

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290871** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.22

(51) Int. Cl. *A61K 47/64* (2017.01)
C07K 7/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.10.15

(54) КОНЬЮГАТЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА С БИЦИКЛИЧЕСКИМ ПЕПТИДНЫМ ЛИГАНДОМ

(31) 1914872.5

(32) 2019.10.15

(33) GB

(86) PCT/GB2020/052590

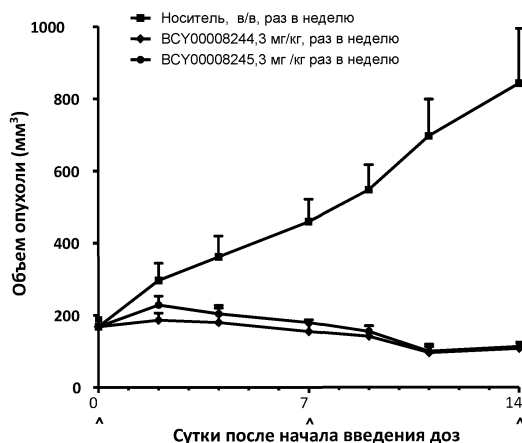
(87) WO 2021/074622 2021.04.22

(71) Заявитель:
БАЙСИКЛЕТКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Бесуик Пол, Мадд Джемма, Ригби
Майкл (GB)

(74) Представитель:
Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Прищепный С.В., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф. (RU)

(57) Изобретение относится к лекарственным конъюгатам, содержащим по меньшей мере два полипептида, каждый из которых ковалентно связан с неароматическими молекулярными каркасами таким образом, что две или несколько пептидных петли располагаются между точками присоединения к каркасу. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные лекарственные конъюгаты, и к применению указанных лекарственных конъюгатов в профилактике, подавлении или лечении заболеваний, таких как заболевания, которые можно облегчить за счет гибели клеток, в частности заболевания, характеризующиеся поврежденными типами клеток, пролиферативные заболевания, такие как злокачественные заболевания, и аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит.



A1

202290871

202290871

A1

КОНЬЮГАТЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА С БИЦИКЛИЧЕСКИМ ПЕПТИДНЫМ ЛИГАНДОМ

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к лекарственным конъюгатам, содержащим по меньшей мере два полипептида, каждый из которых ковалентно присоединен к неароматическим молекулярным каркасам, таким образом, что две или более пептидных петли, располагаются между точками присоединения к каркасу. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные лекарственные конъюгаты, и к их применению в профилактике, подавлении или лечении заболеваний, таких как заболевания, которые могут быть облегчены за счет гибели клеток, в частности, заболевания, характеризующиеся поврежденными типами клеток, пролиферативные заболевания, такие как злокачественные заболевания, и аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Циклические пептиды обладают способностью связываться с высокой аффинностью и целевой специфичностью с белковыми мишенями и, следовательно, представляют собой перспективный класс молекул для разработки лекарственных средств. Известно, что некоторые циклические пептиды уже успешно используются в клинической практике, как, например, антибактериальный пептид ванкомицин, иммуносуппрессирующее лекарственное средство циклоспорин или противоопухолевое лекарственное средство октреотид (Driggers *et al.* (2008), Nat Rev Drug Discov 7 (7), 608-24). Хорошие связывающие свойства являются результатом относительно большой поверхности взаимодействия, образованной между пептидом и мишенью, а также сниженной конформационной гибкостью циклических структур. Обычно, макроциклы связываются с поверхностями несколько сотен квадратных ангстрем, как, например, CVX15 - циклический пептидный антагонист CXCR4 (400 Å²; Wu *et al.* (2007), Science 330, 1066-71), циклический пептид с мотивом Arg-Gly-Asp, который связывается 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 их циклической конфигурации пептидные макроциклы являются менее гибкими, чем линейные пептиды, что приводит к меньшей потере энтропии при связывании с мишенями, и, как результат, к более высокой аффинности связывания. Сниженная гибкость также приводит к закрытию мишень-специфичных конформаций, повышая специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Этот эффект был продемонстрирован на примере мощного и селективного ингибитора матриксной металлопротеиназы 8 (ММР-8), которая утратила свою селективность по сравнению с другими ММР при открытии ее кольца (Cherney *et al.* (1998), J Med Chem 41 (11), 1749-51). Подходящие связывающие свойства, достигнутые посредством макроциклизации, еще более четко выражены у мультициклических пептидов, имеющих более одного пептидного кольца, как, например, в ванкомицине, низине и актиномицине.

Различные группы исследователей ранее связывали пептиды 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 ему молекулы для быстрой и количественной циклизации множества пептидных петель в синтетические каркасы для структурной имитации поверхностей белка (Timmerman *et al.* (2005), ChemBioChem). Способы получения потенциальных лекарственных соединений, в которых указанные соединения получают путем связывания полипептидов, содержащих цистеин, с молекулярными каркасами, как, например, трис(бромметил)бензол, описаны в публикациях WO 2004/077062 и WO 2006/078161. Дополнительные подходящие примеры молекулярных каркасов включают неароматические каркасы, описанные у Heinis *et al* (2014) *Angewandte Chemie, International Edition* 53(6) 1602-1606.

Комбинаторные подходы на основе фагового дисплея были разработаны для создания и скрининга больших библиотек бициклических пептидов в отношении представляющих интерес мишеней (Heinis *et al.* (2009), Nat Chem Biol 5 (7), 502-7 и WO 2009/098450). Вкратце, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащих три цистеиновых остатка и две области шести случайных аминокислот (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys) были экспонированы на поверхности фага и циклизованы путем ковалентного связывания цистеиновых боковых цепей с небольшой молекулой (трис(бромметил)бензол).

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предложен лекарственный конъюгат, содержащий по меньшей мере два пептидных лиганда, которые

могут быть одинаковыми или различными, каждый из которых содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и неароматический молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида, таким образом, что по меньшей мере две полипептидных петли образованы на молекулярном каркасе.

В соответствии со вторым аспектом изобретения представлен лекарственный конъюгат, содержащий одно или более цитотоксических средств, конъюгированных по меньшей мере с двумя пептидными лигандами, которые могут быть одинаковыми или различными, каждый содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и неароматический молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида, таким образом, что по меньшей мере две полипептидных петли образуются на молекулярном каркасе.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая охарактеризованный здесь лекарственный конъюгат, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предложен охарактеризованный здесь лекарственный конъюгат для применения в профилактике, подавлении или лечении заболеваний, таких, которые можно облегчить за счет гибели клеток, в частности, заболеваний, характеризующихся поврежденными типами клеток, пролиферативных заболеваний, таких как злокачественные заболевания, и аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит.

Краткое описание чертежей

Фигура 1: Кривая изменения массы тела и объема опухоли после введения BCY8244 самкам бестимусных мышей Balb/c с ксенотрансплантатом NCI-H292. Точки данных представляют собой среднюю массу тела в группе. Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего. (SEM).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предложен лекарственный конъюгат, содержащий по меньшей мере два пептидных лиганда, которые могут быть одинаковыми или различными, каждый из которых содержит полипептид,

содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и неароматический молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида, таким образом, что по меньшей мере две полипептидных петли образуются на молекулярном каркасе.

Будет понятно, что помимо лекарственного конъюгата, содержащего множество пептидных лигандов, имеющих потенциально разные последовательности, указанные пептидные лиганды могут быть специфичны в отношении одинаковых или различных мишеней. Расположение, в котором лекарственный конъюгат содержит один пептидный лиганд, специфичный в отношении одной мишени, и один или несколько дополнительных лигандов, специфичных в отношении разных мишеней, известно как би-паратопное связывание.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов специфичен в отношении эпитопа, присутствующего на злокачественной клетке.

В одном варианте осуществления, по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов специфичен в отношении нектина, например, нектин-4. Нектин-4 представляет собой поверхностную молекулу, которая принадлежит семейству белков нектинов, которое включает в себя 4 члена. Нектины представляют собой молекулы клеточной адгезии, которые играют ключевую роль в различных биологических процессах, таких как поляриность, пролиферация, дифференцировка и миграция, для эпителиальных, эндотелиальных, иммунных клеток и нейронов, во время развития и взрослой жизни. Они вовлечены в некоторые патологические процессы у людей. Они являются основными рецепторами для вируса полиомиелита, вируса простого герпеса и вируса кори. Мутации в генах, кодирующих нектин-1 (PVRL1) или нектин-4 (PVRL4) вызывают синдромы эктодермальной дисплазии, связанные с другими аномалиями. Нектин-4 экспрессируется во время эмбрионального развития. В тканях взрослого организма его экспрессия более ограничена, чем экспрессия других членов этого семейства. Нектин-4 представляет собой ассоциированный с опухолью антиген в 50%, 49% и 86% карциномах молочной железы, яичников и легких, соответственно, главным образом, на опухолях с плохим прогнозом. Его экспрессия не определяется в соответствующих нормальных тканях. В опухолях молочной железы нектин-4 экспрессируется главным образом в тройных негативных и ERBB2+ карциномах. В сыворотке пациентов с этими злокачественными опухолями выявление растворимых форм нектин-4 связано с плохим прогнозом. Уровни сывороточного нектин-4 повышаются во время развития метастаз и снижаются после лечения. Эти результаты дают основание предполагать, что нектин-4 мог быть надежной

мишенью для лечения злокачественных заболеваний. В связи с этим, в предшествующем уровне техники были описаны некоторые антитела к нектину-4. В частности, энфортумаб ведотин (ASG-22ME) представляет собой конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC), нацеленный на нектин-4, и в настоящее время проходит клиническое исследование для лечения пациентов, страдающих солидными опухолями.

Примеры подходящих пептидных лигандов, специфичных к нектину-4, описаны в публикации GB 1810250.9 и GB 1815684.4, бициклические пептидные лиганды которых включены в настоящее описание посредством ссылки.

В варианте осуществления изобретения, в котором по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов специфичен в отношении нектина-4, указанные петлевые последовательности содержат 3 или 9 аминокислот. Еще в одном варианте осуществления изобретения указанные петлевые последовательности содержат три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, одна из которых состоит из 3 аминокислот, а другая состоит из 9 аминокислот.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один пептидный лиганд, специфичный в отношении нектина-4, имеет срединную последовательность:

CP[1Nal][dD]CMKDWSTP[HyP]WC (SEQ ID NO: 1)

(обозначенную как SEQ ID NO: 212 в публикации GB 1815684.4).

Еще в одном варианте осуществления по меньшей мере один пептидный лиганд, специфичный в отношении нектина-4, имеет полноразмерную последовательность:

(β -Ala)-Sar₁₀-CP[1Nal][dD]CMKDWSTP[HyP]WC (SEQ ID NO: 2)

(обозначенную как BCY8238 в публикации GB 1815684.4).

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в данной области, например, в области химии пептидов, клеточных культур и фагового дисплея, химии нуклеиновых кислот и биохимии. Стандартные технологии используются для методов молекулярной биологии, генетических и биохимических методов (смотри 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.), которые включены здесь посредством ссылки.

