

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390494 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.24

(22) Дата подачи заявки
2021.08.03

(51) Int. Cl. C07K 5/062 (2006.01)
C07K 5/065 (2006.01)
C07K 5/093 (2006.01)
A61K 47/65 (2017.01)

(54) ЛИНКЕРЫ НА ПЕПТИДНОЙ ОСНОВЕ

(31) 63/060,344

(32) 2020.08.03

(33) US

(86) PCT/GB2021/052001

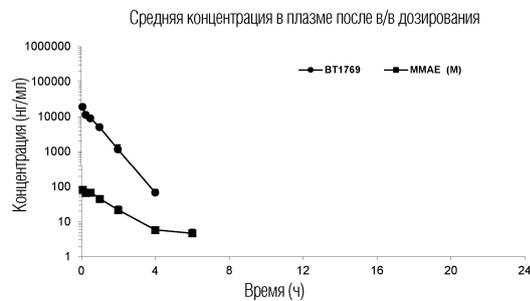
(87) WO 2022/029420 2022.02.10

(71) Заявитель:
БАЙСИКЛТЭКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Мадд Джемма, Макдоннелл Кевин,
Бесвик Пол (GB)

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

(57) Изобретение относится к новым линкерам, которые содержат две или три основных, кислых или гидрофобных природных или не природных аминокислоты. Также изобретение относится к конъюгатам лекарственного средства, содержащим указанные линкеры, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные конъюгаты лекарственного средства, и к применению указанных конъюгатов лекарственного средства для предупреждения, подавления или лечения злокачественной опухоли.



A1

202390494

202390494

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577155EA/030

ЛИНКЕРЫ НА ПЕПТИДНОЙ ОСНОВЕ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к новым линкерам, которые содержат две или три основных, кислых или гидрофобных природных или неприродных аминокислоты. Изобретение также относится к конъюгатам лекарственного средства, содержащим указанные линкеры, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные конъюгаты лекарственного средства, и к применению указанных конъюгатов лекарственного средства для предупреждения, подавления или лечения злокачественной опухоли.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Комплексы для лечения злокачественной опухоли, включающие конъюгат связывающего компонента (т.е. пептиды, антитела и т.д.) и цитотоксического средства оцениваются на протяжении многих лет. Данная концепция вовлекает связывающий компонент, обычно имеющий конфигурацию для связывания мишени, как правило, эпитопа на злокачественной клетке, и присутствие цитотоксического средства, которое предназначено для того, чтобы выступать в качестве груза для разрушения злокачественной клетки. Однако синтез этих конъюгатов лекарственного средства обычно вовлекает включение линкера между связывающимся компонентом и цитотоксическим агентом, и после введения индивидууму этот линкер часто претерпевает преждевременное расщепление, т.е. другими протеазами, распознающими последовательность линкера. Такое расщепление приводит к высвобождению цитотоксического средства до связывания со злокачественной клеткой и повышает риск нежелательных побочных эффектов.

Эту проблемы пытался решить ряд исследовательских групп. Например, в WO 98/19705 описан разветвленный пептидный линкер, который содержит две или более аминокислотных частей, которые обеспечивают участок расщепления ферментом. В US 2017/360952 описан линкер, имеющий азид-содержащую неприродную аминокислоту между связывающимся с клеткой компонентом и цитотоксическим средством. В US 2016/046721 описаны конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие линкер Val-Cit. В US 2015/087810 описаны конъюгаты антител и токсины с линкером, содержащим от 1 до 20 аминокислот.

Таким образом, существует необходимость в предоставлении альтернативных линкеров, которые позволяют селективное расщепление цитотоксического средства в или вблизи участка связывания с мишенью и приводят к повышению стабильности полученного конъюгата.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту изобретения, предусматривается линкер, содержащий часть -P1-P2-P3-, где:

P1 обозначает основную неприродную аминокислоту или ее производное;

P2 обозначает гидрофобную аминокислоту или гидрофобную неприродную

аминокислоту; и

P3 либо отсутствует, либо обозначает кислую аминокислоту или кислую неприродную аминокислоту, так что, когда P1 обозначает Cit и P2 обозначает Val, тогда P3 должен обозначать кислую неприродную аминокислоту.

Согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается конъюгат лекарственного средства, содержащий связывающий компонент, который связывается с мишенью, и цитотоксическое средство, где указанный связывающий компонент соединен с указанным цитотоксическим средством через линкер, как описано в настоящем описании.

Согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат лекарственного средства, как описано в настоящем описании, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается конъюгат лекарственного средства, как описано в настоящем описании, для применения для предупреждения, подавления или лечения злокачественной опухоли.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1: Фармакокинетический анализ ВСУ7761 в плазме мыши.

Фиг.2: Фармакокинетический анализ ВСУ10980 в плазме мыши.

Фиг.3: Фармакокинетический анализ ВСУ10981 в плазме мыши.

Фиг.4: Фармакокинетический анализ ВСУ10989 в плазме мыши.

Фиг.5: Фармакокинетический анализ ВСУ10984 в плазме мыши.

Фиг.6: Фармакокинетический анализ ВСУ10985 в плазме мыши.

Фиг.7: Фармакокинетический анализ ВСУ10984 в плазме крысы.

Фиг.8: Фармакокинетический анализ ВСУ7761 в плазме крысы.

Фиг.9: Эффективность ВСУ10984 в отношении уменьшения опухоли.

Фиг.10: Эффективность ВСУ7761 в отношении уменьшения опухоли.

Фиг.11-15: Анализ уровня токсинов для ВСУ10984 и ВСУ7761.

Фиг.16: Кривые объема опухоли после введения ВСУ10984 и ВСУ12951 самкам мышей BALB/c nude, имеющим опухоль HT1080. Планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего значения (SEM).

Фиг.17: Результаты примера 6, демонстрирующие наличие у мышей в группах 5 и 6 (которым дозировали 45 мкМ ВСУ10984) мощного ингибирования роста опухоли.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Линкеры

Согласно первому аспекту, предусматривается линкер, содержащий часть -P1-P2-P3-, где:

P1 обозначает основную неприродную аминокислоту или ее производное;

P2 обозначает гидрофобную аминокислоту или гидрофобную неприродную аминокислоту; и

P3 либо отсутствует, либо обозначает кислую аминокислоту или кислую

неприродную кислоту, так что, когда P1 обозначает Cit и P2 обозначает Val, тогда P3 должен обозначать кислоту природную аминокислоту.

Таким образом, изобретение относится к линкерным молекулам, содержащим 2 или 3 аминокислоты, для которых требуется присутствие по меньшей мере одной природной аминокислоты и либо мотива -основная-гидрофобная-, либо мотива -основная-гидрофобная-кислая-.

Линкерные молекулы по изобретению обеспечивают преимущества повышения стабильности в плазме, о чем свидетельствует пролонгированное время полужизни, продемонстрированное в примере 1, по сравнению с контрольным линкером Cit-Val. Кроме того, линкерные молекулы по изобретению обеспечивают способность коррекции скорости расщепления CatB до требуемого уровня в зависимости от потребностей (см. пример 2). Более того, линкерные молекулы по изобретению обеспечивают способность модулировать способность связывания белков в плазме у конъюгата бициклический пептид-токсин, как описано в примере 3. Более того, линкерные молекулы по изобретению продемонстрировали пролонгированное время полужизни и более низкие относительные уровни свободного токсина в плазме, о которых свидетельствуют фармакокинетические испытания на мышах и крысах, приведенные в примере 4. Более того, один пример линкерной молекулы по изобретению (BCY10984) продемонстрировал более высокую эффективность в отношении уменьшения объема опухоли по сравнению с эталонным конъюгатом бициклический пептид-токсин (BTC) с Cit-Val (см. фиг.9 и 10 и пример 5). Более того, в случае одной иллюстративной линкерной молекулы по изобретению (BCY10984) в опухоли наблюдались более высокие уровни токсина по сравнению с эталонным конъюгатом бициклический пептид-токсин (BTC) с Cit-Val (см. фиг.11-15 и пример 5).

Упоминание в настоящем описании "основной природной аминокислоты или ее производного" относится к любой аминокислоте, отличной от стандартных природных 20 аминокислот, которая имеет основную природу. В объем термина "основной" входят природные аминокислоты, которые содержат основные боковые при нейтральном значении pH. Такие основные природные аминокислоты, как правило, являются полярными и положительно заряженными при величинах pH ниже их pKa, и являются в высокой степени гидрофильными.

В одном варианте осуществления P1 обозначает основную природную аминокислоту, выбранную из: 2-амино-4-гуанидинобутановой кислоты (Agb); 2-амино-4-(3-метилгуанидино)бутановой кислоты (Agb(Me)); 2,4-диаминобутановой кислоты (Dab); 2,3-диаминопропионовой кислоты (Dap); 2-амино-3-гуанидинопропионовой кислоты (Dap(CNNH₂)) и цитруллин (Cit). В следующем варианте осуществления P1 обозначает цитруллин (Cit).

Упоминание в настоящем описании термина "гидрофобная аминокислота или гидрофобная природная аминокислота" включает любую аминокислоту, включая как стандартные природные 20 аминокислот, так и любые природные аминокислоты,

которые имеют гидрофобную природу. В объем термина "гидрофобный" входят как природные аминокислоты, так и неприродные аминокислоты, которые содержат гидрофобные боковые цепи, т.е. аминокислоты, которые маловероятно будут присутствовать в водной среде (т.е. воде).

В одном варианте осуществления P2 обозначает гидрофобную аминокислоту, выбранную из Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp и Val, или гидрофобную неприродную аминокислоту, выбранную из циклобутила, дифенилаланина (Dpa), 1-нафтилаланина (1Nal), 2-нафтилаланина (2Nal) и метилтриптофана (Trp(Me)), такую как гидрофобная аминокислота, выбранная из Val или неприродной аминокислоты, выбранной из циклобутила, Dpa, 1Nal и 2Nal. В следующем варианте осуществления P2 обозначает 1-нафтилаланин (1Nal).

Упоминание в настоящем описании термина "кислая аминокислота или кислая неприродная аминокислота" включает любую аминокислоту, включая как стандартные природные 20 аминокислот, так и любые неприродные аминокислоты, которые имеют кислую природу. В объем термина "кислый" входят как природные аминокислоты, так и неприродные аминокислоты, которые содержат кислые боковые цепи при нейтральном значении pH. Как правило, их боковые цепи имеют группы карбоновых кислот, чьи pKa являются достаточно низкими для того, чтобы утрачивать протоны и становиться при этом отрицательно заряженными.

В одном варианте осуществления P3 отсутствует. В альтернативном варианте осуществления P3 обозначает кислую аминокислоту, выбранную из Asp и Glu. В следующем варианте осуществления P3 обозначает Glu.

В одном варианте осуществления часть -P1-P2-P3- обозначает:

P1	P2	P3	Номера соединений, содержащих указанные линкеры
Agb	Val	Отсутствует	BCY9423
Agb(Me)	Val	Отсутствует	BCY9477
Dab	Val	Отсутствует	BCY9474, BCY10989
Dap	Val	Отсутствует	BCY10298
Dap(CNNH ₂)	Val	Отсутствует	BCY10300
Agb	Val	Glu	BCY9695, BCY10983
Cit	1Nal	Glu	BCY10984
Dab	cBu	Glu	BCY10988
Dab	Dpa	Glu	BCY10987
Dab	1Nal	Glu	BCY10985
Dab	2Nal	Glu	BCY10986
Dab	Val	Glu	BCY10122, BCY10981

Dap	Val	Glu	BCY10297, BCY10982
Dap (CNNH ₂)	Val	Glu	BCY10299

В следующем варианте осуществления часть -P1-P2-P3- обозначает: Cit-1Nal-Glu (BCY10984).

Конъюгаты лекарственных средств

Согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается конъюгат лекарственного средства, содержащий связывающий компонент, который связывается с мишенью, и цитотоксическое средство, где указанный связывающий компонент соединен с указанным цитотоксическим средством через линкер, как определено в настоящем описании.

В одном варианте осуществления указанное связующее вещество представляет собой пептид, такой как антитело или бициклической пептид, в частности, бициклической пептид.

Бициклические пептиды

Специалисту в данной области будет понятно, что пептиды и антитела являются общепризнанными терминами в данной области, однако упоминание в настоящем описании бициклических пептидов (или Бициклов) подразумевает указание на пептидную последовательность, которая имеет две петли вследствие циклизации трех реакционноспособных аминокислотных групп (т.е. остатков цистеина). Эти бициклические пептиды были идентифицированы в 2009 году посредством комбинаторных подходов на основе фагового дисплея для получения и скрининга больших библиотек бициклических пептидов против представляющих интерес мишеней (Heinis *et al.* (2009), Nat Chem Biol 5 (7), 502-7 и WO 2009/098450). Желательно, бициклический пептид имеет конфигурацию для связывания с противораковой мишенью. Подходящие примеры связывающихся со злокачественной клеткой бициклических пептидов включают бициклические пептиды, описанные в WO 2016/067035 (связывающие MT1-MMP бициклические пептиды), WO 2017/191460 (связывающие MT1-MMP бициклические пептиды), WO 2019/025811 (связывающие CD137 бициклические пептиды), PCT/GB2018/053675 (связывающие EphA2 бициклические пептиды), PCT/GB2018/053676 (связывающие EphA2 бициклические пептиды), PCT/GB2018/053678 (связывающие EphA2 бициклические пептиды), PCT/GB2019/050485 (связывающие CD137 бициклические пептиды), PCT/GB2019/051740 (связывающие нектин-4 бициклические пептиды) и PCT/GB2019/051741 (связывающие нектин-4 бициклические пептиды), и бициклические пептиды, описанные в указанных документах, включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Бициклический пептид, как упоминается в настоящем описании, относится к пептиду, ковалентно связанному с молекулярным каркасом. Как правило, такие пептиды содержат две или более реакционноспособных групп (т.е. остатков цистеина), которые способны образовывать ковалентные связи с каркасом, и последовательность, которая замыкается между указанными реакционноспособными группами, называется последовательностью петли, поскольку она формирует петлю, когда пептид связан с

каркасом. В данном случае, пептиды содержат по меньшей мере три остатка цистеина и образуют по меньшей мере две петли на каркасе.

Молекулярные каркасы

В одном варианте осуществления бициклический пептид связан с неароматическим молекулярным каркасом. Упоминание в настоящем описании термина "неароматический молекулярный каркас" относится к любому молекулярному каркасу, как определено в настоящем описании, который не содержит ароматическую (т.е. ненасыщенную) карбоциклическую или гетероциклическую кольцевую систему.

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

Как отмечалось в вышеуказанных документах, молекулярный каркас может представлять собой низкомолекулярное соединение, такое как низкомолекулярное органическое соединение.

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 реагировать с функциональной группой(ами) полипептида, образуя ковалентные связи.

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, малеинимиды, алкилгалогениды и ацилгалогениды.

Примером $\alpha\beta$ -ненасыщенного карбонилсодержащего соединения является 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-тритил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) (*Angewandte Chemie, International Edition (2014), 53(6), 1602-1606*).

В альтернативном варианте осуществления бициклической пептид ковалентно связан с ароматическим молекулярным каркасом. Упоминание в настоящем описании термина "ароматический молекулярный каркас" относится к любому молекулярному каркасу, как определено в настоящем описании, который содержит ароматическую карбоциклическую или гетероциклическую кольцевую систему.

Будет понятно, что ароматический молекулярный каркас может содержать ароматическую часть. Примеры подходящих ароматических частей в ароматическом каркасе включают бифенилен, терфенилен, нафталин или антрацен.

Также будет понятно, что ароматический молекулярный каркас может содержать гетероароматическую часть. Примеры подходящих гетероароматических частей в ароматическом каркасе включают пиридин, пиримидин, пиррол, фуран и тиофен.

Также будет понятно, что ароматический молекулярный каркас может содержать галогенметилареновую часть, такую как бис(бромметил)бензол, трис(бромметил)бензол, тетра(бромметил)бензол или их производные.

Неограничивающие примеры ароматических молекулярных каркасов включают: бис-, трис- или тетра(галогенметил)бензол; бис-, трис- или тетра(галогенметил)пиридин; бис-, трис- или тетра(галогенметил)пиридазин; бис-, трис- или тетра(галогенметил)пиримидин; бис-, трис- или тетра(галогенметил)пиразин; бис-, трис- или тетра(галогенметил)-1,2,3-триазин; бис-, трис- или тетрагалогенметил)-1,2,4-триазин; бис-, трис- или тетра(галогенметил)пиррол, -фуран, -тиофен; бис-, трис- или тетра(галогенметил)имидазол, -оксазол, -тиазол; бис-, трис- или тетра(галогенметил)-3Н-пиразол, -изооксазол, -изотиазол; бис-, трис- или тетра(галогенметил)бифенилен; бис-, трис- или тетра(галогенметил)терфенилен; 1,8-бис(галогенметил)нафталин; бис-, трис- или тетра(галогенметил)антрацен; и бис-, трис- или тетра(2-галогенметилфенил)метан.

Более конкретные примеры ароматических молекулярных каркасов включают: 1,2-бис(галогенметил)бензол; 3,4-бис(галогенметил)пиридин; 3,4-бис(галогенметил)пиридазин; 4,5-бис(галогенметил)пиримидин; 4,5-бис(галогенметил)пиразин; 4,5-бис(галогенметил)-1,2,3-триазин; 5,6-бис(галогенметил)-1,2,4-триазин; 3,4-бис(галогенметил)пиррол, -фуран, -тиофен и другие региоизомеры; 4,5-бис(галогенметил)имидазол, -оксазол, -тиазол; 4,5-бис(галогенметил)-3Н-пиразол, -изооксазол, -изотиазол; 2,2'-бис(галогенметил)бифенилен; 2,2''-бис(галогенметил)терфенилен; 1,8-бис(галогенметил)нафталин; 1,10-бис(галогенметил)антрацен; бис(2-галогенметилфенил)метан; 1,2,3-трис(галогенметил)бензол; 2,3,4-трис(галогенметил)пиридин; 2,3,4-трис(галогенметил)пиридазин; 3,4,5-трис(галогенметил)пиримидин; 4,5,6-трис(галогенметил)-1,2,3-триазин; 2,3,4-трис(галогенметил)пиррол, -фуран, -тиофен; 2,4,5-бис(галогенметил)имидазол, -оксазол, -тиазол; 3,4,5-бис(галогенметил)-1Н-пиразол, -изооксазол, -изотиазол; 2,4,2'-трис(галогенметил)бифенилен; 2,3',2''-трис(галогенметил)терфенилен; 1,3,8-трис(галогенметил)нафталин; 1,3,10-трис(галогенметил)антрацен; бис(2-галогенметилфенил)метан; 1,2,4,5-тетра(галогенметил)бензол; 1,2,4,5-тетра(галогенметил)пиридин; 2,4,5,6-тетра(галогенметил)пиримидин; 2,3,4,5-тетра(галогенметил)пиррол, -фуран, -тиофен; 2,2',6,6'-тетра(галогенметил)бифенилен; 2,2'',6,6''-тетра(галогенметил)терфенилен; 2,3,5,6-тетра(галогенметил)нафталин и 2,3,7,8-тетра(галогенметил)антрацен и бис(2,4-бис(галогенметил)фенил)метан.

В одном варианте осуществления молекулярный каркас может содержать или может состоять из трис(бромметил)бензола, в частности, 1,3,5-трис(бромметил)бензола ("ТВМВ") или его производного.

В одном варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой 2,4,6-трис(бромметил)мезитилен. Эта молекула является сходной с 1,3,5-трис(бромметил)бензолом, но содержит три дополнительных метильных группы, присоединенных к бензольному кольцу. Это имеет преимущество, состоящее в том, что дополнительные метильные группы могут формировать дополнительные контакты с полипептидом и, таким образом, добавлять дополнительное структурное ограничение.

Молекулярный каркас по изобретению содержит химические группы, которые позволяют функциональным группам полипептида кодируемой библиотеки по изобретению образовывать ковалентные связи с молекулярным каркасом. Указанные химические группы выбирают из широкого диапазона функциональных групп, включая амины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, нитрилы, карбоновые кислоты, сложные эфиры, алкены, алкины, ангидриды, сукцинимиды, малеинимиды, азиды, алкилгалогениды и ацилгалогениды.

Каркасные реакционноспособные группы, которые могут использоваться на молекулярном каркасе для реакции с тиольными группами остатков цистеина, представляют собой алкилгалогениды (или также называемые галогеноалканами или галоалканами).

Примеры включают бромметилбензол (каркасная реакционноспособная группа, иллюстрируемая ТВМВ) или йодацетамид. Другими каркасными реакционноспособными группами, которые используются для селективного связывания соединений с остатками цистеина в белках, являются малеинимиды, $\alpha\beta$ -ненасыщенные карбонил-содержащие соединения и α -галогенметилкарбонил-содержащие соединения. Примеры малеинимидов, которые могут использоваться в качестве молекулярных каркасов по изобретению, включают: трис-(2-малеимидоэтил)амин, трис-(2-малеимидоэтил)бензол, трис-(малеимидо)бензол. Примером α -галогенметилкарбонил-содержащего соединения является N,N',N''-(бензол-1,3,5-триил)трис(2-бромацетамид). Селеноцистеин также является природной аминокислотой, которая имеет сходную реакционноспособность с цистеином, и он может использоваться для тех же реакций. Таким образом, когда бы ни упоминался цистеин, как правило, является приемлемой замена его на селеноцистеин, если контекстом не подразумевается иное.

Синтез

Бициклические пептиды можно изготавливать синтетическим путем стандартными способами с последующей реакцией с молекулярным каркасом *in vitro*. Когда это осуществляют, можно использовать стандартную химию. Это позволяет быстрое крупномасштабное получение растворимого материала для дальнейших экспериментов или подтверждения. Такие способы можно проводить с использованием общепринятой химии, такой как химия, описанная в Timmerman *et al* (*выше*).

Таким образом, изобретение также относится к производству полипептидов, отобранных, как описано в настоящем описании, где производство включает необязательные дополнительные стадии, как объяснено ниже. В одном варианте осуществления эти стадии проводят для конечного полипептида, полученного посредством химического синтеза.

Пептиды также можно удлинять, например, путем включения, например, другой петли и, таким образом, внесения множественной специфичности.

Для удлинения пептида его можно просто удлинять химически на его N-конце или C-конце или в петлях с использованием ортогонально выступающих остатков лизина (и

аналогов) с помощью стандартной твердофазной химии или химии в фазе раствора. Стандартные способы (био)конъюгации можно использовать для обеспечения активированного или активируемого N- или C-конца. Альтернативно вставки можно вносить 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 посредством ферментов, например с использованием субтилигазы, как описано в (Chang *et al* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 20; 91(26):12544-8 или в Hikari *et al* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003).

Альтернативно пептиды можно удлинять или модифицировать путем дальнейшей конъюгации через дисульфидные связи. Это имеет дополнительное преимущество, состоящее в позволении первому и второму пептидам диссоциировать друг от друга после того, как они оказываются в восстанавливающей среде в клетке. В этом случае, молекулярный каркас (например, ТАТА) можно присоединять в ходе химического синтеза первого пептида, чтобы он реагировал с тремя группами цистеина; затем можно присоединять дополнительный цистеин или тиол к N- или C-концу первого пептида, так чтобы этот цистеин или тиол реагировал только со свободным цистеином или тиолом второго пептида, образуя связанный дисульфидной связью конъюгат бициклический пептид-пептид.

Сходные способы в равной степени применимы для синтеза/присоединения двух бициклических и биспецифических макроциклов, потенциально создавая тетраспецифическую молекулу.

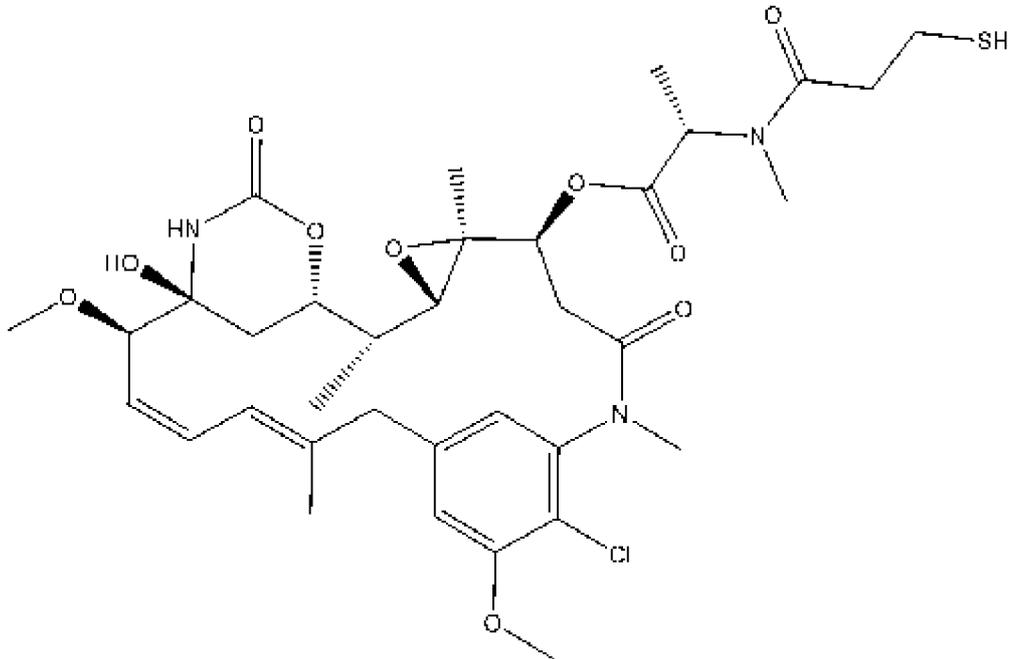
Более того, присоединения других функциональных групп или эффекторных групп можно проводить аналогичным образом с использованием соответствующей химии, осуществляя присоединение на N- или C-конце или посредством боковых цепей. В одном варианте осуществления присоединение проводят так, что не происходит блокирования активности любой из структур.

