

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290417 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.27(51) Int. Cl. A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)
A61K 38/12 (2006.01)
C07K 7/54 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2020.07.30

(54) ГЕТЕРОТАНДЕМНЫЙ БИЦИКЛИЧЕСКИЙ ПЕПТИДНЫЙ КОМПЛЕКС

(31) 62/880,191; 62/910,088; 62/931,442;
63/022,667; 63/024,715(72) Изобретатель:
Макдоннелл Кевин, Упадхияйя Пунит,
Лехденрента Джоанна, Мадд Джемма
(GB)(32) 2019.07.30; 2019.10.03; 2019.11.06;
2020.05.11; 2020.05.14

(33) US

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

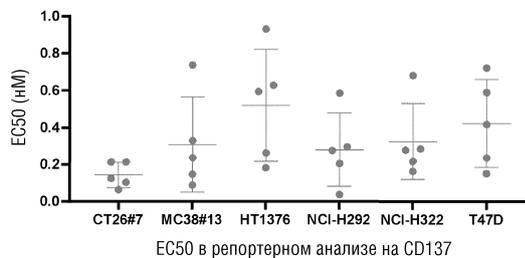
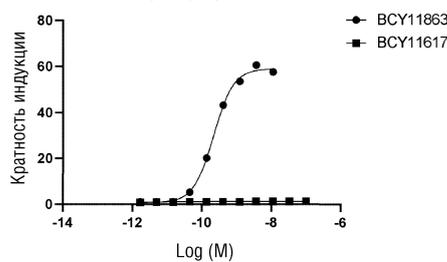
(86) PCT/GB2020/051828

(87) WO 2021/019244 2021.02.04

(71) Заявитель:
БАЙСИКЛТЭКС ЛИМИТЕД (GB)

(57) Настоящее изобретение относится к гетеротандемному бициклическому пептидному комплексу, который включает первый пептидный лиганд, который связывается с нектин-4, конъюгированный через линкер с двумя вторыми пептидными лигандами, которые связываются с CD137. Изобретение также относится к применению указанных гетеротандемным бициклических пептидных комплексов для предотвращения, подавления или лечения рака.

Активность в репортерном анализе на CD137



A1

202290417

202290417

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572796EA/042

ГЕТЕРОТАНДЕМНЫЙ БИЦИКЛИЧЕСКИЙ ПЕПТИДНЫЙ КОМПЛЕКС

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к гетеротандемному бициклическому пептидному комплексу, который включает первый пептидный лиганд, который связывается с нектин-4, конъюгированный через линкер с двумя вторыми пептидными лигандами, которые связываются с CD137. Изобретение также относится к применению указанных гетеротандемным бициклических пептидных комплексов для предотвращения, подавления или лечения рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Циклические пептиды могут связываться с высокой аффинностью и специфичностью с белками-мишенями и, вследствие этого, они представляют собой перспективный класс молекул для разработки терапевтических средств. В действительности, несколько циклических пептидов уже успешно используются в клинической практике, например, антибактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессант циклоспорин или противораковый препарат октреотид (Driggers et al. (2008), *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 608-24). Высокая способность к связыванию обусловлена относительно большой поверхностью взаимодействия, образующейся между пептидом и мишенью, а также пониженной конформационной гибкостью циклических структур. Обычно макроциклы связываются с поверхностями площадью несколько сотен квадратных ангстрем, как, например, циклический пептидный антагонист CXCR4-CVX15 (400 Å²; Wu et al. (2007), *Science* 330, 1066-71), циклический пептид с мотивом Arg-Gly-Asp, связывающийся с интегрином αVβ3 (355 Å²) (Xiong et al. (2002), *Science* 296 (5565), 151-5) или циклический пептидный ингибитор упаин-1, связывающийся с активатором плазминогена урокиназного типа (603 Å²; Zhao et al. (2007), *J Struct Biol* 160 (1), 1-10).

Вследствие своей циклической конфигурации, пептидные макроциклы являются менее гибкими, чем линейные пептиды, что приводит к меньшей потере энтропии при связывании с мишенями и обуславливает более высокую аффинность связывания. Пониженная гибкость также приводит к блокированию мишень-специфичных конформаций, повышая специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Этот эффект был продемонстрирован на высокоактивном и селективном ингибиторе матриксной металлопротеиназы-8 (ММР-8), который терял свою селективность относительно других ММР при раскрытии его кольца (Cherney et al. (1998), *J Med Chem* 41 (11), 1749-51). Достижимая за счет макроциклизации высокая способность к связыванию еще более выражена у полициклических пептидов, имеющих более одного пептидного кольца, как, например, у ванкомицина, низина и актиномицина.

Ранее, различные группы исследователей проводили связывание полипептидов с остатками цистеина с синтетической молекулярной структурой (Kemp and McNamara (1985), *J. Org. Chem*; Timmerman et al. (2005), *ChemBioChem*). Meloen с соавторами

использовали трис(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной циклизации множества пептидных петель на синтетических каркасах для структурной имитации поверхности белков (Timmerman et al. (2005), ChemBioChem). Способы получения перспективных лекарственных соединений, в которых указанные соединения получают путем связывания цистеинсодержащих полипептидов с молекулярным каркасом, таким как, например 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА), раскрыты в патентных документах WO 2019/122860 и WO 2019/122863.

Для создания и скрининга больших библиотек бициклических пептидов на связывание с представляющими интерес мишенями были разработаны комбинаторные подходы на основе фагового дисплея (Heinis et al. (2009), Nat Chem Biol 5 (7), 502-7 и патентный документ WO 2009/098450). Вкратце, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащих три остатка цистеина и две области из шести случайно выбранных аминокислот (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys), представляли на фаге и подвергали циклизации путем ковалентного связывания боковых цепей цистеина с малой молекулой (трис(бромметил)бензолом).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту изобретения, предлагается гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, включающий:

(а) первый пептидный лиганд, который связывается с нектин-4 и который имеет последовательность C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 1; BCY8116), конъюгированный через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид) линкер с

(b) двумя вторыми пептидными лигандами, которые связываются CD137, оба из которых имеют последовательность Ac-C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 2; BCY8928),

где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий, по меньшей мере, три реакционно-способных группы, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) и который образует ковалентные связи с реакционно-способными цистеиновыми группами полипептида, вследствие чего на молекулярном каркасе образуются две полипептидных петли,

где Ac представляет ацетил, HAArg представляет гомоаргинин, HyP представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, 1Nal представляет 1-нафтилаланин, tBuAla представляет третбутил-аланин, PYA представляет 4-пентиноую кислоту и Nle представляет норлейцин.

Согласно дополнительному аспекту изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, включающая указанный в изобретении гетеротандемный бициклический пептидный комплекс в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

Согласно дополнительному аспекту изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, включающая указанный в изобретении гетеротандемный бициклический пептидный комплекс для применения с целью предотвращения, подавления или лечения рака.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. (А) Анализ гетеротандемного бициклического пептидного комплекса нектин-4/CD137 путем проведения анализа репортерного гена люциферазы на CD137 фирмы Promega в присутствии клеток H292, экспрессирующих нектин-4. BCY11617 представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, который связывается с нектин-4 с той же аффинностью, что и BCY11863, но не связывается с CD137. (В) Данные по EC_{50} (нМ) для BCY11863, полученные анализом репортерного гена люциферазы на CD137 фирмы Promega в совместной культуре с другими клеточными линиями, которые экспрессируют эндогенно нектин-4 или которые сконструированы для сверхэкспрессирования нектин-4.

Фигура 2. Гетеротандемные бициклические пептидные комплексы нектин-4/CD137 индуцируют секрецию цитокинов IFN- γ (фигура 2А) и IL-2 (фигура 2В) в анализе совместной культуры РВМС-4Т1. Клетки 4Т1 конструировали для экспрессии нектин-4. BCY11617 представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, который связывается с нектин-4 с той же аффинностью, что и BCY11863, но не связывается с CD137. На фигуре 2С приведены данные по EC_{50} (нМ) для BCY11863, полученные анализом секреции цитокина мононуклеарными клетками периферической крови (РВМС) человека от многих доноров и линиями опухолевых клеток.

Фигура 3. Фармакокинетические данные, полученные при внутривенном введении гетеротандемного бициклического пептидного комплекса BCY11863 крысам линии SD и яванским макакам (супо) в дозе 2 мг/кг ($n=3$) и 1 мг/кг ($n=2$), соответственно.

Фигура 4. Противоопухолевая активность BCY11863 в отношении опухоли МС38#13 в модели сингенной нектин-4 сверхэкспрессирующей опухоли МС38 (МС38#13). Объемы опухолей в процессе лечения и после лечения с помощью BCY11863. Число мышей с полным ответом (CR) на день D69 указано в скобках. QD: ежедневное дозирование; Q3D: дозирование каждые три дня; ip: интраперитонеальное введение.

Фигура 5. Лечение с помощью BCY11863 приводит к появлению иммунологической памяти в модели нектин-4 сверхэкспрессирующей опухоли МС38. Объемы опухолей МС38#13 после инокуляции наивным мышам C57BL/6J-hCD137 или мышам, которые имели полные ответы (CR) на лечение с помощью BCY11863. Следует отметить, что ни у одной из мышей CR не появлялись опухоли к концу периода наблюдения (22 дня).

Фигура 6. BCY11863 демонстрирует противоопухолевую активность в модели сингенной нектин-4 сверхэкспрессирующей опухоли СТ26 (СТ26#7). Объемы опухолей СТ26#7 в процессе лечения с помощью BCY11863. Q3D: дозирование каждые три дня; ip: интраперитонеальное введение.

Фигура 7. Суммарное число Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток увеличивается в ткани опухоли СТ26#7 через 1 час после последнего (6-го) Q3D дозирования ВСУ11863. Анализ (А) суммарного числа Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, регуляторных Т-клеток и (В) отношения CD8⁺ Т-клетки/регуляторные Т-клетки в ткани опухоли СТ26#7 через 1 час после последнего Q3D дозирования ВСУ11863.

Фигура 8. Фармакокинетические профили ВСУ11863 в плазме и ткани животных, несущих сингенную опухоль СТ26#7, после одноразового внутривенного (iv) введения 5 мг/кг ВСУ11863.

Фигура 9. Кривые зависимости концентрации ВСУ11863 в плазме от времени при введении интраперитонеальной дозы 15 мг/кг мышам CD-1 (n =3) и конечные периоды полувыведения ВСУ118633.

Фигура 10. Данные исследования методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) связывания ВСУ11863 с иммобилизованными (А) нектин-4 и (В) CD137. Исследования методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) двойного связывания путем иммобилизования (С) CD137 и (D) нектин-4 на сенсорном чипе SPR с последующим захватом ВСУ11863. Аффинность связанного ВСУ11863 к растворимому человеческому нектин-4 (С) или CD137 (D) измеряют путем полива растворимого рецептора на поверхность чипа при различных концентрациях. (Е) Связывание ВСУ13582 (биотинилированного ВСУ11863), иммобилизованного на покрытой стрептавидином поверхности SPR чипа, с растворимым человеческим CD137.

Фигура 11. Технология клеточных микрочипов фирмы Retrogenix, используемая для изучения неспецифических нецелевых взаимодействий ВСУ13582 (биотинилированного ВСУ11863). На фигуре приведены данные скрининга, которые показывают, что 1 мкМ ВСУ13582, добавленный на микрочип с микропрепаратами, экспрессирующими 11 различных белков, связывается только с CD137 и нектин-4 (что детектируется с использованием стрептавидина, меченного с помощью AlexaFluor647). Сигнал связывания пропадает при инкубировании с ВСУ11863.

Фигура 12. Кривые роста опухолей МС38#13 у мышей линии huCD137 C57Bl/6 демонстрируют противоопухолевую активность ВСУ11863 при различных дозах и различных интервалах между введением доз. Число животных с полным ответом (CR; отсутствие пальпируемой опухоли) на день 15 после начала лечения указано в скобках.

Фигура 13. Кривые роста опухоли (среднее значение±стандартная ошибка среднего значения) МС38#13 у мышей линии huCD137 C57Bl/6 (n=6/группа) демонстрируют противоопухолевую активность ВСУ11863 при различных дозах и различных интервалах между введением доз. Число животных с полным ответом (CR; отсутствие пальпируемой опухоли) на день 52 после начала лечения указано в скобках. (А) Группы, в которых вводят плацебо (среду) или суммарную недельную дозу 3 мг/кг ВСУ11863. (В) Группы, в которых вводят плацебо (среду) или суммарную недельную дозу 10 мг/кг ВСУ11863. (С) Группы, в которых вводят плацебо (среду) или суммарную недельную дозу 30 мг/кг ВСУ11863.

Фигура 14. Фармакокинетические данные для гетеротандемного бициклического пептидного комплекса BCY11863 в случае крыс SD, внутривенно дозируемых 100 мг/кг (n=3), и результаты измерений концентрации BCY11863 и потенциальных метаболитов BCY15155 и BCY14602 в плазме.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту изобретения, предлагается гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, включающий:

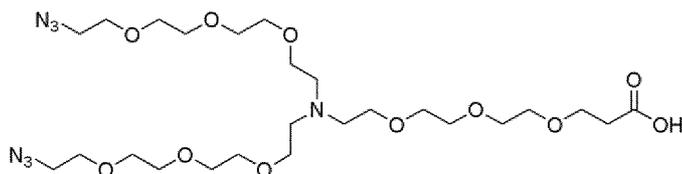
(а) первый пептидный лиганд, который связывается с нектин-4 и который имеет последовательность $C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 1; BCY8116), конъюгированный через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), с

(б) вторыми пептидными лигандами, которые связываются с CD137, оба из которых имеют последовательность $Ac-C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A$ (SEQ ID NO: 2; BCY8928);

где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий три реакционно-способные цистеиновые группы (C_i , C_{ii} and C_{iii}), разделенных двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) и который образует ковалентные связи с реакционно-способными цистеиновыми группами полипептида, вследствие чего на молекулярном каркасе образуются две полипептидных петли;

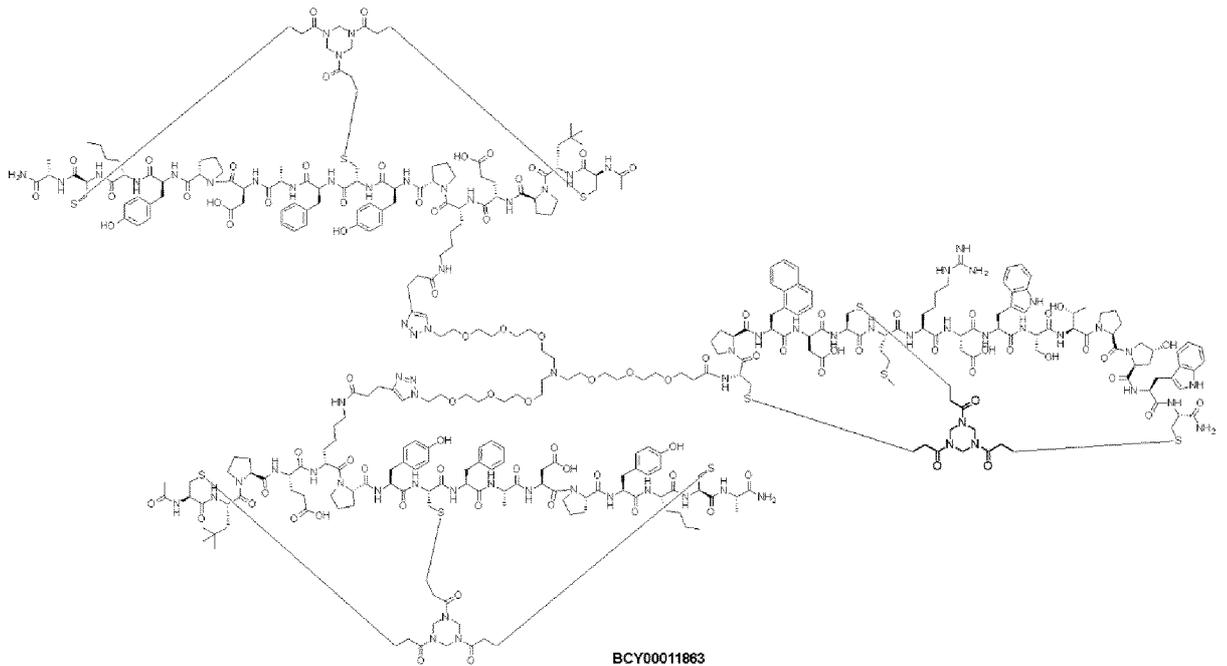
где Ac представляет ацетил, HAArg представляет гомоаргинин, HyP представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, 1Nal представляет 1-нафтилаланин, tBuAla представляет третбутил-аланин, PYA представляет 4-пентиноую кислоту и Nle представляет норлейцин.

Упоминания в изобретении линкера N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид) включают линкер:



N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид).

В одном варианте осуществления, гетеротандемный бициклический пептидный комплекс представляет собой BCY11863:



Подробная информация по VCY11863 приведена в таблице А ниже.

Таблица А. Состав VCY11863

№ комплекса	№ VCY для нектин-4	Точка присоединения	Линкер	№ VCY для CD137	Точка присоединения
VCY11863	VCY8116	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	VCY8928, VCY8928	dLys (PYA)4

На фигуре 1 и в таблице 1 представлены данные, которые показывают, что 1 VCY11863 демонстрирует сильную активацию CD137 в репортерном анализе на CD137. Кроме того, на фигуре 2 и в таблице 2 представлены данные, которые показывают, что VCY11863 индуцирует устойчивую секрецию цитокинов IL-2 и IFN- γ при проведении анализа в совместной культуре РВМС с многими линиями опухолевых клеток и РВМС людей-доноров. Кроме того, на фигуре 3 и в таблице 5 представлены данные, которые показывают, что VCY11863 демонстрировал очень высокий фармакокинетический профиль с величиной конечного периода полувыведения 4,1 часа у крыс SD и 5,3 часа у яванских макаков. Данные, представленные на фигурах 10 и 11 наряду с методами, описанными в разделах 11 и 12, демонстрируют связывание и очень высокую селективность VCY11863 в отношении его мишеней нектин-4 и CD137. На фигурах 4 и 5 представлены данные по высокой противоопухолевой активности VCY11863 в отношении сингенных опухолевых клеток MC38#13 у мышей и доказательства формирования иммунологической памяти после лечения с помощью VCY11863. На фигурах 6 и 7 представлены данные по противоопухолевой активности VCY11863 в модели сингенных

клеток СТ26#7 с соответствующей инфильтрацией цитотоксических Т-клеток в опухоль. На фигурах 12 и 13 однозначно показано, что нет необходимости поддержания значительных концентраций ВСУ11863 в плазме, так как при его дозировании 1,5 мг/кг ВІW и 5 мг/кг при 0, 24 часа в неделю ВСУ11863 продуцировал устойчивую противоопухолевую активность.

В изобретении упоминаются конкретные аналоги (то есть модифицированные производные) и метаболиты ВСУ11863, каждый из которых образует дополнительные аспекты изобретения и данные о которых приведены в таблице В ниже.

Таблица В. Композиция аналогов и метаболитов ВСУ11863

№ комплекса	№ ВСУ для нектин-4	Точка присоединения	Линкер	№ ВСУ для CD137	Точка присоединения	Модификатор
ВСУ13390	ВСУ8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	ВСУ8928, ВСУ13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	
ВСУ13582	ВСУ8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	ВСУ8928, ВСУ13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Биотин- Peg12
ВСУ13583	ВСУ8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	ВСУ8928, ВСУ13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Alexa Fluor 488
ВСУ13628	ВСУ8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	ВСУ8928, ВСУ13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Цианин 5
ВСУ15155	ВСУ8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	ВСУ8928, ВСУ14601	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	
ВСУ14602	ВСУ8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	ВСУ14601	dLys(PYA)4	

где BCY14601 представляет бициклический пептидный лиганд, имеющий последовательность $C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A$ (SEQ ID NO: 3), с ТАТА в качестве молекулярного каркаса;

и где BCY13389 представляет бициклический пептидный лиганд, имеющий последовательность $[Ac]C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-K$ (SEQ ID NO: 4), с ТАТА в качестве молекулярного каркаса.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют те же значения, которые являются общепринятыми для специалистов в данной области, например, в области химии пептидов, культуры клеток и фагового дисплея, химии нуклеиновых кислот и биохимии. Используются стандартные методы молекулярной биологии, генетических и биохимических исследований (смотрите монографии Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th ed., John Wiley & Sons, Inc.), содержание которых включены в настоящее изобретение путем ссылки на них.

Номенклатура

Нумерация

При указании положений аминокислотного остатка в соединениях по изобретению, для остатков цистеина (C_i , C_{ii} и C_{iii}) нумерация не приводится, поскольку они являются инвариантными, поэтому нумерация аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 1 является такой, как показано ниже:

$C_i-P_1-1Nal_2-dD_3-C_{ii}-M_4-HArg_5-D_6-W_7-S_8-T_9-P_{10}-HyP_{11}-W_{12}-C_{iii}$ (SEQ ID NO: 1).

Применительно к настоящему изобретению, предполагается, что все бициклические пептиды циклизованы с помощью 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА) с образованием тризамещенной структуры. Циклизация с помощью ТАТА происходит по C_i , C_{ii} и C_{iii} .

Молекулярный формат

N- или C-концевые удлинения для коровой последовательности бицикла добавляются к левой или правой стороне последовательности и отделяются дефисом. Например, N-концевой $\beta Ala-Sar_{10}-Ala$ хвост будет обозначаться как:

$\beta Ala-Sar_{10}-A-(SEQ ID NO: X)$.

Обратные пептидные последовательности

В свете публикации Nair et al (2003) *J Immunol* 170(3), 1362-1373, предполагается, что раскрытые в изобретении пептидные последовательности могут также найти применение в их ретро-инверсной форме. Например, порядок последовательности изменяют на обратный (то есть N-конец становится C-концом и наоборот), и ее стереохимия таким же образом становится обратной (то есть D-аминокислоты становятся L-аминокислотами и наоборот). Во избежание неправильного толкования, предполагается, что при указании аминокислот, либо в виде их полного названия, либо в виде их буквенного кода из одной или трех букв, в изобретении они представляются как L-

аминокислоты, если не заявлено иное. Если предполагается, что такая аминокислота должна быть представлена в изобретении как D-аминокислота, то, в этом случае, перед обозначением аминокислоты будет стоять строчная буква d и все обозначение будет взято в квадратные скобки, например, [dA], [dD], [dE], [dK], [d1NaI], [dNle], и так далее.