В одном варианте осуществления указанный лекарственный конъюгат содержит два пептидных лиганда, оба из которых являются специфичными в отношении одной и той же мишени. Еще в одном варианте осуществления указанный лекарственный конъюгат содержит два пептидных лиганда, оба из которых специфичны в отношении нектина-4. И еще в одном варианте осуществления указанный лекарственный конъюгат

содержит два пептидных лиганда, оба из которых являются специфичными в отношении нектин-4 и оба из которых содержат одну и ту же пептидную последовательность.

Номенклатура

Нумерация

При обозначении положений аминокислотных остатков в бициклических пептидах по настоящему изобретению, цистеиновые остатки (C_i, C_{ii} и C_{iii}) исключены из нумерации, поскольку они являются постоянными, следовательно, нумерация аминокислотных остатков в выбранном бициклическом пептиде по настоящему изобретению обозначается, как указано ниже:

-C_i-P₁-[1Nal]₂-[dD]₃-C_{ii}-M₄-K₅-D₆-W₇-S₈-T₉-P₁₀-[HyP]₁₁-W₁₂-C_{iii} (SEQ ID NO: 1).

Для цели настоящего описания предполагается, что все бициклические пептиды циклизованы с использованием 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА) с получением на выходе трехзамещенной структуры. Циклизация с ТАТА происходит на C_i, C_{ii} и C_{iii}.

Молекулярный формат

N- или C-концевые удлинения бициклической срединной последовательности добавляют к левой или правой стороне последовательности, разделяя дефисом. Например, N-концевой βAla-Sar₁₀-Ala хвост был бы обозначен следующим образом:

βAla-Sar₁₀-A-(SEQ ID NO: X).

Инверсированные пептидные последовательности

В соответствии с настоящим описанием у Nair *et al* (2003) J Immunol 170(3), 1362-1373, предполагается, что раскрытые здесь пептидные последовательности также найдут применение в их ретро-инверсной форме. Например, последовательность является реверсной (т.е. N-конец становится C-концом и наоборот) и их стереохимия также является реверсной (т.е. D-аминокислоты становятся L-аминокислотами и наоборот).

Пептидные лиганды

Пептидный лиганд, как указано в настоящем описании, относится к пептиду, пептидному соединению или пептидомиметику, ковалентно связанному с молекулярным каркасом. Обычно такие пептиды, пептидные соединения или пептидомиметики содержат пептид, имеющий природные или неприродные аминокислоты, две или более реакционноспособные группы (то есть цистеиновые остатки), которые обладают способностью образовывать ковалентные связи с каркасом, и последовательность, заключенную между указанными реакционноспособными группами, которая называется петлевой последовательностью, поскольку она образует петлю, когда пептид, пептидное соединение или пептидомиметик связываются с каркасом. В данном случае, пептиды,

пептидные соединения или пептидомиметики содержат по меньшей мере три цистеиновых остатка (обозначенных здесь как C_i, C_{ii} и C_{iii}), и образуют на каркасе по меньшей мере две петли.

Преимущества пептидных лигандов

Некоторые бициклические пептиды по настоящему изобретению обладают рядом благоприятных свойств, которые позволяют рассматривать их в качестве подходящих подобных лекарствам молекул для инъекции, ингаляции, назального, глазного, перорального или местного введения. Такие благоприятные свойства включают:

- межвидовую перекрестную реактивность. Это стандартное требование для доклинической оценки фармакодинамики и фармакокинетики;
- устойчивость к действию протеаз. Бициклические пептидные лиганды должны идеально демонстрировать устойчивость к действию протеаз плазмы, эпителиальных протеаз («заякоренных в мембране»), желудочных и кишечных протеаз, протеаз легочной поверхности, внутриклеточных протеаз и подобных. Устойчивость к действию протеаз должна сохраняться между различными видами, так, чтобы бициклический пробный вариант можно было разработать на животной модели, а также с уверенностью вводить людям;
- желаемый профиль растворимости. Это функция количественного соотношения заряженных и гидрофильных остатков к гидрофобным остаткам и внутри/межмолекулярным связям, что является важным для получения лекарственной формы и абсорбции;
- оптимальный плазменный период полужизни в кровотоке. В зависимости от клинических показаний и режима лечения может потребоваться разработка бициклического пептида для кратковременного воздействия для создания бициклического пептида с увеличенным удерживанием в кровотоке, и, следовательно, являющегося оптимальным для лечения более длительных патологических состояний. Другими факторами, которые приводят к желаемому периоду полужизни в плазме, являются необходимость длительного воздействия для максимальной терапевтической эффективности в зависимости от сопутствующей токсикологии вследствие длительного воздействия агента; и
- селективность. Некоторые пептидные лиганды по настоящему изобретению демонстрируют хорошую селективность относительно других подтипов рецепторов. Например, в тех случаях, когда бициклический пептид специфичен в отношении нектина-4, селективность указанного бициклического пептида будет идеальной в отношении нектина-4 по сравнению с другими нектинами.

Фармацевтически приемлемые соли

Следует понимать, что солевые формы входят в объем настоящего изобретения, и ссылки на пептидные лиганды включают солевые формы указанных лигандов.

Соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основную или кислую функциональную группу, с помощью общепринятых химических способов, например, способов, описанных в *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002. В основном, такие соли могут быть получены реакцией свободных кислых или основных форм этих соединений с соответствующим основанием или кислотой в воде или в органическом растворителе, или в их смеси.

Кислотно-аддитивные соли (моно или ди-соли) могут быть образованы с целым рядом кислот, как неорганических, так и органических. Примеры кислотно-аддитивных солей включают моно- или ди-соли, 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, камфор-сульфоновой, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламовой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, фумаровой, галактаровой, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α -оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, галоидоводородных кислот (например, бромистоводородной, хлористоводородной, иодистоводородной), 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-аминосалициловой, себациновой, стеариновой, янтарной, серной, дубильной, (+)-L-винной, тиоциановой, п-толуолсульфокислотой, ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированных аминокислот и катионообменных смол.

Одна конкретная группа солей состоит из солей, образованных уксусной, соляной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной, молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изетионовой, фумаровой, бензолсульфоновой, толуолсульфоновой, серной, метансульфоновой (мезилатной), этансульфоновой,

нафталинсульфоновой, валериановой, пропановой, бутановой, малоновой, глюкуроновой и лактобионовой кислотами. Одной конкретной солью является гидрохлоридная соль. Другой конкретной солью является ацетатная соль.

Если соединение является анионоактивным или имеет функциональную группу, которая может быть анионоактивной (например, COOH может быть COO^-), тогда соль может быть образована с органическим или неорганическим основанием с образованием подходящего катиона. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но не ограничиваются ими, ионы щелочных металлов, такие как Li^+ , Na^+ и K^+ , катионы щелочноземельных металлов, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} , и другие катионы, такие как Al^{3+} или Zn^{2+} . Примеры подходящих органических катионов включают, но не ограничиваются ими, ион аммония (т.е. NH_4^+) и замещенные ионы аммония (например, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются полученные из: метиламина, этиламина, диэтиламина, пропиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтаноланамина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером обычного четвертичного иона аммония является $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Когда соединения по изобретению содержат аминогруппу, они могут образовывать соли четвертичного аммония, например, путем реакции с алкилирующим агентом в соответствии со способами, хорошо известными специалисту в данной области. Такие соединения четвертичного аммония входят в объем соединений по настоящему изобретению.

Модифицированные производные

Следует понимать, что модифицированные производные пептидных лигандов, как определено в настоящем описании, 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 нескольких аминокислотных остатков одним или несколькими неприродными аминокислотными остатками (например, замена одного или нескольких полярных аминокислотных остатков одной или несколькими изостерическими или изоэлектронными аминокислотами; замена одного или нескольких неполярных аминокислотных остатков другими неприродными изостерическими или изоэлектронными аминокислотами); добавления спейсерной группы; замены одного или нескольких чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или несколькими устойчивыми к окислению аминокислотными остатками; замены одного или

нескольких аминокислотных остатков одной или несколькими замещающими аминокислотами, такими как аланин, замены одного или нескольких остатков L-аминокислоты одним или несколькими остатками D-аминокислоты; N-алкилирования одной или нескольких амидных связей внутри бициклического пептидного лиганда; замены одной или нескольких пептидных связей замещающей связью; модификации длины пептидного остова; замены водорода на альфа-углероде одного или нескольких аминокислотных остатков другой химической группой, модификации аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат/аспартат и тирозин, подходящими реагентами, реагирующими с амином, тиолом, карбоновой кислотой и фенолом, то есть, что касается функционализации указанных аминокислот, а также введения или замены аминокислот, которые придают ортогональные реакционные способности, подходящие для функционализации, например аминокислоты, несущие азидную или алкиновую группу, которые позволяют функционализировать алкиновые или азидсодержащие фрагменты, соответственно.

В одном варианте осуществления модифицированное производное содержит N-концевую и/или C-концевую модификацию. В другом варианте осуществления модифицированное производное включает N-концевую модификацию с использованием подходящей аминореактивной химической структуры и/или C-концевую модификацию с использованием подходящей карбоксиреактивной химической структуры. В другом варианте осуществления указанная N-концевая или C-концевая модификация включает добавление эффекторной группы, включая, но не ограничиваясь этим, цитотоксический агент, радиохелатор или хромофор.

Еще в одном варианте осуществления модифицированное производное содержит N-концевую модификацию. В другом варианте осуществления N-концевая модификация содержит N-концевую ацетильную группу. В этом варианте осуществления N-концевой остаток блокируется уксусным ангидридом или другими соответствующими реагентами во время синтеза пептида, что приводит к получению молекулы, которая является ацетилированной по N-концу. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциальной точки узнавания аминопептидаз и позволяет избежать возможного разрушения бициклического пептида.

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

Еще в одном варианте осуществления модифицированное производное включает модификацию С-конца. В другом варианте осуществления С-концевая модификация содержит амидную группу. В этом варианте осуществления С-концевой остаток синтезируется в виде амида во время синтеза пептида, что приводит к получению молекулы, которая амидирована с С-конца. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциальной точки узнавания карбоксипептидазы и снижает возможность протеолитического расщепления бициклического пептида.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или нескольких аминокислотных остатков одним или несколькими неприродными аминокислотными остатками. В этом варианте осуществления могут быть выбраны неприродные аминокислоты, имеющие изостерические/изоэлектронные боковые цепи, которые не распознаются расщепляющими протеазами и не оказывают какого-либо неблагоприятного воздействия на специфическую активность мишени.

В качестве альтернативы могут быть использованы неприродные аминокислоты, имеющие ограниченные боковые цепи аминокислот, так что протеолитический гидролиз соседней пептидной связи конформационно и стерически затруднен. В частности, это касается аналогов пролина, объемных боковых цепей, C α -дизамещенных производных (например, аминокислоты, Aib) и циклоаминокислот, простым производным которых является аминоклопропилкарбоновая кислота.

В одном варианте осуществления изобретения модифицированное производное содержит добавление спейсерной группы. Еще в одном варианте осуществления модифицированное производное содержит добавление спейсерной группы к N-концевому цистеину (C_i) и/или С-концевому цистеину (C_{iii}).

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или нескольких чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или несколькими устойчивыми к окислению аминокислотными остатками. В другом варианте модифицированное производное включает замену остатка триптофана остатком нафтилаланина или аланина. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество улучшения профиля фармацевтической стабильности полученного в результате бициклического пептидного лиганда.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или нескольких заряженных аминокислотных остатков одним или несколькими гидрофобными аминокислотными остатками. В альтернативном варианте модифицированное производное включает замену одного или нескольких остатков гидрофобных аминокислот одним или несколькими заряженными остатками аминокислот.

Правильный баланс заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков является важной характеристикой бициклических пептидных лигандов. Например, гидрофобные аминокислотные остатки влияют на степень связывания с белками плазмы и, следовательно, на концентрацию свободно доступной фракции в плазме, в то время как заряженные аминокислотные остатки (в частности, аргинин) могут влиять на взаимодействие пептида с фосфолипидными мембранами на поверхности клеток. Комбинация этих двух факторов может влиять на период полувыведения, объем распределения и экспозицию пептидного лекарственного средства и может быть адаптирована в соответствии с клинической конечной точкой. Кроме того, правильное сочетание и количество заряженных аминокислотных остатков по сравнению с гидрофобными, может уменьшить раздражение в месте инъекции (если пептидный препарат вводился подкожно).

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или нескольких остатков L-аминокислоты одним или несколькими остатками D-аминокислоты. Считается, что этот вариант осуществления увеличивает протеолитическую стабильность за счет стерических затруднений и за счет склонности D-аминокислот стабилизировать α -спиральные конформации (Tugyi *et al* (2005) PNAS, 102(2), 413–418).

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает удаление любых аминокислотных остатков и замену аланинами, например, D-аланинами. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество идентификации ключевых связывающих остатков и удаление потенциального сайта (сайтов) протеолитического воздействия.

Следует отметить, что каждая из вышеупомянутых модификаций служит для намеренного улучшения эффективности или стабильности пептида. Дальнейшее улучшение эффективности на основе модификаций может быть достигнуто с помощью следующих механизмов:

- включения гидрофобных функциональных групп, которые оказывают гидрофобный эффект и приводят к снижению скорости диссоциации, таким образом, что достигается более высокая аффинность;
- включения заряженных групп, которые вызывают длительные межмолекулярные взаимодействия, приводя к более быстрой скорости ассоциации и к более высокой аффинности (смотри, например, Schreiber *et al*, *Rapid, electrostatically assisted association of proteins* (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31); и
- включения дополнительных ограничений в пептид, например, правильное

ограничение боковых цепей аминокислот, так что потеря энтропии будет минимальной при связывании с мишенью, ограничение торсионных углов основной цепи, так что потеря энтропии будет минимальной при связывании с мишенью, и введение дополнительных циклизаций в молекулу по тем же причинам.

(обзор смотри у 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 меченые (радио)изотопами пептидные лиганды по изобретению, в которых один или несколько атомов заменены атомами, имеющими такой же атомный номер, но атомную массу или массовое число, отличающееся от атомной массы или массового числа, обычно встречающиеся в природе, и пептидные лиганды по изобретению, к которым присоединены металлохелатирующие группы (называемые «эффекторами»), способные удерживать соответствующие (радио)изотопы, и пептидные лиганды по изобретению, в которых определенные функциональные группы ковалентно заменены соответствующими (радио)изотопами или изотопно-мечеными функциональными группами.

Примеры изотопов, подходящих для включения в пептидные лиганды по настоящему изобретению, включают в себя 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 .

Некоторые изотопно-меченые пептидные лиганды по изобретению, например лиганды, включающие радиоактивный изотоп, применяют в исследованиях распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях, а также для клинической оценки присутствия и/или отсутствия мишени EphA2 на пораженных тканях. Пептидные лиганды по изобретению могут дополнительно обладать необходимыми диагностическими свойствами, поскольку их можно использовать для обнаружения или идентификации образования комплекса между меченым соединением и другими молекулами, пептидами, белками, ферментами или рецепторами. В способах обнаружения или идентификации могут использоваться соединения, которые помечены метящими агентами, такими как радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные вещества, светящиеся вещества (например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин и люцифераза) и так далее. Радиоактивные изотопы трития, т.е. ^3H (T) и углерод-14, т.е. ^{14}C , особенно применимы для этой цели ввиду простоты их включения и легких способов их обнаружения.

Замена более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, т.е. ^2H (D), может обеспечить определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличение периода полувыведения *in vivo* или снижение необходимой дозировки, и, следовательно, может быть предпочтительным в некоторых обстоятельствах.

Замена изотопами, испускающими позитроны, такими как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , может использоваться в исследованиях позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) для изучения занятости мишени.

Меченые изотопами соединения пептидных лигандов по изобретению, как правило, могут быть получены обычными способами, известными специалистам в данной области, или способами, аналогичными описанным в прилагаемых примерах, с использованием соответствующего реагента, меченного изотопом, вместо ранее используемого немеченого реагента.

Реакционноспособные группы

Молекулярный каркас по изобретению может быть связан с полипептидом через функциональные или реакционноспособные группы полипептида. Обычно они образуются из боковых цепей определенных аминокислот, содержащихся в полипептидном полимере.

Реакционноспособные группы представляют собой группы, способные образовывать ковалентную связь с молекулярным каркасом. Как правило, реакционноспособные группы присутствуют на боковых цепях аминокислот пептида. Примерами являются лизин, аргинин, гистидин и серосодержащие группы, такие как цистеин, метионин, а также аналоги, такие как селеноцистеин.

В одном варианте осуществления указанные реакционноспособные группы содержат цистеин.

Примерами реакционноспособных групп природных аминокислот являются тиольная группа цистеина, аминогруппа лизина, карбоксильная группа аспартата или глутамата, гуанидиновая группа аргинина, фенольная группа тирозина или гидроксильная группа серина. Неприродные аминокислоты могут обеспечивать широкий спектр реакционноспособных групп, включая азидную, кетокarbонильную, алкиновую, винильную или арилгалогенидную группу. Амино- и карбоксильные группы на концах полипептида также могут служить реакционноспособными группами для образования ковалентных связей с молекулярным каркасом/молекулярным ядром.

Полипептиды по настоящему изобретению содержат по меньшей мере три реакционноспособные группы. Указанные полипептиды также могут содержать четыре

или более реакционноспособных групп. Чем больше реакционноспособных групп используется, тем больше петель может образоваться в молекулярном каркасе.

В предпочтительном варианте осуществления образуются полипептиды с тремя реакционноспособными группами. Реакция указанных полипептидов с молекулярным каркасом/молекулярным ядром, имеющим тройную симметрию вращения, приводит к образованию единственного конечного изомера. Образование единственного конечного изомера благоприятно по нескольким причинам. Нуклеиновые кислоты библиотек соединений кодируют только первичные последовательности полипептида, но не изомерное состояние молекул, образующихся при реакции полипептида с молекулярным ядром. Если может образоваться только один конечный изомер, четко определено отнесение нуклеиновой кислоты к конечному изомеру. Если образуется несколько конечных изомеров, нуклеиновая кислота не может дать информацию о природе конечного изомера, который был выделен в процессе скрининга или отбора. Образование единственного конечного изомера также благоприятно, если синтезируется конкретный член библиотеки по настоящему изобретению. В этом случае химическая реакция полипептида с молекулярным каркасом дает единственный конечный изомер, а не смесь изомеров.

В другом варианте осуществления изобретения получают полипептиды с четырьмя реакционноспособными группами. Реакция указанных полипептидов с молекулярным каркасом/молекулярным ядром, имеющим тетраэдрическую симметрию, приводит к образованию двух конечных изомеров. Несмотря на то, что два разных конечных изомера кодируются одной и той же нуклеиновой кислотой, изомерная природа выделенного изомера может быть определена путем химического синтеза обоих изомеров, разделения двух изомеров и тестирования обоих изомеров на связывание с лигандом-мишенью.

В одном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна из реакционноспособных групп полипептидов перпендикулярна остальным реакционноспособным группам. Использование перпендикулярных реакционноспособных групп позволяет направлять указанные перпендикулярные реакционноспособные группы к определенным участкам молекулярного ядра. Стратегии связывания, в которых используются перпендикулярные реакционноспособные группы, можно применять для ограничения количества образующихся конечных изомеров. Другими словами, путем выбора неодинаковых или различных реакционноспособных групп по меньшей мере для одной или более из трех связей, которые выбраны для оставшихся по меньшей мере трех связей, может быть эффективно достигнут определенный порядок связывания или

направления конкретных реакционноспособных групп полипептида к конкретным положениям на молекулярном каркасе.

В другом варианте осуществления реакционноспособные группы полипептида по изобретению взаимодействуют с молекулярными линкерами, при этом указанные линкеры способны взаимодействовать с молекулярным каркасом, таким образом, что в конечном связанном состоянии линкер будет находиться между молекулярным каркасом и полипептидом.

Альтернативы конъюгатам с участием тиола могут быть использованы для присоединения молекулярного каркаса к пептиду посредством ковалентных взаимодействий. В качестве альтернативы эти методики могут быть использованы для модификации или присоединения дополнительных функциональных групп (например, представляющих интерес молекул с низкой молекулярной массой, которые отличаются от молекулярного каркаса) к полипептиду после того, как они были отобраны или выделены в соответствии с настоящим изобретением – в этом варианте осуществления тогда очевидно, что присоединение не обязательно должно быть ковалентным и может включать нековалентное присоединение. Эти способы могут быть использованы вместо способов с участием тиола (или в сочетании), путем получения фага, который отображает белки и пептиды, несущие неприродные аминокислоты с необходимыми химическими реакционноспособными группами, в сочетании с молекулами с низкой молекулярной массой, которые несут комплементарную реакционноспособную группу, или путем включения неприродных аминокислот в химически или рекомбинантно синтезированный полипептид, когда молекула создается после фазы селекции/выделения. Дополнительные подробности можно найти в WO 2009/098450 или Heinis, et al., *Nat Chem Biol* **2009**, 5 (7), 502-7.

Следует понимать, что петлевая бициклическая пептидная структура дополнительно присоединена к молекулярному каркасу по меньшей мере через одну тиоэфирную связь. Тиоэфирная связь обеспечивает якорь во время образования бициклических пептидов. В одном варианте осуществления имеется только одна такая тиоэфирная связь. В дополнительных вариантах осуществления имеется одна такая тиоэфирная связь и две аминосвязи. В дополнительных вариантах осуществления имеется одна такая тиоэфирная связь и две алкиламиносвязи. Соответственно, тиоэфирная связь представляет собой центральную связь бициклического или полициклического пептидного конъюгата, т.е. в пептидной последовательности два остатка (например, остатки диаминопропионовой кислоты), образующие аминосвязи в пептиде, отделены от аминокислотного остатка и расположены по обе стороны от него (например, лизин),

образуя тиоэфирную связь. Таким образом, петлевая пептидная структура представляет собой бициклический пептидный конъюгат, имеющий центральную тиоэфирную связь и две периферические аминосвязи. В некоторых вариантах осуществления размещение тиоэфирной связи может быть N-концевым или C-концевым по отношению к двум N-алкиламино связям.

В одном варианте осуществления реакционноспособные группы содержат один остаток цистеина и два остатка L-2,3-диаминопропионовой кислоты (Dap) или N-бета-C₁₋₄ алкил-L-2, 3-диаминопропионовой кислоты (N-AlkDap).