Цитотоксические средства

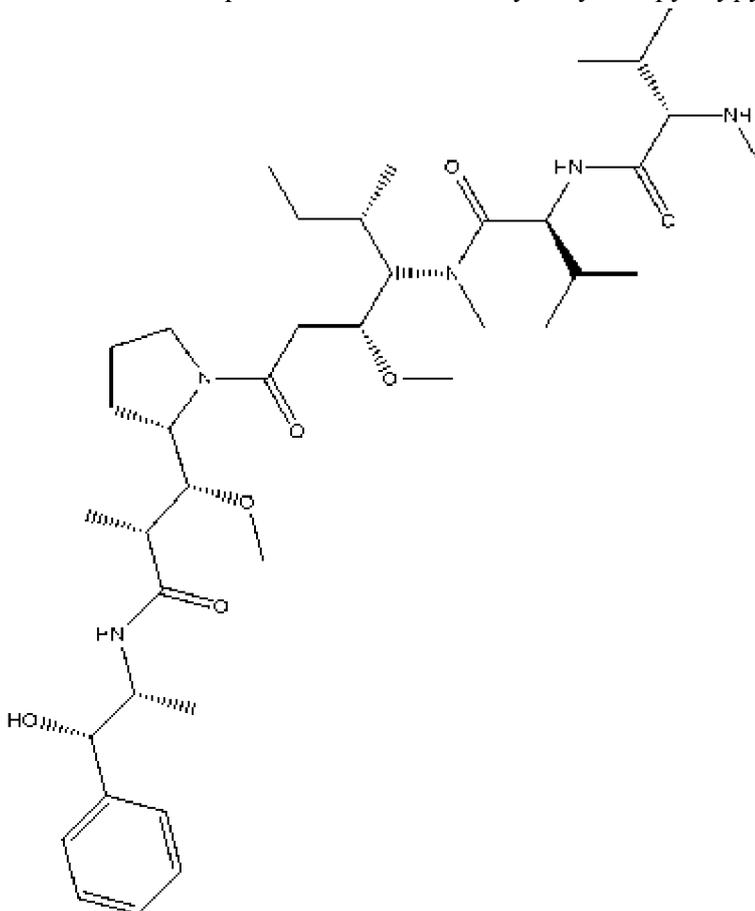
Примеры подходящих "цитотоксических средств" включают: алкилирующие средства, такие как цисплатин и карбоплатин, а также оксалиплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, ифосфамид; антиметаболиты, включая аналоги пуринов азатиоприн и меркаптопурин или аналоги пиримидинов; растительные алкалоиды и терпеноиды, включающие 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 типа II, включая амсакрин, этопозид, этопозида фосфат и тенипозид. Следующие средства могут включать противоопухолевые антибиотики, которые включают иммунодепрессант дактиномицин (который используют для трансплантации почек), доксорубицин, эпирубицин, блеомицин, калихеамицины и другие.

В одном варианте осуществления указанное цитотоксическое средство выбрано из майтанзиноидов (таких как DM1) или монометилауристатинов (таких как MMAE).

DM1 представляет собой цитотоксическое средство, которое представляет собой тиолсодержащее производное майтанзина и имеет следующую структуру:



Монометилауристатин E (MMAE) представляет собой синтетическое антинеопластическое средство и имеет следующую структуру:



В следующем варианте осуществления указанное цитотоксическое средство представляет собой ММАЕ.

Фармацевтические композиции

В соответствии со следующим аспектом изобретения предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат лекарственного средства, как описано в настоящем описании, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Главным образом, конъюгаты лекарственного средства по настоящему изобретению могут 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 солевой раствор и/или забуференные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, раствор декстрозы Рингера, раствор декстрозы и хлорид натрия и лактатный раствор Рингера. Подходящие физиологически-приемлемые адъюванты, если необходимо поддерживать полипептидный комплекс в суспензии, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Внутривенные носители включают жидкости и средства для восполнения питательных веществ и восполнения электролитов, такие как средства на основе раствора декстрозы Рингера. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы (Mask (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition).

Конъюгаты лекарственного средства по настоящему изобретению можно использовать в качестве вводимых по отдельности композиций или совместно с другими средствами. 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 средств совместно с конъюгатами лекарственного средства по настоящему изобретению, или даже комбинациями выбранных конъюгатов лекарственного средства в соответствии с настоящим изобретением, обладающими различной специфичностью, такими как полипептиды, отобранные с использованием различных лигандов-мишеней, и их могут объединять или не объединять перед введением.

Путь введения фармацевтических композиций по изобретению может представлять собой любой из путей, широко известных средним специалистам в данной области. Для терапии конъюгаты лекарственного средства по изобретению можно вводить любому пациенту в соответствии со стандартными способами. Введение можно проводить посредством любого подходящего пути, в том числе парентерально, внутривенно, внутримышечно, внутривнутрибрюшинно, трансдермально, легочным путем или также в соответствующих случаях путем прямой инфузии с использованием катетера. Предпочтительно, фармацевтические композиции согласно изобретению можно вводить

посредством ингаляции. Дозировка и частота введения зависят от возраста, пола и состояния пациента, сопутствующего введения других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые должен учитывать клиницист.

Конъюгаты лекарственного средства по настоящему изобретению можно лиофилизировать для хранения и восстанавливать в подходящем носителе перед применением. Показано, что этот способ является эффективным, и можно использовать известные в данной области способы лиофилизации и восстановления. Специалистам в данной области будет понятно, что лиофилизация и восстановление могут приводить к различной степени потери активности, и что для компенсации этого уровни могут быть увеличены.

Композиции, содержащие конъюгаты лекарственного средства по настоящему изобретению или их коктейль, можно вводить для профилактического и/или терапевтического лечения. В определенных терапевтических применениях достаточное количество для достижения по меньшей мере частичного ингибирования, подавления, модулирования, уничтожения или некоторого другого поддающегося определению параметра популяции выбранных клеток определяют как "терапевтически-эффективная доза". Количества, требуемые для достижения этой дозировки, зависят от тяжести заболевания и общего состояния собственной иммунной системы пациента, но, как правило, они находятся в диапазоне от 0,005 до 5,0 мг выбранного конъюгата лекарственного средства на килограмм массы тела, причем более часто используют дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/доза. Для профилактических применений композиции, содержащие конъюгаты лекарственного средства по настоящему изобретению или их коктейли, также можно вводить в сходных или более низких дозировках.

Композицию, содержащую конъюгат лекарственного средства в соответствии с настоящим изобретением, можно использовать в профилактических и терапевтических условиях для способствования изменению, инактивации, уничтожению или удалению выбранной популяции клеток-мишеней у млекопитающего. Кроме того, конъюгаты лекарственного средства, описанные в настоящем описании, можно использовать экстракорпорально или *in vitro* для селективного уничтожения, истощения или иного эффективного удаления популяции клеток-мишеней из гетерогенной совокупности клеток. Кровь от млекопитающего можно комбинировать экстракорпорально с конъюгатами лекарственного средства, и при этом нежелательные клетки убивают или иным образом извлекают из крови для возвращения млекопитающему в соответствии со стандартными способами.

Терапевтические применения

Согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается конъюгат лекарственного средства, как описано в настоящем описании, для применения для предупреждения, подавления или лечения злокачественной опухоли.

Примеры злокачественных опухолей (и их доброкачественных аналогов), которые можно лечить (или ингибировать), включают, но не ограничиваются ими, опухоли

эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциномы, плоскоклеточные карциномы, переходно-клеточные карциномы и другие карциномы), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевыводящих путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (включая пищевод, желудок (гастральная), тонкий кишечник, толстый кишечник, прямую кишку и анус), печени (печеночно-клеточная карцинома), желчного пузыря и желчевыводящей системы, экзокринные карциномы поджелудочной железы, почки, легкого (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легкого, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), головы и шеи (например, злокачественные опухоли языка, ротовой полости, гортани, глотки, носоглотки, миндалевидных желез, слюнных желез, носовой полости и околоносовых пазух), яичника, фаллопиевых труб, брюшины, вагины, вульвы, полового члена, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярная карцинома щитовидной железы), надпочечников, предстательной железы, кожи и смежных органов (например, меланома, базально-клеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, кератоакантома, дисплатический невус); гематологические злокачественные опухоли (т.е. лейкозы, лимфомы) и предзлокачественные гематологические нарушения и нарушения пограничной злокачественности, включая гематологические злокачественные опухоли и родственные состояния лимфоидного происхождения (например, острый лимфоцитарный лейкоз [ALL], хронический лимфоцитарный лейкоз [CLL], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лимфома из клеток мантийной зоны, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы из натуральных киллеров [NK], лимфома Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, моноклональная гаммапатия неуточненного значения, плазмацитома, множественная миелома и посттрансплантационные лимфопрлиферативные нарушения), и гематологические злокачественные опухоли и родственные состояния миелоидного роста (например, острый миелогенный лейкоз [AML], хронический миелогенный лейкоз [CMML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелопрлиферативные нарушения, такие как истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелопрлиферативный синдром, миелодиспластический синдром и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимного 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, желудочно-кишечные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные гистиоцитомы, и возвышающаяся дерматофибросаркома; опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитомы, глиомы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, пиниальные опухоли и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островковых клеток, опухоли паращитовидной железы и медуллярная карцинома

щитовидной железы); опухоли глаза и прилежащих тканей (например, ретинобластома); герминогенные и трофобластические опухоли (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы, хорионаденомы и хориокарциномы); и педиатрические и эмбриональные опухоли (например, медуллобластома, нейробластома, опухоль Вильмса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, которые делают пациента предрасположенными к злокачественным опухолям (например, пигментная ксеродерма).

В следующем варианте осуществления злокачественная опухоль выбрана из гемопоэтической злокачественной опухоли, например, выбранной из: неходжскинской лимфомы (NHL), лимфомы Беркитта (BL), множественной миеломы (MM), хронического В-лимфоцитарного лейкоза (B-CLL), острого В- и Т-лимфоцитарного лейкоза (ALL), Т-клеточной лимфомы (TCL), острого миелоидного лейкоза (AML), волосатоклеточного лейкоза (HCL), лимфомы Ходжкина (HL) и хронического миелоидного лейкоза (CML).

Упоминание в настоящем описании термина "предупреждение" вовлекает введение защитной композиции до индукции заболевания. "Подавление" относится к введению композиции после индуцирующего события, но до клинического появления заболевания. "Лечение" вовлекает введение защитной композиции после проявления симптомов заболевания.

Модельные системы на животных, которые можно использовать для скрининга эффективности конъюгатов лекарственного средства в отношении защиты от или лечения заболевания, являются доступными. Настоящее изобретение облегчает использование модельных систем на животных, что позволяет разработку конъюгатов лекарственного средства, которые могут перекрестно реагировать с мишенями из человека и животных, для обеспечения возможности применения моделей на животных.

Изобретение дополнительно описано ниже с помощью следующих примеров.

Материалы и способы

Синтез пептидов

Синтез пептидов был основан на химии Fmoc с использованием устройства для синтеза пептидов Symphony, производимого Peptide Instruments, и устройства для синтеза Syro II от MultiSynTech. Использовали стандартные Fmoc-аминокислоты (Sigma, Merck) с подходящими защитными группами боковых цепей: когда это было применимо, в каждом случае использовали стандартные условия присоединения, за которыми следовало удаление защитных групп с использованием стандартной методологии. Пептиды очищали с использованием ВЭЖХ и после выделения их модифицировали посредством 1,3,5-трис(бромметил)бензола (ТВМВ, Sigma). Для этого линейный пептид разбавляли H₂O вплоть до ~35 мл, добавляли ~500 мкл 100 мМ ТВМВ в ацетонитриле и реакцию начинали посредством 5 мл 1 М NH₄HCO₃ в H₂O. Реакции позволяли протекать в течение ~30-60 мин при к.т., и лиофилизировали после завершения реакции (на основе данных MALDI-MS).

После лиофилизации модифицированный пептид очищали, как описано выше, заменяя Luna C8 на колонку Gemini C18 (Phenomenex), и заменяя кислоту на 0,1%

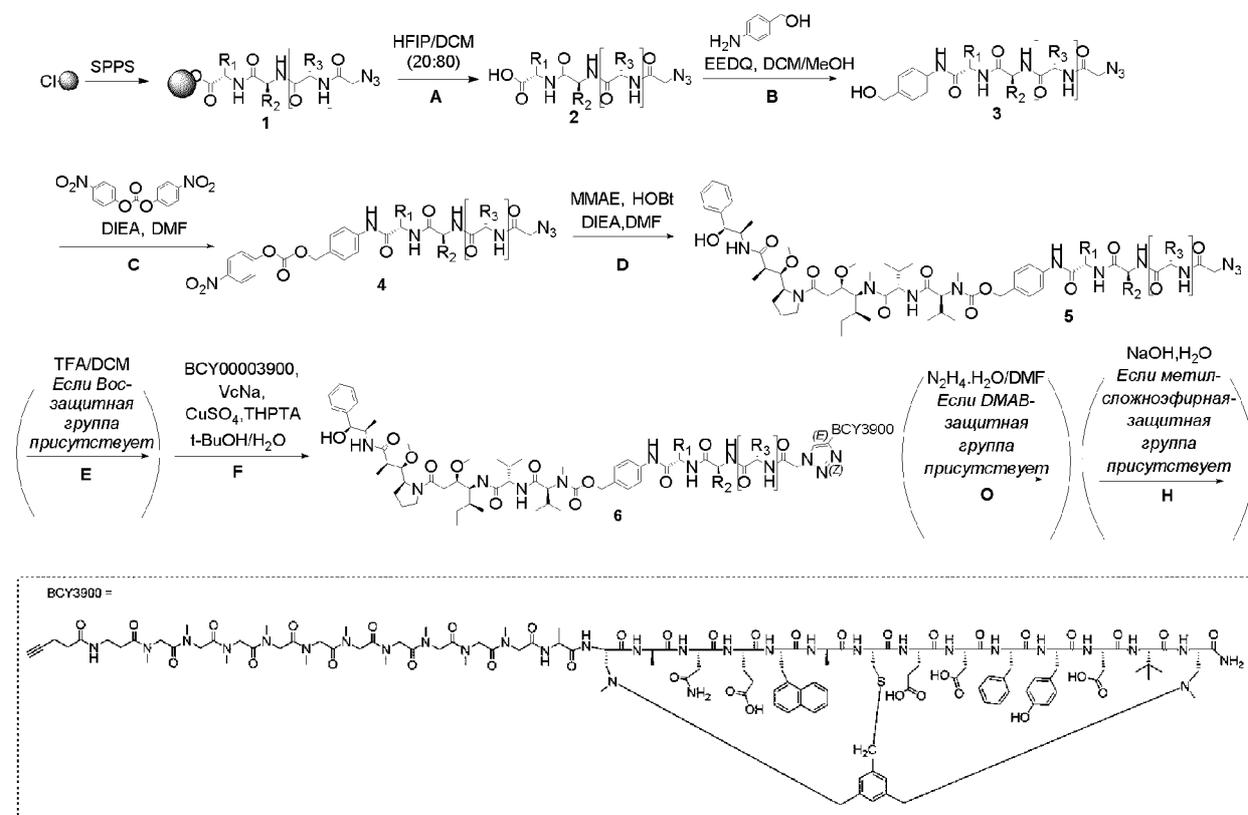
трифторуксусную кислоту. Очищенные фракции, содержавшие правильный ТВМВ-модифицированный материал, объединяли, лиофилизировали и держали при -20°C для хранения.

Все аминокислоты, если нет иных указаний, использовали в L-конфигурациях.

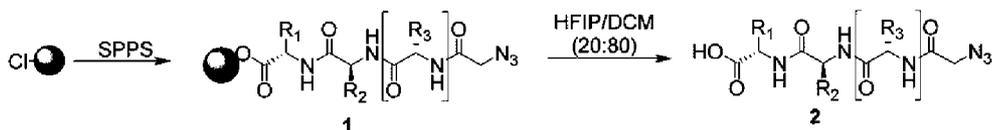
В некоторых случаях пептиды конвертируют в активированные дисульфиды перед присоединением к свободной тиольной группе токсина с использованием следующего способа; раствор 4-метил(сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)пентаноата) (100 мМ) в сухом DMSO (1,25 мол. экв.) добавляли к раствору пептида (20 мМ) в сухом DMSO (1 мол. экв.). Реакционную смесь хорошо перемешивали и добавляли DIPEA (20 мол. экв.). Мониторинг реакции проводили посредством LC/MS до завершения.

Синтез конъюгата бициклического пептида

Общий способ



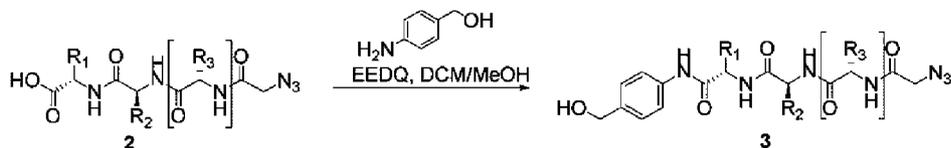
Стадия (а): Твердофазный синтез пептидного линкерного соединения



Пептиды синтезировали на хлортритильной смоле (2 моль) с использованием стандартной химии Fmoc. Первую аминокислоту загружали на смолу путем инкубации со смесью Fmoc-AA-OH (1 экв.) и DIEA (4 экв.) в DMF в течение 2 часов. Смолу осушали и промывали, а затем обрабатывали MeOH в течение 30 мин. Остальную часть последовательности конструировали с использованием стандартных способов SPPS с Fmoc-AA-OH (или кислотной кэппирующей группой, например азидоуксусной кислотой) (3

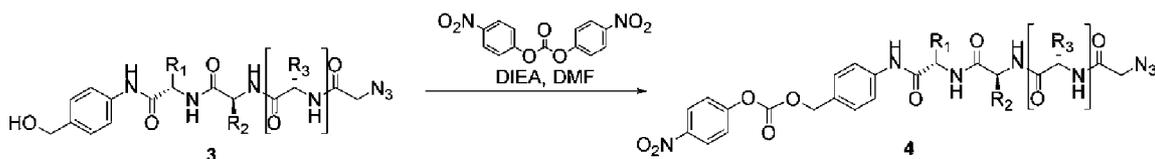
экв.), HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6 экв.). Реакции присоединения проводили в течение 1 часа. Удаление защитной группы Fmoc проводили с использованием 20% пиперидина/DMF в течение 30 мин. Пептиды отщепляли от смолы посредством инкубации с использованием HFIP/DCM (20:80) в течение 30 мин. Неочищенный пептид сушили и прямо использовали на следующей стадии без очистки.

Стадия (b): Присоединение (4-аминофенил)метанола к пептидному линкерному соединению



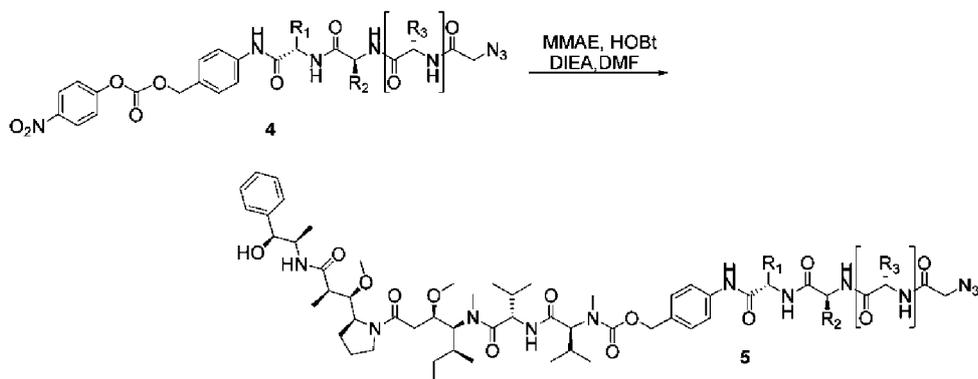
К раствору соединения **2** (1,0 экв.) в MeOH (100 мг/мл) добавляли раствор EEDQ (2,0 экв.) и (4-аминофенил)метанола (2,0 экв.) в DCM. Смесь перемешивали при 35°C в течение 16 ч. После завершения реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении и остаток очищали препаративной ВЭЖХ.

Стадия (c): Реакция бис(2,4-динитрофенил)карбоната с пептидным линкером-(4-аминофенил)метанолом



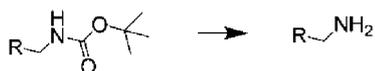
К раствору соединения **3** (1,0 экв.) в DMF (50 мг/мл) добавляли DIEA (5,0 экв.) и бис(4-нитрофенил)карбонат (4,0 экв.) и смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч (или до тех пор, пока соединение **3** не было израсходовано полностью). Реакционную смесь прямо очищали препаративной ВЭЖХ.

Стадия (d): Конъюгация MMAE с пептидными линкерными соединениями



К раствору соединения **4** (1,5 экв.) в DMF (10 мг/мл) добавляли HOBT (1,5 экв.), DIEA (5,0 экв.) и MMAE (1,0 экв.). Смесь перемешивали при 40°C в течение 16 ч, до тех пор, пока соединение **4** не было израсходовано полностью. Реакционную смесь прямо очищали препаративной ВЭЖХ.

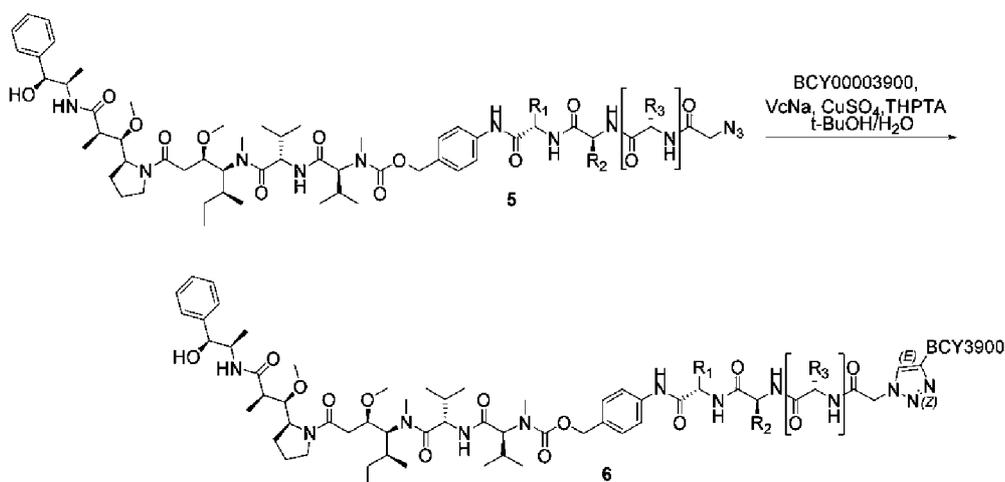
Стадия (e): Удаление защитной группы Boc



(Для линкеров, синтезированных с использованием аминокислот с Вос-защищенными боковыми цепями).

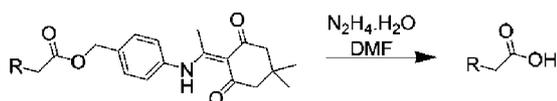
Линкер, содержащий Вос-защищенный амин (1,0 экв.) добавляли к смеси 10% TFA/DCM (30 мг/мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч, а затем концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM. Неочищенный продукт прямо использовали на следующей стадии без очистки.

Стадия (f): Катализируемое медью циклоприсоединение азид-функционализированный токсин-линкеров к алкин-функционализированным бициклическим пептидам



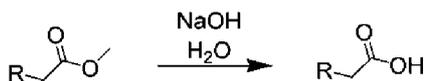
К раствору соединения **5** (1,0 экв.) в t-BuOH/H₂O (1:1, 6,5 мг/мл) добавляли CuSO₄ (0,4 М, 2,0 экв.), THPTA (1,0 экв.), **BCY3900** (0,9 экв.), VcNa (2,0 экв.). Смесь доводили до pH~7, а затем перемешивали при 40°C в течение 2 ч (или до тех пор, пока соединение **5** не было израсходовано полностью). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления t-BuOH. Если в соединении присутствовала DMAВ или метил-сложноэфирная защитная группа, удаление защитной группы проводили на неочищенном материале (общий способ F или G). В ином случае, неочищенный остаток очищали с использованием препаративной ВЭЖХ с получением конечного конъюгата.

Стадия (g): Удаление защитной группы DMAВ



(Для линкеров, синтезированных с использованием аминокислот с DMAВ-защищенными боковыми цепями).

К раствору DMAВ-защищенного линкерного соединения (1,0 экв.) в DMF (36 мг/мл) добавляли N₂H₄·H₂O (75 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч, а затем реакционную смесь прямо очищали препаративной ВЭЖХ с получением конечного конъюгата.

Стадия (h): Удаление метил-сложноэфирной защитной группы

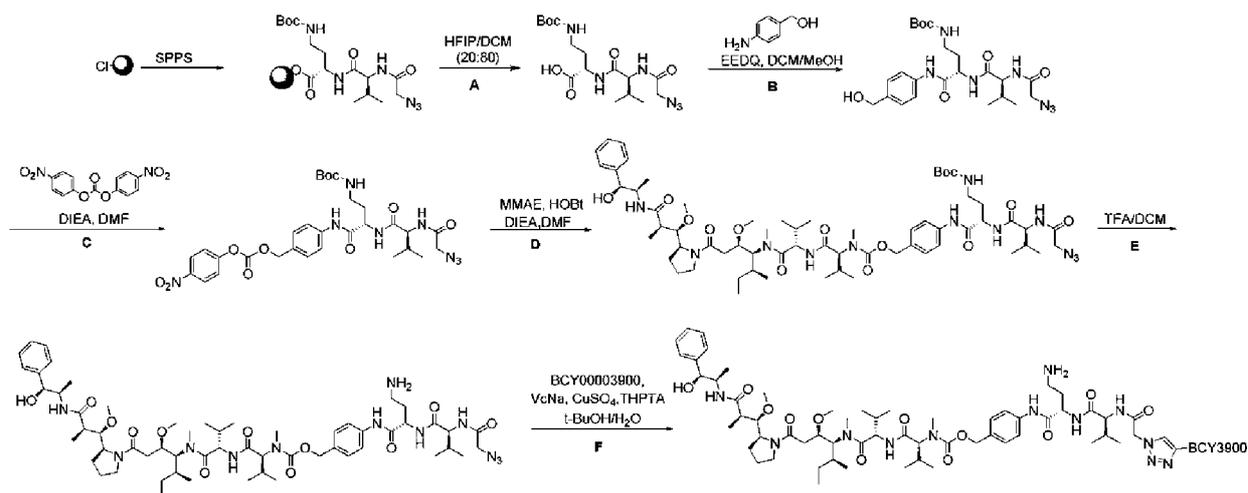
(Для линкеров, синтезированных с использованием аминокислот с боковыми цепями, защищенными посредством метилового сложного эфира).

К раствору защищенного метиловым сложным эфиром линкерного соединения (1,0 экв.) в H₂O (100 мг/мл) добавляли NaOH (20,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. Реакционную смесь прямо очищали препаративной ВЭЖХ с получением конечного конъюгата.

