

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391972 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.30

(51) Int. Cl. C07K 14/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.01.10

(54) ГЕТЕРОТАНДЕМНЫЕ БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

(31) 63/135,273; 63/262,599

(32) 2021.01.08; 2021.10.15

(33) US

(86) PCT/GB2022/050044

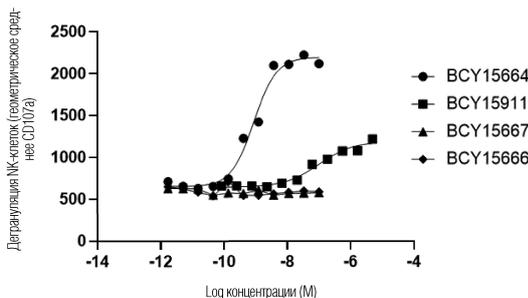
(87) WO 2022/148975 2022.07.14

(71) Заявитель:
БАЙСИКЛТЭКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Кин Николас, Мадд Джемма,
Брэндиш Фил, Гейнор Кэти, Чэнь
Люхун, Дюфор Фэй, Лейтейзер Крис,
Макдоннелл Кевин, Репаш Лиз,
Уленбройх Сандра (GB)

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

(57) Настоящее изобретение относится к гетеротандемным бициклическим пептидным комплексам, содержащим первый пептидный лиганд, связывающийся с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке, конъюгированный через линкер с одним или более вторыми пептидными лигандами, связывающимися с одним или более компонентами, присутствующими на естественном киллере (НК). Изобретение также относится к применению указанных гетеротандемных бициклических пептидных комплексов в профилактике, супрессии или лечении злокачественного новообразования.



A1

202391972

202391972

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578625EA/081

ГЕТЕРОТАНДЕМНЫЕ БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к гетеротандемным бициклическим пептидным комплексам, содержащим первый пептидный лиганд, связывающийся с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке, конъюгированный через линкер с одним или более вторыми пептидными лигандами, связывающимися с одним или более компонентами, присутствующими на естественном киллере (NK). Изобретение также относится к применению указанных гетеротандемных бициклических пептидных комплексов в профилактике, супрессии или лечении злокачественного новообразования.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Циклические пептиды могут связываться с высокой аффинностью и целевой специфичностью с белковыми мишенями и, таким образом, являются привлекательным классом молекул для разработки терапевтических средств. Фактически, несколько циклических пептидов уже успешно используют в клинических условиях, например, антибактериальный пептид ванкомицин, иммуносупрессорное лекарственное средство циклоспорин или противоопухолевое лекарственное средство октреотид (Driggers *et al.* (2008), *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 608-24). Хорошие связывающие свойства являются результатом относительно большой поверхности взаимодействия, образующейся между пептидом и мишенью, а также сниженной конформационной гибкости циклических структур. Как правило, макроциклы связываются с поверхностями в несколько сотен квадратных ангстрем, например, как циклический пептидный антагонист CXCR4 CVX15 (400 Å²; Wu *et al.* (2007), 330 *Science* 1066-71), циклический пептид с мотивом Arg-Gly-Asp, связывающимся с интегрином αVβ3 (355 Å²) (Xiong *et al.* (2002), *Science* 296 (5565), 151-5) или циклический пептидный ингибитор упаин-1, связывающийся с активатором плазминогена урокиназного типа (603 Å²; Zhao *et al.* (2007), *J Struct Biol* 160 (1), 1-10).

Из-за своей циклической конфигурации, пептидные макроциклы являются менее гибкими, чем линейные пептиды, что приводит к меньшей потере энтропии после связывания с мишенями и большей аффинности связывания. Сниженная гибкость также приводит к замыканию мишенеспецифических конформаций, повышению специфичности связывания по сравнению с линейными пептидами. Примером этого эффекта является мощный и селективный ингибитор матричной металлопротеиназы 8 (ММР-8), теряющий свою селективность относительно других ММР, когда кольцо размыкается (Cherney *et al.* (1998), *J Med Chem* 41 (11), 1749-51). Благоприятные связывающие свойства, достигаемые за счет макроциклизации, еще более выражены в мультициклических пептидах, имеющих более одного пептидного кольца, например, как в ванкомицине, низине и актиномицине.

Различные исследовательские группы ранее связывали полипептиды с остатками цистеина с синтетической молекулярной структурой (Kemp and McNamara (1985), *J. Org. Chem*; Timmerman *et al.* (2005), *ChemBioChem*). Meloen с соавт. использовали

трис(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной циклизации множества пептидных петель на синтетических каркасах для структурной мимикрии белковых поверхностей (Timmerman *et al.* (2005), ChemBioChem). Способы получения лекарственных соединений-кандидатов, где указанные соединения получают посредством связывания цистеин-содержащих полипептидов с молекулярным каркасом, например, как в трис(бромметил)бензоле, описаны в WO 2004/077062 и WO 2006/078161.

Разработаны комбинаторные подходы на основе фагового дисплея для получения и скрининга крупных библиотек бициклических пептидов для интересующих мишеней (Heinis *et al.* (2009), Nat Chem Biol 5 (7), 502-7 и WO2009/098450). В кратком изложении, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащих три остатка цистеина и две области из шести случайных аминокислот (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys), экспонировали на фаге и циклизировали посредством ковалентного связывания боковых цепей цистеина с низкомолекулярным соединением (трис-(бромметил)бензолом).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение относится к гетеротандемному бициклическому пептидному комплексу, содержащему:

(а) первый пептидный лиганд, связывающийся с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке; конъюгированный через линкер с

(б) одним или более вторыми пептидными лигандами, связывающимися с одним или более компонентами, присутствующими на естественном киллере (NK);

где каждый из указанных пептидных лигандов содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, образующий ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида таким образом, что на молекулярном каркасе образуются по меньшей мере две полипептидные петли.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, как определено в настоящем описании, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к гетеротандемному бициклическому пептидному комплексу, как определено в настоящем описании, для применения в профилактике, супрессии или лечении злокачественного новообразования.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: Активация NK-клеток посредством ВСУ15664 и ВСУ15911, что измеряли по положительной регуляции CD107a.

Фигуры 2-4: Результаты анализа цитотоксичности NK-клеток для ВСУ15664, ВСУ15923 и ВСУ17226.

Фигура 5: Результаты анализа секреции ИФН γ для ВСУ17226.

Фигуры 6-10: Результаты анализа цитотоксичности NK-клеток для ВСУ17225, ВСУ21686, ВСУ21687, ВСУ17231, ВСУ17235, ВСУ18731, ВСУ20793, ВСУ15924,

BCY18042, BCY18049, BCY18603 и BCY18604.

Фигуры 11-12: Результаты анализа секреции цитокинов для BCY17225, BCY21686, BCY21687 и BCY18048.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение относится к гетеротандемному бициклическому пептидному комплексу, содержащему:

(а) первый пептидный лиганд, связывающийся с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке; конъюгированный через линкер с

(b) одним или более вторыми пептидными лигандами, связывающимися с одним или более компонентами, присутствующими на естественном киллере (NK);

где каждый из указанных пептидных лигандов содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, образующий ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида таким образом, что на молекулярном каркасе образуются по меньшей мере две полипептидные петли.

Первые пептидные лиганды

В настоящем описании ссылки на термин "злокачественная клетка" включают любую клетку, известную как участвующая в злокачественном новообразовании. Злокачественные клетки образуются, когда гены, отвечающие за регуляцию деления клеток, повреждены. Карциногенез вызван мутацией и эпимутацией генетического материала нормальных клеток, нарушающими нормальный баланс между пролиферацией и гибелью клеток. Это приводит к неконтролируемому делению клеток и эволюции этих клеток посредством естественного отбора в организме. Неконтролируемая и зачастую быстрая пролиферация клеток может приводить к доброкачественным или злокачественным опухолям. Доброкачественные опухоли не распространяются в другие части организма или инвазируют другие ткани. Злокачественные опухоли могут инвазировать другие органы, распространяться в отдаленные локации (метастазировать) и становиться угрожающими жизни.

В одном из вариантов осуществления злокачественная клетка выбрана из опухолевых клеток HT1080, A549, SC-OV-3, PC3, HT1376, NCI-H292, LnCap, MC38, MC38 #13, 4T1-D02, H322, HT29, T47D и RKO.

В одном из вариантов осуществления компонент, присутствующий на злокачественной клетке, представляет собой нектин-4.

Нектин-4 является поверхностной молекулой, принадлежащей к семейству белков нектинов, включающему 4 членов. Нектины являются молекулами клеточной адгезии, играющими ключевую роль в различных биологических процессах, таких как поляриность, пролиферация, дифференцировка и миграция, в эпителиальных, эндотелиальных, иммунных и нервных клетках во время развития и взрослой жизни. Они участвуют в нескольких патологических процессах у людей. Они являются главными рецепторами для полиовируса, вируса простого герпеса и вируса кори. Мутации в генах, кодирующих

нектин-1 (PVRL1) или нектин-4 (PVRL4), вызывают синдромы эктодермальной дисплазии, ассоциированные с другими аномалиями. Нектин-4 экспрессируется во время эмбрионального развития. В тканях взрослых его экспрессия является более ограниченной, чем у других членов семейства. Нектин-4 является опухолеспецифическим антигеном в 50%, 49% и 86% карцином молочной железы, яичников и легких, соответственно, главным образом, на опухолях с плохим прогнозом. Его экспрессия неопределяема в соответствующих нормальных тканях. При раке молочной железы нектин-4 экспрессируется, в основном, в тройных негативных и ERBB2⁺ карциномах. В сыворотке пациентов с этими злокачественными новообразованиями детекция растворимых форм нектин-4 ассоциирована с неблагоприятным прогнозом. Уровни нектин-4 в сыворотке повышаются во время метастатического прогрессирования и снижаются после лечения. Эти результаты позволяют предполагать, что нектин-4 может являться надежной мишенью для лечения злокачественного новообразования. Таким образом, на современном уровне техники описано несколько антител против нектин-4. В частности, энфортумаб ведотин (ASG-22ME) является конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), нацеленным на нектин-4 и в настоящее время исследуемым в клинических условиях для лечения пациентов, страдающих солидными опухолями.

В одном из вариантов осуществления первый пептидный лиганд содержит нектин-4-связывающий бициклический пептидный лиганд.

Подходящие примеры нектин-4-связывающих бициклических пептидных лигандов описывают в WO 2019/243832, пептиды из которой включены в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном из вариантов осуществления нектин-4-связывающий бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой:

$C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 1; в настоящем описании обозначаемый как BCY8116).

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, 1Nal представляет собой 1-нафтилаланин, HAArg представляет собой гомоаргинин, и HyP представляет собой транс-4-гидрокси-L-пролин или его фармацевтически приемлемую соль.

В альтернативном варианте осуществления компонент, присутствующий на злокачественной клетке, представляет собой EphA2.

Рецепторные тирозинкиназы Eph (Eph) принадлежат к большой группе рецепторных тирозинкиназ (RTK), киназ, фосфорилирующих белки по остаткам тирозина. Eph и их мембраносвязанные эфриновые лиганды (эфрины) контролируют позиционирование клеток и организацию ткани (Poliakov *et al.* (2004) *Dev Cell* 7, 465-80). Функциональные и биохимические ответы Eph происходят при более высоких состояниях олигомеризация лиганда (Stein *et al.* (1998) *Genes Dev* 12, 667-678).

Среди других функций формирования паттернов, показано, что различные Eph и

эфрины играют роль в развитии сосудов. Нокаут EphB4 и эфрина-B2 приводит к отсутствию способности ремоделировать капиллярные ложа в кровеносные сосуды (Poliakov *et al.*, выше) и эмбриональной летальности. Персистирующую экспрессию некоторых рецепторов Eph и эфринов также наблюдали в недавно образованных микрососудах взрослых (Brantley-Sieders *et al.* (2004) *Curr Pharm Des* 10, 3431-42; Adams (2003) *J Anat* 202, 105-12).

Также наблюдали, что нерегулируемое повторное появление некоторых эфринов и их рецепторов у взрослых вносит вклад в опухолевую инвазию, метастазирование и неангиогенез (Nakamoto *et al.* (2002) *Microsc Res Tech* 59, 58-67; Brantley-Sieders *et al.*, выше). Кроме того, обнаружено, что некоторые члены семейства Eph гиперэкспрессированы на опухолевых клетках различных опухолей человека (Brantley-Sieders *et al.*, выше; Marme (2002) *Ann Hematol* 81 Suppl 2, S66; Booth *et al.* (2002) *Nat Med* 8, 1360-1).

Рецептор EPH A2 (рецептор эфрина типа A 2) является белком, который у людей кодируется геном *EPHA2*.

EphA2 положительно регулируется во множестве злокачественных новообразований у людей, зачастую коррелируя с прогрессированием, метастазированием и неблагоприятным прогнозом заболевания, например: рака молочной железы (Zelinski *et al.* (2001) *Cancer Res.* 61, 2301-2306; Zhuang *et al.* (2010) *Cancer Res.* 70, 299-308; Brantley-Sieders *et al.* (2011) *PLoS One* 6, e24426), легких (Brannan *et al.* (2009) *Cancer Prev Res (Phila)* 2, 1039-1049; Kinch *et al.* (2003) *Clin Cancer Res.* 9, 613-618; Guo *et al.* (2013) *J Thorac Oncol.* 8, 301-308), желудка (Nakamura *et al.* (2005) *Cancer Sci.* 96, 42-47; Yuan *et al.* (2009) *Dig Dis Sci* 54, 2410-2417), поджелудочной железы (Mudali *et al.* (2006) *Clin Exp Metastasis* 23, 357-365), предстательной железы (Walker-Daniels *et al.* (1999) *Prostate* 41, 275-280), печени (Yang *et al.* (2009) *Hepatol Res.* 39, 1169-1177) и глиобластомы (Wykosky *et al.* (2005) *Mol Cancer Res.* 3, 541-551; Li *et al.* (2010) *Tumor Biol.* 31, 477-488).

Вся роль EphA2 в прогрессировании злокачественных новообразований еще неясна, хотя есть доказательства взаимодействия на множестве стадий прогрессирования злокачественных новообразований, включая рост опухолевых клеток, выживаемость, инвазию и ангиогенез. Отрицательная регуляция экспрессии EphA2 супрессирует размножение злокачественных клеток опухоли (Binda *et al.* (2012) *Cancer cell* 22, 765-780), в то время как блокада EphA2 ингибирует VEGF-индуцированную миграцию клеток (Hess *et al.* (2001) *Cancer Res.* 61, 3250-3255), спраунтинг и ангиогенез (Cheng *et al.* (2002) *Mol Cancer Res.* 1, 2-11; Lin *et al.* (2007) *Cancer* 109, 332-40) и метастатическое прогрессирование (Brantley-Sieders *et al.* (2005) *FASEB J.* 19, 1884-1886).

Показано, что конъюгат антитело-лекарственное средство против EphA2 значительно снижает рост опухоли в моделях ксенотрансплантатов на крысах и мышах (Jackson *et al.* (2008) *Cancer Research* 68, 9367-9374), и схожий подход опробован на людях, хотя лечение пришлось прекратить по причине нежелательных явлений, связанных с лечением (Annunziata *et al.* (2013) *Invest New Drugs* 31, 77-84).

В одном из вариантов осуществления первый пептидный лиганд содержит EphA2-связывающий бициклический пептидный лиганд.

Подходящие примеры EphA2-связывающих бициклических пептидных лигандов описаны в WO 2019/122860, WO 2019/122861 и WO 2019/122863, пептиды из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В одном из вариантов осуществления EphA2-связывающий бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой:

C_i [HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HAArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 2);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют собой первую (i), вторую (ii) и третью (iii) реакционноспособные группы, HyP представляет собой транс-4-гидрокси-L-пролин, HAArg представляет собой гомоаргинин или его фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления EphA2-связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно содержит N-концевые и/или C-концевые модификации и содержит:

A-[HAArg]-D-(SEQ ID NO: 2) (в настоящем описании обозначаемый как BCY9594);

где HAArg представляет собой гомоаргинин или его фармацевтически приемлемую соль.

В альтернативном варианте осуществления компонент, присутствующий на злокачественной клетке, представляет собой PD-L1.

Лиганд 1 белка программируемой гибели клеток 1 (PD-L1) является трансмембранным белком типа I из 290 аминокислот, кодируемым геном CD274 на хромосоме мыши 19 и хромосоме человека 9. Экспрессия PD-L1 вносит вклад в уклонение от иммунных ответов, участвующих в хронической инфекции, например, хронической вирусной инфекции (включая, например, помимо прочего, ВИЧ, HBV, HCV и HTLV), хронической бактериальной инфекции (включая, например, помимо прочего, *Helicobacter pylori*) и хронической паразитарной инфекции (включая, например, *Schistosoma mansoni*). Экспрессию PD-L1 определяли в ряде тканей и типов клеток, включая Т-клетки, В-клетки, макрофаги, дендритные клетки и негемопозитические клетки, включая эндотелиальные клетки, гепатоциты, мышечные клетки и плаценту.

Экспрессия PD-L1 также вносит вклад в супрессию противоопухолевой иммунной активности. Опухоли экспрессируют антигены, которые могут распознаваться Т-клетками хозяев, но иммунологический клиренс опухолей редок. Частично эта неудача связана с иммунной супрессией опухолевым микроокружением. Экспрессия PD-L1 на многих опухолях является компонентом этой супрессорной среды и действует совместно с другими иммуносупрессорными сигналами. Экспрессия PD-L1 показана *in situ* на широком спектре солидных опухолей, включая рак молочной железы, легких, толстого кишечника, яичников, меланому, рак мочевого пузыря, печени, слюнных желез, желудка, глиомы, рак щитовидной железы, эпителиальный рак тимуса, рак головы и шеи (Brown JA *et al.* 2003 Immunol. 170:1257-66; Dong H *et al.* 2002 Nat. Med. 8:793-800; Hamaishi J, *et al.* 2007 Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 104:3360-65; Strome SE *et al.* 2003 Cancer Res. 63:6501-5; Inman BA *et al.* 2007 Cancer 109:1499-505; Konishi J *et al.* 2004 Clin. Cancer Res. 10:5094-100; Nakanishi J *et al.* 2007 Cancer Immunol. Immunother. 56:1173-82; Nomi T *et al.* 2007 Clin. Cancer Res. 13:2151-57; Thompson RH *et al.* 2004 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 17174-79; Wu C *et al.* 2006 Acta Histochem. 108:19-24). Кроме того, экспрессия рецептора PD-L1, белка программируемой гибели клеток 1 (также известного как PD-1 и CD279), положительно регулируется на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах, и это также вносит вклад в иммуносупрессию опухоли (Blank C *et al.* 2003 Immunol. 171:4574-81). Что наиболее важно, исследования, касающиеся экспрессии PD-L1 на опухолях в отношении исхода заболевания, показали, что экспрессия PD-L1 сильно коррелирует с неблагоприятным прогнозом при раке почек, яичников, мочевого пузыря, молочной железы, желудка и поджелудочной железы (Nakanishi J *et al.* 2007 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:3360-65; Inman BA *et al.* 2007 Cancer 109:1499-505; Konishi J *et al.* 2004 Clin. Cancer Res. 10:5094-100; Nakanishi J *et al.* 2007 Cancer Immunol. Immunother. 56:1173-82; Nomi T *et al.* 2007 Clin. Cancer Res. 13:2151-57; Thompson RH *et al.* 2004 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:17174-79; Wu C *et al.* 2006 Acta Histochem. 108:19-24). Кроме того, эти исследования позволяют предполагать, что более высокие уровни экспрессии PD-L1 на опухолях могут облегчать прогрессирование стадии опухоли и инвазию в более глубокие тканевые структуры.

Путь PD-1 также может играть роль в гемобластозах. PD-L1 экспрессируется на клетках множественной миеломы, но не на нормальных плазматических клетках (Liu J *et al.* 2007 Blood 110:296-304). PD-L1 экспрессируется на некоторых первичных Т-клеточных лимфомах, в частности, анапластических крупноклеточных Т-клеточных лимфомах (Brown JA *et al.*, 2003 Immunol. 170:1257-66). PD-1 высоко экспрессируется на Т-клетках ангиоиммунобластных лимфом, и PD-L1 экспрессируется на ассоциированной сети фолликулярных дендритных клеток (Dorfman DM *et al.* 2006 Am. J. Surg. Pathol. 30:802-10). При нодулярной лимфоме Ходжкина с лимфоидным преобладанием Т-клетки, ассоциированные с лимфоцитарными или гистиоцитарными клетками (L&H), экспрессируют PD-1. Микроматричный анализ с использованием результатов считывания генов, индуцированных лигированием PD-1, позволяет предполагать, что опухолеассоциированные Т-клетки отвечают на сигналы PD-1 *in situ* в лимфоме Ходжкина (Chemnitz JM *et al.* 2007 Blood 110:3226-33). PD-1 и PD-L1 экспрессируются на CD4 Т-клетках при HTLV-1-опосредованном Т-клеточном лейкозе и лимфоме взрослых (Shimauchi T *et al.* 2007 Int. J. Cancer 121: 2585-90). Эти опухолевые клетки являются гипореактивными в ответ на сигналы TCR.

Исследования на моделях на животных показали, что PD-L1 на опухолях ингибирует активацию Т-клеток и лизис опухолевых клеток и в некоторых случаях приводит к повышенной гибели опухолеспецифических Т-клеток (Dong H *et al.* 2002 Nat. Med. 8:793-800; Hirano F *et al.* 2005 Cancer Res. 65:1089-96). Опухлеассоциированные APC также могут использовать путь PD-1:PD-L1 для контроля ответа противоопухолевых Т-клеток. Экспрессия PD-L1 на популяции опухолеассоциированных миелоидных DC подвергается

положительной регуляции факторами опухолевого окружения (Curiel TJ *et al.* 2003 Nat. Med. 9:562-67). Плазмацитоидные дендритные клетки (DC) в дренирующей опухоли лимфоузле меланомы B16 экспрессируют IDO, сильно активирующий супрессорную активность регуляторных Т-клеток. Для супрессорной активности обработанных IDO регуляторных Т-клеток необходим контакт клеток с IDO-экспрессирующими DC (Sharma MD *et al.* 2007 Clin. Invest. 117:2570-82).

В одном из вариантов осуществления первый пептидный лиганд содержит PD-L1-связывающий бициклический пептидный лиганд.

В одном из вариантов осуществления PD-L1-связывающий бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой:

$C_iSAGWLTMC_{ii}QKLHLC_{iii}$ (SEQ ID NO: 3);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первую (i), вторую (ii) и третью (iii) группы цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой TATA, и PD-L1-связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно содержит N-концевые и/или C-концевые модификации и содержит:

Ac-D-[Harg]-(SEQ ID NO: 3)-PSH (в настоящем описании обозначаемый как BCY11865);

где Harg представляет собой гомоаргинин или его фармацевтически приемлемую соль.

Подходящие примеры PD-L1-связывающих бициклических пептидных лигандов описаны в WO 2020/128526 и WO 2020/128527, пептиды из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В альтернативном варианте осуществления компонент, присутствующий на злокачественной клетке, представляет собой матричную металлопептидазу 14 мембранного типа 1 (MT1, также известную как MMP14). MT1-MMP является трансмембранной металлопротеазой, играющей основную роль в ремоделировании внеклеточного матрикса, напрямую приводя к деградации нескольких из его компонентов и косвенно активируя про-MMP2. MT1-MMP является ключевой для опухолевого ангиогенеза (Sounni *et al.* (2002) FASEB J. 16(6), 555-564) и гиперэкспрессирована на различных солидных опухолях, таким образом, MT1-MMP-связывающие бициклические пептиды по настоящему изобретению обладают особенной пригодностью при направленном лечении злокачественного новообразования, в частности, солидных опухолей, таких как немелкоклеточные карциномы легких. В одном из вариантов осуществления бициклический пептид по изобретению является специфическим для MT1-MMP человека. В дополнительном варианте осуществления бициклический пептид по изобретению является специфическим для MT1-MMP мыши. В дополнительном варианте осуществления бициклический пептид по изобретению является специфическим для MT1-MMP человека и мыши. В дополнительном варианте осуществления бициклический пептид по изобретению является

специфическим для МТ1-ММР человека, мыши и собаки.

В одном из вариантов осуществления МТ1-связывающий бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой:

$C_iV[\text{Harg}]EC_{ii}A[\text{tBuAla}]LFP[\text{Harg}]TC_{iii}$ (SEQ ID NO: 4);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первую (i), вторую (ii) и третью (iii) группы цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой ТАТА, и МТ1-связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно содержит N-концевые и/или C-концевые модификации и содержит:

LPP-(SEQ ID NO: 4) (в настоящем описании обозначаемый как ВСУ14320);

или его фармацевтически приемлемую соль.

Подходящие примеры МТ1-связывающих бициклических пептидных лигандов описаны в WO 2016/067035, пептиды из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В альтернативном варианте осуществления компонент, присутствующий на злокачественной клетке является простатспецифическим мембранным антигеном (PSMA).

Простатспецифический мембранный антиген (PSMA) (также известный как глутамат-карбоксипептидаза II (GCP II), N-ацетил-L-аспартил-L-глутамат-пептидаза I (NAALAD-аза I) и NAAG-пептидаза) является ферментом, у людей кодируемым геном *FOLH1* (фолатгидролазы 1). GCP II человека содержит 750 аминокислот и имеет массу приблизительно 84 кДа.

PSMA человека высоко экспрессируется в предстательной железе, приблизительно в сто раз больше, чем в большинстве других тканей. При некоторых раках предстательной железы PSMA является вторым по положительной регуляции продуктом гена с 8-12-кратным повышением относительно уровней в незлокачественных клетках предстательной железы. Из-за этой высокой экспрессии PSMA исследуют в качестве потенциального биомаркера для терапии и визуализации некоторых злокачественных новообразований. При раке предстательной железы человека опухоли с более высокой экспрессией ассоциированы с меньшим временем до прогрессирования и более высоким процентом пациентов с рецидивированием.

В одном из вариантов осуществления первый пептидный лиганд содержит PSMA-связывающий бициклический пептидный лиганд.

Подходящие примеры PSMA-связывающих бициклических пептидных лигандов описаны в WO 2019/243455 и WO 2020/120980, пептиды из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Вторые пептидные лиганды

Следует понимать, что один или более вторых пептидных лигандов необходимы для связывания с одним или более компонентами, присутствующими на естественном киллере (НК). Также следует понимать, что, если присутствует более одного второго пептидного

лиганда, указанные вторые пептидные лиганды могут связываться с одинаковыми или разными мишенями в НК-клетках. Таким образом, в одном из вариантов осуществления указанные вторые бициклические пептидные лиганды являются специфическими для одной и той же мишени в НК-клетке. В дополнительном варианте осуществления гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит по меньшей мере два идентичных вторых бициклических пептидных лиганда. Термин "идентичный" означает, что вторые бициклические пептиды имеют одинаковую аминокислотную последовательность, наиболее важно, что термин "одинаковая" аминокислотная последовательность относится к связывающей части указанного второго бициклического пептида (например, последовательность может варьироваться по положению присоединения). В этом варианте осуществления каждый из вторых бициклических пептидов в гетеротандемном бициклическом пептидном комплексе будет связываться точно с тем же эпитопом на той же мишени на НК-клетке - образующийся связанный с мишенью комплекс, таким образом, будет образовывать гомодимер (если гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит два идентичных вторых бициклических пептида), гомотример (если гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит три идентичных вторых бициклических пептида) или гомотетрамер (если гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит четыре идентичных вторых бициклических пептида) и т.д.

В альтернативном варианте осуществления гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит по меньшей мере два разных вторых бициклических пептидных лиганда. Термин "разные" означает, что вторые бициклические пептиды имеют разную аминокислотную последовательность. В этом варианте осуществления разные вторые бициклические пептидные лиганды в гетеротандемном бициклическом пептидном комплексе будут связываться с разными эпитопами на НК-клетках - образующийся связанный с мишенью комплекс, таким образом, будет образовывать бипаратопный (если гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит два разных вторых бициклических пептида), трипаратопный (если гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит три разных вторых бициклических пептида) или тетрапаратопный (если гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит четыре разных вторых бициклических пептида) комплекс и т.д.

Без связи с какой-либо теорией считается, что образующиеся гетеротандемные бициклические пептидные комплексы могут активировать рецепторы посредством перекрестной гетеро-сшивки разных мишеней, таких как разные рецепторы-мишени на НК-клетках. Таким образом, в одном из вариантов осуществления указанные вторые бициклические пептидные лиганды являются специфическими для разных мишеней на НК-клетках. Следует понимать, что в этом варианте осуществления гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит по меньшей мере два разных вторых бициклических пептидных лиганда (т.е. вторые бициклические пептидные лиганды, имеющие разные аминокислотные последовательности). В этом варианте осуществления

каждый из вторых бициклических пептидов в гетеротандемном бициклическом пептидном комплексе будет связываться с другим эпитопом на НК-клетках - образующийся связанный с мишенью комплекс, таким образом, будет образовывать биспецифический гетеротандемный бициклический пептидный комплекс (если гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит два разных вторых бициклических пептида), триспецифический мультимерный связывающий комплекс (если гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит три разных вторых бициклических пептида), тетраспецифический гетеротандемный бициклический пептидный комплекс (если гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит четыре разных вторых бициклических пептида) и т.д.

НКp46-связывающие бициклические пептиды

Естественные киллеры (НК) являются компонентами врожденной иммунной системы, представляя небольшую фракцию мононуклеарных клеток периферической крови. Как передовые респондеры, эти иммунные клетки определяют и элиминируют нездоровые клетки и связывают врожденный иммунный ответ с адаптивным иммунным ответом. Из-за своих характерных свойств, НК-клетки являются отличными кандидатами для усиления терапевтических инструментов в иммуноонкологии и аутоиммунитете.

НК-клетки отвечают за иммунный надзор, осуществляемый с помощью различных ингибиторных и активирующих рецепторов. Эти активирующие и ингибиторные рецепторы на поверхности НК-клеток представляют собой комплексные меры, посредством которых активность НК-клеток поддерживается в равновесии у здоровых людей. НК-клетки распознают молекулы МНС класса I на поверхности здоровых клеток и удерживаются с помощью ингибиторных рецепторов от элиминации этих здоровых клеток. Во время стресса, инфекции или трансформации НК-клетки распознают нездоровые клетки благодаря утрате МНС класса I на поверхности клеток и индукции лигандов рецепторов НК-клеток, связывающихся с активирующими рецепторами. Распознавание чужеродного материала НК-клетками вызывает цитотоксический ответ, высвобождение цитокинов и цитотоксических молекул для элиминации нездоровых клеток.

Активность НК-клеток является сложным механизмом, включающим активирующие и ингибиторные сигналы. Во множестве сообщений приведены доказательства центральной роли рецепторов НК-клеток в природной цитотоксичности и их пригодности в лечении злокачественных новообразований. Существует неудовлетворенная потребность в большем понимании и усилении опосредованного НК-клетками распознавания и уничтожения опухолевых клеток. В сообщениях предполагают, что опухолевые клетки используют множество механизмов для снижения активности НК-клеток, и что наличие и эффективность НК-клеток ассоциированы с благоприятным прогнозом у пациентов (Pasero *et al.* (2015) *Oncotarget* 6(16), 14360-14373, Stringaris *et al.* (2014) *Haematologica* 99(5), 836-847). Только посредством терапевтического вмешательства можно использовать то, что НК-клетки потенциально могут играть роль в опосредовании иммунного ответа, для борьбы со злокачественными новообразованиями и аутоиммунными

заболеваниями.

В одном из вариантов осуществления один или более компонентов, присутствующих на естественных киллерах (NK), представляют собой природный цитотоксический рецептор, присутствующий на поверхности NK-клеток. В дополнительном варианте осуществления один или более компонентов, присутствующих на естественном киллере (NK), представляют собой природный цитотоксический рецептор, выбранный из NKp30, NKp44 и NKp46. В дополнительном варианте осуществления один или более компонентов, присутствующих на естественном киллере (NK), представляют собой NKp46.

Природные цитотоксические рецепторы (NCR) являются семейством стимуляторных рецепторов, экспрессирующихся на поверхности NK-клеток, вызывающих активацию NK-клеток и клеточно-опосредованную цитотоксичность. Семейство NCR состоит из трех членов, NKp30, NKp44 и NKp46. Хотя клеточный лиганд для NKp46 неизвестен, показана роль NKp46 в противоопухолевом иммунитете. Опосредованная вирусным антигеном активация NKp46 NK-клеток приводит к отторжению опухоли (Chinnery *et al.* 2012). После взаимодействия с его лигандом рецептор NKp46 запускает NK-клетки для индуцирования направленной цитотоксичности, что проиллюстрировано с использованием блокирующих антител против NKp46, ингибирующих способность NK-клеток лизировать мишени (Arnon *et al.* 2004). Степень экспрессии NCR на поверхности NK-клеток также повышает цитотоксичность NK-клеток. определена сильная корреляция между плотностью экспрессии NCR и способностью NK-клеток уничтожать клетки-мишени, включая широкий спектр опухолевых клеток (Moretta *et al.* 2006). При AML, раке шейки матки и предшествующих повреждениях недостаточное количество NCR или лигандов NCR делает опухолевые клетки резистентными к цитотоксичности NK-клеток (Costello *et al.* 2002, Garcia-Iglesias *et al.* 2009). Во многих солидных опухолях NK-клетки подвергаются отрицательной регуляции под действием микроокружения опухоли, что, помимо прочего, включает слущивание опухолью лигандов NCR и иммуноредактирование, мешающие способности NK-клеток распознавать, инфильтрировать и уничтожать опухолевые клетки (Nayyar 2019, Stojanovic *et al.* 2011, Sordo-Bahamonde *et al.* 2020, Watanabe *et al.* 2010, Izawa *et al.* 2011, Koo *et al.* 2013, Sun *et al.* 2015, Hasmim *et al.* 2015, Han *et al.* 2018). Stringaris *et al.* (2014) описали отрицательную регуляцию NKp46, положительную регуляцию ингибиторного рецептора NK-клеток NKG2A и низкую цитотоксическую способность NK-клеток от пациентов с AML. Кроме того, при солидных злокачественных опухолях, таких как рак предстательной железы, описана сниженная экспрессия нескольких активирующих рецепторов (CD16, NKp30, NKp46, NKG2D и DNAM-1) и повышение ингибиторного рецептора CD85j (Pesaro *et al.* 2016). и наоборот, Gauthier *et al.* (2019) идентифицировали NKp46 в качестве хорошего кандидата для таргетинга активирующего рецептора на NK-клетках при злокачественном новообразовании, демонстрируя отсутствие статистически значимой отрицательной регуляции NKp46 на периферии у пациентов с SCCHN, раком молочной железы, печени,

легких, почек и метастазирующей меланомой. Кроме того, во множестве солидных опухолей устойчивая экспрессия НКp46, ассоциированная с отрицательной регуляцией других активирующих рецепторов, таких как NKG2D, НКp30 и НКp44, и низкая экспрессия CD16 на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах описана для таких злокачественных новообразований, как острый миелолейкоз, рак молочной железы и карцинома легких (Fauriat *et al.* 2007, Mamessier *et al.* 2011, Platonova *et al.* 2011, Levi *et al.* 2015, Kim *et al.* 2010, MacFarlane *et al.* 2017). Таким образом, показано, что НКp46 является специфическим поверхностным маркером НК-клеток, подходящим для терапевтического использования для идентификации и таргетинга НК-клетки к опухолям.

В одном из вариантов осуществления один или более НКp46-связывающих бициклических пептидных лигандов содержат аминокислотную последовательность, выбранную из:

$C_i Y[Cba]PDYLC_{ii}[dA]DEYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 5);

$C_i YLPDYLC_{ii}GDEYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 6);

$C_i DLTTHNC_{ii}QWGIC_{iii}$ (SEQ ID NO: 7);

$C_i NLQAPC_{ii}MQTGKVC_{iii}$ (SEQ ID NO: 8);

$C_i NLQNPC_{ii}MKFPC_{iii}$ (SEQ ID NO: 9);

$C_i YLPDYLC_{ii}[dK(PYA)]DEYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 10); и

$C_i LLHDHC_{ii}PNTHPKLC_{iii}$ (SEQ ID NO: 11);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, и где Cba представляет собой β -циклобутилаланин, dA представляет собой D-аланин, и PYA представляет собой пентиноевую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой ТАТА, и один или более НКp46-связывающих бициклических пептидных лигандов необязательно содержат N-концевые и/или C-концевые модификации и содержат:

A_c-(SEQ ID NO: 5)-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY17224);

A-(SEQ ID NO: 6)-A-[dK(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY15452);

A-(SEQ ID NO: 7)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY15686);

A-(SEQ ID NO: 8)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY15687);

A-(SEQ ID NO: 9)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY18004);

A-(SEQ ID NO: 10)-A (в настоящем описании обозначаемый как BCY17662); и

A-(SEQ ID NO: 11)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY18005);

где PYA представляет собой пентиноевую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

CD16a-связывающие бициклические пептиды

В одном из вариантов осуществления один или более компонентов, присутствующих на естественном киллере (NK), представляют собой Fc-рецептор, присутствующий на поверхности NK-клеток. В дополнительном варианте осуществления один или более компонентов, присутствующих на естественном киллере (NK), представляют собой низкоаффинный Fc-рецептор гамма (FcγR), выбранный из FcγR1A, FcγR1B, FcγR1C, FcγR1A и FcγR1B. В дополнительном варианте осуществления один или более компонентов, присутствующих на естественном киллере (NK), представляют собой FcγR1A (также известный как CD16a).

Fc-рецепторы экспрессируются на поверхности многих лейкоцитов. У людей пять классических низкоаффинных Fc-рецепторов гамма (FcγR) (FcγR1A, FcγR1B, FcγR1C, FcγR1A и FcγR1B) связываются с Fc-частью иммуноглобулина G (IgG) и являются медиаторами воспаления в результате активации, а также ингибирования иммунных клеток (Muta *et al.* 1994, Ravetch *et al.* 2001). FcγR1A (CD16a) активируется в результате вовлечения Fc-части молекулы IgG и является критическим для антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). ADCC является механизмом, в котором антиген-специфические антитела направляют NK-клетки на уничтожение антиген-экспрессирующих злокачественных клеток (Arnould *et al.* 2006). Благодаря важной роли в противоопухолевых эффектах mAb IgG1, в нескольких исследованиях показано, что часть противоопухолевого эффекта трастузумаба, антитела IgG1 человека против рецептора эпидермального фактора роста 2 человека (HER-2), а также антитела против EGFR цетуксимаба у пациентов с метастатическим колоректальным раком, приходится на ADCC (Zhang *et al.* 2007, 2020, Wu *et al.* 2003). Схожие результаты можно описать для ритуксимаба, химерного mAb IgG1 против антигена дифференцировки B-клеток CD20 (Manches *et al.* 2003, Clynes *et al.* 2000). Пригодность экспрессии CD16 для нацеливания иммунных клеток на стимуляцию уничтожения опухолевых клеток показана в исследованиях гиперэкспрессии. В результате ретровирусной трансдукции Ig-Fc экспрессия IgFc на поверхности клеток меланомы B16 приводила к уничтожению опухоли *in vivo* (Riddle *et al.* 2005). Роль вовлечения FcγR для нацеливания NK-клеток к опухолям также показана в исследованиях, в которых T-клетки с химерным антигенным рецептором экспрессируют scFv против CD16 и нацелены на покрытые антителом опухолевые клетки. Включение CD16-CarT-клеток в моделях *in vivo* несущим EGFR⁺ или CD20⁺ опухоли мышам, которым вводили цетуксимаб или ритуксимаб, повышало таргетинг иммунных клеток и уничтожение посредством ADCC, таким образом, приводя к эрадикации ускользающих от иммунного надзора опухолей (Rataj *et al.* 2019, Caratelli *et al.* 2017).

Участие генов FcγR в аутоиммунных заболеваниях привлекало значительное внимание, и описано, что функциональные полиморфизмы FcγR, играют важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний (Salmon *et al.* 2001, Morgan *et al.* 2003, Wu *et al.* 1997). В моделях FcγR-нокаутных мышей показано, что активирующие и ингибиторные FcγR влияют на развитие аутоиммунных заболеваний (Nabbe *et al.* 2003, Kleinau *et al.* 2000,

Bolland *et al.* 2000). Изменения экспрессии FcγR значительно влияют на пороговые значения опосредованного иммунными комплексами IgG сигнала. Примечательно, что провоспалительные и противовоспалительные цитокины могут модулировать уровни экспрессии активирующих и ингибиторных FcγR, влияющие на порог ответа иммунных клеток на иммунные комплексы IgG (Pricop *et al.* 2001, Voruchov *et al.* 2005). Изменения количества копий FCGR3A и FCGR3B ассоциированы с системной красной волчанкой (SLE) и ревматоидным артритом (RA) у тайваньских пациентов (Chen *et al.* 2014). Показано, что высокое количество копий FCGR3A является фактором риска SLE. Более высокие доли цитокин-продуцирующих FcγRIIIА-положительных дендритных клеток (DC) наблюдали у пациентов с SLE, в частности, у пациентов с активным заболеванием, что позволяет предполагать, что FcγRIIIА-опосредованная продукция воспалительных цитокинов в DC может вносить вклад в патогенез заболевания (Henriques *et al.* 2012). Считают, что более высокая плотность активирующих FcγRIIIА на поверхности иммунных клеток (NK-клеток, моноцитов, DC, макрофагов и субпопуляций Т-клеток) может нарушать хрупкий баланс иммунных ответов в сторону интенсивного воспаления, что может привести к развитию SLE (Chen *et al.* 2014). Показана корреляция между низким количеством копий FCGR3A и низкой экспрессией CD16A на NK-клетках, что позволяет предполагать, что количество копий FCGR3A имеет физиологические последствия для функций NK-клеток. Что наиболее важно, дефицит FCGR3A ассоциирован с 2 разными аутоиммунными заболеваниями (SLE и RA), что позволяет предполагать, что дефектные функции FcγRIIIА могут представлять собой общий фактор риска для различных аутоиммунных заболеваний. Ассоциации с заболеваниями позволяют предполагать, что модуляция функции FcγRIIIА может являться важной терапевтической целью при волчаночном нефрите (Chen *et al.* 2014).

Терапевтические инновации дали некоторую надежду на средства для блокирования воспаления при аутоиммунном заболевании через взаимодействия FcγR. Предыдущие исследования подтвердили потенциал ингибирования FcγR в качестве терапевтической стратегии для ингибирования опосредованных иммунными комплексами явлений при аутоиммунных заболеваниях (Clarkson *et al.* 1986, Flaherty *et al.* 2012). Fc-фрагмент IgG сам по себе демонстрирует хорошую эффективность в моделях RA на животных и у людей с тромбоцитопенией (ITP) или болезнью Кавасаки (Anthony *et al.* 2008, Debré M *et al.* 1993, Hsu *et al.* 1993). Показано, что мультивалентные конструкции Fc ингибируют процессирование иммунных комплексов в моделях тромбоцитопении и артрита на мышцах (Ortiz *et al.* 2016). Кроме того, инфузия растворимых FcγR3a и 2a может ингибировать запускаемое иммунными комплексами воспаление в модели системной красной волчанки на мышцах (Li *et al.* 2014). Блокирование образования иммунных комплексов на NK-клетках предоставляет возможность исследования сниженной активации воспаления и, таким образом, аутоиммунных заболеваний.

В одном из вариантов осуществления один или более CD16a-связывающих бициклических пептидных лигандов содержат аминокислотную последовательность, выбранную из:

C_i VGLEELGPC_{ii}SDLC_{iii} (SEQ ID NO: 12);
 C_i RWHFSEPC_{ii}GAWC_{iii} (SEQ ID NO: 13); и
 C_i RWSVEDPC_{ii}GAWC_{iii} (SEQ ID NO: 14);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой TBMT, и один или более CD16a-связывающих бициклических пептидных лигандов необязательно содержат N-концевые и/или C-концевые модификации и содержат:

A-(SEQ ID NO: 12)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY13886);

A-(SEQ ID NO: 13)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY20361); и

A-(SEQ ID NO: 14)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY13883);

где PYA представляет собой пентиноевую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

В одном из вариантов осуществления гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит один (т.е. единственный) второй пептидный лиганд, связывающийся с компонентом, присутствующим на естественном киллере (NK). В дополнительном варианте осуществления единственный второй пептидный лиганд является NKp46-связывающим бициклическим пептидным лигандом, как определено в настоящем описании, или CD16a-связывающим бициклическим пептидом, как определено в настоящем описании.

В альтернативном варианте осуществления гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит два вторых пептидных лиганда, связывающихся с компонентом, присутствующим на естественном киллере (NK). В дополнительном варианте осуществления два вторых пептидных лиганда представляют собой:

оба NKp46-связывающих бициклических пептидных лиганда, как определено в настоящем описании; или

оба CD16a-связывающих бициклических пептида, как определено в настоящем описании; или

один NKp46-связывающий бициклический пептидный лиганд, как определено в настоящем описании, и один CD16a-связывающий бициклический пептид, как определено в настоящем описании.

В дополнительном варианте осуществления, если гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит два NKp46-связывающих бициклических пептидных лиганда, как определено в настоящем описании, указанные пептидные лиганды являются идентичными (т.е. имеют одинаковую пептидную последовательность).

В дополнительном варианте осуществления, если гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит два CD16a-связывающих бициклических пептидных

лиганда, как определено в настоящем описании, указанные пептидные лиганды являются идентичными (т.е. имеют одинаковую пептидную последовательность).

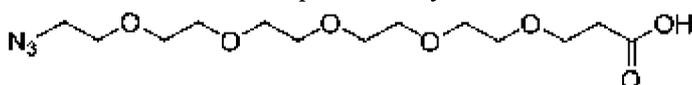
В альтернативном варианте осуществления гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержит три вторых пептидных лиганда, связывающихся с компонентом, присутствующим на естественном киллере (NK). В дополнительном варианте осуществления каждый из трех вторых пептидных лиганда является NKp46-связывающим бициклическим пептидным лигандом, как определено в настоящем описании. В дополнительном варианте осуществления три NKp46-связывающих бициклических пептидных лиганда, как определено в настоящем описании, являются идентичными (т.е. имеют одинаковую пептидную последовательность).

Линкеры

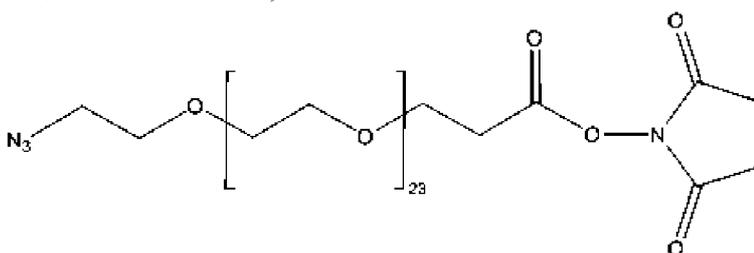
Следует понимать, что первый пептидный лиганд можно конъюгировать с одним или более вторыми пептидными лигандами через любой подходящий линкер. Как правило, дизайн указанного линкера будет таким, что два или более общих бициклических пептидов расположены так, что они могут связываться беспрепятственно со своими соответствующими мишенями по отдельности или одновременно со связыванием с обоими рецепторами-мишенями. Кроме того, линкер должен позволять связываться с обеими мишенями одновременно, при этом сохраняя подходящее расстояние между клетками-мишенями, которое будет приводить к желаемому функциональному исходу. Свойства линкера можно модулировать для увеличения длины, жесткости или растворимости для оптимизации желаемого функционального исхода. Линкер также можно конструировать, чтобы сделать возможным присоединение более одного бицикла к одной мишени. Повышение валентности любого связывающего пептида может служить для повышения аффинности гетеротандема к клеткам-мишеням или может способствовать индуцированию олигомеризации одного или обоих рецепторов-мишеней.

В одном из вариантов осуществления линкер является линейным линкером. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что линейный линкер обладает преимуществом, заключающимся в возможности наличия одного первого пептида на одном конце и одного второго пептида на другом конце.

В дополнительном варианте осуществления линейный линкер выбран из:



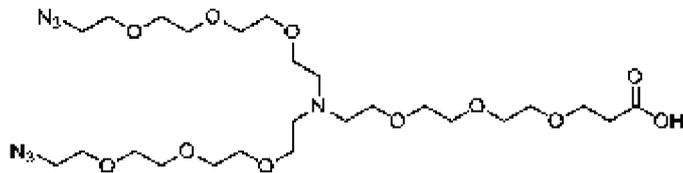
азид-PEG5-кислота; и



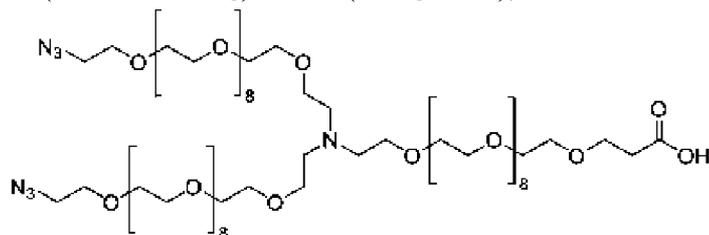
азид-PEG24-кислота.

В одном из вариантов осуществления линкер является разветвленным линкером. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что разветвленный линкер обладает преимуществом, заключающимся в возможности наличия одного первого пептида на одном конце и двух или более вторых пептидов на другом конце.

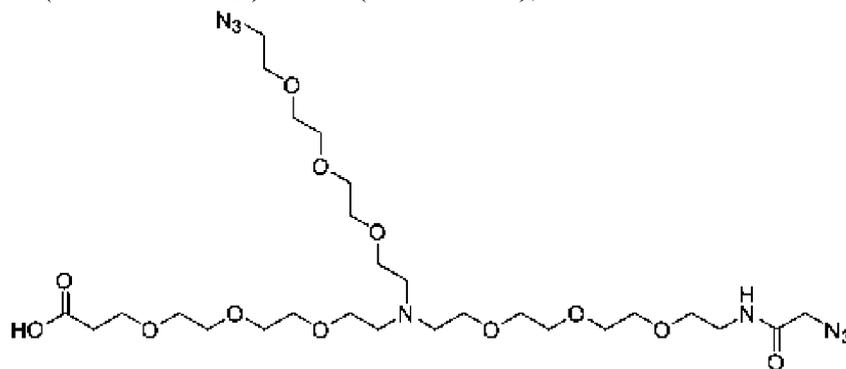
В дополнительном варианте осуществления разветвленный линкер выбран из:



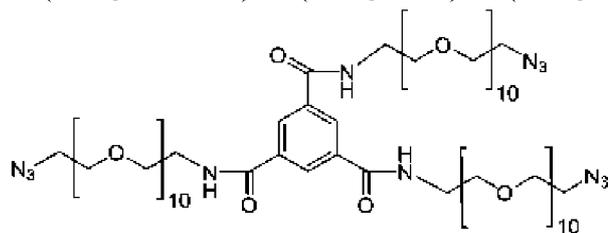
N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид);



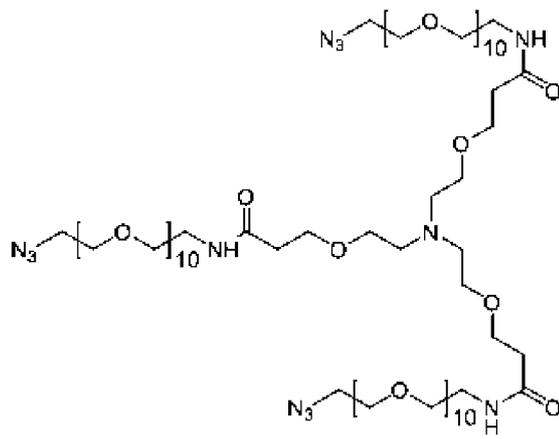
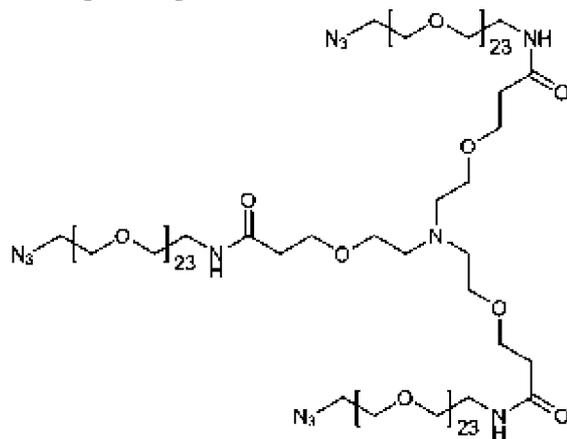
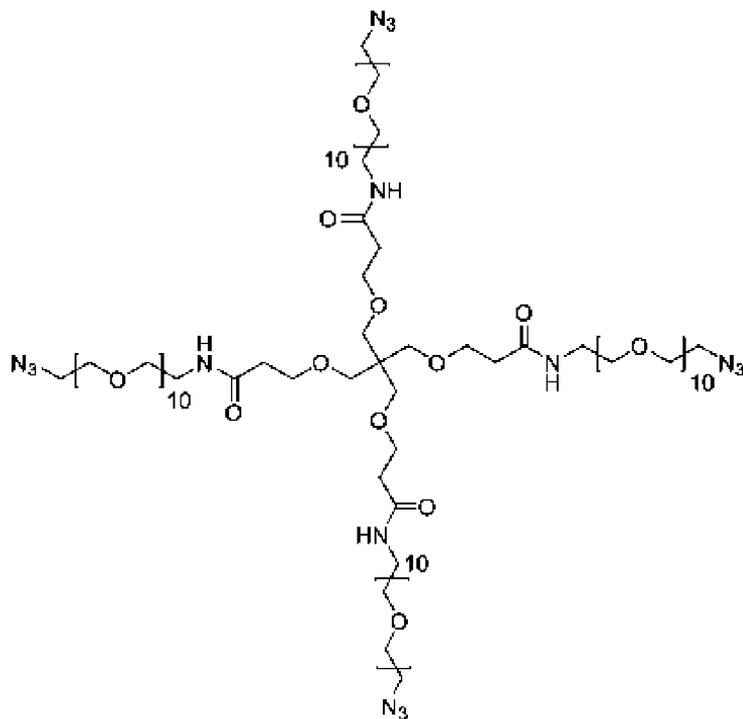
N-(кислота-PEG₁₀)-N-бис(PEG₁₀-азид);

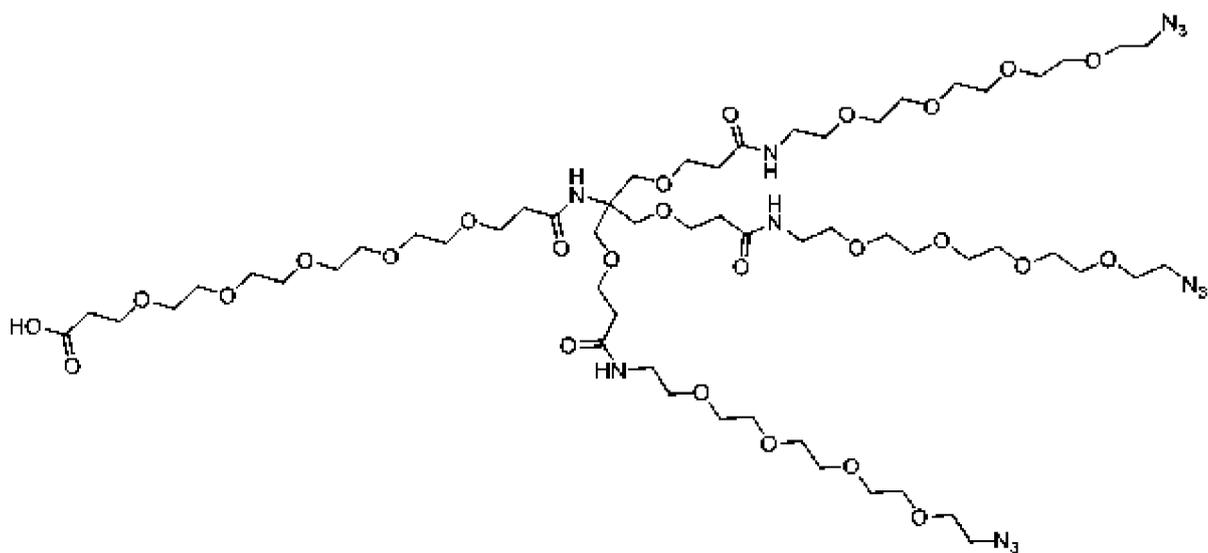


N-(PEG₃-кислота)-N-(PEG₃-азид)-N-(PEG₃-NH-АсAz);

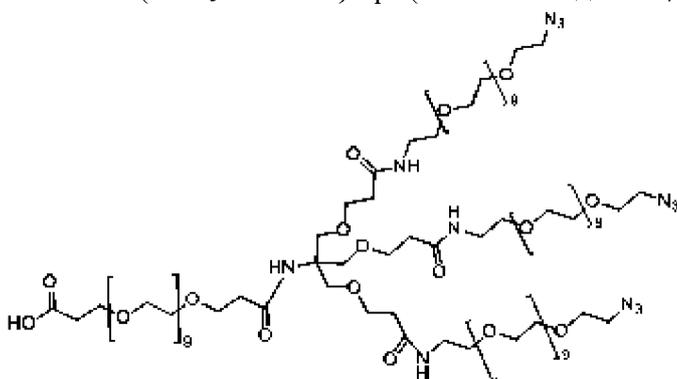


Тримезин-[PEG₁₀]₃;

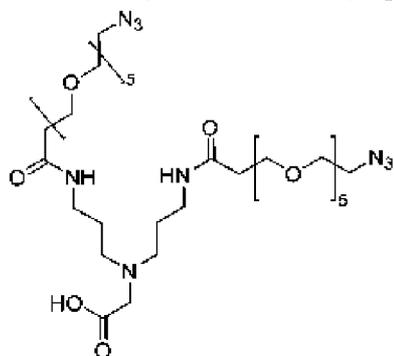
TCA-[PEG₁₀]₃;TCA-[PEG₂₃]₃;Tet-[PEG₁₀]₄;



Метан-N-(PEG₅-кислота)-три(МеОPr-амид-PEG₄-азид);

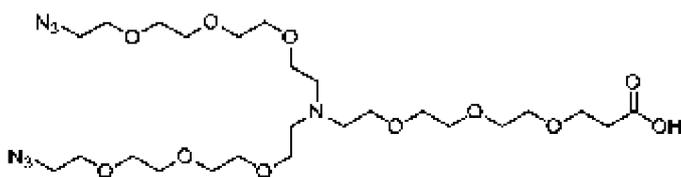


Метан-N-(PEG₁₀-кислота)-три(МеОPr-амид-PEG₁₀-азид); и



Бис-N-аминопропил-глицин-(PEG₅)₂.

В одном конкретном варианте осуществления разветвленный линкер представляет собой:



N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид).

Гетеротандемные комплексы

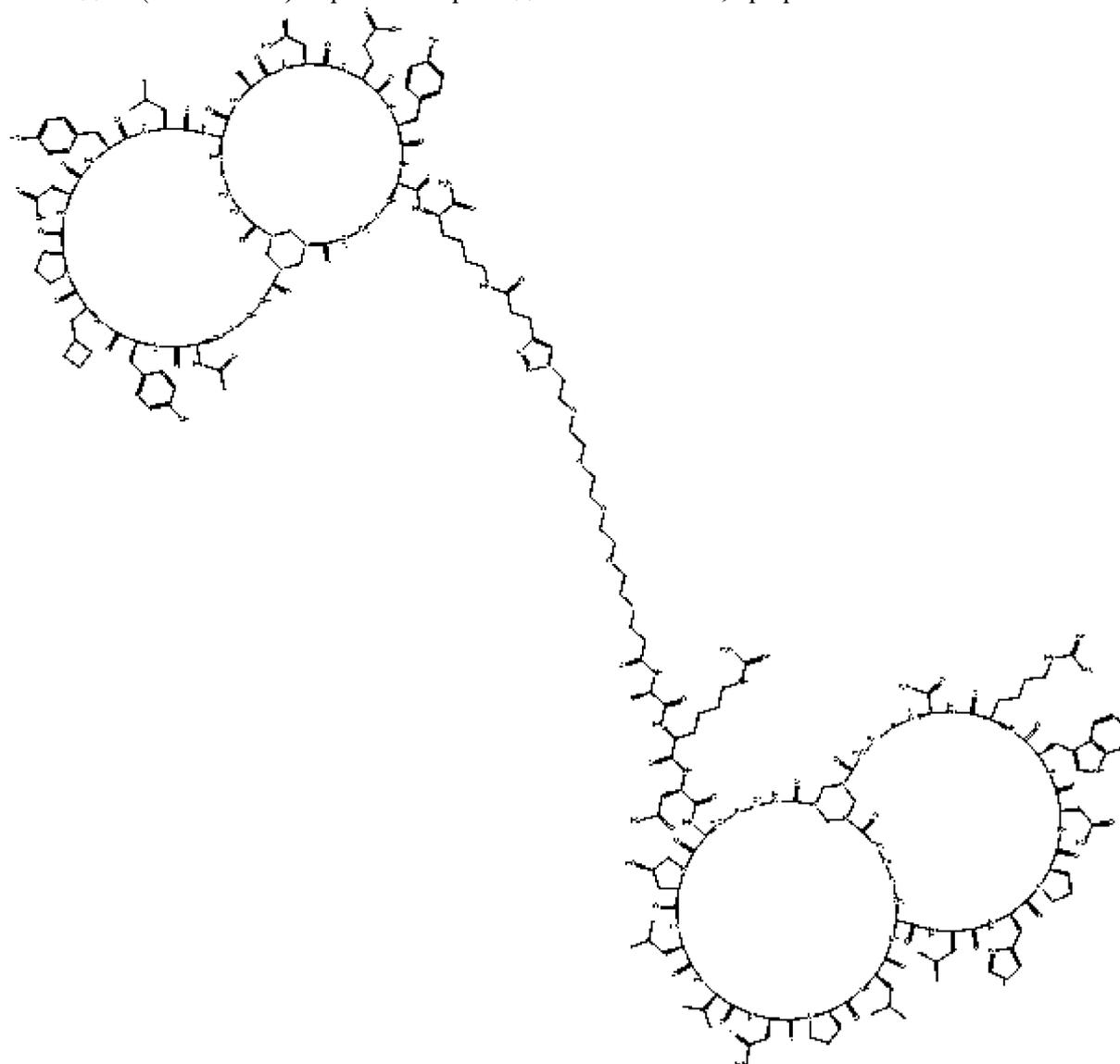
В конкретном варианте осуществления первый пептидный лиганд содержит EphA2-

связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, один или более вторых пептидных лигандов содержат два НКр46-связывающих бициклических пептидных лиганда, присоединенных к каркасу ТАТА, и указанный гетеротандемный комплекс является комплексом, приведенным в таблице А1, таблице А2 и таблице А3:

Таблица А1 (EphA2:НКр46; 1:1)

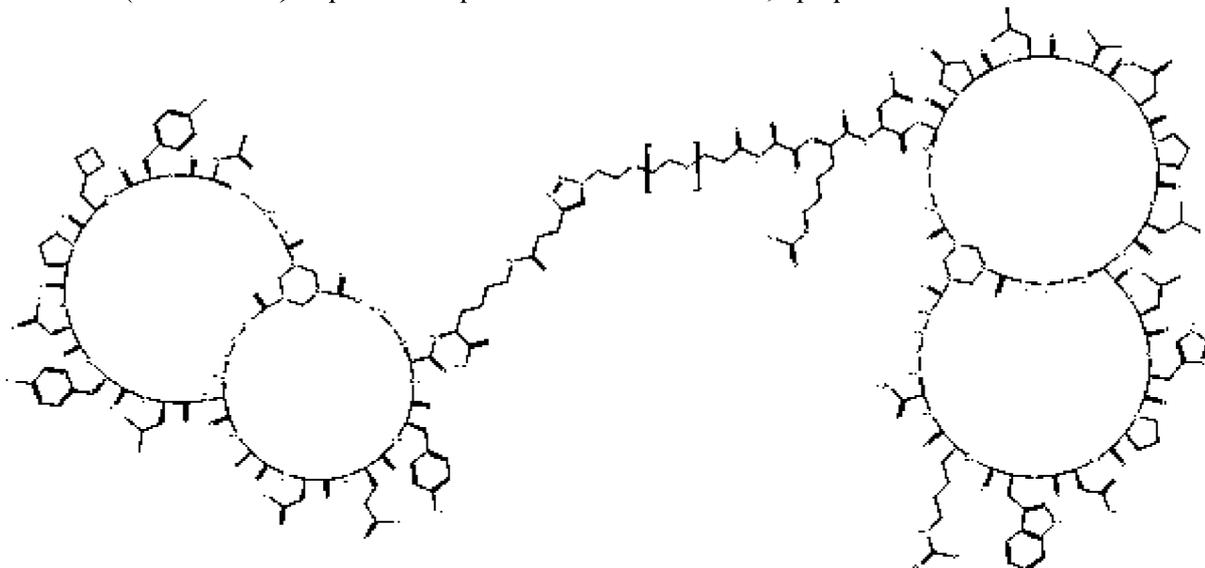
<i>№ комплекса</i>	<i>№ EphA2 ВСУ</i>	<i>Точка присоединения</i>	<i>Линкер</i>	<i>№ НКр46 ВСУ</i>	<i>Точка присоединения</i>
ВСУ17225	ВСУ959 4	Н-конец	Азид-PEG5-кислота	ВСУ17224	С-концевой Lys(РУА)
ВСУ18731	ВСУ959 4	Н-конец	Азид-PEG24-кислота	ВСУ17224	С-концевой Lys(РУА)

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс ВСУ17225 состоит из EphA2-специфического пептида ВСУ9594, соединенного с одним НКр46-специфическим пептидом (ВСУ17224) через линкер азид-PEG5-кислота, графически показанный как:



BCY17225

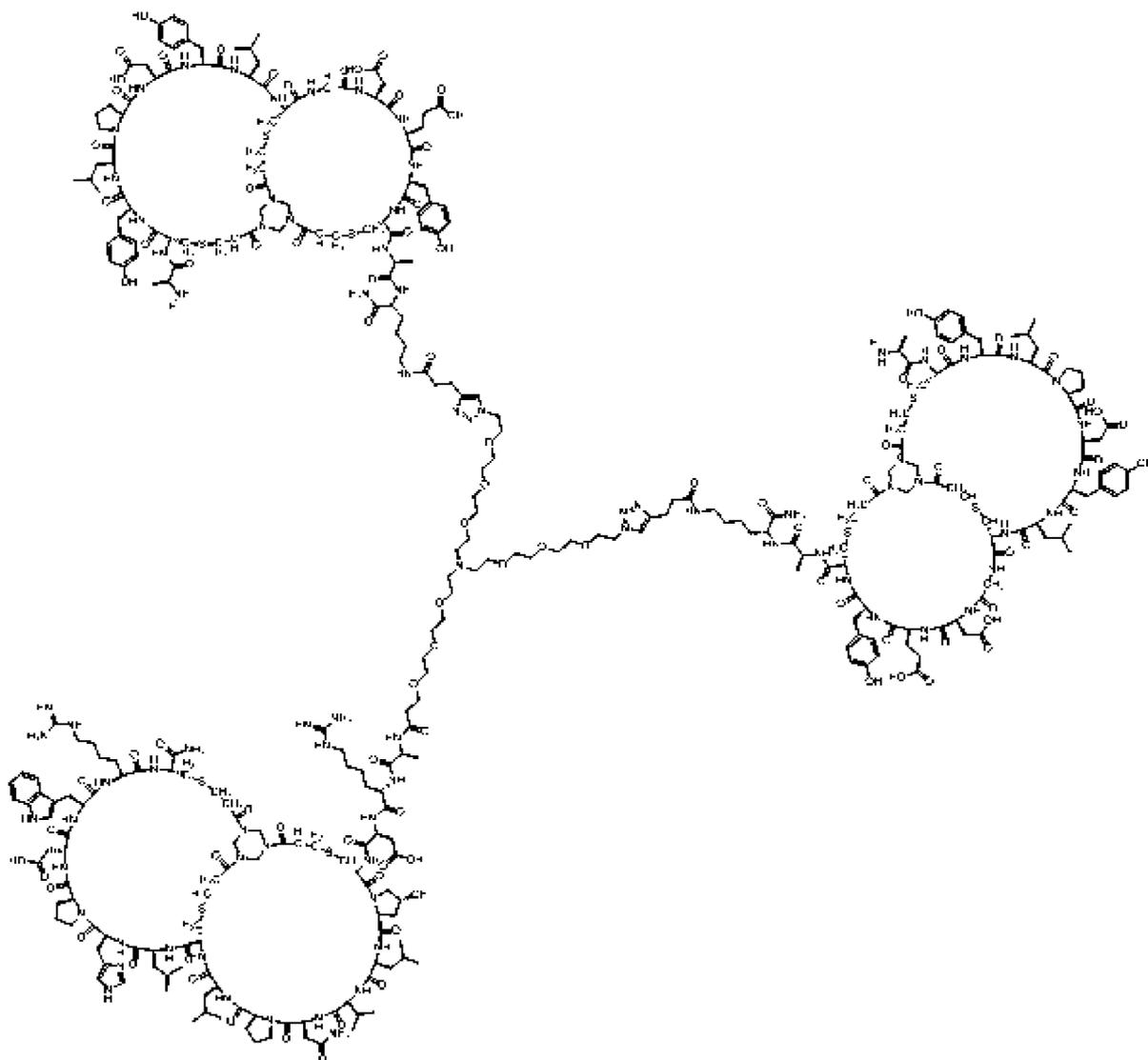
Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY18731 состоит из EphA2-специфического пептида BCY9594, соединенного с одним NKp46-специфическим пептидом (BCY17224) через линкер азид-PEG24-кислота, графически показанный как:

**BCY18731****Таблица А2 (EphA2:NKp46; 1:2)**

<i>№ комплекса</i>	<i>№ EphA2 BCY</i>	<i>Точка присоединения</i>	<i>Линкер</i>	<i>№ NKp46 BCY</i>	<i>Точка присоединения</i>
BCY15664	BCY959 4	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY1545 2	С-концевой D-Lys(PYA)
BCY15923	BCY959 4	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY1568 6	С-концевой Lys(PYA)
BCY17226	BCY959 4	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY1722 4	С-концевой Lys(PYA)
BCY15924	BCY959 4	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY1568 7	С-концевой Lys(PYA)
BCY18042	BCY959 4	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY1800 4	С-концевой Lys(PYA)
BCY18048	BCY959	N-конец	N-(кислота-	BCY1766	D-Lys(PYA)7

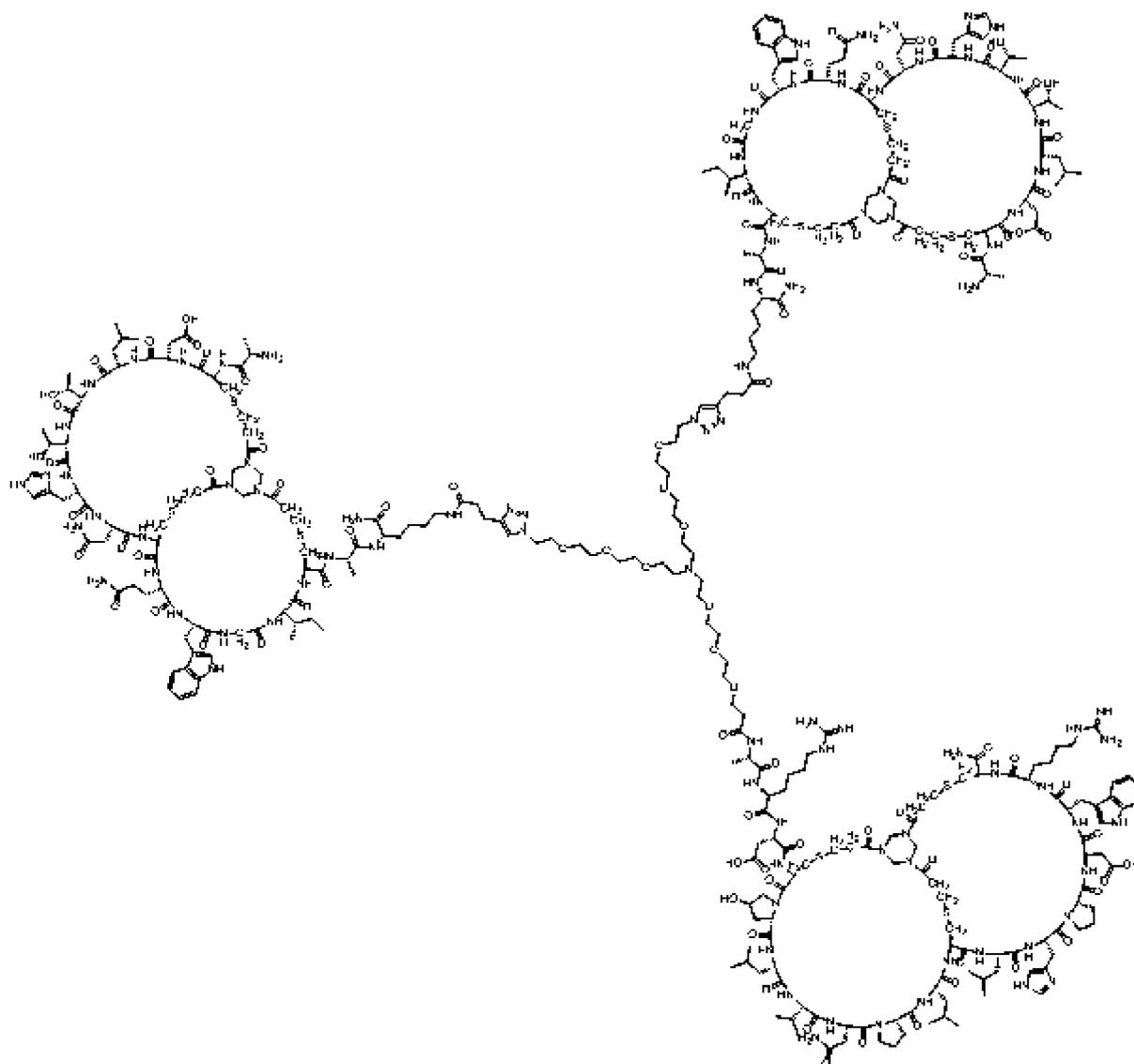
	4		PEG ₃ -N- бис(PEG ₃ -азид)	2	
BCY18049	BCY959 4	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ -азид)	BCY1800 5	C-концевой Lys(PYA)

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY15664 состоит из EphA2-специфического пептида BCY9594, соединенного с двумя НКр46-специфическими пептидами (оба из которых являются BCY15452) через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), графически показанный как:



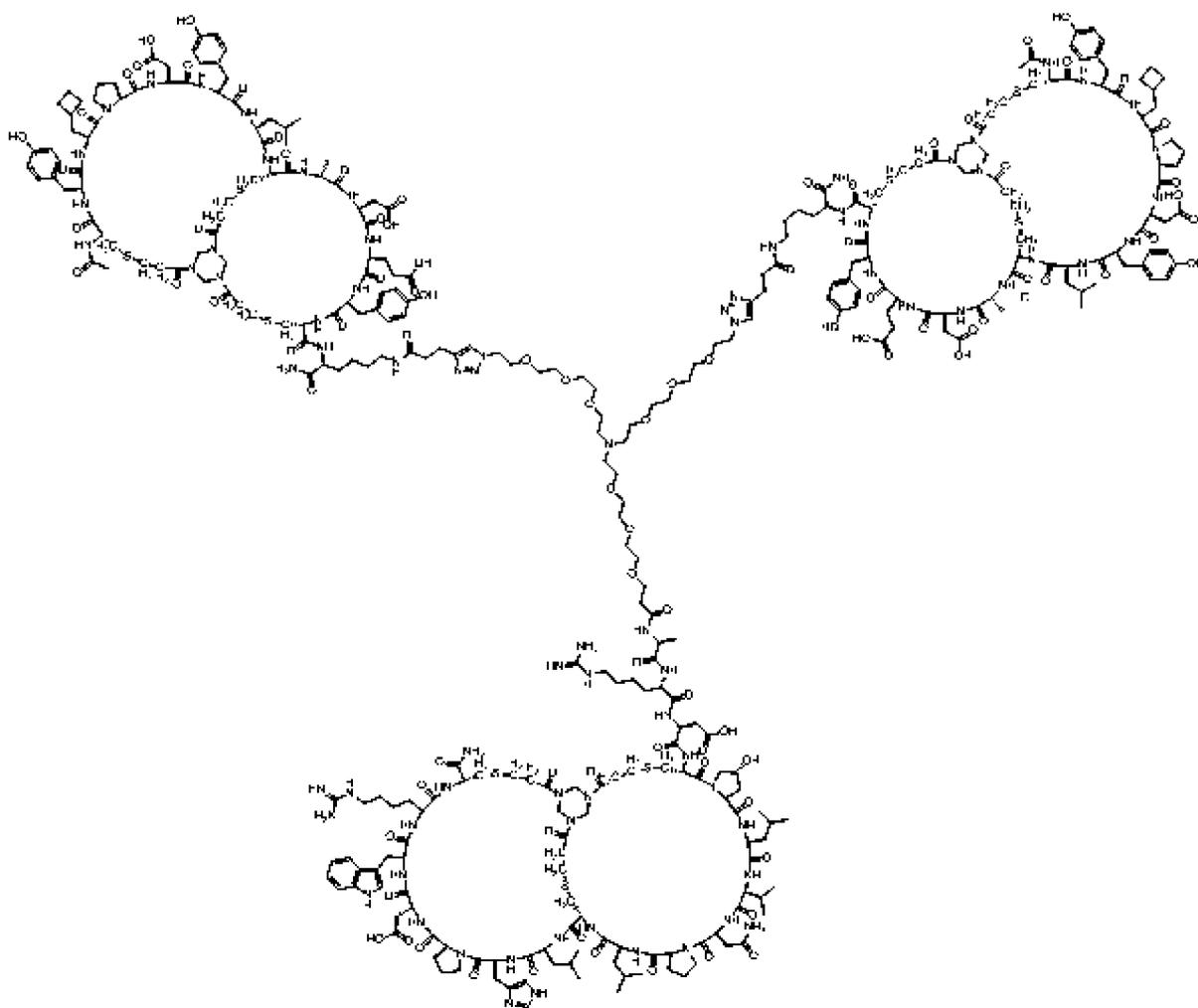
BCY15664

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY15923 состоит из EphA2-специфического пептида BCY9594, соединенного с двумя НКр46-специфическими пептидами (оба из которых являются BCY15686) через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), графически показанный как:

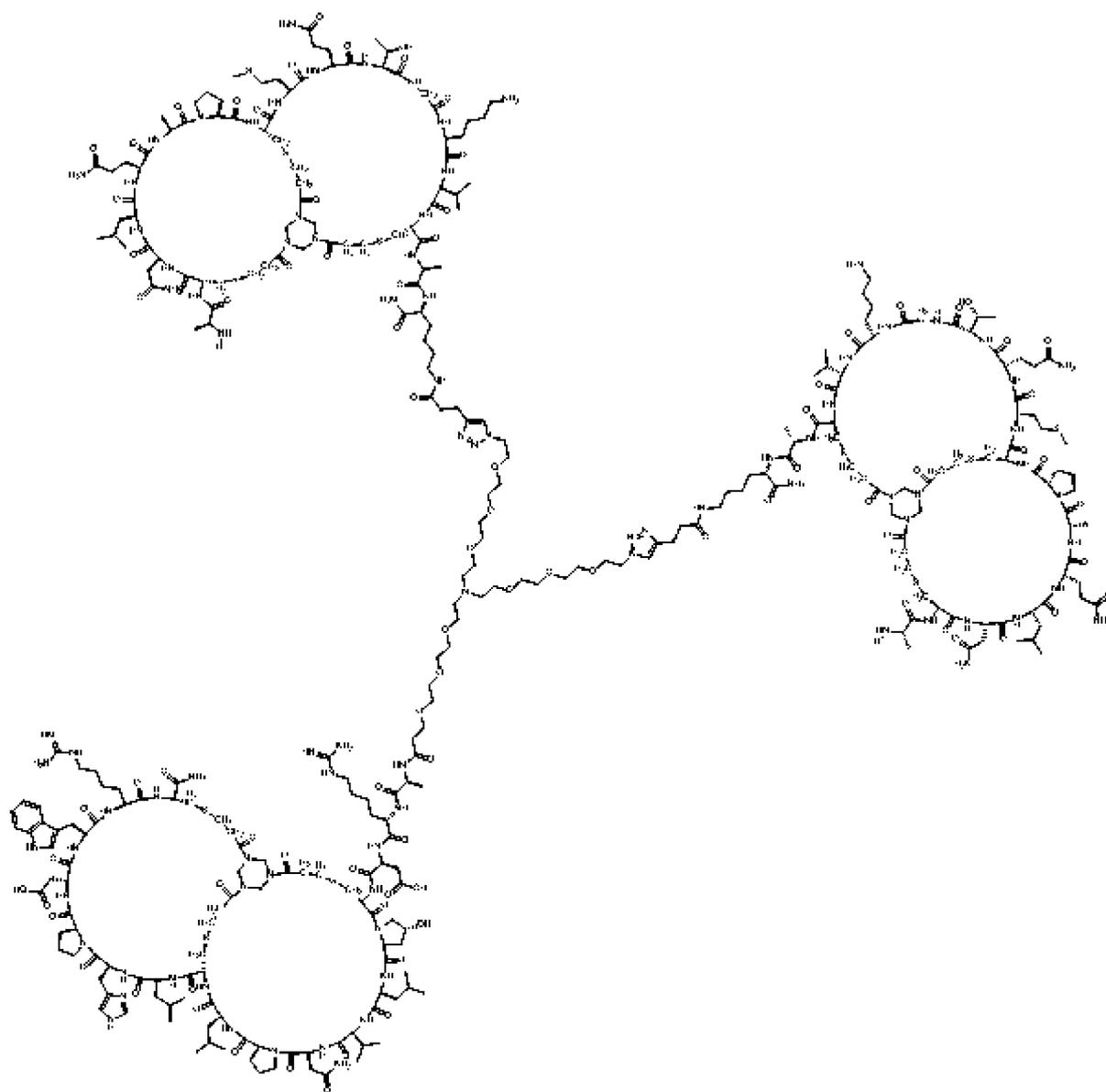


VCY15923

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс VCY17226 состоит из EphA2-специфического пептида, VCY9594, соединенного с двумя НКр46-специфическими пептидами (оба из которых являются VCY17224) через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), графически показанный как:

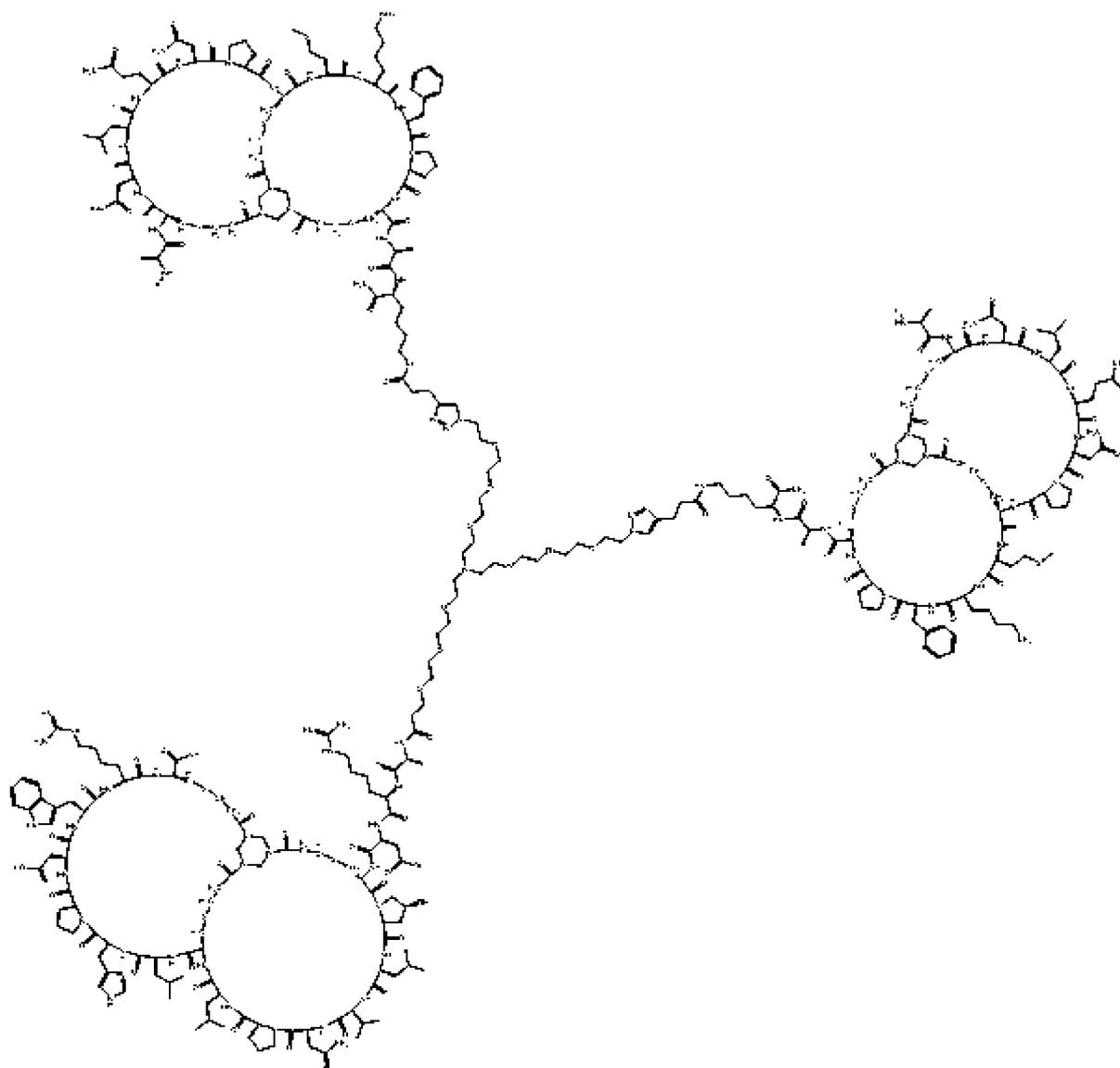
**VCY17226**

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс VCY15924 состоит из EphA2-специфического пептида VCY9594, соединенного с двумя NKp46-специфическими пептидами (оба из которых являются VCY15687) через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), графически показанный как:

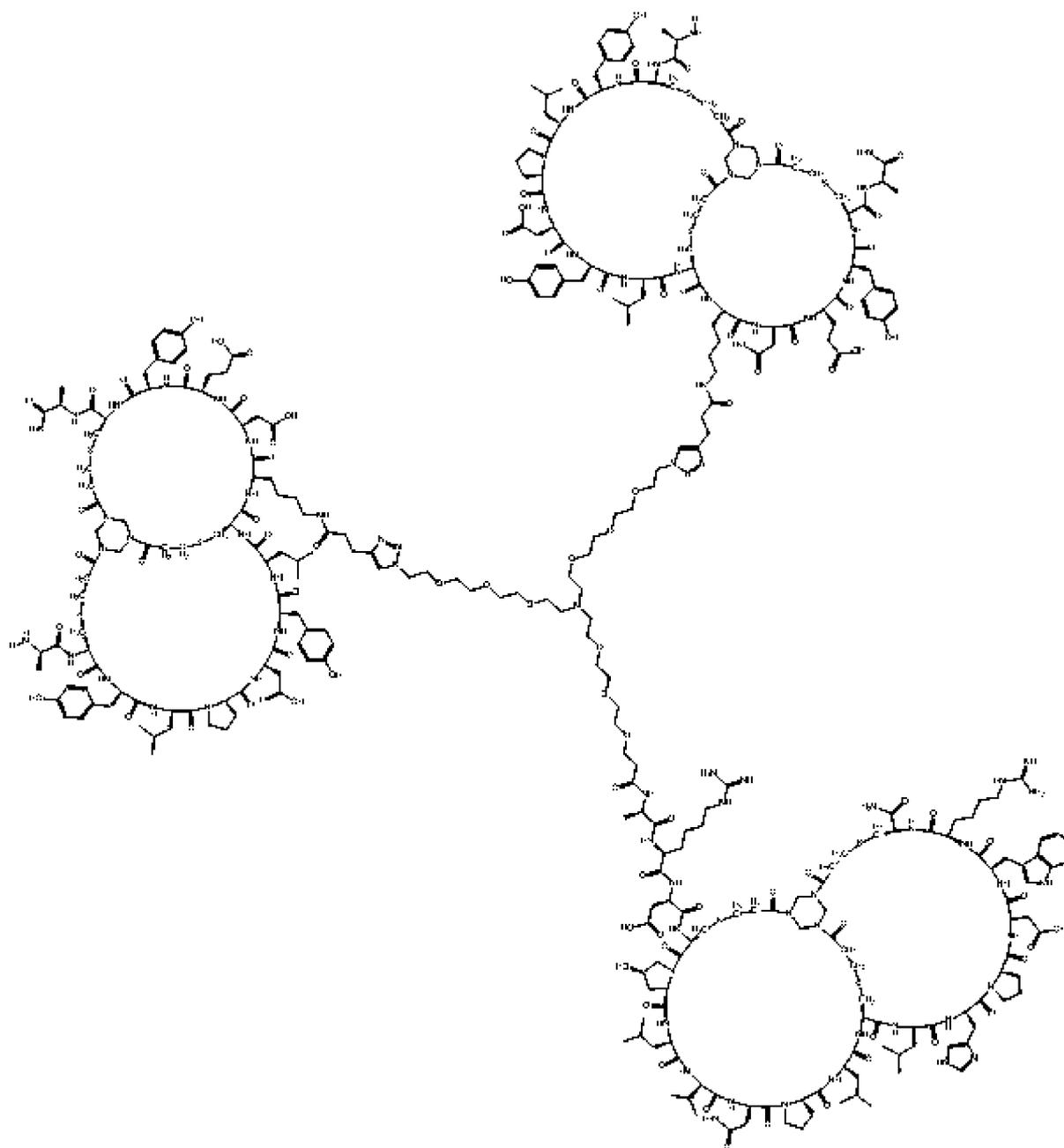


BCY15924

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY18042 состоит из EprA2-специфического пептида BCY9594, соединенного с двумя НКр46-специфическими пептидами (оба из которых являются BCY18004) через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), графически показанный как:

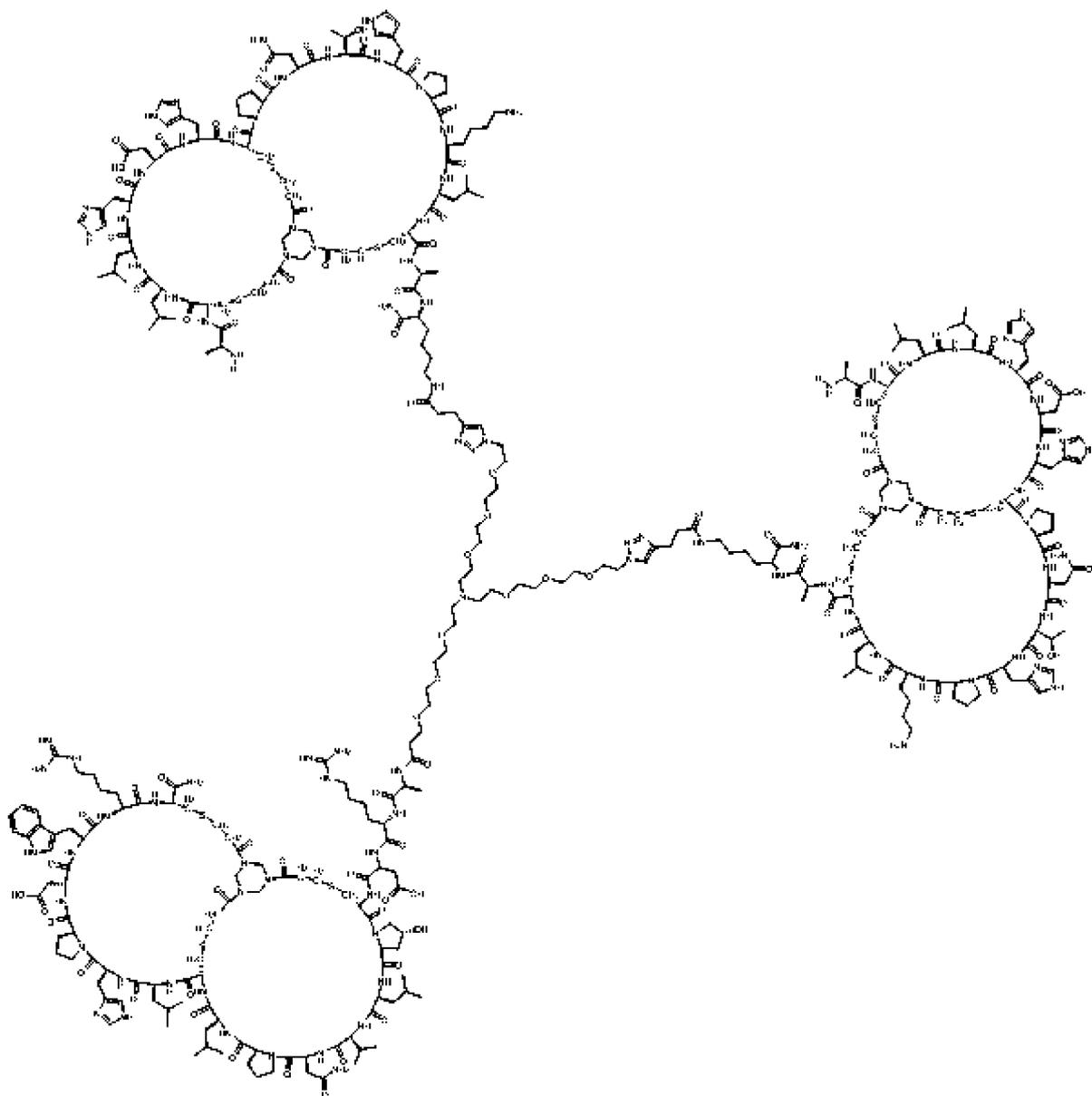
**BCY18042**

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY18048 состоит из EphA2-специфического пептида BCY9594, соединенного с двумя NKp46-специфическими пептидами (оба из которых являются BCY17662) через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), графически показанный как:



VCY18048

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс VCY18049 состоит из EphA2-специфического пептида VCY9594, соединенного с двумя NKp46-специфическими пептидами (оба из которых являются VCY18005) через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), графически показанный как:



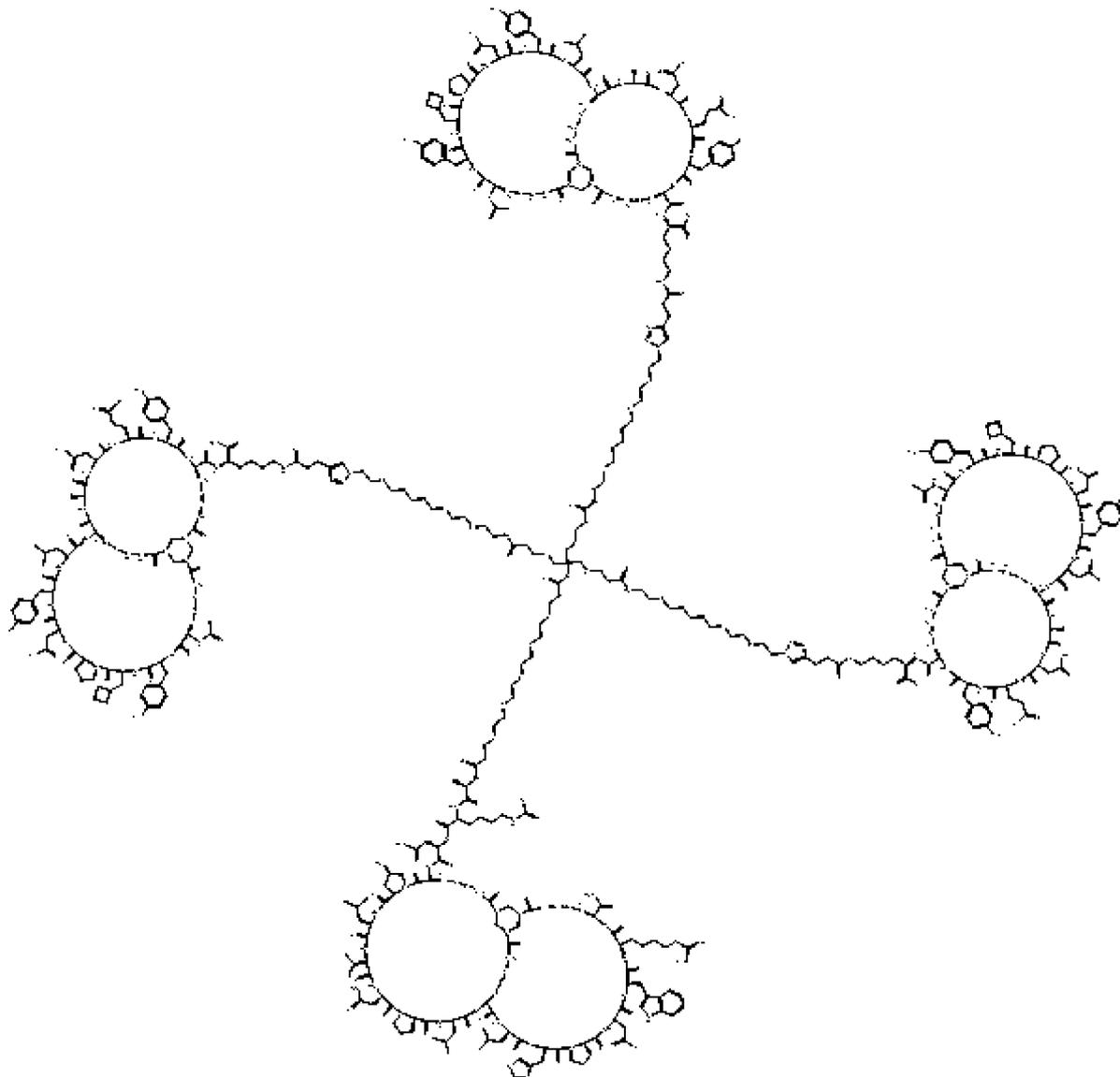
BCY18049

Таблица А3 (EphA2:НКр46; 1:3)

<i>№ комплекса</i>	<i>№ EphA2 BCY</i>	<i>Точка присоединения</i>	<i>Линкер</i>	<i>№ НКр46 BCY</i>	<i>Точка присоединения</i>
BCY21686	BCY959 4	N-конец	Метан-N-(PEG ₅ -кислота)-три(МеOPr-амид-PEG ₄ -азид)	BCY17224	C-концевой Lys(PYA)
BCY21687	BCY959 4	N-конец	Метан-N-(PEG ₁₀ -	BCY17224	C-концевой Lys(PYA)

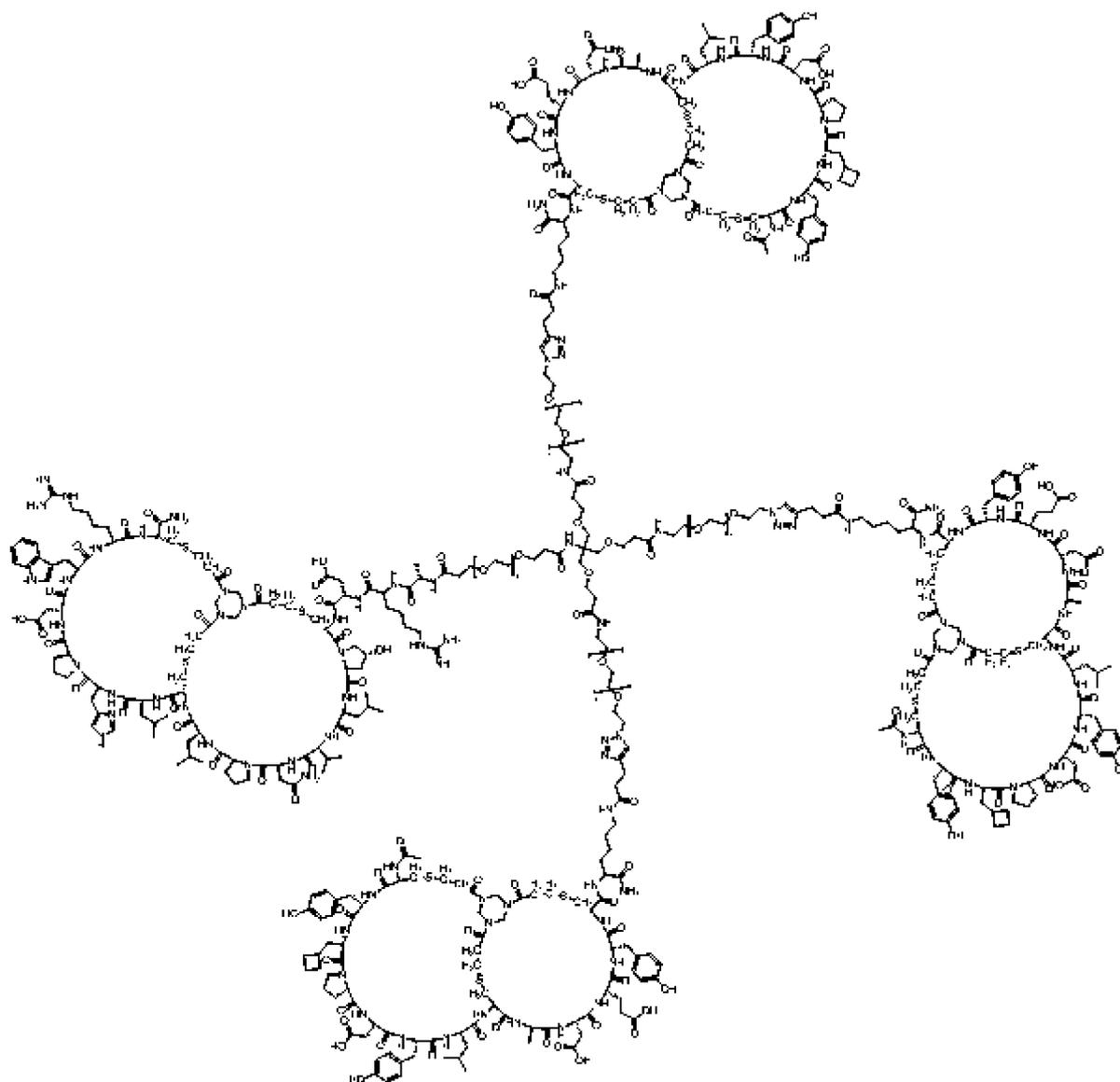
			кислота)- три(МеОРг- амид-РЕG ₁₀ - азид)		
--	--	--	--	--	--

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс ВСУ21686 состоит из EphA2-специфического пептида ВСУ9594, соединенного с тремя НКр46-специфическими пептидами (все из которых являются ВСУ17224) через линкер метан-N-(РЕG₅-кислота)-три(МеОРг-амид-РЕG₄-азид), графически показанный как:



BCY21686

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс ВСУ21687 состоит из EphA2-специфического пептида ВСУ9594, соединенного с тремя НКр46-специфическими пептидами (все из которых являются ВСУ17224) через линкер метан-N-(РЕG₁₀-кислота)-три(МеОРг-амид-РЕG₁₀-азид), графически показанный как:



BCY21687

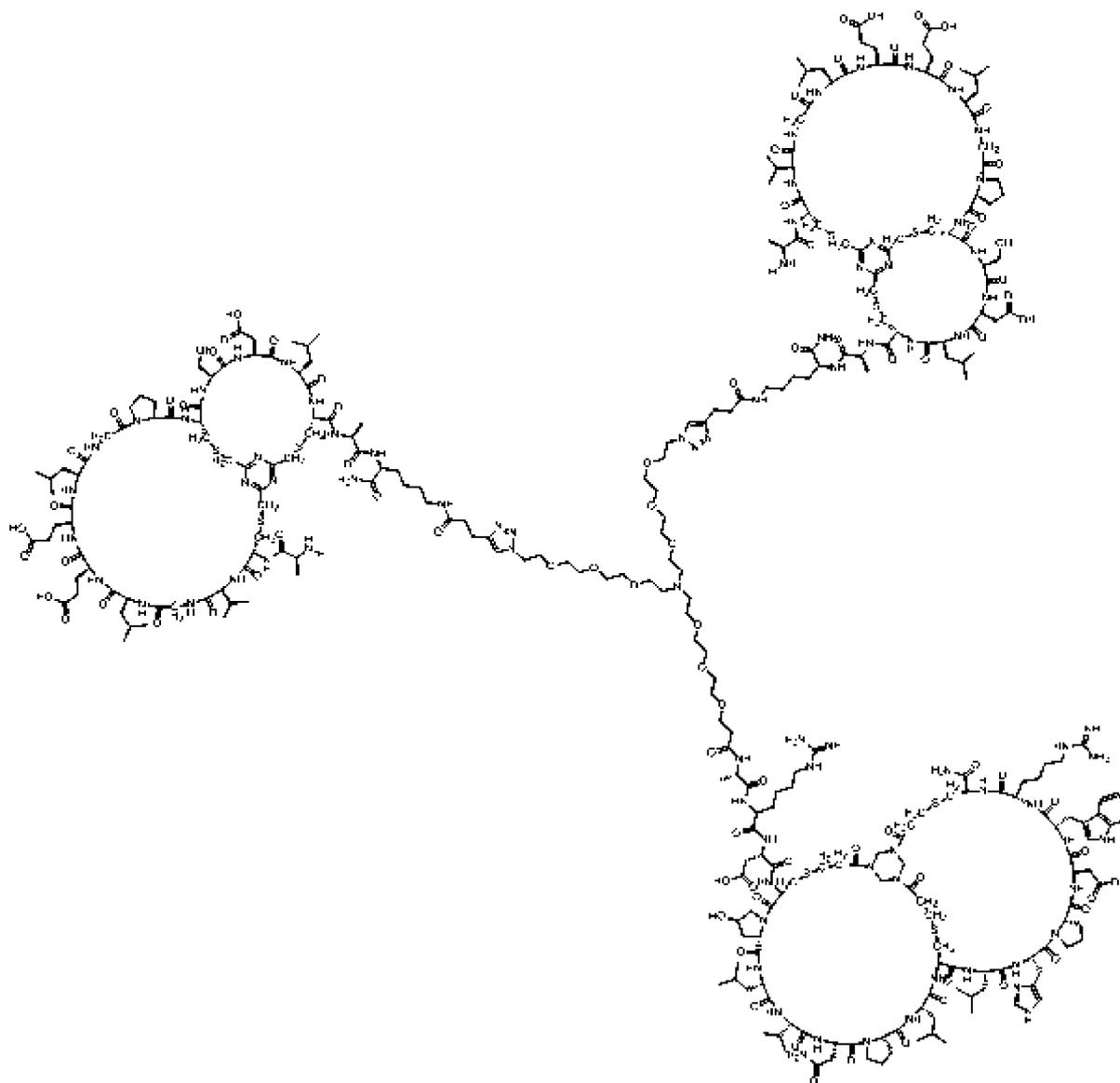
В конкретном варианте осуществления первый пептидный лиганд содержит EphA2-связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, один или более вторых пептидных лигандов содержат два CD16a-связывающих бициклических пептидных лиганда, присоединенных к каркасу ТВМТ, и указанный гетеротандемный комплекс выбран из комплексов, приведенных в таблице В1:

Таблица В1 (EphA2:CD16a; 1:2)

<i>№ комплекса</i>	<i>№ EphA2 BCY</i>	<i>Точка присоединения</i>	<i>Линкер</i>	<i>№ CD16a BCY</i>	<i>Точка присоединения</i>
BCY15911	BCY9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY1388 6	C-концевой Lys(PYA)
BCY20810	BCY9594	N-конец	N-(кислота-	BCY2036	C-концевой

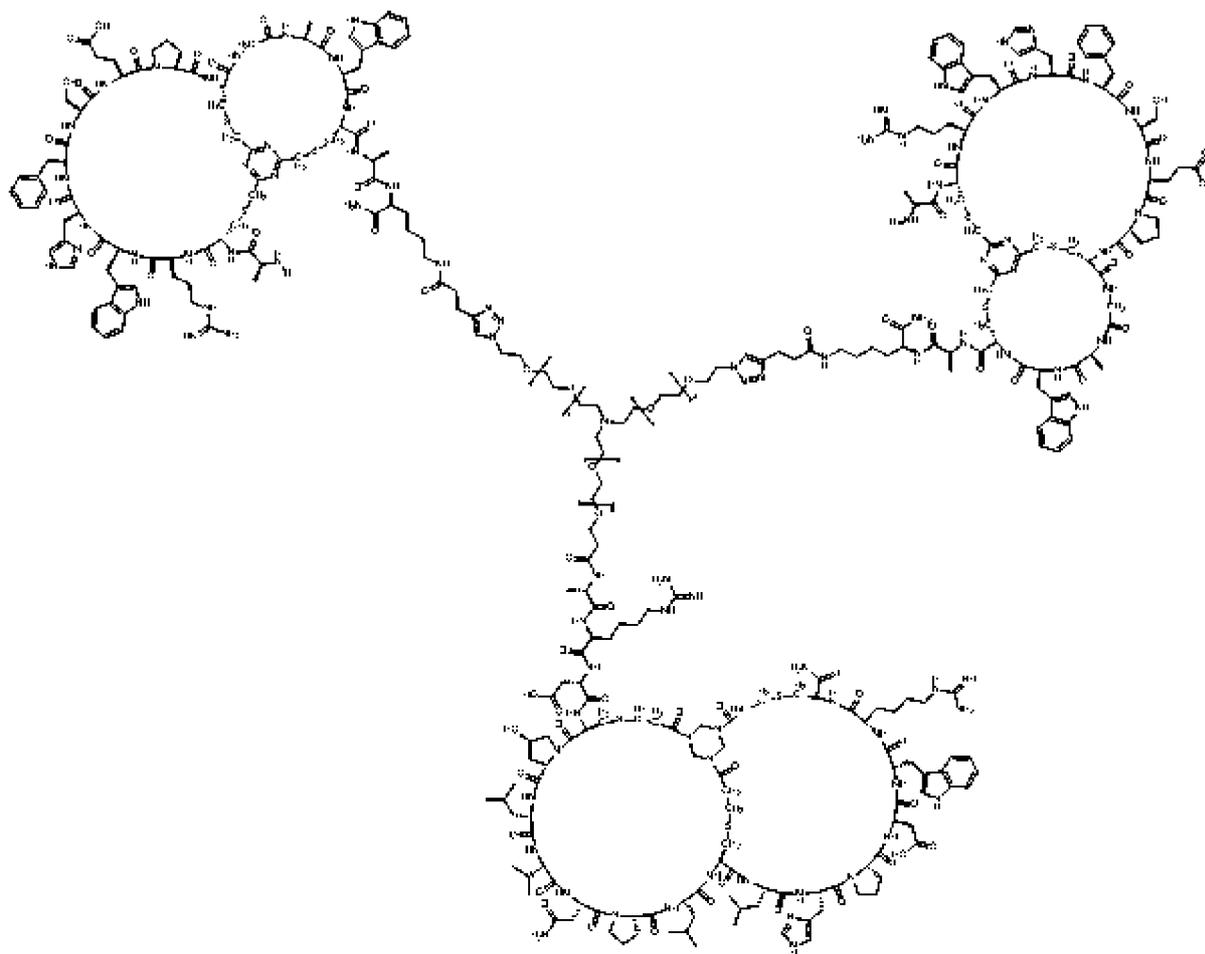
			PEG ₁₀ -N- бис(PEG ₁₀ - азид)	1	Lys(PYA)
--	--	--	---	---	----------

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY15911 состоит из EphA2-специфического пептида BCY9594, соединенного с двумя CD16a-специфическими пептидами (оба из которых являются BCY13886) через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), графически показанный как:



BCY15911

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY20810 состоит из EphA2-специфического пептида BCY9594, соединенного с двумя CD16a-специфическими пептидами (оба из которых являются BCY20361) через линкер N-(кислота-PEG₁₀)-N-бис(PEG₁₀-азид), графически показанный как:



VCY20810

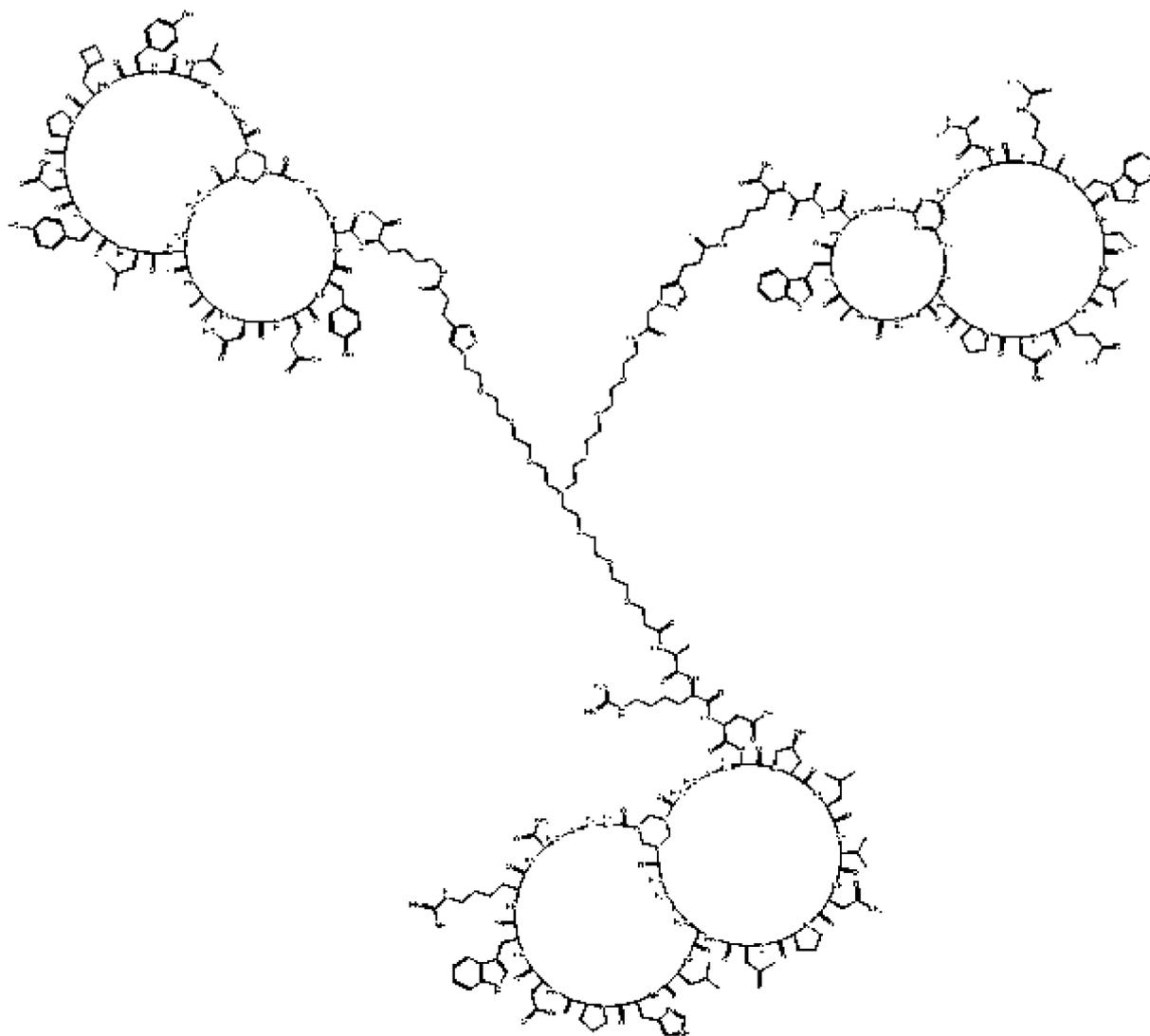
В конкретном варианте осуществления первый пептидный лиганд содержит EphA2-связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, и два вторых пептидных лиганда, содержащие один NKp46-связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, и один CD16a-связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТВМТ, и указанный гетеротандемный комплекс выбран из комплексов, приведенных в таблице С:

Таблица С (EphA2:NKp46:CD16a; 1:1:1)

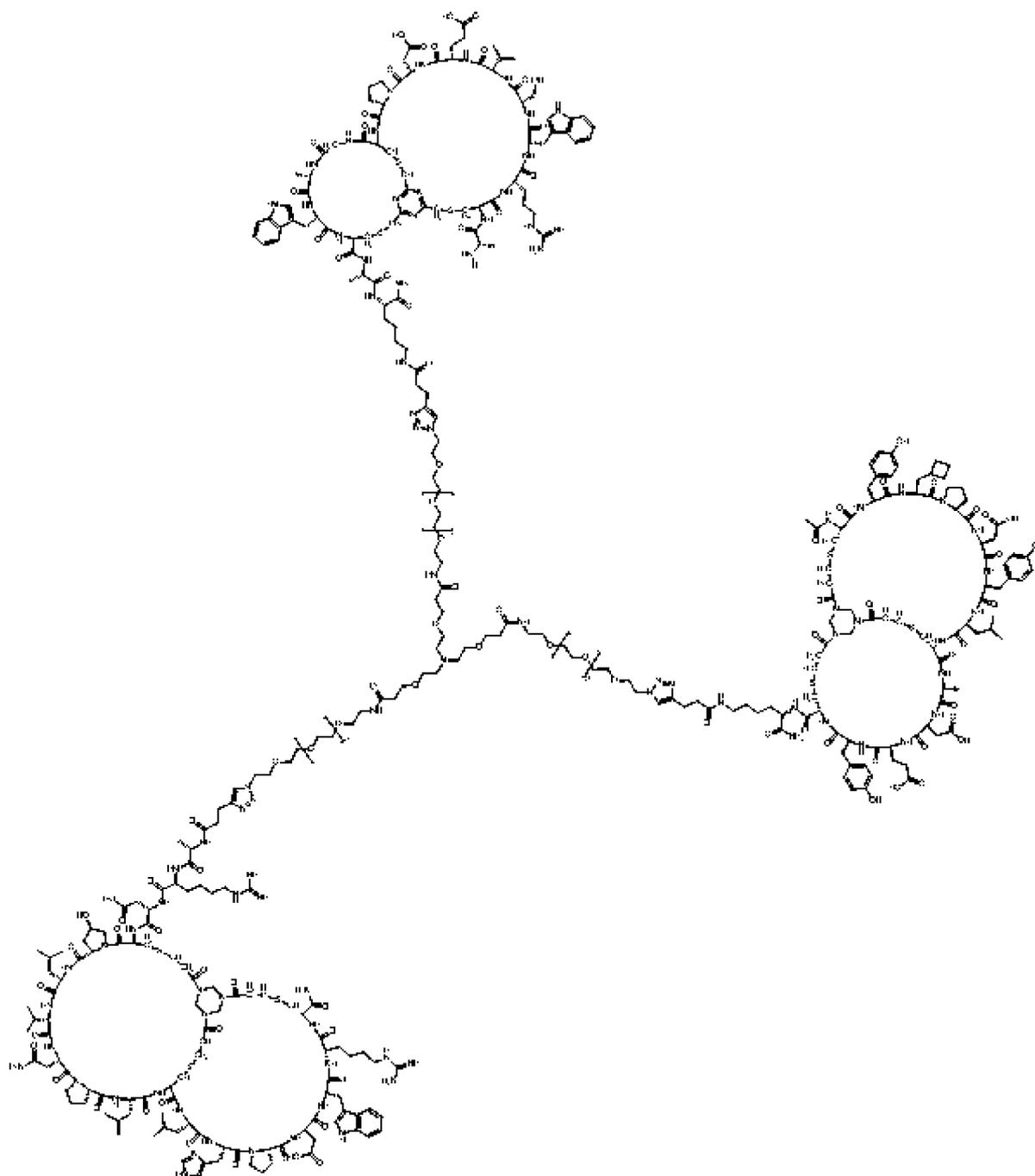
<i>№ комплекса</i>	<i>№ EphA2 VCY</i>	<i>Точка присоединения</i>	<i>Линкер</i>	<i>№ NKp46 VCY</i>	<i>Точка присоединения</i>	<i>№ CD16a VCY</i>	<i>Точка присоединения</i>
VCY172 31	VCY9594	N-конец	N-(PEG3-кислота)-N-(PEG3-азид)-N-(PEG3-	VCY172 24	C-концевой Lys(PYA)	VCY13 883	C-концевой Lys(PYA)

			NH- AcAz)				
BCY172 35	BCY9594	N-конец	TCA- [Peg ₂₃] ₃	BCY172 24	C- концевой Lys(PYA)	BCY13 883	C- концевой Lys(PYA)
BCY207 93	BCY9594	N-конец	N- (PEG3- кислота) -N- (PEG3- азид)-N- (PEG3- NH- AcAz)	BCY172 24	C- концевой Lys(PYA)	BCY20 361	C- концевой Lys(PYA)

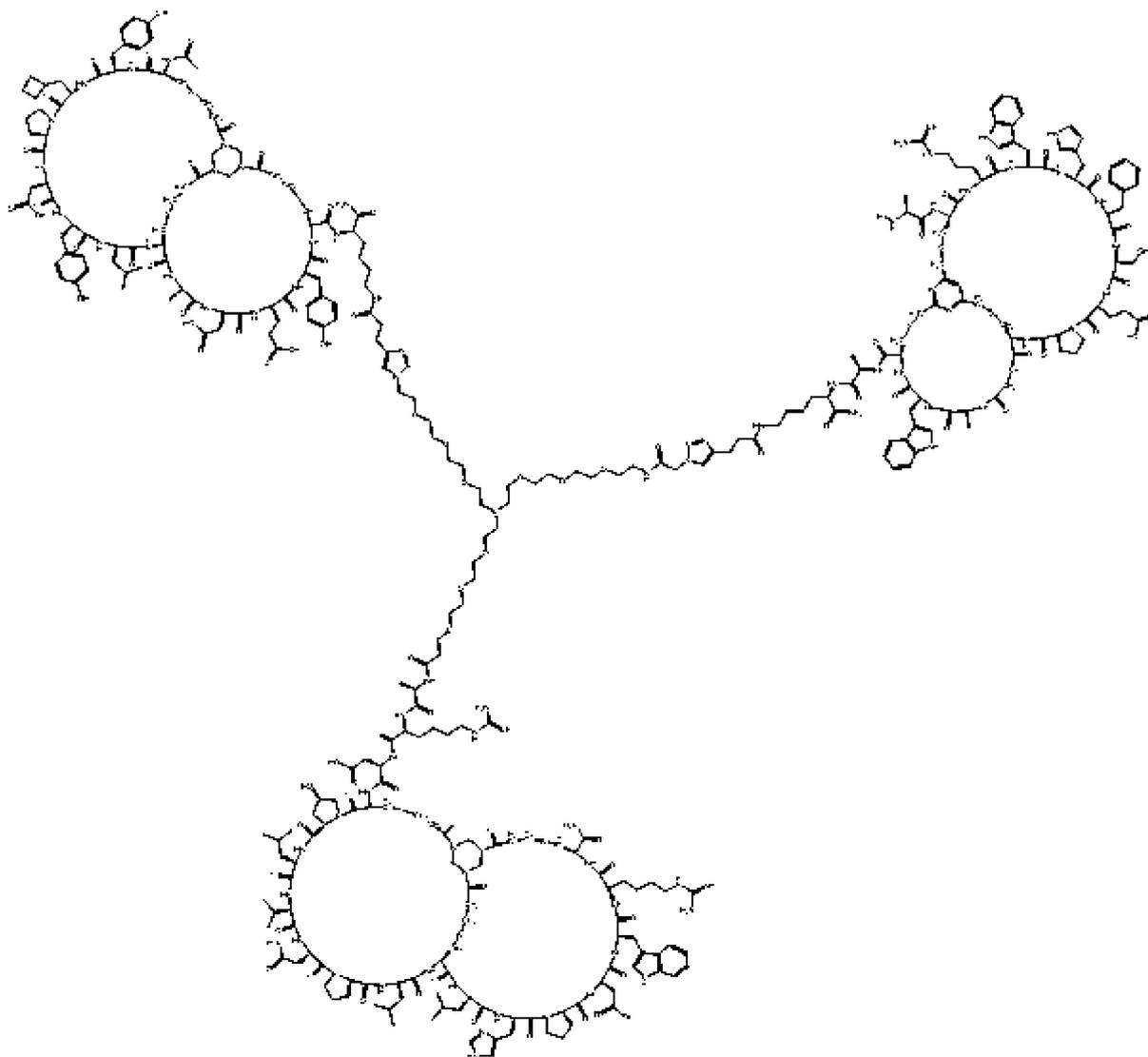
Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY17231 состоит из EphA2-специфического пептида BCY9594, соединенного с NKp46-специфическим пептидом (BCY17224) и CD16a-специфическим пептидом (BCY13883) через линкер N-(PEG3-кислота)-N-(PEG3-азид)-N-(PEG3-NH-AcAz), графически показанный как:

**BCY17231**

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY17235 состоит из EphA2-специфического пептида BCY9594, соединенный с NKp46-специфическим пептидом (BCY17224) и CD16a-специфическим пептидом (BCY13883) через линкер TCA-[PEG₂₃]₃, графически показанный как:

**VCY17235**

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс VCY20793 состоит из EphA2-специфического пептида VCY9594, соединенного с NKp46-специфическим пептидом (VCY17224) и CD16a-специфическим пептидом (VCY20361) через линкер N-(PEG3-кислота)-N-(PEG3-азид)-N-(PEG3-NH-AcAz), графически показанный как:



BCY20793

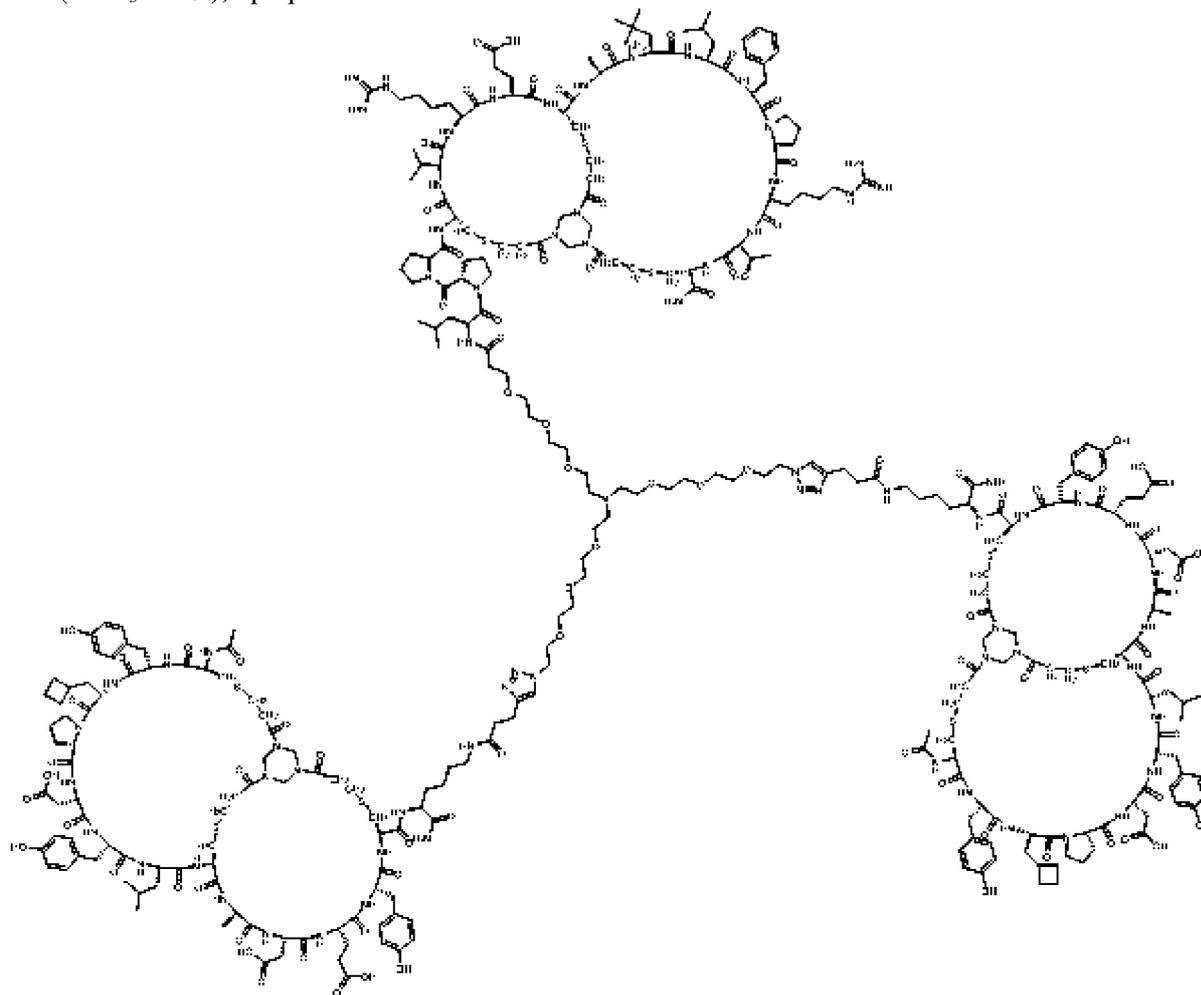
В конкретном варианте осуществления первый пептидный лиганд содержит МТ1-связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, один или более вторых пептидных лигандов содержат два НКр46-связывающих бициклических пептидных лиганда, присоединенных к каркасу ТАТА, и указанный гетеротандемный комплекс выбран из комплексов, приведенных в таблице D:

Таблица D (MT1:НКр46; 1:2)

<i>№ комплекса</i>	<i>№MT1 BCY No.</i>	<i>Точка присоединения</i>	<i>Линкер</i>	<i>№ НКр46 BCY</i>	<i>Точка присоединения</i>
BCY18604	BCY14320	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY17224	C-концевой Lys(PYA)

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY18604 состоит из МТ1-специфического пептида BCY14320, соединенного с двумя НКр46-специфическими

пептидами (оба из которых являются ВСУ17224) через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), графически показанный как:



BCY18604

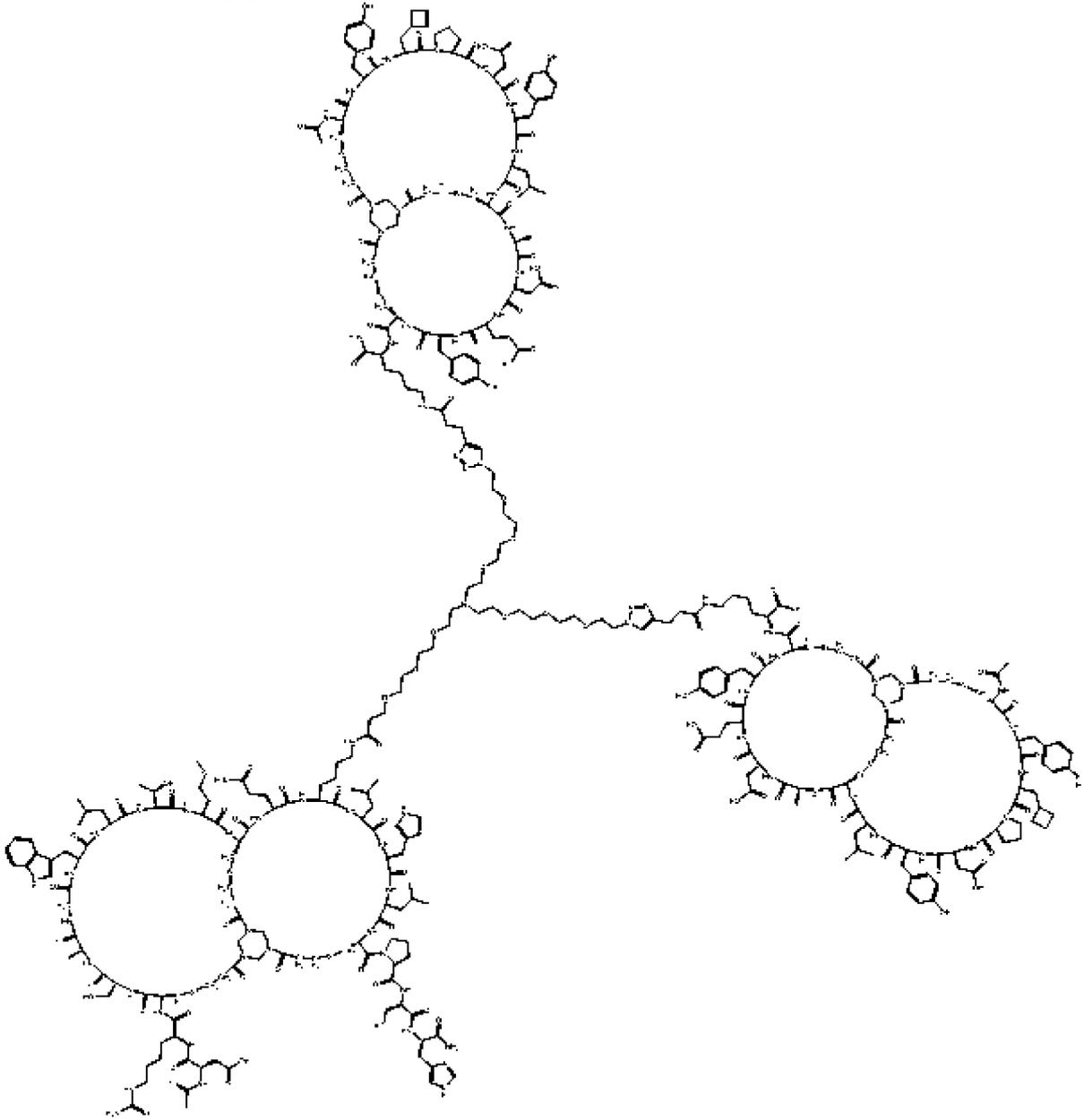
В конкретном варианте осуществления первый пептидный лиганд содержит PD-L1-связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, один или более вторых пептидных лигандов содержат два НКр46-связывающих бициклических пептидных лиганда, присоединенных к каркасу ТАТА, и указанный гетеротандемный комплекс выбран из комплексов, приведенных в таблице Е:

Таблица Е (PD-L1:НКр46; 1:2)

<i>№ комплекса</i>	<i>№ PD-L1 ВСУ</i>	<i>Точка присоединения</i>	<i>Линкер</i>	<i>№ НКр46 ВСУ</i>	<i>Точка присоединения</i>
BCY18603	BCY11865	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY17224	C-концевой Lys(PYA)

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY18603 состоит из PD-L1-специфического пептида BCY11865, соединенного с двумя НКр46-специфическими пептидами (оба из которых являются BCY17224) через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-

бис(PEG₃-азид), графически показанный как:



BCY18603

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют значение, понятное специалистам в данной области, такой как область пептидной химии, культивирования клеток и фагового дисплея, химии нуклеиновых кислот и биохимии. Используют стандартные способы молекулярной биологии, генетики и биохимии (см. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular biology* (1999) 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., включенные в настоящее описание в качестве ссылки).

Номенклатура

Нумерация

Когда даются ссылки на положения аминокислотных остатков в пептидах по изобретению, остатки цистеина (C_i, C_{ii} и C_{iii}) опускают из нумерации, т.к. они являются

инвариантными, таким образом, нумерацию аминокислотных остатков в пептидах по изобретению обозначают, как приведено ниже:

$-C_i-N_1-L_2-Q_3-A_4-P_5-C_{ii}-M_6-Q_7-T_8-G_9-K_{10}-V_{11}-C_{iii}-$ (SEQ ID NO: 1).

В целях по изобретению все бициклические пептиды считают циклизированными с помощью ТАТА или ТВМТ и образующими три-замещенную структуру. Циклизация с помощью ТАТА или ТВМТ происходит на первой, второй и третьей реакционноспособных группах (т.е. C_i , C_{ii} , C_{iii}).

Молекулярный формат

N- или C-концевые удлинения коровой последовательности бицикла добавляют на левую или правую сторону последовательности, разделенные дефисом. Например, N-концевой хвост β Ala-Sar10-Ala будут обозначать следующим образом:

β Ala-Sar10-A-(SEQ ID NO: X).

Инверсированные пептидные последовательности

Как описано в Nair *et al.* (2003) J Immunol 170(3), 1362-1373, предполагается, что пептидные последовательности, представленные в настоящем описании, также будут пригодными в своей ретро-инверсной форме. Например, последовательность является реверсированной (т.е. N-конец становится C-конец и наоборот), и их стереохимия также является аналогично реверсированной (т.е. D-аминокислоты становятся L-аминокислотами и наоборот). Во избежание сомнений, ссылки на аминокислоты по их полному названию или однобуквенному или трехбуквенному коду аминокислот предназначены в настоящем описании для обозначения L-аминокислот, если не указано иначе. Если такая аминокислота должна представлять собой D-аминокислоту, то аминокислоте будет предшествовать строчная буква d с квадратными скобками, например [dA], [dD], [dE], [dK], [d1Nal], [dNle] и т.д.

Преимущества пептидных лигандов

В подходе мультифункциональных рекрутеров НК-клеток (NKCE) комбинируют и усиливают способности НК-клеток к иммунному надзору, а также их цитотоксическую функцию. Биспецифические (BiKE), триспецифические (TRiKE) или тетраспецифические рекрутеры НК-клеток (TetraKE) являются небольшими, сконструированными молекулами антител, созданными так, чтобы образовывать связь между эффекторной НК-клеткой и целевыми опухолевыми клетками (Felices *et al.* 2016, Moore *et al.* 2011). Важно, что mAb-опосредованная активация NCR приводит к активации цитотоксичности НК-клеток против многих типов клеток-мишеней. Перекрестная сшивка, индуцируемая специфическими mAb, приводит к сильной активации НК-клеток, что приводит к повышенной цитотоксичности и продукции цитокинов. Эти рекрутеры содержат антитело против CD16, которые будут связываться с CD16 для запуска цитотоксичности НК-клеток и антителом или антигеном в случае опухолевой клетки. Примером BiKE является CD16 \times CD33, повышающее активность НК-клеток против CD33⁺ линии клеток AML HL60 *in vitro* (Gleason *et al.* 2014). В TRiKE и TetraKE используют молекулу цитокина интерлейкина 15 (ИЛ-15) в качестве связи между антителами, демонстрирующими более высокую

цитотоксичность и образование воспалительных цитокинов, чем BiKE (Davis *et al.* 2017, Felices *et al.* 2019). Пытаясь максимизировать противоопухолевый ответ NK-клеток, группа Vivier недавно показала активность мультифункционального NKCE, состоящего из Fc-фрагмента, в отношении связывания CD16, а также двух доменов антител, нацеленных на активирующий рецептор NK-клеток, NKp46, и специфический опухолевый антиген, такой как CD19, CD20 и EGFR (Gauthier *et al.* 2019). Этот NKCE демонстрировал повышенную инфильтрацию NK-клеток в опухолях и способствовал клиренсу опухоли в моделях *in vivo*, и дополнительно демонстрировал повышенную эффективность по сравнению с существующими антителами при клиническом использовании, такими как ритуксимаб и цетуксимаб. Кроме того, используя активирующий потенциал множества стимуляторных рецепторов (CD16 и NKp46) на NK-клетке, преодолевали ингибирование и достигали полной активности NK-клеток (BenShumel 2020, Tarzona 2020, Davis *et al.* 2017).

Некоторые бициклические пептиды по настоящему изобретению имеют ряд благоприятных свойств, позволяющих считать их подходящими подобными лекарственным средствам молекулам для инъекции, ингаляции, назального, глазного, перорального или топического введения. Такие благоприятные свойства включают:

- Видовая перекрестная реактивность. Это является типичным требованием для доклинической оценки фармакодинамики и фармакокинетики;

- Стабильность под действием протеаз. Бициклические пептидные лиганды в большинстве условий должны демонстрировать стабильность под действием протеаз плазмы, эпителиальных ("заякоренных в мембране") протеаз, желудочных и кишечных протеаз, поверхностных протеаз легких, внутриклеточных протеаз и т.п. Стабильность под действием протеаз должна сохраняться между разными биологическими видами таким образом, что главного бициклического пептида-кандидата можно разрабатывать с помощью моделей на животных, а также уверенно вводить людям;

- Желаемый профиль растворимости. Он является функцией доли заряженных и гидрофильных остатков относительно гидрофобных остатков и внутри-/межмолекулярных водородных связей, что важно для целей составления и абсорбции; и

- Оптимальный период полувыведения из плазмы в кровотоке. В зависимости от клинических показаний и схемы лечения, может потребоваться разработка бициклического пептида с небольшим или пролонгированным *in vivo* временем воздействия для лечения хронических или острых состояний. Оптимальное время воздействия будет регулироваться требованием продолжительного воздействия (для максимальной терапевтической эффективности) относительно требования небольшого времени воздействия для минимизации токсических эффектов, возникающих при продолжительном воздействии средства.

Пептидные лиганды

В настоящем описании термин "пептидный лиганд" относится к пептиду, ковалентно связанному с молекулярным каркасом. Как правило, такие пептиды содержат две или более реакционноспособные группы (т.е. остатки цистеина), способные

образовывать ковалентные связи с каркасом, и последовательность, заключенная между указанными реакционноспособными группами, обозначаемыми как петлевая последовательность, т.к. она образует петлю, когда пептид связан с каркасом. В данном случае пептиды содержат по меньшей мере три реакционноспособные группы, выбранные из цистеина, 3-меркаптопропионовой кислоты и/или цистеамина, и образуют по меньшей мере две петли на каркасе.

Реакционноспособные группы

Молекулярный каркас по изобретению можно связывать с полипептидом через функциональные или реакционноспособные группы на полипептиде. Как правило, они образуются из боковых цепях конкретных аминокислот, обнаруживаемых в полипептидном полимере. Такие реакционноспособные группы могут представлять собой боковую цепь цистеина, боковую цепь лизина, N-концевую аминогруппу или любую другую подходящую реакционноспособную группу, такую как пеницилламин. Подробное описание подходящих реакционноспособных групп можно найти в WO 2009/098450.

Примерами реакционноспособных групп природных аминокислот является тиоловая группа цистеина, аминогруппа лизина, карбоксильная группа аспартата или глутамата, гуанидиниевая группа аргинина, фенольная группа тирозина или гидроксильная группа серина. Неприродные аминокислоты могут обеспечивать широкий спектр реакционноспособных групп, включая азидную, кето-карбонильную, алкиновую, винильную или арилгалидную группу. Аминогруппа и карбоксильная группа концов полипептида также могут служить в качестве реакционноспособных групп для образования ковалентных связей с молекулярным каркасом/молекулярным кором.

Полипептиды по изобретению содержат по меньшей мере три реакционноспособных группы. Указанные полипептиды также могут содержать четыре или более реакционноспособных группы. Чем больше реакционноспособных групп используют, тем больше петель может образовываться на молекулярном каркасе.

В предпочтительном варианте осуществления получают полипептиды с тремя реакционноспособными группами. В реакции указанных полипептидов с молекулярным каркасом/молекулярным кором, имеющим трехмерную вращательную симметрию, образуется один изомер продукта. Образование одного изомера продукта является благоприятным по нескольким причинам. Нуклеиновые кислоты из библиотек соединений кодируют только первичные последовательности полипептида, но не изомерные состояния молекул, образующиеся после реакции полипептида с молекулярным кором. Если может образовываться только один изомер продукта, четко определено присвоение нуклеиновой кислоты изомеру продукта. Если образуется множество изомеров продуктов, из нуклеиновой кислоты нельзя получить информацию о природе изомера продукта, который выделили при скрининге или селекции. Образование одного изомера продукта также является благоприятным, если синтезируют конкретного члена библиотеки по изобретению. В этом случае в химической реакции полипептида с молекулярным каркасом получают один изомер продукта, а не смесь изомеров.

В другом варианте осуществления получают полипептиды с четырьмя реакционноспособными группами. В реакции указанных полипептидов с молекулярным каркасом/молекулярным кором, имеющим тетраэдрическую симметрию, получают два изомера продукта. Даже если два разных изомера продукта кодируются одной и той же нуклеиновой кислотой, изомерную природу выделенного изомера можно определять посредством химического синтеза обоих изомеров, разделяя два изомера и тестируя оба изомера на связывание с лигандом-мишенью.

В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна из реакционноспособных групп полипептидов является ортогональной относительно остальных реакционноспособных групп. Использование ортогональных реакционноспособных групп позволяет нацеливать указанные ортогональные реакционноспособные группы на специфические участки молекулярного кора. Стратегии связывания, включающие ортогональные реакционноспособные группы, можно использовать для ограничения количества образующихся изомеров продукта. Другими словами, выбирая отличающиеся или разные реакционноспособные группы для одной или более из по меньшей мере трех связей в зависимости от выбранных для остальных из по меньшей мере трех связей, можно эффективно достигать конкретного порядка связывания или нацеливания специфических реакционноспособных групп полипептида на конкретные положения на молекулярном каркасе.

В другом варианте осуществления реакционноспособные группы полипептида по изобретению подвергают реакцию с молекулярными линкерами, где указанные линкеры могут реагировать с молекулярным каркасом таким образом, что линкер будет встраиваться между молекулярным каркасом и полипептидом в конечном связанном состоянии.

В некоторых вариантах осуществления аминокислоты членов библиотек или наборов полипептидов можно заменять любой природной или неприродной аминокислотой. Из этих заменяемых аминокислот исключены аминокислоты, несущие функциональные группы для перекрестной сшивки полипептидов с молекулярным кором, таким образом, что петлевые последовательности в отдельности являются заменяемыми. Заменяемые полипептидные последовательности имеют случайные последовательности, константные последовательности или последовательности со случайными и константными аминокислотами. Аминокислоты с реакционноспособными группами локализуются в определенных положениях в полипептиде, т.к. положение этих аминокислот определяет размер петли.

В одном из вариантов осуществления полипептид с тремя реакционноспособными группами имеет последовательность $(X)_l Y(X)_m Y(X)_n Y(X)_o$, где Y представляет собой аминокислоту с реакционноспособной группой, X представляет собой случайную аминокислоту, m и n являются числами от 3 до 6, определяющими длину промежуточных полипептидных сегментов, которые могут являться одинаковыми или разными, и l и o являются числами от 0 и 20, определяющими длину фланкирующих полипептидных сегментов.

Альтернативы тиол-опосредованной конъюгации можно использовать для присоединения молекулярного каркаса к пептиду посредством ковалентных взаимодействий. Альтернативно, эти способы можно использовать в модификации или присоединении дополнительных остатков (таких как интересующие низкомолекулярные соединения, отличающиеся от молекулярного каркаса) к полипептиду после селекции или выделения по настоящему изобретению, в этом варианте осуществления очевидно, что присоединения может не являть ковалентным и может включать нековалентное присоединение. Эти способы можно использовать вместо (или в комбинации с) тиол-опосредованными способами, получая фага, экспонирующего белки и пептиды, несущие неприродные аминокислоты с необходимыми химическими реакционноспособными группами, в комбинации с низкомолекулярными соединениями, несущими комплементарную реакционноспособную группу, или посредством встраивания неприродных аминокислот в химически или рекомбинантно синтезированный полипептид, когда молекулу получают после фазы селекции/выделения. Дополнительные подробности можно найти в WO 2009/098450 или Heinis *et al.*, *Nat Chem Biol* **2009**, 5 (7), 502-7.

В одном из вариантов осуществления реакционноспособные группы выбраны из остатков цистеина, 3-меркаптопропионовой кислоты и/или цистеамина.

Фармацевтически приемлемые соли

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

Соли по настоящему изобретению можно синтезировать из родительского соединения, содержащего основной или кислый остаток, общепринятыми химическими способами, такими как способы, описанные в *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002. Как правило, такие соли можно получать посредством реакции форм свободной кислоты или основания этих соединений с подходящим основанием или кислотой в воде или органическом растворителе или их смеси.

Кислые соли присоединения (моно- или двухвалентные соли) можно получать с использованием широкого спектра кислот, неорганических и органических. Примеры кислых солей присоединения включают моно- или двухвалентные соли, полученные с использованием кислоты, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацетамидобензойной, бутановой, (+) камфорной, камфор-сульфоновой, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламиновой, додецилсурной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, фумаровой, галактаровой, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α -оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, галогенводородных кислот (например, бромистоводородной, соляной, йодистоводородной), изэтионовой, молочной (например, (+)-L-молочной, (\pm)-DL-

молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, (±)-DL-миндальной, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, щавелевой, пальмитиновой, памовой, фосфорной, пропионовой, пировиноградной, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-амино-салициловой, себациновой, стеариновой, янтарной, серной, таниновой, (+)-L-винной, тиоциановой, *p*-толуолсульфоновой, ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированных аминокислот и катионообменных смол.

Конкретная группа солей состоит из солей, полученных из уксусной, соляной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной, молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изэтионовой, фумаровой, бензолсульфоновой, толуолсульфоновой, серной, метансульфоновой (мезилат), этансульфоновой, нафталинсульфоновой, валериановой, пропионовой, бутановой, малоновой, глюкуроновой и лактобионовой кислот. Конкретной солью является гидрохлорид. Другой конкретной солью является ацетат.

Если соединение является анионным или имеет функциональную группу, которая может являться анионной (например, -COOH может являться -COO⁻), то соль можно получать с использованием органического или неорганического основания, образующего подходящий катион. Неограничивающие примеры подходящих неорганических катионов включают ионы щелочных металлов, такие как Li⁺, Na⁺ и K⁺, катионы щелочноземельных металлов, такие как Ca²⁺ и Mg²⁺, и другие катионы, такие как Al³⁺ или Zn⁺. Неограничивающие примеры подходящих органических катионов включают ион аммония (т.е. NH₄⁺) и ионы замещенного аммония (например, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Примерами некоторых подходящих ионов замещенного аммония являются ионы, полученные с помощью: метиламина, этиламина, диэтиламина, пропиламина, дидецилогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглюмина и трометамина, а также аминокислоты, такие как лизин и аргинин. Примером распространенного иона четвертичного аммония является N(CH₃)₄⁺.

Если соединения по изобретению содержат функциональную аминогруппу, они могут образовывать четвертичные соли аммония, например, в результате реакции с алкилирующим средством способами, хорошо известными специалисту в этой области. Такие четвертичные соединения аммония входят в объем изобретения.

Модифицированные производные

Следует понимать, что модифицированные производные пептидных лигандов, как определено в настоящем описании, входят в объем настоящего изобретения. Примеры таких подходящих модифицированных производных включают одну или более модификаций, выбранных из: N-концевых и/или C-концевых модификаций; замены одного или более аминокислотных остатков одним или более неприродными аминокислотными остатками (такой как замена одного или более полярных аминокислотных остатков одной

или более изостерическими или изоэлектронными аминокислотами; замена одного или более неполярных аминокислотных остатков другими неприродными изостерическими или изоэлектронными аминокислотами); добавления спейсерной группы; замены одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или более резистентными к окислению аминокислотными остатками; замены одного или более аминокислотных остатков аланином, замены одного или более L-аминокислотных остатков одним или более D-аминокислотными остатками; N-алкилирования одной или более амидных связей в бициклическом пептидном лиганде; замены одной или более пептидных связей суррогатной связью; модификации длины пептидного остова; замены водорода на альфа-углероде одного или более аминокислотных остатков другой химической группой, модификацию аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат/аспарат и тирозин, с использованием подходящих амин-, тиол-, карбокси- и фенол-реактивных реагентов для функционализации указанных аминокислот и встраивания или замены аминокислот, позволяющих встраивать ортогональные реакционноспособные группы, подходящие для функционализации, например, несущие азидную или алкиновую группу аминокислоты, делающие возможной функционализацию с использованием алкин- или азид-несущих остатков, соответственно.

В одном из вариантов осуществления модифицированное производное содержит N-концевую и/или C-концевую модификацию. В дополнительном варианте осуществления модифицированное производное содержит N-концевую модификацию благодаря использованию подходящей аминореактивной химии и/или C-концевую модификацию благодаря использованию подходящей карбоксиреактивной химии. В дополнительном варианте осуществления указанная N-концевая или C-концевая модификация включает добавление эффекторной группы, включая, в качестве неограничивающих примеров, цитотоксическое средство, радиохелатор или хромофор.

В дополнительном варианте осуществления модифицированное производное содержит N-концевую модификацию. В дополнительном варианте осуществления N-концевая модификация содержит N-концевую ацетильную группу. В этом варианте осуществления N-концевую группу цистеина (группу, обозначаемую в настоящем описании как C₁) кэпируют уксусным ангидридом или другими подходящими реагентами во время пептидного синтеза, что приводит к получению молекулы, ацетилированной на N-конце. Этот вариант осуществления обладает преимуществом удаления потенциальной точки распознавания для аминопептидаз и избегания потенциальной деградации бициклического пептида.

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

В дополнительном варианте осуществления модифицированное производное содержит C-концевую модификацию. В дополнительном варианте осуществления C-концевая модификация включает амидную группу. В этом варианте осуществления C-

концевую группу цистеина (группу, обозначаемую в настоящем описании как C_{iii}) синтезируют в виде амида во время пептидного синтеза, что приводит к получению молекулы, амидированной по С-концу. Этот вариант осуществления обладает преимуществом удаления потенциальной точки распознавания для карбоксипептидаз и снижает вероятность протеолитической деградации бициклического пептида.

В одном из вариантов осуществления модифицированное производное включает замену одного или более аминокислотных остатков одним или более неприродными аминокислотными остатками. В этом варианте осуществления можно выбирать неприродные аминокислоты, имеющие изостерические/изоэлектронные боковые цепи, нераспознаваемые вызывающими деградацию протеазами и неимеющие какого-либо неблагоприятного эффекта в отношении активности для мишени.

Альтернативно, можно использовать неприродные аминокислоты, имеющие затрудненные боковые цепи аминокислот, таким образом, что протеолитический гидролиз ближайшей пептидной связи конформационно и стерически заблокирован. В частности, это касается аналогов пролина, объемных боковых цепей, C α -дизамещенных производных (например, аминокислоты, Aib) и циклоаминокислот, где простым производным является аминокислота циклопропилкарбоновая кислота.

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

В одном из вариантов осуществления модифицированное производное включает замену одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или более резистентными к окислению аминокислотными остатками. В дополнительном варианте осуществления модифицированное производное включает замену остатка триптофана остатком нафтилаланина или аланина. Этот вариант осуществления обладает преимуществом улучшения профиля фармацевтической стабильности получаемого бициклического пептидного лиганда.

В одном из вариантов осуществления модифицированное производное включает замену одного или более заряженных аминокислотных остатков одним или более гидрофобными аминокислотными остатками. В альтернативном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более гидрофобных аминокислотных остатков одним или более заряженными аминокислотными остатками. Правильный баланс заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков является важной характеристикой бициклических пептидных лигандов. Например, гидрофобные аминокислотные остатки влияют на степень связывания белков плазмы и, таким образом, концентрацию свободной доступной фракции в плазме, в то время как заряженные аминокислотные остатки (в частности, аргинин) могут влиять на взаимодействие пептида с фосфолипидными мембранами на поверхности клеток. Эти два фактора в комбинации могут влиять на время полужизни, объем распределения и воздействие пептидного

лекарственного средства, и их можно адаптировать в соответствии с клинической конечной точкой. Кроме того, правильная комбинация и количество заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков могут уменьшать раздражение в участке инъекции (если пептидное лекарственное средство вводят подкожно).

В одном из вариантов осуществления модифицированное производное включает замену одного или более L-аминокислотных остатков одним или более D-аминокислотными остатками. Считают, что этот вариант осуществления повышает протеолитическую стабильность посредством стерического затруднения и склонности D-аминокислот стабилизировать конформации β -изгиба (Tugyi *et al.* (2005) PNAS, 102(2), 413-418).

В одном из вариантов осуществления модифицированное производное включает удаление любых аминокислотных остатков и замену аланинами. Этот вариант осуществления обладает преимуществом удаления потенциальных участков протеолитического воздействия.

Следует отметить, что каждая из указанных выше модификаций служит для умышленного улучшения активности или стабильности пептида. Дополнительного улучшения активности на основе модификаций можно достигать с помощью следующих механизмов:

- Включение гидрофобных остатков, в которых используют гидрофобный эффект, что приводит к более низким скоростям обратной реакции таким образом, что достигают более высоких аффинностей;

- Включение заряженных групп, в которых используют дальнедействующие ионные взаимодействия, что приводит к более высоким скоростям прямой реакции и более высоким аффинностям (см., например, Schreiber *et al.*, *Rapid, electrostatically assisted association of proteins* (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31); и

- Включение дополнительного затруднения в пептид, например, с помощью затрудняющих боковых цепи аминокислот таким образом, что потеря энтропии является минимальной после связывания мишени, затрудняя торсионные углы остова таким образом, что потеря энтропии является минимальной после связывания мишени, и включая дополнительные циклизации в молекулу по тем же причинам (см. обзор в Gentilucci *et al.*, Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203, и Nestor *et al.*, Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418).

Изотопные варианты

Настоящее изобретение относится ко всем фармацевтически приемлемым меченым радиоактивными изотопами пептидным лигандам по изобретению, где один или более атомов заменены атомами, имеющими то же атомное число, но атомную массу или массовое число, отличающиеся от атомной массы или массового числа, как правило, обнаруживаемого в природе, и пептидным лигандам по изобретению, где присоединяют металл-хелатирующие группы (обозначаемые как "эффектор"), способные удерживать соответствующие радиоактивные изотопы, и пептидным лигандам по изобретению, где

некоторые функциональные группы ковалентно заменены соответствующими радиоактивными изотопами или изотопно мечеными функциональными группами.

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

Некоторые изотопно меченые пептидные лиганды по изобретению, например, включающие радиоактивный изотоп, можно использовать в исследованиях распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях и клинической оценки наличия и/или отсутствия мишени нектин-4 на пораженных тканях. Пептидные лиганды по изобретению дополнительно могут иметь значимые диагностические свойства, состоящие в том, что их можно использовать для детекции или идентификации образования комплекса между меченым соединением и другими молекулами, пептидами, белками, ферментами или рецепторами. В способах детекции или идентификации можно использовать соединения, меченые средствами мечения, такие как радиоактивные изотопы, ферменты, флуоресцентные вещества, светящиеся вещества (например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин и люцифераза) и т.д. Радиоактивные изотопы тритий, т.е. ^3H (T), и углерод-14, т.е. ^{14}C , особенно пригодны для этой цели из-за простоты включения и готовых средств детекции.

Замена более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, т.е. ^2H (D), может привести к некоторым терапевтическим преимуществам, являющимся результатом более высокой метаболической стабильности, например, повышенного времени полужизни *in vivo* или сниженным требованиям к дозе, и, таким образом, может являться предпочтительной в некоторых обстоятельствах.

Замену позитронно-активными изотопами, такими как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , можно использовать в исследованиях с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) для исследования занятости мишени.

Изотопно меченые соединения пептидные лиганды по изобретению, как правило, можно получать общепринятыми способами, известными специалистам в этой области, или способами, аналогичными описанным в сопутствующих примерах, с использованием подходящего изотопно меченого реагента вместо ранее используемого немеченого реагента.

Молекулярный каркас

Молекулярные каркасы описаны, например, в WO 2009/098450 и цитируемых в них ссылках, в частности, WO 2004/077062 и WO 2006/078161.

Как указано в приведенных выше ссылках, молекулярный каркас может являться низкомолекулярным соединением, таким как небольшая органическая молекула.

В одном из вариантов осуществления молекулярный каркас может являться

макромолекулой. В одном из вариантов осуществления молекулярный каркас является макромолекулой, состоящей из аминокислот, нуклеотидов или углеводов.

В одном из вариантов осуществления молекулярный каркас содержит реакционноспособные группы, способные реагировать с функциональными группами полипептида с образованием ковалентных связей.

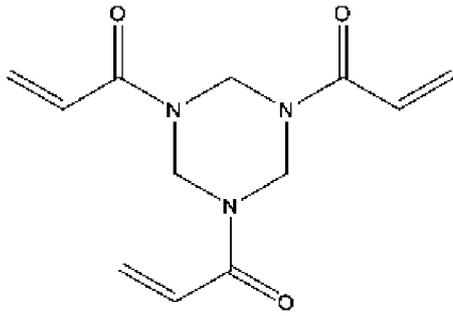
Молекулярный каркас может содержать химические группы, образующие связь с пептидом, такими как амины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, нитрилы, карбоновые кислоты, сложные эфиры, алкены, алкины, азиды, ангидриды, сукцинимиды, малеимиды, алкилгалиды и ацилгалиды.

Молекулярный каркас по изобретению содержит химические группы, позволяющие функциональным группам полипептида из кодируемой библиотеки по изобретению образовывать ковалентные связи с молекулярным каркасом. Указанные химические группы выбраны из широкого спектра функциональных групп, включая амины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, нитрилы, карбоновые кислоты, сложные эфиры, алкены, алкины, ангидриды, сукцинимиды, малеимиды, азиды, алкилгалиды и ацилгалиды.

Реакционноспособными группами каркаса, которые можно использовать на молекулярном каркасе для реакции с тиольными группами цистеинов, являются алкилгалиды (или также названные галогеноалканами или галоалканами).

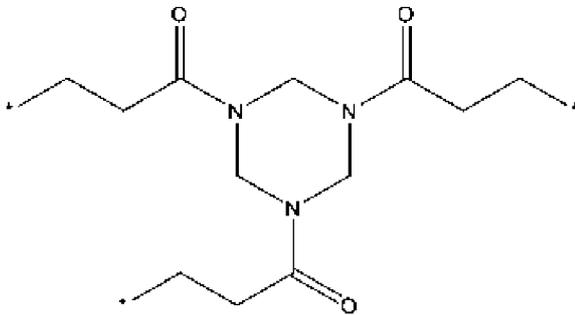
Примеры включают бромметилбензол (реакционноспособная группа каркаса, примером которой является ТВМВ) или йодацетамид. Другими реакционноспособными группами каркаса, которые используют для селективного связывания соединений с цистеинами в белках, являются малеимиды, соединения, содержащие α -ненасыщенный карбонил, и соединения, содержащие α -галометилкарбонил. Примеры малеимидов, которые можно использовать в качестве молекулярных каркасов в изобретении, включают: трис-(2-малеимидоэтил)амин, трис-(2-малеимидоэтил)бензол, трис-(малеимидо)бензол. Примером соединения, содержащего α -ненасыщенный карбонил, является 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) (*Angewandte Chemie, International Edition* (2014), 53(6), 1602-1606). Примером соединения, содержащего α -галометилкарбонил, является N,N',N''-(бензол-1,3,5-триил)трис(2-бромацетамид). Селеноцистеин также является природной аминокислотой, имеющей схожую реакционную способность в отношении цистеина, и его можно использовать для тех же реакций. Таким образом, если упомянут цистеин, как правило, приемлемо заменять его селеноцистеином, если контекст не указывает на иное.

В одном из вариантов осуществления молекулярный каркас является 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-оном (также известным как триакрилоилгексагидро-*s*-триазин (ТАТА)):



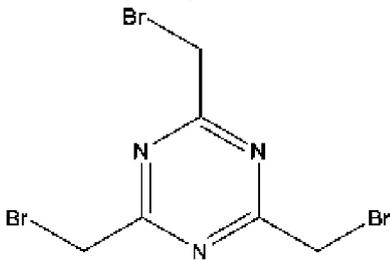
TATA

Таким образом, после циклизации с бициклическими пептидами по изобретению на остатках цистеина C_i, C_{ii} и C_{iii} молекулярный каркас образует тризамещенное 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипропан-1-оновое производное TATA, имеющее следующую структуру:



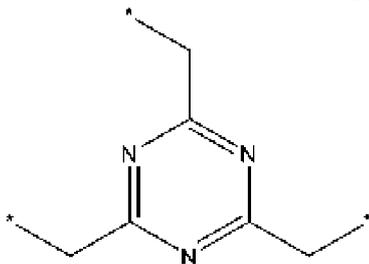
где "*" означает точку присоединения трех остатков цистеина.

В альтернативном варианте осуществления молекулярный каркас является 2,4,6-трис(бромметил)-s-триазином (ТВМТ):



ТВМТ

Таким образом, после циклизации с бициклическими пептидами по изобретению на остатках цистеина C_i, C_{ii} и C_{iii} молекулярный каркас образует тризамещенное производное ТВМТ, имеющее следующую структуру:



где "*" означает точку присоединения трех остатков цистеина.

Синтез

Пептиды по настоящему изобретению можно производить синтетически стандартными способами с последующей реакцией с молекулярным каркасом *in vitro*. При осуществлении этого можно использовать стандартную химию. Это делает возможным быстрое крупномасштабное получение растворимого материала для последующих экспериментов или валидации. Такие способы можно осуществлять с использованием общепринятой химии, такой как описываемая в Timmerman *et al.* (выше).

Таким образом, изобретение также относится к производству полипептидов или конъюгатов, выбранных, как указано в настоящем описании, где производство включает необязательные дополнительные стадии, описанные ниже. В одном из вариантов осуществления эти стадии осуществляют в отношении конечного продукта полипептида/конъюгата, полученного посредством химического синтеза.

Необязательно, аминокислотные остатки в интересующем полипептиде можно заменять при производстве конъюгата или комплекса.

Пептиды также можно удлинять для включения, например, другой петли, и, таким образом, добавлять множество специфичностей.

В случае удлинения пептида, его можно просто удлинять химически на N-конце или C-конце или в петлях с использованием ортогонально защищенных лизинов (и аналогов) с использованием стандартной твердофазной или жидкофазной химии. Можно использовать стандартные способы биоконъюгации (для встраивания активированного или активируемого N- или C-конца. Альтернативно, можно осуществлять добавления посредством конденсации фрагментом или нативного химического лигирования, например, как описано в (Dawson *et al.* 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science 266:776-779), или с помощью ферментов, например с использованием субтилигазы, как описано в (Chang *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 20; 91(26):12544-8 или Hikari *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003).

Альтернативно, пептиды можно удлинять или модифицировать посредством дополнительной конъюгации с помощью дисульфидных связей. Это обладает дополнительным преимуществом, заключающимся в том, что первый и второй пептиды могут диссоциировать друг от друга после попадания в восстановительную среду клетки. В этом случае молекулярный каркас (например, ТАТА) можно добавлять во время химического синтеза первого пептида так, чтобы проводить реакцию с тремя группами цистеина; затем можно добавлять дополнительный цистеин или тиол на N- или C-конец первого пептида, таким образом, что этот цистеин или тиол реагирует только со свободным цистеином или тиолом вторых пептидов, образуя соединенный дисульфидными связями конъюгат бициклический пептид-пептид.

Схожие способы в равной степени используют в синтезе/связывании двух бициклических и биспецифических макроциклов, теоретически получая тетраспецифическую молекулу.

Кроме того, добавление других функциональных групп или эффекторных групп

можно осуществлять аналогичным образом с использованием подходящей химии, присоединяя к N- или C-концам или через боковые цепи. В одном из вариантов осуществления связывание осуществляют таким образом, что оно не блокирует активность всей молекулы.

Фармацевтические композиции

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей пептидный лиганд, как определено в настоящем описании, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Как правило, пептидные лиганды по изобретению будут использовать в очищенной форме вместе с фармакологически подходящими эксципиентами или носителями. Как правило, эти эксципиенты или носители включают водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и/или забуференные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия и лактат Рингера. Подходящие физиологически приемлемые адъюванты, при необходимости поддержания полипептидного комплекса в суспензию, можно выбирать из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

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

Пептидные лиганды по настоящему изобретению можно использовать в качестве отдельно вводимых композиций или в комбинации с другими средствами. Они могут включать антитела, фрагменты антител и различных иммунотерапевтические лекарственные средства, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин и иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать "смеси" различных цитотоксических или других средств в комбинации с белковыми лигандами по настоящему изобретению или даже комбинации выбранных полипептидов по настоящему изобретению, имеющих разные специфичности, таких как полипептиды, выбранные с использованием разных лигандов-мишеней, объединяют ли их перед введением или нет.

Путь введения фармацевтических композиций по изобретению может являться любым из известных специалистам в этой области. В случае терапии, пептидные лиганды по изобретению можно вводить любому пациенту стандартными способами. Введение можно осуществлять любым подходящим способом, включая парентеральный, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, трансдермальный, легочный путь или также, соответствующим образом, посредством прямой инфузии с помощью катетера. Предпочтительно, фармацевтические композиции по изобретению будут вводить посредством ингаляции. Доза и частота введения будут зависеть от возраста, пола и состояния пациента, сопутствующего введения других лекарственных средств,

противопоказаний и других параметров, которые должен принимать во внимание клиницист.

Пептидные лиганды по настоящему изобретению можно лиофилизировать для хранения и восстанавливать в подходящем носителе перед использованием. Показано, что этот способ эффективен, и можно использовать известные в этой области способы лиофилизации и восстановления. Специалистам в этой области следует понимать, что лиофилизация и восстановление могут приводить к различным степеням потери активности, и что может потребоваться коррекция уровней на повышение для компенсации.

Композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их смесь, можно вводить для профилактического и/или лечения. При некотором терапевтическом применении подходящее количество для осуществления по меньшей мере частичного ингибирования, супрессии, модуляции, уничтожения или некоторого другого измеримого параметра популяции выбранных клеток определяют как "терапевтически эффективную дозу". Количество, необходимое для достижения этой дозы, будет зависеть от тяжести заболевания и общего состояния иммунной системы пациента, но, как правило, находится в диапазоне от 0,005 до 5,0 мг выбранного пептидного лиганда на килограмм массы тела, при этом дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/дозу являются более общепотребительными. В случае профилактического использования композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их смеси, также можно вводить в схожих или немного более низких дозах.

Композицию, содержащую пептидный лиганд по настоящему изобретению, можно использовать в профилактических и терапевтических условиях для способствования изменению, инактивации, уничтожению или удалению выбранной популяции клеток-мишеней у млекопитающего. Кроме того, пептидные лиганды, представленные в настоящем описании, можно использовать экстракорпорально или *in vitro* селективно для уничтожения, истощения или иного эффективного удаления популяции клеток-мишеней из гетерогенного набора клеток. Крови из млекопитающего можно комбинировать экстракорпорально с выбранными пептидными лигандами, посредством чего нежелательные клетки уничтожают или иначе удаляют из крови, чтобы вернуть ее млекопитающему стандартными способами.

Терапевтическое применение

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к гетеротандемному бициклическому пептидному комплексу, как определено в настоящем описании, для применения в профилактике, супрессии или лечении злокачественного новообразования.

Примеры злокачественных новообразований (и соответствующих доброкачественных заболеваний), которые можно лечить (или ингибировать), включают, в качестве неограничивающих примеров, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциномы, плоскоклеточные карциномы, переходноклеточные карциномы и другие карциномы), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевыводящих путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (включая

пищевод, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник, прямую кишку и анус), печени (печеночноклеточную карциному), желчного пузыря и желчевыводящей системы, экзокринной части поджелудочной железы, почек, легких (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легких, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), головы и шеи (например, злокачественные новообразования языка, полости рта, гортани, глотки, носоглотки, миндалин, слюнных желез, носовой полости и придаточных пазух носа), яичника, фаллопиевых труб, брюшины, влагалища, вульвы, полового члена, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярную карциному щитовидной железы), надпочечника, предстательной железы, кожи и придатков (например, меланому, базально-клеточную карциному, плоскоклеточную карциному, кератоакантому, диспластический невус); гемобластозы (т.е. лейкозы, лимфомы), предзлокачественные гематологические нарушения и пограничные злокачественные новообразования, включая гемобластозы и родственные состояния лимфоидного ростка (например, острый лимфоцитарный лейкоз [ALL], хронический лимфоцитарный лейкоз [CLL], В-клеточные лимфомы, такие как крупноклеточная В-клеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лимфома клеток мантийной зоны, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы естественных киллеров [NK], лимфомы Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, моноклональную гаммапатию неясного генеза, плазмцитому, множественную миелому и лимфопролиферативные нарушения после трансплантации) и гемобластозы и родственные состояния миелоидного ростка (например, острый миелогенный лейкоз [AML], хронический миелогенный лейкоз [CML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелопролиферативные нарушения, такие как истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелопролиферативный синдром, миелодиспластический синдром и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимального происхождения, например, саркомы мягких, костной или хрящевой тканей, такие как остеосаркомы, фибросаркомы, хондросаркомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, саркому Капоши, саркому Юинга, синовиальные саркомы, эпителиоидные саркомы, гастроинтестинальные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные гистиоцитомы и взрывающую дерматофибросаркому; опухоли центральной или периферической нервной системы (например астроцитомы, глиомы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, опухоли эпифиза и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островков поджелудочной железы, опухоли парашитовидной железы, карциноидные опухоли и медуллярную карциному щитовидной железы); опухоли глаз и придатков (например, ретинобластому); герминомы и трофобластические опухоли (например, тератомы, семиномы, дисгерминома, пузырьный занос и хориокарциномы); и педиатрические и эмбриональные опухоли (например, медуллобластому, нейробластому, опухоль Вильмса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, делающие пациента предрасположенным

к злокачественному новообразованию (например, пигментную ксеродерму).

В дополнительном варианте осуществления злокачественное новообразование выбрано из гемобластоза, такого как выбранный из: неходжкинской лимфомы (NHL), лимфомы Беркитта (BL), множественной миеломы (MM), хронического В-клеточного лимфоцитарного лейкоза (B-CLL), острого В- и Т-клеточного лимфоцитарного лейкоза (ALL), Т-клеточной лимфомы (TCL), острого миелолейкоза (AML), волосатоклеточного лейкоза (HCL), лимфомы Ходжкина (HL) и хронического миелолейкоза (CML).

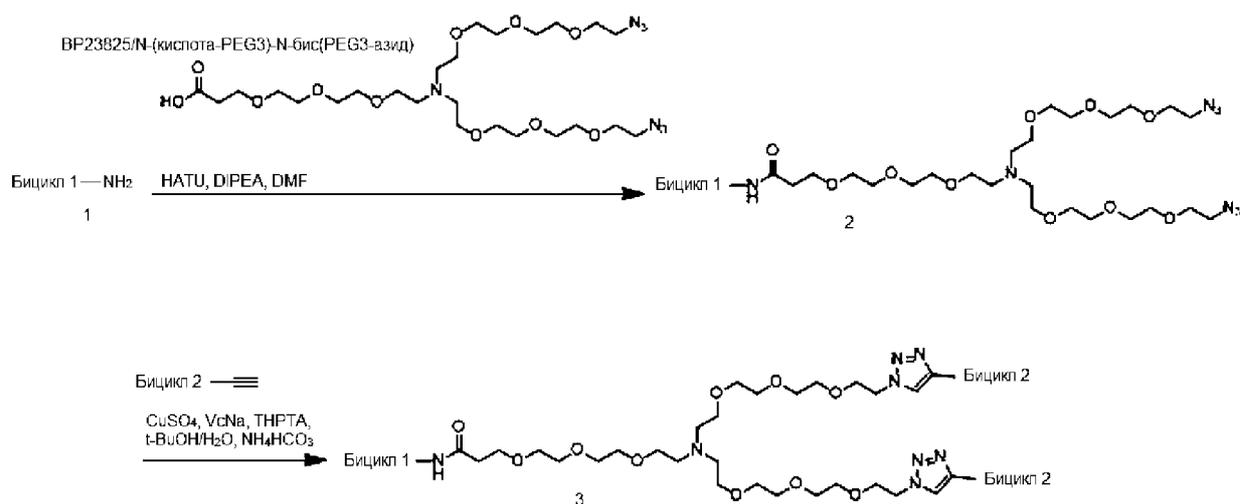
В настоящем описании ссылки на термин "профилактика" включают введение протективной композиции до возникновения заболевания. Термин "супрессия" относится к введению композиции после индуктивного события, но до клинической манифестации заболевания. Термин "лечение" включает введение протективной композиции после манифестации симптомов заболевания.

Доступны системы моделей на животных, которые можно использовать для скрининга эффективности пептидных лигандов в отношении защиты от заболевания или лечения заболевания. Использование систем моделей на животных облегчено настоящим изобретением, делающим возможным разработку полипептидных лигандов, которые могут перекрестно реагировать с мишенями человека и животных, чтобы использовать модели на животных.

Настоящее изобретение дополнительно описано ниже со ссылкой на следующие примеры.

ПРИМЕРЫ

В основном, некоторые из гетеротандемных бициклических пептидных комплексов по изобретению можно получать следующим общим способом:



Все растворители дегазируют и барботируют N₂. Раствор BP23825 (1,0 экв.), HATU (1,2 экв.) и DIPEA (2,0 экв.) в DMF смешивают в течение 5 минут, затем добавляют бицикл 1 (1,2 экв.). Реакционную смесь перемешивают при 40°C в течение 16 ч. Затем реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении для удаления растворителя и очищают посредством препаративной ВЭЖХ для получения промежуточного соединения 2.

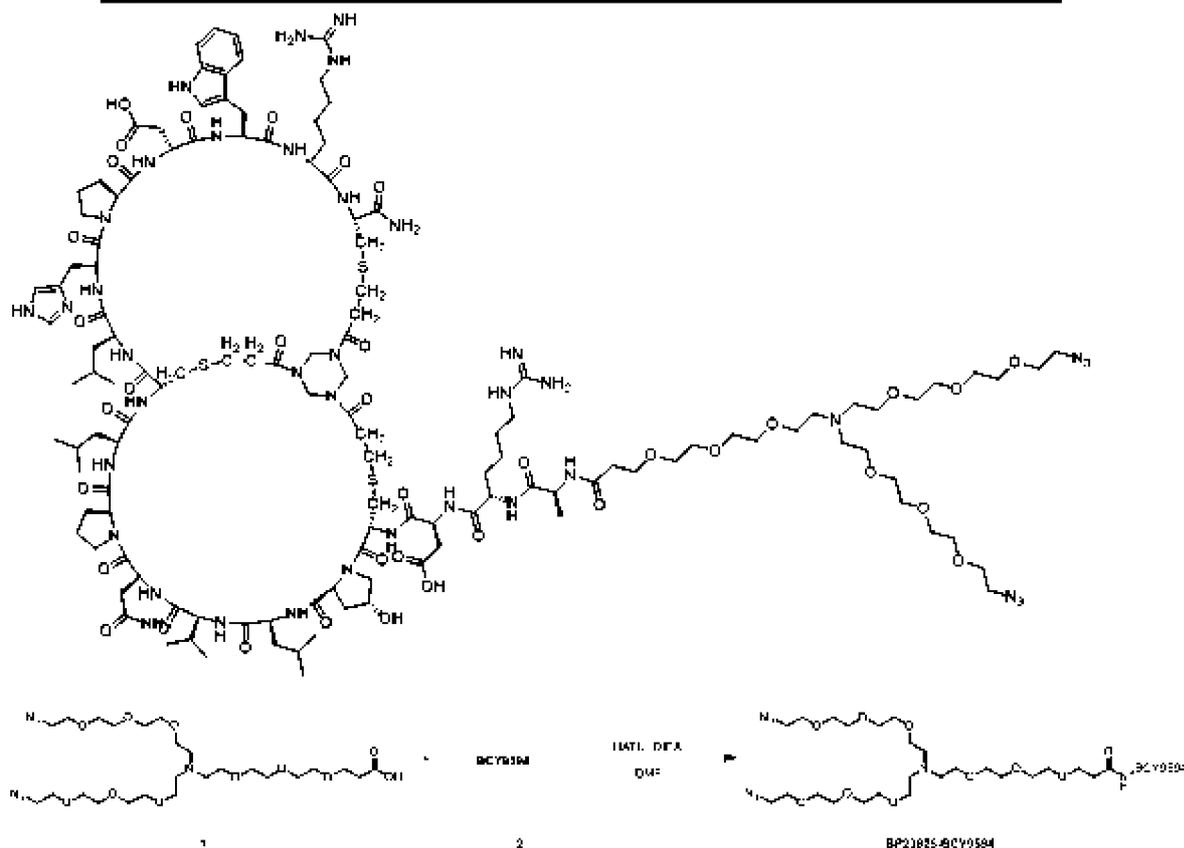
Смесь промежуточного соединения 2 (1,0 экв.) и бицикла 2 (2,0 экв.) растворяют в *t*-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляют CuSO₄ (1,0 экв.), VcNa (4,0 экв.) и ТНРТА (2,0 экв.). И наконец, добавляют 0,2 М NH₄HCO₃ для доведения pH до 8. Реакционную смесь перемешивают при 40°C в течение 16 ч. в атмосфере N₂.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

Гетеротандемные бициклические пептидные комплексы, полученные этим способом, приведены ниже:

EphA2/NKp46	EphA2/CD1 6a	PD- L1/NKp46	MT1/NKp4 6
BCY15664, BCY15923, BCY17226, BCY15924, BCY18042, BCY18048, BCY18049	BCY15911	BCY18603	BCY18604

Более подробное описание экспериментов для выбранных гетеротандемных бициклических пептидных комплексов по изобретению приведено в настоящем описании ниже:

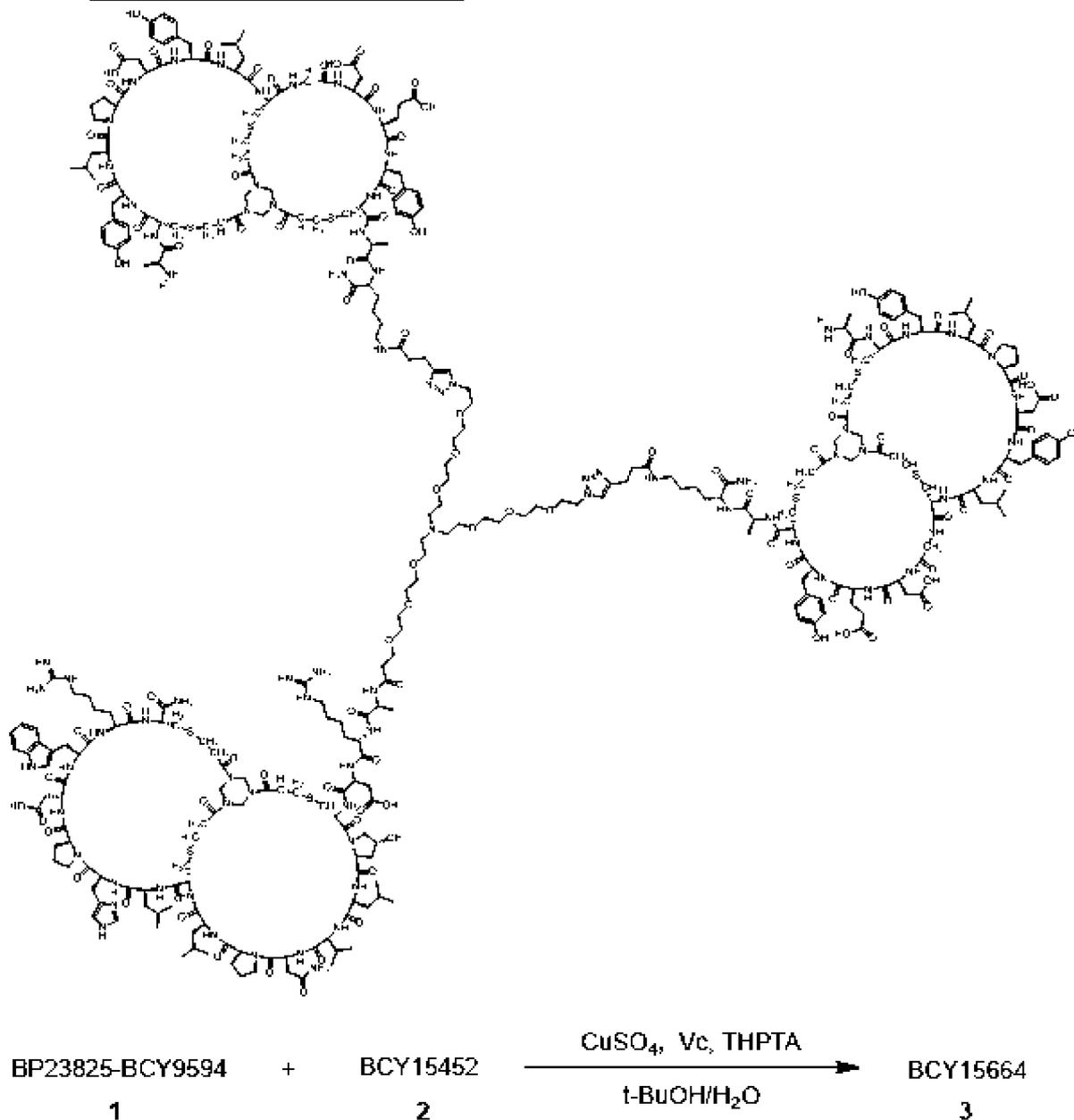
Пример 1: Синтез промежуточного соединения ВР23825-BCY9594



К смеси соединения 1 (ВР23825, 60,0 мг, 96,2 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (3 мл) добавляли DIEA (12,4 мг, 96,2 мкмоль, 16,8 мкл, 1,0 экв.) и HATU (38,4 мг, 101 мкмоль, 1,05 экв.) и перемешивали смесь в течение 5 мин. Затем в смесь добавляли BCY9594 (243 мг, 101 мкмоль, 1,05 экв.), барботируя N₂, затем перемешивали при 40°C в течение 16 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS соединение 1 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым *m/z*. Реакционную смесь очищали посредством

препаративной ВЭЖХ для получения ВР23825-ВСУ9594 (154 мг, 48,1 мкмоль, выход 50,0%, чистота 94,0%) в виде белого твердого вещества. Вычисленная MW: 3006,48, наблюдаемое m/z: 1002,8 ($[M+3H]^{3+}$), 1504,4 ($[M+2H]^{2+}$).

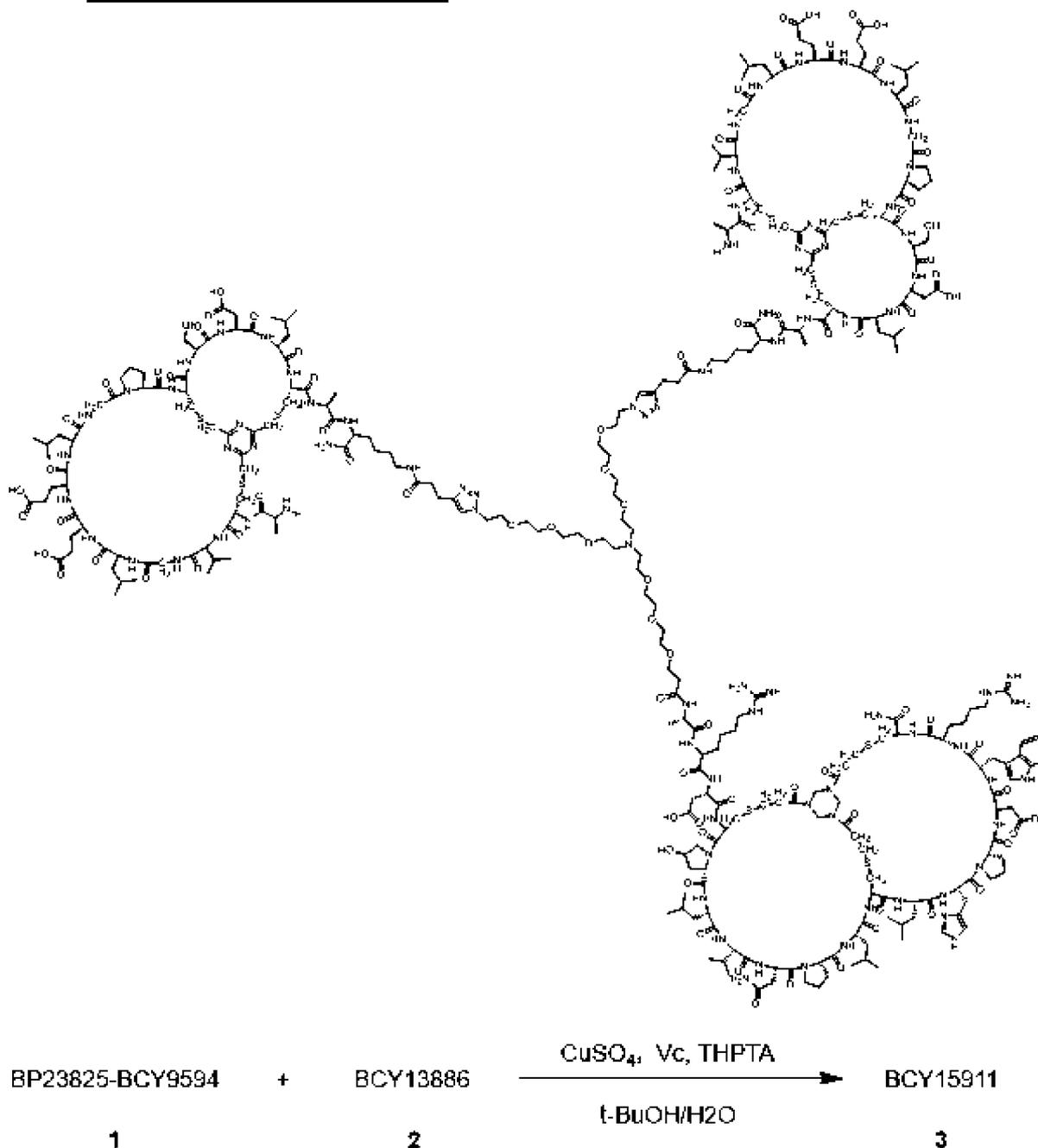
Пример 2: Синтез ВСУ15664



Смесь соединения 1 (20,0 мг, 6,65 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (30,0 мг, 13,97 мкмоль, 2,1 экв.) и THPTA (2,9 мг, 6,65 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл), который дегазировали и барботировали N₂. Добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 16,6 мкл, 1,0 экв.) и Vc (4,7 мг, 26,61 мкмоль, 4,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора довели до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS ВР23825-ВСУ9594 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z. Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворенного остатка. Неочищенный продукт очищали

посредством препаративной ВЭЖХ и получали BCY15664 (15,0 мг, 1,97 мкмоль, выход 29,6%, чистота 97,7%) в виде белого твердого вещества. Вычисленная MW: 7317,3, наблюдаемое m/z: 1220,3 ($[M+6H]^{6+}$), 915,5 ($[M+8H]^{8+}$).

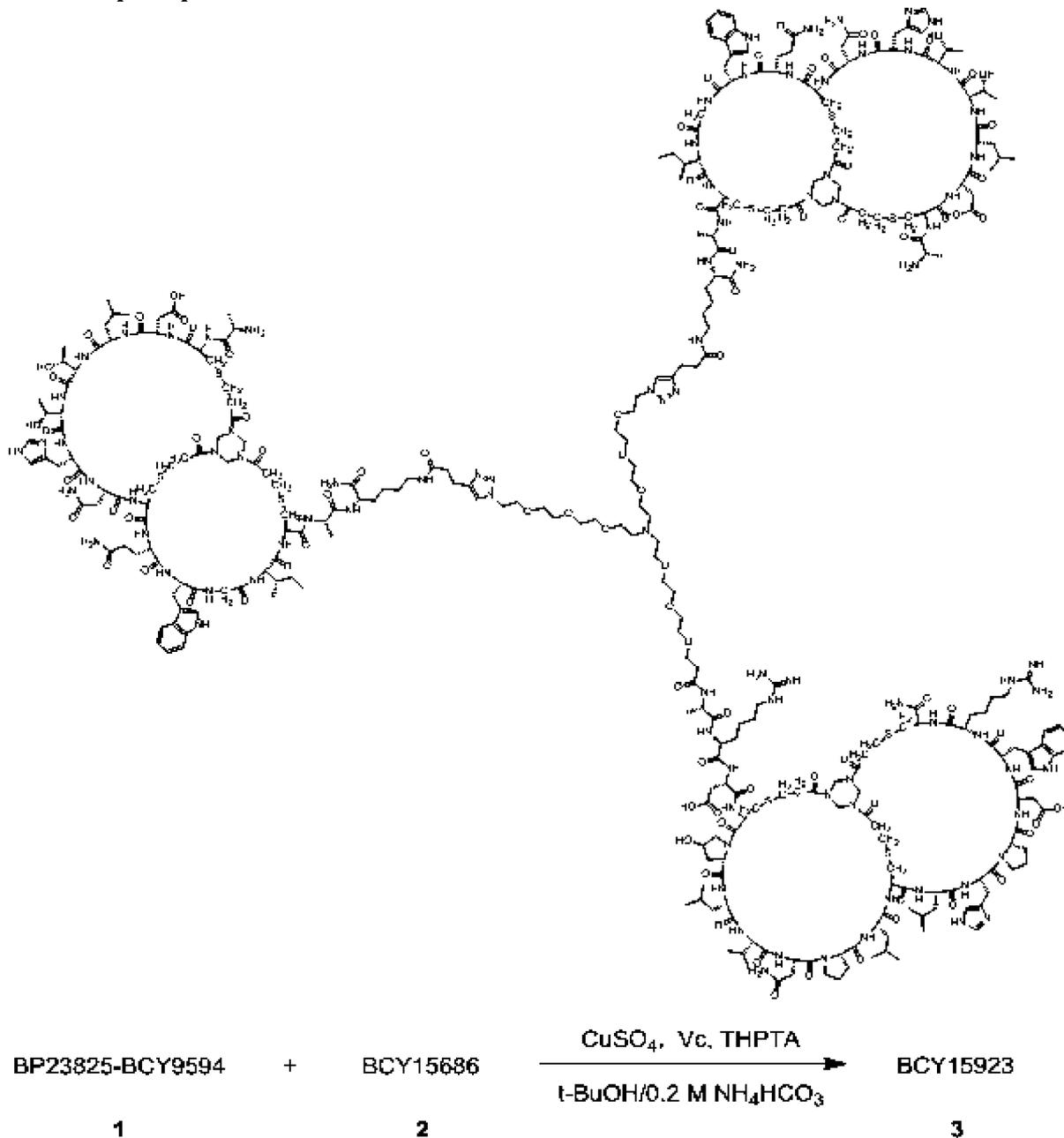
Пример 3: Синтез BCY15911



Смесь соединения 1 (20,0 мг, 6,65 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (31,6 мг, 16,63 мкмоль, 2,5 экв.) и THPTA (2,9 мг, 6,65 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл), который дегазировали и барботировали N₂. Добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 16,6 мкл, 1,0 экв.) и Vc (4,7 мг, 26,61 мкмоль, 4,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора довели до 8, и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS BP23825-BCY9594 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z. Реакционную

смесь фильтровали для удаления нерастворенного остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ и получали ВСУ15911 (10,4 мг, 1,50 мкмоль, выход 22,61%, чистота 94%) в виде белого твердого вещества. Вычисленная MW: 6814,8, наблюдаемое m/z: 1364,0 ($[M+5H]^{5+}$), 1137,0 ($[M+6H]^{6+}$).

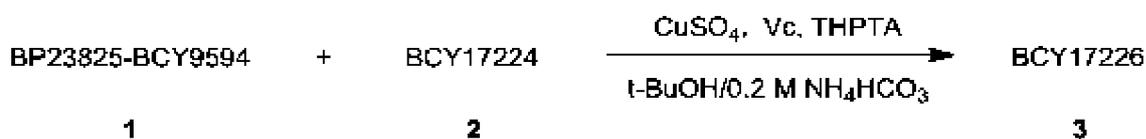
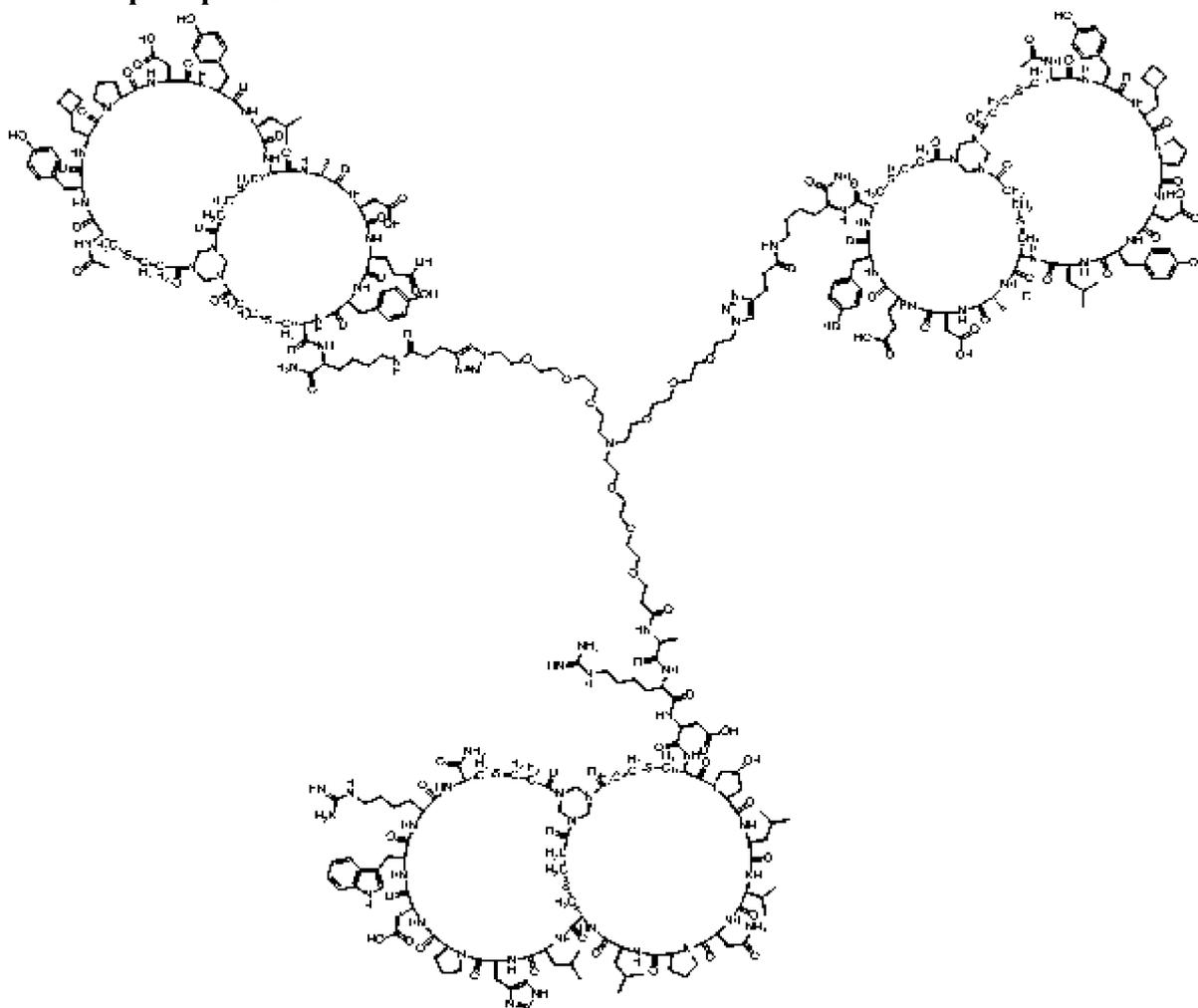
Пример 4: Синтез ВСУ15923



Смесь соединения 1 (20,0 мг, 6,65 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (35,0 мг, 16,79 мкмоль, 2,5 экв.) и THPTA (2,9 мг, 6,65 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/0,2 M NH₄HCO₃ (1:1, 1 мл), предварительно дегазированном и барботированном N₂ 3 раза, а затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 M, 16,6 мкл, 1,0 экв.) и аскорбиновой кислоты (4,69 мг, 26,61 мкмоль, 4 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора довели до 8 посредством покапельного добавления 0,2 M NH₄HCO₃, и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. в атмосфере N₂. По результатам

LC-MS соединение 1 потреблялось полностью, и определяли желаемое m/z (вычисленная MW: 7191,31, наблюдаемое m/z : 1439,3 ($[M/5+H]^+$), 1199,6 ($[M/6+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) и получали BCY15923 (4 мг, 5,28e-1 мкмоль, выход 7,94%, чистота 95%) в виде белого твердого вещества.

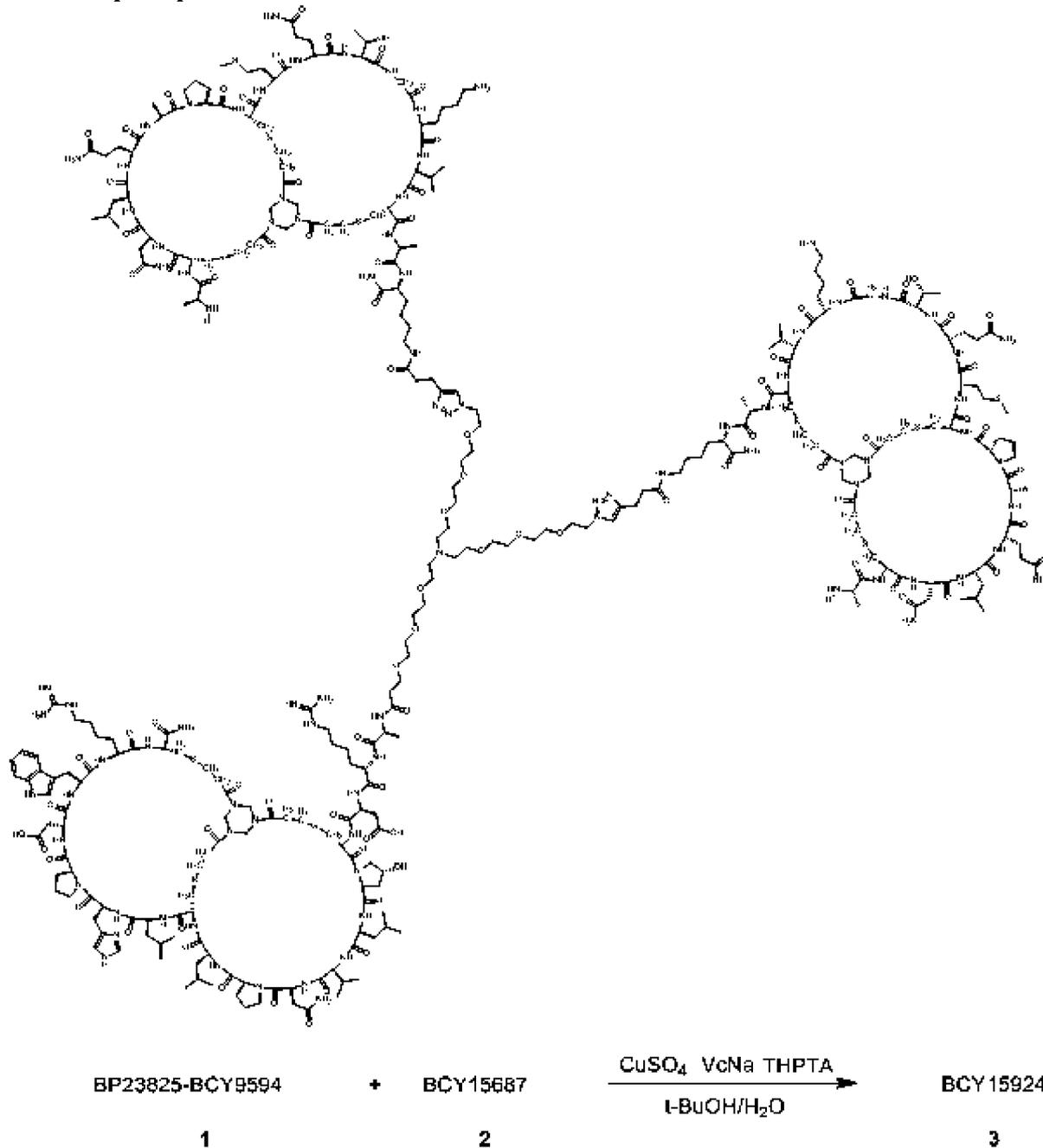
Пример 5: Синтез BCY17226



Смесь соединения 1 (20,0 мг, 6,65 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (30,5 мг, 14,64 мкмоль, 2,2 экв.) и THPTA (5,8 мг, 13,30 мкмоль, 2,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 1,0 мл, предварительно дегазированном и барботированном N₂ 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 24,9 мкл, 1,5 экв.) и VcNa (4,0 мг, 19,96 мкмоль, 3,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 0,5 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS соединение 1 потреблялось полностью, и определяли один главный пик, имеющий желаемое m/z (вычисленная MW: 7169,18, наблюдаемое m/z : 1434,9 ($[M/5+H]^+$), 1195,9

($[M/6+H]^+$). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворенного остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA), и получали ВСУ17226 (24,0 мг, 3,35 мкмоль, выход 50,32%, чистота 97,0%) в виде белого твердого вещества.

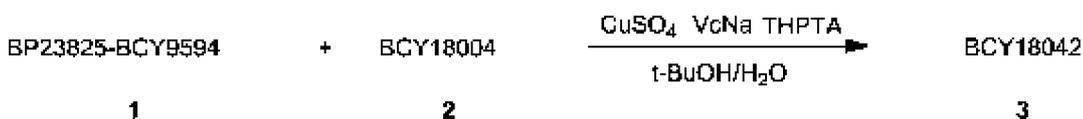
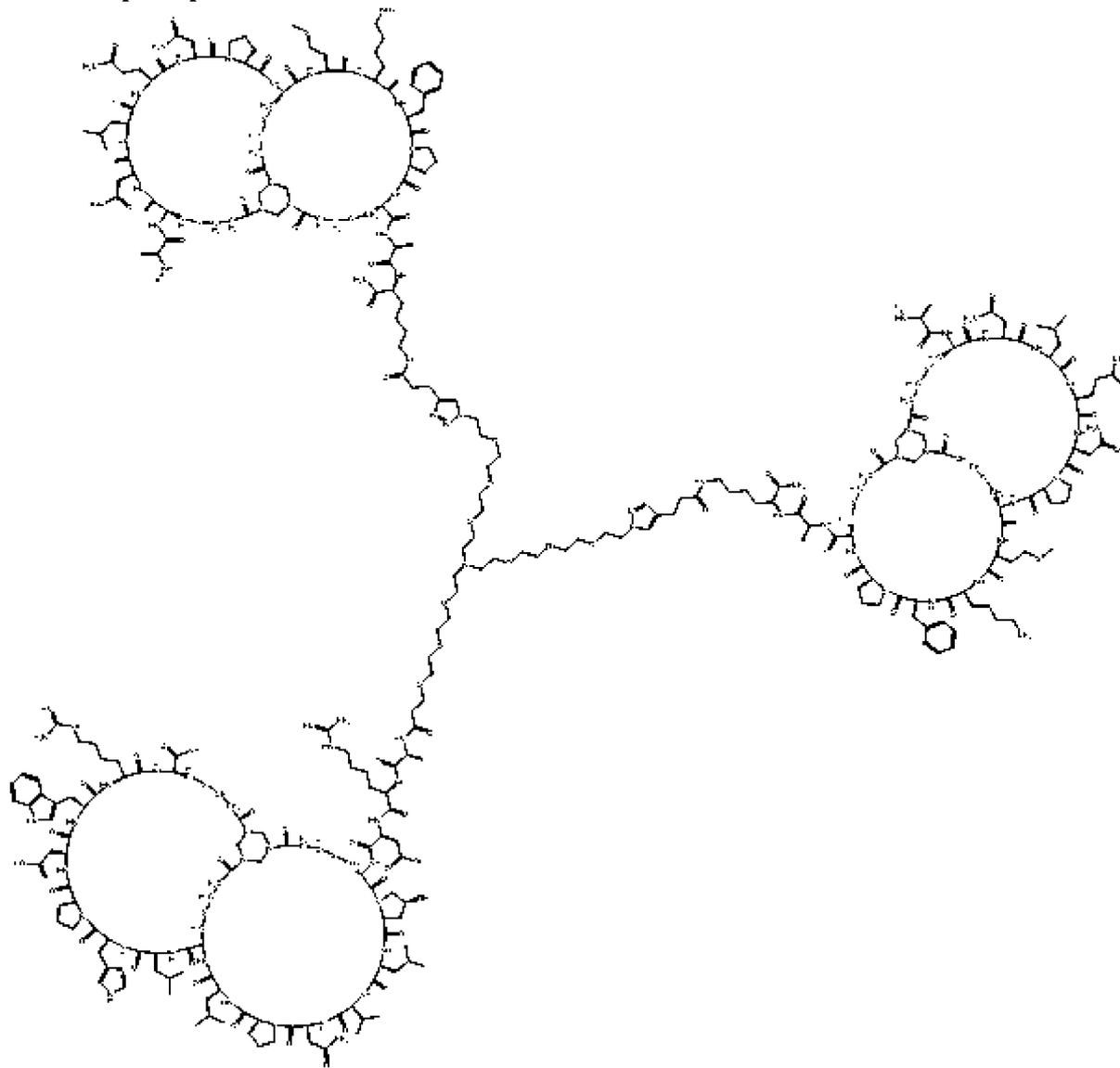
Пример 6: Синтез ВСУ15924



Смесь соединения 1 (5 мг, 1,66 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (6,97 мг, 3,33 мкмоль, 2,0 экв.) и THPTA (1,45 мг, 3,33 мкмоль, 2,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2,0 мл, предварительно дегазированном и барботированном N₂ 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 6,24 мкл, 1,5 экв.) и VcNa (988,40 мкг, 4,99 мкмоль, 3,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS

соединение 1 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z (вычисленная MW: 7195,55, наблюдаемое m/z : 1440,1 ($[M/5+H]^+$), 1200,2 ($[M/6+H]^+$), 1029,1 ($[M/7+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворенного остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA), и ВСУ15924 (3,4 мг, 4,52e-1 мкмоль, выход 27,16%, чистота 95,6%) получали в виде белого твердого вещества.

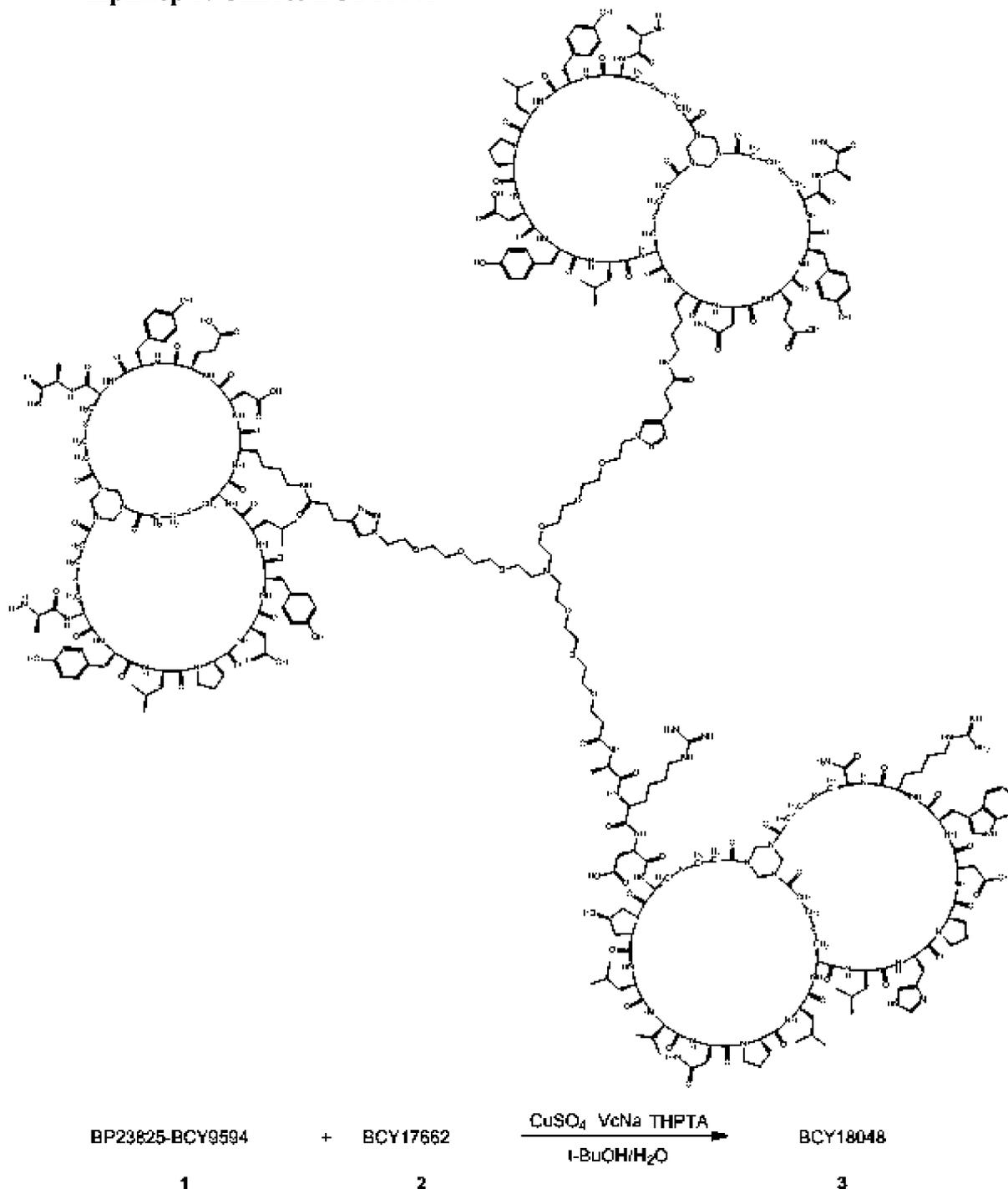
Пример 7: Синтез ВСУ18042



Смесь соединения 1 (15 мг, 4,99 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (28,08 мг, 10,48 мкмоль, 2,1 экв.) и THPTA (4,34 мг, 9,98 мкмоль, 2,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2,0 мл, предварительно дегазированном и барботированном N₂ 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 18,71 мкл, 1,5 экв.) и VcNa (2,97 мг, 14,97 мкмоль, 3,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь

перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS соединение 1 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z (вычисленная MW: 6999,35, наблюдаемое m/z: 1400,7 ([M/5+H]⁺), 1167,6 ([M/6+H]⁺), 1000,9 ([M/7+H]⁺)). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворенного остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) и получали ВСУ18042 (3,9 мг, 5,15e-1 мкмоль, выход 10,32%, чистота 96,0%) в виде белого твердого вещества.

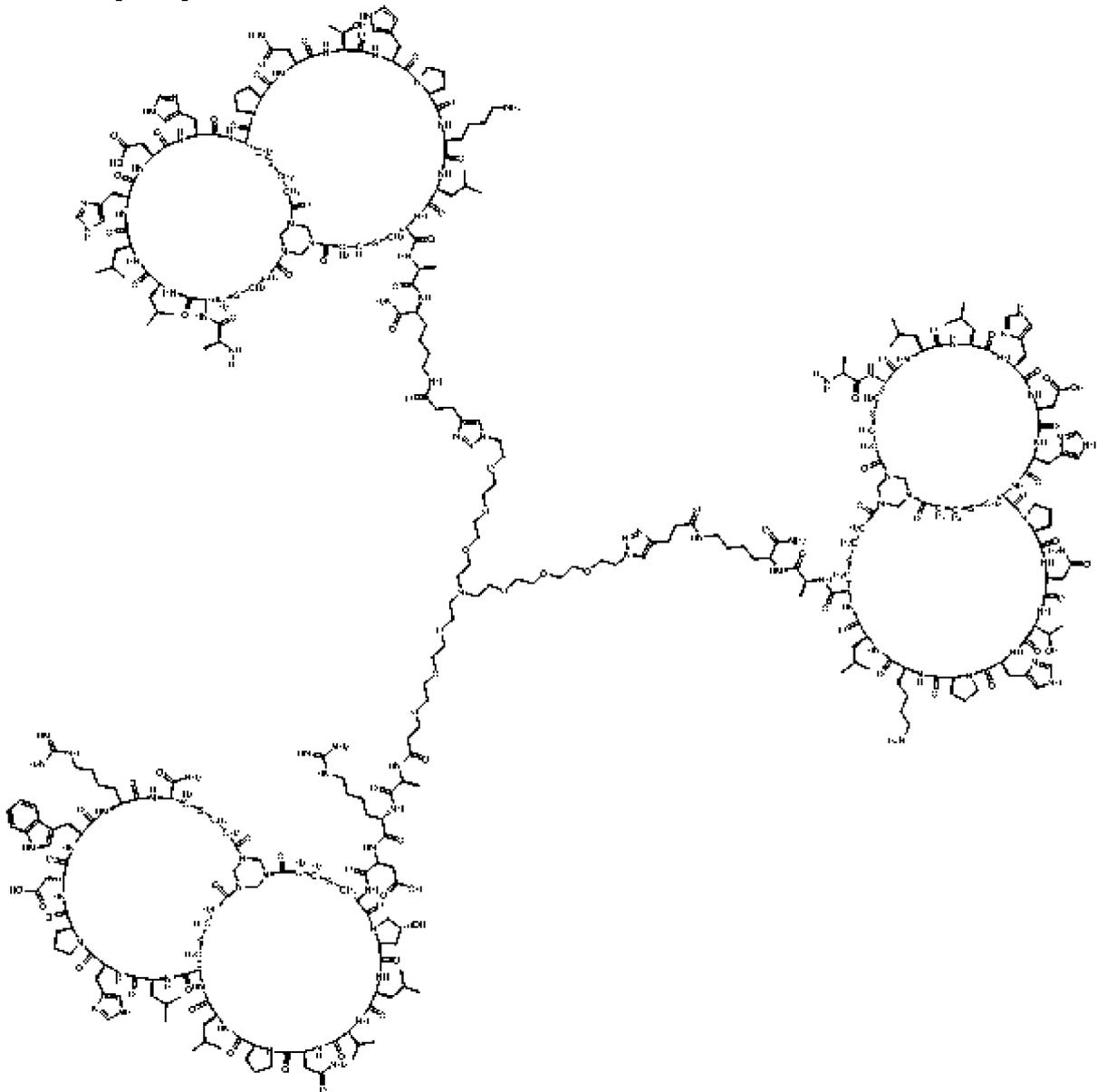
Пример 8: Синтез ВСУ18048



Смесь соединения 1 (15 мг, 4,99 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (21,99 мг, 10,48 мкмоль, 2,1 экв.) и THPTA (4,34 мг, 9,98 мкмоль, 2,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1,

2,0 мл, предварительно дегазированном и барботированном N_2 3 раза), а затем добавляли водный раствор $CuSO_4$ (0,4 M, 25,0 мкл, 2,0 экв.) и $VcNa$ (2,97 мг, 14,97 мкмоль, 3,0 экв.) в атмосфере N_2 . pH этого раствора довели до 8 посредством покапельного добавления 0,2 M NH_4HCO_3 (в 1:1 t-BuOH/ H_2O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. в атмосфере N_2 . По результатам LC-MS соединение 1 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z (вычисленная MW: 7203,30, наблюдаемое m/z: 1441,3 ($[M/5+H]^+$), 1201,3 ($[M/6+H]^+$), 901,7 ($[M/8+H]^+$)). реакцию смесь фильтровали для удаления нерастворенного остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) и получали BCY18048 (7,4 мг, 9,85e-1 мкмоль, выход 19,74%, чистота 97,4%) в виде белого твердого вещества.

Пример 9: Синтез BCY18049



BP23825-BCY9594

+

BCY18005

$CuSO_4$ $VcNa$ $THPTA$
 $t-BuOH/H_2O$

BCY18049

1

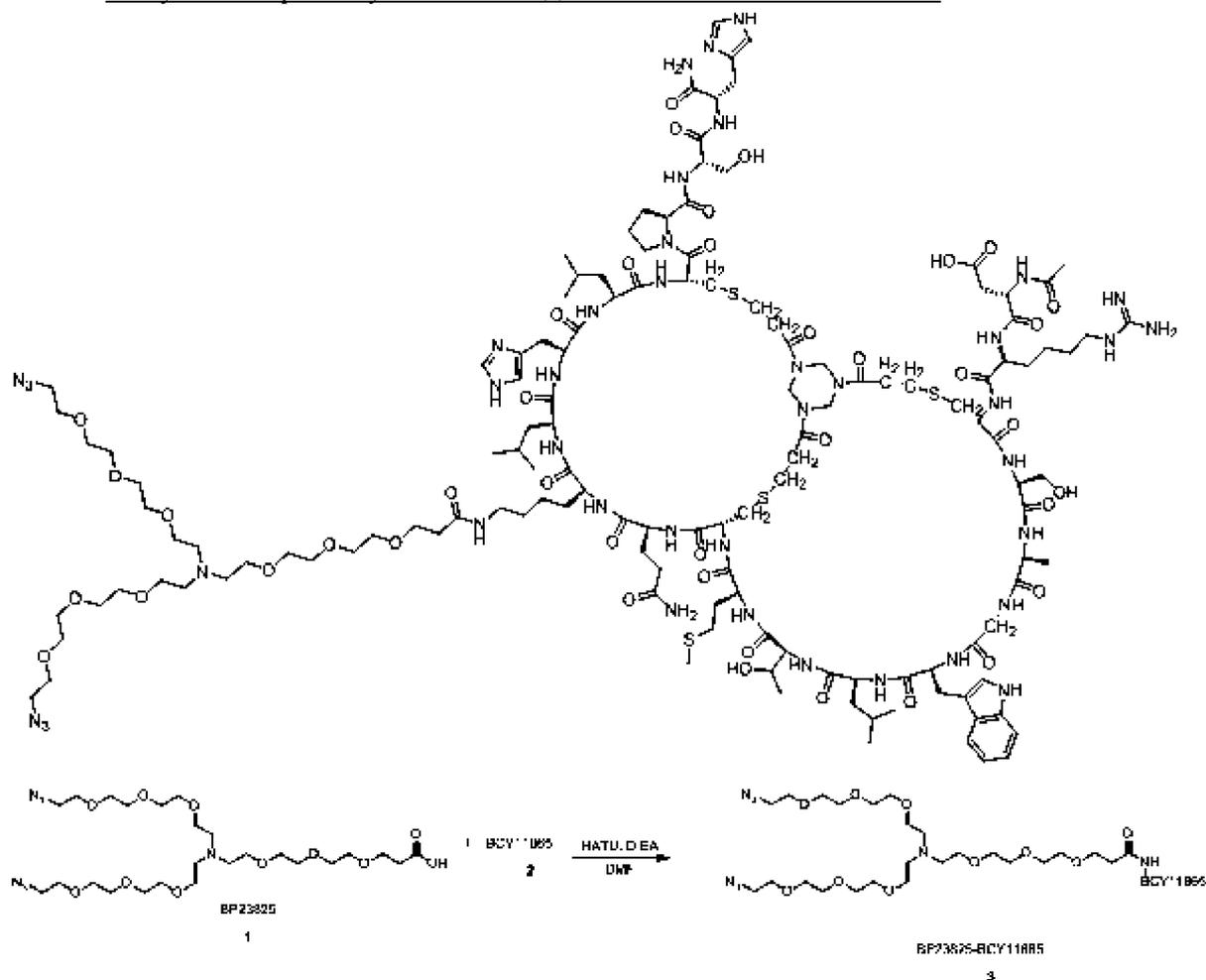
2

3

Смесь соединения 1 (15 мг, 4,99 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (24,41 мг, 10,48 мкмоль, 2,1 экв.) и ТНРТА (4,34 мг, 9,98 мкмоль, 2,0 экв.) растворяли в *t*-BuOH/H₂O (1:1, 2,0 мл, предварительно дегазированном и барботированном N₂ 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 18,71 мкл, 1,5 экв.) и VcNa (2,97 мг, 14,97 мкмоль, 3,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 *t*-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS соединение 1 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым *m/z* (вычисленная MW: 7666,02, наблюдаемое *m/z*: 959,3 ([M/8+H]⁺), 1096,2 ([M/7+H]⁺), 1278,6([M/6+H]⁺)). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворенного остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) и получали BCY18049 (10,6 мг, 1,37 мкмоль, выход 27,41%, чистота 98,9%) в виде белого твердого вещества.

Пример 10: Синтез BCY18603

Получение промежуточного соединения BP23825-BCY11865

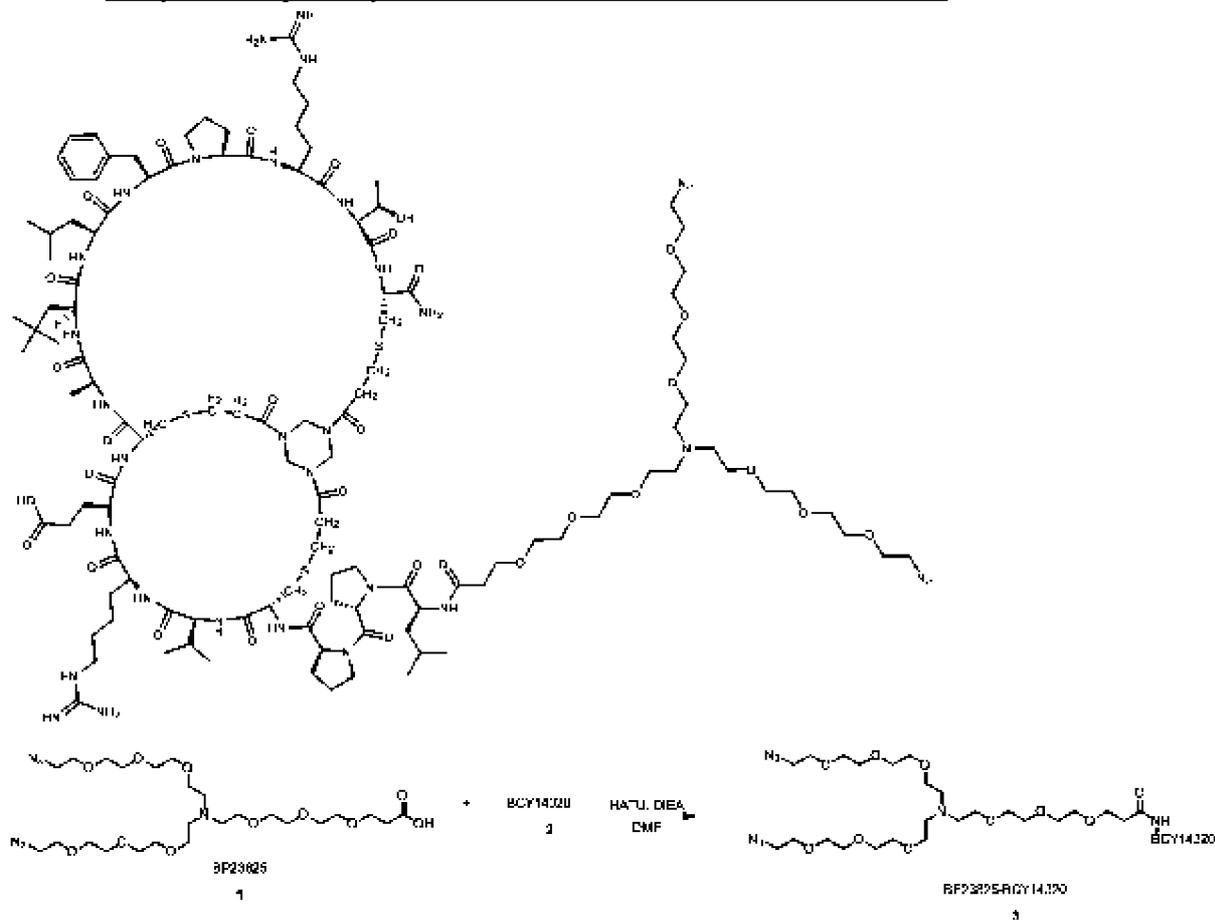


Смесь соединения 1 (15,0 мг, 24,0 мкмоль, 1,0 экв.), HATU (10,1 мг, 26,5 мкмоль, 1,1 экв.) и DIEA (9,3 мг, 72,1 мкмоль, 12,6 мкл, 3,0 экв.) растворяли в DMF (1,0 мл). Реакционную смесь активировали при 25-30°C в течение 6 мин, затем в реакционную смесь добавляли соединение 2 (68,5 мг, 26,5 мкмоль, 1,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали

водный раствор CuSO_4 (0,4 М, 17,6 мкл, 1,5 экв.) и VcNa (2,8 мг, 14,1 мкмоль, 3,0 экв.) в атмосфере N_2 . рН этого раствора доводили до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH_4HCO_3 (в 1:1 t-BuOH/ H_2O), и раствор становился светло-желтым. реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. в атмосфере N_2 . По результатам LC-MS соединение 3 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z (вычисленная MW: 7359,3, наблюдаемое m/z: 1472,9 $[\text{M}/5+\text{H}]^+$, 1227,5 $[\text{M}/6+\text{H}]^+$). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) и получали ВСУ18603 (13,4 мг, 1,82 мкмоль, выход 38,8%, чистота 97,8%) в виде белого твердого вещества.

Пример 11: Синтез ВСУ18604

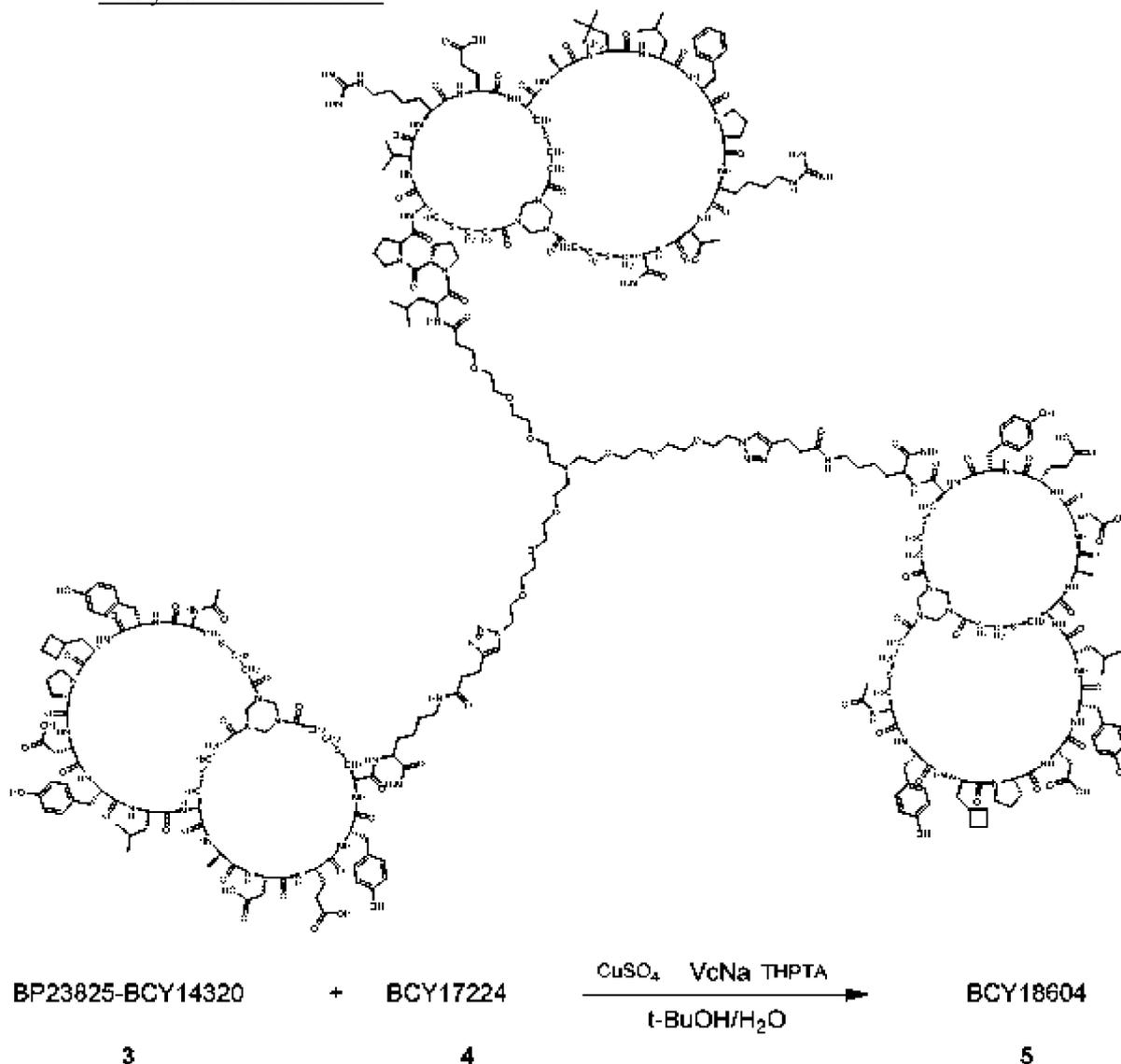
Получение промежуточного соединения ВР23825-ВСУ14320



Смесь соединения 1 (20,0 мг, 32,1 мкмоль, 1,0 экв.), HATU (13,4 мг, 35,3 мкмоль, 1,1 экв.) и DIEA (12,4 мг, 96,2 мкмоль, 16,8 мкл, 3,0 экв.) растворяли в DMF (1,0 мл). Реакционную смесь активировали при 25-30°C в течение 6 мин, затем в реакционную смесь добавляли соединение 2 (74,4 мг, 35,3 мкмоль, 1,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 0,5 ч. По результатам определяли LC-MS наблюдали один главный пик с желаемой m/z (MW: 2714,27, наблюдаемое m/z: 1358,1 $[\text{M}/2+\text{H}]^+$, 905,9 $[\text{M}/3+\text{H}]^+$, 679,5 $[\text{M}/4+\text{H}]^+$). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворенного остатка. Затем остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA). Соединение 3 (ВР23825-ВСУ14320, 42,3 мг, 15,6 мкмоль, выход 48,5%, чистота 97,7%) получали в виде

белого твердого вещества.

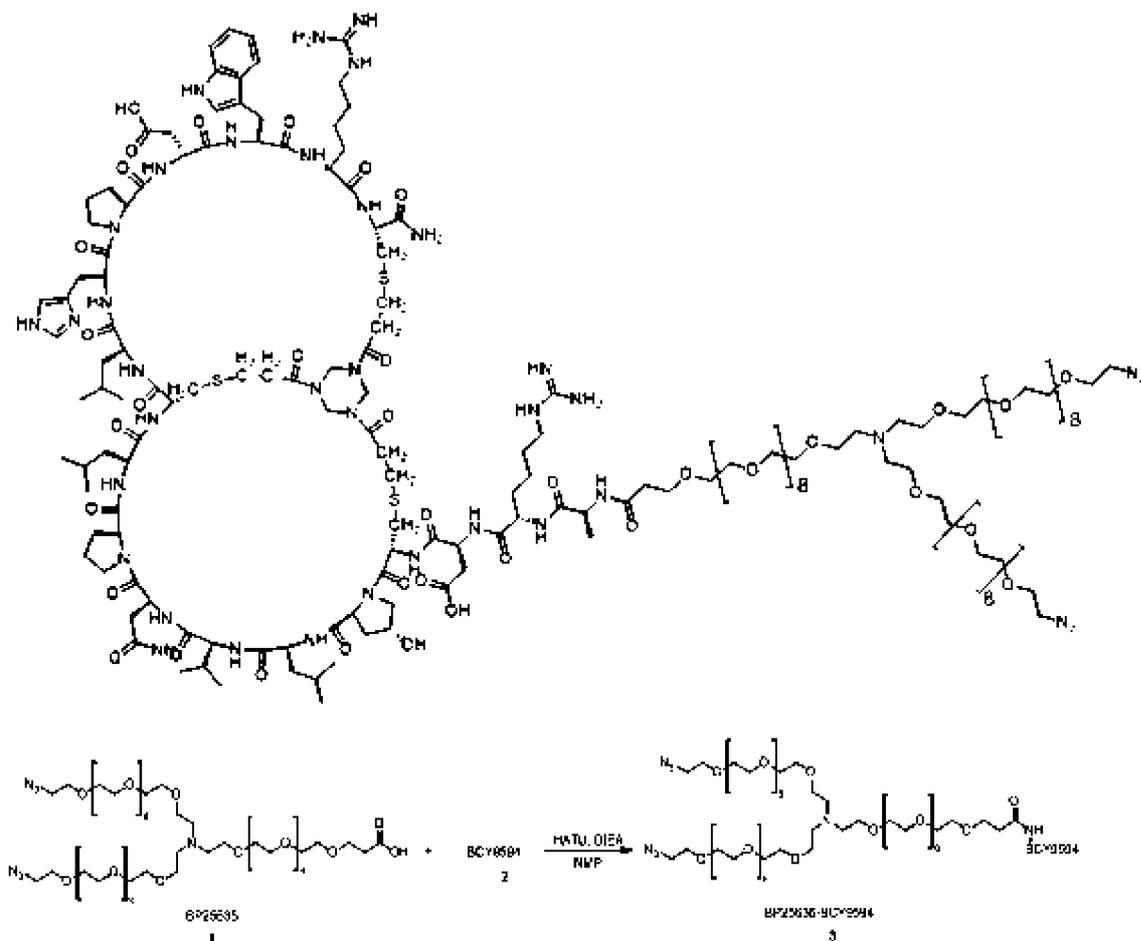
Получение BCY18604



Смесь соединения 3 (15,0 мг, 5,53 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (24,2 мг, 11,6 мкмоль, 2,1 экв.) и THPTA (2,4 мг, 5,53 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2,0 мл, предварительно дегазированном и барботированном N₂ 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 20,7 мкл, 1,5 экв.) и VcNa (3,3 мг, 16,6 мкмоль, 3,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS соединение 3 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z (вычисленная MW: 6876,9, наблюдаемое m/z: 1376,4 [M/5+H]⁺, 1147,3 [M/6+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) и получали BCY18604 (19,1 мг, 2,77 мкмоль, выход 50,0%, чистота 97,1%) в виде белого твердого вещества.

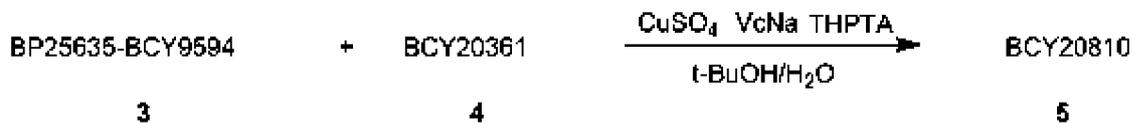
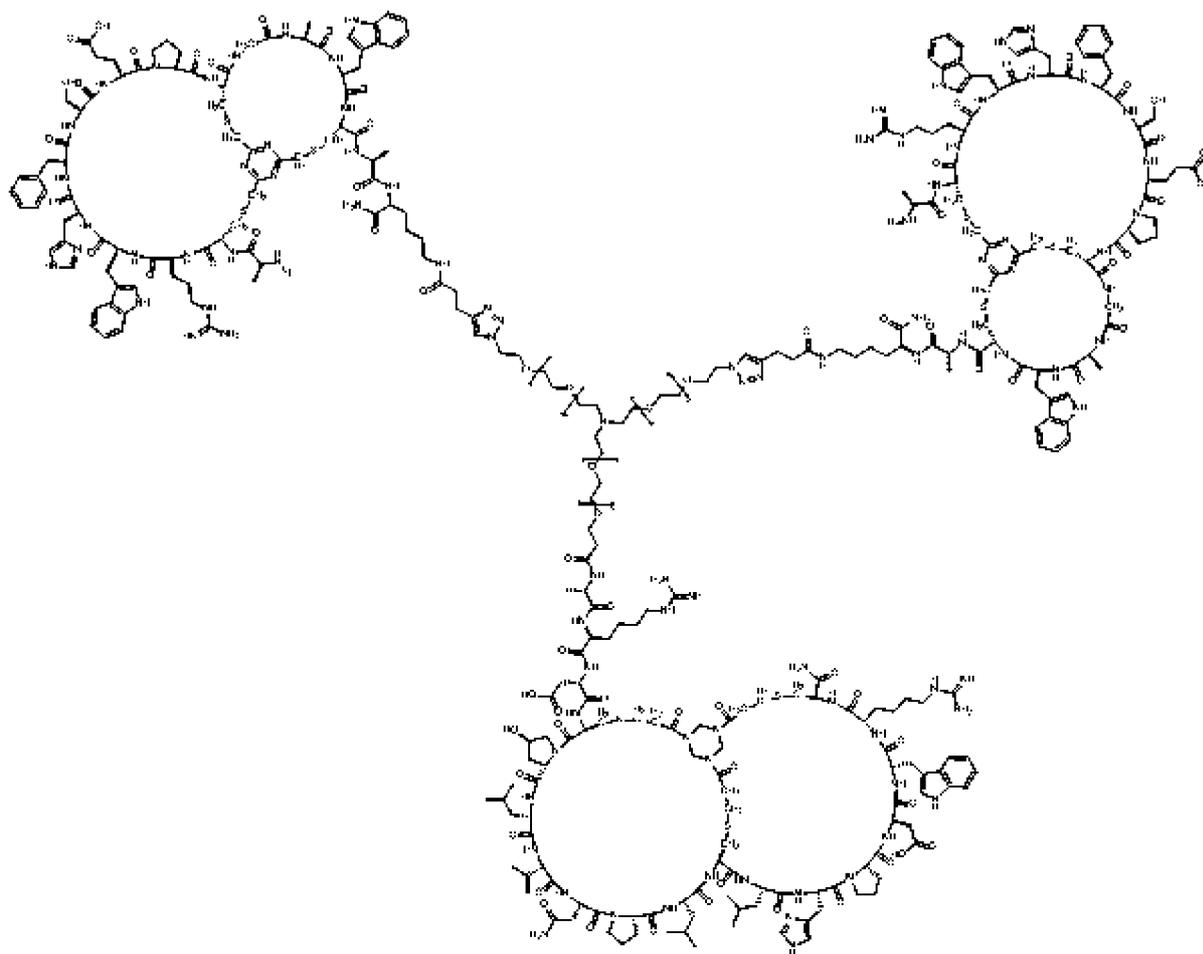
Пример 12: Синтез BCY20810

Получение BP25635-BCY9594



Смесь соединения 1 (50,0 мг, 32,3 мкмоль, 1,0 экв.), HATU (14,7 мг, 38,7 мкмоль, 1,2 экв.) и DIEA (8,3 мг, 64,5 мкмоль, 11,2 мкл, 2,0 экв.) растворяли in NMP (0,5 мл). Реакционную смесь активировали при 25-30°C в течение 5 мин, затем в реакционную смесь добавляли соединение 2 (85,2 мг, 35,5 мкмоль, 1,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 0,5 ч. По результатам LC-MS определяли один главный пик с желаемой m/z (MW:3931,5, наблюдаемое m/z : 1310,5 $[M/3+H]^+$, 983,8 $[M/4+H]^+$). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Затем растворимый неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA). Соединение 3 (BP25635-BCY9594, 34,6 мг, 8,80 мкмоль, выход 27,2%, чистота 96,8%) получали в виде белого твердого вещества.

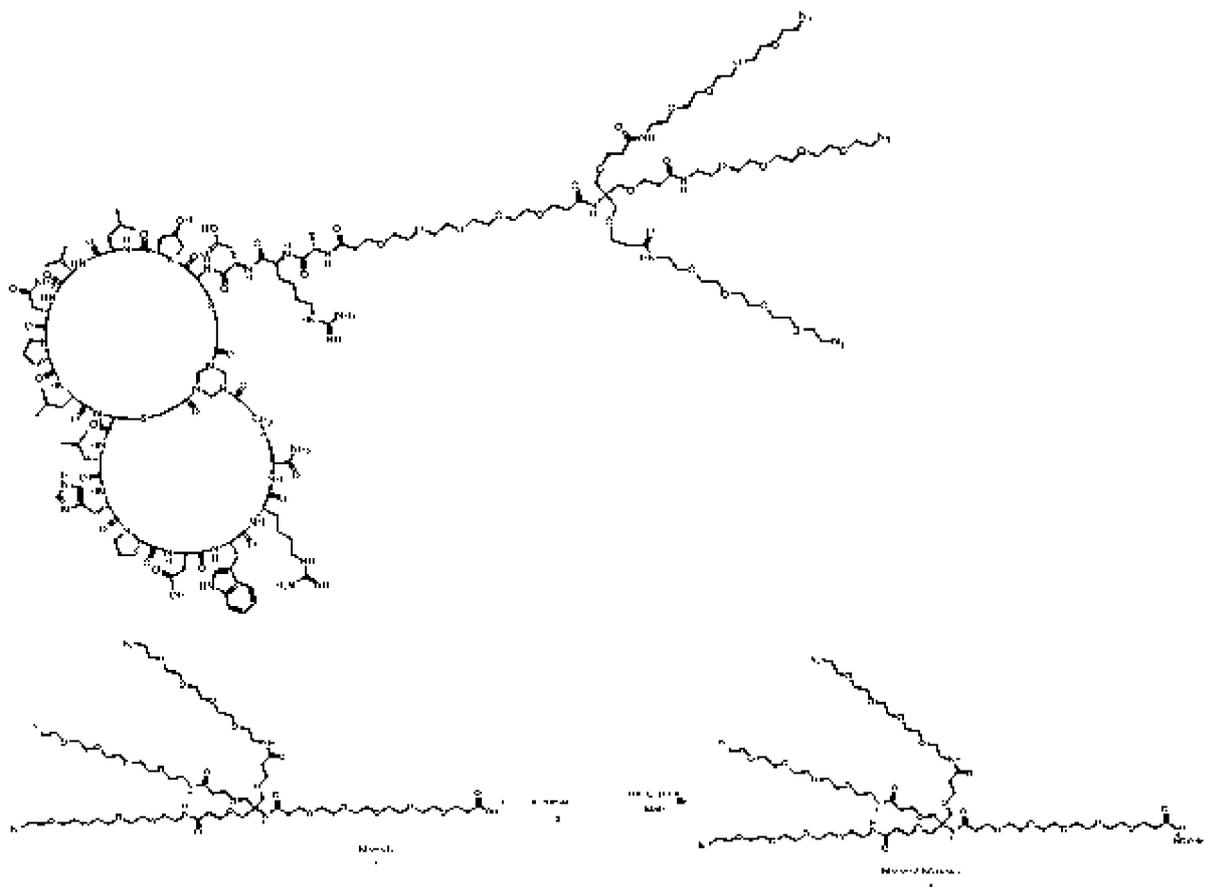
Получение BCY20810



Смесь соединения 3 (15,0 мг, 3,82 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (15,6 мг, 7,63 мкмоль, 2,0 экв.), и THPTA (3,3 мг, 7,63 мкмоль, 2,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 0,3 мл, предварительно дегазированном и барботированном N₂ 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 14,3 мкл, 1,5 экв.) и VcNa (2,3 мг, 11,4 мкмоль, 3,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 0,5 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS соединение 3 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z (вычисленная MW: 8028,3, наблюдаемое m/z: 1338,7 [M/6+H]⁺, 1147,7 [M/7+H]⁺, 1004,4 [M/8+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Растворимый неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) и получали BCY20810 (3,0 мг, 3,73e-1 мкмоль, выход 9,76%, чистота 95,2%) в виде белого твердого вещества.

Пример 13: Синтез BCY21686

Получение промежуточного соединения BP25517-BCY9594

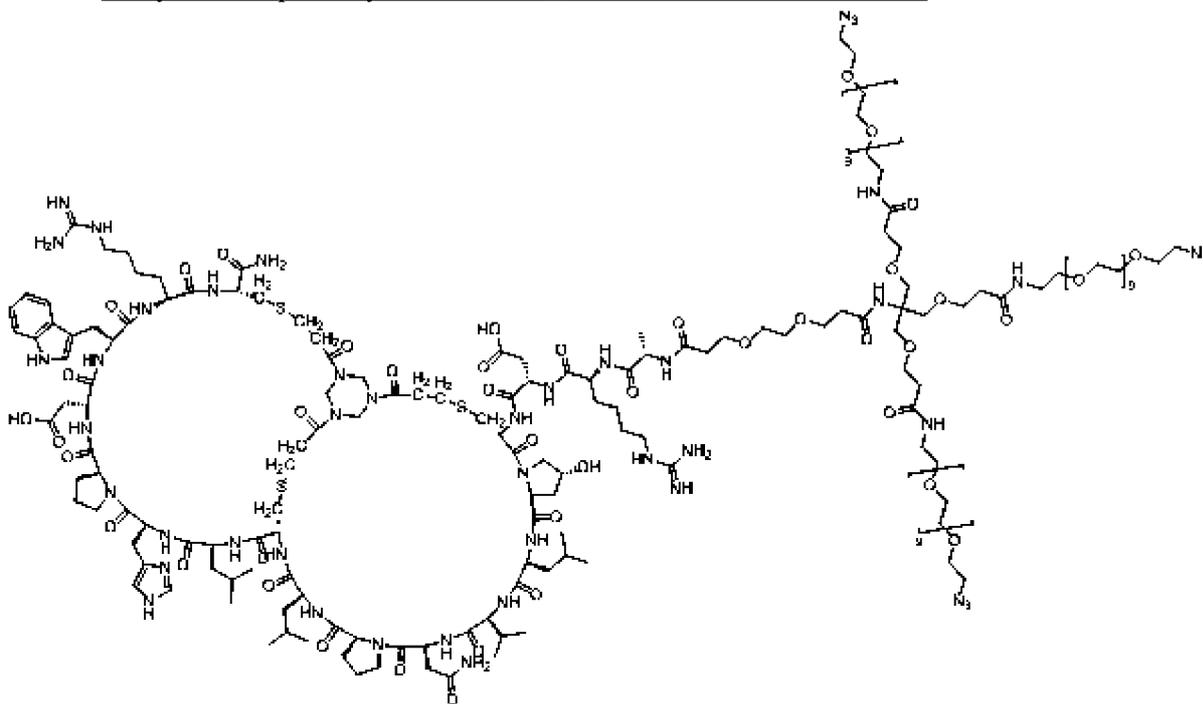


Смесь соединения 1 (10,0 мг, 7,19 мкмоль, 1,0 экв.), НАТУ (3,3 мг, 8,6 мкмоль, 1,2 экв.) и DIEA (2,8 мг, 21,6 мкмоль, 3,8 экв.) растворяли в NMP (0,5 мл). Реакционную смесь активировали при 25-30°C в течение 5 мин, затем в реакционную смесь добавляли соединение 2 (19,0 мг, 7,91 мкмоль, 1,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 0,5 ч. По результатам определяли LC-MS один главный пик с желаемой m/z (вычисленная MW:3773,3, наблюдаемое m/z : 1258,4 $[M/3+H]^+$, 944,1 $[M/4+H]^+$, 755,5 $[M/5+H]^+$). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворенного остатка. Затем неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA). Соединение 3 (BP25517-BCY9594, 9,5 мг, 2,52 мкмоль, выход 35,0%, чистота 95,3%) получали в виде белого твердого вещества.

Получение BCY21686

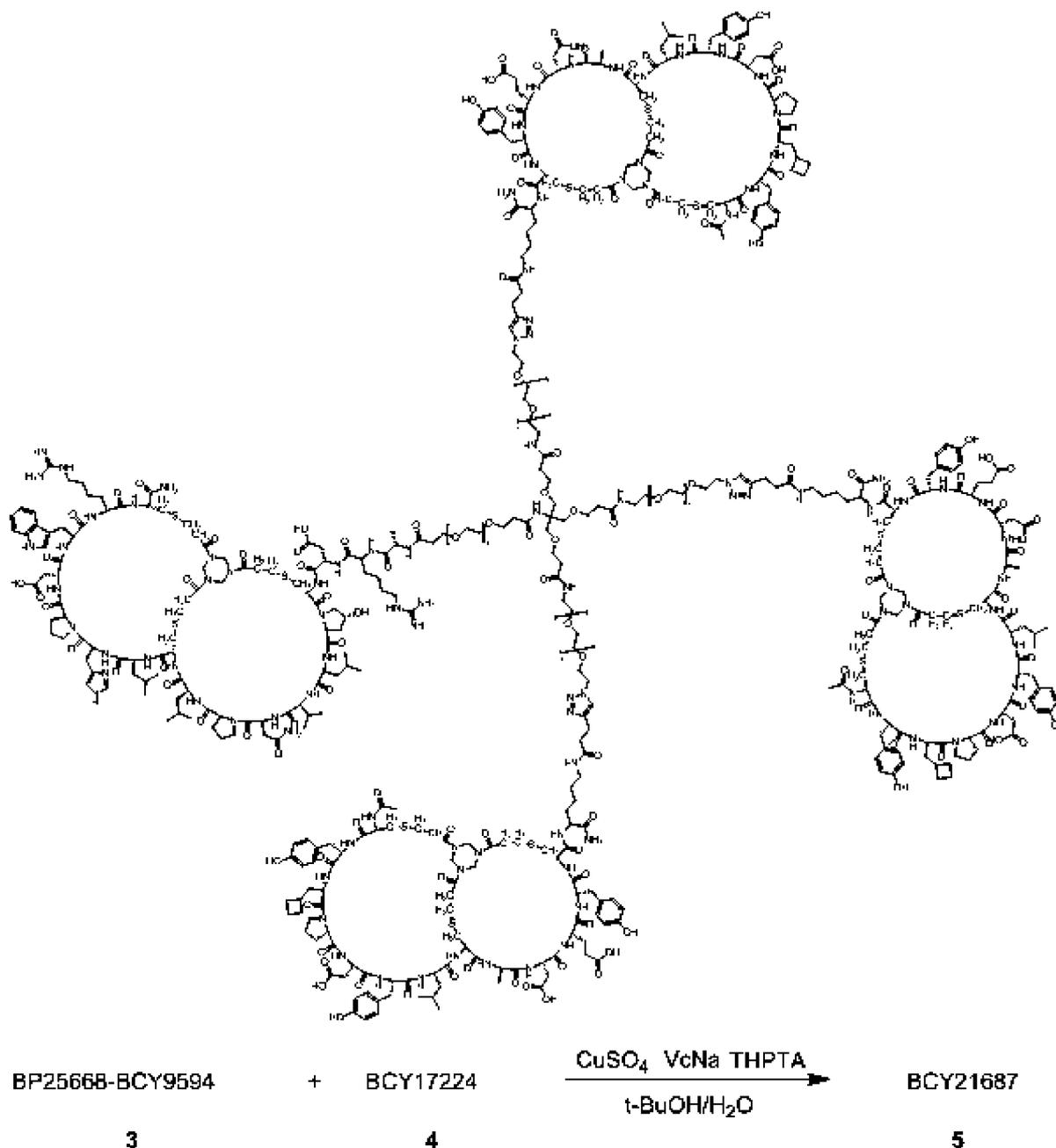
Пример 14: Синтез ВСУ21687

Получение промежуточного соединения ВР25668-ВСУ9594



Смесь соединения 1 (15,0 мг, 6,24 мкмоль, 1,0 экв.), НАТУ (2,8 мг, 7,49 мкмоль, 1,2 экв.) и DIEA (2,4 мг, 18,7 мкмоль, 3,3 мкл, 3,0 экв.) растворяли в NMP (0,5 мл). Реакционную смесь активировали при 25-30°C в течение 5 мин, затем в реакционную смесь добавляли соединение 2 (16,5 мг, 6,86 мкмоль, 1,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 0,5 ч. По результатам LC-MS определяли один главный пик с желаемой m/z (MW:4786,5, наблюдаемое m/z :1197,4 $[M/4+H]^+$). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворенного остатка. Затем неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA). Соединение 3 (ВР25668-ВСУ9594, 13,6 мг, 2,84 мкмоль, выход 45,51%, чистота 95,5%) получали в виде белого твердого вещества.

Получение ВСУ21687

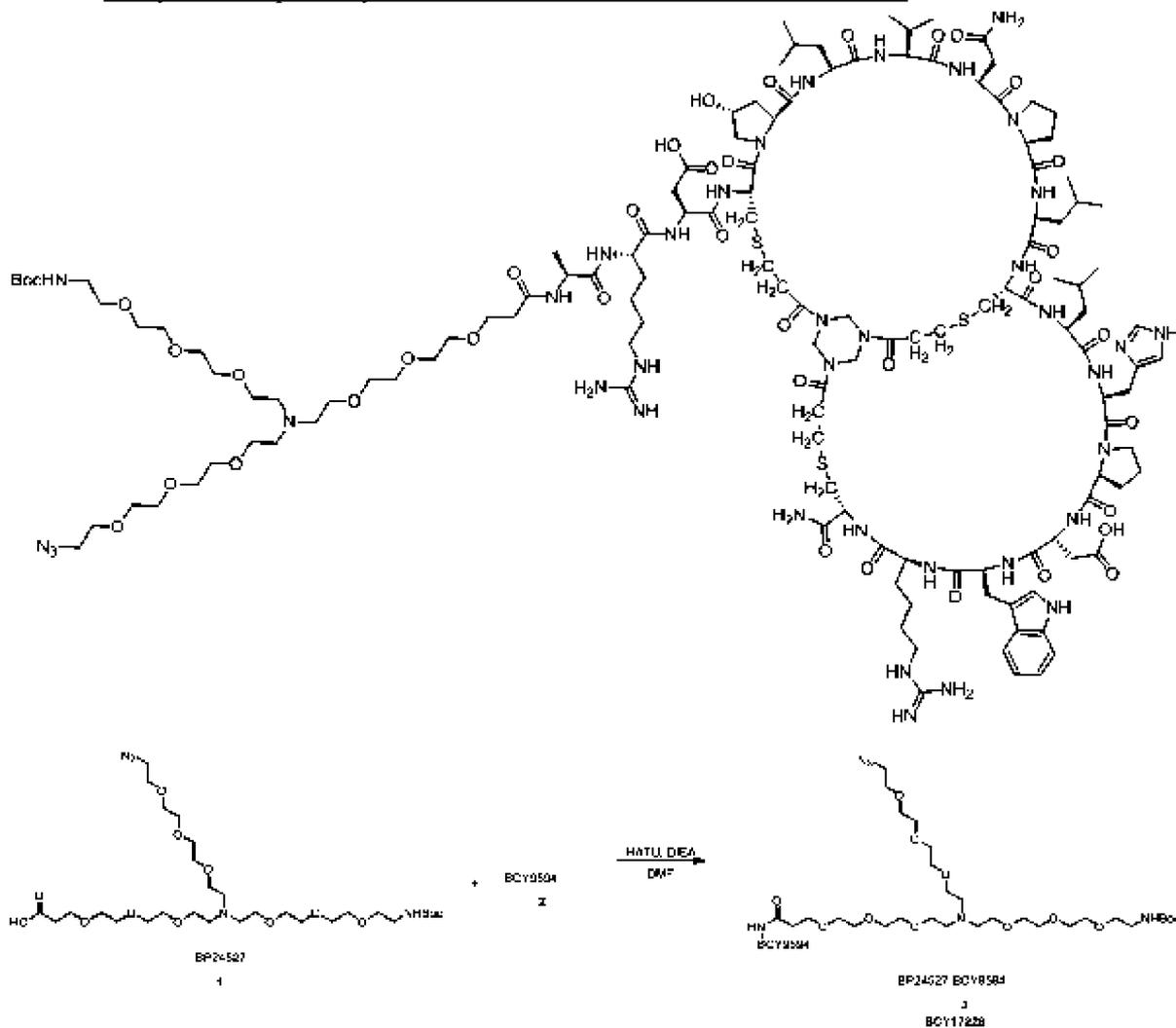


Смесь соединения 3 (13,6 мг, 2,84 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (17,3 мг, 8,32 мкмоль, 3,0 экв.), и THPTA (2,5 мг, 5,68 мкмоль, 2,0 экв.) растворяли в *t*-BuOH/H₂O (1:1, 0,3 мл, предварительно дегазированном и барботированном N₂ 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,9 мг, 5,68 мкмоль, 2,0 экв.) и VcNa (2,2 мг, 11,37 мкмоль, 4,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 *t*-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 0,5 ч. в атмосфере N₂ атмосфера. По результатам LC-MS соединение 3 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым *m/z* (вычисленная MW: 11030,5, наблюдаемое *m/z*: 1379,6 [M/8+H]⁺, 1226,5 [M/9+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Растворимый неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA), и BCY21687 (14,5 мг, 1,31 мкмоль, выход 46,1%, чистота 94,5%) получали в виде белого

твердого вещества.

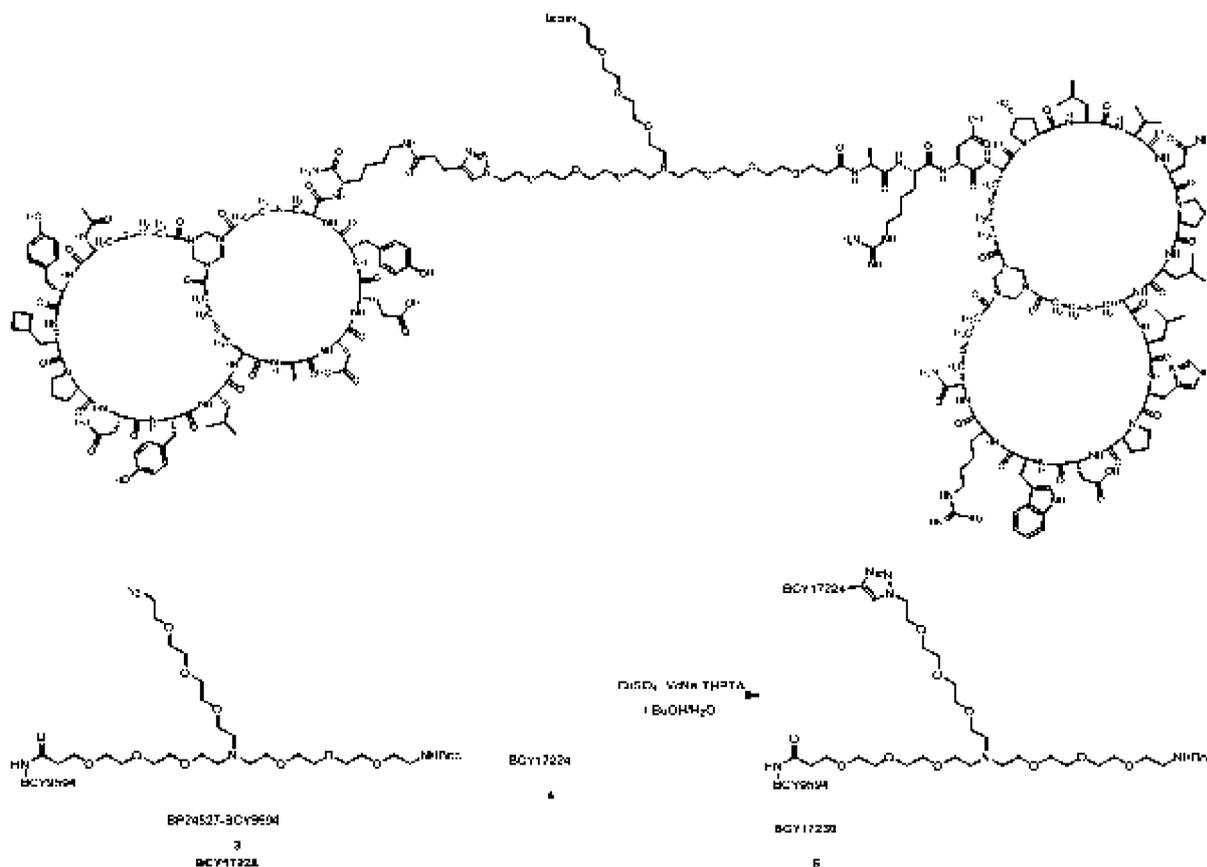
Примеры 15: Синтез ВСУ17231

Получение промежуточного соединения ВР24527-ВСУ9594



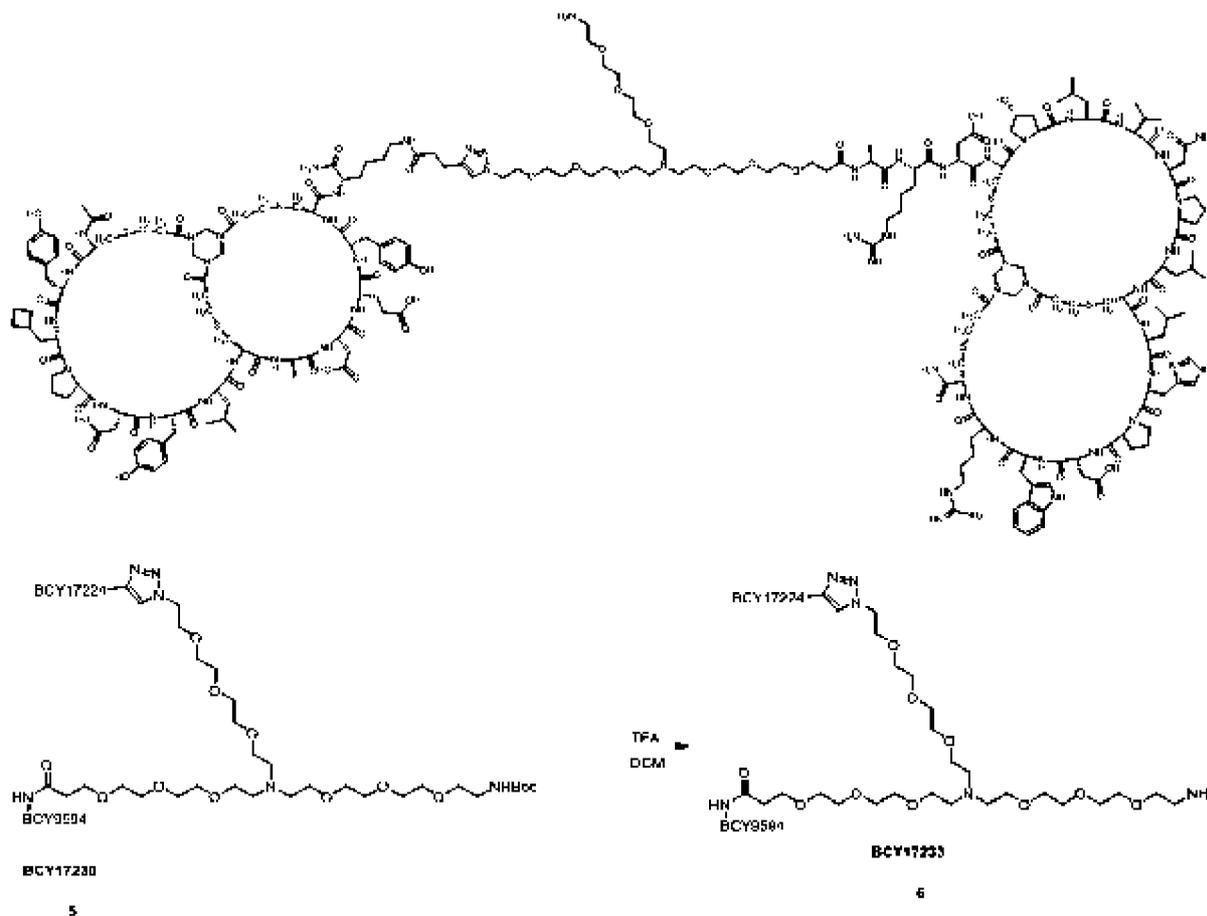
Смесь соединения 1 (100,0 мг, 143 мкмоль, 1,0 экв.), HATU (59,9 мг, 157,6 мкмоль, 1,1 экв.) и DIEA (55,56 мг, 429,9 мкмоль, 74,88 мкл, 3,0 экв.) растворяли в DMF (5,0 мл). Реакционную смесь активировали при 25-30°C в течение 6 мин, затем в реакционную смесь добавляли соединение 2 (378 мг, 157 мкмоль, 1,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 0,5 ч. По результатам LC-MS определяли наблюдали один главный пик с желаемой m/z (MW: 3080,59, наблюдаемое m/z : 1027,9[(M/3+H)⁺, 771,2 [(M/4+H)⁺). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Затем остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA). Соединение 3 (BP24527-BCY9594, 342 мг, 111,02 мкмоль, выход 77,4%, чистота 91,5%) получали в виде белого твердого вещества.

Получение промежуточного соединения ВСУ17230



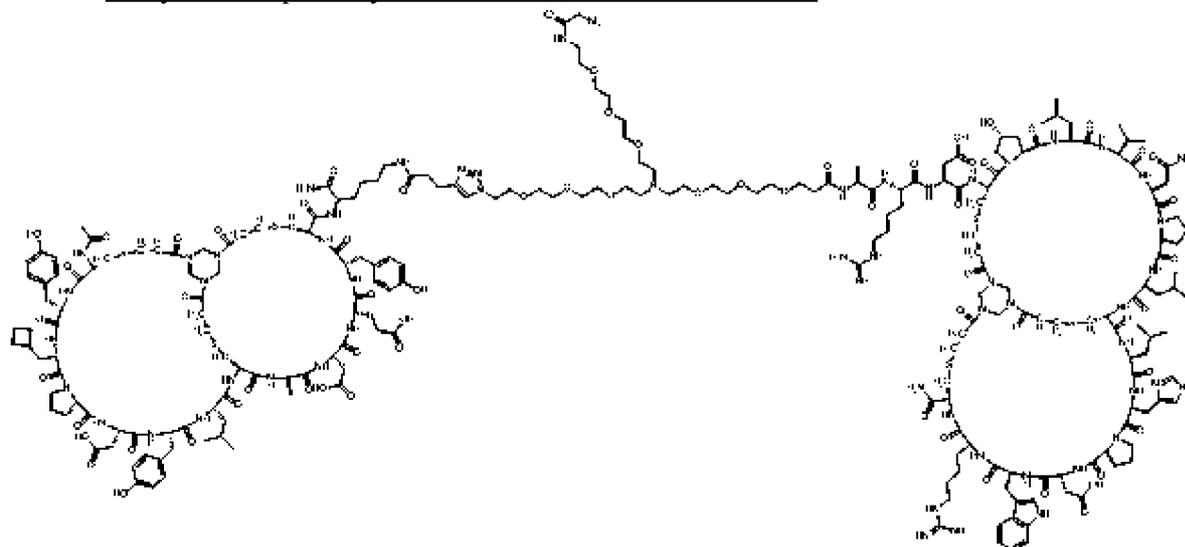
Смесь соединения 3 (100,0 мг, 32,5 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (74,3 мг, 35,7 мкмоль, 1,1 экв.) и THPTA (14,1 мг, 32,5 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 4,0 мл, предварительно дегазированном и барботированном N_2 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO_4 (0,4 М, 81,1 мкл, 2,0 экв.) и VcNa (12,86 мг, 64,92 мкмоль, 2,0 экв.) в атмосфере N_2 . pH этого раствора доводили до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH_4HCO_3 (в 1:1 $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. в атмосфере N_2 . По результатам LC-MS соединение 3 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z (вычисленная MW: 5161,94, наблюдаемое m/z : 1291,6 ($[\text{M}/4+\text{H}]^+$), 1033,4 ($[\text{M}/5+\text{H}]^+$), 861,4 ($[\text{M}/6+\text{H}]^+$)). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA), и получали соединение 5 (BCY17230, 65,0 мг, 12,1 мкмоль, выход 37,28%, чистота 96,1%) в виде белого твердого вещества.

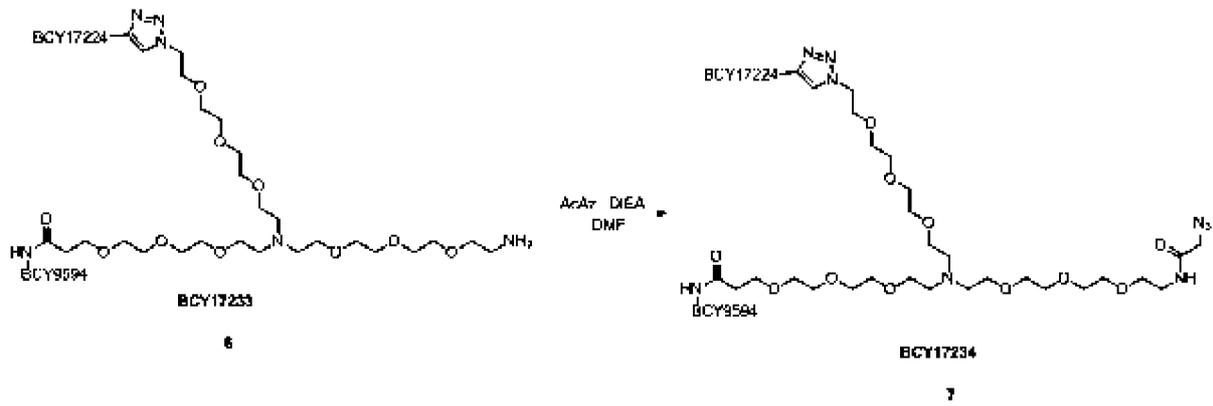
Получение промежуточного соединения BCY17233



К раствору of Соединение 5 (65,0 мг, 12,1 мкмоль, 1,0 экв.) in DCM (0,80 мл) добавляли TEA (0,2 мл). The смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. По результатам LC-MS соединение 5 потреблялось полностью и один главный пик с желаемым m/z (MW: 5061,9, наблюдаемое m/z : 1266,1[M/4+H]⁺, 1013,2[M/5+H]⁺, 844,5 [M/6+H]⁺) определяли. реакционную смесь фильтровали, и растворимый fraction was затем очищенный посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA). Соединение 6 (36,8 мг, 7,13 мкмоль, 56,64% выход, 98,1% чистота) получали в виде белого твердого вещества.

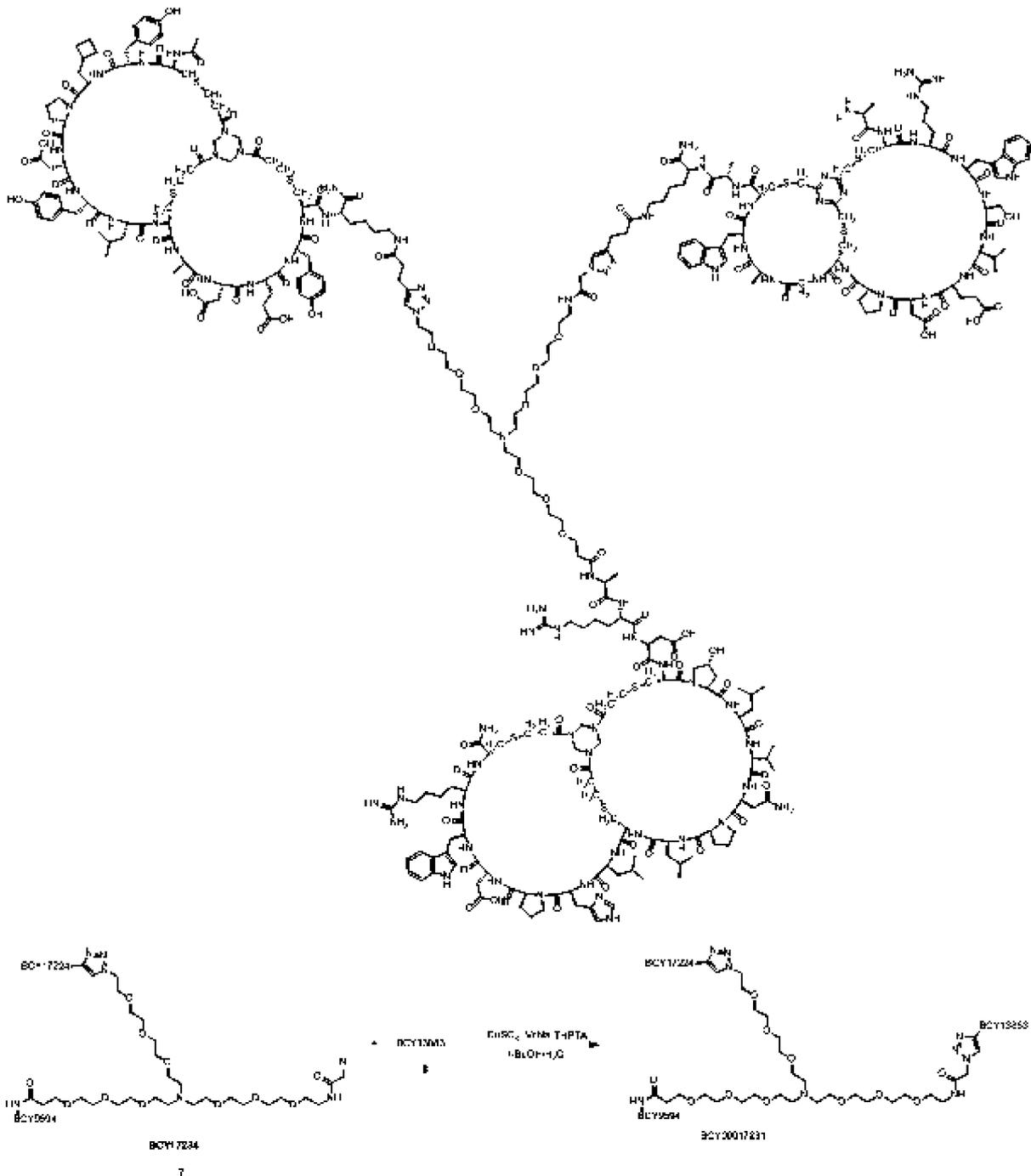
Получение промежуточного соединения BCY17234





К раствору соединения 6 (BCY17233, 36,8 мг, 7,13 мкмоль, 1,0 экв.) и AcAz (1,73 мг, 8,72 мкмоль, 1,2 экв.) в DMF (1,0 мл) добавляли DIEA (1,9 мг, 14,4 мкмоль, 2,5 мкл, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. По результатам LC-MS соединение 6 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z (MW: 5141,35, наблюдаемое m/z : 1029,8[M/5+H]⁺, 1286,9[M/4+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали, а затем очищали растворимую фракцию посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA). Соединение 7 (BCY17231, 25,0 мг, 4,65 мкмоль, выход 63,96%, чистота 95,7%) получали в виде белого твердого вещества.

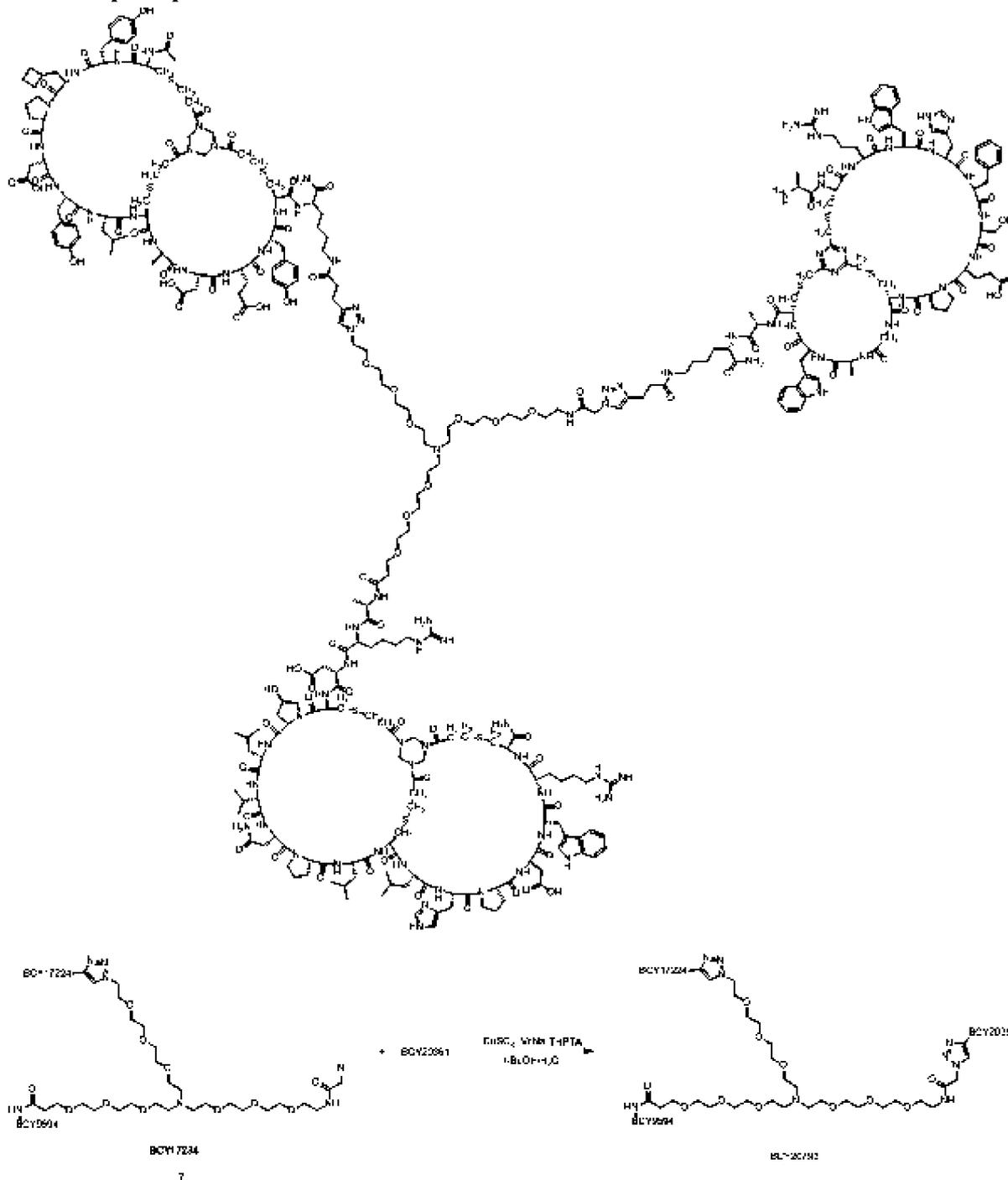
Получение BCY17231



Смесь соединения 7 (22 мг, 4,28 мкмоль, 1,0 экв.), BSY13883 (9,31 мг, 4,70 мкмоль, 1,1 экв.) и TNPFA (1,86 мг, 4,28 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в *t*-BuOH/H₂O (1:1, 2,0 мл, предварительно дегазированном и барботированном N₂ 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 10,69 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (1,69 мг, 8,55 мкмоль, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора довели до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 *t*-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS соединение 7 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым *m/z* (вычисленная MW: 7123,1, наблюдаемое *m/z*: 1425,3 ([M/5+H]⁺), 1188,0([M/6+H]⁺)). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) и получали BSY17231

(4,8 мг, 6,29e-1 мкмоль, выход 14,70%, чистота 93,2%) в виде белого твердого вещества.

Пример 16: Синтез ВСУ20793

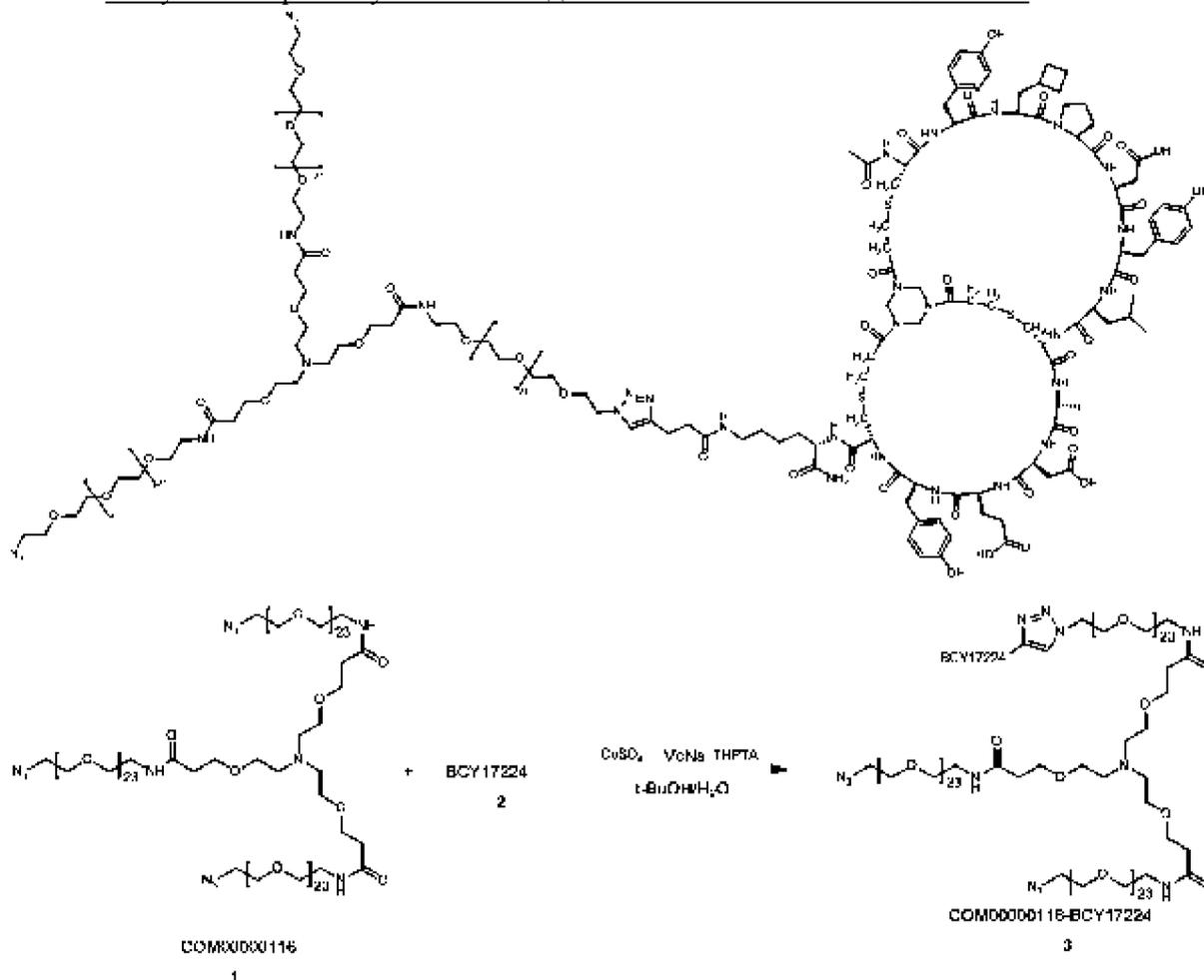


Смесь соединения 1 (17,4 мг, 3,38 мкмоль, 1,0 экв.), ВСУ20361 (7,61 мг, 3,72 мкмоль, 1,1 экв.) и ТНРТА (1,47 мг, 3,38 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2,0 мл, предварительно дегазированном и барботированном N₂ 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 8,46 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (1,34 мг, 6,76 мкмоль, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 посредством по капельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS соединение 1 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z

(вычисленная MW: 7193,2, наблюдаемое m/z: 1439,3 ($[M/5+H]^+$), 1199,7 ($[M/6+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) и получали BCY20793 (8,0 мг, 1,05 мкмоль, выход 30,96%, чистота 94,1%) в виде белого твердого вещества.

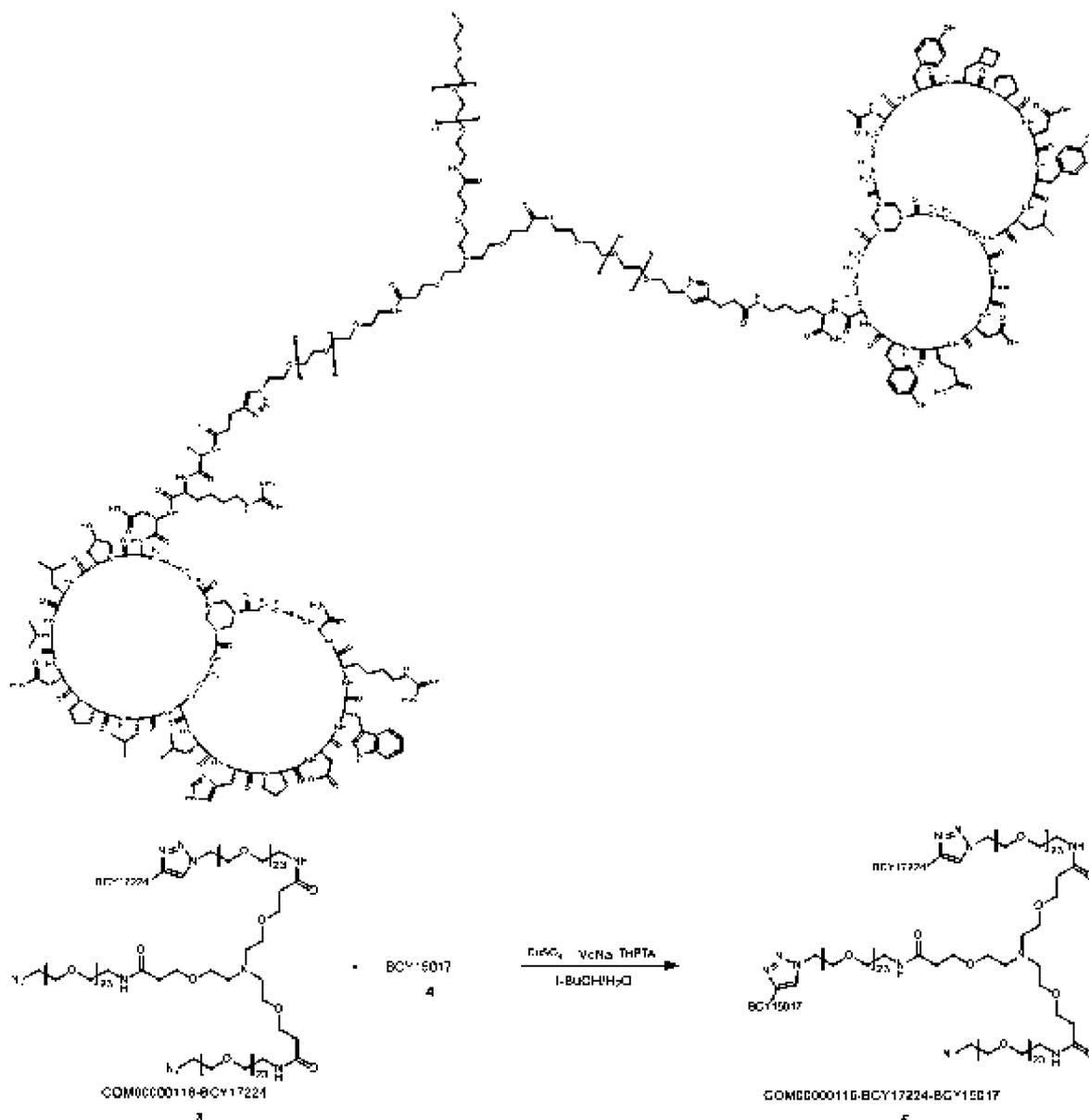
Пример 17: Синтез BCY17235

Получение промежуточного соединения COM00000116-BCY17224



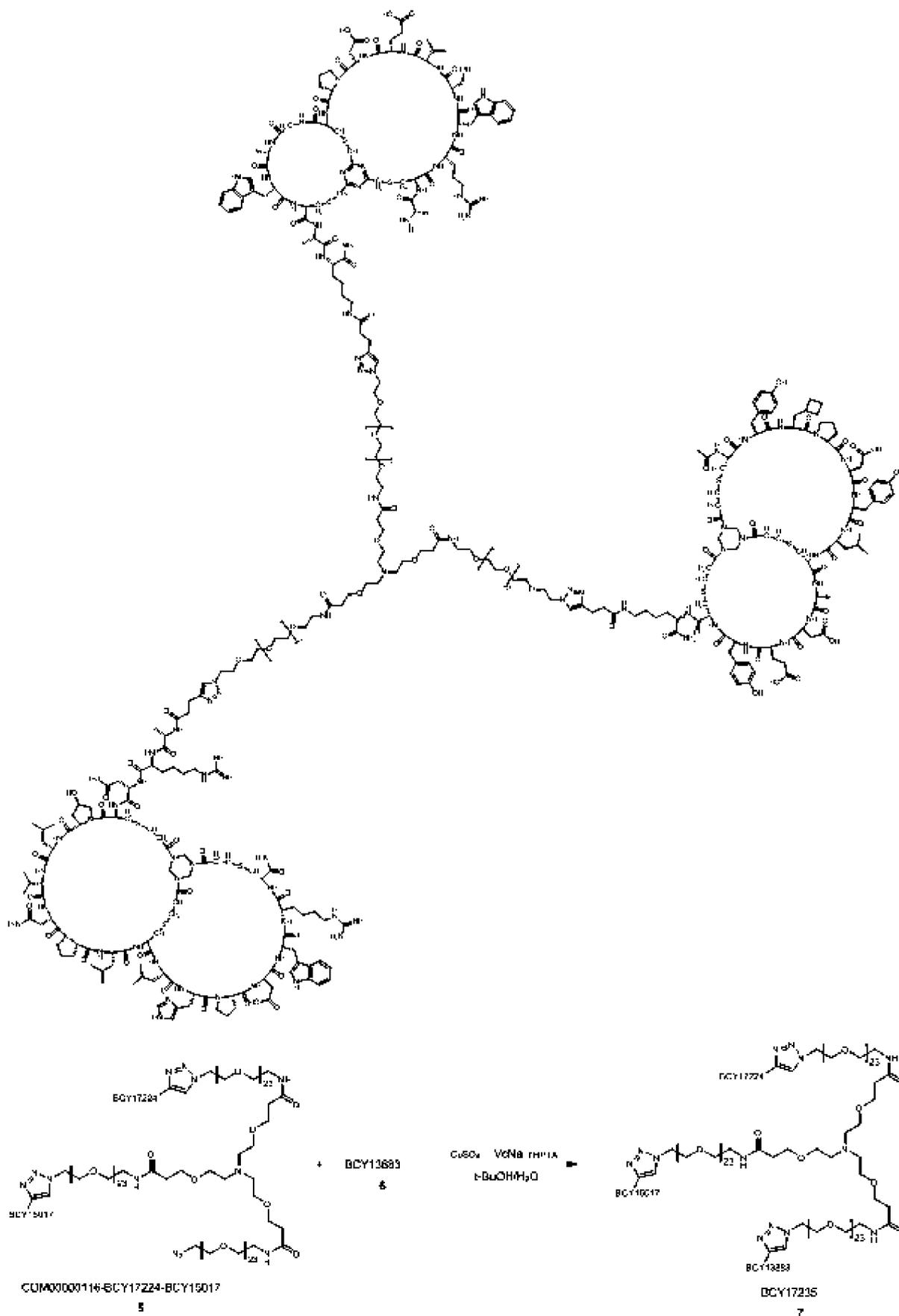
Смесь COM00000116 (50,0 мг, 13,8 мкмоль, 1,0 экв.), BCY17224 (23,0 мг, 11,1 мкмоль, 0,8 экв.) и THPTA (30,1 мг, 69,3 мкмоль, 5,0 экв.) растворяли в $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 10 мл, предварительно дегазированном и барботированном N_2 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO_4 (0,4 M, 13,8 мкл, 0,4 экв.) и VcNa (54,8 мг, 277,1 мкмоль, 20,0 экв.) в атмосфере N_2 . pH этого раствора доводили до 8 посредством покапельного добавления 0,2 M NH_4HCO_3 (в 1:1 $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 3 ч. в атмосфере N_2 . По результатам LC-MS наблюдали желаемую массу (вычисленная MW: 5690,6, наблюдаемое m/z: 1416,3 ($[M-28]/4+H]^+$). Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA), но чистота была плохой. Соединение 3 (COM00000116-BCY17224, 43,9 мг, чистота 53,1%) получали в виде белого твердого вещества.

Получение промежуточного соединения COM00000116-BCY17224-BCY15017



А смесь of соединение 3 (COM00000116-BCY17224, 29,8 мг, 5,24 мкмоль, 1,0 экв.), соединение 4 (BCY15017, 13,0 мг, 5,24 мкмоль, 1,0 экв.), и THPTA (4,5 мг, 10,5 мкмоль, 2,0 экв.) растворяли в $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 1 мл, предварительно дегазированный и барботированный with N_2 3 раза), а затем водный раствор CuSO_4 (0,4 М, 13,1 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (3,1 мг, 15,7 мкмоль, 3,0 экв.) добавляли в атмосфере N_2 . The pH этого раствора довели до 8 посредством по капельного добавления 0,2 М NH_4HCO_3 (в 1:1 $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$), и раствор становился светло-желтым. реакцию смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. в атмосфере N_2 атмосфера. По результатам LC-MS desired m/z (вычисленная MW: 8171,45, наблюдаемое m/z : 1362,6 ($[\text{M}/6+\text{H}]^+$), 1168,3 ($[\text{M}/7+\text{H}]^+$)) определяли. реакцию смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. The растворимый неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA), и соединение 5 (COM00000116-BCY17224-BCY15017, 8,7 мг, 1,06 мкмоль, 20,2% выход, 78,7% чистота) получали в виде белого твердого вещества.

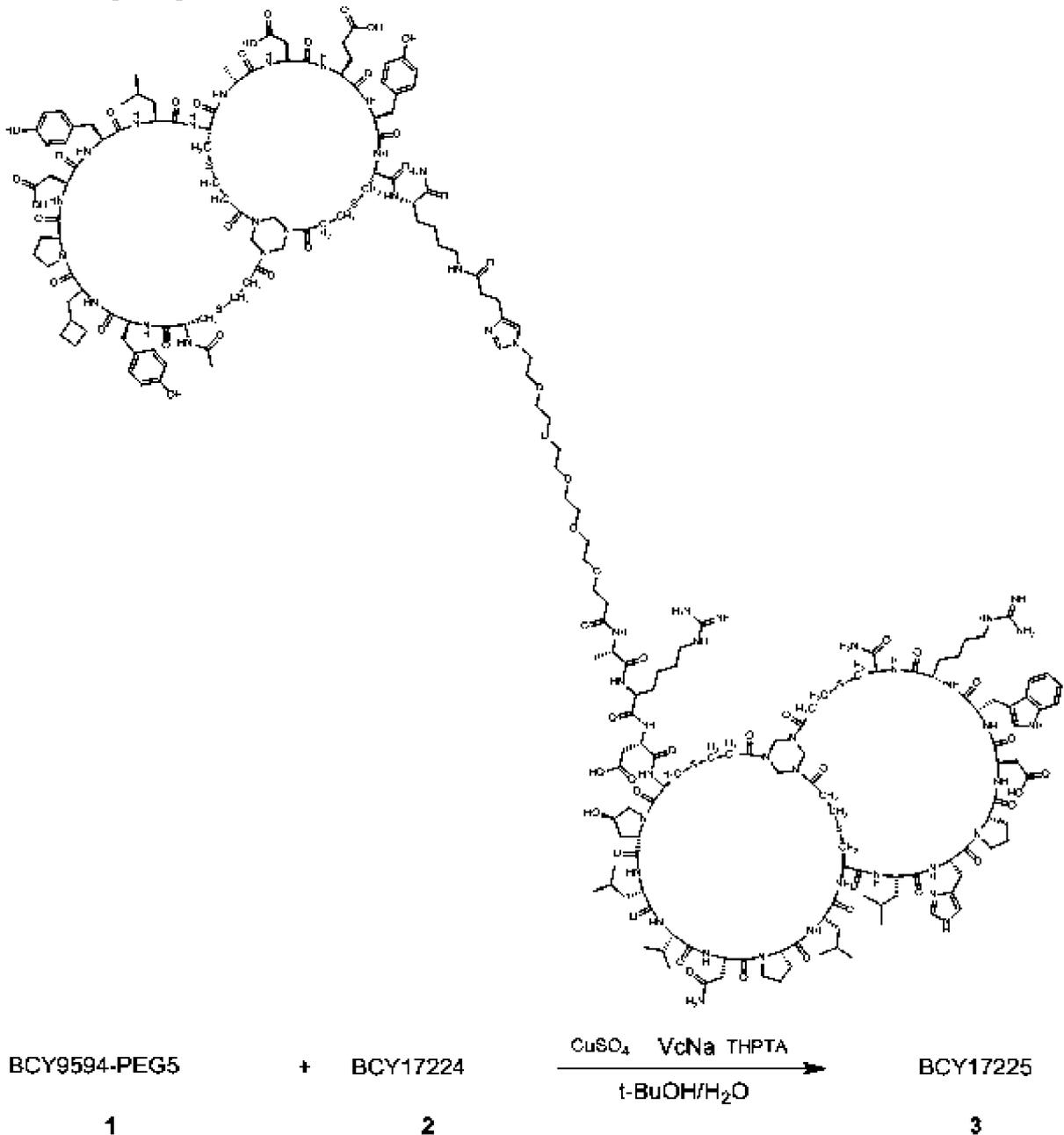
Получение BCY17235



Смесь соединения 5 (COM00000116-BCY17224-BCY15017, 4,2 мг, 5,14e-1 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 6 (BCY13883, 1,0 мг, 5,14e-1 мкмоль, 1,0 экв.) и ТНРТА (0,2 мг, 5,14e-1 мкмоль, 1,0 экв.) растворили в t-BuOH/H₂O (1:1, 0,2 мл, предварительно дегазированном и

барботированном N_2 3 раза), а затем добавляли водный раствор $CuSO_4$ (0,4 М, 1,3 мкл, 1,0 экв.) и $VcNa$ (0,2 мг, 1,03 мкмоль, 2,0 экв.) в атмосфере N_2 . pH этого раствора довели до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH_4HCO_3 (в 1:1 $t-BuOH/H_2O$), и раствор становился светло-желтым. реакцию смесь перемешивали при 25-30°C в течение 0,5 ч. в атмосфере N_2 . По результатам LC-MS соединение 5 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z (вычисленная MW: 10149,8, наблюдаемое m/z : 1269,3 ($[M/8+H]^+$), 1128,4 ($[M/9+H]^+$)). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Растворимый неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) и получали BCY17235 (1,8 мг, 1,77e-1 мкмоль, выход 34,4%, чистота 91,6%) в виде белого твердого вещества.

Пример 18: Синтез BCY17225

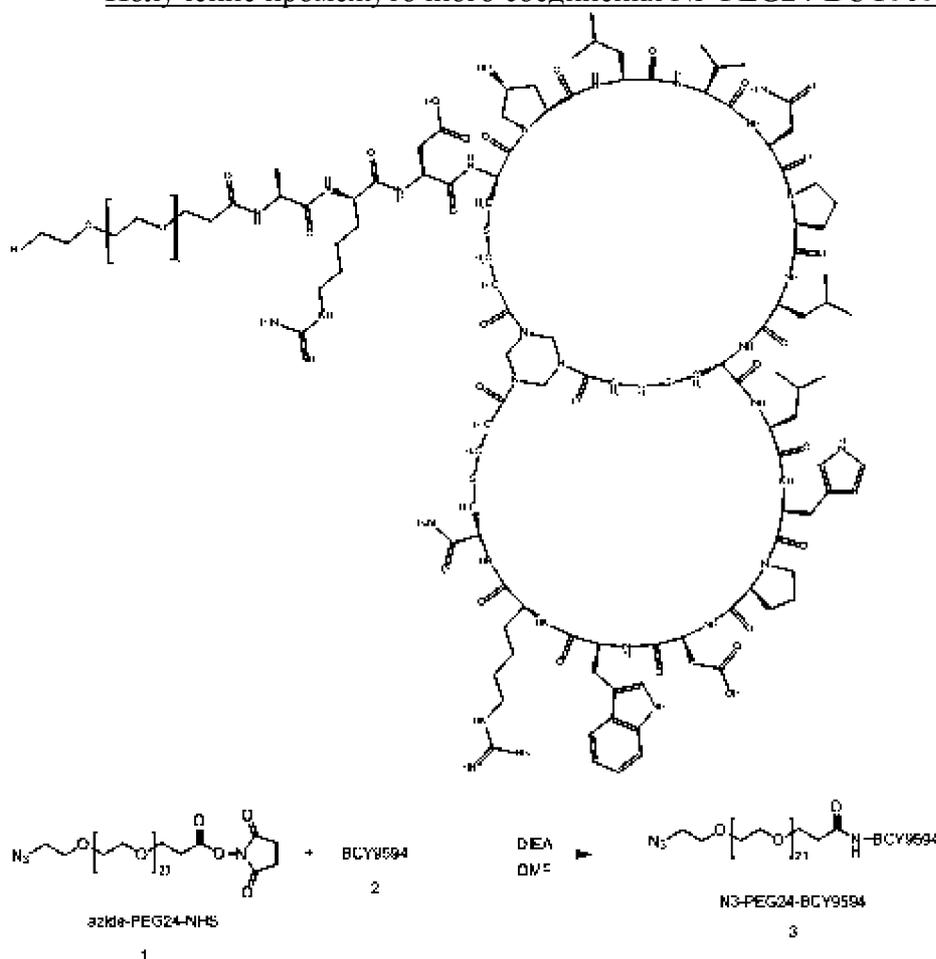


Смесь соединения 1 (20 мг, 7,36 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 2 (BCY17224, 16,85

мг, 8,09 мкмоль, 1,1 экв.) и ТНРТА (3,20 мг, 7,36 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в *t*-BuOH/H₂O (1:1, 1,0 мл, предварительно дегазированном и барботированном N₂ 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 18,4 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (2,92 мг, 14,72 мкмоль, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 *t*-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS соединение 1 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым *m/z* (вычисленная MW: 4799,47, наблюдаемое *m/z*: 961,0 ([M/5+H]⁺), 1200,9 ([M/4+H]⁺). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) и получали BCY17225 (19,5 мг, 3,88 мкмоль, выход 52,73%, чистота 95,5%) в виде белого твердого вещества.

Пример 19: Синтез BCY18731

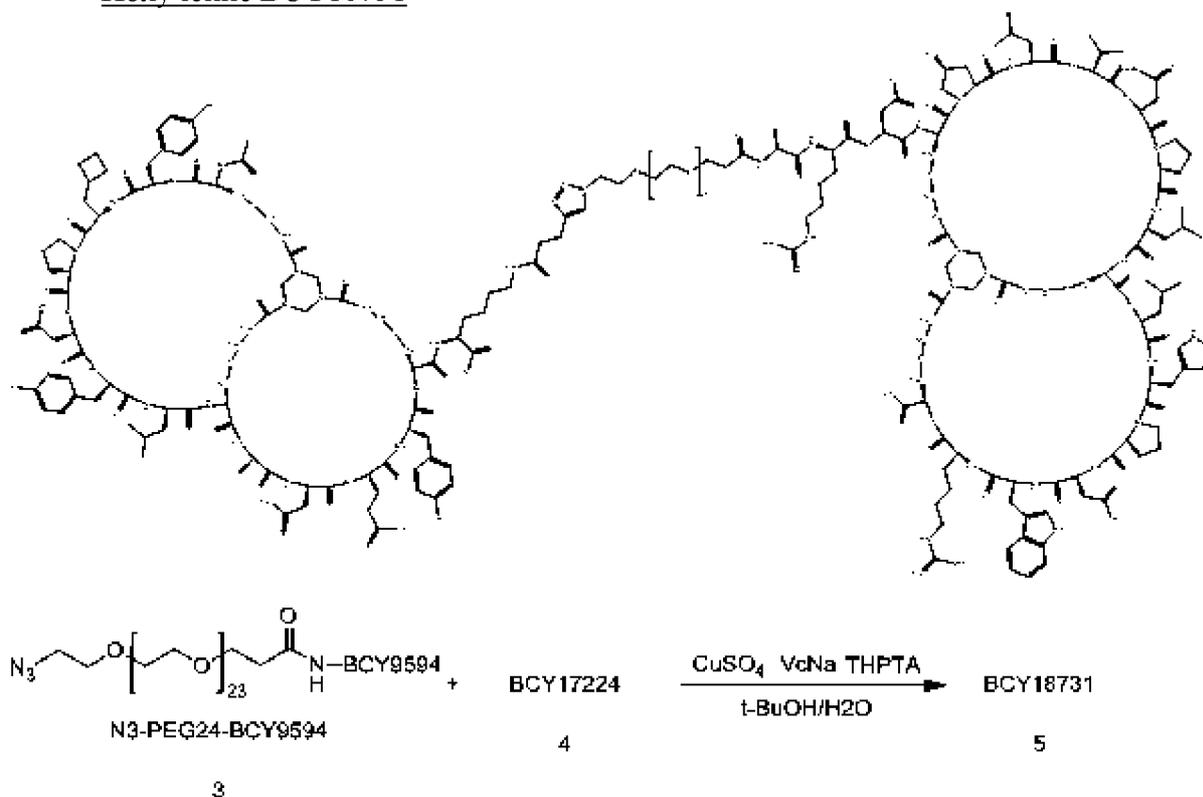
Получение промежуточного соединения N3-PEG24-BCY9594



Смесь соединения 1 (17,45 мг, 13,75 мкмоль, 1,1 экв.), DIEA (3,23 мг, 24,99 мкмоль, 4,35 мкл, 2,0 экв.) растворяли в DMF (1,0 мл). Реакционную смесь активировали при 25-30°C в течение 6 мин, затем в реакционную смесь добавляли соединение 2 (30,0 мг, 12,50 мкмоль, 1,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 0,5 ч. По результатам LC-MS соединение 2 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым *m/z* (MW: 3555,1, наблюдаемое *m/z*: 1186,1 [(M/3+H)⁺). Реакционную смесь

фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Затем остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA). Соединение 3 (N3-PEG24-BCY9594, 23,8 мг, 6,69 мкмоль, выход 52,40%, чистота 97,8%) получали в виде белого твердого вещества.

Получение BCY18731



Смесь соединения 3 (N3-PEG24-BCY9594, 23,8 мг, 6,69 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (BCY17224, 15,33 мг, 7,36 мкмоль, 1,1 экв.) и THPTA (2,91 мг, 6,69 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2,0 мл, предварительно дегазированном и барботированном N₂ 3 раза), а затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 16,74 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (2,65 мг, 13,39 мкмоль, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 посредством покапельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. в атмосфере N₂. По результатам LC-MS соединение 3 потреблялось полностью, и определяли один главный пик с желаемым m/z (вычисленная MW: 5636,47, наблюдаемое m/z: 1410,0 ([M/5+H]⁺), 1128,3 ([M/5+H]⁺), 940,4 ([M/6+H]⁺)). Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) и получали BCY18731 (14,7 мг, 2,50 мкмоль, выход 37,4%, чистота 96,0%) в виде белого твердого вещества.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

1. Анализ дегрануляции

Опухолевые клетки могут распознаваться и уничтожаться цитотоксическими CD8⁺ Т-клетками и НК-клетками посредством иммунной секреции литических гранул, уничтожающих клетки-мишени. Этот процесс включает слияние мембраны гранулы с цитоплазматической мембраной иммунной эффекторной клетки, что приводит к

экспонированию CD107a (LAMP1) на поверхности. Мембранная экспрессия CD107a представляет собой маркер активации иммунных клеток и цитотоксической дегрануляции. Гетеротандемные бициклические пептидные комплексы для EphA2/NKp46 или EphA2/CD16a оценивали на активацию NK-клеток с использованием анализа дегрануляции.

В день эксперимента подготавливали среду, дополняя ее RPMI-1640 (Gibco™ 11875-093; с L-глутамином) с 10% термически инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой (FBS; Corning® 35-011-CV), 10 мМ HEPES (Gibco™ 15-630-080) и 1% пенициллина/стрептомицина (Corning™ 30-002-CI), в настоящем описании обозначаемую как рабочая среда. Предварительно выделенные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека из цельной крови быстро размораживали на водяной бане и однократно промывали при 500 об./мин. в течение 5 минут в 10 мл предварительно нагретой рабочей среды. Затем осадок PBMC ресуспендировали до концентрации 5×10^6 клеток/мл в рабочей среде и оставляли на ночь (12-18 часов) горизонтально во флаконе для культивирования ткани с покрытием (T-183; CELLTREAT Scientific 229351). Кроме того, экспрессирующую рецептор эфрина типа А (EphA2) линию клеток карциномы легкого человека A549 (ATCC® CCL-185; клетки выращивали и поддерживали по инструкциям производителя) открепляли от культурального сосуда с использованием трипсина/ЭДТА и однократно промывали при 500 об./мин. в течение 5 минут в 15 мл предварительно нагретой рабочей среды. Затем клеточный осадок ресуспендировали в рабочей среде в концентрации 1×10^5 клеток/мл. Затем 100 мкл суспензии клеток высевали в плоскодонный 96-луночный планшет для культивирования ткани с покрытием (Greiner CellStar® 655180) и оставляли на ночь (12-18 часов).

После инкубации в течение ночи PBMC удаляли из флакона и однократно промывали при 500 об./мин. в течение 5 минут в 10 мл предварительно нагретой рабочей среды. Затем NK-клетки выделяли из общей популяции PBMC с использованием набора для отрицательного выделения (STEMCELL Technologies 17955) по инструкциям производителя. Затем осадок NK-клеток ресуспендировали в рабочей среде в концентрации 1×10^5 клеток/мл. Затем 100 мкл суспензии клеток высевали в 96-луночный планшет, содержащий оставленные на ночь клетки A549.

Гетеротандемные бициклические пептидные комплексы разводили в рабочей среде и добавляли в соответствующий планшет с клетками в предложенной начальной концентрации 300 нМ или 5 мкМ, титрованной в серии разведений 1:4 для получения серийного разведения из 12 точек. Кроме того, добавляли ингибитор транспорта белков GolgiStop™ (BD Biosciences 554715) по инструкциям производителя. Затем планшеты инкубировали в течение 4 часов при 37°C и 5% CO₂. Затем образцы однократно промывали в 200 мкл 1-кратного фосфатно-солевого буфера (PBS; Gibco™ 10-010-023) при 500 об./мин. в течение 5 минут. Клетки ресуспендировали в 200 мкл PBS и переносили в 96-луночный полипропиленовый планшет с V-образным дном (Greiner Bio-One 651201). Затем образцы центрифугировали при 500 об./мин. в течение 5 минут и выбрасывали супернатант.

Препарат образцов для проточной цитометрии с фиксируемым красителем для оценки жизнеспособности Zombie Aqua™ (BioLegend® 423102) получали в виде разведения 1:1000 в PBS, в каждую лунку добавляли 100 мкл красителя для оценки жизнеспособности и инкубировали в темноте при 4°C в течение 30 минут. Затем лунки промывали 100 мкл PBS в течение 5 минут при 500 об./мин. и выбрасывали супернатант. Затем подготавливали блокатор TruStain FcX™ человека (BioLegend® 422302) посредством разведения 1,5 мкл FcX в 25 мкл окрашивающего буфера (1-кратного PBS, дополненного 2% FBS). Fc-блокирующий раствор (25 мкл/лунку) инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 10 минут в темноте. Мастер-микс из смеси антител подготавливали посредством разведения 1,5 мкл следующих антител на 100 мкл окрашивающего буфера: FITC-конъюгированного антитела против CD45 человека (BioLegend® 304038; клон HI30), конъюгированного с Brilliant Violet 605™ антитела против CD3 человека (BioLegend® 344836; клон SK7), PE/Cyanine7-конъюгированного антитела против CD56 человека (BioLegend® 362510; клон 5.1H11), PE-конъюгированного антитела против NKp46 человека (BioLegend® 331908; клон 9E2) и конъюгированного с Brilliant Violet 421™ антитела против CD107a человека (BioLegend® 328626; клон H4A3). Клетки ресуспендировали в мастер-миксе смеси (100 мкл) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут в темноте. Затем клетки промывали 3 раза в 100 мкл окрашивающего буфера в течение 5 минут при 500 об./мин. и выбрасывали супернатант. Клетки, ресуспендированные в 200 мкл окрашивающего буфера, держали при 4°C и в темноте до считывания с помощью проточного цитометра BD FACSCelesta™ и анализировали файлы FCS с помощью FlowJo™.

Данные, приведенные в таблице 1 и на фигуре 1, свидетельствуют о дозозависимой положительной регуляции CD107a на поверхности NK-клеток после обработки BCY15664 и BCY15911. Несвязывающие контроли, BCY15667 и BCY15666, не вызывали положительной регуляции выше базового уровня.

Данные, приведенные в таблице 1 и на фигуре 1, свидетельствуют о дозозависимой и зависящей от опухолевого антигена положительной регуляции CD107a на поверхности NK-клеток после обработки BCY15664 и BCY15911. Несвязывающий контроль (BCY15667) с бициклическими пептидами для EphA2 и NKp46, состоящими полностью из D-аминокислот, не вызывал положительной регуляции выше базового уровня. Кроме того, контроль (BCY15666) только с бициклическим пептидом для EphA2, состоящим полностью из D-аминокислот и, таким образом, способным связываться с NKp46, но не EphA2, не вызывал положительной регуляции выше базового уровня.

Таблица 1: Полумаксимальная эффективная концентрация (EC₅₀), ассоциированная с поверхностной экспрессией CD107a на NK-клетках, свидетельствующей о дегрануляции

<i>Номер комплекса</i>	<i>гетеротандемного</i>	<i>Геометрическое среднее EC₅₀ дегрануляции CD107a (нМ)</i>
------------------------	-------------------------	--

BCY15664	0,88
BCY15911	99,82
BCY15667	N/A
BCY15666	N/A

2. Анализ цитотоксичности НК-клеток

Гетеротандемные бициклические пептидные комплексы оценивали на функциональные данные НК-клеток (цитотоксичность и секреция цитокинов) в совместных культурах НК-клеток и линии опухолевых клеток.

НК-клетки выделяли с использованием набора для отрицательного выделения (STEMCELL™ Technologies 17955) из популяции тотальных РВМС, очищенных из цельной крови. Затем осадок НК-клеток ресуспендировали в среде DMEM (Corning™ 10-013-CV) с 10% термически инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой (FBS; Corning® 35-011-CV), 10 mM HEPES (Gibco™ 15-630-080), 1% пенициллина/стрептомицина (Corning™ 30-002-CI) и 50 МЕ/мл ИЛ-2 человека (Miltenyi Biotec® 130-097-748) в концентрации 4×10^5 клеток/мл. Для анализов цитотоксичности НК-клеток 50 мкл (2×10^4) суспензии клеток высевали в 96-луночный планшет (Grenier® Bio One™ 655090), содержащий 50 мкл (4×10^3) клеток HT1080-luc (ATCC® CCL-121-luc2) в DMEM (Gibco™ 11875-093; с L-глутамином) с 10% термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; Corning® 35-011-CV), 10 mM HEPES (Gibco™ 15-630-080) и 1% пенициллина/стрептомицина (Corning™ 30-002-CI). Тестируемые изделия или антитело (InvivoGen® hegfr-mab1) разводили в среде DMEM (Corning™ 10-013-CV) с 10% термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; Corning® 35-011-CV), 10 mM HEPES (Gibco™ 15-630-080) и 1% пенициллина/стрептомицина (Corning™ 30-002-CI)) и добавляли на соответствующий планшет с клетками (50 мкл) в предложенной начальной концентрации 10 нМ, титрованной в серии разведений 1/5, для получения серийного разведения из 8 точек. Затем планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C и 5% CO₂. После инкубации планшеты центрифугировали при 250×g в течение 5 минут и выбрасывали 100 мкл супернатанта. Затем образцы инкубировали в течение 10 минут с 50 мкл системы для анализа люциферазы Bright-Glo™ (Promega™ E2620). Люминесценцию после возбуждения при 570 нм считывали с использованием спектрофотометра для чтения планшетов CLARIOstar® с программным обеспечением для анализа данных MARS™. Данные аппроксимировали с помощью опции четырехпараметрической нелинейной регрессии в GraphPad Prism™ 8.0.2 для получения значения EC₅₀.

В этом анализе тестировали выбранные гетеротандемные бициклические пептидные комплексы по изобретению, и результаты приведены на фигурах 2-4 и 6-10.

На фигуре 2 показано, что BCY17226 вызывает дозозависимый ответ НК-клеток для уничтожения линии опухолевых клеток EphA2+ve HT1080-luc. Не наблюдали повышенного, дозозависимого эффекта при уничтожении опухолевых клеток в случае

несвязывающего гетеротандемного бициклического пептидного комплекса (BCY15667) по сравнению с совместной культурой NK:HT1080-luc без добавления гетеротандемного бициклического пептидного комплекса. Способное к ADCC антитело против EGFR (InvivoGen®, hegfr-mab1) использовали в анализе в качестве положительного референсного контроля для NK-индуцированной цитотоксичности. Средняя люминесценция для эксперимента без NK-TICA (обозначаемого как "без гетеротандемного бициклического пептидного комплекса") произвольно показана при 0,00001 пМ для референса. $EC_{50}=6,1$ пМ BCY17226 вычисляли с использованием четырехпараметрической логистической регрессии с помощью GraphPad Prism™ 8.0.2.

На фигуре 3 показано, что BCY15664 и BCY15923 вызывают дозозависимый ответ NK-клеток для уничтожения линии опухолевых клеток EphA2+ve HT1080-luc. Не наблюдали повышенного, дозозависимого эффекта при уничтожении опухолевых клеток в случае несвязывающего гетеротандемного бициклического пептидного комплекса (BCY15667) по сравнению с совместной культурой NK:HT1080-luc без добавления гетеротандемного бициклического пептидного комплекса. Способное к ADCC антитело против EGFR (InvivoGen®, hegfr-mab1) использовали в анализе в качестве положительного референсного контроля для NK-индуцированной цитотоксичности. Средняя люминесценция для эксперимента без NK-TICA (обозначаемого как "без гетеротандемного бициклического пептидного комплекса") произвольно показана при 0,00001 пМ для референса. BCY15664 (эпитоп 1 NKp46, $EC_{50}=21$ пМ) или BCY15923 (эпитоп 2 NKp46, $EC_{50}=44$ пМ) вычисляли с использованием четырехпараметрической логистической регрессии с помощью программного обеспечения GraphPad Prism™ 8.0.2.

На фигуре 4 показана необходимость связывающих опухолевый антиген бициклических пептидов в конструкции гетеротандемного бициклического пептидного комплекса для вызывания повышенной цитотоксической активности NK-клеток. Не наблюдали повышенного, дозозависимого эффекта при уничтожении опухолевых клеток в случае несвязывающего EphA2/несвязывающего NKp46 гетеротандемного бициклического пептидного комплекса (BCY15667) по сравнению с совместной культурой NK:HT1080-luc без добавления гетеротандемного бициклического пептидного комплекса. Не наблюдали повышенного, дозозависимого эффекта при уничтожении опухолевых клеток в случае несвязывающего EphA2/связывающего NKp46 гетеротандемного бициклического пептидного комплекса (BCY15666) по сравнению с совместной культурой NK:HT1080-luc без добавления гетеротандемного бициклического пептидного комплекса. Способное к ADCC антитело против EGFR (InvivoGen®, hegfr-mab1) использовали в анализе в качестве положительного референсного контроля для NK-индуцированной цитотоксичности. Средняя люминесценция для эксперимента без NK-TICA (обозначаемого как "без гетеротандемного бициклического пептидного комплекса") произвольно показана при 0,001 нМ для референса. $EC_{50}=16$ пМ BCY15664 вычисляли с использованием четырехпараметрической логистической регрессии с помощью GraphPad Prism™ 8.0.2.

На фигуре 6 показана повышенная цитотоксическая активность NK-клеток при

различной валентности бицикла NKp46 в конструкции NK-TICA. Наблюдали повышенный дозозависимый эффект при уничтожении опухолевых клеток в случае конструкций NK-TICA: BCY17225_01_02 ($EC_{50}=3,6$ пМ), BCY21686_01_01 ($EC_{50}=1,3$ пМ) по сравнению с совместной культурой NK:HT1080-luc без добавления NK-TICA. Не наблюдали повышенного, дозозависимого эффекта при уничтожении опухолевых клеток в случае несвязывающего NK-TICA (BCY15667_01_01). Способное к ADCC антитело против EGFR (InvivoGen®, hegfr-mab1) использовали в анализе в качестве положительного референсного контроля для NK-индуцированной цитотоксичности ($EC_{50}=0,053$ пМ). Средняя люминесценция для эксперимента без NK-TICA произвольно показана при 0,005 пМ для референса. Значения EC_{50} бициклов вычисляли с использованием четырехпараметрической логистической регрессии с помощью GraphPad Prism™ 8.0.2.

На фигуре 7 показана повышенная дозозависимая цитотоксическая активность NK-клеток с различной длиной спейсера конструкции NK-TICA. Повышенный, дозозависимый эффект при уничтожении опухолевых клеток наблюдают в случае конструкций бициклов NKp46 NK-TICA: BCY18731_01_01 ($EC_{50}=18$ пМ), BCY17231_01_01 ($EC_{50}=21$ пМ) и BCY17235_04_01 ($EC_{50}=14$ пМ) по сравнению с совместной культурой NK:HT1080-luc без добавления NK-TICA. Не наблюдали повышенного эффекта в отношении цитотоксичности NK-клеток в случае несвязывающего NK-TICA (BCY15667_01_01). Способное к ADCC антитело против EGFR (InvivoGen®, hegfr-mab1, 6,7 нМ) использовали в анализе в качестве положительного референсного контроля для NK-индуцированной цитотоксичности. