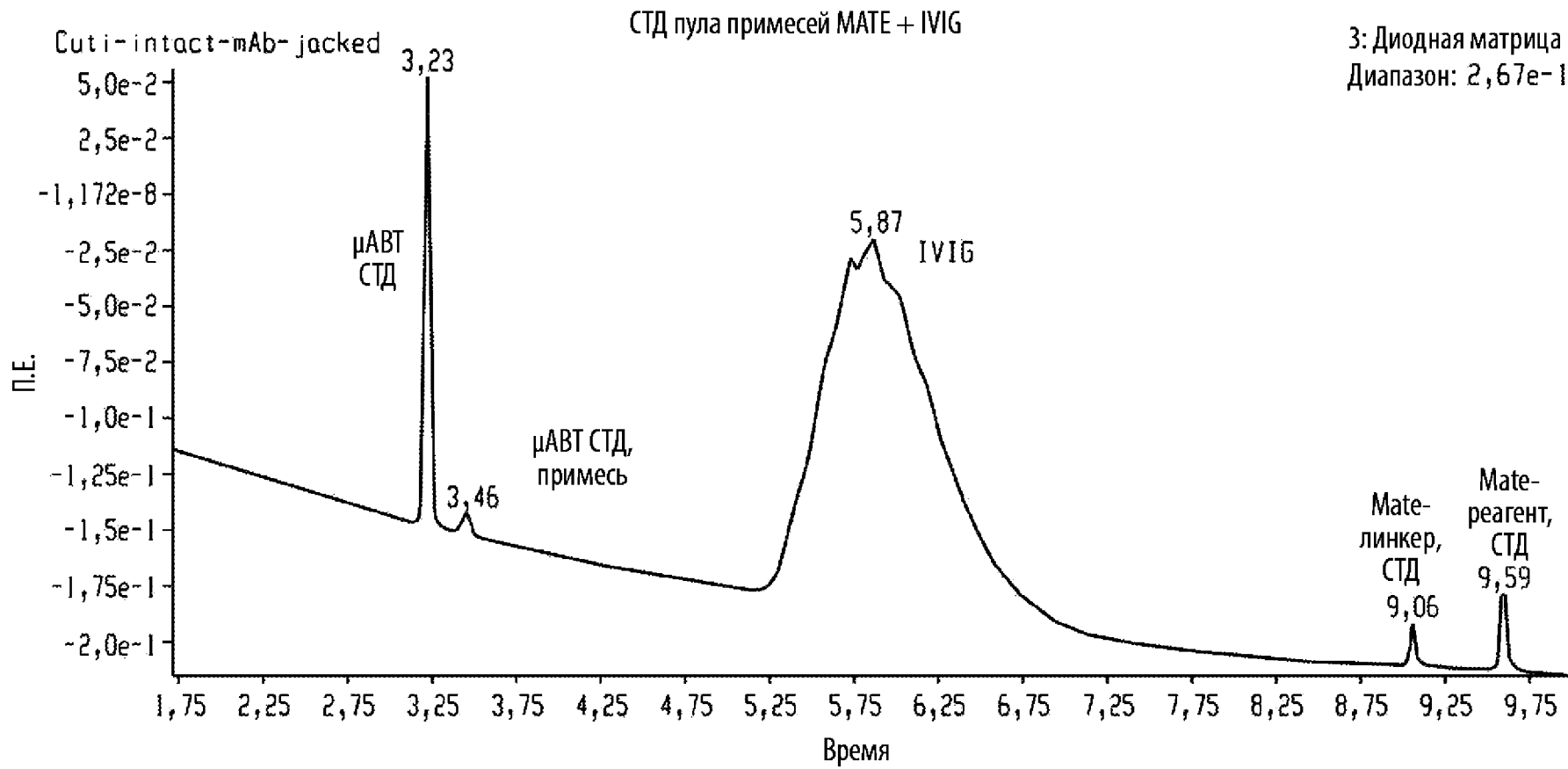
или их комбинацию.



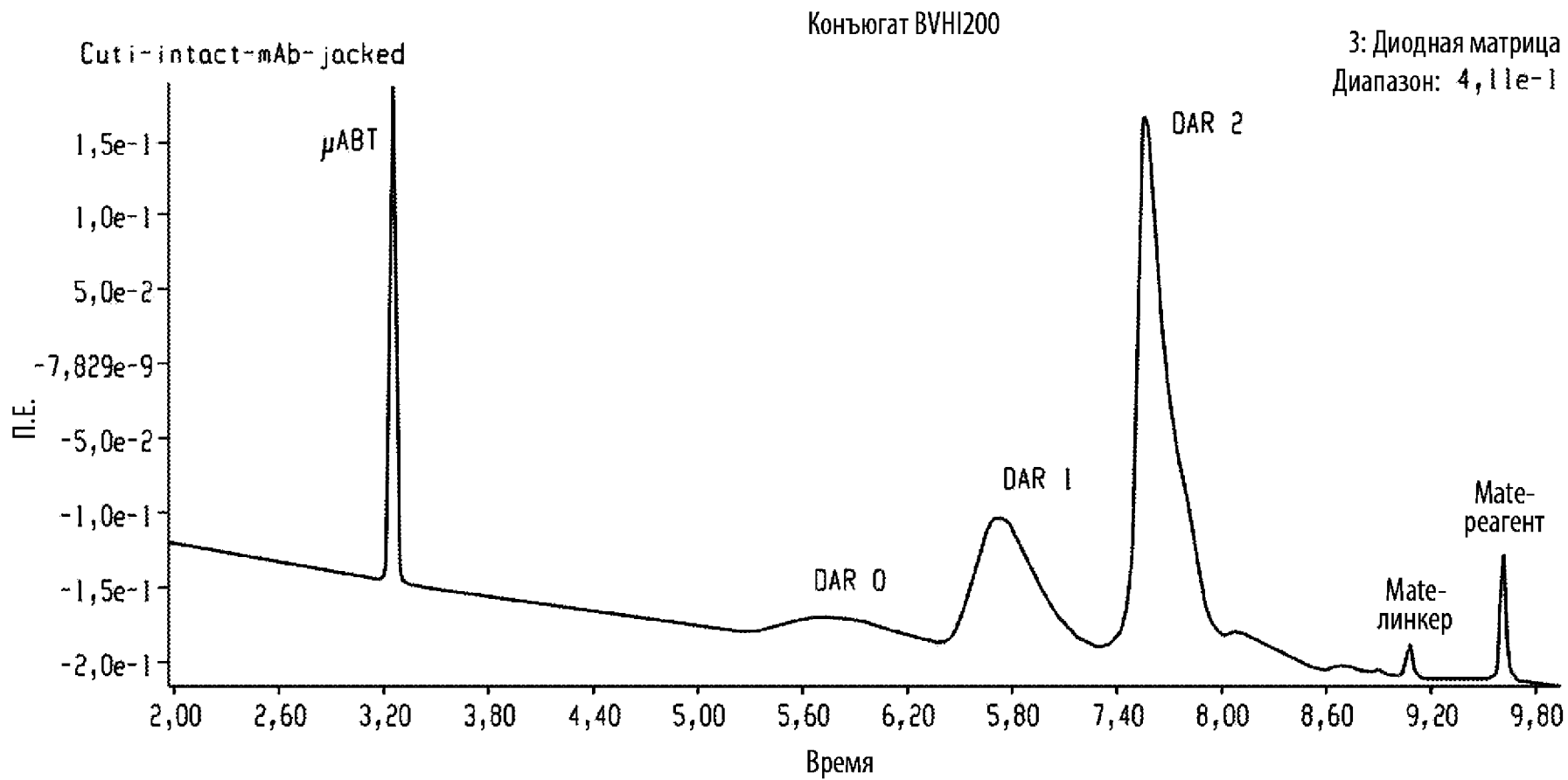
ФИГ. 1



Фиг. 2А

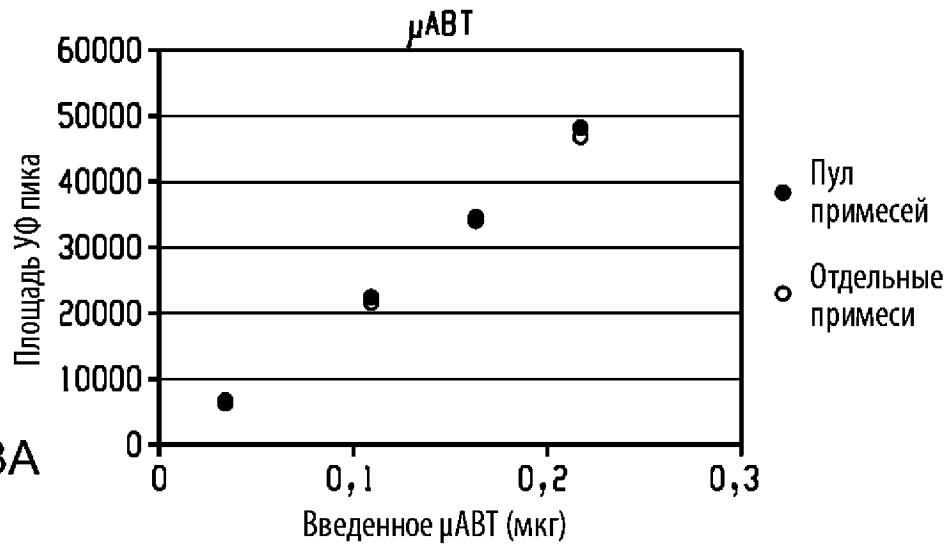


Фиг. 2В

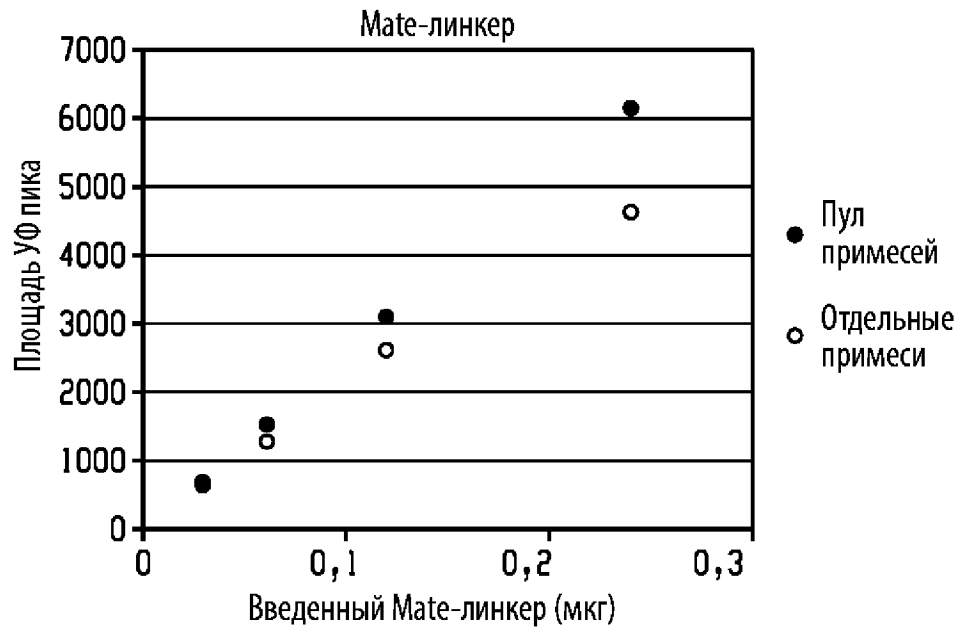


Фиг. 2С

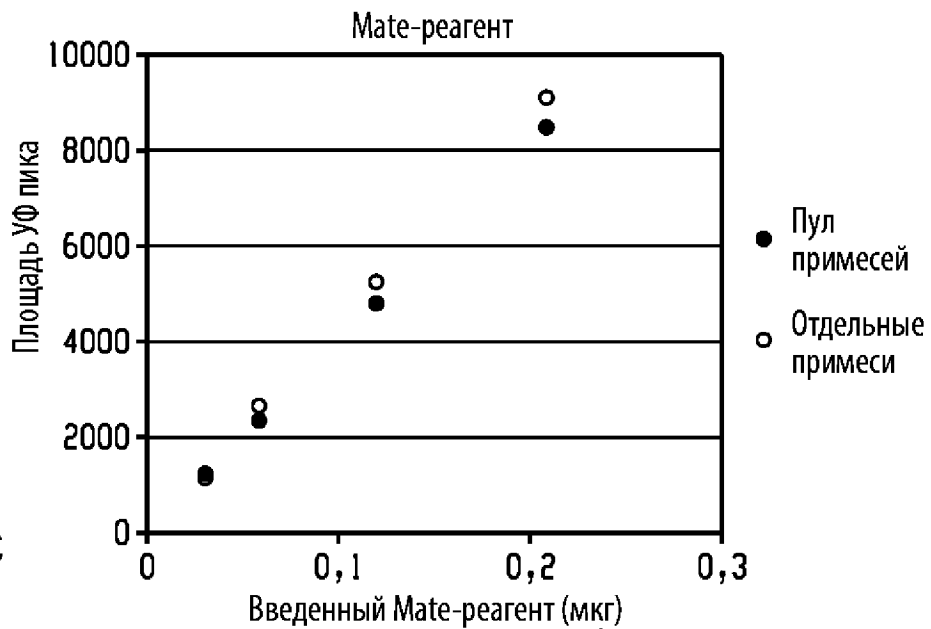
5/5



Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 3С