Вышеупомянутый общий способ использовали для получения следующих конъюгатов бициклических пептидов:

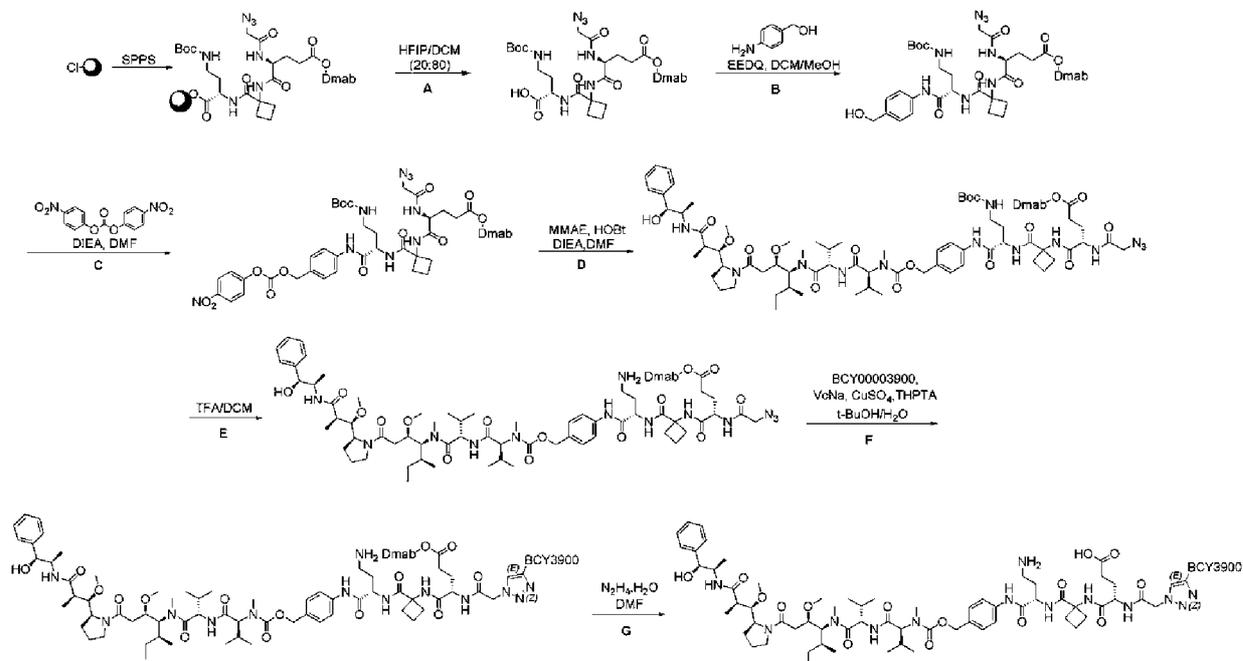
		Использованные защищенные аминокислоты
BCY10989	MMAE-PAB-(Dab-Val)-BCY3900	Fmoc-Dab(Boc)-OH
BCY10980	MMAE-PAB-(Cit-Val-Glu)-BCY3900	Fmoc-Glu(DMAB)-OH
BCY10982	MMAE-PAB-(Dap-Val-Glu)-BCY3900	Fmoc-Dap(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OMe)-OH
BCY10983	MMAE-PAB-(Agp-Val-Glu)-BCY3900	Fmoc-Dap(Boc)-OH Fmoc-Glu(OMe)-OH
BCY10984	MMAE-PAB-(Cit-1Nal-Glu)-BCY3900	Fmoc-Glu(OMe)-OH
BCY10981	MMAE-PAB-(Dab-Val-Glu)-BCY3900	Fmoc-Dab(Boc)-OH Fmoc-Glu(OMe)-OH
BCY10985	MMAE-PAB-(Dab-1Nal-Glu)-BCY3900	Fmoc-Dab(Boc)-OH Fmoc-Glu(OMe)-OH
BCY10986	MMAE-PAB-(Dab-2Nal-Glu)-BCY3900	Fmoc-Dab(Boc)-OH Fmoc-Glu(DMAB)-OH
BCY10987	MMAE-PAB-(Dab-Dpa-Glu)-BCY3900	Fmoc-Dab(Boc)-OH
BCY10988	MMAE-PAB-(Dab-cBu-Glu)-BCY3900	Fmoc-Dab(Boc)-OH Fmoc-Glu(DMAB)-OH

BCY10989 - (Dab-Val)



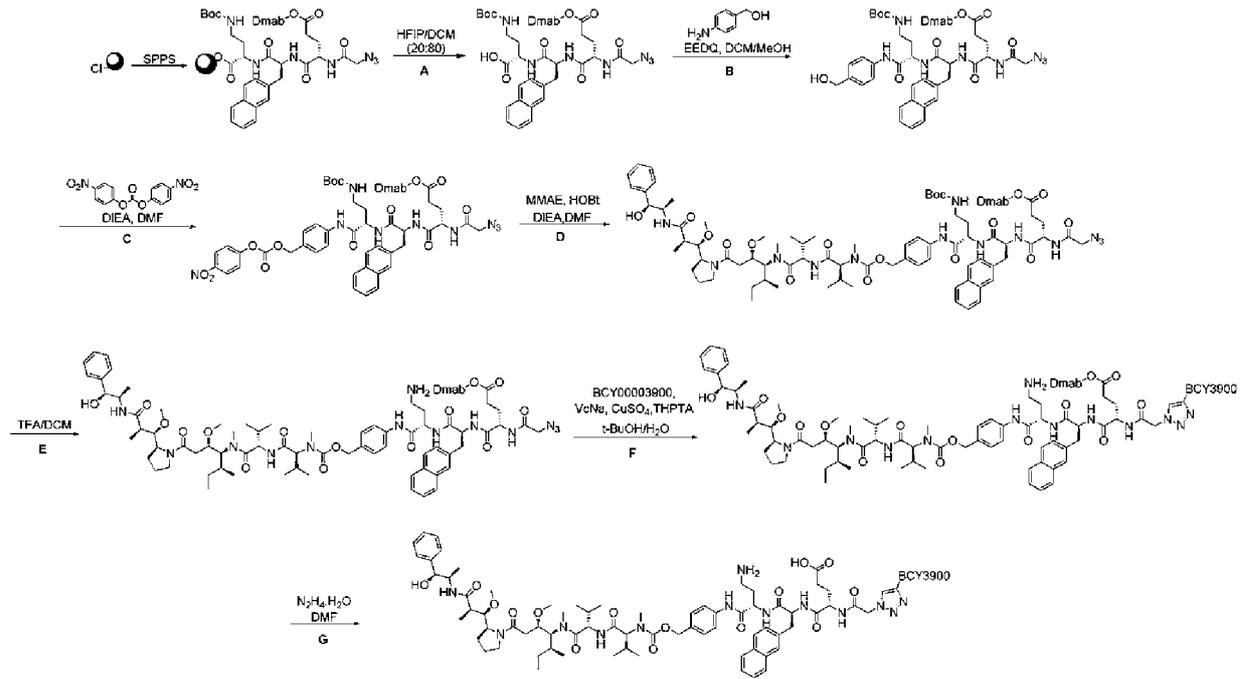
Следовали общим способам с получением **BCY10989**. Ожидаемая ММ=3882,4, наблюдаемое m/z: 1294 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 971 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$.

BCY10988 - (Dab-cBu-Glu)



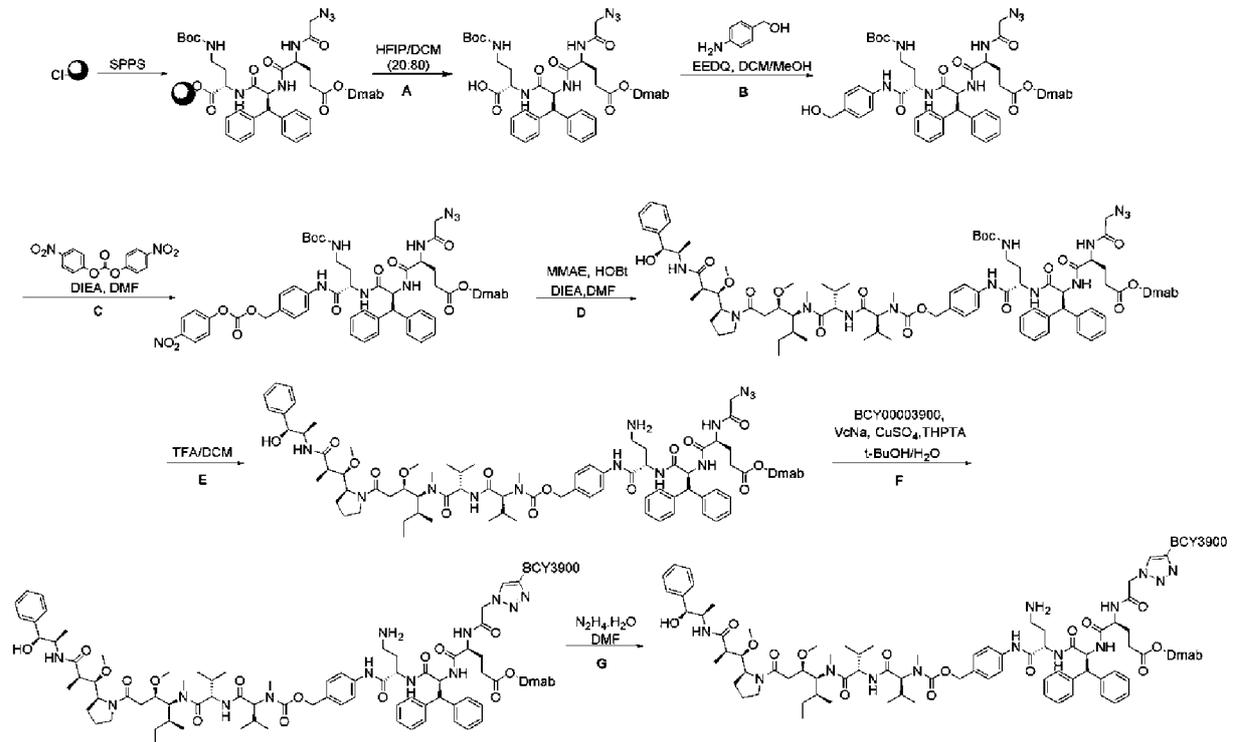
Следовали общим способам с получением **BCY10988**. Ожидаемая ММ=4009,5, наблюдаемое m/z: 1337 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 1003 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$.

BCY10986 (Dab-2Nal-Glu)



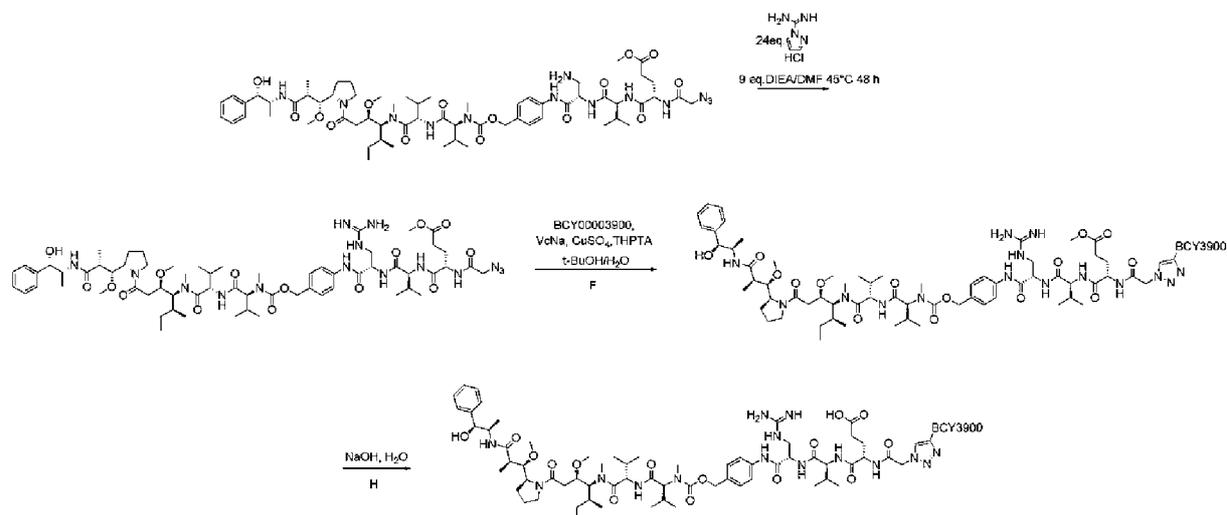
Следовали общим способам с получением **BCY10986**. Ожидаемая ММ=4109,6, наблюдаемое m/z: 1370 [M+3H]³⁺, 1028 [M+4H]⁴⁺.

BCY10987 - (Dab-DPA-Glu)



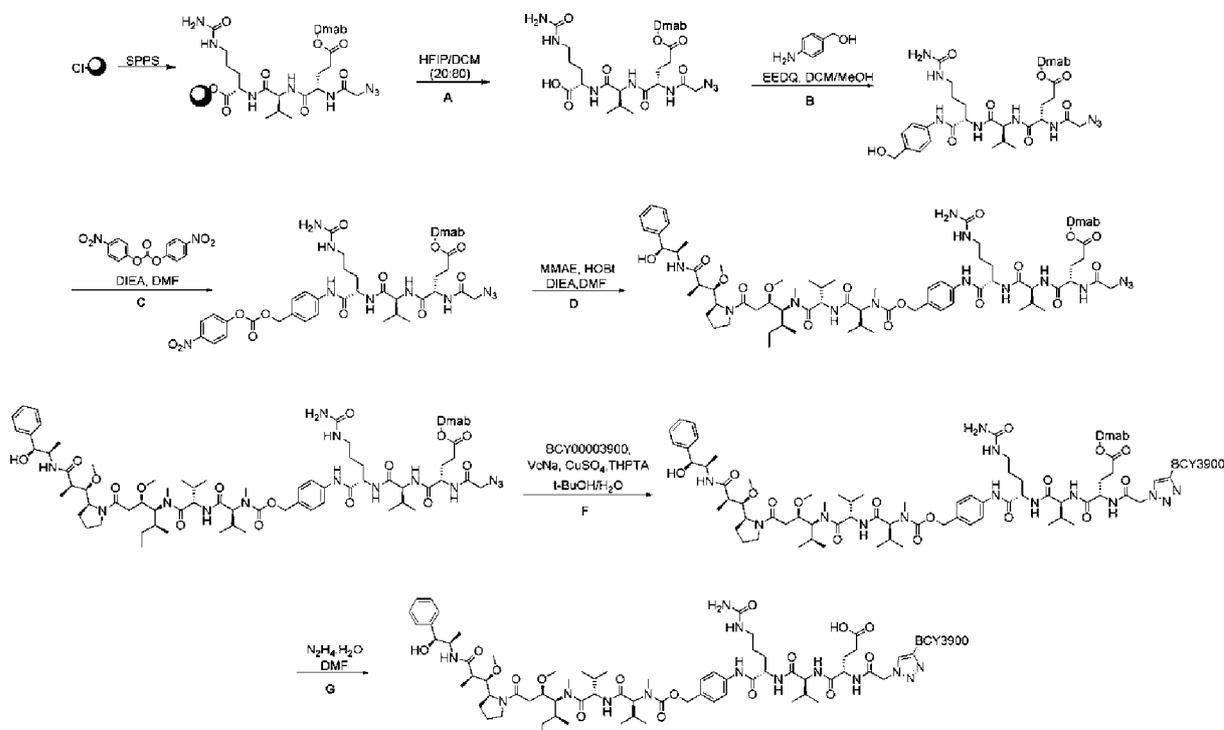
Следовали общим способам с получением **BCY10987**. Ожидаемая ММ=4135,7, наблюдаемое m/z: 1379 [M+3H]³⁺, 1034 [M+4H]⁴⁺.

BCY10983 - (Agp-Val-Glu)



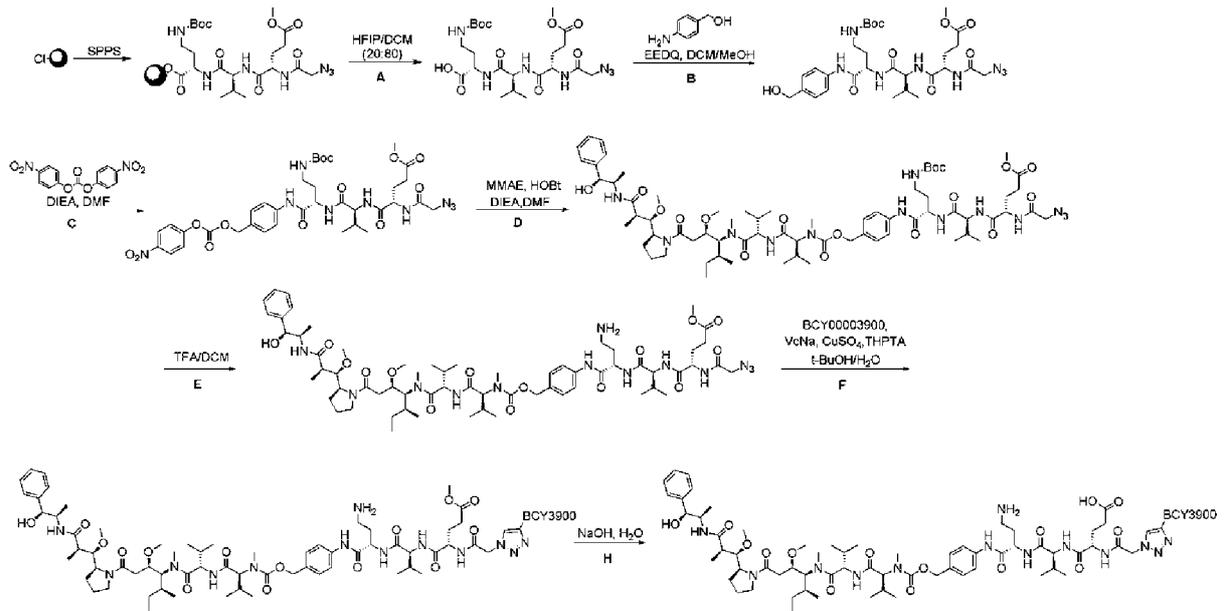
Промежуточное соединение MMAE-PAB-Dap-Val-Glu(OMe)-AcAz получали, как описано для синтеза **BCY10982**. Затем амин боковой цепи конвертировали в соответствующий гуанидин. MMAE-PAB-Dap-Val-Glu(OMe)-AcAz (1 экв.) перемешивали в DMF и к нему добавляли DIEA (9 экв.) и гидрохлорид 1H-пиразол-1-карбоксамидина (24 экв.). Смесь перемешивали при 45°C в течение 24 часов, а затем разбавляли и очищали посредством препаративной ВЭЖХ. Остальные стадии синтеза проводили с использованием общих способов с получением **BCY10983**. Ожидаемая ММ=4039,5, наблюдаемое m/z: 1346 [M+3H]³⁺, 1010 [M+4H]⁴⁺.

BCY10980 - (Cit-Val-Glu)



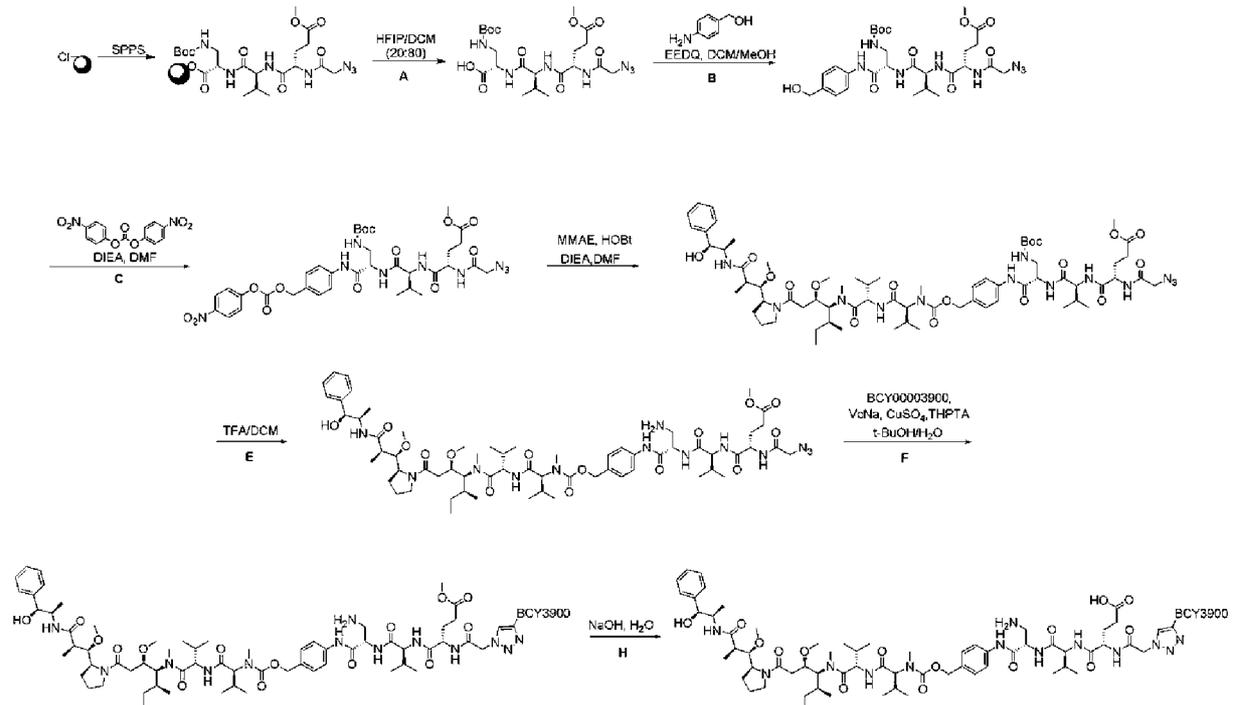
Следовали общим способам с получением **BCY10980**. Ожидаемая ММ=4068,6, наблюдаемое m/z: 1356 [M+3H]³⁺, 1017 [M+4H]⁴⁺.

BCY10981 - (Dab-Val-Glu)



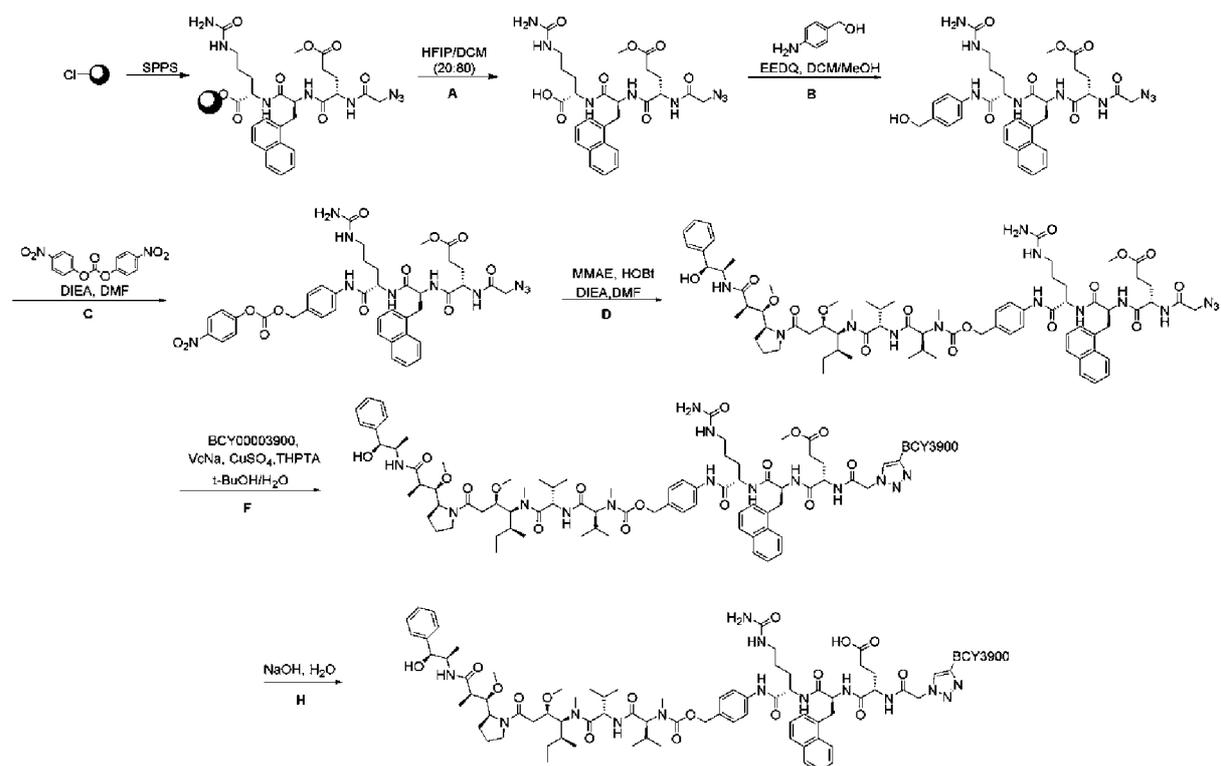
Следовали общим способам с получением **BCY1081**. Ожидаемая ММ=4011,5, наблюдаемое m/z: 1338 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 1003 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$.

BCY1082 - (Dap-Val-Glu)



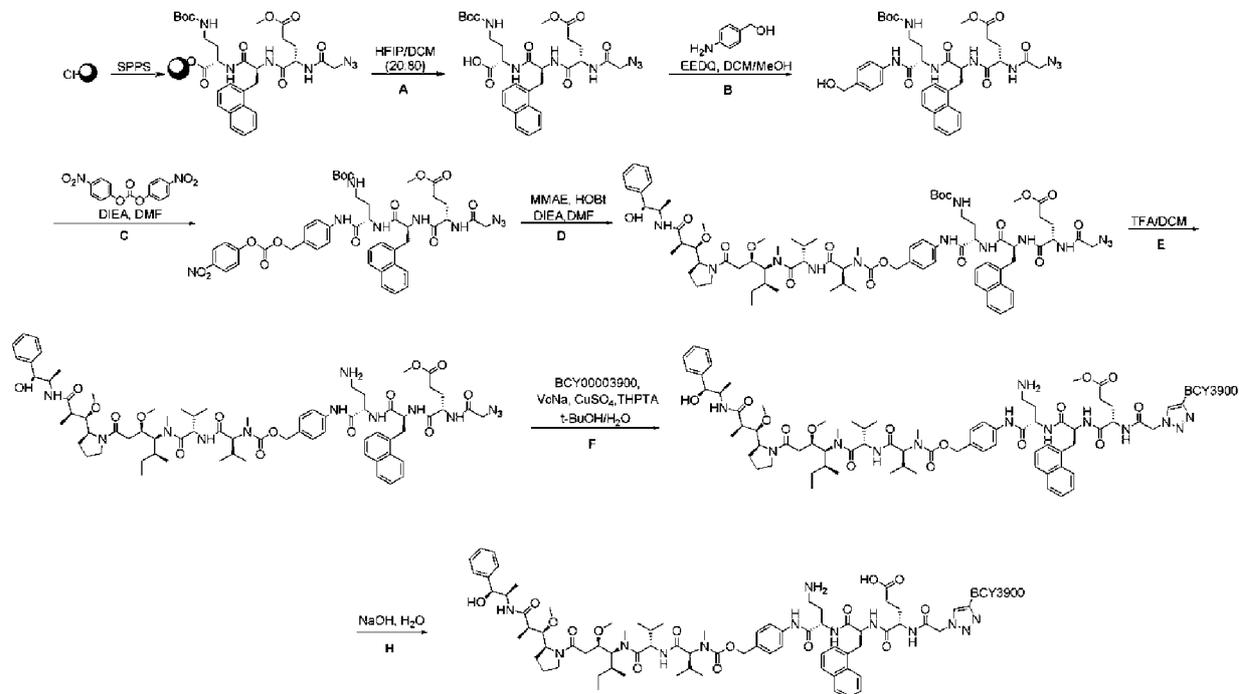
Следовали общим способам с получением **BCY1082**. Ожидаемая ММ=3997,5, наблюдаемое m/z: 1333 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 1000 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$.

BCY1084 - (Cit-1Nal-Glu)



Следовали общим способам с получением **BCY10984**. Ожидаемая ММ=4166,7, наблюдаемое m/z: 1388 [M+3H]³⁺, 1042 [M+4H]⁴⁺.

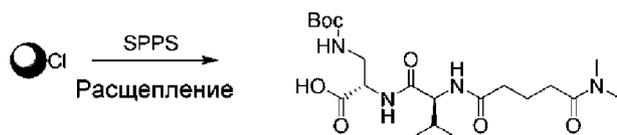
BCY10985 - (Dab-1Nal-Glu)



Следовали общим способам с получением **BCY10985**. Ожидаемая ММ=4109,6, наблюдаемое m/z: 1370 [M+3H]³⁺, 1028 [M+4H]⁴⁺.

BCY10298 - (Dap-Val)

Получение соединения 1



DCM добавляли в емкость, содержащую смолу CTC (5 моль, 4,50 г, 1,10 моль/г), затем капельно добавляли Fmoc-Dap(Boc)-OH (2,13 г, 5 моль, 1,0 экв.) при барботировании N_2 . DIEA (4,0 экв.) и смолу перемешивали в течение 2 ч. Добавляли MeOH (4,5 мл) и смолу вновь перемешивали в течение 30 мин. Затем смолу сушили и промывали DMF 5 раз.

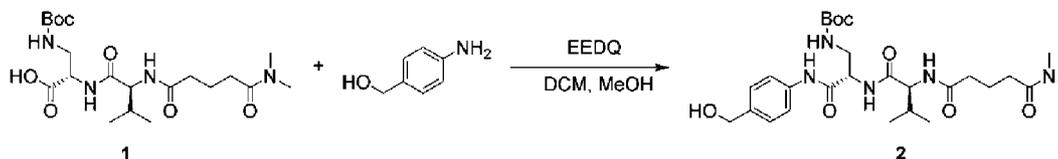
Группы Fmoc удаляли, добавляя 20% пиперидин/DMF и оставляя реагировать в течение 30 мин, затем смолу сушили и промывали DMF 5 раз.

Для присоединения следующих аминокислот к смоле добавляли раствор Fmoc-аминокислоты в DMF и перемешивали в течение 30 секунд, а затем добавляли активирующий агент и основание. Присоединению позволяли протекать в течение 1 ч при непрерывном барботировании N_2 . Раунды присоединения и удаления защитной группы Fmoc повторяли со следующими аминокислотами.

#	Материалы	Реагенты для присоединения/основание
1	Fmoc-Dap(Boc)-OH (1,0 экв.)	DIEA (4,0 экв.)
2	Fmoc-Val-OH (3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)
3	Глутаровый ангидрид (3,0 экв.)	DIEA (6,0 экв.)
4	Диметиламин.HCl(3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)

После последнего присоединения смолу промывали MeOH 3 раза, а затем сушили в вакууме. Отщепление от смолы проводили добавлением 20% HFIP/80% DCM в колбу, содержащую пептид с защищенной боковой цепью, при комнатной температуре. Затем расщепление повторяли (по 1 ч в каждом случае) при непрерывном барботировании N_2 . Смолу фильтровали и фильтрат собирали, а затем концентрировали для удаления растворителя. Неочищенный пептид лиофилизировали с получением соединения **1** (1,64 г, чистота 94,1%, выход 73,7%). Ожидаемая ММ=444,53, наблюдаемое m/z: 445,12 $[M+H]^+$.

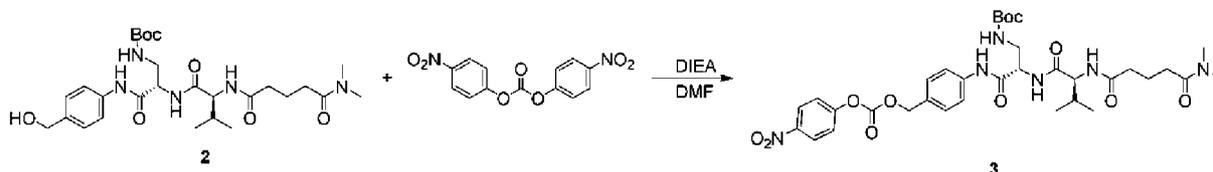
Получение соединения **2**



К раствору соединения **1** (800 мг, 1,80 моль, 1,0 экв.) в DCM (16,0 мл) и MeOH (8,00 мл) добавляли (4-аминофенил)метанол (266 мг, 2,16 моль, 1,2 экв.) и EEDQ (890 мг, 3,60 моль, 2,0 экв.) в темноте. Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. TLC (DCM: MeOH=10: 1, $R_f=0,46$) показала, что соединение **1** было израсходовано полностью. LC-MS показала, что соединение **1** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с

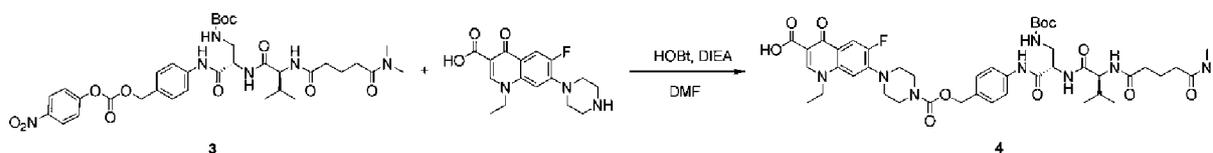
получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; испарительная колонка с диоксидом кремния 40 g SepaFlash®, элюент 0~20% MeOH/DCM при 60 мл/мин) с получением соединения **2** (550 мг, 1,00 моль, выход 55,6%) в виде светло-коричневого твердого вещества. Ожидаемая ММ=549,66, наблюдаемое m/z: 450,04 [(M-Вос)+H]⁺ и 550,08 [M+H]⁺.

Получение соединения 3



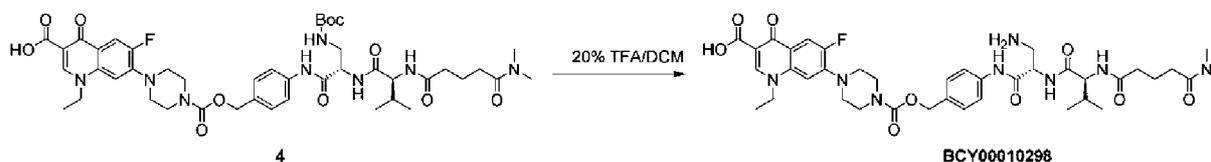
К раствору соединения **2** (550 мг, 1,00 моль, 1,0 экв.) в DMF (7,00 мл) добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (913 мг, 3,00 моль, 3,0 экв.) и DIEA (517 мг, 4,00 моль, 697 мкл, 4,0 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. LC-MS показала, что соединение **2** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **3** (560 мг, 783 мкмоль, выход 78,30%) в виде светло-желтого твердого вещества. Ожидаемая ММ=714,76, наблюдаемое m/z: 614,96 [(M-Вос)+H]⁺ и 715,01 [M+H]⁺.

Получение соединения 4



К раствору соединения **3** (550 мг, 769 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (6,00 мл) добавляли DIEA (398 мг, 3,08 моль, 536 мкл, 4,0 экв.) и перемешивали в течение 10 минут в атмосфере N₂. Затем к смеси добавляли 1-этил-6-фтор-4-оксо-7-пиперазин-1-илхинолин-3-карбоновую кислоту (491 мг, 1,54 моль, 2,0 экв.) и HOBT (208 мг, 1,54 моль, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. LC-MS показала, что соединение **3** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z. Реакционную смесь промывали добавлением H₂O (250 мл) при 25°C, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, соединения **4** (580 мг, неочищенное), в виде желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки. Ожидаемая ММ=894,98, наблюдаемое m/z: 398,04 [(M-Вос)/2+H]⁺, 895,06 [M+H]⁺.

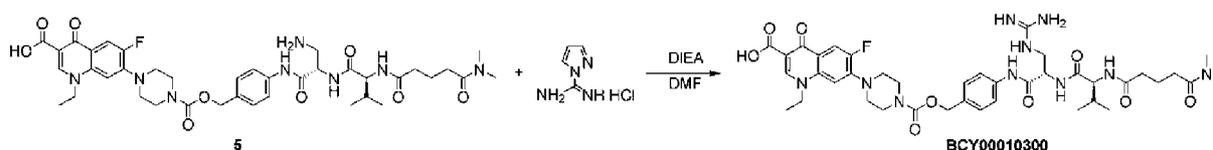
Получение ВСУ10298



К раствору соединения **4** (250 мг, 279 мкмоль, 1,0 экв.) в DCM (2,40 мл) добавляли

TFA (924 мг, 8,10 моль, 0,60 мл, 29,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. LC-MS показала, что соединение **4** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым *m/z*. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% TFA в H₂O, В: ACN) с получением **BCY10298** (160 мг, 194 мкмоль, выход 69,6%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=794,87, наблюдаемое *m/z*: 398,06 [M/2+H]⁺, 795,02 [M+H]⁺.

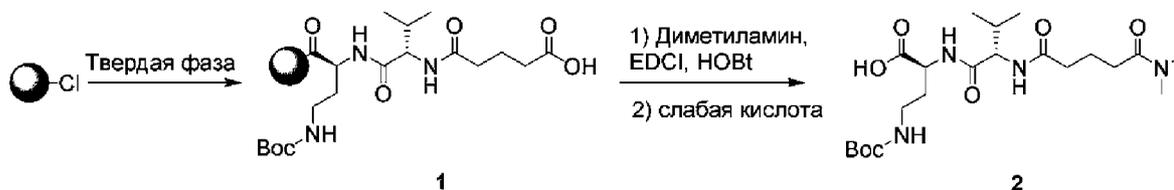
BCY10300 - (Dap(CNNH₂)-Val)



К раствору **BCY10298** (85,0 мг, 107 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (1,00 мл) добавляли хлор(пиразол-1-карбоксимидоил)аммоний (15,6 мг, 107 мкмоль, 1,0 экв.) и DIEA (41,5 мг, 321 мкмоль, 60,0 мкл, 3,0 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. LC-MS показала, что соединение **5** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым *m/z*. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% TFA в H₂O, В: ACN) с получением **BCY10300** (39,3 мг, 46,2 мкмоль, выход 43,1%, чистота 98,3%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=836,91, наблюдаемое *m/z*: 419,11 [M/2+H]⁺ и 836,95 [M+H]⁺.

BCY9474 - (Dab-Val)

Получение соединения 2



В емкость, содержащую смолу СТС, добавляли DCM (10 моль, 9,10 г, 1,10 моль/г), затем добавляли Fmoc-Dab(Boc)-OH (4,40 г, 10 моль, 1,0 экв.) при барботировании N₂. Капельно добавляли DIEA (4,0 экв.) и смолу перемешивали в течение 2 ч. Добавляли MeOH (9,1 мл) и смолу вновь перемешивали в течение 30 мин. Затем смолу осушали и промывали DMF 5 раз.

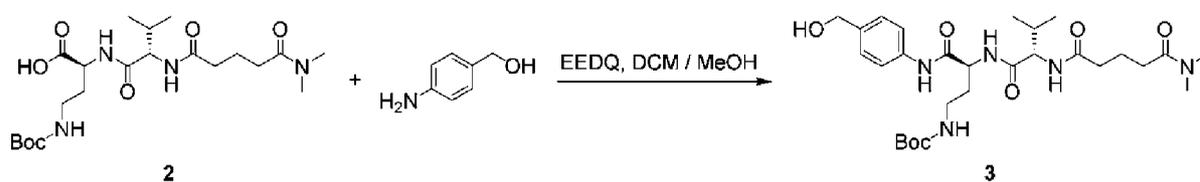
Группы Fmoc удаляли, добавляя 20% пиперидин/DMF и оставляя реагировать в течение 30 мин, затем смолу осушали и промывали DMF 5 раз.

Для присоединения следующих аминокислот к смоле добавляли раствор Fmoc-аминокислоты в DMF и перемешивали в течение 30 секунд, а затем добавляли активирующий агент и основание. Присоединению позволяли протекать в течение 1 ч при непрерывном барботировании N₂. Раунды присоединения и удаления защитной группы Fmoc проводили со следующими аминокислотами:

#	Материалы	Реагенты для присоединения
1	Fmoc-Dab(Boc)-OH (1,0 экв.)	DIEA (4,0 экв.)
2	Fmoc-Val-OH (3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)
3	тетрагидропиран-2,6-дион (3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)
4	Диметиламин·HCl (3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)

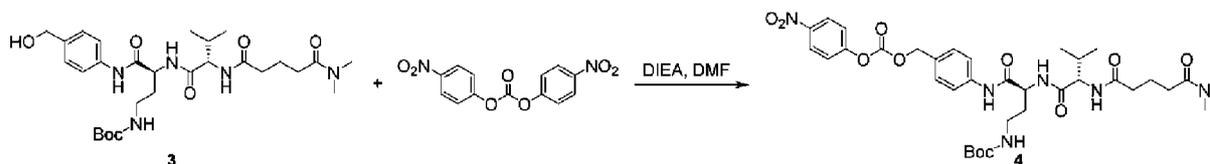
После последнего присоединения смолу промывали MeOH 3 раза, а затем сушили в вакууме. Отщепление от смолы проводили добавлением 20% HFIP/80% DCM в колбу, содержащую пептид с защищенной боковой цепью, при комнатной температуре. Затем расщепление повторяли (по 1 ч в каждом случае) при непрерывном барботировании N₂. Смолу фильтровали и фильтрат собирали, а затем концентрировали для удаления растворителя. Неочищенный пептид лиофилизировали с получением соединения 2 (2,50 г, чистота 96,6%, выход 54,40%). Ожидаемая MM=458,56, наблюдаемое m/z: 459,4 [M+H]⁺.

Получение соединения 3



К раствору соединения 2 (2,50 г, 5,45 моль, 1,0 экв.) в DCM (50,0 мл) и MeOH (25,0 мл) добавляли (4-аминофенил)метанол (806 мг, 6,54 моль, 1,2 экв.) и EEDQ (2,70 г, 10,9 моль, 2,0 экв.) в темноте. Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч в темноте. TLC (DCM: MeOH=10: 1, R_f=0,35) показала, что соединение 2 было израсходовано полностью. LC-MS показала, что основная часть соединения 2 была израсходована, и был выявлен один пик с желаемым m/z для соединения 3. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; испарительная колонка с диоксидом кремния 80 g SepaFlash®, элюент 0~20% MeOH/DCM при 60 мл/мин) с получением соединения 3 (1,65 г, 2,93 моль, выход 53,7%) в виде светло-желтого твердого вещества. Ожидаемая MM=563,69, наблюдаемое m/z: 464,3 [(M-Boc)+H]⁺ и 564,3 [M+H]⁺.

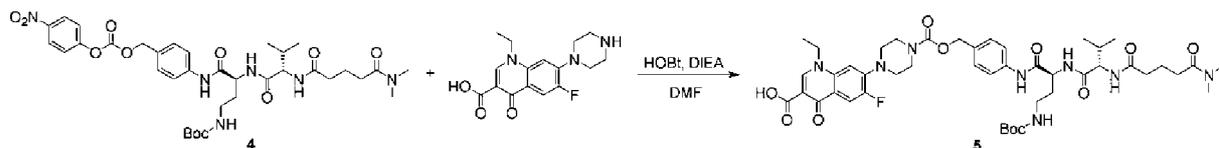
Получение соединения 4



К раствору соединения 3 (1,65 г, 2,93 моль, 1,0 экв.) в DMF (10,0 мл) добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (2,67 г, 8,78 моль, 3,0 экв.) и DIEA (1,51 г, 11,7 моль, 2,04 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. LC-MS продемонстрировала, что был выявлен один основной пик с желаемым m/z для соединения 4. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением

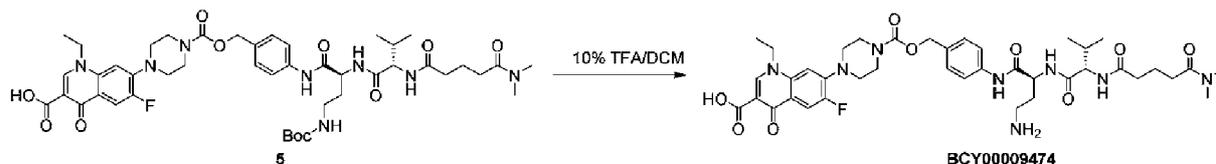
соединения **4** (1,56 г, 1,33 моль, выход 45,3%, чистота 62,0%) в виде светло-желтого твердого вещества. Ожидаемая ММ=728,79, наблюдаемое m/z: 729,3 [M+H]⁺.

Получение соединения **5**



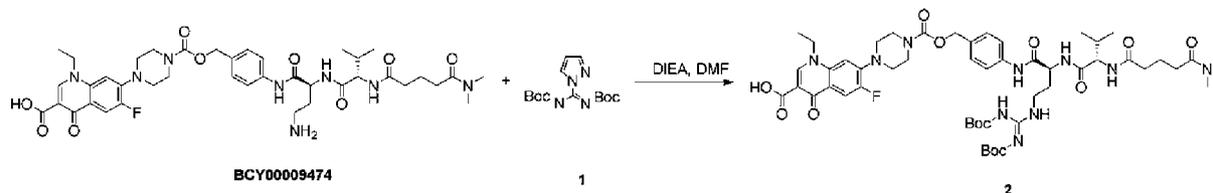
К раствору соединения **4** (1,56 г, 2,14 моль, 1,0 экв.) в DMF (10,0 мл) добавляли DIEA (1,38 г, 10,7 моль, 1,86 мл, 5,0 экв.) и перемешивали в течение 10 мин. Затем к смеси добавляли 1-этил-6-фтор-4-оксо-7-пиперазин-1-илхинолин-3-карбоновую кислоту (1,37 г, 4,28 моль, 2,0 экв.) и HOBt (578 мг, 4,28 моль, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 35°C в течение 2 ч. LC-MS продемонстрировала один выявленный основной пик с желаемым m/z для соединения **5**. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **5** (1,45 г, 1,60 моль, выход 74,5%) в виде светло-желтого твердого вещества. Ожидаемая ММ=909,01, наблюдаемое m/z: 909,3 [M+H]⁺.

Получение ВСУ9474



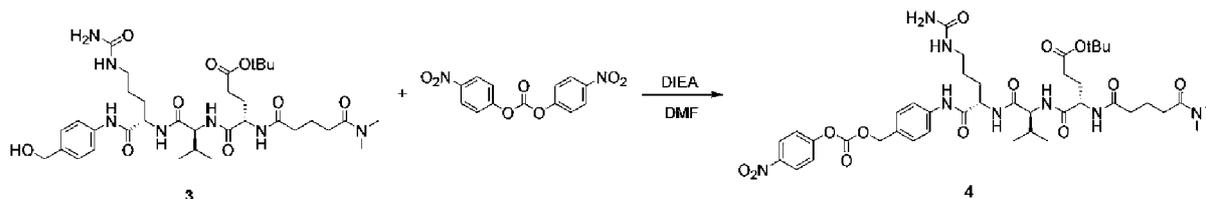
К раствору соединения **5** (1,45 г, 1,60 моль, 1,0 экв.) в DCM (9,00 мл) добавляли TFA (1,54 г, 13,5 моль, 1,00 мл, 8,47 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение **5** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением ВСУ9474 (850 мг, 1,05 моль, выход 65,9%, чистота 98,74%) в виде светло-желтого твердого вещества. Ожидаемая ММ=808,90, наблюдаемое m/z: 405,3 [M/2+H]⁺ и 809,3 [M+H]⁺.

ВСУ9423 - (Agb-Val)



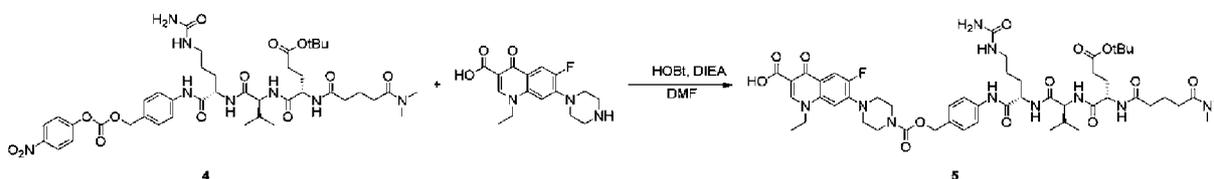
К раствору ВСУ9474 (150 мг, 185 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (2,00 мл) добавляли трет-бутил (Nz)-N-[(tert-бутоксикарбониламино)пиперазол-1-илметил]карбамат (86,3 мг, 278 мкмоль, 1,5 экв.) и DIEA (47,9 мг, 371 мкмоль, 64,6 мкл, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. LC-MS продемонстрировала, что большая часть ВСУ9474 была израсходована, и был выявлен один пик с желаемым m/z для соединения **2**. Реакционную

Получение соединения 4



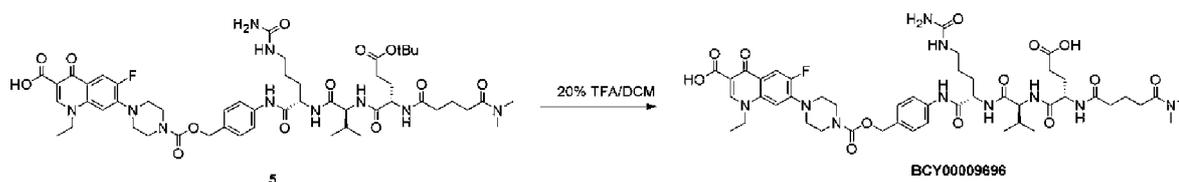
К раствору соединения **3** (350 мг, 496 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (4 мл) добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (453 мг, 1,49 моль, 3,0 экв.) и DIEA (256 мг, 1,98 моль, 345 мкл, 4,0 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. LC-MS показала, что соединение **3** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **4** (370 мг, 425 мкмоль, выход 85,7%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=870,41, наблюдаемое m/z: 870,66 [M+H]⁺.

Получение соединения 5

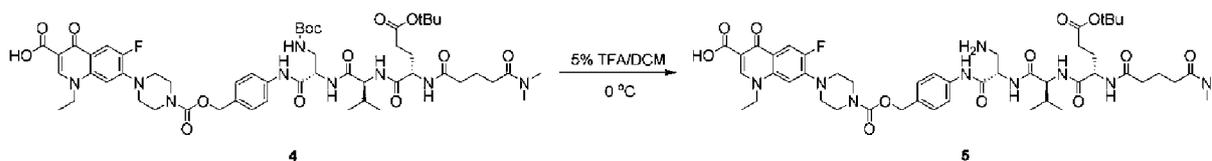


К раствору соединения **4** (360 мг, 413 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (4 мл) добавляли DIEA (267 мг, 2,07 моль, 360 мкл, 5,0 экв.) и перемешивали в течение 10 минут в атмосфере N₂. Затем к смеси добавляли 1-этил-6-фтор-4-оксо-7-пиперазин-1-илхинолин-3-карбоновую кислоту (264 мг, 827 мкмоль, 2,0 экв.) и HOBT (112 мг, 827 мкмоль, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 35°C в течение 2 ч. LC-MS показала, что соединение **4** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **5** (390 мг, 371 мкмоль, выход 89,8%) в виде белого твердого вещества.

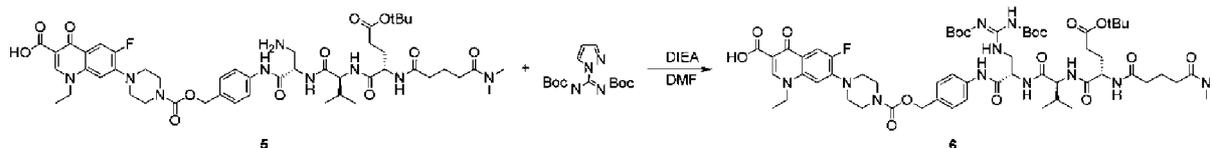
Получение ВСУ9696



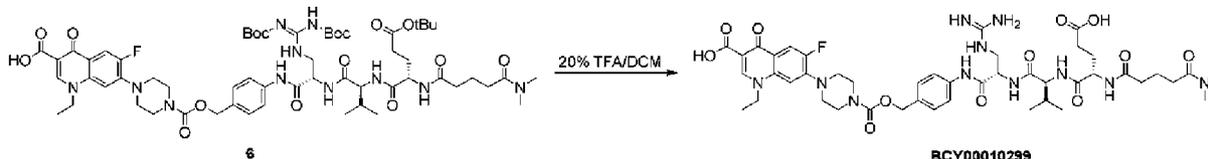
К раствору соединения **5** (150 мг, 143 мкмоль, 1,0 экв.) в DCM (5 мл) добавляли TFA (1,93 г, 16,9 моль, 1,25 мл, 118,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. LC-MS показала, что соединение **5** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% TFA в H₂O, В: ACN) с получением соединения **ВСУ9696** (66,5 мг, 65,8 мкмоль, выход 46,1%, чистота 98,4%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=994,46, наблюдаемое m/z: 497,68 [M/2+H]⁺ и 994,64 [M+H]⁺.

BCY10299 - (Dap(CNNH₂)-Val-Glu)Получение соединения 5

К раствору соединения **4** (которое может быть получено, как описано для BCY10297; 150 мг, 139 мкмоль, 1,0 экв.) в DCM (1,9 мл) добавляли TFA (150 мг, 1,32 моль, 0,10 мл, 9,5 экв.) при 0°C и перемешивали в течение 1 ч. LC-MS (ES10336-123-P1A3) продемонстрировала, что соединение **4** было израсходовано полностью и сформировалось два основных пика, где один соответствовал **BCY10297** (материал с полностью удаленными защитными группами), а другой соответствовал желаемому соединению **5**. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **5** (50,0 мг, 51,0 мкмоль, выход 36,7%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=980,09, наблюдаемое m/z: 490,67 [M/2+H]⁺ и 980,07 [M+H]⁺.

Получение соединения 6

К раствору соединения **5** (92,0 мг, 93,9 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (2 мл) добавляли DIEA (48,5 мг, 375 мкмоль, 65,4 мкл, 4,0 экв.) и пиперазол-1-карбоксамидин (13,8 мг, 93,9 мкмоль, 1,0 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. LC-MS продемонстрировала, что большая часть соединения **5** израсходовалась, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z для соединения **6**. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **6** (72,0 мг, 70,4 мкмоль, выход 75,0%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=1222,36, наблюдаемое m/z: 512,1 [(M-2*Boc)/2+H]⁺, 1022,7 [(M-2*Boc)+H]⁺.

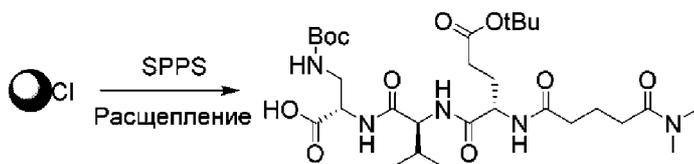
Получение BCY10299

К раствору соединения **6** (72,0 мг, 70,4 мкмоль, 1,0 экв.) в DCM (2,4 мл) добавляли TFA (900 мг, 8,00 моль, 0,60 мл, 114,0 экв.) и перемешивали при 25°C в течение 2 ч. LC-MS показала, что соединение **6** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% TFA в H₂O, В: ACN) с получением **BCY10299** (15,2 мг, 14,0 мкмоль, чистота 96,0% и 1,1 мг, 1,09 мкмоль,

чистота 97,1%; общий выход 21,4%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=966,02, наблюдаемое m/z: 483,65 [M/2+H]⁺ и 966,12 [M+H]⁺.

BCY10297 - (Dap-Val-Glu)

Получение соединения 1



1

В емкость, содержащую смолу СТС, добавляли DCM (5 моль, 4,50 г, 1,10 моль/г), затем капельно добавляли Fmoc-Dap(Boc)-OH (2,13 г, 5 моль, 1,0 экв.) при барботировании N₂. Добавляли DIEA (4,0 экв.) и смолу перемешивали в течение 2 ч. Добавляли MeOH (4,5 мл) и смолу вновь перемешивали в течение 30 мин. Затем смолу осушали и промывали DMF 5 раз.

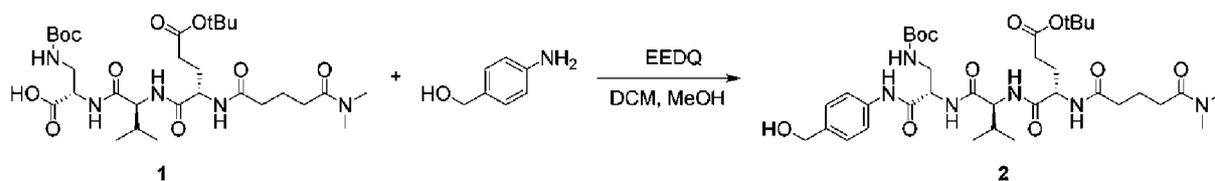
Группы Fmoc удаляли, добавляя 20% пиперидин/DMF и оставляя реагировать в течение 30 мин, затем смолу осушали и промывали DMF 5 раз.

Для присоединения следующих аминокислот к смоле добавляли раствор Fmoc-аминокислоты в DMF и перемешивали в течение 30 секунд, а затем добавляли активирующий агент и основание. Присоединению позволяли протекать в течение 1 ч при непрерывном барботировании N₂. Раунды присоединения и удаления защитной группы Fmoc проводили со следующими аминокислотами:

#	Материалы	Реагенты для присоединения
1	Fmoc-Dap(Boc)-OH (1,0 экв.)	DIEA (4,0 экв.)
2	Fmoc-Val-OH (3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)
3	Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)
4	Глутаровый ангидрид (3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)
5	Диметиламин.HCl (3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)

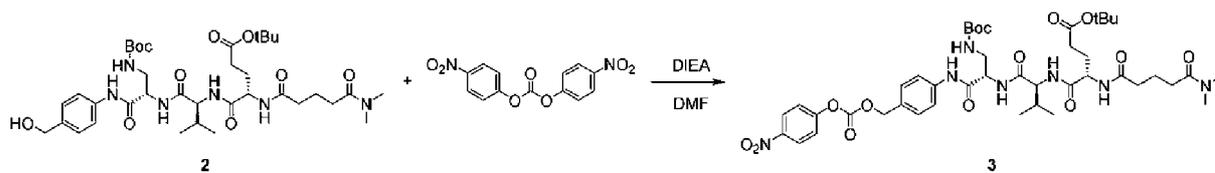
После последнего присоединения смолу промывали MeOH 3 раза, а затем сушили в вакууме. Отщепление от смолы проводили добавлением 20% HFIP/80% DCM в колбу, содержащую пептид с защищенной боковой цепью, при комнатной температуре. Затем расщепление повторяли (по 1 ч в каждом случае) при непрерывном барботировании N₂. Смолу фильтровали и фильтрат собирали, а затем концентрировали для удаления растворителя. Неочищенный пептид лиофилизировали с получением соединения 2 (2,27 г, чистота 93,4%, выход 69,1%). Ожидаемая ММ=629,75, наблюдаемое m/z: 630,10 [(M-Boc)+H]⁺, 630,10 [M+H]⁺.

Получение соединения 2



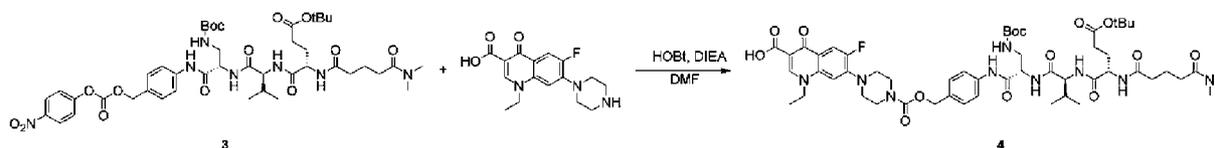
К раствору соединения **1** (800 мг, 1,27 моль, 1,0 экв.) в DCM (16,0 мл) и MeOH (8,00 мл) добавляли (4-аминофенил)метанол (188 мг, 1,52 моль, 1,2 экв.) и EEDQ (628 мг, 2,54 моль, 2,0 экв.) в темноте. Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. TLC (DCM: MeOH=10: 1, $R_f=0,46$) показала, что соединение **1** было израсходовано полностью. LC-MS показала, что соединение **1** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Затем остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; испарительная колонка с диоксидом кремния 40 g SepaFlash®, элюент 0~20% MeOH/DCM при 60 мл/мин) с получением соединения **2** (600 мг, 816 мкмоль, выход 64,3%) в виде светло-коричневого твердого вещества. Ожидаемая ММ=734,88, наблюдаемое m/z : 635,09 [(M-Boc)+H]⁺ и 735,10 [M+H]⁺.

Получение соединения 3



К раствору соединения **2** (600 мг, 816 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (8,00 мл) добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (745 мг, 2,45 моль, 3,0 экв.) и DIEA (422 мг, 3,27 моль, 569 мкл, 4,0 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. LC-MS показала, что соединение **2** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z . Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **3** (630 мг, 700 мкмоль, выход 85,7%) в виде светло-желтого твердого вещества. Ожидаемая ММ=899,98, наблюдаемое m/z : 799,99 [(M-Boc)+H]⁺ и 900,02 [M+H]⁺.

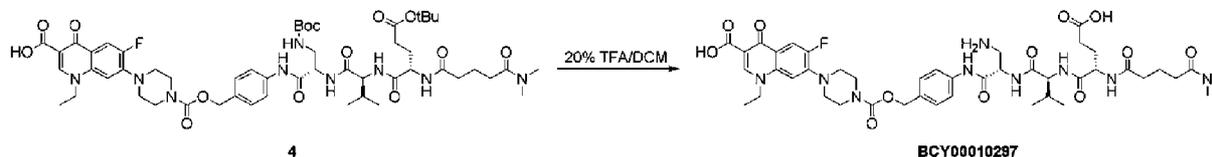
Получение соединения 4



К раствору соединения **3** (630 мг, 700 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (8,00 мл) добавляли DIEA (362 мг, 2,80 моль, 488 мкл, 4,0 экв.) и перемешивали в течение 10 минут в атмосфере N₂. Затем к смеси добавляли 1-этил-6-фтор-4-оксо-7-пиперазин-1-илхинолин-3-карбоновую кислоту (447 мг, 1,40 моль, 2,0 экв.) и HOBT (189 мг, 1,40 моль, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. LC-MS показала, что соединение **3** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z .

Реакционную смесь промывали добавлением 250 мл H₂O при 25°C, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного соединения **4** (630 мг, неочищенное) в виде желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки. Ожидаемая ММ=1080,20, наблюдаемое m/z: 490,63 [(M-Boc)/2+H]⁺ и 1080,09 [M+H]⁺.

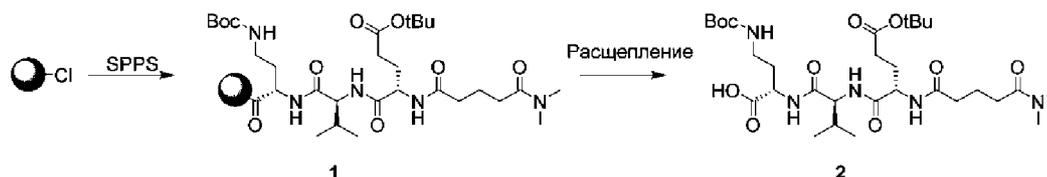
Получение BCY10297



К раствору соединения **4** (130 мг, 120 мкмоль, 1,0 экв.) в DCM (1,60 мл) добавляли TFA (596 мг, 5,23 моль, 400 мкл, 43,6 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. LC-MS показала, что соединение **4** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% TFA в H₂O, В: ACN) с получением **BCY10297** (45,3 мг, 46,6 мкмоль, выход 38,7%, чистота 95,0%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=923,68, наблюдаемое m/z: 462,58 [M/2+H]⁺ и 924,07 [M+H]⁺.

BCY9695 - (Agb-Val-Glu)

Получение соединения 2



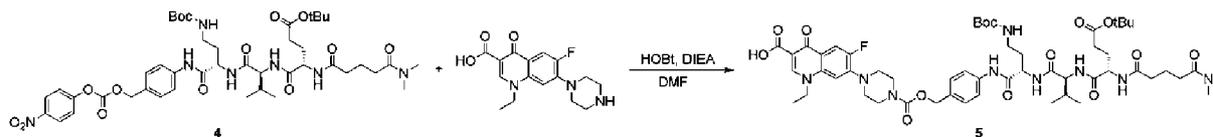
В емкость, содержащую смолу CTC, добавляли DCM (5 моль, 4,50 г, 1,10 моль/г), затем добавляли Fmoc-Dab(Boc)-OH (2,20 г, 5 моль, 1,0 экв.) при барботировании N₂. Капельно добавляли DIEA (4,0 экв.) и смолу перемешивали в течение 2 ч. Добавляли MeOH (4,5 мл) и смолу вновь перемешивали в течение 30 мин. Затем смолу осушали и промывали DMF 5 раз.

Группы Fmoc удаляли, добавляя 20% пиперидин/DMF и оставляя реагировать в течение 30 мин, затем смолу осушали и промывали DMF 5 раз.

Для присоединения следующих аминокислот к смоле добавляли раствор Fmoc-аминокислоты в DMF и перемешивали в течение 30 секунд, а затем добавляли активирующий агент и основание. Присоединению позволяли протекать в течение 1 ч при непрерывном барботировании N₂. Раунды присоединения и удаления защитной группы Fmoc проводили со следующими аминокислотами:

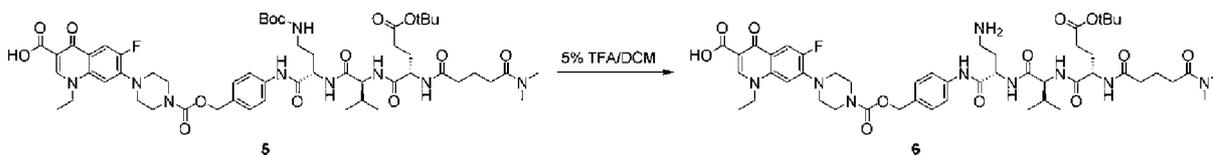
#	Материалы	Реагенты для присоединения
1	Fmoc-Dab(Boc)-OH (1,0 экв.)	DIEA (4,0 экв.)
2	Fmoc-Val-OH (3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)

Получение соединения 5



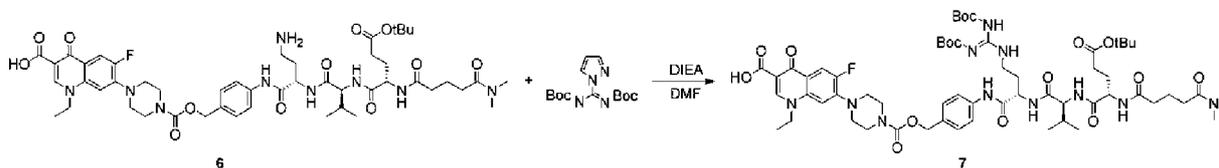
К раствору соединения **4** (400 мг, 438 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (5 мл) добавляли DIEA (283 мг, 2,19 моль, 381 мкл, 5,0 экв.) и перемешивали в течение 10 мин. Затем к смеси добавляли 1-этил-6-фтор-4-оксо-7-пиперазин-1-илхинолин-3-карбоновую кислоту (280 мг, 875 мкмоль, 2,0 экв.) и HOBT (118 мг, 875 мкмоль, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 35°C в течение 2 ч. LC-MS показала, что соединение **4** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z для соединения **5**. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **5** (310 мг, 283 мкмоль, выход 64,7%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=1093,55, наблюдаемое m/z: 1093,77 [M+H]⁺ и 547,18 [M/2+H]⁺.

Получение соединения 6



К раствору соединения **5** (305 мг, 279 мкмоль, 1,0 экв.) в DCM (5,70 мл) добавляли TFA (462 мг, 4,05 моль, 0,30 мл, 14,5 экв.). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. LC-MS показала, что соединение **5** было израсходовано полностью и сформировалось два основных пика, где один соответствовал желаемому соединению **6**, а другой соответствовал материалу с полностью удаленными защитными группами. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **6** (205 мг, 206 мкмоль, выход 74,0%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=993,50, наблюдаемое m/z: 993,72 [M+H]⁺ и 497,26 [M/2+H]⁺.

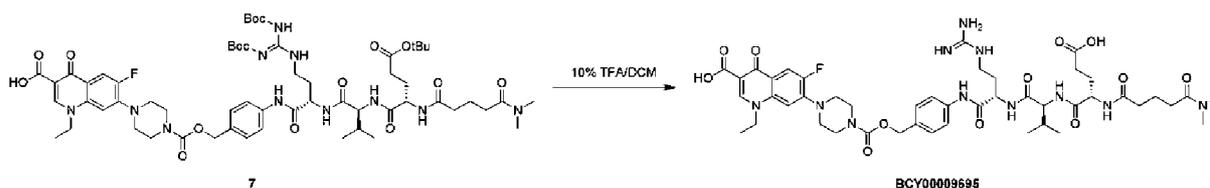
Получение соединения 7



К раствору соединения **6** (205 мг, 206 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (3 мл) добавляли трет-бутил (Nz)-N-[(трет-бутоксикарбониламино)пиперазол-1-илметил]карбамат (96,0 мг, 309 мкмоль, 1,5 экв.) и DIEA (53,3 мг, 412 мкмоль, 71,8 мкл, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. LC-MS показала, что соединение **6** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z для соединения **7**. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **7** (70,0 мг, 56,6 мкмоль, выход 27,5%) в виде белого твердого

вещества. Ожидаемая ММ=1235,62, наблюдаемое m/z: 1257,66 [M+Na]⁺ и 618,21 [M/2+H]⁺.

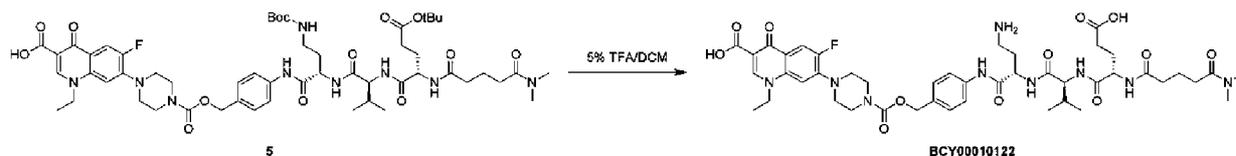
Получение BCY9695



К раствору соединения **7** (70,0 мг, 56,6 мкмоль, 1,0 экв.) в DCM (0,90 мл) добавляли TFA (154 мг, 1,35 моль, 100 мкл, 23,8 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. LC-MS показала, что соединение **7** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Затем остаток очищали препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% TFA в H₂O, В: ACN) с получением соединения **BCY9695** (21,9 мг, 22,1 мкмоль, выход 39,0%, чистота 98,9%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=979,46, наблюдаемое m/z: 979,60 [M+H]⁺ и 490,18 [M/2+H]⁺.

BCY10122 - (Dab-Val-Glu)

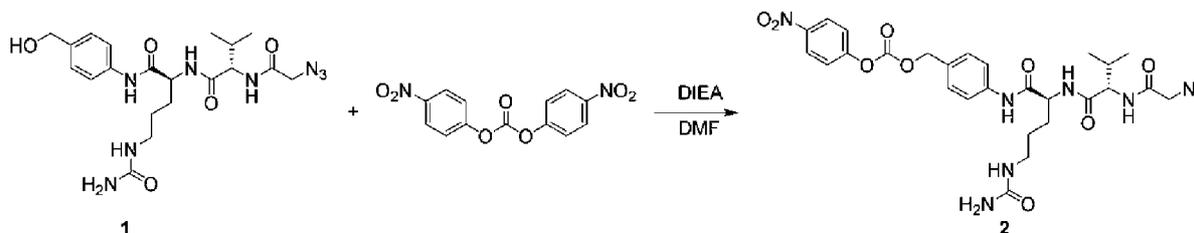
Получение BCY10122



К раствору соединения **5** (305 мг, 279 мкмоль, 1,0 экв.) в DCM (5,70 мл) добавляли TFA (462 мг, 4,05 моль, 0,30 мл, 14,5 экв.). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. LC-MS показала, что соединение **5** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z (*вычисленная ММ.*, *наблюдаемое m/z.*). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением **BCY10122** (50,2 мг, 52,0 мкмоль, выход 18,6%, чистота 97,1%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=937,43, наблюдаемое m/z: 469,24 [M/2+H]⁺, 937,65 [M+H]⁺.

BCY7761 - (Cit-Val)

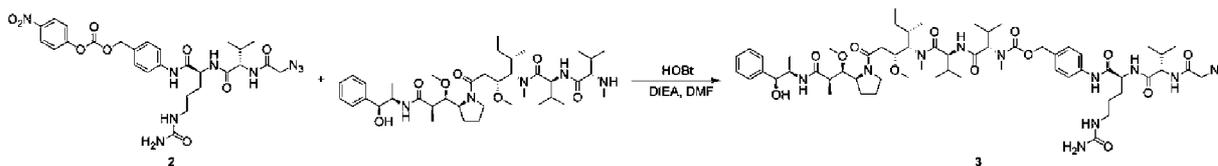
Получение соединения 2



К раствору соединения **1** (1,50 г, 3,24 моль, 1,0 экв.) в DMF (20 мл) добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (2,96 г, 9,73 моль, 3,0 экв.) и DIEA (1,68 г, 13,0 моль, 2,26 мл, 4,0 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 15°C в течение 2 ч. LC-MS показала, что соединение **1** было израсходовано полностью, и был выявлен один пик с желаемым m/z.

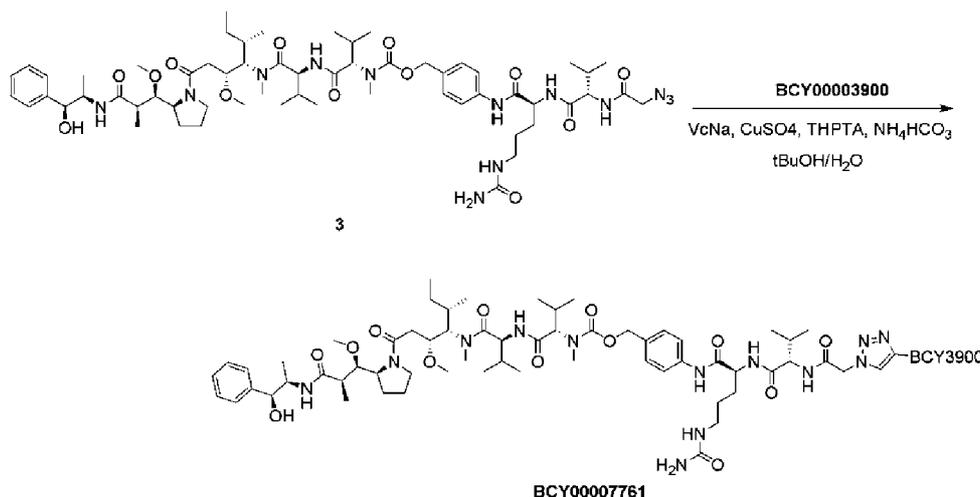
Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **2** (1,20 г, 1,91 моль, выход 58,9%) в виде светло-желтого твердого вещества. Ожидаемая ММ=627,61, наблюдаемое m/z: 627,94 [M+H]⁺.

Получение соединения 3



К раствору соединения **2** (905 мг, 1,44 моль, 1,15 экв.) в DMF (10 мл) добавляли DIEA (486 мг, 3,76 моль, 655 мкл, 3,0 экв.) и перемешивали в течение 10 мин. Затем к смеси добавляли HOBT (195 мг, 1,44 моль, 1,15 экв.) и **ММАЕ** (900 мг, 1,25 моль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 35°C в течение 16 ч. LC-MS показала, что соединение **2** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **3** (1,08 г, 895 мкмоль, выход 71,6%) в виде светло-желтого твердого вещества. Ожидаемая ММ=1206,48, наблюдаемое m/z: 1206,25 [M+H]⁺.

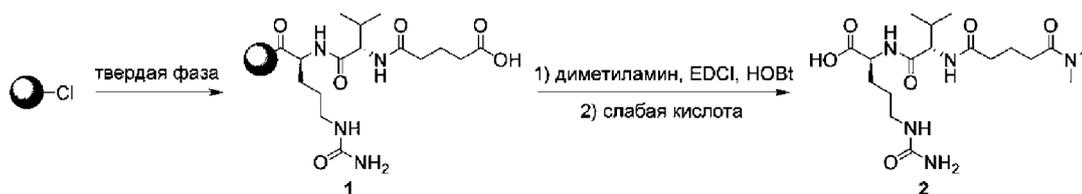
Получение BCY7761



К раствору соединения **3** (971 мг, 805 мкмоль, 1,1 экв.), **BCY3900** (2,00 г, 732 мкмоль, 1,0 экв.) в t-BuOH (10 мл) и H₂O (10 мл) добавляли CuSO₄ (0,4 М, 1,83 мл, 1,0 экв.) и трис(3-гидроксипропилтриазилилметил)амин (ТНРТА, 318 мг, 732 мкмоль, 1,0 экв.). Затем к смеси добавляли VcNa (0,4 М, 3,66 мл, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 15°C в течение 2 ч. LC-MS показала, что соединение **3** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z. К реакционной смеси добавляли EDTA (0,5 М, 1,5 мл) для гашения реакции. Затем реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% TFA в H₂O, В: ACN) с получением **BCY7761** (2,20 г, 539 мкмоль, выход 73,4%, чистота 96,5%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая ММ=3939,45, наблюдаемое m/z: 985,47 [M/4+H]⁺ и 1313,56 [M/3+H]⁺.

BCY9422 - (Cit-Val)

Получение соединения 2



В емкость, содержащую смолу СТС, добавляли DCM (10 моль, 9,10 г, 1,10 моль/г), а затем добавляли Fmoc-Cit-OH (3,98 г, 10 моль, 1,0 экв.) при барботировании N_2 . Капельно добавляли DIEA (4,0 экв.) и смолу перемешивали в течение 2 ч. Добавляли MeOH (9,1 мл) и смолу вновь перемешивали в течение 30 мин. Затем смолу осушали и промывали DMF 5 раз.

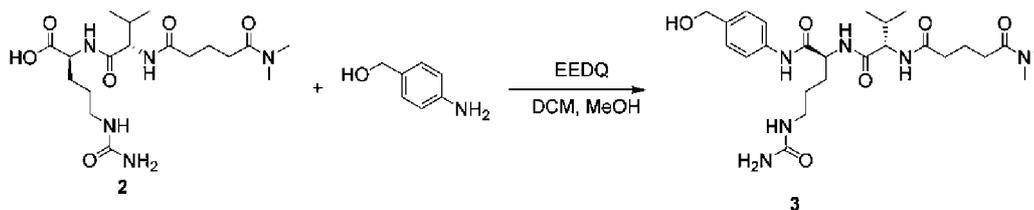
Группы Fmoc удаляли, добавляли 20% пиперидин/DMF и оставляя реагировать в течение 30 мин, затем смолу осушали и промывали DMF 5 раз.

Для присоединения следующих аминокислот к смоле добавляли раствор Fmoc-аминокислоты в DMF и перемешивали в течение 30 секунд, а затем добавляли активирующий агент и основание. Присоединению позволяли протекать в течение 1 ч при непрерывном барботировании N_2 . Раунды присоединения и удаления защитной группы Fmoc проводили со следующими аминокислотами:

#	Материалы	Реагенты для присоединения
1	Fmoc-Cit-OH (1,0 экв.)	DIEA (4,0 экв.)
2	Fmoc-Val-OH (3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)
3	тетрагидропиран-2,6-дион (3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)
4	Диметиламин·HCl (3,0 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)

После присоединения последней аминокислоты смолу промывали MeOH 3 раза, а затем сушили в вакууме. Отщепление от смолы проводили добавлением 20% HFIP/80% DCM в колбу, содержащую пептид с защищенной боковой цепью, при комнатной температуре. Затем расщепление повторяли (по 1 ч в каждом случае) при непрерывном барботировании N_2 . Смолу фильтровали и фильтрат собирали, а затем концентрировали для удаления растворителя. Неочищенный пептид лиофилизировали с получением соединения 2 (неочищенное, 1,80 г, чистота 91,82%, выход 39,7%). Ожидаемая $MM=415,49$, наблюдаемое m/z : 416,2 $[M+H]^+$.

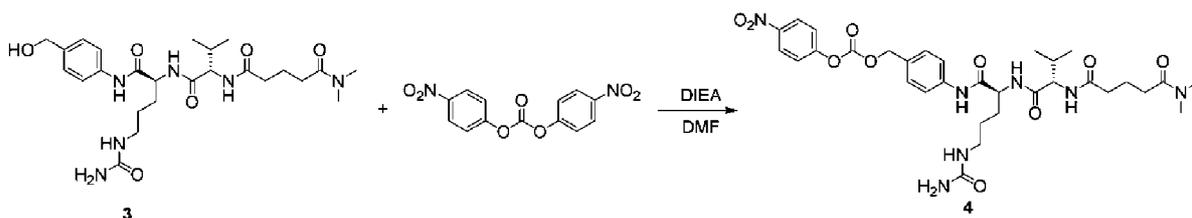
Получение соединения 3



К раствору соединения 2 (500 мг, 1,20 моль, 1,0 экв.) в DCM (10 мл) и MeOH (5 мл) добавляли (4-аминофенил)метанол (178 мг, 1,44 моль, 1,2 экв.) и EEDQ (595 мг, 2,41 моль, 2,0 экв.) в темноте. Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч. TLC (DCM: MeOH=10:

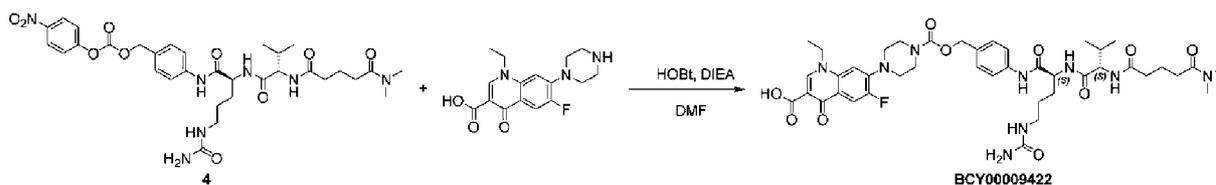
1, $R_f=0,53$) показала, что соединение **2** было израсходовано полностью. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; испарительная колонка с диоксидом кремния 40 g SepaFlash®, элюент 0~25% MeOH/DCM при 40 мл/мин) с получением соединения **3** (380 мг, 730 мкмоль, выход 60,7%) в виде светло-желтого твердого вещества. $^1\text{H-NMR}$: ES8396-320-P1D1 (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ м.д. 9,87-9,91 (м, 1 H), 8,09 (ушир. д, $J=7,53$ Гц, 1 H), 7,86 (д, $J=8,53$ Гц, 1 H), 7,49-7,57 (м, 2 H), 7,18-7,26 (м, 2 H), 5,97 (ушир. т, $J=5,52$ Гц, 1 H), 5,41 (с, 2 H), 5,06-5,12 (м, 1 H), 4,34-4,44 (м, 3 H), 4,14-4,22 (м, 1 H), 3,33 (с, 6 H), 2,91 (с, 3 H), 2,79 (с, 2 H), 2,16-2,32 (м, 4 H), 1,97 (дкв, $J=13,52$, 6,70 Гц, 1 H), 1,63-1,76 (м, 3 H), 0,85 (дд, $J=11,17$, 6,90 гц, 6 H).

Получение соединения 4



К раствору соединения **3** (380 мг, 730 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (8 мл) добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (666 мг, 2,19 моль, 3,0 экв.) и DIEA (377 мг, 2,92 моль, 509 мкл, 4,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. LC-MS показала, что соединение **3** было израсходовано полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z для соединения **4**. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением соединения **4** (368 мг, 537 мкмоль, выход 73,5%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая $MM=685,32$, наблюдаемое m/z : 686,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Получение ВСУ9422



К раствору соединения **4** (150 мг, 219 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (3 мл) добавляли DIEA (141 мг, 1,09 моль, 191 мкл, 5,0 экв.) и перемешивали в течение 10 мин при 25°C. Затем к смеси добавляли 1-этил-6-фтор-4-оксо-7-пиперазин-1-илхинолин-3-карбоновую кислоту (105 мг, 328 мкмоль, 1,5 экв.) и HOBT (29,6 мг, 219 мкмоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 35°C в течение 16 ч. LC-MS продемонстрировала один пик с выявленным желаемым m/z . Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (А: 0,075% TFA в H_2O , В: ACN) с получением **ВСУ9422** (107,8 мг, 119 мкмоль, выход 54,6%, чистота 95,9%) в виде белого твердого вещества. Ожидаемая $MM=865,95$, наблюдаемое m/z : 433,7 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ и 866,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Анализ стабильности в плазме

Объединенную замороженную плазму размораживали на водяной бане при 37°C.

Плазму центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин и при наличии сгустки удаляли. рН при необходимости доводили до $7,4 \pm 0,1$. Исходный раствор 1 мМ приготавливали с DMSO. Пропентелин (положительный контроль) получали путем приготовления 100-мкМ рабочего раствора путем разведения 5 мкл исходного раствора (10 мМ) посредством 495 мкл сверхчистой воды. 100 мкМ рабочие растворы тестируемых соединений получали путем разбавления 10 мкл исходного раствора (1 мМ) посредством 90 мкл DMSO. К 98 мкл пустой плазмы добавляли 2 мкл раствора для дозирования (100 мкМ) для достижения конечной концентрации 2 мкМ в двух экземплярах, и образцы инкубировали при 37°C на водяной бане. В каждый момент времени (0, 1, 2, 4, 6 и 24 ч) добавляли 400 мкл 200 нг/мл толбутамида и лабеталола в 100% MeOH и тщательно перемешивали для осаждения белков. Планшеты с образцами центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин. Аликвоту супернатанта (150 мкл) переносили из каждой лунки, а затем проводили анализ LC-MS/MS.

% оставшегося тестируемого соединения после инкубации в плазме вычисляли с использованием следующего уравнения:

$$\% \text{ оставшегося соединения} = 100 \times (\text{PAR в указанный момент времени инкубации} / \text{PAR в момент времени } T_0)$$

Где PAR представляет собой соотношение площадей пиков анализируемого соединения и внутреннего стандарта (IS).

Указанные моменты времени инкубации представляют собой T_0 (0 ч), T_n ($n=0, 1, 2, 4, 6, 24$ ч). Время полужизни ($T_{1/2}$) вычисляли из логарифмического линейного графика концентрации против времени.

Когда величина % оставшегося соединения в максимальный момент времени инкубации, который в этом испытании представлял собой 24 ч, составляла более 75%, считалось, что она находится в пределах приемлемого экспериментального отклонения. Таким образом, было установлено соответствующее $t_{1/2} > 57,8$ ч.

Анализ с катепсином В (CatB)

15 мкл раствора тестируемого соединения (2 мМ в DMSO) добавляли в планшет для инкубации в двух экземплярах. 30 мкл исходного раствора катепсина В (16 мкМ) предварительно активировали посредством 1500 мкл активирующего буфера в течение 10 мин при комнатной температуре. Раствор катепсина В разбавляли 13,17 мл воды, затем в планшет для инкубации добавляли 735 мкл активированной ферментной смеси. Смесь инкубировали при 37°C на водяной бане. В различные моменты времени (например, 0 ч, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 24 ч) реакцию завершали путем отбора аликвот 100 мкл и гашения 400 мкл холодного раствора для гашения с добавлением IS. Образцы смешивали и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин. 50 мкл супернатанта отбирали в новый планшет, содержащий 150 мкл сверхчистой воды, и образцы тщательно перемешивали, а затем подвергали анализу LC-MS/MS.

Модели с ксенотрансплантатами

Для моделей с ксенотрансплантатами клеточного происхождения (CDX) мышам (balb/c nude, самки, 18-23 г в начале испытания) инокулировали клетки HT1080 ($5,0 \times 10^6$

клеток/мышь в 0,2 мл PBS в правый бок). Животных случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал заданного начального размера. Размер групп составляет $n=4$. Все исследования включали контроль с введением носителя.

Дозирование проводили посредством внутривенного болюса. Объем опухоли измеряли в двух измерениях с использованием штангенциркуля, и объем выражали в мм^3 с использованием формулы: $V=0,5 a \times b^2$, где a и b являются длинным и коротким диаметрами опухоли, соответственно. Все исследования с ксенотрансплантатами проводились в Wuxi AppTec Co. Ltd. (Shanghai).

Фармакокинетика в плазме конъюгатов бициклических пептидов и высвободившихся грузов у мышей CD-1

Самцам мышей CD-1 дозировали каждый конъюгат бициклического пептида, составленный в 25 мМ гистидине HCl, 10% сахарозе, pH 7, посредством инъекции в хвостовую вену. Проводили серийное взятие крови (приблизительно 80 мкл крови/момент времени) в каждый момент времени через подчелюстную или подкожную вену. Все образцы крови сразу переносили в предварительно охлажденные микроцентрифужные пробирки, содержавшие 2 мкл K2-EDTA (0,5M) в качестве антикоагулянта, и помещали на жидкий лед. Образцы крови сразу обрабатывали для получения плазмы посредством центрифугирования при приблизительно 4°C , 3000g. Преципитирующий агент, включавший внутренний стандарт (350 мкл), сразу добавляли в 35-мкл образец плазмы, хорошо перемешивали и центрифугировали при 3220 g, 4°C , в течение 15 минут. Супернатант переносили в предварительно обозначенные микроцентрифужные пробирки из полипропилена, а затем быстро замораживали на сухом льду. Образцы хранили при 70°C или ниже при необходимости до анализа. Образцы супернатанта смешивали с 50 мкл воды, хорошо встряхивали и центрифугировали при 3220 g, 4°C , в течение 15 минут. Образец супернатанта инжестировали для анализа LC-MS/MS с использованием Acquity UPLC с AB Sciex 6500+ Triple Quad MS в режиме положительных ионов для определения концентраций конъюгата бициклического пептида и высвободившегося груза. Данные концентрации в плазме против времени анализировали посредством некомпартментных подходов с использованием программного обеспечения Phoenix WinNonlin 6.3. Получали данные о C_0 , Cl , Vd_{ss} , $T_{1/2}$, $AUC_{(0-last)}$, $AUC_{(0-inf)}$, $MRT_{(0-last)}$, $MRT_{(0-inf)}$ и графики профиля концентрации против времени.

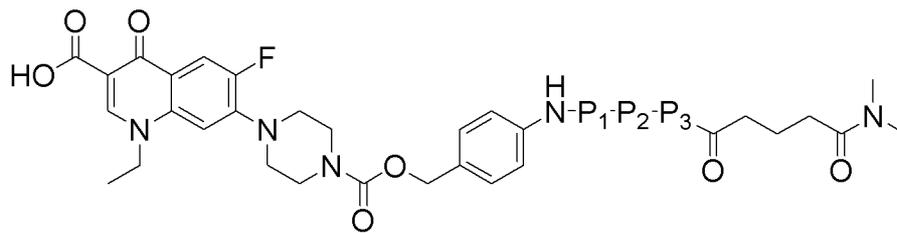
Измерение ММАЕ в образцах плазмы, мышц и опухоли

Образцы опухоли из испытаний ксенотрансплантатов *in vivo* взвешивали, гомогенизировали (10× разведение в буфере для гомогенизации, включавшем ингибиторы протеаз). Затем гомогенаты опухоли и плазму анализировали посредством LC-MS/MS по стандартным методикам.

Тестируемые соединения

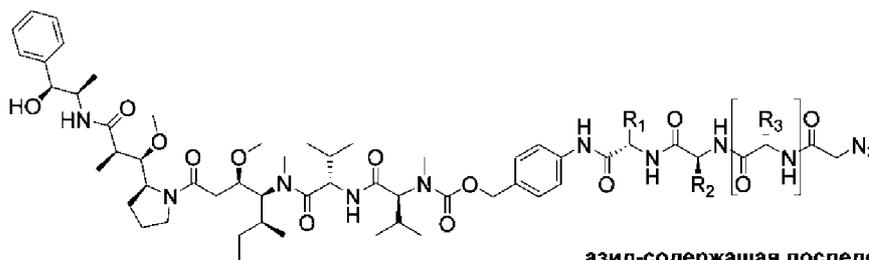
Соединения, использованные для следующих испытаний, конструировали, как описано в настоящем описании выше, с использованием норфлоксацина в качестве суррогатного груза, конъюгированного с ди/трипептидными линкерами по изобретению

через саморасщепляющуюся группу PAB. Пептидные линкеры были кэпированы на N-конце 5-(диметиламино)-5-оксопентановой кислотой, как схематично представлено ниже:

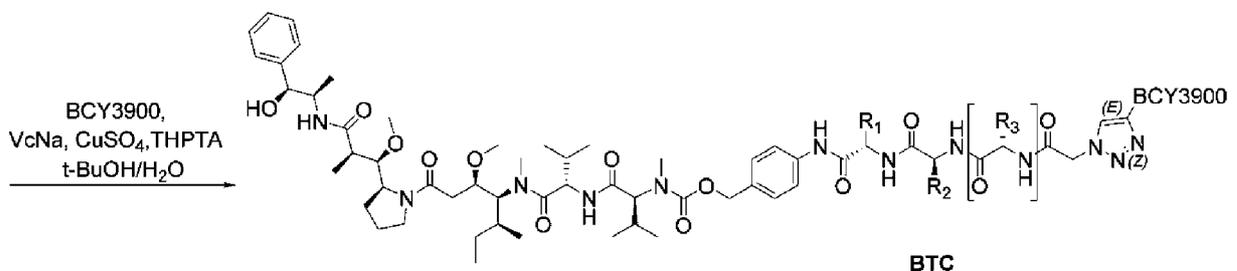


Конъюгаты бициклический пептид-токсин (BTC)

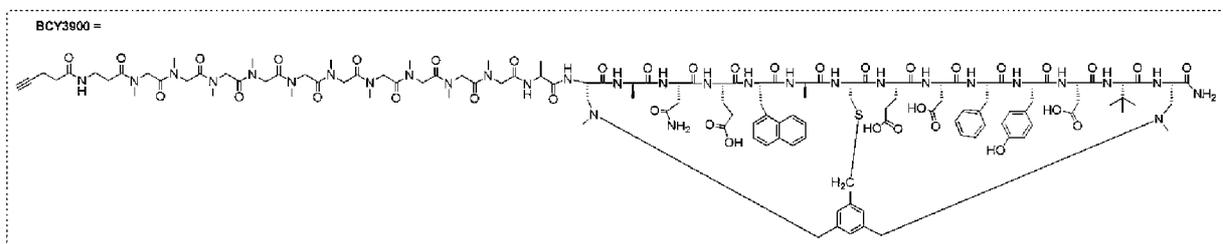
BTC, включавшие ди/трипептидные линкеры по изобретению, синтезировали путем получения азид-содержащих последовательностей токсина/линкера. В данном случае, цитотоксин MMAE был связан с пептидными расщепляемыми линкерами через саморасщепляющуюся группу PAB, которые были конъюгированы со связывающимся бициклическим пептидом MT1-MMP (BCY3900; как представлено в WO 2016/067035 в качестве SEQ ID NO: 5) с использованием катализируемого медью циклоприсоединения азид-алкин.



азид-содержащая последовательность MMAE/линкер



BTC



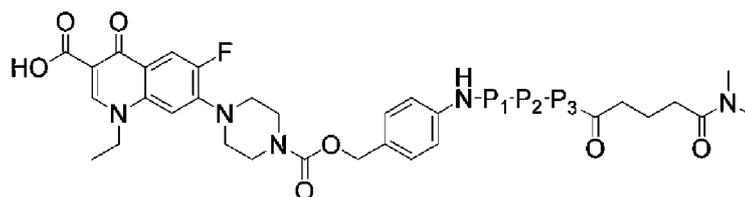
Пример 1: Анализ стабильности в плазме с использованием линкеров по изобретению

Было показано, что замена остатка цитруллина в CatB-чувствительном дипептидном линкере Cit-Val основной неприродной аминокислотой повышает устойчивость линкера к неспецифическому расщеплению при инкубации с плазмой мыши *in vitro*. На это указывает пролонгированное время полужизни в таблице 1 для тестируемых соединений по

сравнению с линкером Cit-Val (BCY9422).

Таблица 1: Замена Cit в P1 основными не природными аминокислотами в дипептидных линкерах

Cit-Val → BAA-Val (BAA=основная не природная аминокислота)

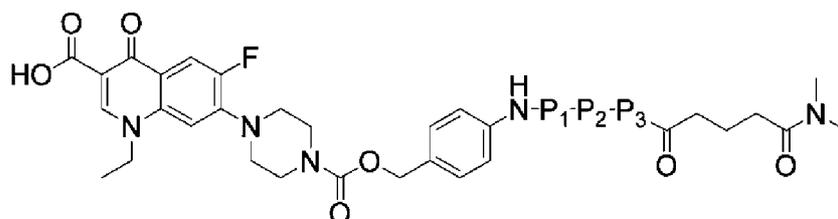


Соединение №	P1	P2	P3	$t_{1/2}$ (ч) в плазме мыши	Кратность увеличения времени полужизни против Cit-Val
BCY9422	Cit	Val	-	0,4	1,0
BCY10300	Dap(CNNH ₂)	Val	-	1,4	3,4
BCY9423	Agb	Val	-	2,4	6,0
BCY9477	Agb(Me)	Val	-	2,5	6,3
BCY10298	Dap	Val	-	2,6	6,5
BCY00009474	Dab	Val	-	4,3	10,8

В некоторых случаях, таких как с Agb и Dab, когда цитруллин заменяют в линкере, содержащем мотив Cit-Val-Glu (который, согласно сообщенным данным, имеет более высокую стабильность в плазме мыши, чем Cit-Val), наблюдают аддитивный эффект, где аналогичные линкеры, включающие основные остатки, демонстрируют еще более увеличенную стабильность в плазме мыши относительно Cit-Val-Glu, как показано в таблице 2.

Таблица 2: Замена Cit в P1 основными не природными аминокислотами в трипептидных линкерах

Cit-Val-Glu → BAA-Val-Glu (BAA=основная не природная аминокислота)

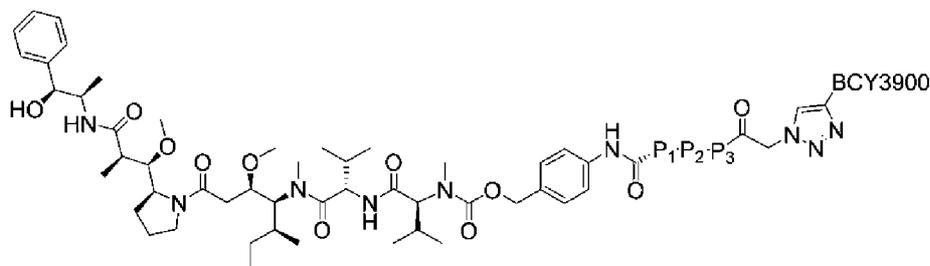


Соединение №	P1	P2	P3	$t_{1/2}$ (ч) в плазме мыши	Кратность увеличения времени полужизни против Cit-Val
BCY9422	Cit	Val	-	0,4	1,0
BCY9696	Cit	Val	Glu	10,8	25,1
BCY10299	Dap(CNNH ₂)	Val	Glu	9,4	11,8
BCY10297	Dap	Val	Glu	15,5	19,3
BCY9695	Agb	Val	Glu	14,3	34,1
BCY10122	Dab	Val	Glu	39,0	107,5

ВТС, включающие линкеры, которые имеют основные неприродные аминокислоты в положении P1, демонстрируют увеличенную устойчивость в плазме мыши, например, ВТС с расщепляемым линкером Dab-Val (см. BCY10989 в таблице 3) имеет время полужизни 30,8 часов в плазме мыши (антикоагулянт EDTA) по сравнению с 6,8 часов для Cit-Val (см. BCY7761 в таблице 3).

Когда Glu включен в положении P3, линкеры с Dab в положении P1 демонстрируют увеличенную устойчивость в плазме по сравнению с их аналогами с Cit (см. Cit-Val-Glu по сравнению с Dab-Val-Glu в плазме человека, Cit-1Nal-Glu по сравнению с Dab-1Nal-Glu в плазме крысы и мыши с антикоагулянтом EDTA).

Таблица 3: Стабильность ВТС в плазме



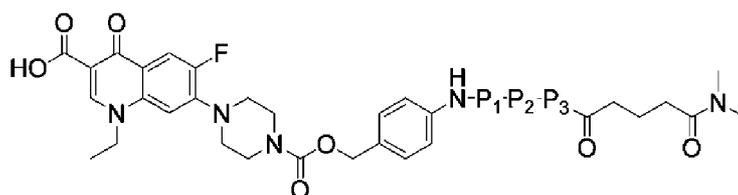
Соединение №	P1	P2	P3	$t_{1/2}$ в плазме человека (гепарин)	$t_{1/2}$ в плазме крысы (гепарин)	$t_{1/2}$ в плазме мыши (гепарин)	$t_{1/2}$ в плазме мыши (EDTA)	$t_{1/2}$ в плазме мыши, эксперимент 2 (EDTA)
BCY7761	Cit	Val	-	>57,8	56,8	9,2	9,1	6,8
BCY10989	Dab	Val	-	NT	NT	NT	NT	30,8
BCY10980	Cit	Val	Glu	40	>57,8	>57,8	>57,8	NT

BCY10981	Dab	Val	Glu	73,8	>57,8	>57,8	>57,8	NT
BCY10984	Cit	1Nal	Glu	>57,8	53,8	47,5	>57,8	NT
BCY10985	Dab	1Nal	Glu	>57,8	>57,8	>57,8	>57,8	NT
BCY10982	Dap	Val	Glu	NT	NT	NT	55,9	NT
BCY10986	Dab	2Nal	Glu	NT	NT	NT	50,1	NT
BCY10987	Dab	Dpa	Glu	NT	NT	NT	>57,8	NT
BCY10988	Dab	cBu	Glu	NT	NT	NT	>57,8	NT

Пример 2: Анализ скорости расщепления CatB с использованием линкеров по изобретению

Замена остатка цитруллина в чувствительном к CatB дипептидном линкере Cit-Val основной неприродной аминокислотой также модулирует скорость расщепления катепсином В линкера. Например, каждый Dab, Agb и Agb(Me) увеличивает скорости расщепления катепсином В *in vitro* по сравнению с Cit-Val (см. таблицу 4). Dap и Dap(CNNH₂) снижают скорость расщепления (см. таблицу 4).

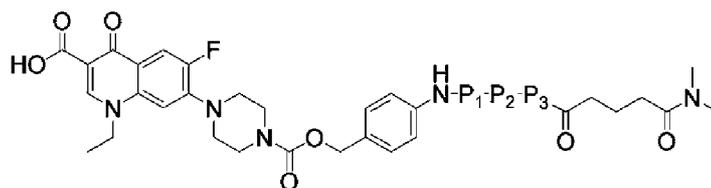
Таблица 4: Замена Cit в P1 основными неприродными аминокислотами в дипептидных линкерах



	P1	P2	P3	% исходного соединения, оставшийся после инкубации CatB		
				T=1 ч	T=4 ч	T=24 ч
BCY9422	Cit	Val	-	3	0	0
BCY10300	Dap(CNNH ₂)	Val	-	72	10	0
BCY9423	Agb	Val	-	0,6	0	0
BCY9477	Agb(Me)	Val	-	0	0	0
BCY10298	Dap	Val	-	92	63	6
BCY9474	Dab	Val	-	0,3	0	0

Замена остатка цитруллина в чувствительном к CatB трипептидном линкере Cit-Val-Glu основной неприродной аминокислотой модулирует скорость расщепления катепсином В линкера. Например, Dab и Agb демонстрируют сходную скорость расщепления катепсином В с Cit-Val *in vitro* (см. таблицу 5). Замена на Dap и Dap(CNNH₂) снижает скорость расщепления (см. таблицу 5).

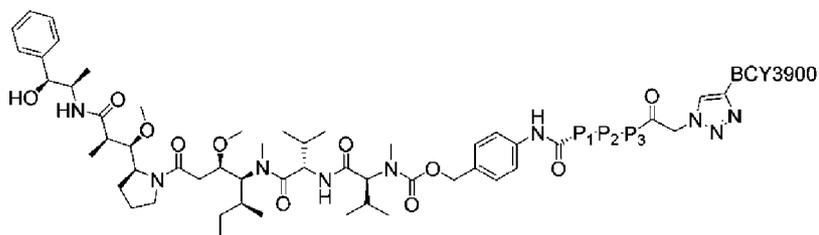
Таблица 5: Замена Cit в P1 основными неприродными аминокислотами в трипептидных линкерах



	P1	P2	P3	% исходного оставшегося соединения после инкубации с CatB		
				T=1 ч	T=4 ч	T=24 ч
BCY9696	Cit	Val	Glu	0	0	0
BCY10299	Dap(CNNH2)	Val	Glu	48	1	0
BCY10297	Dap	Val	Glu	75	15	0
BCY9695	Agb	Val	Glu	0	0	0
BCY10122	Dab	Val	Glu	0	0	0

Скорость расщепления линкеров катепсином В можно модулировать путем внесения различных неприродных аминокислот в положения P1 и P2. Результаты анализа расщепления CatB с ВТС можно видеть в таблице 6, где замена Cit на Dab в линкере Cit-Val обеспечивает более медленно расщепляемый линкер. Когда Glu вносят в эти последовательности в положении P3, скорость расщепления между 2 линкерами является сравнимой. Замена положения P1 на Dap значительно замедляет расщепление линкера посредством CatB. Замена Val в положении P2 на 1Nal значительно замедляет расщепление CatB, в то время как его региоизомер 2Nal только немного снижает кинетику расщепления. Включение Dpa в P2 значительно снижает скорость расщепления CatB, и сBu ингибирует расщепление полностью.

Таблица 6: Расщепление ВТС посредством CatB



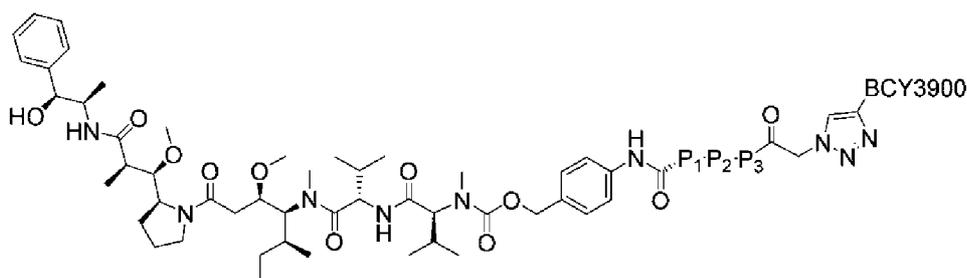
Соединение №	P1	P2	P3	% исходного оставшегося соединения после инкубации CatB						t _{1/2} CatB (ч)
				0 ч	1 ч	2 ч	4 ч	6 ч	24 ч	
BCY7761	Cit	Val	-	100	33,687	15,1	4,93	1,01	0,462	0,9

BCY10989	Dab	Val	-	100	89,4	60,7	40,4	23,2	12,8	2,8
BCY10980	Cit	Val	Glu	100	0	0	0	0	0	<0,2
BCY10981	Dab	Val	Glu	100	0	0	0	0	0	<0,2
BCY10982	Dap	Val	Glu	100	85,435	82,3	73,1	72,3	73,91	>57,8
BCY10984	Cit	1Nal	Glu	100	94,498	83,5	39,2	33,4	32,5	3,3
BCY10985	Dab	1Nal	Glu	100	103,62	94,8	107	92,2	86,82	>57,8
BCY10986	Dab	2Nal	Glu	100	9,7346	0	0	0	0	0,3
BCY10987	Dab	Dpa	Glu	100	104,27	90,6	90,2	94	91,48	>57,8
BCY10988	Dab	cBu	Glu	100	109,88	119	110	105	111	>57,8

Пример 3: Анализ связывания белка в плазме с использованием линкеров по изобретению

Замена аминокислот в положениях P1 и P2 может модулировать связывание белков плазмы с ВТС. В таблице 7 продемонстрировано, что замена Dab в положении P1 на Cit повышает процент несвязанного соединения. Замена Val в положении P2 на 1Nal снижает % несвязанного соединения.

Таблица 7: Связывание ВТС с белками плазмы



	P1	P2	P3	Связывание белков плазмы (% несвязанного соединения)			
				Мышь	Крыса	Яванский макак	Человек
BCY7761	Cit	Val	-	17,3	10,6	18,7	21,1
BCY10980	Cit	Val	Glu	18,7	NT	NT	NT
BCY10981	Dab	Val	Glu	28,8	41,7	45,9	65,3
BCY10984	Cit	1Nal	Glu	0,2	3,5	9,2	3,1
BCY10985	Dab	1Nal	Glu	4,8	NT	NT	23,4
BCY10986	Dab	2Nal	Glu	7,1	11,5	NT	NT

Пример 4: Фармакокинетический анализ с использованием линкеров по изобретению

Замена дипептидных линкерных аминокислот может изменять профиль фармакокинетики (ПК) ВТС.

Мышь

Результаты, показанные на фиг.1-6 и в таблице 8, демонстрируют, что линкеры, содержащие 1Nal в положении P2, демонстрируют пролонгированное время полужизни в исследованиях РК на мышах. Линкеры с увеличенной стабильностью в плазме мыши демонстрируют более низкие относительные уровни ММАЕ в плазме относительно Cit-Val (относительно исходного соединения).

Таблица 8: Обобщение фармакокинетического анализа у мышей

BCY	Последовательность	C0 (нг/мл)	CLp (мл/мин/кг)	Vdss (л/кг)	t _{1/2} (ч)
BCY7761	ММАЕ-РАВ-(Cit-Val)- BCY3900	24753	1,0	0,04	0,48
BCY10984	ММАЕ-РАВ-(Cit-1Nal- Glu)-BCY3900	111807	0,2	0,09	7,55
BCY10980	<i>ММАЕ-РАВ-(Cit-Val-Glu)- BCY3900</i>	40157	4,8	0,20	0,64
BCY10981	<i>ММАЕ-РАВ-(Dab-Val- Glu)-BCY3900</i>	30674	3,9	0,15	0,60
BCY10985	ММАЕ-РАВ-(Dab-1Nal- Glu)-BCY3900	26393	1,0	0,18	2,48

Крыса

Результаты экспериментов РК на крысах, представленные на фиг.7 и 8 и в таблице 9, показывают, что BCY10984 имеет пролонгированное время полужизни по сравнению с аналогом Cit-Val BCY7761. Также в плазме присутствует меньше свободного токсина ММАЕ (относительно интактного исходного соединения).

Таблица 9: Обобщение фармакокинетического анализа у крыс

Соединение	Линкер	РРВ (% несвязанного соединения)	t _{1/2} (ч)	Соотношение АUC
BCY7761	Cit-Val	11%	0,49	0,00445
BCY10984	Cit-1Nal-Glu	4%	1,83	0,0000936

Пример 5: Эффективность уменьшения опухоли и уровни токсина в опухоли

Результаты, приведенные на фиг.9 и 10, показывают, что BCY10984 (линкер Cit-1Nal-Glu) демонстрирует более высокую эффективность, чем BCY7761 (BT1769-линкер Cit-Val), в модели на мышах CDX (клетки HT1080) с полным устранением опухоли после однократной дозы 1 мг/кг и 3 мг/кг. Эти дозы не влияют на массу тела животных.

Результаты, представленные на фиг.11-15, демонстрируют, что более высокие уровни токсина ММАЕ наблюдаются в опухоли при введении BCY10984 мышам,

имеющим опухоли HT1080, по сравнению с BT1769 в той же дозе. Сходные уровни ММАЕ присутствуют в плазме и мышечной ткани.

Пример 6: Испытание эффективности *in vivo* с использованием линкеров по изобретению в модели с ксенотрансплантатом HT1080 у мышей BALB/c Nude

(a) Задача исследования

Задачей этого исследования была оценка *in vivo* терапевтической эффективности BCY10984 и BCY12951 (конъюгат лекарственного средства, содержащий тот же линкер, что и в BCY10984, но с несвязывающим бициклическим пептидным лигандом, т.е. имеющим состав: MMAE-PAV-(Dab-Val-Glu)-несвязывающий бициклической пептид) в модели с ксенотрансплантатом HT1080 на мышах BALB/c nude.

(b) Схема эксперимента

Группа	N	Лечение	Дозировка	Объем дозирования	Путь	Схема
1	5	Носитель	--	10 мл/кг	в/в	qw×2
2	5	BCY10984	5 мкМ	10 мл/кг	в/в	qw×3
3	5	BCY10984	15 мкМ	10 мл/кг	в/в	qw×3
4	5	BCY10984	45 мкМ	10 мл/кг	в/в	qw×3
5	5	BCY12951	5 мкМ	10 мл/кг	в/в	qw×2
6	5	BCY12951	15 мкМ	10 мл/кг	в/в	qw×2
7	5	BCY12951	45 мкМ	10 мл/кг	в/в	qw×3

Примечание: мониторинг мышей проводили до 39 суток после 2~3 курсов дозирования.

Мышам из групп 5 и 6 дозировали 45 мкМ BCY10984 на 14 сутки и 28 сутки.

(c) Материалы

(i) Животные и условия содержания

Животные

Вид: *Mus Musculus*

Линия: BALB/c nude

Возраст: 6-8 недель

Пол: самки

Масса тела: 18-22 г

Количество животных: 35 мышей плюс запасные

Поставщик животных: Shanghai Lingchang Biotechnology Experimental Animal Co., LTD.

Условия содержания

Мышей держали в клетках с индивидуальной вентиляцией при постоянной температуре и влажности по 5 животных в каждой клетке.

- Температура: 20~26°C.

- Влажность 40-70%.

Клетки: изготовленные из поликарбоната. Размер составлял 375 мм × 215 мм × 180

мм. Материалом подстилки являлись кукурузные початки, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному посредством облучения сухому гранулированному корму в ходе всего периода испытания.

Вода: животные имели свободный доступ к стерильной питьевой воде.

Обозначение клетки: идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала лечения.

Идентификация животных: животных маркировали посредством ушной маркировки.

(d) Экспериментальные способы и методики

(i) Клеточная культура

Клетки HT1080 поддерживали в среде EMEM, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивировали два раза в неделю. Растущие клетки в экспоненциальной фазе роста собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

(ii) Инокуляция опухоли

Каждой мышце инокулировали подкожно в правый бок опухолевые клетки HT1080 (5×10⁶) в 0,2 мл PBS для развития опухоли. Животных случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 320 мм³, для исследования эффективности. Введение тестируемого изделия и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

(iii) Получение тестируемого состава

Лечение	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	--	25 mM гистидин, 10% сахароза pH=7
BCY10984	0,4	Растворить 2,34 мг BCY10984 в 5,583 мл His-буфера*.
	0,188	Разбавить 0,703 мл исходного раствора 0,4 мг/мл BCY10948 посредством 0,797 мл His-буфера.
	0,063	Разбавить 0,234 мл исходного раствора 0,4 мг/мл BCY10948 посредством 1,266 мл His-буфера.
	0,021	Разбавить 0,078 мл исходного раствора 0,4 мг/мл BCY10948 посредством 1,422 мл His-буфера.
BCY12951	0,4	Растворить 2,5 мг BCY12951 в 5,645 мл His-буфера.
	0,185	Разбавить 0,693 мл 0,4 мг/мл BCY12951 исходного раствора посредством 0,807 мл His-буфера.
	0,062	Разбавить 0,231 мл исходного раствора 0,4 мг/мл BCY12951

		посредством 1,438 мл His-буфера.
	0,021	Разбавить 0,077 мл исходного раствора 0,4 мг/мл BCY12951 посредством 1,479 мл His-буфера.
*His-буфер: 25 mM гистидин, 10% Сахароза pH=7		

(iv) Наблюдения

Все процедуры, связанные с содержанием, уходом и лечением животных в испытании проводили в соответствии с рекомендациями, одобренными Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (IACUC) WuXi AppTec, согласно руководству Ассоциации по оценке и аккредитации условий содержания лабораторных животных (AAALAC). В ходе стандартного мониторинга животных проверяли в отношении каких-либо эффектов роста опухоли и лечения на нормальное поведение, таких как подвижность, употребление пищи и воды (только путем наблюдения), увеличение/снижение массы тела, потускнение глаз/волос и любой другой аномальный эффект в соответствии с протоколом. Смерть и наблюдаемые клинические признаки регистрировали на основе количеств животных в каждой подгруппе.

(v) Измерение опухоли и конечные результаты

Основным конечным результатом было определить, может ли быть замедлен рост опухоли или могут ли мышцы быть вылечены. Объем опухоли измеряли три раза в неделю в двух измерениях с использованием штангенциркуля, и объем выражали в мм³ с использованием формулы: $V=0,5 a \times b^2$, где a и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Затем размер опухоли использовали для вычислений величины T/C.

Величина T/C (в процентах) является признаком противоопухолевой эффективности; T и C представляют собой средние объемы групп лечения и контроля, соответственно, в данный день.

TGI вычисляли для каждой группы с использованием формулы: $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$; T_i представляет собой средний объем опухоли в группе лечения в данный день, T_0 представляет собой средний объем опухоли в группе лечения в день начала лечения, V_i представляет собой средний объем опухоли в контрольной группе носителя в той же день с T_i , и V_0 представляет собой средний объем опухоли в группе носителя в день начала лечения.

(vi) Статистический анализ

Суммарная статистика, включая среднее значение и стандартную ошибку среднего значения (SEM), предоставлена для объема опухоли в каждой группе в каждый момент времени.

Статистический анализ различий в объеме опухоли среди групп проводили для данных, полученных в наилучший терапевтический момент времени после последней дозы.

Односторонний ANOVA проводили для сравнения объема опухоли среди групп, и, когда получали значимую F-статистику (соотношение дисперсии лечения и дисперсии

ошибки), сравнения между группами проводили с использованием критерия Геймса-Ховелла. Все данные анализировали с использованием GraphPad Prism 5.0. Статистически значимым считали $P < 0,05$.

(e) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Кривые роста опухоли представлены на фиг. 16 и 17.

(ii) Отслеживание объема опухоли

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей BALB/c nude, имеющих опухоль NT1080, представлен в таблице 10:

Таблица 10: Отслеживание объема опухоли с течением времени

Группа	Лечение	Сутки после начала лечения					
		0	2	4	6	9	11
1	Носитель, в/в, qw	321±45	505±42	742±73	920±97	1297±133	1731±194
2	BCY10984, 5 мкМ, в/в, qw	320±48	508±49	681±64	750±50	958±53	1257±95
3	BCY10984, 15 мкМ, в/в, qw	321±43	519±76	428±88	378±128	304±112	288±126
4	BCY10984, 45 мкМ, в/в, qw	320±32	489±68	285±90	139±46	29±10	15±6
5	BCY12951, 5 мкМ, в/в, qw	321±42	529±51	668±68	720±69	818±98	1011±140
6	BCY12951, 15 мкМ, в/в, qw	321±37	528±67	687±91	830±113	1026±88	1354±145
7	BCY12951, 45 мкМ, в/в, qw	321±30	522±34	545±20	584±22	755±20	901±59

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Скорость ингибирования роста опухоли для BCY10984 и BCY12951 в модели с ксенотрансплантатом NT1080 вычисляли на основе показателей объема опухоли на 11 сутки после начала лечения.

Таблица 11: Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	Значение <i>p</i> (против носителя)	Значение <i>p</i> (BCY10984 против BCY12951)
1	Носитель, в/в, qw	1731±194	--	--	--	
2	BCY10984, 5 мкМ, в/в, qw	1257±95	72,6	33,6	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05 (против группы 5)
3	BCY10984, 15 мкМ, в/в, qw	288±126	16,6	102,3	<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001(против группы 6)
4	BCY10984, 45 мкМ, в/в, qw	15±6	0,9	121,6	<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001(против группы 7)
5	BCY12951, 5 мкМ, в/в, qw	1011±140	58,4	51,1	<i>p</i> <0,01	-
6	BCY12951, 15 мкМ, в/в, qw	1354±145	78,2	26,7	<i>p</i> >0,05	-
7	BCY12951, 45 мкМ, в/в, qw	901±59	52,0	58,9	<i>p</i> <0,001	-

a. Среднее значение ± SEM;

b. Ингибирование роста опухоли вычисляются путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (T/C).

(f) Обобщение и обсуждение результатов

В этом испытании оценивали терапевтическую эффективность BCY10984 и BCY12951 в модели с ксенотрансплантатом NT1080. Измеренный объем опухоли для всех групп лечения в различные моменты времени представлен на фиг.16 и 17 и в таблицах 10 и 11.

Средний объем опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 1731 мм³ на 11 сутки после начала лечения. BCY10984 в дозе 5 мкМ qw (TV=1257 мм³, TGI=33,6%, *p*>0,05), 15 мкМ qw (TV=288 мм³, TGI=102,3%, *p*<0,001) и 45 мкМ qw (TV=15 мм³,

TGI=121,6%, $p<0,001$) продемонстрировал дозозависимую противоопухолевую активность. Среди них ВСУ10984 в дозе 45 мкМ qw полностью устранял опухоли на 16 сутки. ВСУ12951 в дозе 5 мкМ qw (TV=1011 мм³, TGI=51,1%, $p<0,01$) и 45 мкМ qw (TV=901 мм³, TGI=58,9%, $p<0,001$) продемонстрировал значимую противоопухолевую активность.

При сравнении противоопухолевой эффективности между двумя тестируемыми изделиями ВСУ10984 в дозе 5 мкМ продемонстрировал сравнимую противоопухолевую эффективность с ВСУ12951 5 мкМ ($p >0,05$), ВСУ10984 в дозе 15 мкМ и 45 мкМ продемонстрировал более высокую эффективность, чем ВСУ12951 в той же молярной дозировке (ВСУ10984 15 мкМ против ВСУ12951 15 мкМ, $p<0,001$; ВСУ10984 45 мкМ против ВСУ12951 45 мкМ, $p<0,001$).

7 животных в группах 5 и 6 лечили 45 мкМ ВСУ10984 при среднем начальном размере опухоли 1291 мм³. Все мыши продемонстрировали внезапную регрессию опухоли после первого дозирования, и после второго дозирования происходила эрадикация всех опухолей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Линкер, содержащий часть -P1-P2-P3-, где:

P1 обозначает основную неприродную аминокислоту или ее производное;

P2 обозначает гидрофобную аминокислоту или гидрофобную неприродную аминокислоту; и

P3 либо отсутствует, либо обозначает кислую аминокислоту, либо кислую неприродную аминокислоту, так что, когда P1 обозначает Cit и P2 обозначает Val, тогда P3 должен обозначать кислую неприродную аминокислоту.

2. Линкер по п.1, где P1 обозначает основную неприродную аминокислоту, выбранную из: 2-амино-4-гуанидинобутановой кислоты (Agb); 2-амино-4-(3-метилгуанидино)бутановой кислоты (Agb(Me)); 2,4-диаминобутановой кислоты (Dab); 2,3-диаминопропионовой кислоты (Dap); 2-амино-3-гуанидинопропионовой кислоты (Dap(CNNH₂)) и цитруллина (Cit), такого как цитруллин (Cit).

3. Линкер по п.1 или п.2, где P2 обозначает гидрофобную аминокислоту, выбранную из Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp и Val, или гидрофобную неприродную аминокислоту, выбранную из циклобутила, дифенилаланина (Dpa), 1-нафтилаланина (1Nal), 2-нафтилаланина (2Nal) и метилтриптофана (Trp(Me)), такую как гидрофобная аминокислота, выбранная из Val или неприродной аминокислоты, выбранной из циклобутила, Dpa, 1Nal и 2Nal, такой как 1-нафтилаланин (1Nal).

4. Линкер по любому из пп.1-3, где P3 обозначает кислую аминокислоту, выбранную из Asp и Glu, такую как кислая аминокислота, выбранная из Glu.

5. Линкер по любому из пп.1-4, где часть -P1-P2-P3- обозначает:

P1	P2	P3
Agb	Val	Отсутствует
Agb(Me)	Val	Отсутствует
Dab	Val	Отсутствует
Dap	Val	Отсутствует
Dap(CNNH ₂)	Val	Отсутствует
Agb	Val	Glu
Cit	1Nal	Glu
Dab	cBu	Glu
Dab	Dpa	Glu
Dab	1Nal	Glu
Dab	2Nal	Glu
Dab	Val	Glu
Dap	Val	Glu
Dap (CNNH ₂)	Val	Glu

6. Конъюгат лекарственного средства, содержащий связывающий компонент, который связывается с мишенью, и цитотоксическое средство, где указанный связывающий компонент соединен с указанным цитотоксическим средством через линкер по любому из пп.1-5.

7. Конъюгат лекарственного средства по п.6, где указанный связывающий компонент представляет собой пептид, такой как антитело или бициклической пептид, в частности, бициклической пептид.

8. Конъюгат лекарственного средства по п.6 или п.7, где указанное цитотоксическое средство представляет собой DM1 или MMAE, такой как MMAE.

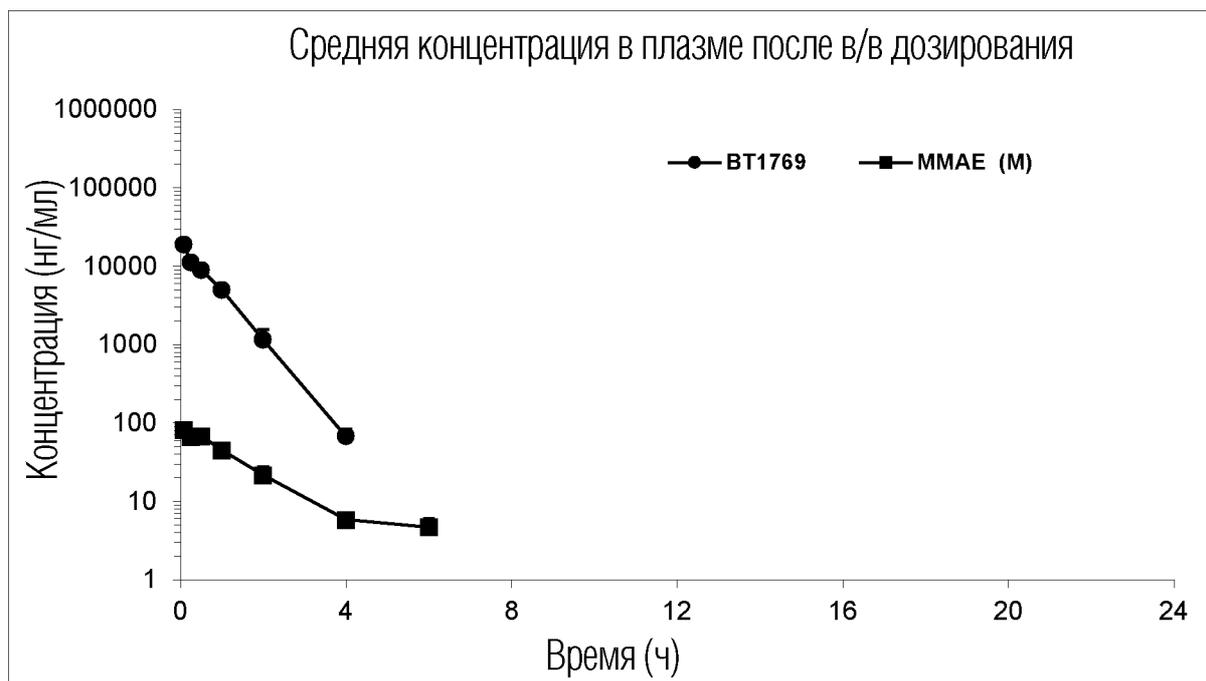
9. Конъюгат лекарственного средства по любому из пп.6-8, который является устойчивым к протеазам по сравнению с конъюгатом, в котором отсутствует указанный линкер, например, к расщеплению катепсином В.

10. Конъюгат лекарственного средства по любому из пп.6-9, который является стабильным в плазме по сравнению с конъюгатом, в котором отсутствует указанный линкер.

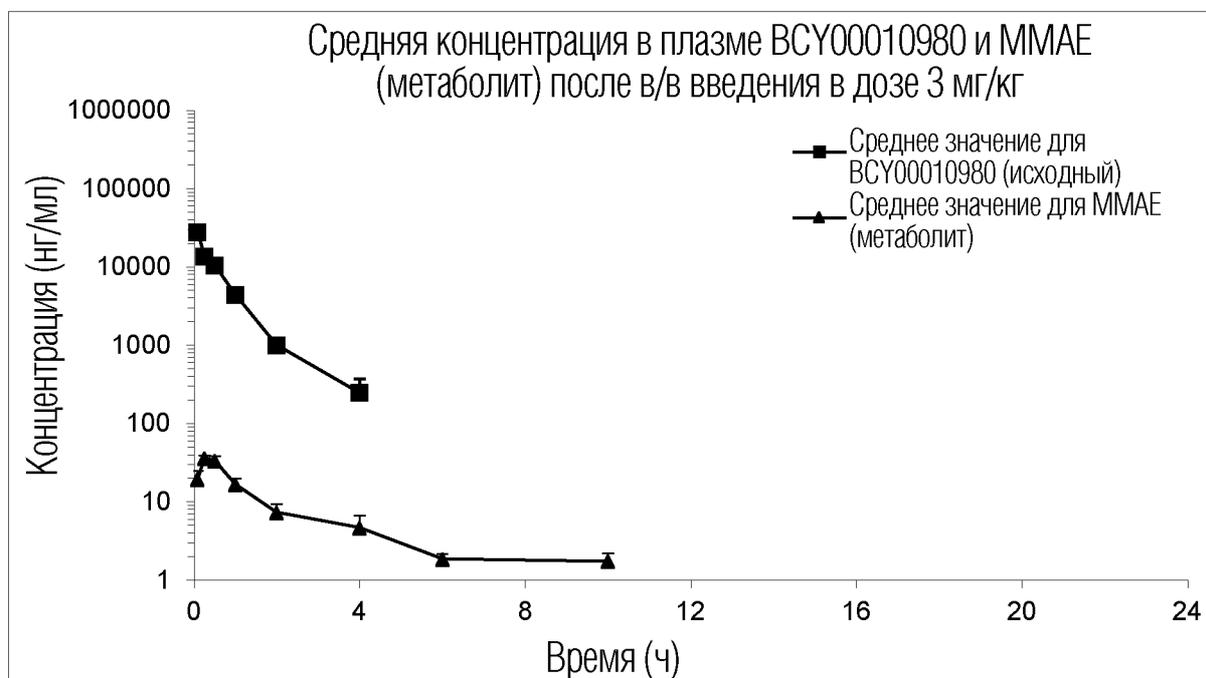
11. Конъюгат лекарственного средства по любому из пп.6-10, который выбран из: ВСУ10989, ВСУ10980, ВСУ10982, ВСУ10983, ВСУ10984, ВСУ10981, ВСУ10985, ВСУ10986, ВСУ10987 и ВСУ10988, такого как ВСУ10984.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат лекарственного средства по любому из пп.6-11 в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

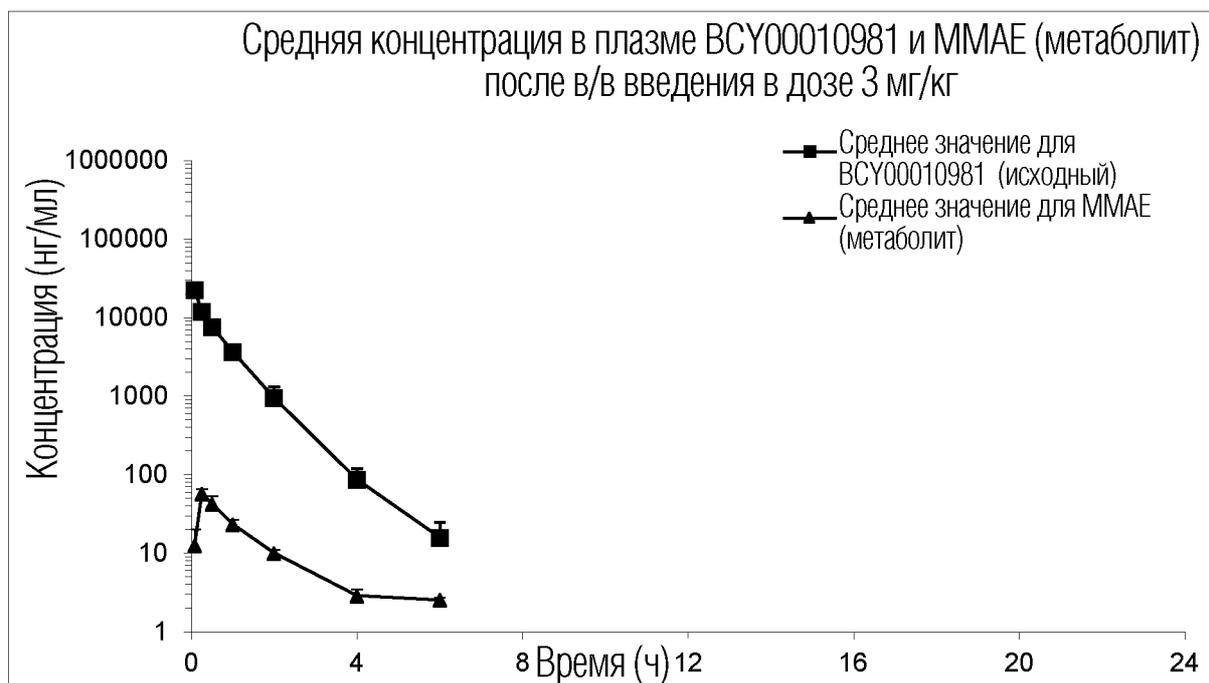
13. Конъюгат лекарственного средства по любому из пп.6-11 для применения в предупреждении, подавлении или лечении злокачественной опухоли.



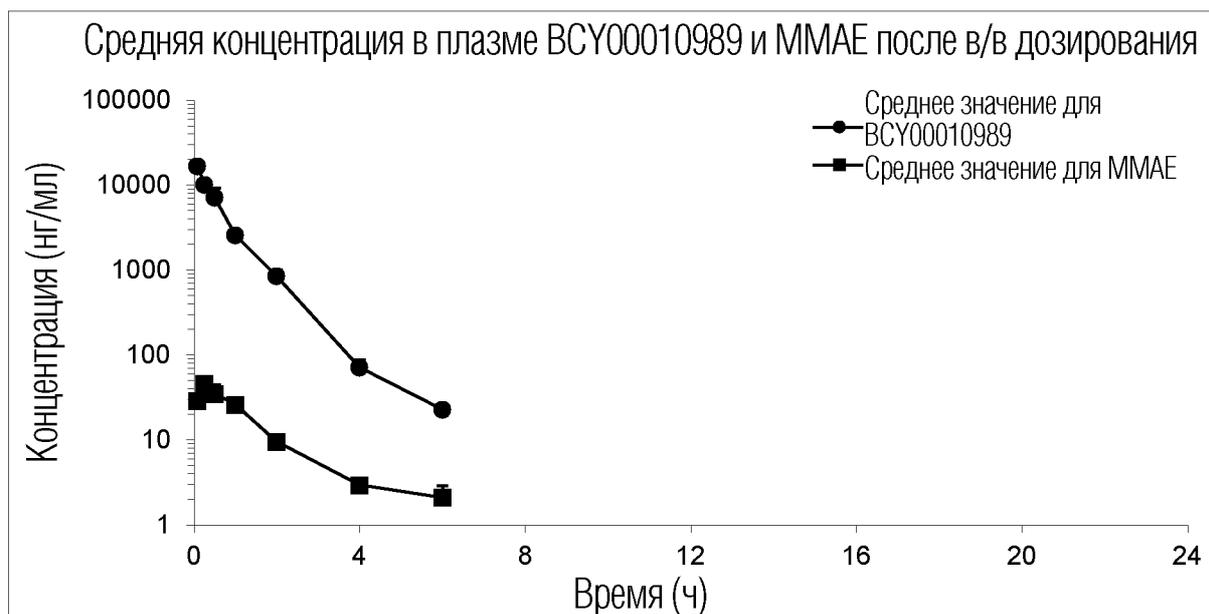
ФИГ. 1



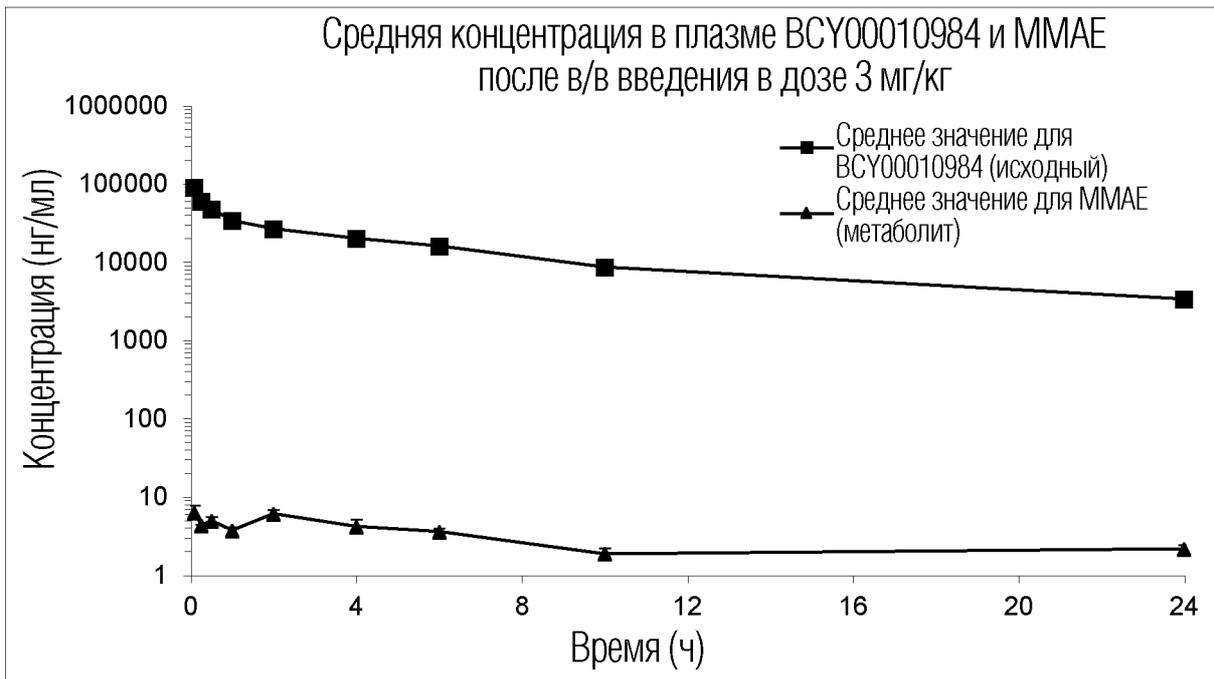
ФИГ. 2



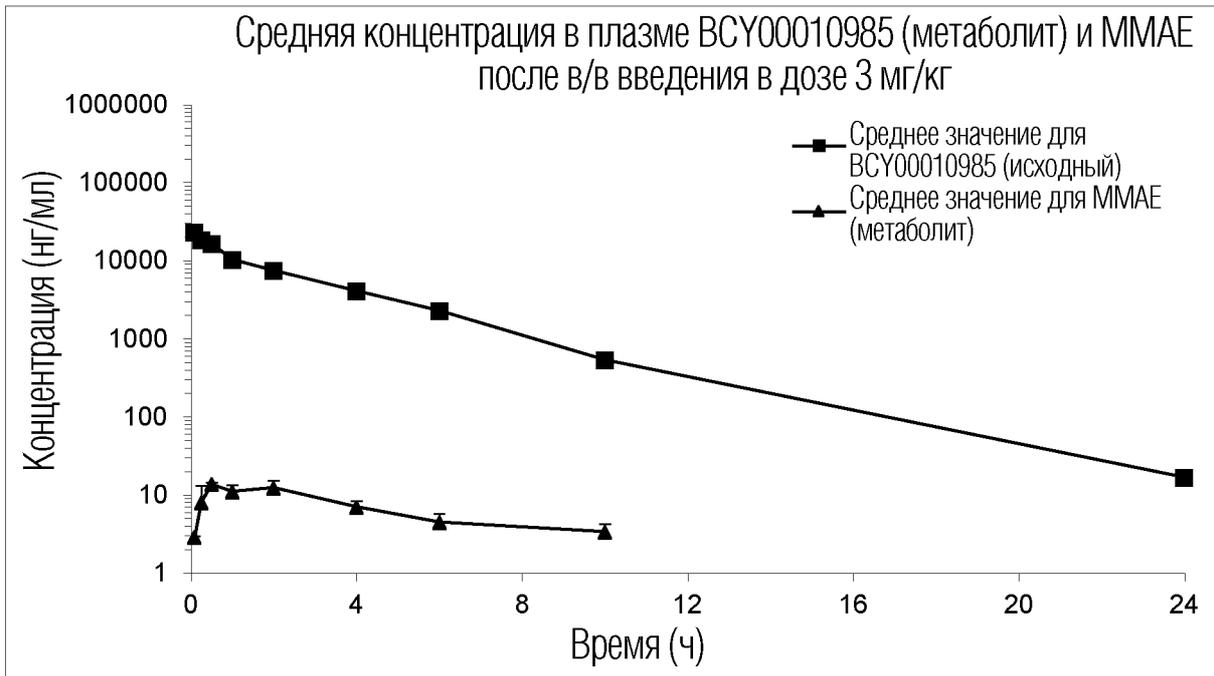
ФИГ. 3



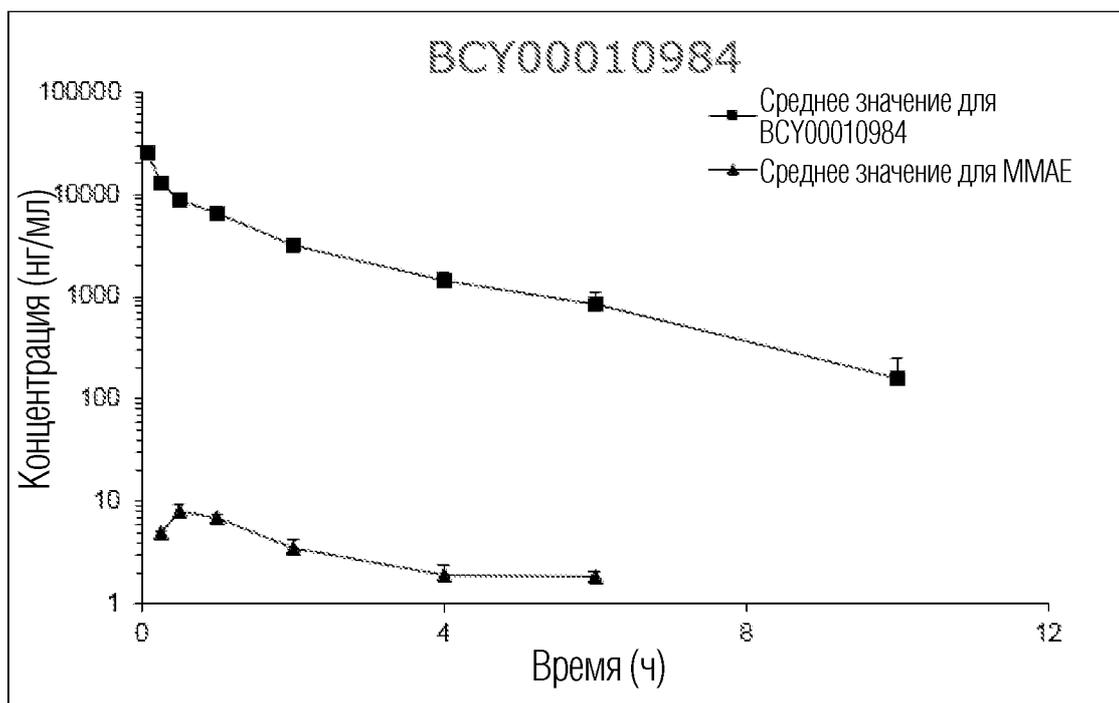
ФИГ. 4



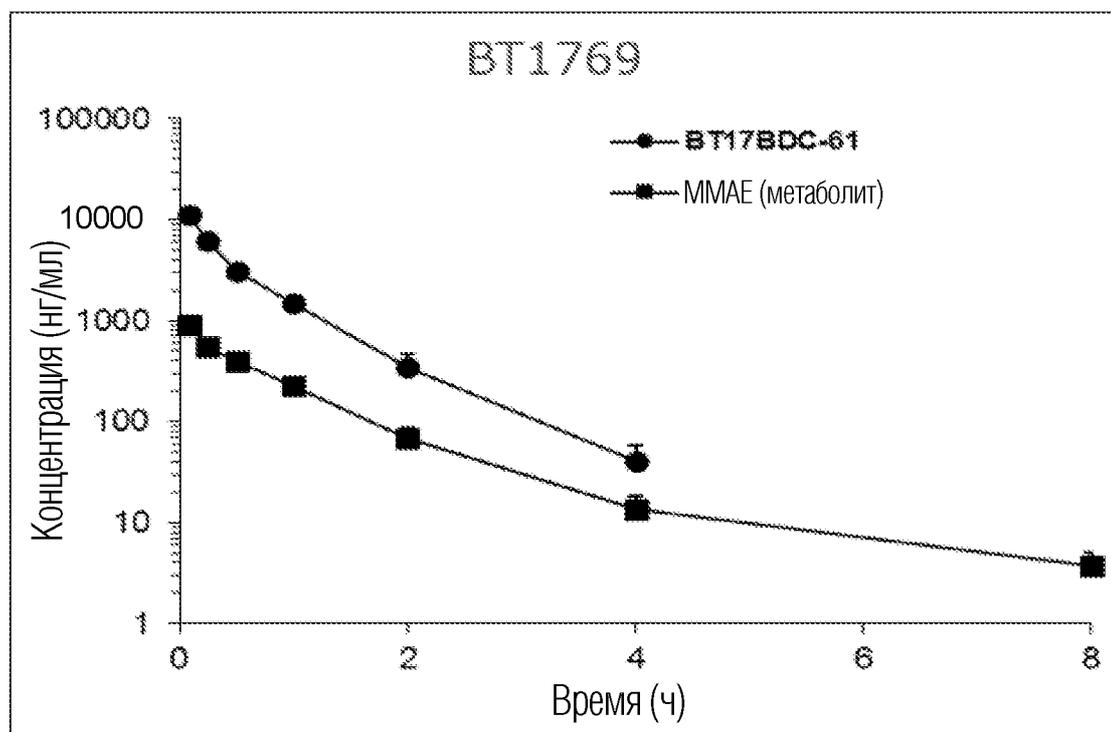
ФИГ. 5



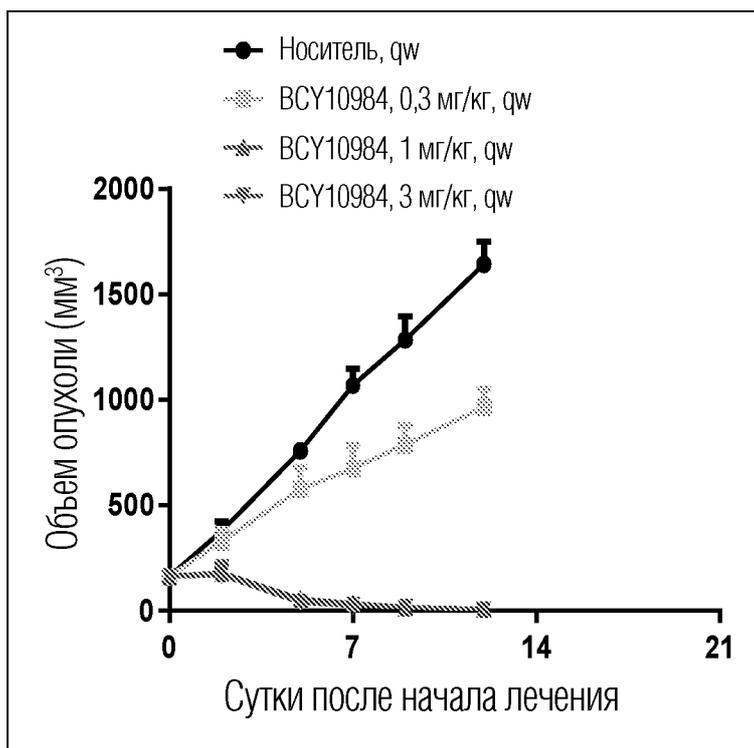
ФИГ. 6



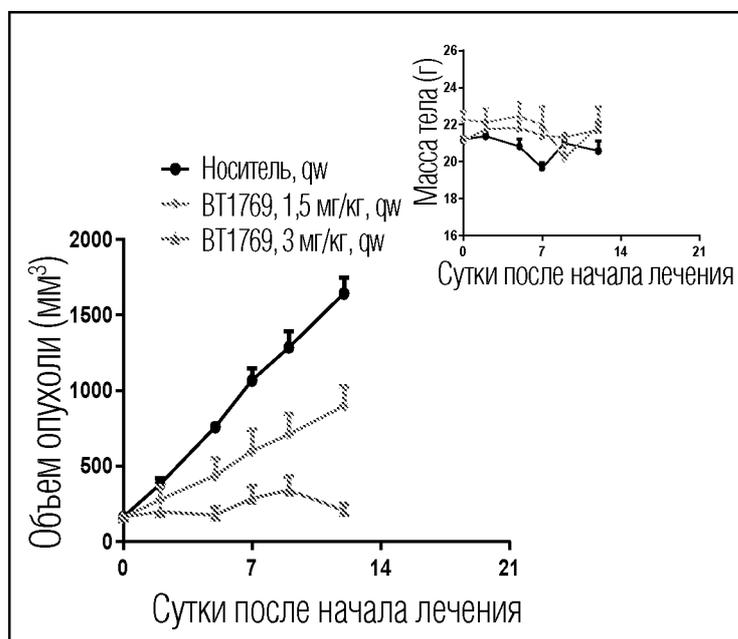
ФИГ. 7



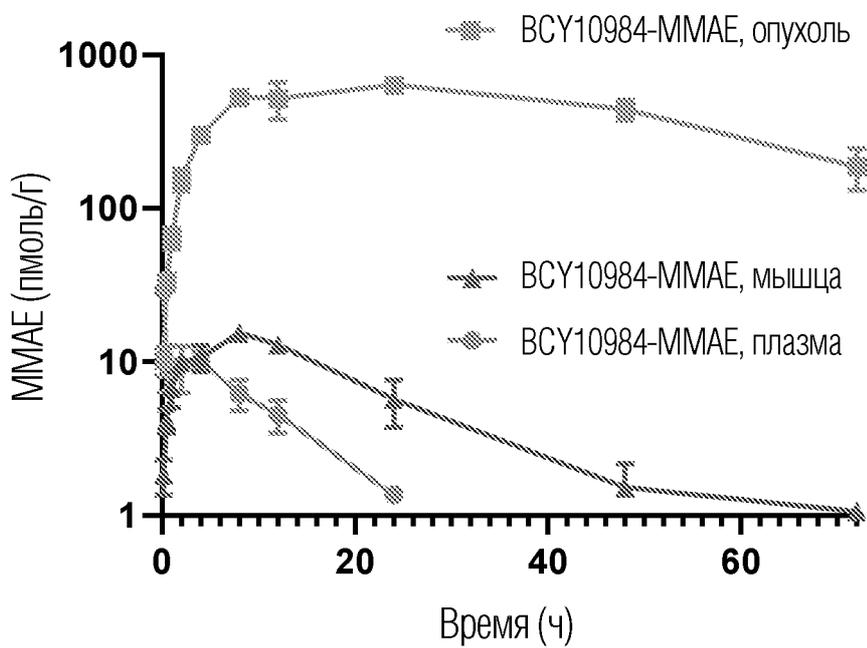
ФИГ. 8



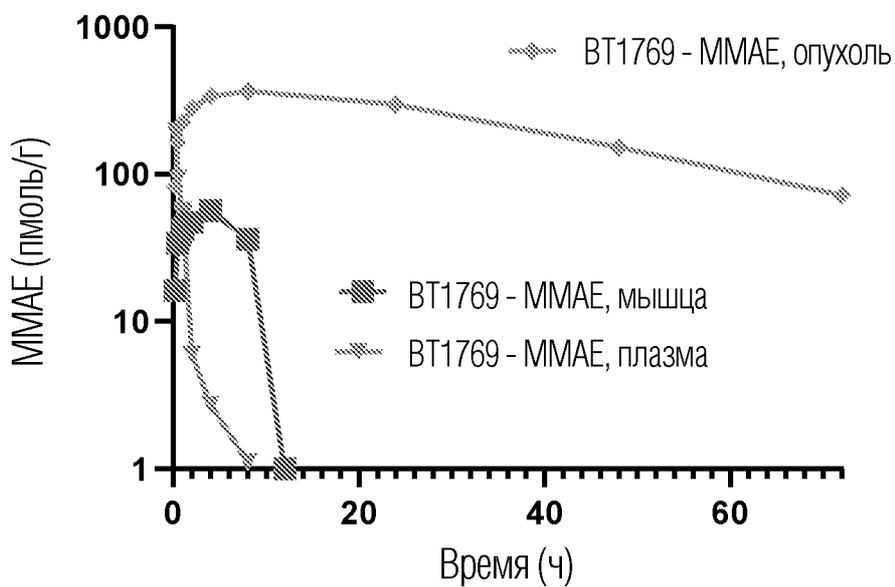
ФИГ. 9



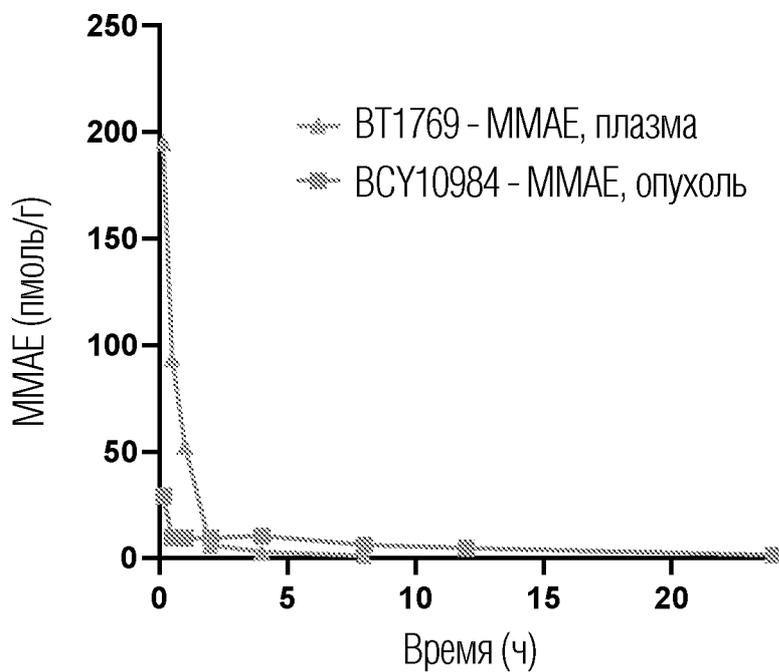
ФИГ. 10



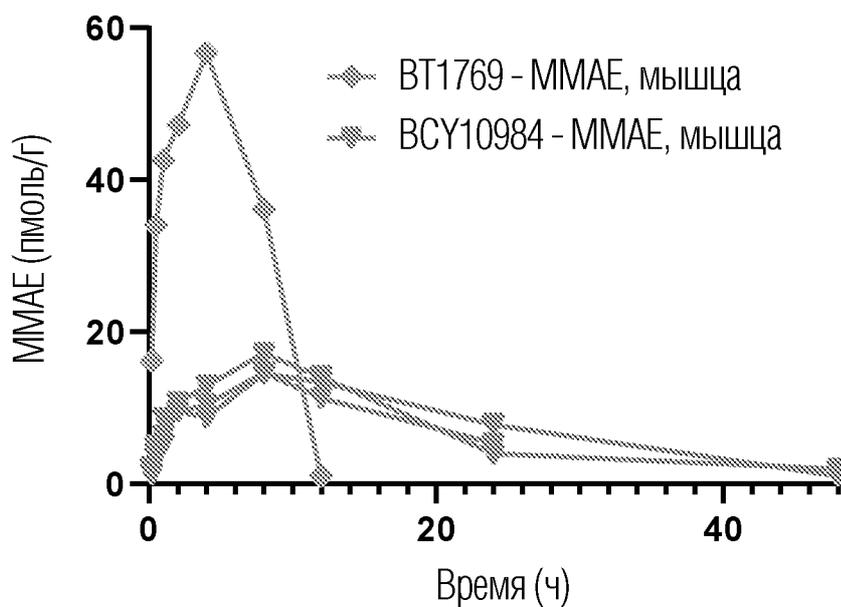
ФИГ. 11



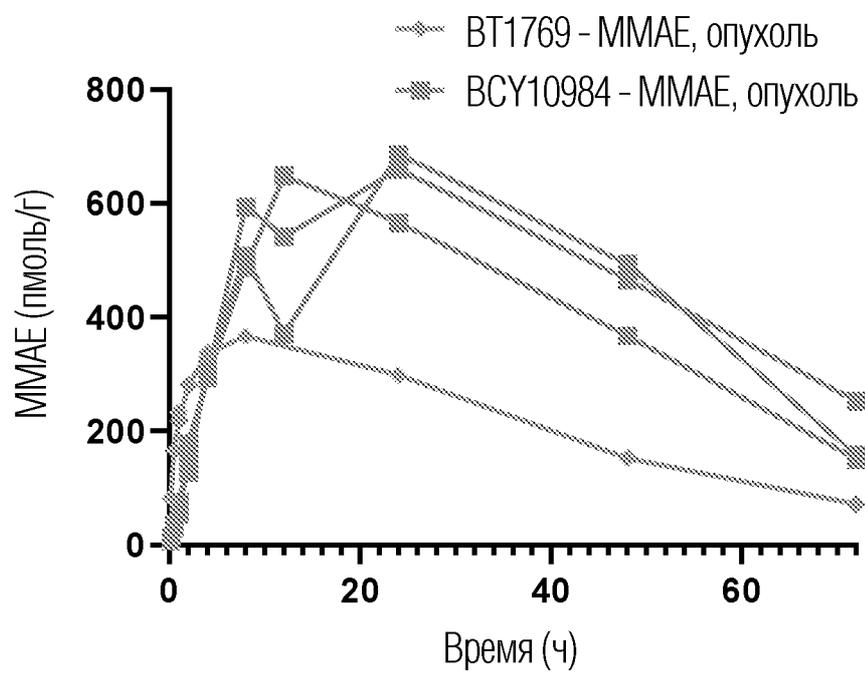
ФИГ. 12



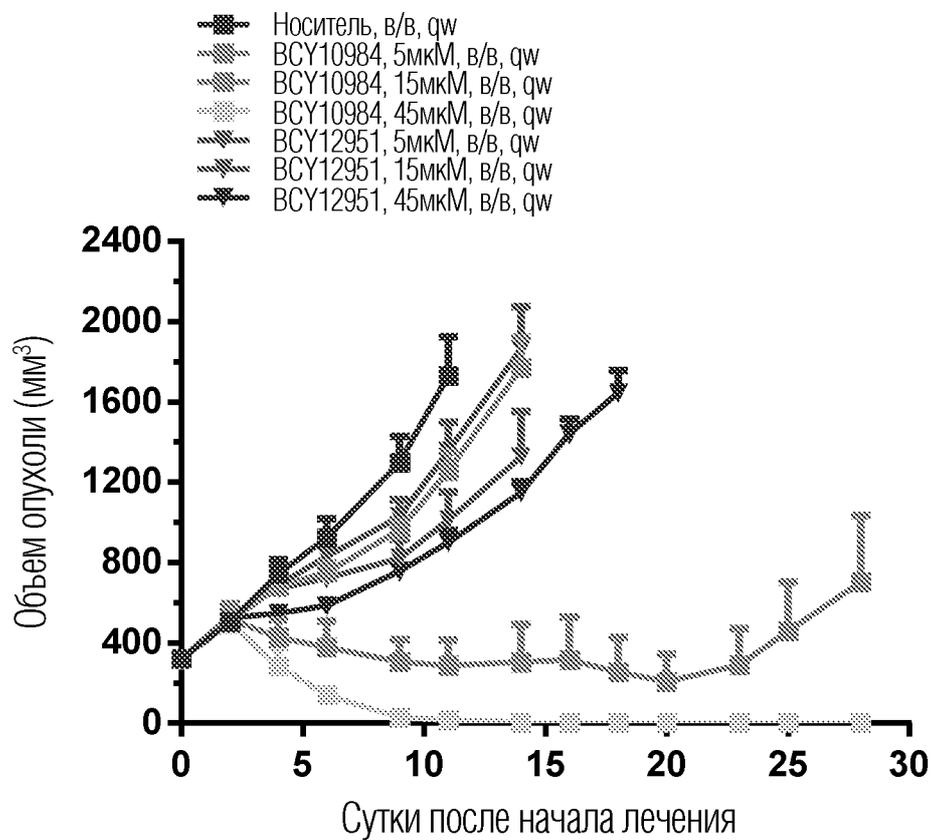
ФИГ. 13



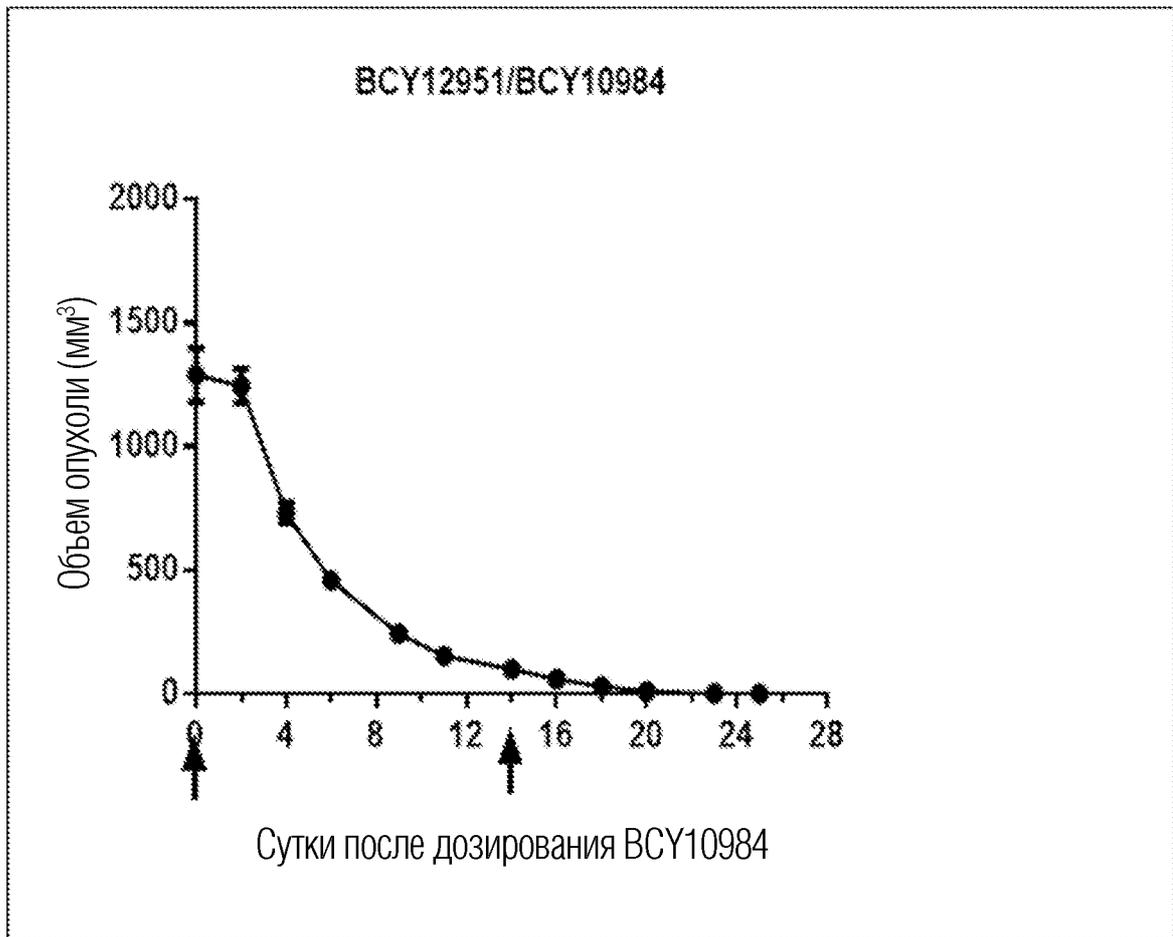
ФИГ. 14



ФИГ. 15



ФИГ. 16



ФИГ. 17