Преимущества пептидных лигандов

Конкретные гетеротандемные бициклические пептидные комплексы по настоящему изобретению имеют ряд предпочтительных свойств, благодаря которым они могут рассматриваться в качестве подходящих молекул, подобных лекарственным средствам, для инъекционного, ингаляционного, назального, глазного, перорального или местного введения. Такие предпочтительные свойства включают:

- межвидовую перекрестную реактивность. Она является обычным требованием для проведения преклинических фармакодинамических и фармакокинетических исследований;

- устойчивость к воздействию протеаз. Гетеротандемные бициклические пептидные комплексы должны, в идеальном варианте, проявлять устойчивость к воздействию протеаз плазмы, эпителиальных ("заякоренных в мембране") протеаз, желудочных и кишечных протеаз, протеаз на поверхности легких, внутриклеточных протеаз и других подобных протеаз. Устойчивость к воздействию протеаз должна сохраняться между различными видами, благодаря чему на животных моделях может быть разработан перспективный гетеротандемный бициклический пептид, который затем с высокой степенью достоверности может применяться на людях;

- требуемый профиль растворимости. Он зависит от отношения заряженных и гидрофильных остатков к гидрофобным остаткам и от внешних/внутренних молекулярных водородных связей, что является важным с точки зрения приготовления и абсорбции лекарственного препарата;

- селективность. Конкретные гетеротандемные бициклические пептидные комплексы по изобретению проявляют высокую селективность в присутствии других мишеней;

- оптимальный период полувыведения из плазмы в кровотоке. В зависимости от клинических показаний и схемы лечения, может потребоваться разработка гетеротандемного бициклического пептидного комплекса с кратковременным воздействием в случае лечения острого заболевания, или разработка гетеротандемного бициклического пептидного комплекса с повышенным временем нахождения в кровотоке, что, вследствие этого, является оптимальным при лечении хронического течения заболеваний. Другими факторами, определяющими требуемый период полувыведения из плазмы, являются требования при пролонгированном воздействии достижения максимальной терапевтической эффективности с учетом сопровождающего токсического действия, обусловленного пролонгированным воздействием лекарственного средства.

Важно отметить, что в изобретении представлены данные, согласно которым выбранные гетеротандемные бициклические пептидные комплексы демонстрируют

противоопухолевую активность при их дозировании с частотой, при которой не поддерживаются концентрации соединения в плазме выше его величины EC_{50} *in vitro*. Это отличается от методов применения более крупных по размеру биологических препаратов (то есть на основе антител) для агонизма CD137 или биспецифического агонизма CD137 (Segal et al., *Clin Cancer Res.*, 23(8):1929-1936 (2017), Claus et al., *Sci Trans Med.*, 11(496): eaav5989, 1-12 (2019), Hinner et al., *Clin Cancer Res.*, 25(19):5878-5889 (2019)). Не приводя в качестве обоснования какую-либо теорию, тем не менее, можно предположить, что наблюдаемое явление обусловлено тем, что гетеротандемные бициклические комплексы имеют относительно низкую молекулярную массу (как правило <15 кДа), они являются полностью синтетическими продуктами и они представляют собой нацеленные на опухоль агонисты CD137. В качестве таковых, они характеризуются относительно короткими периодами полувыведения из плазмы, но высокой проницаемостью в опухоль и продолжительным временем нахождения в опухоли. В изобретении приведены данные, которые полностью поддерживают наличие этих преимуществ. Например, противоопухолевая активность в моделях сингенной опухоли на мышах с гуманизированным CD137 проявляется либо ежедневно, либо на каждый третий день. Кроме того, фармакокинетические данные, полученные в случае интраперитонеального введения, показывают, что период полувыведения из плазмы составляет <3 часов, что позволяет предположить стабильное падение циркулирующей концентрации комплекса ниже величины *in vitro* EC_{50} в промежутках времени между введениями доз. Кроме того, фармакокинетические данные для опухоли показывают, что уровни гетеротандемного бициклического комплекса в опухолевой ткани могут быть более высокими и более устойчивыми по сравнению с уровнями в плазме.

Следует отметить, что этот вывод образует важный дополнительный аспект изобретения. Так, согласно дополнительному аспекту изобретения, в изобретении предлагается способ лечения рака, который включает введение описанного в изобретении гетеротандемного бициклического пептидного комплекса при частоте введения доз, при которой не поддерживаются концентрации указанного комплекса в плазме выше величины *in vitro* EC_{50} для указанного комплекса.

- Иммунологическую память. Сочетание связывающегося с раковой клеткой бициклического пептидного лиганда со связывающимся с иммунной клеткой бициклическим пептидным лигандом обеспечивает синергетический положительный эффект для иммунологической памяти. В изобретении представлены данные, которые показывают, что выбранные гетеротандемные бициклические пептидные комплексы по изобретению позволяют не только уничтожить опухоли, но при повторном введении вызывающего образование опухоли средства, ни у одной из инокулированных мышей с полным ответом не развивались опухоли (смотрите фигуру 5). Это указывает на то, что лечение с помощью выбранных гетеротандемных бициклических пептидных комплексов по изобретению вызывало иммунологическую память у мышей с полным ответом. Это является значительным клиническим преимуществом с точки зрения предотвращения

повторного возникновения указанной опухоли, после того как она первоначально была подвергнута противоопухолевой терапии и уничтожена.

Пептидные лиганды

Упомянутый в изобретении пептидный лиганд относится к пептиду, ковалентно связанному с молекулярным каркасом. Как правило, такие пептиды включают две или более реакционно-способных групп (то есть остатки цистеина), которые способны образовывать ковалентные связи с каркасом, и последовательность, находящуюся между указанными реакционно-способными группами, которую называют петлевой последовательностью, так как она образует петлю при связывании пептида с каркасом. В данном случае, пептиды включают, по меньшей мере, три реакционно-способные группы, выбранные из цистеина, 3-меркаптопропионовой кислоты и/или цистеинамина, и образуют, по меньшей мере, две петли на каркасе.

Фармацевтически приемлемые соли

Следует иметь в виду, что в объем настоящего изобретения входят солевые формы, и упоминания пептидных лигандов включают и солевые формы указанных лигандов.

Соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит фрагмент с основными или кислотными свойствами, обычными химическими методами, такими как методы, описанные в монографии *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002. Как правило, такие соли можно получить реакцией этих соединений в форме свободной кислоты или свободного основания с подходящим основанием или кислотой в воде или в органическом растворителе, или в их смеси.

Соли присоединения кислот (моно- или дисоли) могут быть образованы с широким спектром кислот, как неорганических, так и органических. Примеры солей включают моно- или дисоли, образованные с кислотой, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацетамидобензойной, бутановой, (+)-камфорной, камфорносульфоновой, (+)-(1S)-камфора-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламовой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, фумаровой, слизевой, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α -оксoglutarовой, гликолевой, гиппуровой, гидрогалогеновых кислот (например, бромистоводородной, хлористоводородной, йодистоводородной), изетионовой, молочной (например, (+)-L-молочной, (\pm)-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, (\pm)-DL-миндальной, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, щавелевой, пальмитиновой, памовой, фосфорной, пропионовой, пировиноградной, L-

пироглутаминовой, салициловой, 4-амино-салициловой, себаценовой, стеариновой, янтарной, серной, дубильной, (+)-L-винной, тиоциановой, п-толуолсульфоновой, ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированных аминокислот и катионообменных смол.

Одна конкретная группа солей состоит из солей, образованных из уксусной, хлористоводородной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной, молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изетионовой, фумаровой, бензолсульфоновой, толуолсульфоновой, серной, метансульфоновой (мезилат), этансульфоновой, нафталинсульфоновой, валериановой, пропановой, бутановой, малоновой, глюкуроновой и лактобионовой кислот. Одной конкретной солью является гидрохлорид. Другой конкретной солью является ацетат.

Если соединение является анионным или имеет функциональную группу, которая может быть анионной (например, -COOH может находиться в форме аниона -COO-), то соль может быть образована с органическим или неорганическим основанием, генерирующим подходящий катион. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но этим не ограничивая, ионы щелочных металлов, такие как Li^+ , Na^+ и K^+ , катионы щелочно-земельных металлов, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} , и другие катионы, такие как Al^{3+} или Zn^+ . Примеры подходящих органических катионов включают, но этим не ограничивая, ион аммония (то есть, NH_4^+) и ионы замещенного аммония (например, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются ионы, которые образованы из метиламина, этиламина, диэтиламина, пропиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумамина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером типичного иона четвертичного аммония является $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Когда соединения по изобретению содержат аминную функциональность, они могут образовывать четвертичные аммониевые соли, например, путем реакции с алкилирующим агентом в соответствии с методами, хорошо известными специалисту в данной области. Такие соединения четвертичного аммония входят в объем изобретения.

Модифицированные производные

Следует иметь в виду, что описанные в изобретении модифицированные производные пептидных лигандов входят в объем настоящего изобретения. Примеры таких подходящих модифицированных производных включают одну или более модификаций, выбранных из N-концевых и/или C-концевых модификаций; замены одного или более аминокислотных остатков одним или более не природными аминокислотными остатками (например, замены одного или более полярных аминокислотных остатков одной или более изостерическими или изоэлектронными аминокислотами; замены одного или более неполярных аминокислотных остатков другими не природными изостерическими или изоэлектронными аминокислотами); добавления спейсерной группы; замены одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков

одним или более устойчивыми к окислению аминокислотными остатками; замены одного или более аминокислотных остатков на аланин, замены одного или более L-аминокислотных остатков одним или более D-аминокислотными остатками; N-алкилирования одной или более амидных связей внутри бициклического пептидного лиганда; замены одной или более пептидных связей суррогатной связью; модификации длины главной цепи пептида; замены водорода на альфа-углероде одного или нескольких аминокислотных остатков другой химической группой, модификации аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат/аспарат и тирозин, подходящими аминами, тиолами, карбоновой кислотой и реагентами, взаимодействующими с фенолом, для функционализации указанных аминокислот, и введения или замены на аминокислоты, которые вводят ортогональные реакционноспособные группы, которые подходят для функционализации, например, аминокислоты, несущие азидные или алкиновые группы, которые позволяют функционализировать с помощью алкиновых или несущих азид фрагментов, соответственно.

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает N-концевую и/или C-концевую модификацию. В дополнительном варианте осуществления, в котором модифицированное производное включает N-концевую модификацию с использованием подходящих химических реакций с аминогруппой, и/или C-концевую модификацию с использованием подходящих химических реакций с карбоксильной группой. В дополнительном варианте осуществления, указанная N-концевая или C-концевая модификация включает введение эффекторной группы, включая, но этим не ограничивая, цитотоксическое средство, радиоактивное хелатирующее вещество или хромофор.

В дополнительном варианте осуществления, модифицированное производное включает N-концевую модификацию. В дополнительном варианте осуществления, N-концевая модификация включает N-концевую ацетильную группу. В этом варианте осуществления, N-концевую цистеиновую группу (группу, обозначаемую в изобретении как C_i) блокируют с помощью уксусного ангидрида или других подходящих реагентов в процессе синтеза пептида, что приводит к образованию молекулы с ацетилированным N-концом. В этом варианте осуществления обеспечивается преимущество, связанное с удалением потенциальной точки распознавания аминоклонидаз и предотвращением возможной деградации бициклического пептида.

В альтернативном варианте осуществления, N-концевая модификация включает введение молекулярной спейсерной группы, которая облегчает конъюгацию эффекторных групп и способствует сохранению активности бициклического пептида в отношении его мишени.

В дополнительном варианте осуществления, модифицированное производное включает C-концевую модификацию. В дополнительном варианте осуществления, C-концевая модификация включает амидную группу. В этом варианте осуществления, C-концевую цистеиновую группу (обозначаемую в изобретении как C_{iii}) синтезируют в

форме амида в процессе синтеза пептида, что приводит к образованию молекулы с амидированным С-концом. В этом варианте осуществления обеспечивается преимущество, связанное с удалением потенциальной точки распознавания карбоксипептидазы и снижением вероятности протеолитической деградации бициклического пептида.

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более аминокислотных остатков одним или более остатками неприродных аминокислот. В этом варианте осуществления, могут быть выбраны неприродные аминокислоты, имеющие изостерические/изоэлектронные боковые цепи, которые не распознаются деградирующими протеазами и не оказывают никакого неблагоприятного воздействия на эффективность в отношении мишени.

В качестве варианта, могут быть использованы неприродные аминокислоты, имеющие стерически затрудненные аминокислотные боковые цепи, в результате чего конформационно и стерически затруднен протеолитический гидролиз соседней пептидной связи. В частности, они относятся к аналогам пролина, объемным боковым цепям, α -дизамещенным производным (например, аминоизомаляновой кислоте, Aib) и циклическим аминокислотам, простым производным которых является аминоклопропилкарбоновая кислота.

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает добавление спейсерной группы. В дополнительном варианте осуществления, модифицированное производное включает добавление спейсерной группы к N-концевому цистеину (C_i) и/или к C-концевому цистеину (C_{iii}).

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или более устойчивыми к окислению аминокислотными остатками. В другом варианте осуществления, модифицированное производное включает замену остатка триптофана остатком нафтилаланина или аланина. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество, связанное с улучшением профиля фармацевтической стабильности полученного бициклического пептидного лиганда.

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более заряженных аминокислотных остатков одним или более гидрофобными аминокислотными остатками. В альтернативном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более гидрофобных аминокислотных остатков одним или более заряженными аминокислотными остатками. Благоприятный баланс между заряженными и гидрофобными аминокислотными остатками является важной характеристикой бициклических пептидных лигандов. Например, гидрофобные аминокислотные остатки влияют на степень связывания с белками плазмы и, таким образом, на концентрацию доступной свободной фракции в плазме, в то время как заряженные аминокислотные остатки (в частности, аргинин) могут влиять на взаимодействие пептида с фосфолипидными мембранами на поверхности

клеток. Эти два типа остатков в комбинации могут влиять на период полувыведения, объем распределения и воздействие пептидного лекарственного средства, и могут быть подобраны в соответствии с требуемым клиническим результатом. Кроме того, благоприятная комбинация и число заряженных аминокислотных остатков относительно гидрофобных аминокислотных остатков могут снижать раздражение в месте инъекции (при подкожном введении пептидного лекарственного средства).

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более остатков L-аминокислоты одним или более остатками D-аминокислоты. В этом варианте осуществления предполагается, что такая замена позволяет повысить протеолитическую устойчивость за счет стерических затруднений и за счет способности D-аминокислоты стабилизировать конформационную изомерию (Tugyi et al (2005) PNAS, 102(2), 413-418).

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает удаление любых аминокислотных остатков и замену их аланинами. В этом варианте осуществления обеспечивается преимущество, связанное с удалением потенциального места (мест) протеолитической атаки.

Следует отметить, что каждая из упомянутых выше модификаций предназначена для планируемого повышения активности или стабильности пептида. Дополнительное повышение активности путем модификаций может быть достигнуто на основе следующих механизмов:

- введение гидрофобных фрагментов, которые обеспечивают гидрофобный эффект и приводят к более низким скоростям диссоциации, в результате чего достигаются более высокие степени аффинности;

- введение заряженных групп, которые обеспечивают ионные взаимодействия дальнего порядка, что приводит к более высоким скоростям ассоциации и к более высоким степеням аффинности (смотрите, например, Schreiber et al, Rapid, electrostatically assisted association of proteins (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31); и

- введение в пептид дополнительных ограничений степеней свободы путем, например, правильного выбора ограничения степеней свободы боковых цепей аминокислоты, благодаря чему минимизируется потеря энтропии при связывании с мишенью, ограничения степеней свободы торсионных углов основной цепи, благодаря чему минимизируется потеря энтропии при связывании с мишенью, и путем введения дополнительных циклов в молекулу по тем же самым причинам

(обзорную информацию можно найти в публикациях Gentilucci et al, Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203, и Nestor et al, Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418).

Изотопные варианты

Настоящее изобретение включает все фармацевтически приемлемые (радиоактивно)изотопно-меченые пептидные лиганды по изобретению, в которых один или более атомов заменены атомами, имеющими тот же атомный номер, но атомную

массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе, и пептидные лиганды по изобретению, к которым присоединены хелатирующие металлы группы (называемые "эффекторными"), которые способны удерживать соответствующие (радиоактивные)изотопы, и пептидные лиганды по изобретению, в которых некоторые функциональные группы ковалентно заменены соответствующими (радиоактивными)изотопами или изотопно-мечеными функциональными группами.

Примеры изотопов, подходящих для введения в пептидные лиганды по изобретению, включают изотопы водорода, такие как ^2H (D) и ^3H (T), углерода, такие как ^{11}C , ^{13}C и ^{14}C , хлора, такие как ^{36}Cl , фтора, такие как ^{18}F , йода, такие как ^{123}I , ^{125}I и ^{131}I , азота, такие как ^{13}N и ^{15}N , кислорода, такие как ^{15}O , ^{17}O и ^{18}O , фосфора, такие как ^{32}P , серы, такие как ^{35}S , меди, такие как ^{64}Cu , галлия, такие как ^{67}Ga или ^{68}Ga , иттрия, такие как ^{90}Y , и лютеция, такие как ^{177}Lu , и висмута, такие как ^{213}Bi .

Конкретные изотопно-меченые пептидные лиганды по изобретению, например, те, в которые введен радиоактивный изотоп, могут применяться в исследованиях распределения лекарственных соединений и/или субстратов в тканях, а также для клинической оценки присутствия и/или отсутствия мишени нектин-4 в пораженных тканях. Пептидные лиганды по изобретению могут дополнительно обладать ценными диагностическими свойствами, в силу чего они могут применяться для детекции или идентификации образования комплекса между меченым соединением и другими молекулами, пептидами, белками, ферментами или рецепторами. В методах детекции или идентификации могут использоваться соединения, которые мечены с помощью наносящих метку средств, таких как радиоизотопы, ферменты, флуоресцирующие вещества, люминесцирующие вещества (например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин и люцифераза), и так далее. В частности, с этой целью могут применяться радиоактивные изотопы тритий, то есть ^3H (T), и углерод-14, то есть ^{14}C , в виду простоты их введения и доступности средств для их детекции.

Замещение с помощью более тяжелых изотопов, таких как дейтерий, то есть ^2H (D), может давать определенные терапевтические преимущества, обусловленные более высокой метаболической стабильностью, например, повышение *in vivo* периода полувыведения или снижение величины необходимой дозы, и, следовательно, может быть предпочтительным при некоторых обстоятельствах.

Замещение с помощью позитрон-активных изотопов, таких как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , может применяться при проведении исследований методом позитронно-эмиссионная томография (PET) с целью определения степени занятости мишени.

Меченые изотопами соединения пептидных лигандов по изобретению, могут быть получены, как правило, обычными методами, известными специалистам в данной области, или методами, аналогичными методам, которые описаны в приводимых в изобретении примерах, путем использования соответствующего меченого изотопом реагента вместо применяемого ранее немеченого реагента.

Синтез

Пептиды по настоящему изобретению могут быть получены синтетическим путем стандартными методами с последующей реакцией с молекулярным каркасом *in vitro*. После завершения этого процесса, могут быть использованы стандартные методы химии. Это позволяет быстро получать в большом количестве растворимый материал для проведения последующих экспериментов или валидации. Такие методы могут быть осуществлены с использованием традиционных химических методик, таких как описанные в упомянутой выше публикации Timmerman et al.

Поэтому, изобретение также относится к получению полипептидов или конъюгатов, выбранных как указано в изобретении, где получение включает необязательные дополнительные стадии, разъясняемые ниже. В одном варианте осуществления, эти стадии проводят на конечном продукте полипептид/конъюгат, полученном химическим синтезом.

Аминокислотные остатки в представляющем интерес полипептиде могут быть необязательно замещены при получении конъюгата или комплекса.

Пептиды могут быть также удлинены, например, для того чтобы ввести еще одну петлю и, следовательно, для достижения множественной специфичности.

Чтобы удлинить пептид, его можно просто удлинить химическими методами по его N-концу или C-концу или внутри петель с использованием ортогонально защищенных лизинов (и их аналогов) с использованием стандартных методов твердофазного синтеза или методов синтеза в растворе. Для введения активированного или активируемого N- или C-конца могут быть использованы стандартные методики (био)конъюгации. В качестве варианта, добавления могут быть осуществлены фрагментарной конденсацией или нативным химическим лигированием, например, как описано в публикации Dawson et al. 1994. *Synthesis Proteins by Native Chemical Ligation. Science* 266:776-779, или с помощью ферментов, например, используя субтилигазу, как это описано в публикациях Chang et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 20; 91(26):12544-8 или Hikari et al *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003.

В качестве варианта, пептиды могут быть удлинены или модифицированы путем дальнейшей конъюгации за счет использования дисульфидных связей. Этот подход имеет дополнительное преимущество, обусловленное тем, что он позволяет разъединение друг от друга первого и второго пептидов сразу после попадания в восстановительную среду клетки. В этом случае, молекулярный каркас (например, ТАТА) может быть добавлен в процессе химического синтеза первого пептида, для того чтобы прореагировать с тремя цистеиновыми группами; затем к N- или C-концу первого пептида может быть присоединен дополнительный цистеин или тиол, вследствие чего этот цистеин или тиол реагирует только со свободным цистеином или тиолом вторых пептидов, образуя связанный дисульфидной связью бициклический конъюгат пептид-пептид.

Аналогичные методы в равной степени применимы к синтезу/связыванию двух бициклических и биспецифичных макроциклов, что позволяет создавать тетраспецифичные молекулы.

Кроме того, аналогичным образом может быть осуществлено добавление других функциональных групп или эффекторных групп, путем использования соответствующих химических реакций, присоединения на N- или C-концах или через боковые цепи. В одном варианте осуществления, присоединение осуществляют таким образом, что оно не блокирует активность ни одного объекта.

Фармацевтические композиции

Согласно дополнительному аспекту изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, включающая определенный в изобретении пептидный лиганд в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

Как правило, пептидные лиганды по настоящему изобретению должны использоваться в очищенной форме вместе с фармакологически приемлемыми вспомогательными веществами или носителями. Обычно, эти вспомогательные вещества или носители включают водный или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физиологический раствор и/или забуференные среды. Среда для парентерального введения включает раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, раствор декстрозы и хлорида натрия и раствор Рингера с лактатом. Подходящие физиологически приемлемые вспомогательные вещества, если необходимо поддерживать полипептидный комплекс в форме суспензии, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Среды для внутривенного введения включают жидкость и средства для восполнения питательных веществ и средства для восстановления содержания электролитов, такие как растворы Рингера с декстрозой. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition).

Пептидные лиганды по настоящему изобретению могут быть использованы в форме отдельно вводимых композиций или в сочетании с другими лекарственными средствами. Они могут включать антитела, фрагменты антител и различные иммунотерапевтические препараты, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин, а также иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать "коктейли" из различных цитотоксических или других лекарственных средств в сочетании с белковыми лигандами по настоящему изобретению или даже в комбинации с выбранными полипептидами по настоящему изобретению, обладающими различной специфичностью, такими как полипептиды, выбранные с использованием различных целевых лиганд, независимо от того, объединят ли их или не объединяют перед введением.

Способ введения фармацевтических композиций по изобретению может представлять собой любой из способов, хорошо известных специалистам в данной области. С целью проведения терапии, пептидные лиганды по изобретению могут быть введены любому пациенту стандартными способами. Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, включая парентеральный, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, трансдермальный способы введения, путем ингаляции или, в случае необходимости, путем прямой инфузии через катетер. Предпочтительно вводить фармацевтические композиции по изобретению путем ингаляции. Доза и частота введения будут зависеть от возраста, пола и состояния пациента, одновременного введения других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые должны учитываться лечащим врачом.

Пептидные лиганды по настоящему изобретению могут быть лиофилизированы для хранения и затем диспергированы в подходящей среде перед использованием. Было показано, что этот подход является эффективным, и могут быть использованы известные в данной области методы лиофилизации и диспергирования. Для специалистов в данной области является очевидным, что лиофилизация и диспергирование могут приводить к потере в различной степени активности, и что может потребоваться корректировка уровней в сторону увеличения для компенсации этих потерь.

Композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их коктейль, могут быть введены с целью профилактического и/или терапевтического лечения. В некоторых вариантах терапевтического применения, количество, достаточное для достижения, по меньшей мере, частичного ингибирования, подавления, модуляции, уничтожения или какого-либо другого измеримого параметра популяции выбранных клеток, определяется как "терапевтически эффективная доза". Количества, необходимые для достижения этой дозы, будут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния собственной иммунной системы пациента, и они обычно изменяются в диапазоне от 0,005 до 5,0 мг выбранного пептидного лиганда на килограмм массы тела, причем чаще всего используют дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/доза. Для профилактических целей, композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их смеси, могут быть также введены в аналогичных или чуть более низких дозах.

Композиция, содержащая пептидный лиганд по настоящему изобретению, может быть использована в профилактических и терапевтических целях для содействия изменению, инактивации, уничтожению или удалению выбранной популяции клеток-мишеней у млекопитающего. Кроме того, описанные в изобретении пептидные лиганды могут быть использованы экстракорпорально или селективно *in vitro* для уничтожения, истощения или иного эффективного удаления популяции клеток-мишеней из гетерогенного набора клеток. Кровь млекопитающего может быть экстракорпорально объединена с выбранными пептидными лигандами, в результате чего нежелательные клетки уничтожаются или иным образом удаляются из крови, которую затем возвращают млекопитающему, используя стандартные методы.

Терапевтическое применение

Согласно дополнительному аспекту изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, включающая указанный в изобретении гетеротандемный бициклический пептидный комплекс для применения с целью предотвращения, подавления или лечения рака.

Примеры видов рака (и их доброкачественных аналогов), которые могут быть подвергнуты лечению (или подавлены) включают, но этим не ограничивая, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциномы, плоскоклеточный рак, переходные клеточные карциномы и другие карциномы), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевых путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (включая карциномы пищевода, желудка (желудочные), тонкой кишки, толстой кишки, прямой кишки и заднего прохода), печени (гепатоцеллюлярную карциному), желчного пузыря и желчевыводительной системы, экзокринной части поджелудочной железы, почек, легких (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легких, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), карциномы головы и шеи (например, рак языка, ротовой полости, гортани, глотки, носоглотки, миндалин, слюнных желез, полости носа и околоносовых пазух), яичников, маточных труб, брюшной полости, влагалища, вульвы, пениса, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярную карциному щитовидной железы), надпочечников, предстательной железы, кожи и прилежащих органов (например, меланому, базальноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, кератоакантому, диспластический невус); гематологические злокачественные опухоли (например, лейкозы, лимфомы) и предраковые гематологические нарушения и нарушения с пограничной злокачественностью, включая гематологические злокачественные заболевания и связанные с ними состояния клеток лимфоидного ряда (например, острый лимфолейкоз [ALL], хронический лимфолейкоз [CLL], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лимфома клеток мантийной зоны, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы натуральных клеток-киллеров [NK], лимфомы Ходжкина, лейкозы ворсистых клеток, моноклональную гаммапатию неясного генеза, плазмцитому, множественную миелому и лимфопролиферативные нарушения после трансплантации), а также гематологические злокачественные и родственные состояния клеток миелоидного ряда (например, острый миелолейкоз [AML], хронический миелолейкоз [CML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелопролиферативные расстройства, такие как полицитемия вера, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелопролиферативный синдром, синдром миелодисплазии и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимального происхождения, например, саркомы мягких тканей, кости или хряща, такие как остеосаркомы, фибросаркомы, хондросаркомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, саркому Капоши, саркому Юинга,

синовиальную саркому, эпителиоидные саркомы, желудочно-кишечные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные гистоцитомы и дерматофибросаркому протуберанс; опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитомы, глиомы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, опухоли эпифиза и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островковых клеток, опухоли парашитовидных желез, карциноидные опухоли и медуллярную карциному щитовидной железы); опухоли глаз и их придатков (например, ретинобластому); опухоли зародышевых клеток и трофобласта (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы, пузырьный занос и хориокарциному); и педиатрические и эмбриональные опухоли (например, медуллобластомы, нейробластомы, опухоль Вильмса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, которые делают больного восприимчивым к возникновению злокачественного новообразования (например, пигментной ксеродермы).

В дополнительном варианте осуществления, рак выбирают из злокачественных гематологических заболеваний, таких как неходжкинская лимфома (NHL), лимфома Беркитта (BL), множественная миелома (MM), В-клеточный хронический лимфолейкоз (B-CLL), В- и Т-клеточный острый лимфолейкоз (ALL), Т-клеточная лимфома (TCL), острый миелолейкоз (AML), лейкоз ворсистых клеток (HCL), лимфома Ходжкина (HL) и хронический миелолейкоз (CML).

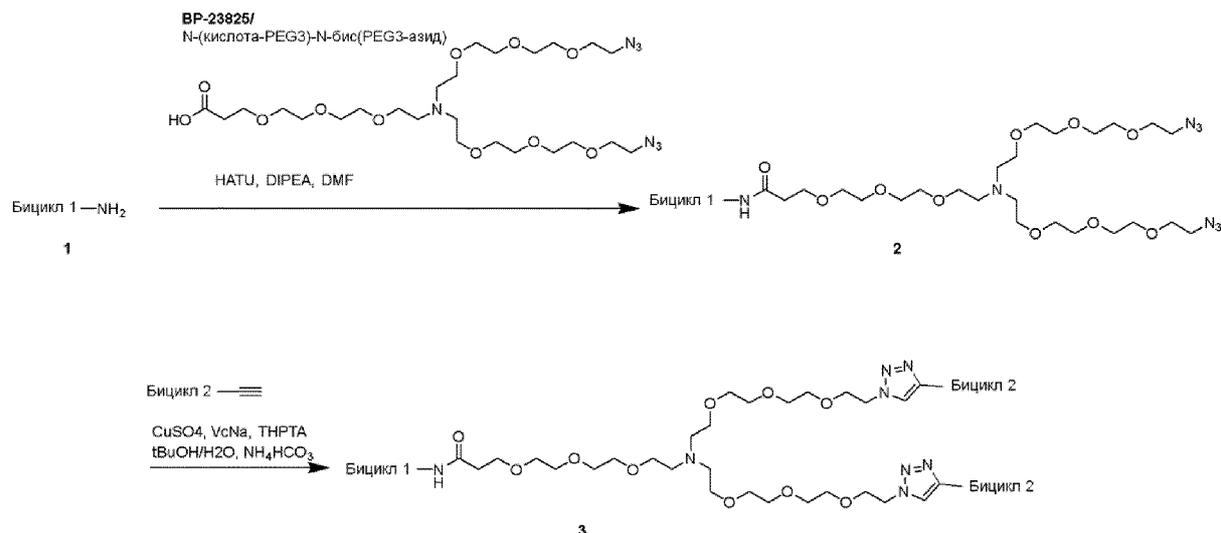
Используемый в изобретении термин "предотвращение" включает введение защищающей композиции до возникновения заболевания. "Подавление" относится к введению композиции после события, приводящего к возникновению заболевания, но до клинического проявления заболевания. "Лечение" включает введение защищающей композиции после проявления симптомов заболевания.

Известны и доступны системы экспериментальных моделей на животных, которые могут быть использованы для скрининга эффективности пептидных лигандов для предотвращения или лечения заболевания. Настоящее изобретение позволяет облегчить использование систем моделей на животных, что дает возможность разрабатывать полипептидные лиганды, которые могут перекрестно реагировать с мишенями у человека и животных, что и позволяет использовать модели на животных.

Далее изобретение дополнительно описано с помощью представленных ниже примеров.

ПРИМЕРЫ

В большинстве случаев, некоторые из гетеротандемных бициклических пептидных комплексов по изобретению могут быть получены следующим общим методом:

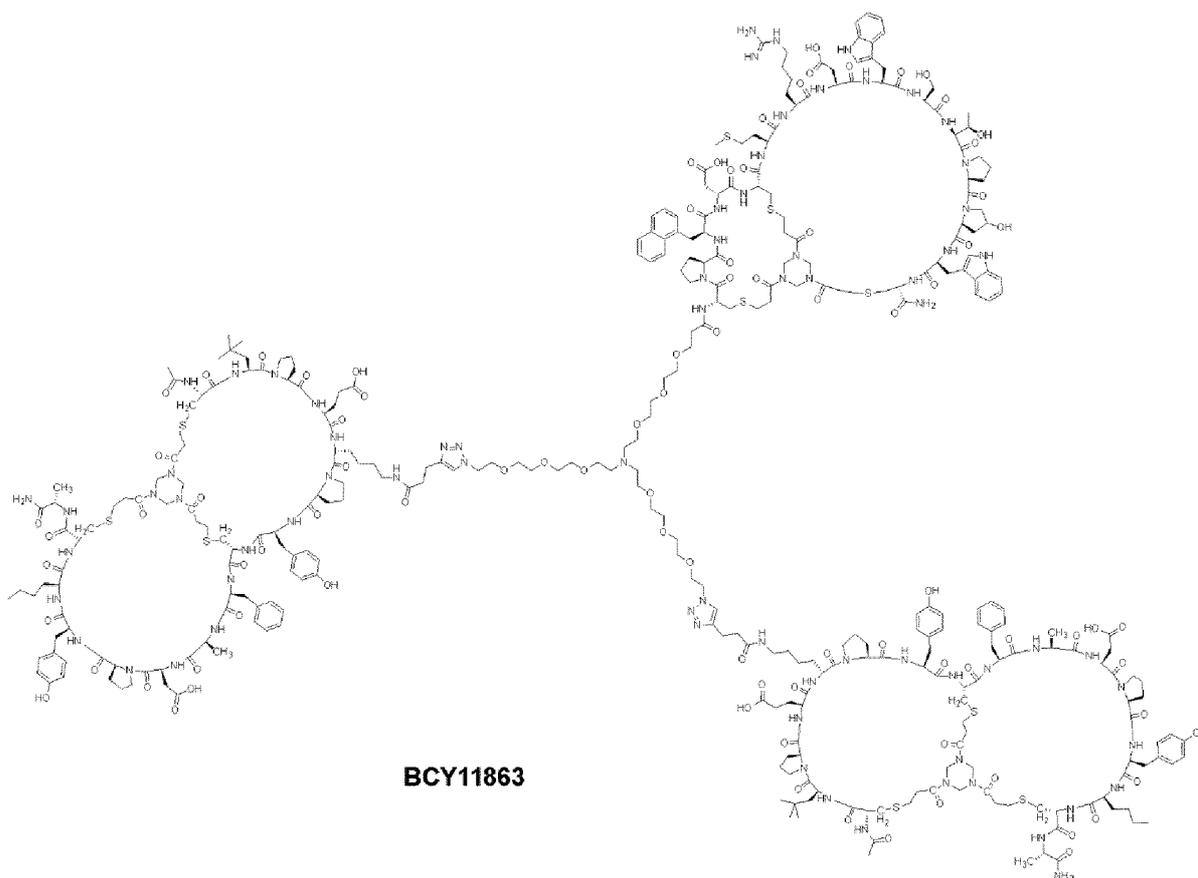


Все растворители дегазируют и продувают с помощью N₂ 3 раза. Раствор BP-23825 (1,0 экв), HATU (1,2 экв) и DIEA (2,0 экв) в DMF смешивают в течение 5 минут, затем добавляют Бицикл 1 (1,2 экв). Реакционную смесь перемешивают при 40°C в течение 16 часов. Реакционную смесь затем концентрируют при пониженном давлении с удалением растворителя и очищают препаративной HPLC с получением промежуточного соединения 2.

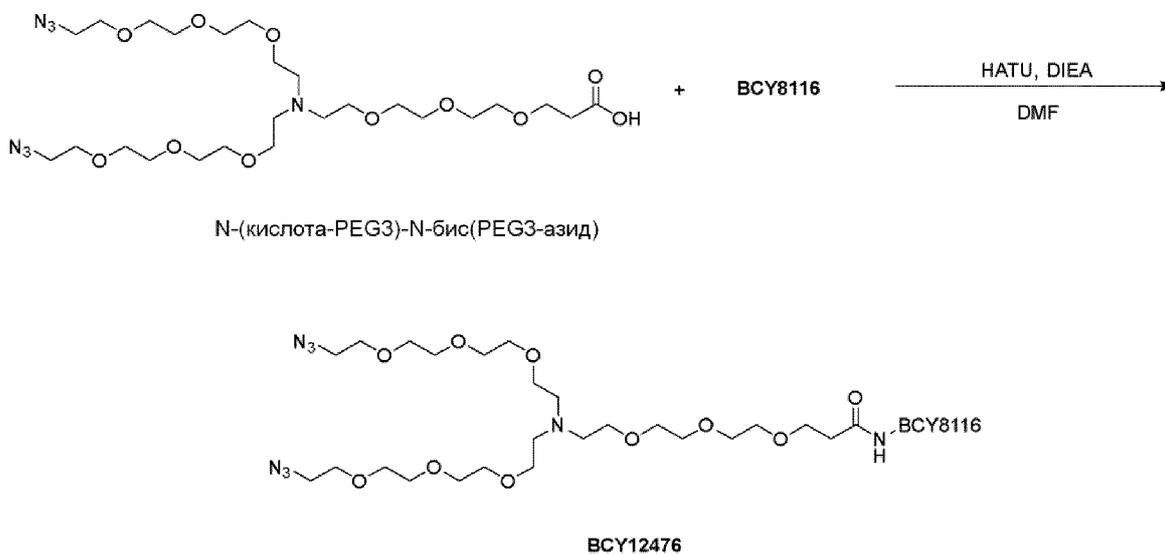
Смесь промежуточного соединения 2 (1,0 экв) и бицикла 2 (2,0 экв) растворяют в t-BuOH/H₂O (1:1), и затем добавляют CuSO₄ (1,0 экв), VcNa (4,0 экв) и THPTA (2,0 экв). И наконец, добавляют 0,2 М NH₄HCO₃ для доведения величины pH до 8. Реакционную смесь перемешивают при 40°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. Реакционную смесь непосредственно очищают препаративной HPLC.

Более подробные описания экспериментов по получению выбранных гетеротандемных бициклических пептидных комплексов по изобретению приведены ниже

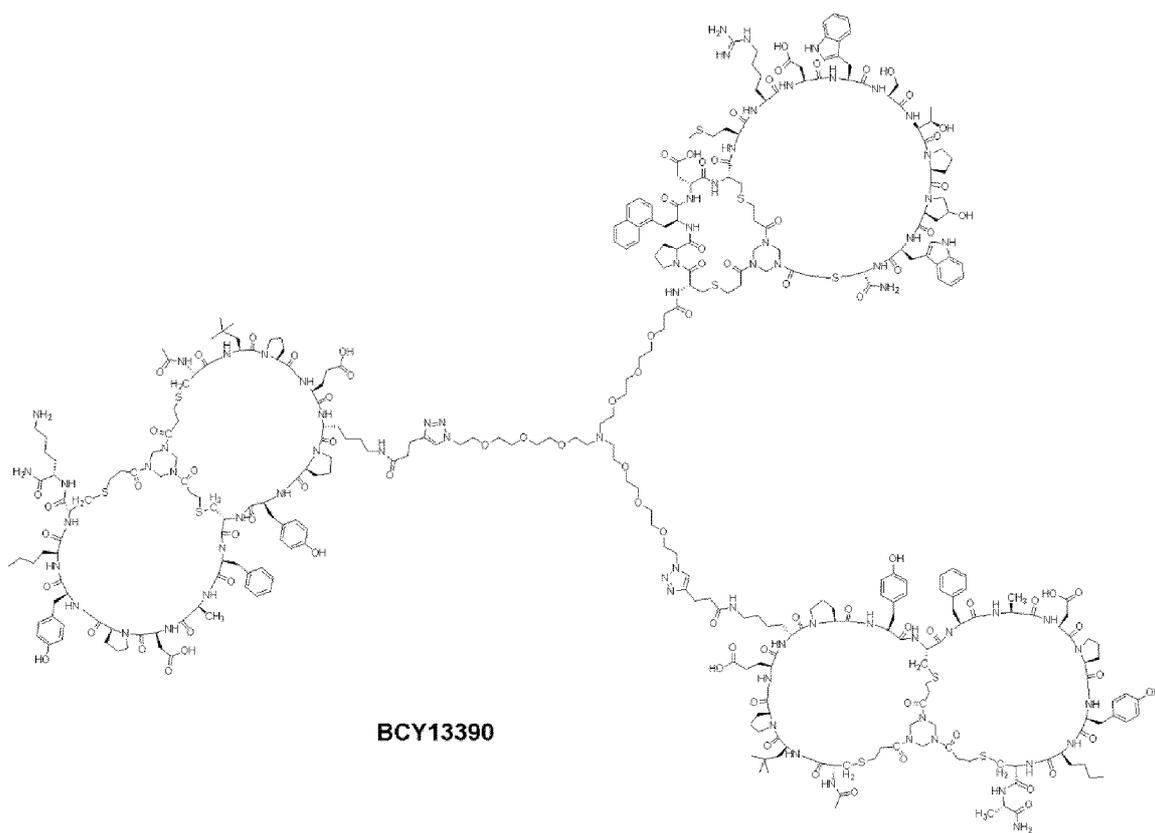
Пример 1. Синтез BCY11863



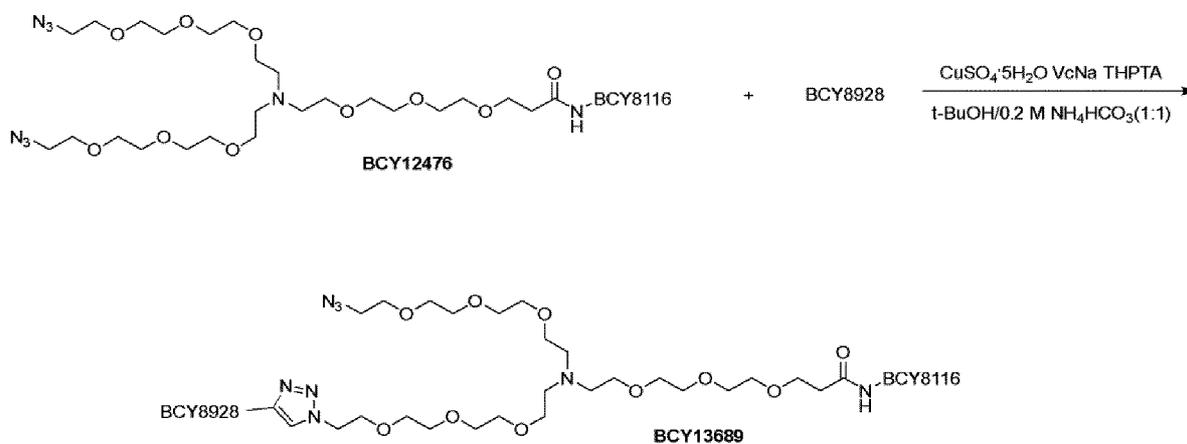
Методика получения BCY12476



Смесь N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид) (70,0 мг, 112,2 мкмоль, 1,0 экв), HATU (51,2 мг, 134,7 мкмоль, 1,2 экв) и DIEA (29,0 мг, 224,4 мкмоль, 40 мкл, 2,0 экв) растворяли в DMF (2 мл) и смешивали в течение 5 минут. Затем добавляли BCY8116 (294,0 мг, 135,3 мкмоль, 1,2 экв). Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS обнаруживал один основной пик с требуемой величиной *m/z*. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получали остаток. Остаток затем очищали препаративной HPLC.



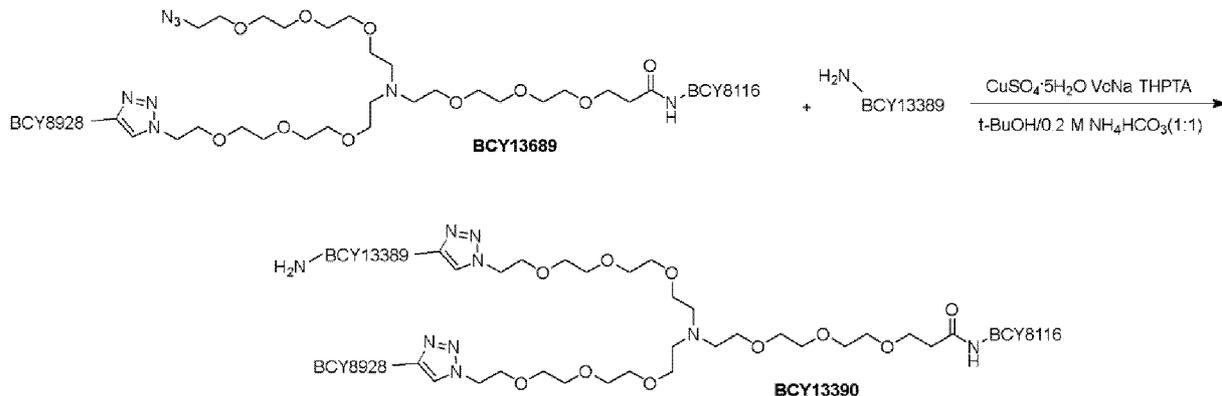
Методика получения BCY13689



Смесь BCY12476 (47,0 мг, 16,91 мкмоль, 1,0 экв), BCY8928 (30,0 мг, 13,53 мкмоль, 0,8 экв) и THPTA (36,7 мг, 84,55 мкмоль, 5,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 8 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 21,0 мкл, 0,5 экв) и VcNa (67,0 мг, 338,21 мкмоль, 20,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1,5 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что оставалось некоторое количество BCY12476, BCY8928 полностью прореагировал, и был обнаружен пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY13689 (25,3 мг,

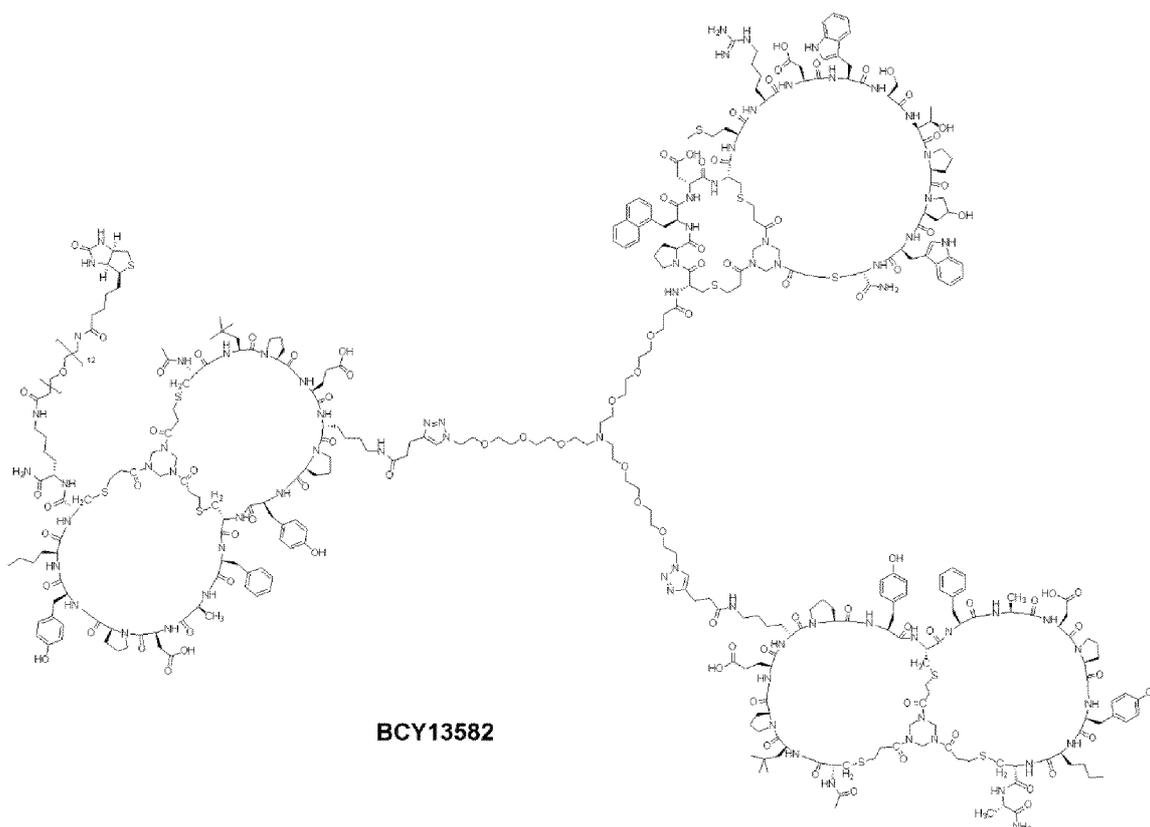
4,56 мкмоль, 27% выход, 90% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 4995,74, наблюдаемые величины m/z: 1249,4 ($[M+4H]^{4+}$), 999,9 ($[M+5H]^{5+}$).

Методика получения BCY13390

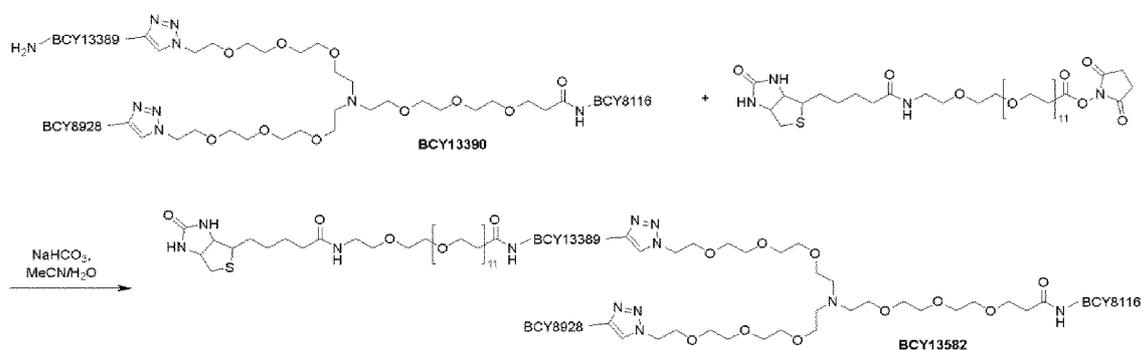


Смесь BCY13689 (43,6 мг, 8,73 мкмоль, 1,0 экв), BCY13389 (20,8 мг, 9,16 мкмоль, 1,05 экв) и THPTA (3,8 мг, 8,73 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 22,0 мкл, 1,0 экв) и VcNa (3,5 мг, 17,45 мкмоль, 2,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора довели до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал светло-желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS обнаруживал значительный пик, соответствующий требуемой величине m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY13390 (33,8 мг, 4,21 мкмоль, 48% выход, 90% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7270,41, наблюдаемые величины m/z: 1454,9 ($[M+5H]^{5+}$), 1213,2 ($[M+6H]^{6+}$).

Пример 3. Синтез BCY13582

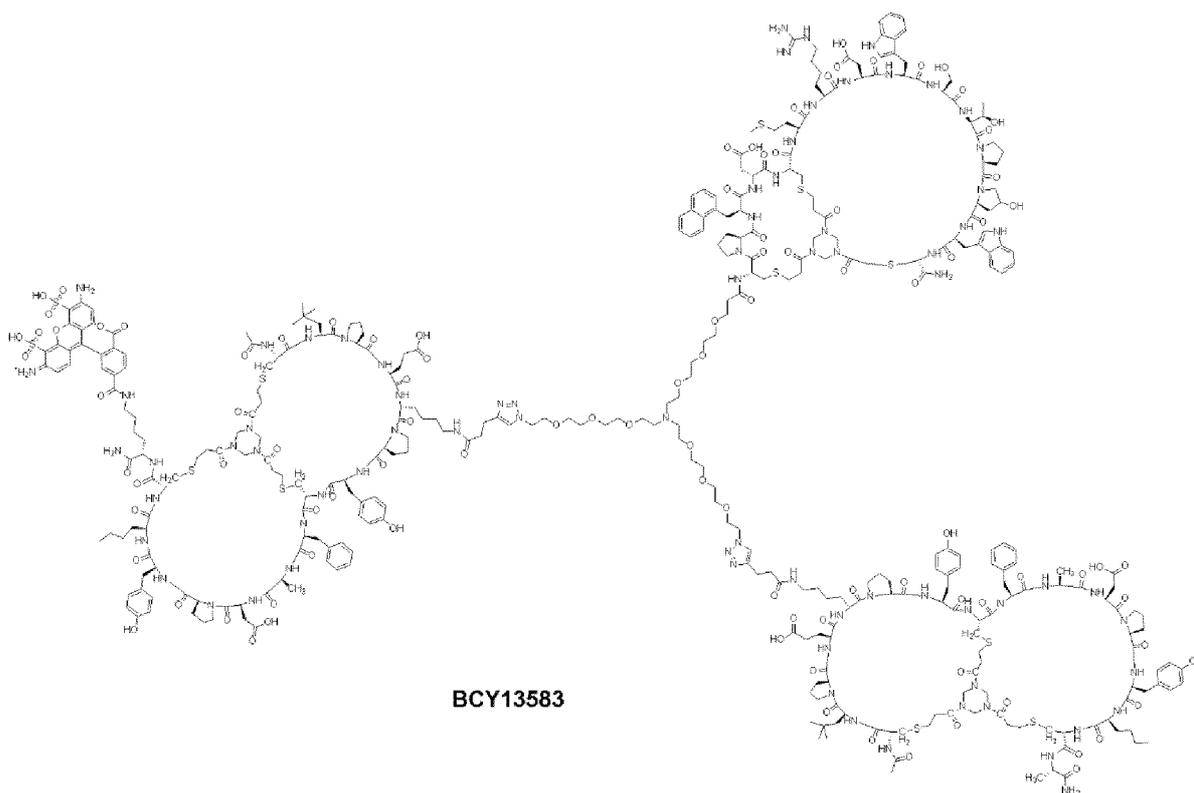


Методика получения BSY13582

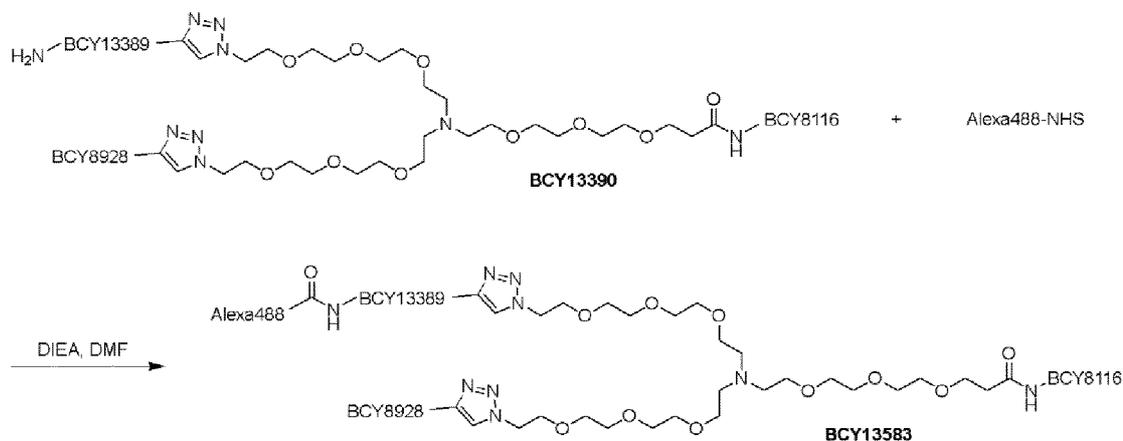


Смесь BSY13390 (5,0 мг, 0,6 мкмоль, 1,0 экв), биотин-PEG12-NHS эфира (CAS 365441-71-0, 0,7 мг, 0,72 мкмоль, 1,1 экв) растворяли в MeCN/H₂O (1:1, 2 мл). Величину pH этого раствора довели до 8 путем добавления по каплям 1,0 М NaHCO₃. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что BSY13390 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BSY13582 (2,5 мг, 0,30 мкмоль, 43% выход, 96% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 8096,43, наблюдаемые величины m/z: 1351,1 ([M+6H]⁶⁺), 1158,5 ([M+7H]⁷⁺).

Пример 4. Синтез BSY13583



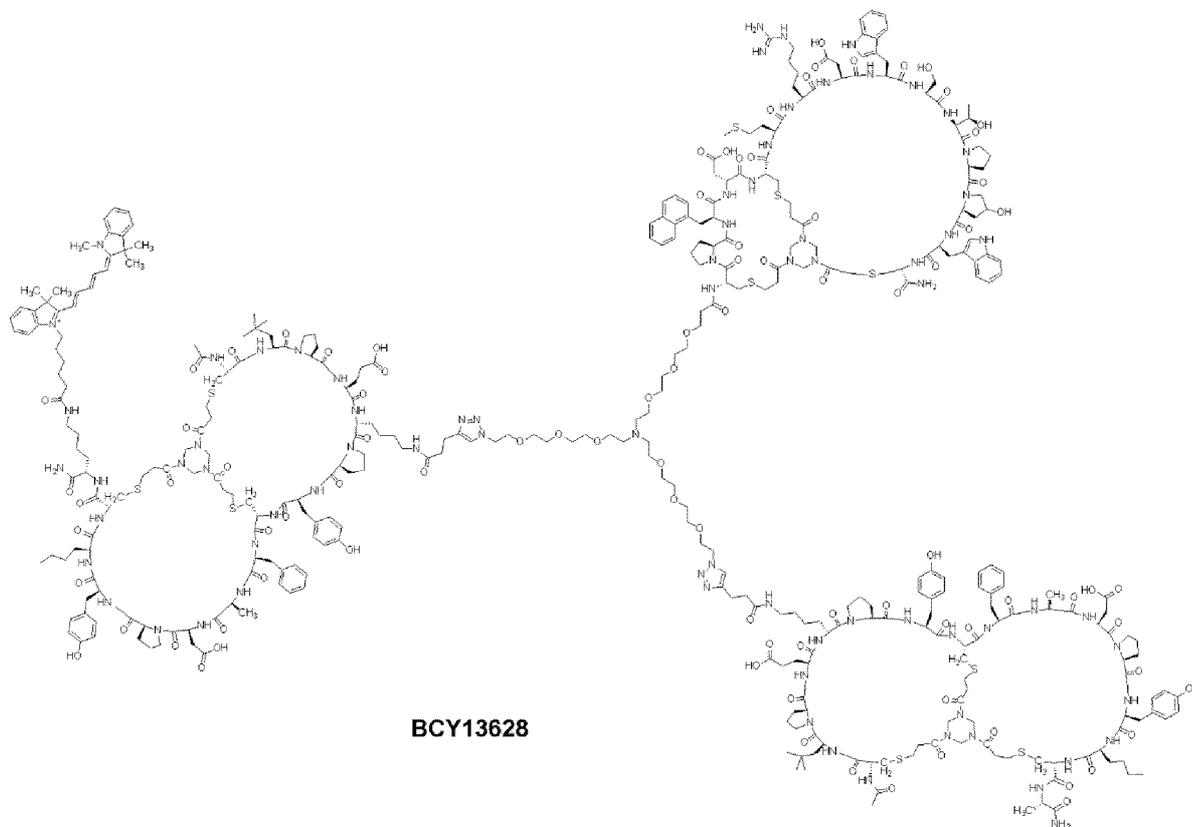
Методика получения BCY13583



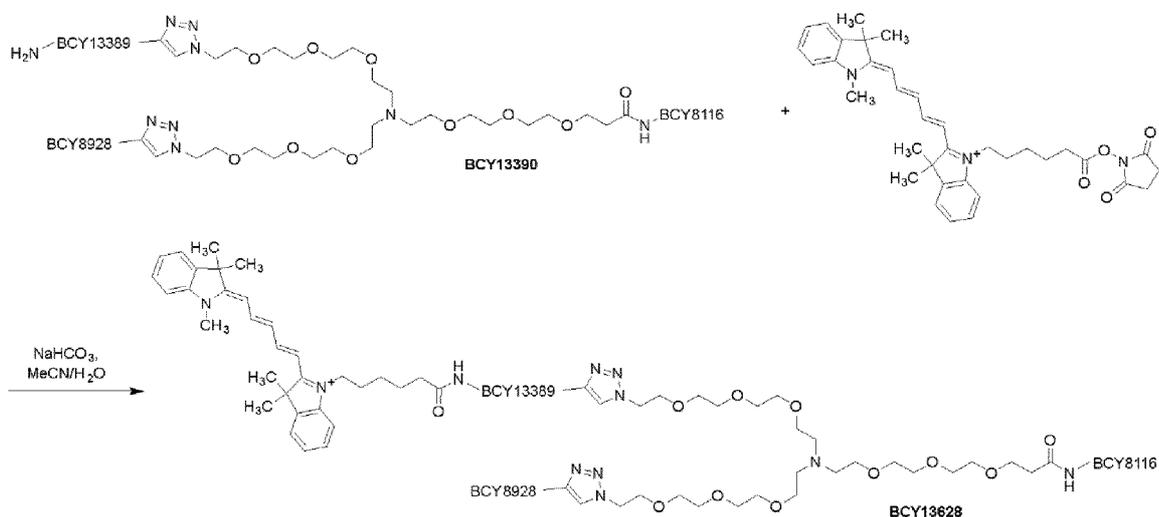
Смесь BCY13390 (15,0 мг, 2,06 мкмоль, 1,0 экв) и Alexa fluor® 488 NHS эфира (2,5 мг, 4,12 мкмоль, 2,0 экв) растворяли в DMF (0,5 мл). Затем добавляли по каплям DIEA (2,6 мг, 20,63 мкмоль, 3,6 мкл, 10 экв). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что оставался BCY13390, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z . К реакционной смеси добавляли дополнительное количество Alexa fluor® 488 NHS эфира (2,0 мг, 3,09 мкмоль, 1,5 экв), и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение еще одного часа. Анализ методом HPLC показывал, что BCY13390 полностью прореагировал. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY13583 (5 мг, 0,61 мкмоль, 29% выход, 95% чистота) в виде красного твердого вещества. Рассчитанная

величина MW: 7787,9, наблюдаемые величины m/z: 1948,8 ($[M+4H+H_2O]^{4+}$), 1558,6 ($[M+5H+H_2O]^{5+}$), 1299,1 ($[M+7H+H_2O]^{7+}$).

Пример 5. Синтез BCY13628



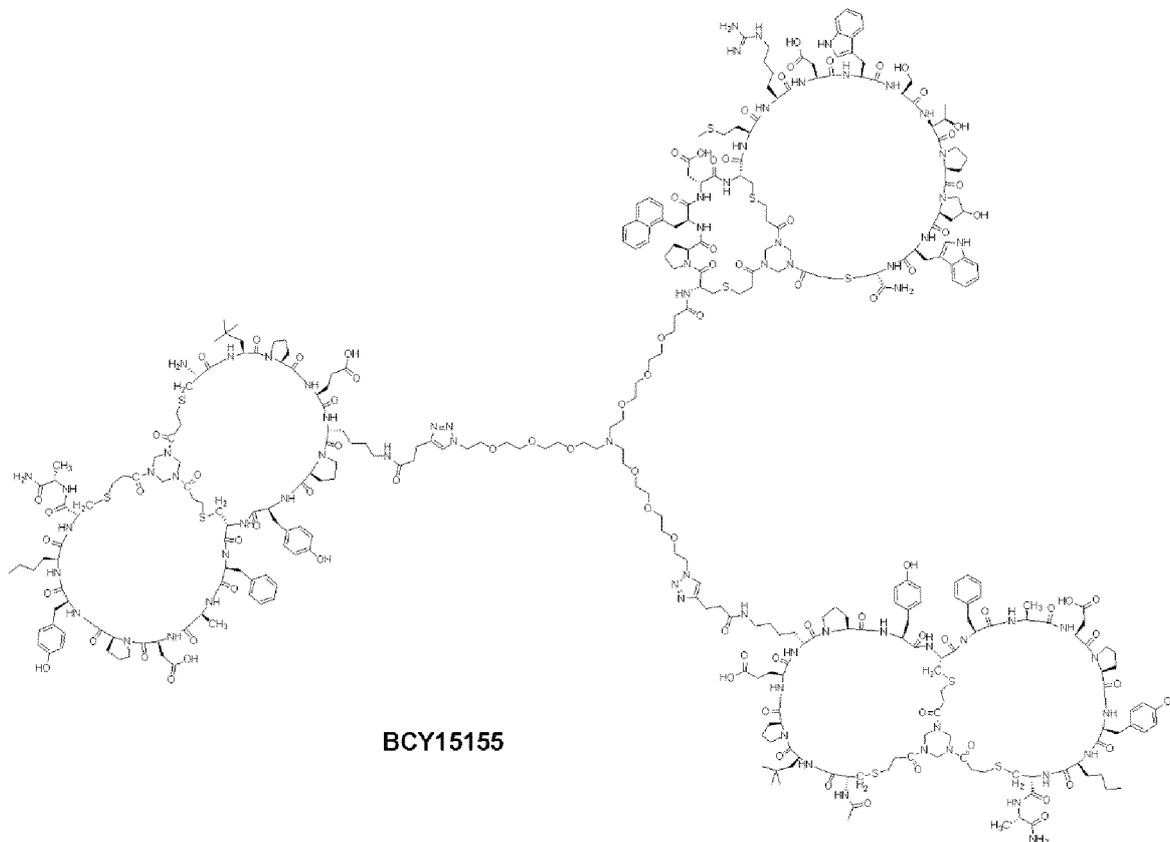
Методика получения BCY13628



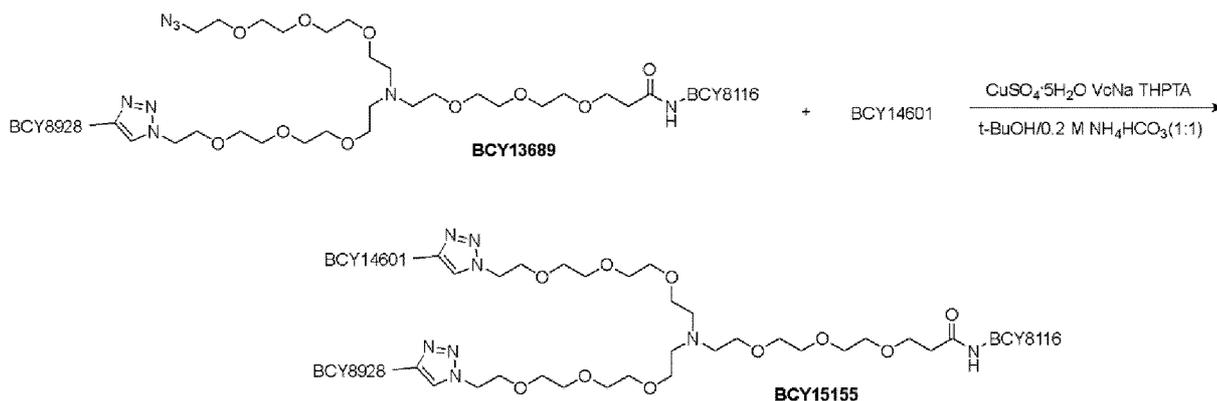
Смесь BCY13390 (5,6 мг, 0,77 мкмоль, 1,0 экв) и цианина 5 NHS эфира (0,5 мг, 0,85 мкмоль, 1,1 экв) растворяли в MeCN/H₂O (1:1, 2 мл). Величину pH этого раствора довели до 8 путем добавления по каплям 1,0 М NaHCO₃. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что BCY13390 полностью прореагировал и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном

давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY13628 (2,9 мг, 0,36 мкмоль, 46% выход, 95% чистота) в виде голубого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7736,06, наблюдаемые величины m/z: 1289,9 ($[M+6H]^{6+}$), 1105,5 ($[M+7H]^{7+}$).

Пример 6. Синтез BCY15155



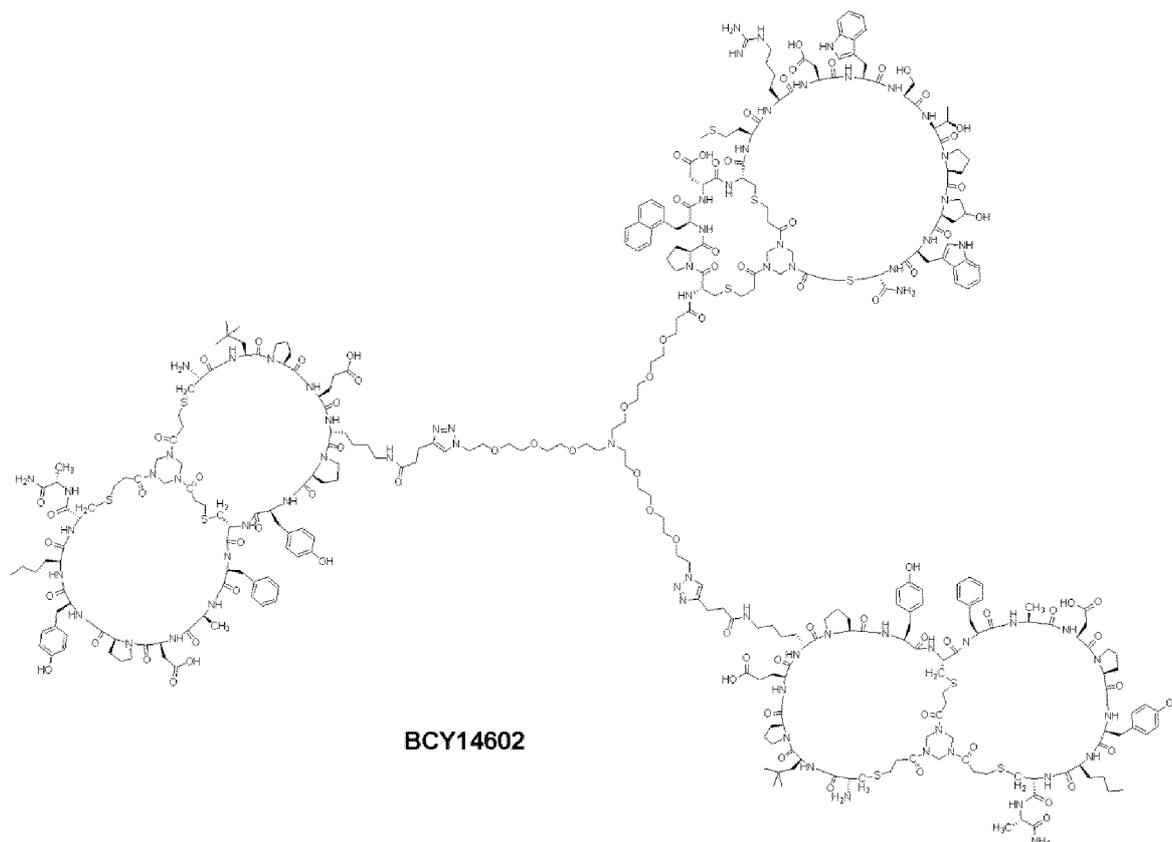
Методика получения BCY15155



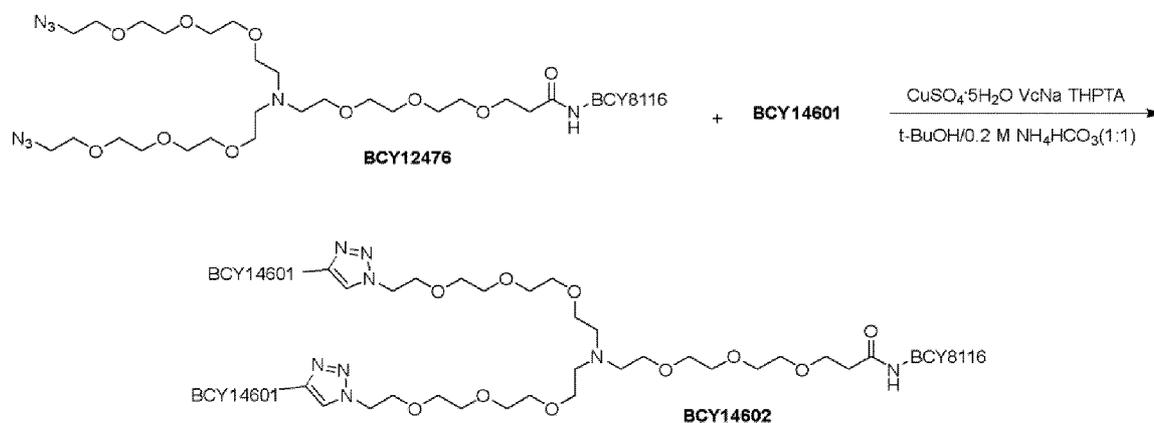
Смесь BCY13689 (25,0 мг, 5,00 мкмоль, 1,0 экв), BCY14601 (13,0 мг, 6,01 мкмоль, 1,2 экв) и THPTA (2,0 мг, 5,00 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в смеси *t*-BuOH/0,2 М NH₄HCO₃ (1:1, 0,5 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 12,5 мкл, 1,0 экв) и Vc (3,5 мг, 20,02 мкмоль, 4,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8, и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. Анализ

методом LC-MS показывал, что BCY13689 полностью прореагировал, оставалось некоторое количество BCY14601, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z . Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY15155 (19,7 мг, 2,41 мкмоль, 36% выход, 97% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7171,3, наблюдаемые величины m/z : 1434,7 ($[M+5H]^{5+}$), 1196,2 ($[M+6H]^{6+}$).

Пример 7. Синтез BCY14602



Методика получения BCY14602



Смесь BCY12476 (100,0 мг, 36,00 мкмоль, 1,0 экв), BCY14601 (158,0 мг, 72,63 мкмоль, 2,04 экв) и THPTA (15,6 мг, 36,00 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в смеси *t*-BuOH/0,2

M NH₄HCO₃ (1:1, 2 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 M, 89,0 мкл, 1,0 экв) и VcNa (28,5 мг, 143,98 мкмоль, 4,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8, и раствор приобретал желтый цвет. Еще раз два раза добавляли THPTA и VcNa, и общий раствор перемешивали при 25°C в течение 48 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что BCY12476 полностью прореагировал, BCY14601 оставался, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Было также обнаружено некоторое количество побочного продукта. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY14602 (45,2 мг, 5,51 мкмоль, 15% выход, 86% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7129,2, наблюдаемые величины m/z: 1426,6 ([M+5H]⁵⁺), 1189,1([M+6H]⁶⁺).

ДАННЫЕ АНАЛИЗА

Проводили анализ следующих гетеротандемных бициклических пептидных комплексов по изобретению методами масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Анализы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии проводили при указанных ниже условиях:

Подвижная фаза: А: 0,1%TFA in H₂O В: 0,1%TFA in ACN

Расход: 1,0 мл/мин

Колонка: Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 мм x 4,6 мм

Прибор: Agilent 1200 HPLC-VE(1-614)

Использовали градиенты 30-60% В в течение 20 минут, и были получены следующие данные:

№ комплекса	Данные анализа методом масс-спектрологии	Время удерживания (мин) методом HPLC
BCY11863	рассчитанная величина MW: 7213,32, наблюдаемая величина m/z: 1444,0 ([M/5+H] ⁺)	10,649

ДАННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

1. Репортерный анализ на CD137 в совместной культуре с опухолевыми клетками

Культуральную среду, называемую средой R1, готовят путем добавления 1% FBS к RPMI-1640 (компонент набора Promega CS196005). Серийные разведения испытуемых образцов в R1 готовят в стерильном 96-луночном планшете. Добавляют 25 мкл на лунку исследуемых образцов или R1 (в качестве фонового контроля) в указанные лунки в планшете белого цвета для культивирования клеток. Опухолевые клетки* собирают и ресуспендируют в среде R1 при концентрации 400000 клеток/мл. Двадцать пять (25) мкл/лунка опухолевых клеток добавляют в планшет белого цвета для культивирования клеток. Клетки Jurkat (набор Promega CS196005, 0,5 мл) размораживают на водяной бане и

затем добавляют к 5 мл предварительно подогретой среды R1. Двадцать пять (25) мкл/лунка клеток Jurkat затем добавляют в планшет белого цвета для культивирования клеток. Инкубируют клетки и испытуемые образцы в течение 6 часов при 37°C, 5% CO₂. По истечении 6 часов, добавляют 75 мкл/лунка реагента Bio-Glo™ (Promega) и инкубируют в течение 10 мин, затем считывают люминесценцию на планшет-ридере (Clariostar, BMG). Рассчитывают кратность изменения по отношению к взятым отдельно клеткам (клетки Jurkat+клеточная линия, используемая при совместном культивировании) и строят графическую зависимость ответа от логарифма концентрации (агониста) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism для определения величины EC₅₀ (нМ) и кратности индукции относительно фона (Max).

Опухолевые клетки, используемые в совместной культуре, представляют собой NCI-H292, СТ26 #7, МС38 #13, НТ1376, NCI-H322 и Т47D, которые, как было показано, экспрессируют нектин-4.

Данные, представленные на фигуре 1А, показывают, что гетеротандем нектин-4/CD137 (BCY11863) индуцирует сильную активацию CD137 в репортерном анализе на CD137, и активация зависит от связывания гетеротандема с CD137. BCY11617, молекула, в которой CD137 бициклический пептид состоит полностью из D-аминокислот, которые предотвращают связывание, не индуцирует агонизма CD137.

Данные по величине EC₅₀ (нМ), индуцируемой гетеротандемным бициклическим пептидным комплексом BCY11863 и его наиболее близкими аналогами, полученные при репортерном анализе на CD137 в совместной культуре с нектин-4-экспрессирующей линией опухолевых клеток, приведены в таблице 1 ниже и представлены на фигуре 1В. Эти данные демонстрируют способность BCY11863 индуцировать агонизм CD137 в совместной культуре с клеточными линиями, которые экспрессируют в различной степени нектин-4.

Таблица 1. Величина EC₅₀ (нМ) кратности индукции относительно фона, вызываемой нектин-4/CD137 гетеротандемными бициклическими пептидными комплексами в репортерном анализе на CD137

№ комплекса	Линия опухолевых клеток представителя биологического вид	Линия клеток, используемая в совместной культуре	Средняя арифметическая величина EC ₅₀ (нМ)
BCY11863	мышь	СТ26#7	0,14±0,07
BCY11863	мышь	МС38#13	0,31±0,26
BCY11863	человек	NCI-H292	0,28±0,20
BCY11863	человек	НТ1376	0,52±0,30
BCY11863	человек	NCI-H322	0,33±0,21
BCY11863	человек	Т47D	0,42±0,24

BCY11863	человек	MDA-MB-468	0,23±0,01
BCY13582	человек	HT1376	0,58±0,27
BCY13582	человек	MDA-MB-468	0,34±0,02
BCY13583	человек	HT1376	1,7±0,9
BCY13583	человек	MDA-MB-468	0,84±0,07

2. Анализ в совместной культуре мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC)-опухолевые клетки (анализ высвобождения цитокинов)

Опухолевые линии клеток человека и мышцы культивировали в соответствии с рекомендациями фирм-поставщиков. Замороженные PBMC здоровых людей-доноров оттаивали и промывали один раз в PBS при комнатной температуре, а затем ресуспендировали в среде R10. Для анализа совместной культуры, высевали 100 мкл PBMC (1000000 PBMC/мл) и 100 мкл опухолевых клеток (100000 опухолевых клеток/мл) (соотношение эффектор:клетки-мишени (Э:Т) 10:1) в каждую лунку 96-луночного планшета с плоским дном. 100 нг/мл растворимого моноклонального антитела (mAb) против CD3 (клон ОКТ3) добавляли в культуру в день 0 для стимуляции PBMC человека. Испытуемые соединения, контрольные соединения или контрольные среды (плацебо) разводили в среде R10 и добавляли по 50 мкл в соответствующие лунки с доведением конечного объема лунки до 250 мкл. Планшеты накрывали воздухопроницаемой пленкой и инкубировали во влажной камере при 37°C с 5% CO₂ в течение трех дней. Через 48 часов после стимуляции, собирали надосадочные жидкости и определяли в них IL-2 и IFN-γ человека с помощью анализатора Luminescence. Вкратце, стандарты и образцы добавляли в 96-луночный планшет черного цвета. Добавляли и встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре коктейль из микрочастиц (предоставляется в комплекте Luminescence, R&D Systems). Планшет промывали 3 раза с использованием магнитного держателя. Затем в планшет добавляли коктейль с биотином и встряхивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет промывали 3 раза с использованием магнитного держателя. Добавляли в планшет коктейль из стрептавидина и встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза с использованием магнитного держателя, ресуспендировали в 100 мкл промывочного буфера, встряхивали в течение 2 минут при комнатной температуре и считывали с помощью анализатора Luminescence 2000. Проводили анализ полученных исходных данных с использованием встроенного программного обеспечения Luminescence для построения стандартных кривых и интерполяции концентраций белка, все остальные анализы данных и построение графиков проводили с использованием программного обеспечения Excel и Prism. Данные относятся к одному исследованию с 3-5 независимыми донорскими PBMC, подвергнутых испытанию в трех параллельных экспериментах.

Данные, представленные на фигурах 2А и 2В, показывают, что нектин-4/CD137 гетеротандем (BCY11863) индуцирует устойчивую секрецию цитокинов IL-2 и IFN-γ при

анализе в совместной культуре РВМС-4Т1. ВСУ11617 используют в качестве отрицательного контроля, который связывает нектин-4, но не связывает CD137.

Данные по величине EC_{50} (нМ) и максимальной секреции цитокина IFN- γ (пг/мл), индуцированной выбранными нектин-4/CD137 гетеротандемными бициклическими пептидными комплексами в анализе совместной культуре РВМС человека (высвобождение цитокина), приведены в таблице 2 ниже и изображены на фигуре 2С. Они демонстрируют способность ВСУ11863 индуцировать секрецию цитокина в присутствии ряда различных линий опухолевых клеток, экспрессирующих нектин-4.

Таблица 2. Величина EC_{50} при секреции цитокина IFN- γ , индуцированной выбранными нектин-4/CD137 гетеротандемными бициклическими пептидными комплексами при анализе в совместной культуре РВМС человека-4Т1 (высвобождение цитокина)

Клеточная линия	IL-2 (нМ)	IFN- γ (нМ)	Число доноров
МС38 # 13 (мыши)	0,25±0,08	0,17±0,11	4
4Т1-D02 (мыши)	0,16±0,22	0,04±0,04	4
НТ1376 (человека)	0,39±0,29	0,23±0,15	5
Т-47D (человека)	0,20±0,07	0,08±0,06	3
Н322 (человека)	0,84±0,15	0,85±0,66	3
ВСУ11863	4Т1- парентерально (нектин4-)	Отсутствие индуцирования вплоть до 100 нМ	

3. Исследование фармакокинетики нектин-4/CD137 гетеротандема ВСУ11863 на крысах SD

Самцам крыс SD вводили нектин-4/CD137 гетеротандем ВСУ11863, приготовленный в 25 мМ гистидина HCl, 10% сахарозы, pH 7, путем внутривенного струйного введения, внутривенного капельного введения (15 минут) или подкожно. Проводили последовательный отбор крови (приблизительно 80 мкл крови/момент времени) из подчелюстной или подкожной вены в каждый момент времени. Все образцы крови незамедлительно переносили в предварительно охлажденные микроцентрифужные пробирки, содержащие 2 мкл K2-EDTA (0,5М) в качестве антикоагулянта, и помещали на натуральный лед. Образцы крови незамедлительно подвергали обработки с получением плазмы путем центрифугирования при приблизительно 4°C при 3000 g. В плазму быстро добавляли осадитель, содержащий внутренний стандарт, хорошо смешивали и центрифугировали при 12000 об/мин, при 4°C в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переносили в предварительно маркированные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки, и затем быстро замораживали на сухом льду. Образцы хранили при -70°C или ниже в необходимом количестве до проведения анализа. Образцы

надосадочной жидкости объемом 7,5 мкл непосредственно вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце. Проводили анализ зависимости концентрации в плазме от времени в соответствии с некомпаратментными методиками, используя программное обеспечение Phoenix WinNonlin 6.3. Регистрировали C_0 , Cl , V_{dss} , $T_{1/2}$, $AUC(0-last)$, $AUC(0-inf)$, $MRT(0-last)$, $MRT(0-inf)$ и строили кривые зависимости концентрации в плазме от времени. Фармакокинетические параметры, полученные в этом эксперименте, приведены в таблице 3.

Таблица 3. Фармакокинетические параметры на крысах SD

Соединение	Доза (мг/кг)	Способ дозирования	$T_{1/2}$ (ч)	V_{dss} (л/кг)	Cl_p (мл/мин/кг)	% F
BCY11863	1,9	внутривенный болюс	4,1	1,6	7,7	-
	3,2	внутривенная инфузия (15 минут)	3,1	1,3	9,3	-
	6,3	подкожно	2,5	-	-	95%

Данные в таблице 3 выше и на фигуре 5 показывают, что BCY11863 представляет собой молекулу с низким клиренсом с объемом распределения большим, чем объем плазмы. Кроме того, биодоступность при подкожном дозировании BCY11863 является высокой у крыс.

Таблица 4. Фармакокинетические параметры BCY11863 и возможных метаболитов, полученные при фармакокинетическом исследовании на крысах SD после внутривенного введения дозы 100 мг/кг

Анализируемые вещества	C_{max} (нг/мл)	AUC (нг.ч/мл)	$T_{1/2}$ (ч)	V_{dss} (л/кг)	Cl_p (мл/мин/кг)
BCY11863	279540	129863	5,4	2,3	13
BCY15155	2854	1296	3,1	-	-
BCY14602	-	-	-	-	-

Данные в таблице 4 и на фигуре 14 показывают, что < 1% BCY11863 метаболизируется в BCY15155 при внутривенном введении BCY11863 крысам SD. Не отмечается значимого превращения в BCY14602 в течение первых 24 часов исследования.

4. Исследование фармакокинетики нектин-4/CD137 гетеротандема BCY11863 на яванских макаках

Ненаивным яванским макакам вводили путем внутривенной инфузии (15 или 30 мин) в подкожную вену 1 мг/кг нектин-4/CD137 гетеротандема BCY11863, приготовленный в 25 мМ гистидина HCl, 10% сахарозы, рН 7. Проводили

последовательный отбор крови (приблизительно 1,2 мл крови/момент времени) из периферического кровеносного сосуда обездвиженных, не подвергнутых воздействию седативных средств животных, в каждый момент времени в выпускаемые промышленностью пробирки, содержащие соль калий (K2) EDTA*2H₂O (0,85-1,15 мг), на натуральном льду и подвергали обработке с целью получения плазмы. Образцы центрифугировали (3000 x g в течение 10 минут при температуре от 2 до 8°C) сразу после отбора образцов. Плазму в объеме 0,1 мл переносили в маркированные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки. В плазму быстро добавляли 5-кратное количество осадителя, включающего внутренний стандарт 100 нг/мл лабеталол+100 нг/мл дексаметазон+100 нг/мл толбутамид+100 нг/мл верапамил+100 нг/мл глибурид+100 нг/мл целекоксиб в растворе плазмы в MeOH, хорошо смешивали и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 минут при температуре от 2 до 8°C. Образцы надосадочной жидкости переносили в предварительно маркированные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки и замораживали на сухом льду. Образцы хранили при -60°C или ниже до проведения анализа методом LC-MS/MS. Аликвоту 40 мкл калибровочного стандарта, контроля качества, одиночного холостого и двойного холостого образцов добавляли в пробирку объемом 1,5 мл. Каждый образец (за исключением двойного холостого) гасили с помощью 200 мкл IS1, соответственно (двойной холостой образец гасили с помощью 200 мкл MeOH с 0,5% triton X-100), и затем смесь хорошо смешивали с помощью смесителя Vortex (по меньшей мере, 15 секунд) и центрифугировали в течение 15 минут при 12000 g при 4°C. Образцы надосадочной жидкости объемом 10 мкл вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце. Проводили анализ зависимости концентрации в плазме от времени в соответствии с некомпартментными методиками, используя программное обеспечение Phoenix WinNonlin 6.3. Регистрировали C₀, C₁, V_{dss}, T_{1/2}, AUC(0-last), AUC(0-inf), MRT(0-last), MRT(0-inf) и кривые зависимости концентрации в плазме от времени. Фармакокинетические параметры для двух биспецифичных соединений приведены в таблице 5.

Таблица 5. Фармакокинетические параметры на яванском макаке

Соединение	Dose (мг/кг)	Способ дозирования	T _{1/2} (ч)	Cl _p (мл/мин/кг)	V _{dss} (л/кг)
BCY11863	0,93	внутривенная инфузия (30 мин)	5,3	3,3	0,62
	0,97	внутривенная инфузия (15 мин)	4,5	4,8	0,91

	9,4	внутривенная инфузия (15 мин)	8,9	3,9	1,1
--	-----	-------------------------------------	-----	-----	-----

На фигуре 3 приведена кривая зависимости концентрации в плазме от времени для ВСУ11863 после внутривенного введения 2 мг/кг крысам SD (n=3) и внутривенной инфузии 1 мг/кг IV яванским макакам (n=2). ВСУ11863 имеет объем распределения в равновесном состоянии (V_{dss}) 1,6 л/кг и клиренс 7,7 мл/мин/кг у крыс, что дает в результате конечный период полувыведения 4,1 часа. ВСУ11863 имеет объем распределения в равновесном состоянии (V_{dss}) 0,62 л/кг и клиренс 3,3 мл/мин/кг у яванских макаков, что дает в результате конечный период полувыведения 5,3 часа. Последующие исследования находятся в соответствии с этими результатами. Фармакокинетические параметры, полученные на яванских макаках при внутривенном введении, указывают, что ВСУ11863 представляет собой молекулу с плазменным клиренсом с объемом распределения, аналогичным общего количества воды в организме.

5. Исследование фармакокинетики нектин-4/CD137 гетеротандема ВСУ11863 на мышцах CD1

Шести самцам мышей CD-1 вводили каждому интраперитонеально или внутривенно 15 мг/кг нектин-4/CD137 гетеротандема ВСУ11863, приготовленного в 25 мМ гистидина HCl, 10% сахарозы, pH 7. Проводили последовательный отбор крови (приблизительно 80 мкл крови/ момент времени) из подчелюстной или подкожной вены в каждый момент времени. Все образцы крови незамедлительно переносили в предварительно охлажденные микроцентрифужные пробирки, содержащие 2 мкл K₂-EDTA (0,5M) в качестве антикоагулянта, и помещали на натуральный лед. Образцы крови незамедлительно подвергали обработки с получением плазмы путем центрифугирования при приблизительно 4°C при 3000 g. В плазму быстро добавляли осадитель, содержащий внутренний стандарт, хорошо смешивали и центрифугировали при 12000 об/мин, при 4°C в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переносили в предварительно маркированные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки, и затем быстро замораживали на сухом льду. Образцы хранили при -70°C или ниже в необходимом количестве до проведения анализа. Образцы надосадочной жидкости объемом 7,5 мкл непосредственно вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце. Проводили анализ зависимости концентрации в плазме от времени в соответствии с некомпартментными методиками, используя программное обеспечение Phoenix WinNonlin 6.3. Регистрировали C₀, C₁, V_{dss} , T_{1/2}, AUC(0-last), AUC(0-inf), MRT(0-last), MRT(0-inf) и строили кривые зависимости концентрации в плазме от времени.

На фигуре 9 представлены кривые зависимости концентрации в плазме от времени для ВСУ11863 при интраперитонеальном введении 15 мг/кг мышам CD1 (n =3) и конечные периоды полувыведения из плазмы крови для ВСУ11863.

Таблица 6. Фармакокинетические параметры на мышах CD-1

Соединение	Доза (мг/кг)	Способ дозирования	T1/2 (ч)	Vdss (л/кг)	Clp (мл/мин/кг)	% F
ВСУ11863	5,6	внутривенный болюс	2,6	1,6	9,7	
	0,96	внутривенный болюс	1,7	2,9	21	
	12	внутривенный болюс	2,6	2,5	17	
	32	внутривенный болюс	2,4	2,1	16	
	15,5	интраперитонеально	2,5	-	-	100

Данные на фигуре 9 и в таблице 6 выше показывают, что ВСУ11863 может быть введен мышам в форме внутривенного болюса и интраперитонеально. Биодоступность при интраперитонеальном дозировании ВСУ11863 является высокой у мышей. Фармакокинетические параметры, полученные при исследовании внутривенного введения, указывают, что ВСУ11863 представляет собой молекулу с низким клиренсом с объемом распределения большим, чем объем плазмы.

6. Противоопухолевая активность ВСУ11863 в модели сингенной опухоли МС38 (МС38#13), сверхэкспрессирующей нектин-4

Самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 в возрасте 6-8 недель инокулировали в бок 1×10^6 сингенных клеток МС38 (МС38#13), сверхэкспрессирующих нектин-4. Когда опухоли достигали среднего размера 72 мм^3 , мышей рандомизировали для введения среды (плацебо) или ВСУ11863 (путем интраперитонеального введения). ВСУ11863 вводили (n=6 мышей/подвергаемая лечению группа) в дозе либо 1 мг/кг, либо 10 мг/кг, или ежедневно (QD), или один раз каждые три дня (Q3D). Дозируемые ежедневно мыши получали 16 доз ВСУ11863, а дозируемые один раз каждые три дня мыши получали 10 доз ВСУ11863. Рост опухоли постоянно контролировали путем проведения измерений с помощью штангенциркуля вплоть до дня 69 после начала лечения. Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 4, на которой видно статистически значимое уменьшение ($p < 0,05$, двухфакторный дисперсионный анализ с критерием Даннета для множественных сравнений) роста опухоли в двух подвергаемых лечению группах 2 ко дню 7, и ко дню 14 все подвергаемые лечению группы статистически значимо отличались от группы с плацебо (в которой вводили среду). Ко дню 48, 22 из 24 подвергнутых

лечению с помощью ВСУ11863 животных демонстрировали полный ответ на лечение и не имели оставшихся пальпируемых опухолей.

Исходя из периода полувыведения циркулирующего в плазме ВСУ11863 у мышей после интраперитонеальной инъекции (2,5 часа), минимальные уровни в плазме будут близки к 0 после обеих доз ВСУ11863 (1 и 10 мг/кг) и интервалов дозирования (QD и Q3D), тем самым демонстрируя, что не являющееся постоянным содержание в плазме ВСУ11863 в результате интермиттирующего дозирования является достаточным для достижения значительной противоопухолевой активности, приводящей к длительным полным ответам.

7. Лечение с помощью ВСУ11863 вызывает иммунологическую память в модели опухоли МС38, сверхэкспрессирующей нектин-4

На день 69, 5 животным, которые имели полные ответы на лечение с помощью ВСУ11863, повторно инокулировали 1×10^6 клеток МС38#13. Группе из 5 наивных самок мышей линии С57BL/6J-hCD137 инокулировали 1×10^6 клеток МС38#13 в качестве контроля. Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 5, на которой видно, что у всех 5 инокулированных наивных самок мышей линии С57BL/6J-hCD137 выросли опухоли ко дню 13 после инокуляции, в то время как ни у одной из инокулированных мышей с полным ответом опухоли не развивались. Это показывает, что животные, которые достигали полного противоопухолевого ответа в результате лечения с помощью ВСУ11863, имеют развитую иммунологическую память.

8. ВСУ11863 демонстрирует противоопухолевую активность в модели сингенной опухоли СТ26 (СТ26#7), сверхэкспрессирующей нектин-4

Самкам мышей линии BALB/c-hCD137 в возрасте 6-8 недель инокулировали в бок 3×10^5 сингенных клеток СТ26 (СТ26#7), сверхэкспрессирующих нектин-4. Когда опухоли достигали среднего размера 70 мм^3 , мышей рандомизировали для введения среды (плацебо) или 5 мг/кг ВСУ11863 интраперитонеально один раз каждые три дня (суммарно 6 доз). Рост опухоли постоянно контролировали путем проведения измерений с помощью штангенциркуля вплоть до дня 14 после начала лечения. Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 6, на которой видно, что лечение с помощью ВСУ11863 статистически значимо ($p < 0,0001$, критерий Стьюдента) уменьшало рост опухоли от дня 7 и далее.

Исходя из периода полувыведения циркулирующего в плазме ВСУ11863 у мышей после интраперитонеальной инъекции (2,5 часа), содержание ВСУ11863 в плазме крови не будет постоянным на протяжении всего периода дозирования, демонстрируя, что не являющееся постоянным содержание в плазме ВСУ11863 является достаточным для достижения значительной противоопухолевой активности.

9. Суммарное количество Т-клеток и CD8+ Т-клеток увеличивается в ткани опухоли СТ26#7 через 1 час после последнего (шестого) Q3D дозирования ВСУ11863

Через 1 час после последнего введения плацебо (среды) или ВСУ11863, несущих опухоли СТ26#7 мышей умерщвляли, и опухоли собирали, обрабатывали с целью

получения суспензий отдельных клеток и окрашивали для анализа методом проточной цитометрии на суммарное количество Т-клеток (CD45+CD3+), CD8+ Т-клеток (CD45+CD3+CD8+), CD4+ Т-клеток (CD45+CD3+CD4+) и регуляторных Т-клеток (регуляторные Т-клетки; CD45+CD3+CD4+Foxp3+). Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 7, на которой можно увидеть, что лечение с помощью BCY11863 приводило к статистически значимому увеличению суммарного количества Т-клеток ($p < 0,0001$, критерий Стьюдента) и CD8+ Т-клеток ($p < 0,0001$, критерий Стьюдента), а также к статистически значимому увеличению отношения CD8+ Т клетки/регуляторные Т-клетки ($p < 0,05$, критерий Стьюдента).

Это показывает, что лечение с помощью BCY11863 может приводить к повышению уровня Т-клеток локально в опухолевой ткани после интермиттирующего дозирования.

10. Фармакокинетические профили BCY11863 в плазме и опухолевой ткани животных, несущих сингенную опухоль CT26#7, после разового внутривенного (iv) введения 5 мг/кг BCY11863

Самкам мышей линии BALB/c в возрасте 6-8 недель инокулировали в бок 3×10^5 сингенных клеток опухоли CT26 (CT26#7), сверхэкспрессирующих нектин-4. Когда опухоли достигали среднего размера приблизительно 400 мм^3 , мышей рандомизировали для введения им разовой внутривенной дозы плацебо (среды) или 5 мг/кг BCY11863. Группу мышей ($n=3$ /момент времени) умерщвляли в моменты времени 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 и 24 часа, и собранную плазму и опухолевую ткань анализировали на BCY11863. Для анализа содержания BCY11863 в опухоли, приготавливали гомогенат опухоли путем гомогенизации ткани опухоли с 10 объемами (масса:объем) гомогенизирующего раствора (MeOH/15 mM PBS (1:2, по объему)). 40 мкл образца гасили с помощью 200 мкл IS1, и смесь перемешивали на вортексе в течение 10 минут при 800 об/мин и центрифугировали в течение 15 минут при 3220 g при 4°C. Надосадочную жидкость переносили в другой чистый 96-луночный планшет и центрифугировали в течение 5 минут при 3220 g при 4°C, и 10,0 мкл надосадочной жидкости вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце. Для анализа содержания BCY11863 в плазме, собирали образцы крови в пробирки с K2-EDTA и незамедлительно подвергали обработки с получением плазмы путем центрифугирования при приблизительно 4°C, 3000 g. 40 мкл образца плазмы гасили с помощью 200 мкл IS1, и смесь перемешивали на вортексе в течение 10 минут при 800 об/мин и центрифугировали в течение 15 минут при 3220 g при 4°C. Надосадочную жидкость переносили в другой чистый 96-луночный планшет и центрифугировали в течение 5 минут при 3220 g при 4°C, и 10,0 мкл надосадочной жидкости затем вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции

положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце.

Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 8, на которой можно увидеть, что BCY11863 удерживался в ткани опухоли после удаления из кровообращения BCY11863, содержащегося в плазме, на что указывает разница величин $T_{1/2}$ плазмы (1,65 часа) и $T_{1/2}$ опухоли (13,4 часа) для BCY11863.

11. Преклиническое исследование связывания BCY11863 с нектин-4 и CD137 у четырех видов животных с перекрестной реактивностью

Связывание BCY11863 с его главной мишенью нектин-4 и CD137 исследовали методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

(a) Нектин-4

BCY11863 связывается с нектин-4 яванского макака, крысы, мыши и человека с величиной K_D в диапазоне 5-27 нМ, измеренной путем прямого связывания с внеклеточным доменом, который был биотинилирован и захвачен стрептавидином на поверхности сенсорного чипа.

Таблица 7. Величины аффинности связывания BCY11863 с биотинилированным - нектин-4 внеклеточным доменом, полученные методом SPR

SPR K_D (нМ)	Тип анализа	Человек (25°C)	Человек (37 °C)	NHP (25°C)	Крыса (25°C)	Мышь (25°C)
BCY11863	Прямое связывание	5,0±2,1 n=7	5,2±1,1 n=9	27±15 n=9	15±1 n=6	4,6±2,1 n=9

Для того чтобы выяснить, изменяется ли связывание BCY11863 с нектин-4 в случае тройного комплекса, то есть, когда также происходит связывание с CD137, был разработан анализ многокомпонентного связывания методом SPR. BCY11863 сначала захватывался CD137 человека, иммобилизованным на поверхности чипа SPR, и затем нектин-4 от различных животных пропускали над поверхностью чипа для определения величин их аффинности к захваченному BCY11863 (смотрите фигуру 10C). Величины аффинностей к нектин-4 обычно сохранялись в присутствии связывания CD137, как показано ниже.

Таблица 8. Величины аффинности связывания BCY11863 с биотинилированным нектин-4 внеклеточным доменом при использовании биотинилированного CD137 человека в качестве реагента захвата

SPR K_D (нМ)	Тип анализа	Человек	NHP	Крыса	Мышь
BCY11863	Сэндвич-анализ	12±2 n=4	28±5 n=3	25±2 n=3	6,7±1,7 n=3

(b) CD137

Прямое связывание BCY11863 с поверхностно связанным CD137 не может быть измерено корректно методом SPR вследствие avidности, обусловленной двумя CD137 связывающими бициклами в BCY11863, что приводит к экстремально медленной K_{off} (смотрите фигуру 10B). Кроме того, биотинилирование CD137 яванского макака аннулирует связывание BCY11863, вероятно, вследствие модификации лизина на белке яванского макака, который является необходимым для BCY11863 связывания. Поэтому, аналог BCY11863, содержащий C-концевой биотинилированный лизин (BCY13582), подвергали анализу методом SPR для определения межвидовой специфичности BCY11863. BCY13582 захватывали на сенсорном чипе, используя набор для обратимого захвата биотина, и определяли величины аффинностей к нектин-4 различных видов животных. Оба подхода показали, что эти аналоги BCY11863 связывались с CD137 человека или яванского макака с величиной $K_D < 10$ нМ и характеризовались пренебрежимо малой величиной связывания как с CD137 мыши, так и с CD137 крысы.

Таблица 9. Величины аффинности связывания биотинилированных аналогов BCY11863 с CD137 внеклеточным доменом, полученные методом SPR

SPR K_D (нМ)	Тип анализа	Человек	NHP	Крыса	Мышь
BCY13582	Прямое связывание	8,4±4,2 n=3	4,23 n=1	NB n=1	NB n=1

Для того чтобы выяснить, изменяется ли связывание BCY11863 с CD137 в случае тройного комплекса, то есть, когда также происходит связывание с нектин-4, был разработан анализ двойного связывания методом SPR. BCY11863 сначала захватывался нектин-4 человека, иммобилизованным на поверхности чипа SPR, и затем растворимый CD137 от различных животных пропускали над поверхностью чипа для определения величин их аффинности к захваченному BCY11863 (смотрите фигуру 10D). Величины аффинностей к CD137 обычно сохранялись в присутствии связывания нектин-4, как показано ниже.

Таблица 10. Величины аффинности связывания с CD137 внеклеточным доменом при использовании биотинилированного нектин-4 человека в качестве реагента захвата

SPR K_D (нМ)	Тип анализа	Человек	NHP	Крыса	Мышь
BCY11863	Двойное связывание	6,3±0,7 n=4	18±6 n=3	NB n=2	NB n=2

На фигуре 10A представлен один пример сенсограммы, которая показывает, что BCY11863 связывается с нектин-4 (человека) с величиной аффинности 4,1 нМ. На фигуре 10B представлена сенсограмма, которая показывает, что BCY11863 связывается с CD137 (человека) с высокой аффинностью. Вследствие присутствия двух CD137 связывающих бициклов в BCY11863, скорость диссоциации иммобилизованного белка CD137 является очень медленной, и приведенная величина K_D может быть завышенной (фигура 10B). На фигуре 10C показано, что BCY11863 связывается с нектин-4, в то время как

CD137 боковые цепи связаны с белком CD137, иммобилизованным на чипе, с образованием тройного комплекса. На фигуре 10D показано, что BCY11863 связывается с CD137, в то время как нектин-4 связывающая боковая цепь связана с белком нектин-4, иммобилизованным на чипе, с образованием тройного комплекса. На фигуре 10E представлена способность BCY13582, иммобилизованного на чипе SPR, связывать CD137 человека.

12. Селективность BCY11863 в отношении нектин-4 и CD137

Скрининг паралога нектин-4. Методом SPR оценивали связывание BCY11863 с нектин-1 (2880-N1, R&D Systems), нектин-2 (2229-N2, R&D Systems), нектин-3 (3064-N3, R&D Systems), нектин-подобным-1 (3678-S4-050, R&D Systems), нектин-подобным-2 (3519-S4-050, R&D Systems), нектин-подобным-3 (4290-S4-050, R&D Systems), нектин-подобным-4 (4164-S4, R&D Systems) и нектин-подобным-5 (2530-CD-050, R&D Systems) путем введения в них метки биотина и иммобилизования их на поверхности стрептавидина. BCY11863 не демонстрировал никакого связывания с этим мишенями вплоть до концентрации 5000 нМ.

Скрининг паралога CD137. Методом SPR оценивали связывание захваченного стрептавидином BCY13582 (биотинилированного-BCY11863) с растворимыми рецепторами OX40 and CD40, являющимися представителями семейства TNF. BCY13582 не связывался с этими мишенями вплоть до концентрации 100 нМ.

Скрининг методом микроматричного анализа фирмы Retrogenix. Технологию микроматричного анализа клеток фирмы Retrogenix использовали для скрининга специфичных нецелевых связывающих взаимодействий биотинилированного BCY11863, известного как BCY13582.

Исследование уровней связывания испытуемого пептида с фиксированными, нетрансфицированными клетками НЕК293 и с клетками, сверхэкспрессирующими нектин-4 и CD137 (TNFRSF9), показало, что для скрининга является достаточной концентрация пептида 1 мкМ. При этих условиях, проводили скрининг испытуемого пептида на связывания с клетками НЕК293 человека, индивидуально экспрессирующими 5484 полноразмерных белков клеточных мембран человека и выделяемых белков. Скрининг выявил 9 первичных попаданий в цель, включающих нектин-4 и CD137.

Каждое первичное попадание в цель повторно экспрессировали, наряду с двумя контрольными рецепторами (TGFB2 and EGFR), и повторно проводили исследование с использованием 1 мкМ испытуемого пептида BCY13582, 1 мкМ испытуемого пептида BCY13582 в присутствии 100 мкМ BCY11863, и других положительных и отрицательных контрольных веществ, вводимых при лечении (фигура 4). После удаления неспецифичных, невоспроизводимых и не незначимых попаданий, оставались три специфичных взаимодействия для испытуемого пептида. Они являлись несвязанными и связанными формами нектин-4 и CD137, представляющими собой основные мишени.

Не были выявлено специфичных нецелевых взаимодействий для BCY13582, что указывало на высокую специфичность в отношении его главных мишеней.

13. Противоопухолевая активность BCY11863 в модели сингенной опухоли MC38 (MC38#13), сверхэкспрессирующей нектин-4, при введении два раза в неделю дозы 5 мг/кг при 0, 24 ч и 10 мг/кг при 0 ч

Самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 [B-hTNFRSF9(CD137); Biocytogen] в возрасте 6-8 недель имплантировали подкожно 1×10^6 клеток MC38#13 (клеток MC38, сконструированных для сверхэкспрессии нектин-4 мышей). Мышей рандомизировали по группам лечения ($n=6$ /группа лечения), когда средние объемы опухолей достигали приблизительно 95 мм^3 , и проводили лечение путем еженедельного дозирования плацебо (25 mM гистидин, 10% сахароза, pH7) или 10 мг/кг BCY11863 при различных режимах дозирования на протяжении двух циклов дозирования (5 мг/кг BCY11863 при 0 ч и 24 ч на день D0 и день D7, или 10 мг/кг при 0 ч на день D0 и день D7). Все лечебные процедуры проводили путем внутривенного введения. Рост опухоли постоянно контролировали вплоть до дня 15 от начала лечения.

BCY11863 приводил к значительной противоопухолевой активности при обоих режимах дозирования, но режим дозирования при дозе 5 мг/кг, вводимой в моменты времени 0 ч и 24 ч, был более предпочтительным по сравнению с дозированием 10 мг/кг в момент времени 0 ч, что обнаруживалось при анализе достижения полных ответов на день 15 после начала лечения (фигура 12). Введение дозы 5 мг/кг BCY11863 в моменты времени 0 ч и 24 ч на день D0 и D7 давало в результате 4 полных ответов из 6 ответов, в то время как введение дозы 10 мг/кг BCY11863 в момент времени 0 ч на день D0 и D7 давало один полный ответ из 6 ответов. Эти данные вместе с фармакокинетическими данными для BCY11863 в плазме мышей указывают, что поддержание концентрации BCY11863 в плазме крови на уровне, который продуцируется в результате введения 5 мг/кг в момент времени 0 ч и момент времени 24 ч при еженедельном цикле, позволяет достигать ответа, близкого к полному противоопухолевому ответу, в модели опухоли MC38#13.

14. Противоопухолевая активность BCY11863 в модели сингенной опухоли MC38 (MC38#13), сверхэкспрессирующей нектин-4

Для проведения лечения при 3 еженедельных дозах 3, 10 и 30 мг/кг при дозах, разделенных на дозирование один раз в неделю, два раза в неделю и один раз в день, самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 [B-hTNFRSF9(CD137); Biocytogen] в возрасте 6-8 недель имплантировали подкожно 1×10^6 клеток MC38#13 (клеток MC38, сконструированных для сверхэкспрессии нектин-4 мышей). Мышей рандомизировали по группам лечения ($n=6$ /группа лечения), когда средние объемы опухолей достигали приблизительно 107 мм^3 , и подвергали лечению путем введения 21 ежедневных доз плацебо (25 mM гистидина, 10% сахарозы, pH7). Лечение с помощью BCY11863 проводили при трех различных уровнях доз (3, 10 и 30 мг/кг суммарная еженедельная доза), разделенных на три различных режима (QD: один раз в сутки; BIW: два раза в неделю или QW: один раз в неделю). Различные группы лечения с помощью BCY11863 получали либо 21 ежедневную дозу (0,43, 1,4 или 4,3 мг/кг), 6 доз два раза в неделю (1,5, 5

или 15 мг/кг), либо 3 еженедельных дозы (3, 10 или 30 мг/кг). Все лечебные процедуры проводили путем внутривенного введения. Рост опухолей постоянно контролировали до достижения их объемов выше 2000 мм³ или вплоть до дня 31 после начала лечения. Продолжали наблюдения за животными с полными ответами (животными с не пальпируемыми опухолями) до дня D52.

BCY11863 приводит к значительной противоопухолевой активности при многих режимах дозирования, при этом режим дозирования два раза в неделю (BIW) является самым эффективным режимом, в частности дозирование 5 мг/кг два раза в неделю. Это демонстрируется числом животных с полным ответом на день 52. На день 52 после начала лечения, у 15 из 18 мышей, подвергнутых лечению с помощью BCY11863 путем введения два раза в неделю, обнаруживали полные ответы, у 12 из 18 мышей, подвергнутых лечению с помощью BCY11863 путем введения один раз в сутки, обнаруживали полные ответы, и у 6 из 18 мышей, подвергнутых лечению с помощью BCY11863 путем введения один раз в неделю, обнаруживали полные ответы. Дозирование 5 мг/кг два раза в неделю приводило к 100% полных ответов при 6 полных ответов из 6 (фигура 13). Эти данные вместе с фармакокинетическими данными для BCY11863 в плазме мышей указывают, что для противоопухолевого ответа на воздействие BCY11863 в модели опухоли MC38#13 не требуется постоянного присутствия BCY11863 в плазме крови.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, включающий:

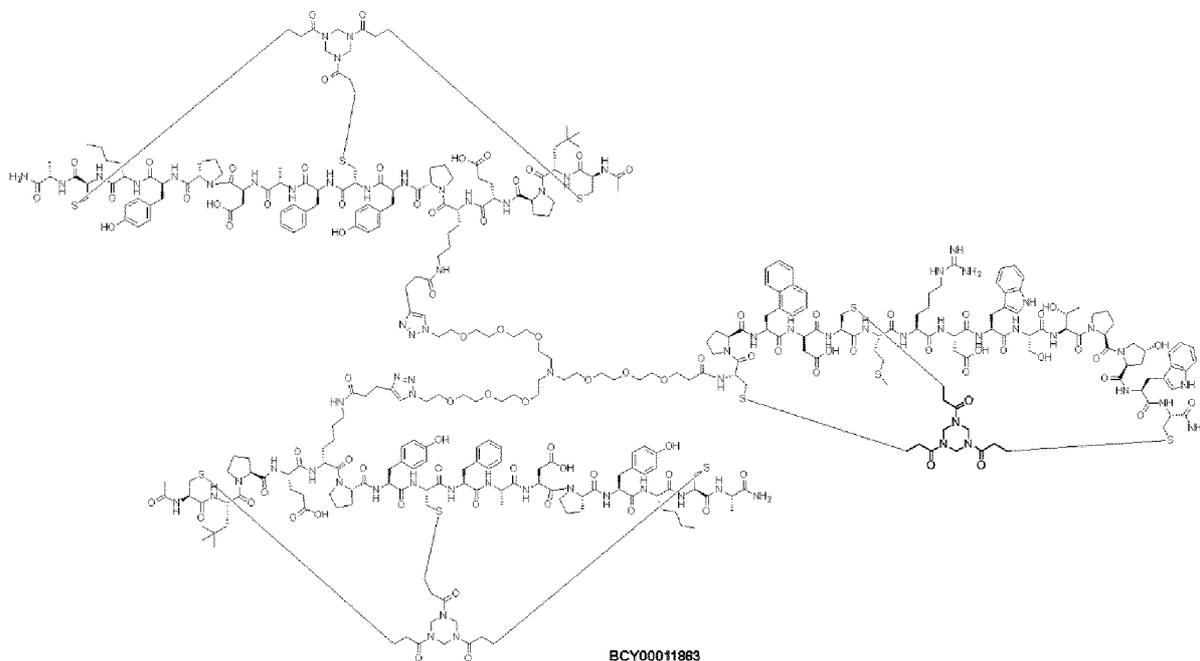
(а) первый пептидный лиганд, который связывается с нектин-4 и который имеет последовательность $C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[NArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 1; ВСУ8116), конъюгированный через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид) с

(б) вторыми пептидными лигандами, которые связываются с CD137, оба из которых имеют последовательность $Ac-C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A$ (SEQ ID NO: 2; ВСУ8928),

где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий три реакционно-способные цистеиновые группы (C_i , C_{ii} и C_{iii}), разделенных двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) и который образует ковалентные связи с реакционно-способными цистеиновыми группами полипептида, вследствие чего на молекулярном каркасе образуются две полипептидных петли;

где Ac представляет ацетил, NArg представляет гомоаргинин, HyP представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, 1Nal представляет 1-нафтилаланин, tBuAla представляет третбутил-аланин, PYA представляет 4-пентиноую кислоту и Nle представляет норлейцин.

2. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 1, который представляет собой ВСУ11863:



3. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 1 или 2, где фармацевтически приемлемую соль выбирают из свободной кислоты или натриевой, калиевой, кальциевой, аммонийной соли.

4. Фармацевтическая композиция, которая включает гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-3 в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

5. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-3 для применения с целью предотвращения, подавления или лечения рака.

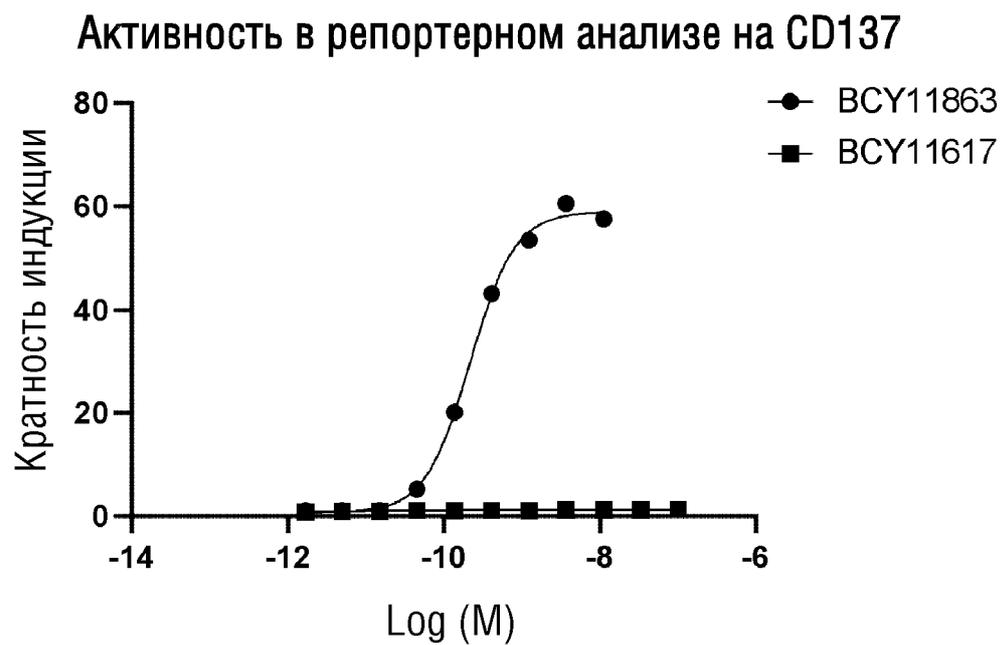
6. Способ лечения рака, который включает введение гетеротандемного бициклического пептидного комплекса по любому одному из пп. 1-3 при частоте дозирования, при которой не поддерживаются концентрации указанного комплекса в плазме выше величины *in vitro* EC₅₀ для указанного комплекса.

По доверенности

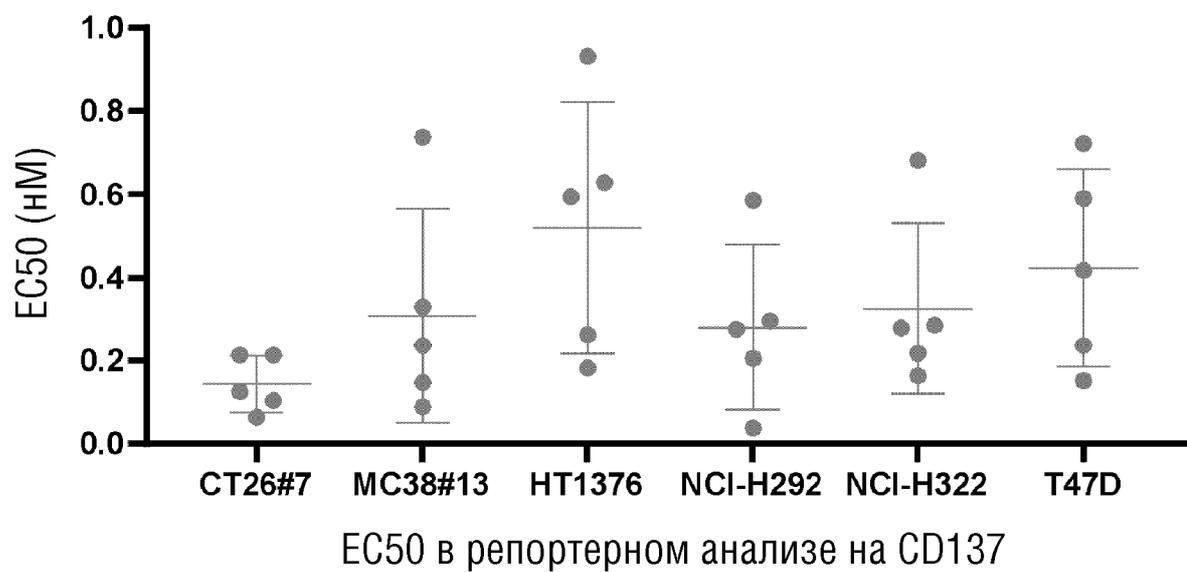
1/13

ФИГ.1

А

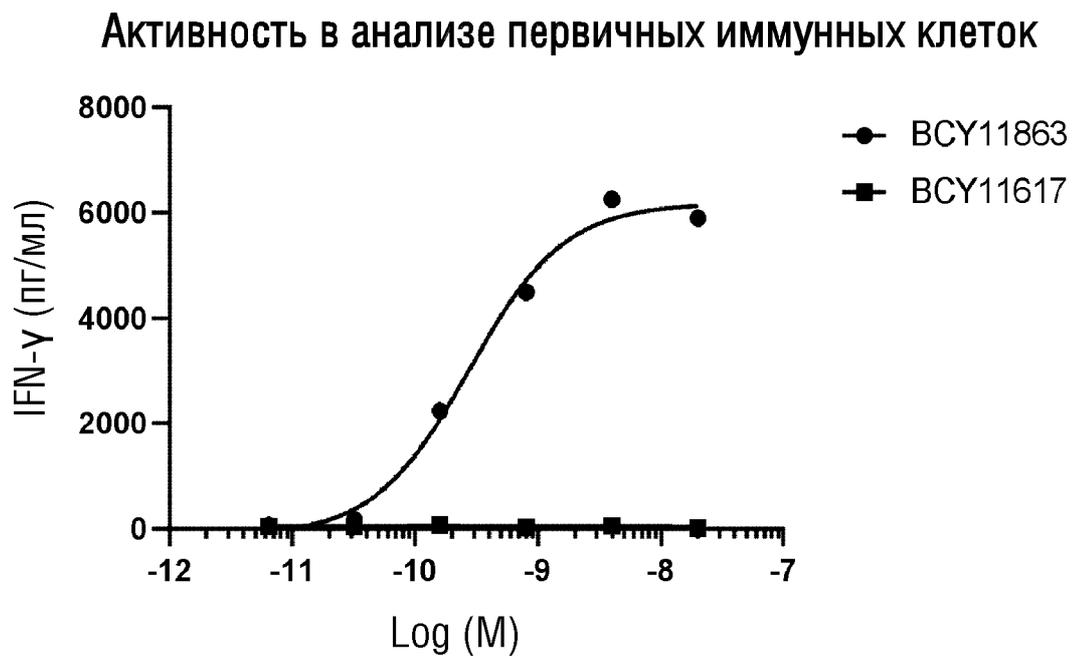


В

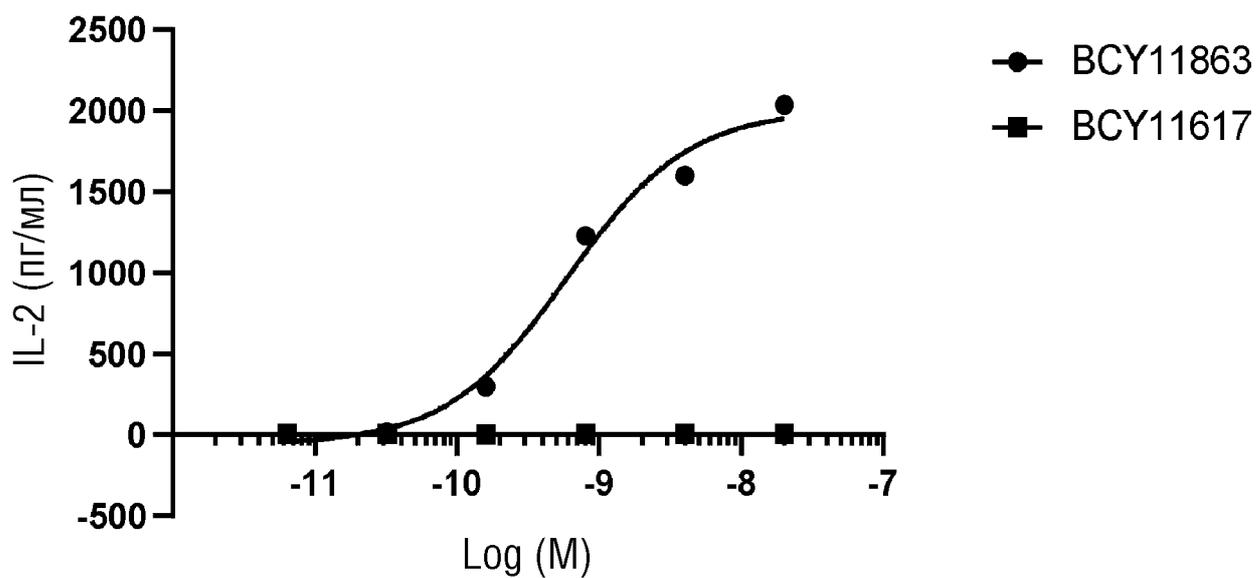


ФИГ. 2

А

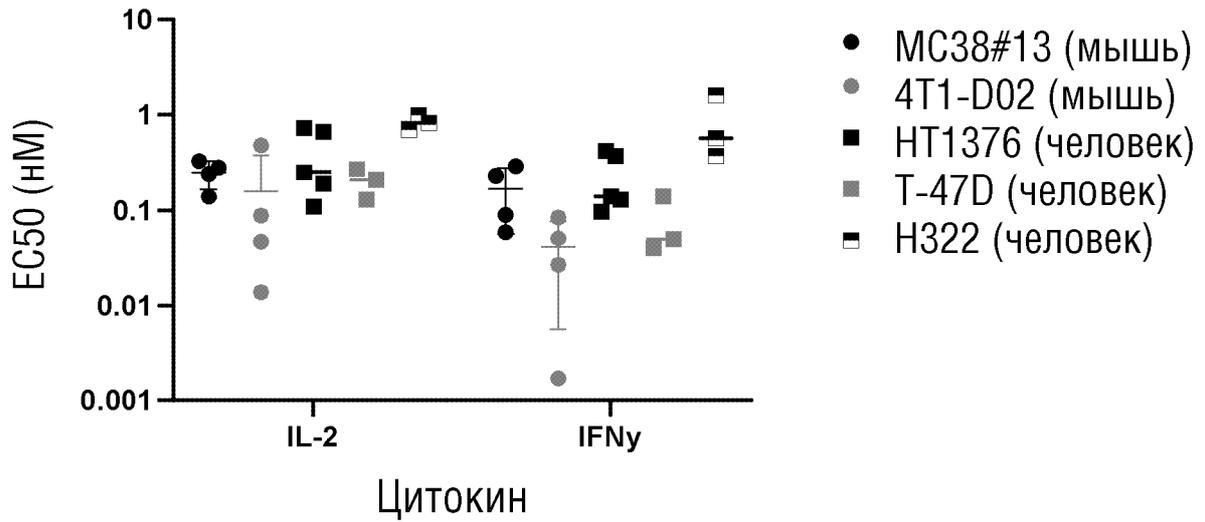


В

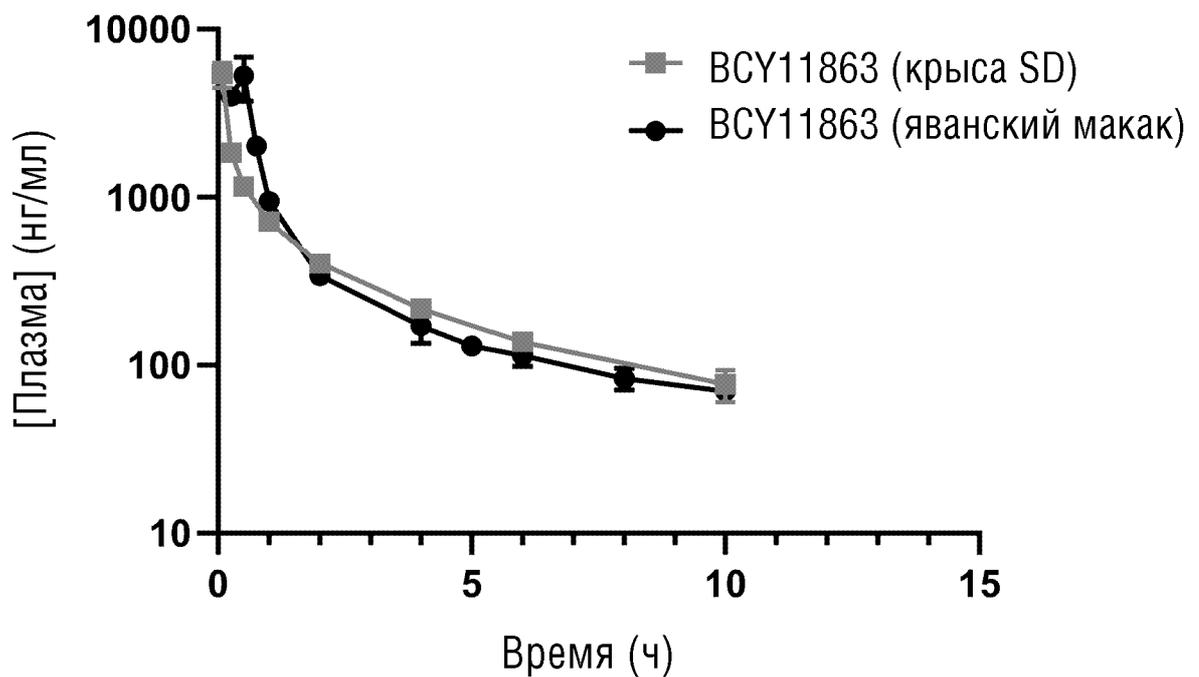


ФИГ.2 (продолжение)

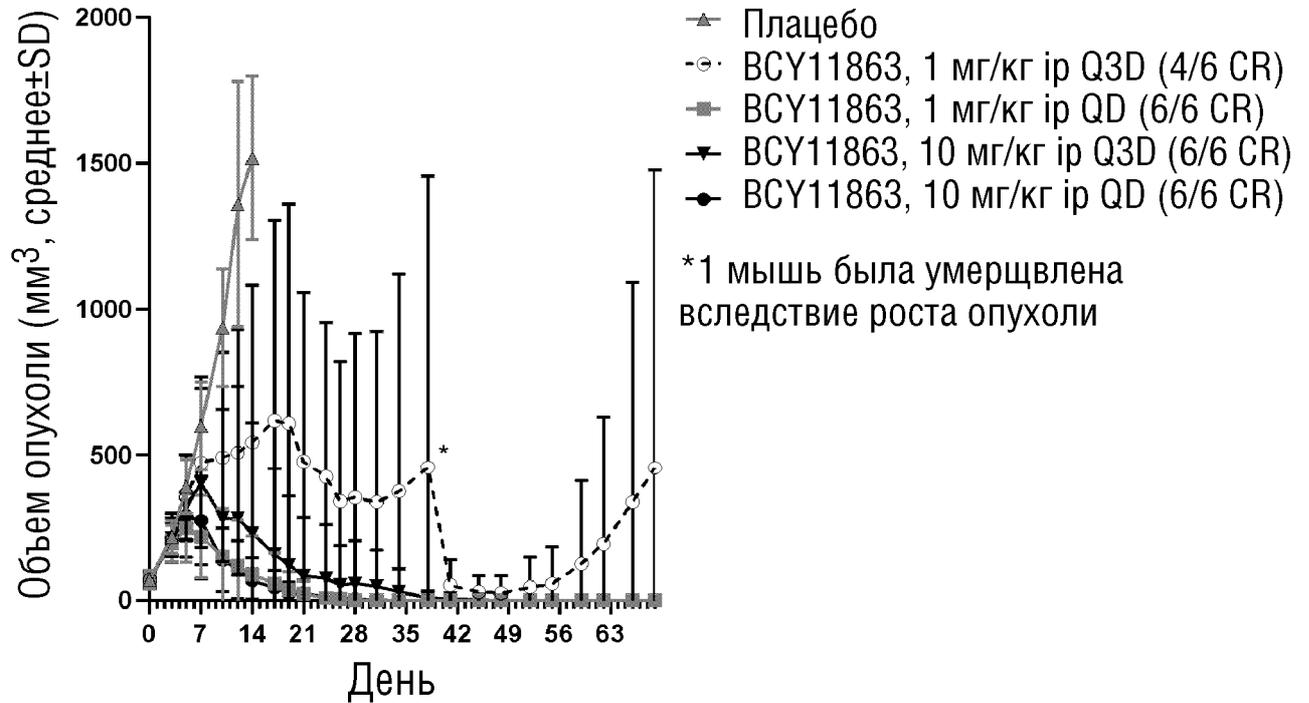
С



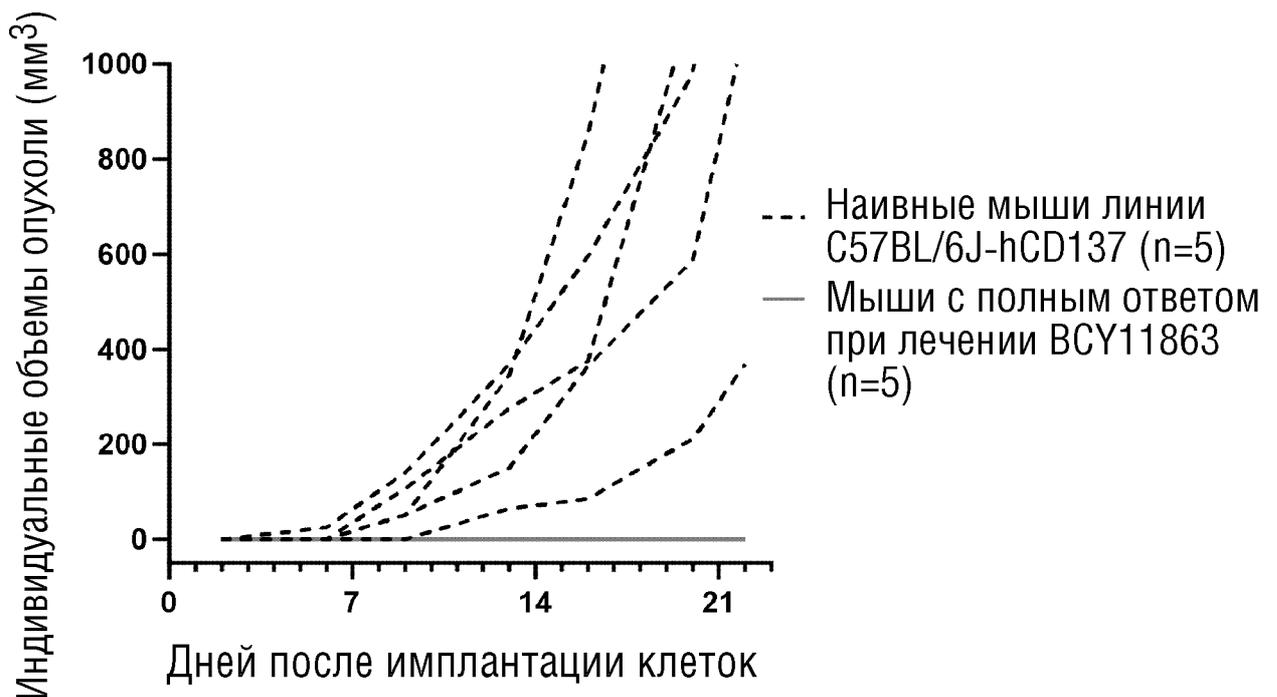
ФИГ.3



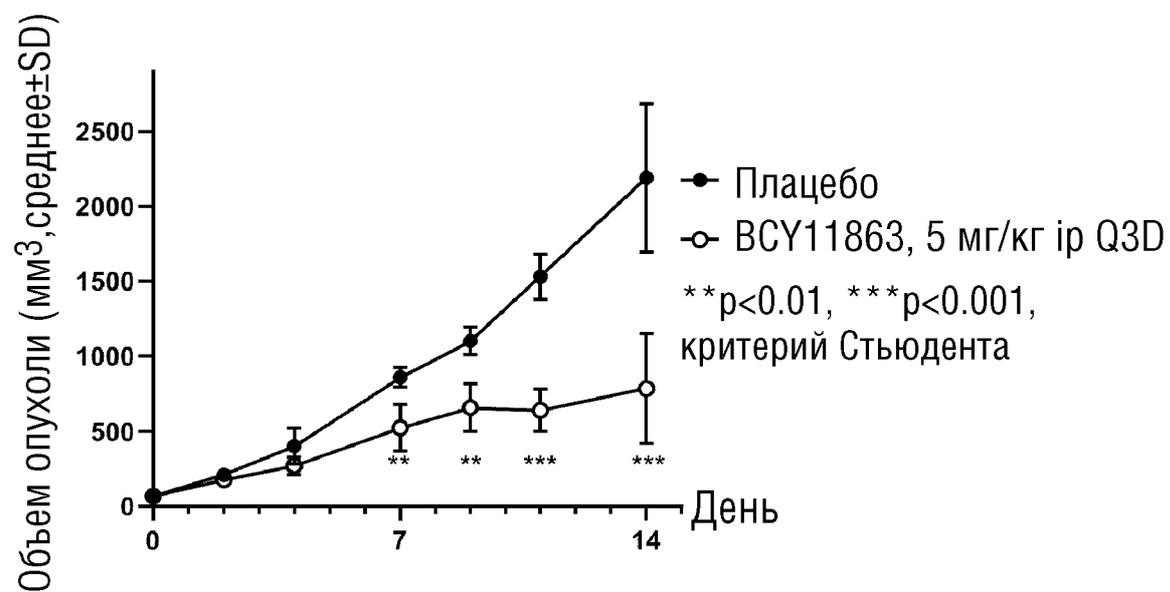
ФИГ.4



ФИГ.5

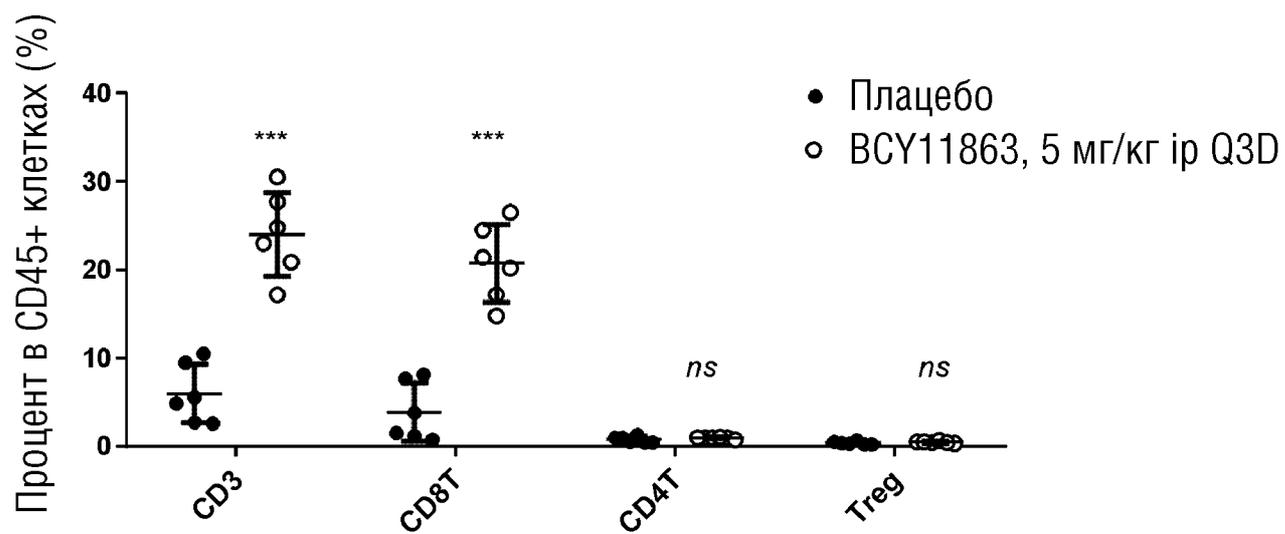


ФИГ.6

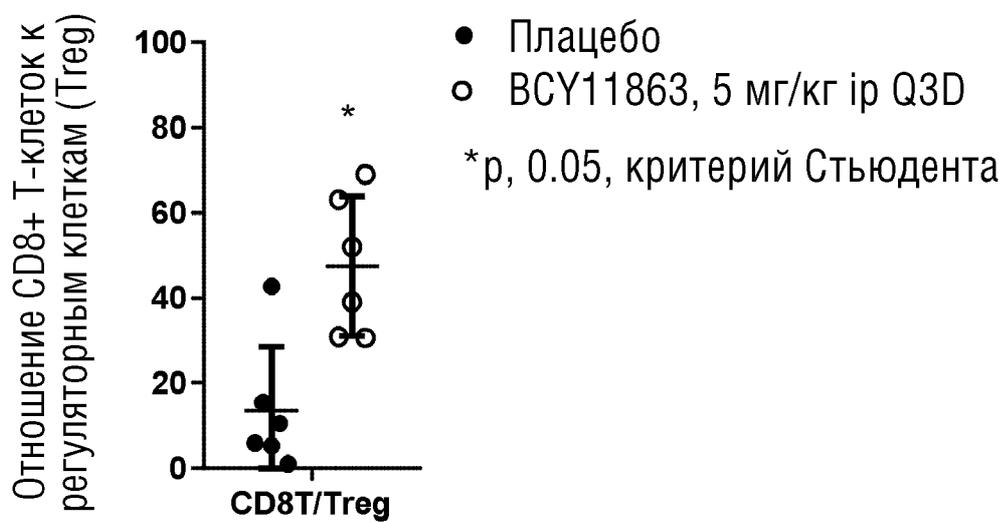


ФИГ.7

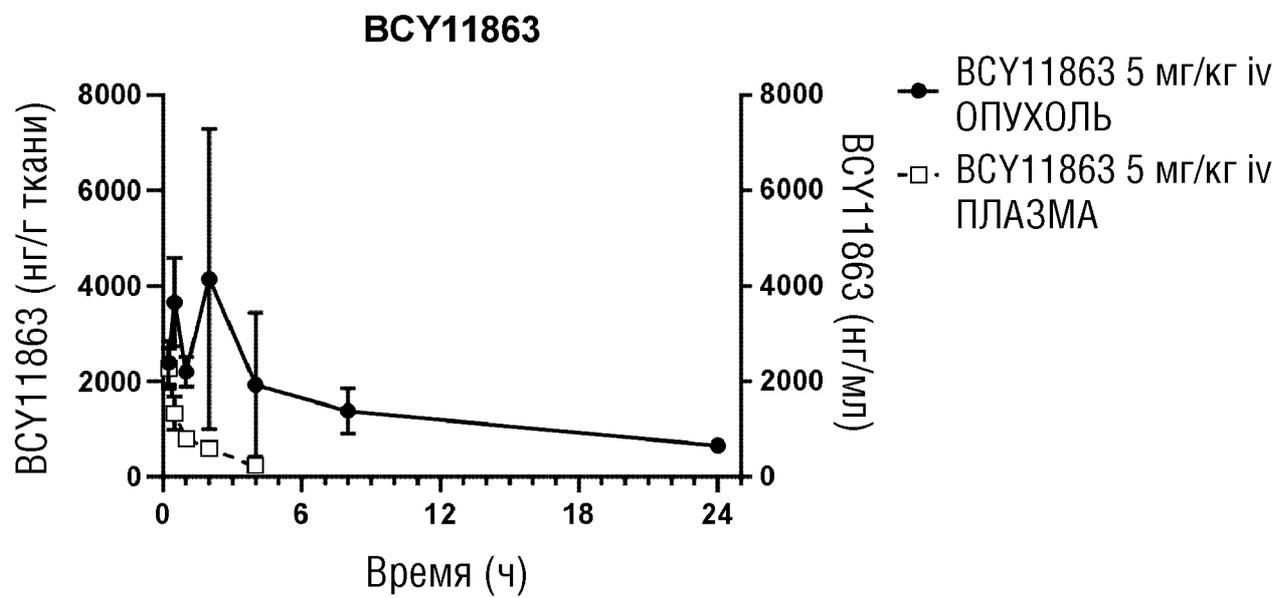
А



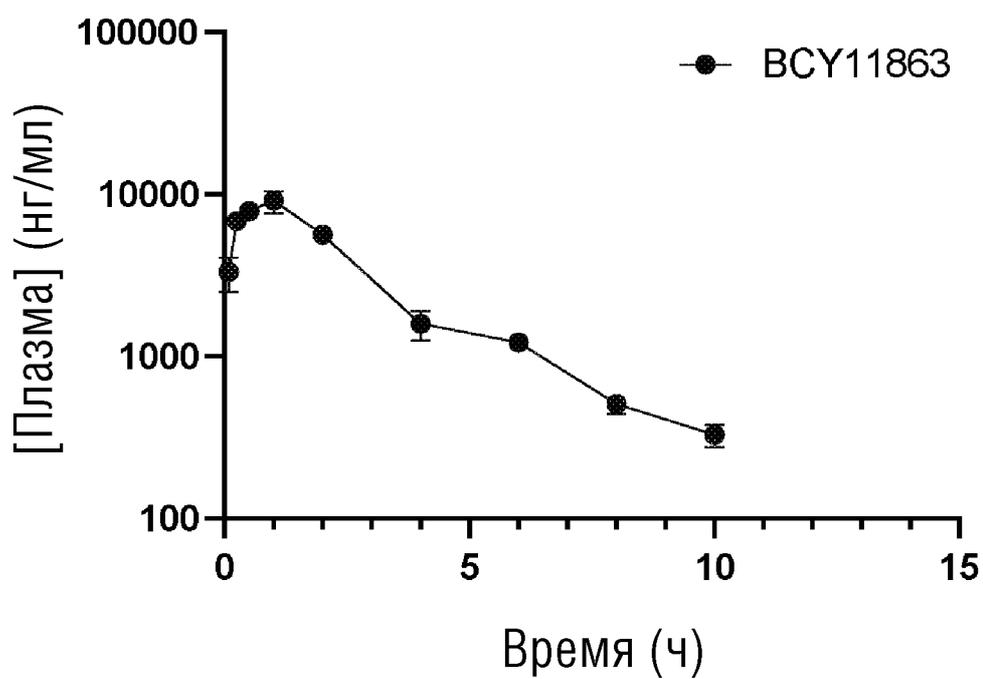
В



ФИГ.8



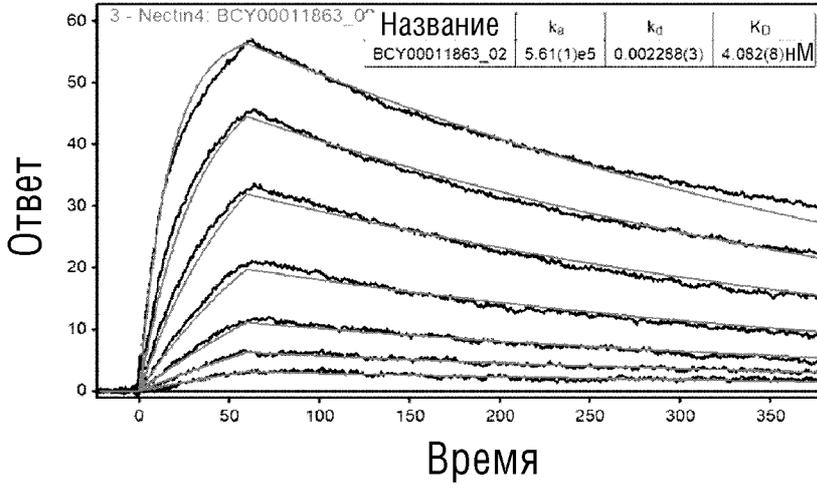
ФИГ.9



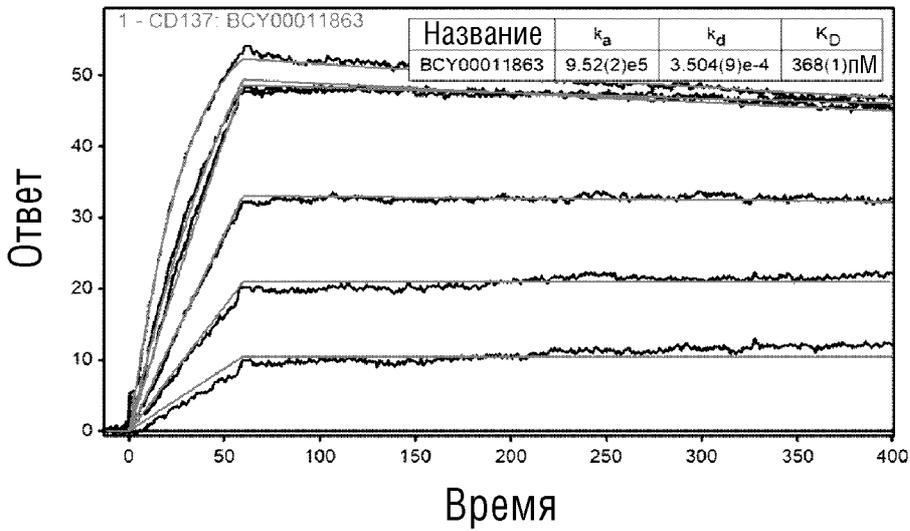
Соединение	Конечный период полувыведения, $T_{1/2}$ (ч)
BCY11863	2.5

ФИГ.10

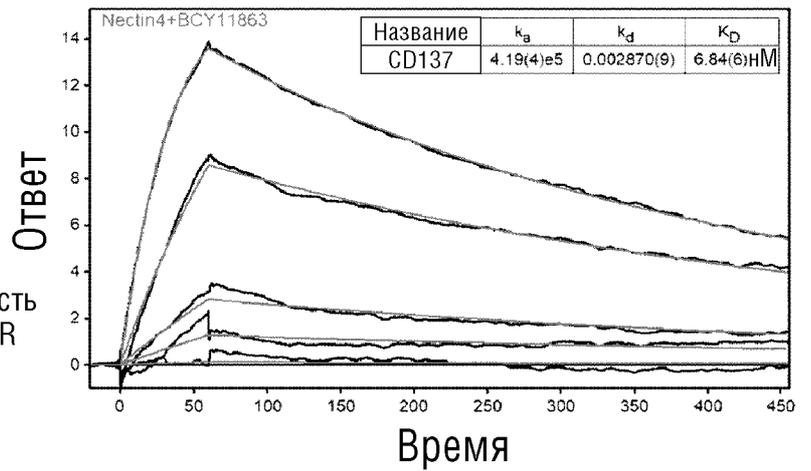
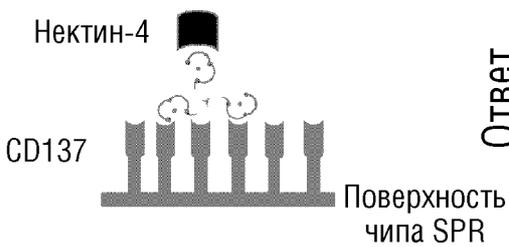
A



B

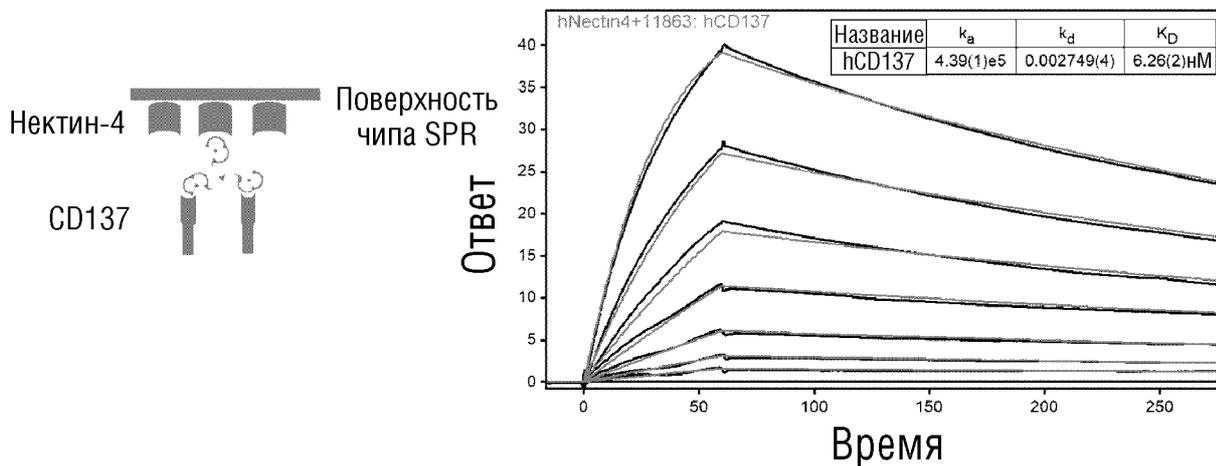


C

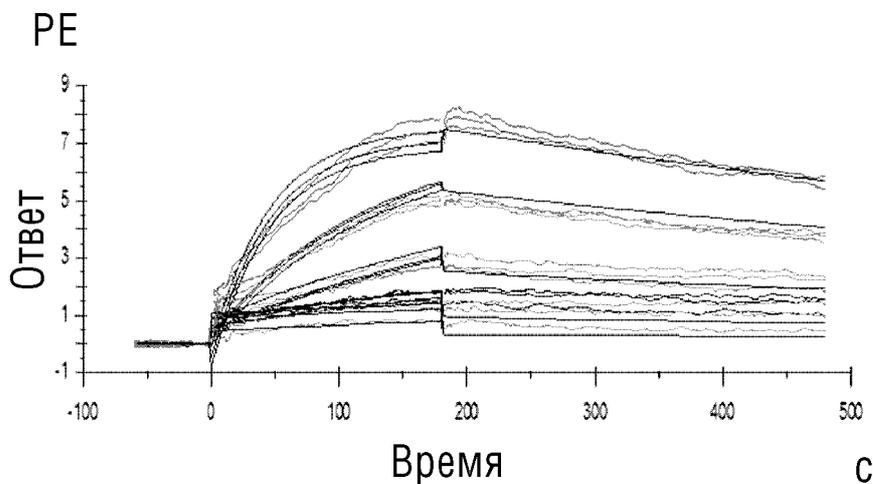


ФИГ.10 (продолжение)

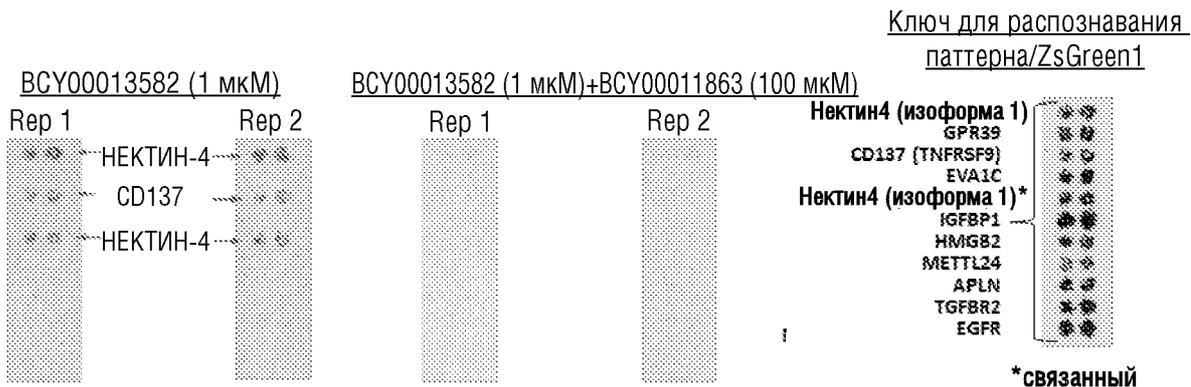
D



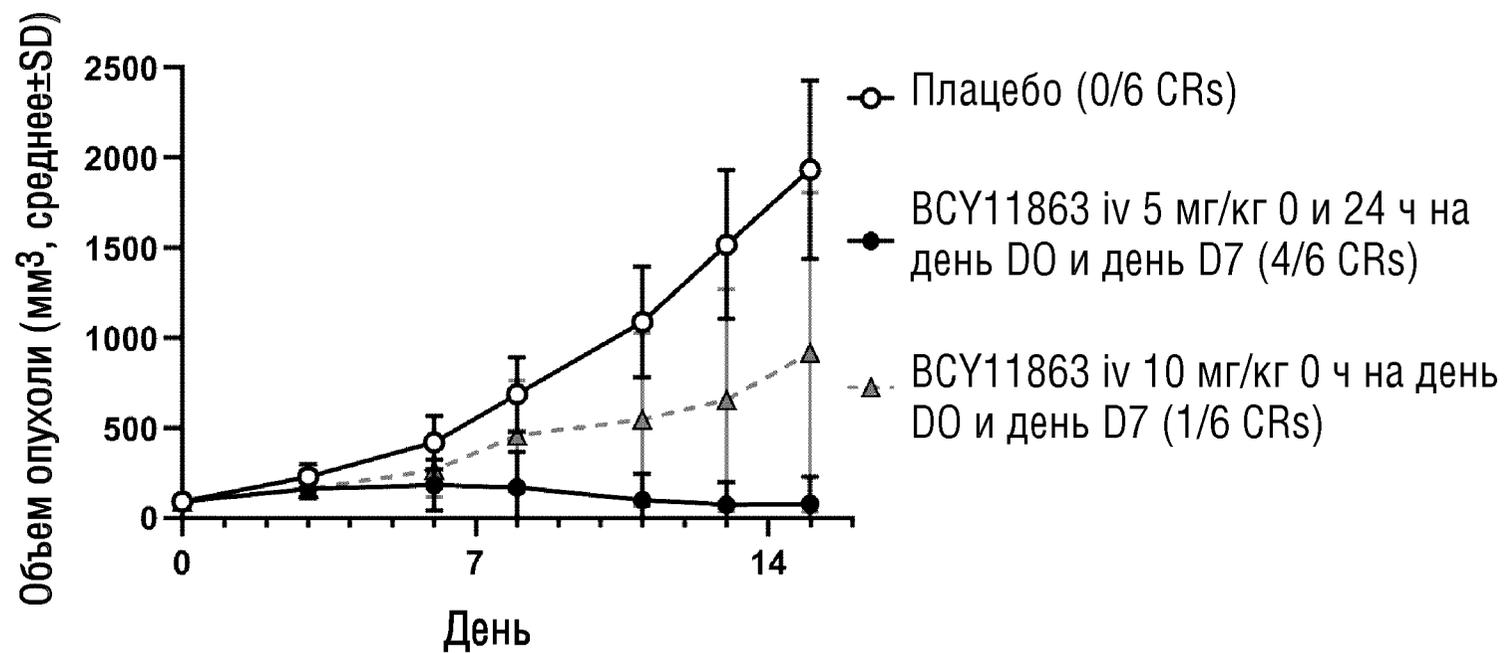
E



ФИГ.11

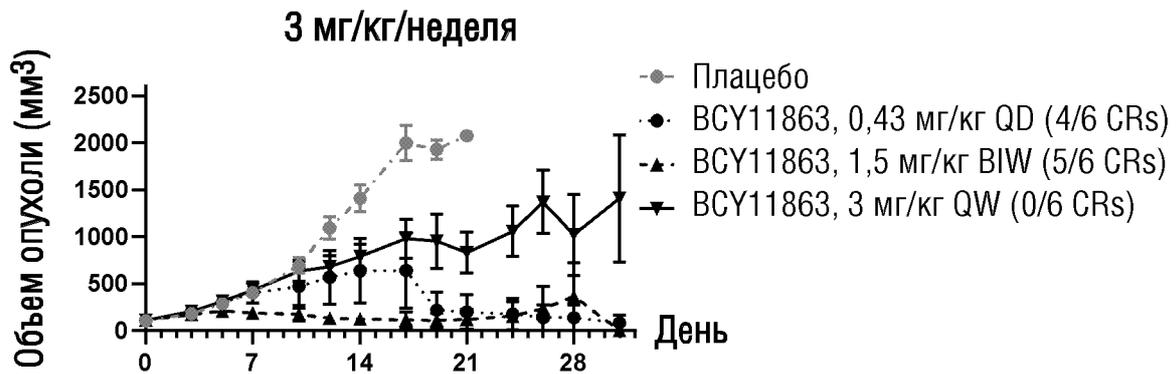


ФИГ.12

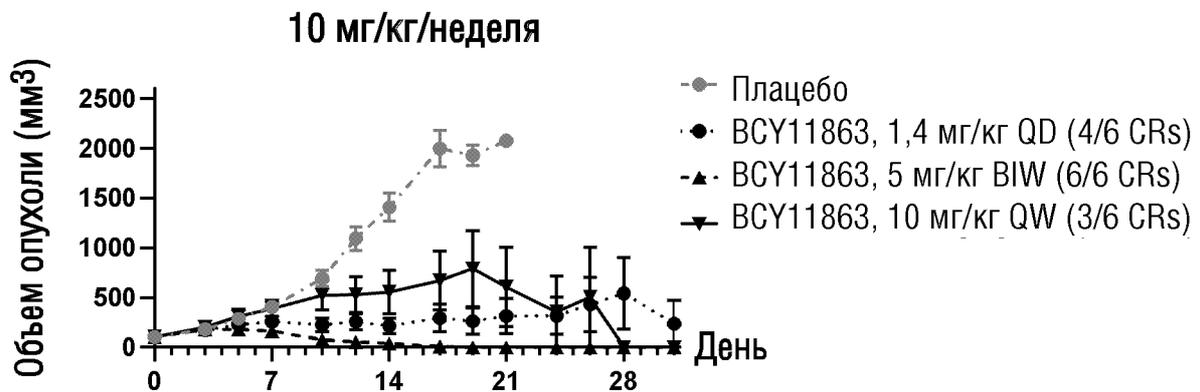


ФИГ.13

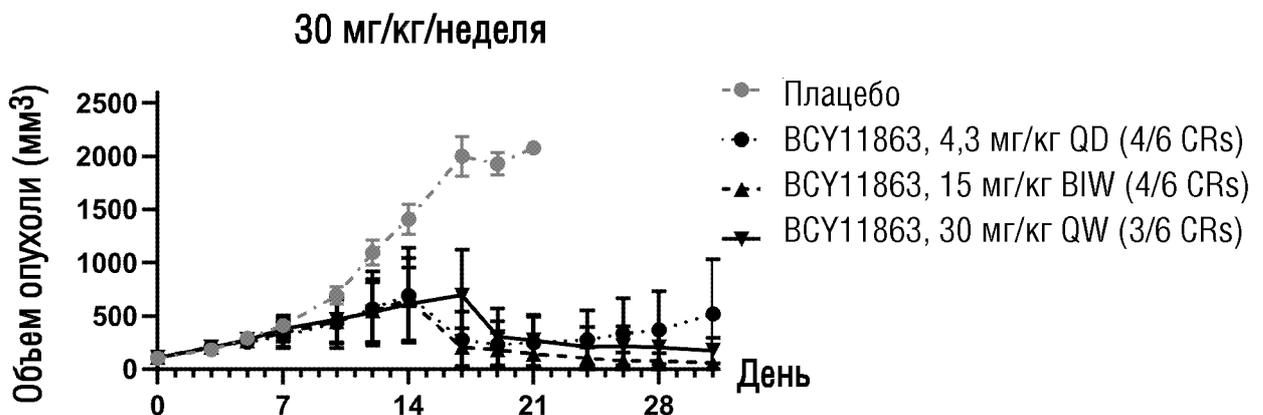
А



Б



С



ФИГ.14