Неароматический молекулярный каркас

Ссылки в настоящем документе на термин «неароматический молекулярный каркас» относятся к любому молекулярному каркасу, определенному в настоящем документе, который не содержит ароматическую (т.е. ненасыщенную) карбоциклическую или гетероциклическую кольцевую систему.

Подходящие примеры неароматических молекулярных каркасов описаны у *Heinis et al (2014) Angewandte Chemie, International Edition 53(6) 1602-1606*.

Как отмечалось в предшествующих документах, молекулярный каркас может представлять собой молекулу с низкой молекулярной массой, например, органическую молекулу с низкой молекулярной массой.

В одном варианте осуществления молекулярный каркас может представлять собой макромолекулу. В одном варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой макромолекулу, состоящую из аминокислот, нуклеотидов или углеводов.

В одном варианте осуществления молекулярный каркас содержит реакционноспособные группы, которые способны взаимодействовать с функционально активной группой (группами) полипептида с образованием ковалентных связей.

Молекулярный каркас может содержать химические группы, которые образуют связь с пептидом, такие как амины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, нитрилы, карбоновые кислоты, сложные эфиры, алкены, алкины, азиды, ангидриды, сукцинимиды, малеимиды, алкилгалогениды и ацил галогениды.

Примером соединения, содержащего αβ ненасыщенный карбонил является 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) (*Angewandte Chemie, International Edition (2014), 53(6), 1602-1606*).

Дополнительные агенты

В одном варианте осуществления указанный лекарственный конъюгат дополнительно конъюгирован с одним или несколькими активными агентами.

Примеры подходящих «активных» агентов включают любой подходящий агент, способный осуществлять клеточную активность при связывании бициклического пептидного комплекса с его мишенью. Такие агенты включают молекулы с низкой молекулярной массой, ингибиторы, агонисты, антагонисты, частичные агонисты и антагонисты, обратные агонисты и антагонисты и цитотоксические агенты.

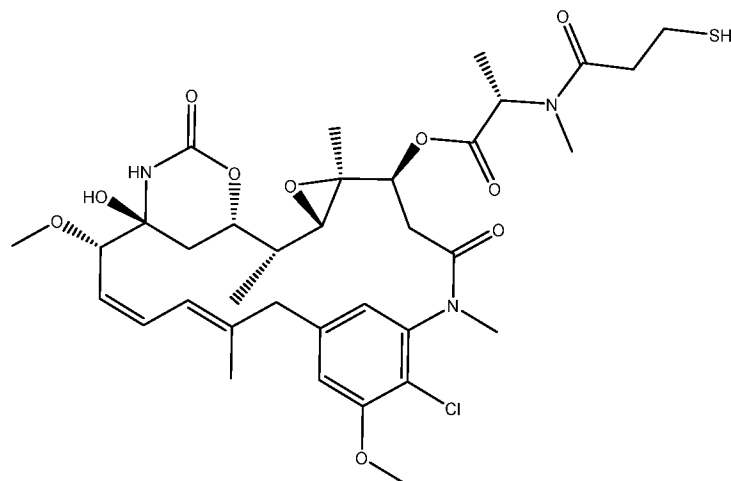
Еще в одном варианте осуществления указанный лекарственный конъюгат дополнительно конъюгирован с одним или несколькими цитотоксическими агентами.

Таким образом, в соответствии со вторым аспектом изобретения предложен конъюгат лекарственного средства, содержащий один или несколько цитотоксических агентов, конъюгированных по меньшей мере с двумя пептидными лигандами, которые могут быть одинаковыми или разными, каждый из которых содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и неароматический молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида, таким образом, что на молекулярном каркасе образуются по меньшей мере две полипептидные петли.

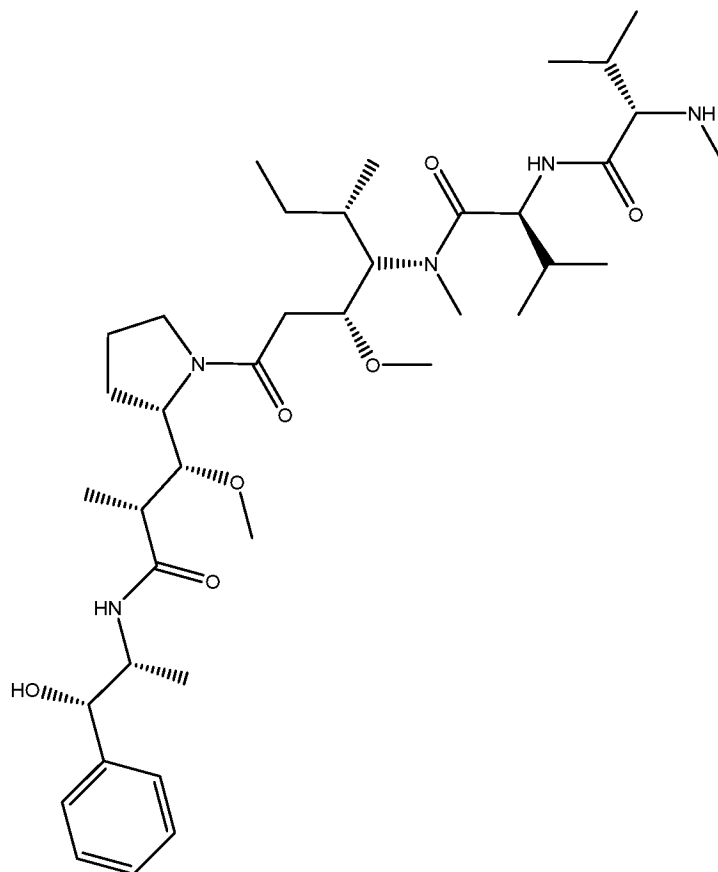
Подходящие примеры цитотоксических агентов включают: алкилирующие агенты, такие как цисплатин и карбоплатин, а также оксалиплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, ифосфамид; антиметаболиты, включая аналоги пурина, азатиоприн и меркаптопурин или аналоги пиримидина; растительные алкалоиды и терпеноиды, включая алкалоиды барвинка, такие как винкристин, винбластин, винорелбин и виндезин; подофиллотоксин и его производные этопозид и тенипозид; таксаны, включая паклитаксел, первоначально известный как таксол; ингибиторы топоизомеразы, включая камптотецины: иринотекан и топотекан, и ингибиторы II типа, включая амсакрин, этопозид, этопозидфосфат и тенипозид. Другие агенты могут включать противоопухолевые антибиотики, которые включают иммунодепрессант дактиномицин (который используется при трансплантации почки), доксорубицин, эпирубицин, блеомицин, калихеамицины и другие.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения цитотоксический агент выбран из майтанзиноидов (например, DM1) или монометилауристатинов (например, MMAE).

DM1 представляет собой цитотоксический агент, который представляет собой тиол-содержащее производное майтанзина и имеет следующую структуру:



Монометилауристатин Е (ММАЕ) представляет собой синтетическое противоопухолевое средство и имеет следующую структуру:



В еще одном конкретном варианте осуществления изобретения цитотоксический агент представляет собой (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)-N,3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метиламино)бутанамида)бутанамид (монометилауристатин Е; MMAE).

В одном варианте осуществления цитотоксический агент связан с бициклическим пептидом расщепляемой связью, такой как дисульфидная связь или чувствительная к протеазе связь. В другом варианте осуществления группы, соседние с дисульфидной

связью, модифицируют для контроля блокировки дисульфидной связи и посредством этого скорости расщепления и сопутствующего высвобождения цитотоксического агента.

Опубликованная работа установила возможность модификации подверженности дисульфидной связи к восстановлению путем введения стерических затруднений по обе стороны от дисульфидной связи (Kellogg et al (2011) *Bioconjugate Chemistry*, 22, 717). Большая степень стерических затруднений снижает скорость восстановления внутриклеточным глутатионом, а также внеклеточными (системными) восстанавливающими агентами, следовательно, снижая легкость высвобождения токсина как внутри, так и вне клетки. Таким образом, выбор оптимальной дисульфидной стабильности в кровообращении (что сводит к минимуму нежелательные побочные эффекты токсина) по сравнению с эффективным высвобождением во внутриклеточную среду (что максимизирует терапевтический эффект) может быть достигнут тщательным подбором степени изоляции с каждой стороны дисульфидной связи.

Блокировка на любой стороне дисульфидной связи модулируется путем введения одной или нескольких метильных групп либо на нацеливаемом объекте (здесь бициклический пептид), либо на стороне токсина молекулярной конструкции.

В одном варианте осуществления цитотоксический агент и линкер выбирают из любых комбинаций, описанных WO 2016/067035 (цитотоксические агенты и их линкеры включены в настоящее описание посредством ссылки).

В одном варианте осуществления линкер между указанным цитотоксическим агентом и указанным бициклическим пептидом содержит один или несколько аминокислотных остатков. Примеры подходящих аминокислотных остатков в качестве подходящих линкеров включают Ala, Cit, Lys, Trp и Val. В другом варианте осуществления линкер между указанным цитотоксическим агентом и указанным бициклическим пептидом содержит фрагмент Val-Cit. В другом варианте осуществления линкер между указанным цитотоксическим агентом и указанным бициклическим пептидом содержит фрагмент β -Ala.

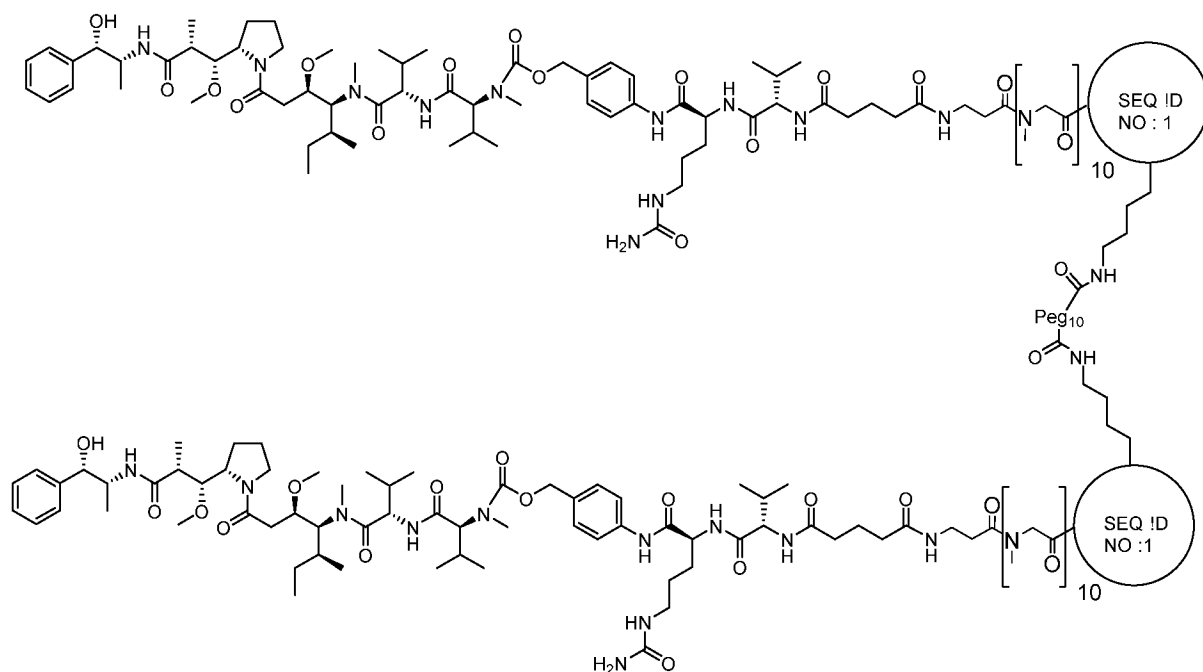
В одном варианте осуществления линкер между указанным цитотоксическим агентом и указанным бициклическим пептидом содержит п-аминобензилкарбамат (PABC).

В одном варианте осуществления линкер между указанным цитотоксическим агентом и указанным бициклическим пептидом содержит глутарильный фрагмент.

В одном варианте осуществления линкер между указанным цитотоксическим агентом и указанным бициклическим пептидом содержит один или несколько (например, 10) остатков саркозина (Sar).

Еще в одном варианте осуществления линкер между указанным цитотоксическим агентом и указанным бициклическим пептидом содержит -PABC-Val-Cit-Glu- β Ala-Sar₁₀-линкер, где указанные бициклические пептиды присоединены по обоим остаткам лизина через фрагмент PEG₁₀ (то есть, полученный в результате лекарственный конъюгат с бициклическим пептидом содержит (фрагмент MMAE-PABC-Val-Cit-Glu- β Ala-Sar₁₀-бициклический пептид)-PEG₁₀-(бициклический пептид -Sar₁₀- β Ala-Glu-Cit-Val-PABC-MMAE)).

В одном варианте осуществления указанный конъюгат содержит два бициклических пептида, оба бициклических пептида являются специфичными в отношении нектин-4 (то есть гомотандем нектин-4), цитотоксический агент представляет собой MMAE и лекарственный конъюгат содержит соединение формулы (A):



BCY00008244

(A)

BDC формулы (A) известен здесь как BCY8244. Данные представлены в настоящем описании в Таблице 1, которые показали, что BCY8244 демонстрировал хорошие уровни связывания в анализе связывания SPR. В частности, гомотандемный нектин-4 BCY8244 продемонстрировал 3,5 раз большую связывающую активность в анализе связывания SPR, чем мономерный нектин-4 бициклический пептид BCY8126. Данные также представлены на Фигуре 1 и Таблицах 4 и 5, которые показали, что

BCY8244 эффективно вызывал регрессию опухолей в ксенотрансплантатной модели H292.

Синтез

Пептиды по настоящему изобретению могут быть получены синтетическим путем с помощью стандартных методов с последующей реакцией с молекулярным каркасом *in vitro*. При осуществлении этого, могут быть использованы стандартные химические способы. Это обеспечивает быстрое получение в большом масштабе растворимого вещества для дополнительных дальнейших экспериментов или оценки. Такие способы могут быть выполнены с использованием общепринятых химических способов, например, описанных у Timmerman *et al* (*supra*).

Таким образом, настоящее изобретение также относится к производству полипептидов или конъюгатов, выбранных, как указано в настоящем описании, при этом производство включает необязательные дополнительные стадии, как описано ниже. В одном варианте осуществления эти стадии осуществляют на конечном продукте полипептиде/конъюгате, полученном химическим синтезом.

Необязательно аминокислотные остатки в полипептиде, представляющем интерес, могут быть замещены при производстве конъюгата или комплекса.

Пептиды также можно удлинить для включения, например, другой петли, и, следовательно, введения множества специфичностей.

Чтобы удлинить пептид, его можно просто удлинить химически на его N-конце или С-конце или внутри петель, используя ортогонально защищенные лизины (и аналоги), используя стандартные химические методы твердой фазы или фазы раствора. Для введения активированного или активируемого N- или С-конца можно использовать стандартные методы (био)конъюгации. Альтернативно добавления могут быть сделаны путем конденсации фрагментов или нативного химического лигирования, например, как описано в (Dawson *et al.* 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science 266:776-779), или с помощью ферментов, например, с использованием субтилигазы, как описано в (Chang *et al.* Proc Natl Acad Sci US A. 1994 Dec 20; 91(26):12544-8. или у Hikari *et al* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003).

Альтернативно, пептиды можно удлинить или модифицировать с помощью дальнейшей конъюгации через дисульфидные связи. Это имеет дополнительное преимущество, заключающееся в том, что первый и второй пептиды могут один раз диссоциировать друг от друга в восстанавливающей среде клетки. В этом случае молекулярный каркас (например, ТАТА) может быть добавлен во время химического

синтеза первого пептида, для взаимодействия с тремя цистеиновыми группами; затем к N- или C-концу первого пептида может быть присоединен дополнительный цистеин или тиол, таким образом, что этот цистеин или тиол взаимодействуют только со свободным цистеином или тиолом второго пептида, образуя дисульфид-связанный бициклический пептид-пептидный конъюгат.

Аналогичные методики в равной степени применимы к синтезу/соединению двух бициклических и биспецифических макроциклов, потенциально создавая тетраспецифическую молекулу.

Более того, добавление других функциональных групп или эффекторных групп может осуществляться тем же образом с использованием подходящих химических методов, соединяя на N- или C-конце или через боковые цепи. В одном варианте осуществления соединение проводят таким образом, что оно не блокирует активность ни одной структуры.

Фармацевтические композиции

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства, как определено в этом описании, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В основном пептидные лиганды по настоящему изобретению будут использоваться в очищенной форме вместе с фармакологически приемлемыми эксципиентами или носителями. Как правило, эти эксципиенты или носители включают водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и/или буферные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия и раствор Рингера с лактатом. Подходящие физиологически приемлемые адъюванты, если необходимо удерживать полипептидный комплекс в суспензии, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Внутривенные носители включают наполнители жидкости и питательных веществ, а также наполнители электролитов, например, на основе декстрозы Рингера. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные препараты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition).

Пептидные лиганды по настоящему изобретению могут быть использованы в виде отдельно вводимых композиций или в сочетании с другими агентами. Они могут включать антитела, фрагменты антител и различные иммунотерапевтические

лекарственные средства, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин и иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать «коктейли» различных цитотоксических или других агентов в сочетании с белковыми лигандами по настоящему изобретению или даже комбинации выбранных полипептидов по настоящему изобретению, обладающих различной специфичностью, таких как полипептиды, выбранные с использованием разных лигандов-мишеней, независимо от того, объединены ли они или нет до введения.

Путь введения фармацевтических композиций по изобретению может быть любым из широко известных специалистам в данной области. Для лечения пептидные лиганды по изобретению можно вводить любому пациенту в соответствии со стандартными методиками. Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, включая парентеральный, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, чрескожный, легочный путь или также, соответственно, путем прямой инфузии через катетер. Предпочтительно фармацевтические композиции по изобретению будут введены путем ингаляции. Дозировка и частота введения будут зависеть от возраста, пола и состояния пациента, одновременного приема других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые должен принимать во внимание лечащий врач.

Пептидные лиганды по данному изобретению могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в подходящем носителе перед использованием. Было показано, что этот метод эффективен, и можно использовать известные в данной области методы лиофилизации и восстановления. Специалистам в данной области должно быть понятно, что лиофилизация и восстановление могут привести к различной степени потери активности и что для компенсации эти уровни могут быть скорректированы в большую сторону.

Композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их смесь, можно вводить для профилактического и/или терапевтического лечения. В некоторых терапевтических применениях адекватное количество для осуществления 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, но обычно находятся в диапазоне от 0,005 до 5,0 мг выбранного пептидного лиганда на килограмм массы тела с более часто используемыми дозами от 0,05 до 2,0 мг/кг/доза. Для профилактических применений композиции, содержащие

пептидные лиганды по настоящему изобретению, или их смеси, также можно вводить в аналогичных или несколько меньших дозировках.

Композиция, содержащая пептидный лиганд по настоящему изобретению, может быть использована в профилактических и терапевтических целях облегчения, изменения, инактивации, уничтожения или удаления выбранной популяции клеток-мишеней у млекопитающего. Кроме того, описанные здесь 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 можно объединить экстракорпорально с выбранными пептидными лигандами, посредством чего нежелательные клетки уничтожаются или иным образом удаляются из крови для возвращения млекопитающему в соответствии со стандартными методиками.

Терапевтические применения

Благодаря присутствию цитотоксического агента конъюгаты лекарственного средства по изобретению особенно применимы при лечении заболеваний, которые можно облегчить за счет гибели клеток. Примеры подходящих заболеваний включают заболевания, характеризующиеся поврежденными типами клеток, пролиферативными нарушениями, такими как злокачественные заболевания, и аутоиммунными нарушениями, такими как ревматоидный артрит.

Благодаря присутствию цитотоксического агента, соединенного с бициклическим пептидом, связывающимся со злокачественными клетками, бициклические пептиды по изобретению особенно используются при лечении злокачественных заболеваний. Таким образом, в соответствии с еще одним аспектом изобретения предлагается конъюгат лекарственного средства, как определено в настоящем описании, для применения в профилактике, подавлении или лечении злокачественного заболевания (такого как опухоль).

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложен способ профилактики, подавления или лечения злокачественного заболевания (такого как опухоль), который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, описанного здесь конъюгата лекарственного средства.

Примеры злокачественных заболеваний (и их доброкачественных аналогов), которые можно лечить (или подавлять), включают, помимо прочего, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциному, плоскоклеточный рак, переходно-клеточный рак и другие виды рака), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевыводящих путей, молочной железы,

желудочно-кишечного тракта (включая пищевод, желудок, тонкую кишку, толстую кишку, прямую кишку и анус), печени (гепатоцеллюлярная карцинома), желчного пузыря и желчевыводящих путей, экзокринной части поджелудочной железы, почек, легких (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легких, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), головы и шеи (например, рак языка, ротовой полости, гортани, глотки, носоглотки, миндалин, слюнных желез, носовой полости) и околоносовых пазух), яичника, фаллопиевых труб, брюшины, влагалища, вульвы, полового члена, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярная карцинома щитовидной железы), надпочечника, предстательной железы, кожи и придатков (например, меланома, базально-клеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, кератоакантома, диспластический невус); гематологические злокачественные новообразования (т.е. лейкозы, лимфомы) и предраковые гематологические заболевания и пограничные злокачественные заболевания, включая гематологические злокачественные новообразования и родственные состояния лимфоидного происхождения (например, острый лимфолейкоз [OLL], хронический лимфоцитарный лейкоз [CLL], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, мантийно-клеточная лимфома, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы естественных киллеров [NK], лимфомы Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, моноклональная гаммапатия неопределенного значения, плазмодитомы, множественные миеломы и посттрансплантационные лимфопролиферативные заболевания), а также гематологические злокачественные новообразования и родственные состояния миелоидного генеза (например, острый миелогенный лейкоз [AML], хронический миелогенный лейкоз [CML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелопролиферативные заболевания, такие как истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелопролиферативный синдром, миелодиспластический синдром и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимального происхождения, например, саркомы мягких тканей, костей или хрящей, такие как остеосаркомы, фибросаркомы, хондросаркомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, саркома Капоши, саркома Юинга, синовиальные саркомы, эпителиоидные саркомы, гастроинтестинальные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные гистиоцитомы и выбухающие дерматофибросаркомы; опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитомы, глиомы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, опухоли шишковидной железы и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли

гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островковых клеток, опухоли парашитовидной железы, карциноидные опухоли и медуллярная карцинома щитовидной железы); опухоли глаза и придатков (например, ретинобластома); зародышевые клетки и трофобластические опухоли (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы, пузырьные заносы и хориокарциномы); и детские и эмбриональные опухоли (например, медуллобластома, нейробластома, опухоль Вильмса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, которые делают пациента восприимчивым к злокачественным новообразованиям (например, пигментная ксеродерма).

Еще в одном варианте осуществления злокачественное заболевание выбрано из рака молочной железы, рака легкого, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака печени, глиобластомы и ангиогенеза.

В настоящем описании ссылки на термин «профилактика» включают введение профилактической композиции до развития заболевания. «Подавление» относится к введению композиции после момента развития, но до клинического проявления заболевания. «Лечение» включает введение протективной композиции после проявления симптомов заболевания.

Доступны модельные системы животных, которые можно использовать для проверки эффективности пептидных лигандов в профилактике или лечении заболевания. Использование модельных систем, осуществляемое с использованием настоящего изобретения, позволяет разрабатывать полипептидные лиганды, которые могут перекрестно реагировать с мишенями человека и животных, что позволяет использовать животные модели.

Изобретение дополнительно описано ниже со ссылкой на следующие примеры.

Примеры

Сокращения

Сокращение	Название	Название исходного вещества	Поставщик	Номер по каталогу
1NAI	1-нафтилаланин	Fmoc-3-(1-нафтил)-L-аланин	Fluorochem	96402-49-2
β -Ala	β -аланин	Fmoc- β -аланин	Fluorochem	35737-10-1
Sar	Саркозин, такой что Sar _x	Fmoc-саркозин-ОН	Sigma	77128-70-2

	представляет х остатков Sar			
tBuGly	Трет-лейцин	Фмос-L-трет-лейцин	Fluorochem	132684-60-7

Материалы и методы

Пептидный синтез

Синтез пептидов был основан на химических методах с Фмос с использованием синтезатора пептидов Symphony производства Peptide Instruments и синтезатора Sygo II от MultiSynTech. Были использованы стандартные Фмос-аминокислоты (Sigma, Merck) с соответствующими защитными группами боковых цепей: там, где это применимо, в каждом случае использовали стандартные условия связывания с последующим снятием защиты с использованием стандартной методики.

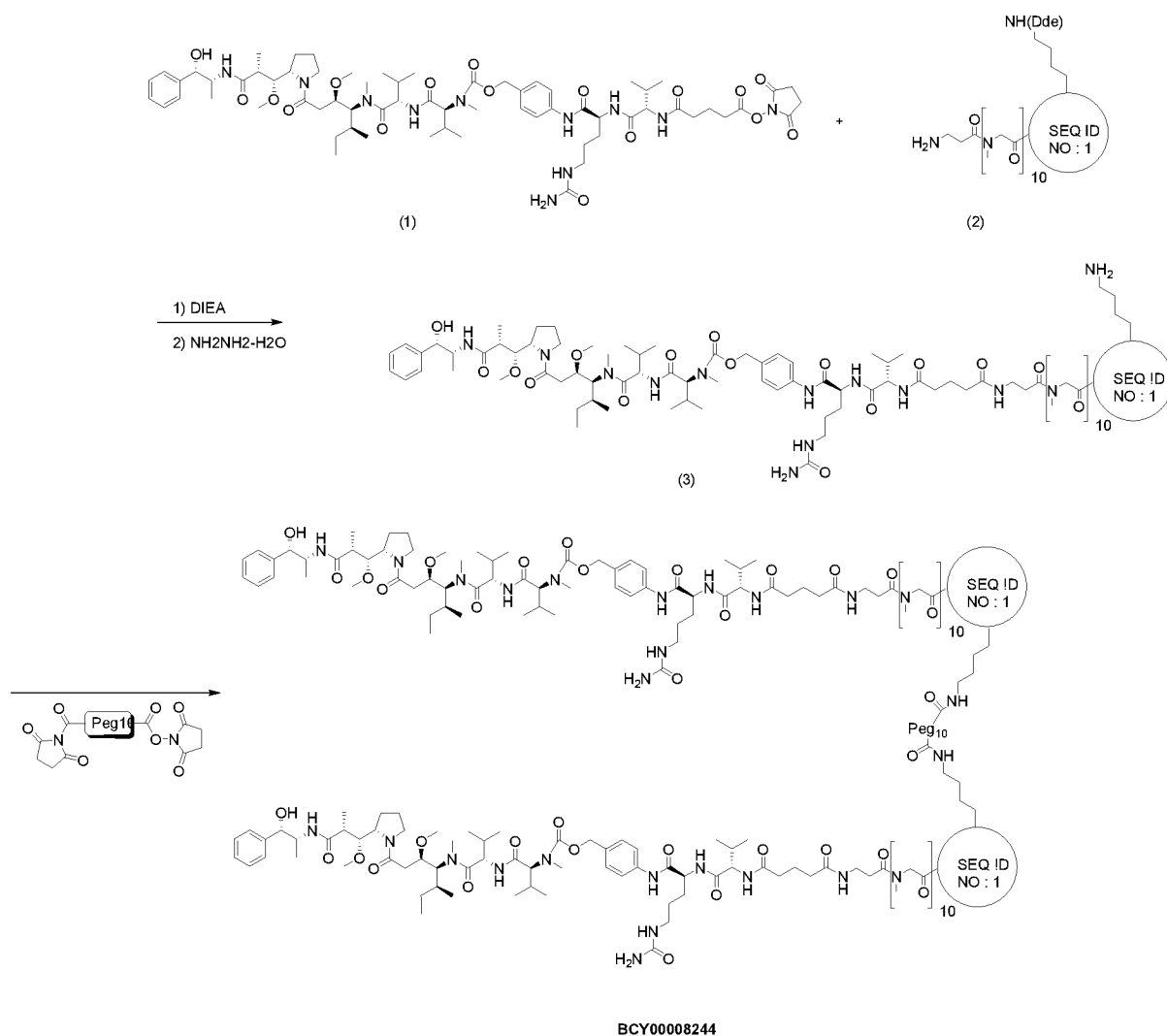
Альтернативно, пептиды очищали с помощью HPLC и после выделения их модифицировали с использованием 1,3,5-триакрилоилгексагидро-1,3,5-триазин (ТАТА, Sigma). Для этого, линейный пептиды разбавляли с использованием 50:50 MeCN:H₂O до ~35 мл, добавляли ~500 мкл 100 мМ ТАТА в ацетонитриле и эту реакцию инициировали с использованием 5 мл 1М NH₄HCO₃ в H₂O. Реакцию проводили в течение ~30 -60 минут при комнатной температуре, и лиофилизировали по завершении реакции (исходя из данных MALDI). По завершении добавляли 1 мл 1М моногидрата L-цистеина гидрохлорида (Sigma) в H₂O для взаимодействия в течение ~60 минут при комнатной температуре, чтобы погасить любой избыток ТАТА.

После лиофилизации модифицированный пептид очищали, как описано выше, при этом заменяя колонку Luna C8 колонкой Gemini C18 (Phenomenex), и заменяя кислоту на 0,1% трифторуксусную кислоту. Чистые фракции, содержащие надлежащее ТАТА-модифицированное вещество, собирали, лиофилизировали и держали при -20°C для хранения.

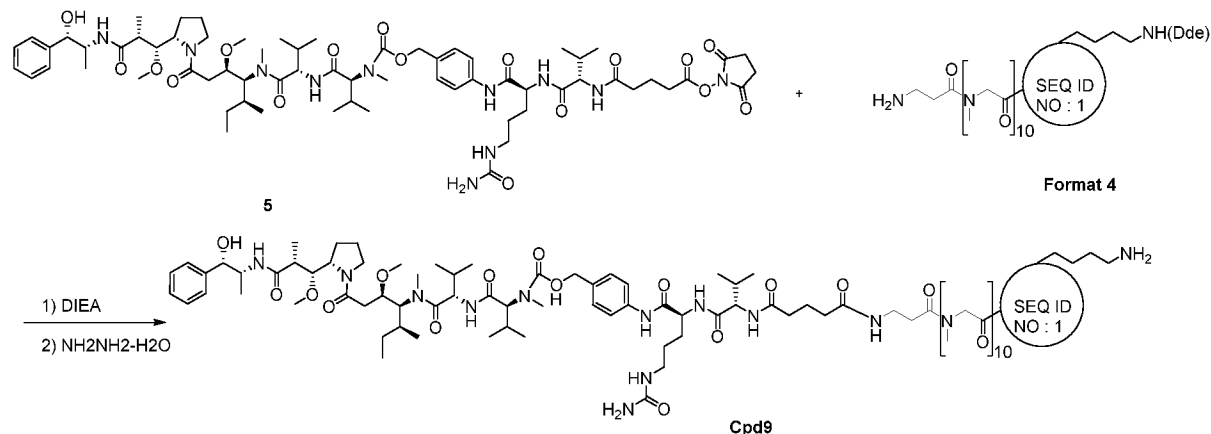
Все аминокислоты, если не указано иное, были использованы в L-конфигурациях.

В некоторых случаях пептиды превращают в активированные дисульфиды перед соединением со свободной тиольной группой токсина с использованием следующего метода: раствор 4-метил(сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноата) (100 мМ) в сухом DMSO (1,25 моль-экв) добавляли к раствору пептида (20 мМ) в сухом DMSO (1 моль-экв). Реакционную смесь хорошо перемешивали и добавляли DIPEA (20 моль-экв). Реакцию контролировали с помощью LC/MS до завершения.

Получение BCY8244



Общая методика получения Соединения 3



К раствору Соединения 2 (216,11 мг, 67,44 мкмоль, 1,0 экв) в DMA (5 мл) добавляли DIEA (26,15 мг, 202,31 мкмоль, 35,24 мкл, 3,0 экв) и Соединение 1 (0,090 г, 67,44 мкмоль, 1,0 экв). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 часов. LC-MS показала, что Соединение 1 было полностью расходувано, и был обнаружен один основной пик с желаемым соотношением масса/заряд.

Добавляли гидрат гидразина (154,50 мг, 3,09 ммоль, 0,15 мл, 45,88 экв). Смесь

перемешивали при 25°C в течение 15 мин. LC-MS показала, что промежуточное вещество cpd9 было полностью расходувано, и был обнаружен один основной пик с желаемым соотношением масса/заряд. Реакционную смесь напрямую очищали с помощью препаративной HPLC (нейтральные условия). Соединение **3** (0,192 г, 46,47 мкмоль, 69,08% выход) было получено в виде твердого вещества белого цвета. LCMS m/z найденное 1378,1 $[M+H]^3+$, RT = 0,82 мин.

Общая методика получения BCY8244

К раствору соединения **3** (0,192 г, 46,47 мкмоль, 3,0 экв) в DMA (2 мл) добавляли DIEA (8,01 мг, 61,96 мкмоль, 10,79 мкл, 4,0 экв) и NHS-PEG10-NHS (11,66 мг, 15,49 мкмоль, 1,0 экв). Смесь перемешивали при 20°C в течение 16 часов. LC-MS показала, что соединение **3** было полностью расходувано и был обнаружен один основной пик с желаемым соотношением масса/заряд. Реакционную смесь напрямую очищали с помощью препаративной HPLC (условие TFA). Соединение **BCY8244** (0,0354 г, 3,84 мкмоль, 24,81% выход, 95,4% чистота) получали в виде твердого вещества белого цвета. LCMS m/z найденное 1758,2 $[M+H]^5+$, RT = 1,1 мин.

Данные

Biacore SPR анализ связывания нектин-4

Эксперименты Biacore проводили для определения значений k_a ($M^{-1}s^{-1}$), k_d (s^{-1}), K_D (нМ) связывания мономерных пептидов с белком нектин-4 человека (полученным от Charles River).

Нектин-4 человека (остатки Gly32-Ser349; NCBI RefSeq: NP_112178.2) с сигнальной последовательностью gp67 и С-концевым FLAG-маркером клонировали в pFastbac-1 и бакуловирус, полученный с использованием стандартных протоколов Bac-to-Bac™ (Life Technologies). Клетки Sf21 с $1 \times 10^6 \text{ мл}^{-1}$ в среде Excell-420 (Sigma) при 27°C инфицировали с MOI 2 с вирусным материалом P1, и супернатант собирали через 72 часа. Супернатант связывали порциями в течение 1 часа при 4°C с использованием аффинной агарозной смолы Anti-FLAG M2 (Sigma), промытой в PBS, а затем смолу переносили в колонку и тщательно промывали PBS. Белок элюировали с использованием 100 мкг/мл FLAG пептида. Элюированный белок концентрировали до 2 мл и наносили на колонку S-200 Superdex (GE Healthcare) в PBS со скоростью 1 мл/мин. Собирали фракции по 2 мл и фракции, содержащие белок нектин-4, концентрировали до 16 мг/мл.

Белок подвергали случайному биотинилированию в PBS с использованием реагента EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Fisher) в соответствии с протоколом,

предложенным производителем. Белок тщательно обессоливали для удаления несвязанного биотина с использованием центрифужных колонок в PBS.

Для анализа связывания пептидов использовали прибор Biacore 3000 с чипом CM5 (GE Healthcare). Стрептавидин иммобилизовали на чипе с использованием стандартных химических методов связывания аминов при 25°C с HBS-N (10 mM HEPES, 0,15 M NaCl, pH 7,4) в качестве рабочего буфера. Вкратце, поверхность карбоксиметилдекстрана активировали 7-минутной инъекцией 0,4 M 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорида (EDC)/0,1M N-гидроксисукцинимид (NHS) в соотношении 1:1 при скорости потока 10 мкл/мин. Для захвата стрептавида белок разводили до 0,2 мг/мл в 10 mM ацетате натрия (pH 4,5) и захватывали путем инъекции 120 мкл стрептавида на поверхность активированного чипа. Остаточные активированные группы блокировали 7-минутной инъекцией 1 M этаноламина (pH 8,5) и биотинилированный нектин-4 улавливали до уровня 1200-1800 RU. Буфер заменяли на PBS/0,05% Tween 20 и готовили серию разведений пептидов в этом буфере с конечной концентрацией DMSO 0,5%. Максимальная концентрация пептида составляла 100 нМ с последующими 6 двукратными разведениями. SPR-анализ проводили при 25°C со скоростью потока 50 мкл/мин с 60-секундной ассоциацией и диссоциацией от 400 до 1200 секунд в зависимости от индивидуального пептида. Данные были скорректированы с учетом исключенных объемных эффектов DMSO. Все данные были дважды соотнесены для контрольных инъекций и эталонной поверхности с использованием стандартных процедур обработки, а обработку данных и кинетическую аппроксимацию проводили с использованием программного обеспечения Scrubber, версия 2.0с (программное обеспечение BioLogic). Данные были аппроксимированы с использованием простой модели связывания 1:1 с учетом эффектов массового переноса, где это необходимо.

BCY8244 (а также входящий в его состав мономерный нектин-4 бициклический пептид, BCY8126) были протестированы в вышеупомянутых анализах связывания нектина-4, и результаты показаны в таблице 1:

Таблица 1

Пептид	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (нМ)
BCY8126 (нектин-4 мономер)	6,62e5	9,69e-4	1,46
BCY8244 (нектин-4 гомотандем)	7,50e5	3,19e-4	0,425

Исследование эффективности BCY8244 *in vivo* при воздействии на ксенотрансплантат NCI-H292 у бестимусных мышей Balb/c

1. Цель исследования

Целью исследования является оценка противоопухолевой эффективности BCY8244 *in vivo* при воздействии на ксенотрансплантат NCI-H292 у бестимусных мышей Balb/c.

2. План исследования

Таблица 2

Группа	Обработка	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь введения	Режим введения
1	Носитель	4	--	10	в/в	Раз в неделю
2	BCY8244	3	3	10	в/в	Раз в неделю

3. Материалы

3.1 Животные и условия содержания

3.1.1. Животные

Вид: Mus Musculus

Линия: Balb/c nude

Возраст: 6-8 недель

Пол: самка

Масса тела: 18-22 г

Количество животных: 43 мыши плюс резерв

Поставщик животных: Shanghai Lingchang Biotechnology Experimental Animal Co. Ltd

3.1.2. Условия содержания

Мышей содержали в индивидуальных вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности по 3 или 4 животных в каждой клетке.

- Температура: 20~26 °C.
- Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер 300 мм x 180 мм x 150 мм. В качестве подстилки используется кукурузный початок, который меняют два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в течение всего периода исследования.

Вода: Животные имели свободный доступ к стерильной питьевой воде.

Идентификация клетки: Идентификационные этикетки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер исследования, номер группы и дата начала лечения.

Идентификация животных: животных маркировали ушным кодированием.

3.2 *Тестируемый образец и положительный контроль*

Идентификатор продукта: **BCY00008244**

Производитель: Bicycle Therapeutics

Номер лота: 1

Физическое описание: лиофилизированный порошок.

Молекулярный вес: 8786,4

Чистота: 95,00%

Упаковка и условия хранения: хранить при температуре -80°C.

4. Экспериментальные методы и методики проведения

4.1 *Клеточная культура*

Опухолевые клетки NCI-H292 поддерживали *in vitro* в виде монослойной культуры в среде RPMI-1640 с добавлением 10% термоинактивированной эмбриональной сыворотки теленка при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки обычно дважды в неделю пересеивали путем обработки трипсин-ЭДТА. Клетки, растущие в фазе экспоненциального роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

4.2 *Инокуляция опухоли*

Каждой мыши инокулировали подкожно в правый бок опухолевые клетки NCI-H292 (10×10^6) в 0,2 мл PBS для развития опухоли. 43 животных были распределены по группам случайным образом, когда средний объем опухоли достиг 168 мм³. Введение тестируемого образца и число животных в каждой группе было показано в таблице плана эксперимента.

4.3 *Подготовка рецептуры тестируемого образца*

Таблица 3

Обработка	Конц. (мг/мл)	Рецептура
Носитель	--	25 mM гистидина pH 7 10% сахарозы
BCY8244	1	Расстворено 1,1 мг BCY8244 в 1045 мкл буфера-носителя
BCY8244	0,3	Разбавление 240 мкл 1 мг/мл рабочего раствора BCY8244 560 мкл буфера-носителя

4.4 Результаты наблюдений

Все процедуры, относящиеся к содержанию животных, уходу и лечению в этом исследовании проводили в соответствии с руководствами, одобренными Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных (IACUC) от WuXi AppTec, а затем с руководством Международной ассоциации оценки и аккредитации лабораторных исследований на животных (AAALAC). Во время систематического наблюдения животных проверяли на любые эффекты опухолевого роста и лечения на нормальное поведение, такое как подвижность, потребление пищи и воды (только зрительно), набор/потеря массы тела, тусклость глаз/волос и любой другой аномальный эффект, как указано в протоколе. Смерть и наблюдаемые клинические признаки регистрировали на основе количества животных в каждой подгруппе.

4.5 Измерения опухоли и конечные точки

Основной конечной точкой было выяснить, можно ли задержать рост опухоли или вылечить мышей. Объем опухоли измеряли три раза в неделю в двух измерениях с помощью штангенциркуля, и объем выражали в мм^3 по формуле: $V = 0,5 \times a \times b^2$, где a и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли соответственно. Затем размер опухоли использовали для расчета значения T/C. Значение T/C (в процентах) является показателем противоопухолевой эффективности; T и C представляют собой средние объемы опухоли обработанной и контрольной групп, соответственно, в заданный день.

TGI рассчитывали для каждой группы по формуле: $\text{TGI (\%)} = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$; T_i представляет собой средний объем опухоли в группе, получавшей лечение, в заданный день, T_0 представляет собой средний объем опухоли в группе, получавшей лечение, в день начала лечения, V_i представляет собой средний объем опухоли в контрольной группе, получавшей носитель в один и тот же день с T_i , и V_0 представляет собой средний объем опухоли в контрольной группе, получавшей носитель, в день начала лечения.

4.6 Сбор образцов

В конце исследования плазму мышей группы 2, 5, 9, 10, 11, 12 собирали через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 1 ч и 2 ч после последней дозы. Опухоли мышей групп 1, 5, 6, 12 собирали для FFPE через 2 часа после последней дозы.

4.7 Статистический анализ

Сводные статистические данные, включая среднее значение и стандартную ошибку среднего (SEM), были предоставлены для объема опухоли каждой группы в каждый момент времени.

Статистический анализ различий в объеме опухоли между группами проводился на основе данных, полученных в наилучший терапевтический момент времени после введения последней дозы.

Для сравнения объема опухоли среди групп определяли t-критерий, а затем статистическую значимость. Все данные были проанализированы с использованием GraphPad Prism 5.0. $P < 0,05$ считалось статистически значимым.

5. Результаты

5.1 Изменение массы тела и кривая опухолевого роста

Масса тела и кривая опухолевого роста показаны на Фигуре 1.

5.2 Отслеживание объема опухоли

Средний объем опухоли с течением времени у самок бестимусных мышей Balb/c с ксенотрансплантатом NCI-H292 показан в Таблице 4.

Таблица 4: Отслеживание объема опухоли во времени

Гр.	Лечение	Дни после начала лечения						
		0	2	4	7	9	11	14
1	Носитель,							
	раз в неделю	168±16	297±48	362±58	460±62	548±69	697±102	843±152
2	BCY8244,							
	3 мг/кг, раз в неделю	168±20	187±20	180±48	155±33	141±29	96±23	108±15

5.3 Анализ ингибирования роста опухоли

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели ксенотрансплантата NCI-H292 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на 14-й день после начала лечения.

Таблица 5: Анализ ингибирования роста опухоли

Гр.	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-значение
1	Носитель, раз в неделю	843±152	--	--	--
2	BCY8244, 3 мг/кг, раз в	108±15	12,8	109,0	$p < 0,01$

неделю

a. Среднее $\pm$ SEM.

b. Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего по группе объема опухоли в группе, получавшей лечение, на средний объем опухоли по группе в контрольной группе (T/C).

6. Краткое описание результатов и обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY8244 в модели ксенотрансплантата NCI-H292. Измеренная масса тела и объем опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени показаны на рисунке 1 и в таблицах 4 и 5.

Средний размер опухоли у мышей, получавших носитель, достиг 843 мм³ на 14-й день.

BCY8244 продемонстрировал отличные уровни ингибирующего действия на опухоли и эффективно вызывал опухолевую регрессию.

В этом исследовании у всех мышей сохранялась хорошая масса тела.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лекарственный конъюгат, содержащий по меньшей мере два пептидных лиганда, которые могут быть одинаковыми или различными, каждый из которых содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и неароматический молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида, таким образом, что по меньшей мере две полипептидных петли образуются на молекулярном каркасе.

2. Лекарственный конъюгат по п. 1, в котором указанные пептидные лиганды являются специфичными к одинаковым или различным мишеням.

3. Лекарственный конъюгат по п. 1 или по п. 2, в котором по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов является специфичным в отношении эпитопа, присутствующего на злокачественной клетке.

4. Лекарственный конъюгат по любому из пунктов 1 - 3, который содержит два пептидных лиганда, каждый из которых является специфичным в отношении одной и той же мишени.

5. Лекарственный конъюгат по любому из пунктов 1 - 4, в котором по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов является специфичным в отношении нектина-4.

6. Лекарственный конъюгат по п. 5, который содержит два пептидных лиганда, каждый из которых является специфичным в отношении нектина-4.

7. Лекарственный конъюгат по п. 5 или по п. 6, который содержит два пептидных лиганда, каждый из которых является специфичным в отношении нектина-4 и каждый из которых содержит одинаковые пептидные последовательности.

8. Лекарственный конъюгат по любому из пп. 5 - 7, в котором указанные петлевые последовательности содержат 3 или 9 аминокислотных остатков.

9. Лекарственный конъюгат по любому из пп. 5 - 8, в котором указанные петлевые последовательности содержат три цистеиновых остатка, разделенных двумя петлевыми последовательностями, одна из которых состоит из 3 аминокислот, а другая состоит из 9 аминокислот.

10. Лекарственный конъюгат по любому из пп. 5 - 9, в котором по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов, специфичный в отношении нектина-4, имеет срединную последовательность:

CP[1NaI][dD]CMKDWSTP[HyP]WC (SEQ ID NO: 1).

11. Лекарственный конъюгат по любому из пп. 5 - 10, в котором по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов, специфичный в отношении нектин-4, имеет полноразмерную последовательность:

(β -Ala)-Sar₁₀-CP[1Nal][dD]CMKDWSTP[HyP]WC (SEQ ID NO: 2).

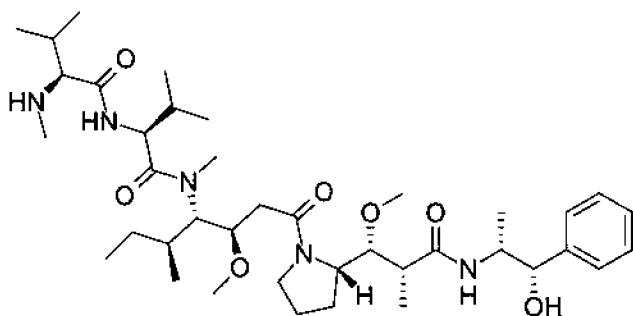
12. Лекарственный конъюгат по любому из пп. 1 - 11, в котором указанные реакционноспособные группы содержат цистеин.

13. Лекарственный конъюгат по любому из пп. 1 - 12, в котором неароматический молекулярный каркас выбран из 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА).

14. Лекарственный конъюгат по любому из пп. 1 - 13, который конъюгирован с одним или несколькими активными агентами, такими как молекулы с низкой молекулярной массой, ингибиторы, агонисты, антагонисты, частичные агонисты и антагонисты, обратные агонисты и антагонисты и цитотоксические агенты.

15. Лекарственный конъюгат по любому из пп. 1 - 14, который конъюгирован с одним или несколькими цитотоксическими агентами.

16. Лекарственный конъюгат по п. 15, в котором цитотоксический агент представляет собой (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)-N,3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метиламино)бутанамида)бутанамид) (монометил ауристатин E; MMAE):

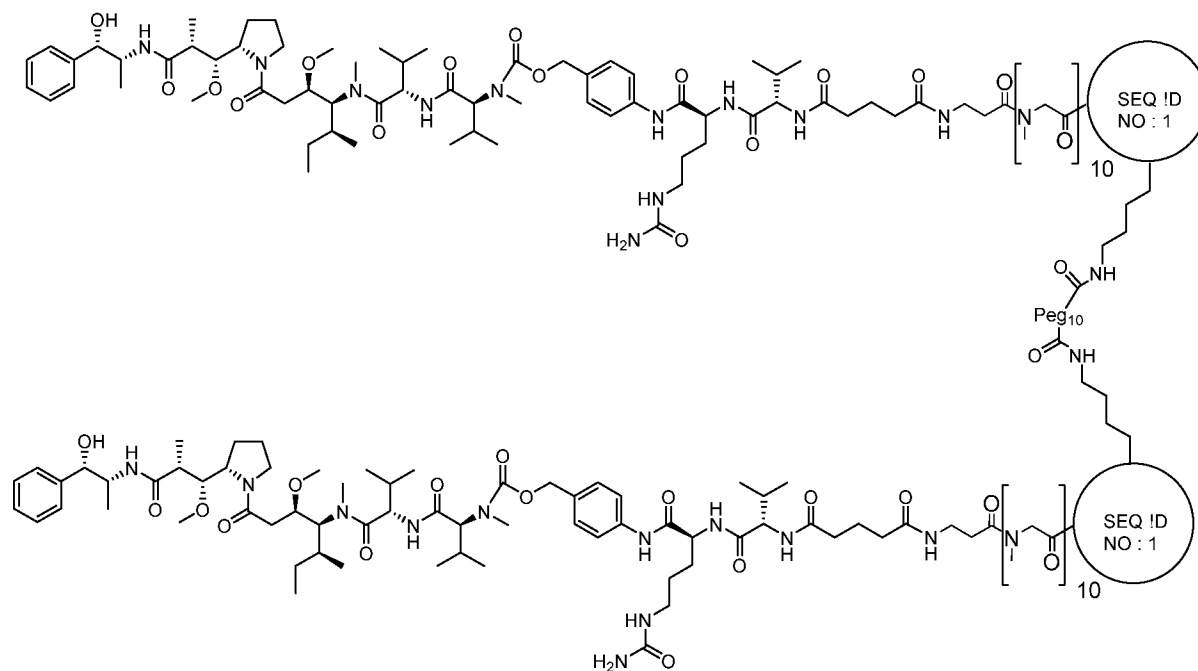


17. Лекарственный конъюгат по п. 15 или по п. 16, который дополнительно содержит линкер между указанным пептидным лигандом и каждым из указанных цитотоксических агентов.

18. Лекарственный конъюгат по п. 17, в котором указанный линкер выбран из одного или нескольких: Val-Cit, β -Ala, п-аминобензилкарбамата (PABC), Glu и одного или нескольких (например, 10) остатков саркозина (Sar), например, как -PABC-Val-Cit-Glu- β Ala-Sar₁₀- линкер, где указанные бициклические пептиды соединены по обоим остаткам

лизина через фрагмент PEG10 (то есть полученный в результате конъюгат лекарственного средства с бициклическим пептидом содержит (фрагмент MMAE-PABC-Val-Cit-Glu-βAla-Sar₁₀-бициклический пептид)-PEG₁₀-(бициклический пептид -Sar₁₀-βAla-Glu-Cit-Val-PABC-MMAE)).

19. Лекарственный конъюгат по любому из пп. 15 - 18, который представляет собой соединение формулы (A):



BCY00008244

(A)

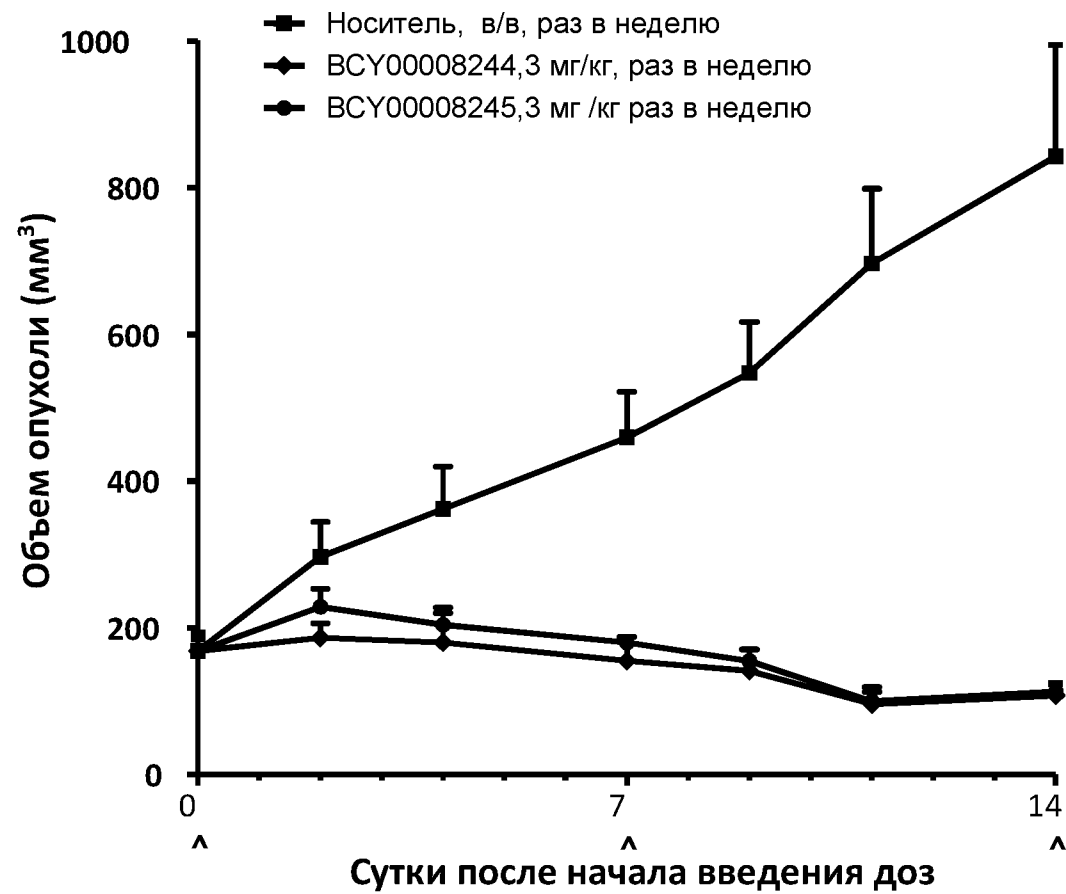
20. Фармацевтическая композиция, содержащая лекарственный конъюгат по любому из пп. 1 – 19, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

21. Применение лекарственного конъюгата по любому из пп. 1 - 19, для в профилактике, подавлении или лечении заболеваний.

22. Применение по п. 21, причем указанное заболевание представляет собой заболевание, которые можно облегчить за счет гибели клеток.

23. Применение по п. 22, причем указанное заболевание выбрано из заболеваний, характеризующихся поврежденным типом клеток, пролиферативных заболеваний, таких как злокачественные заболевания, и аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит.

1/1



ФИГ. 1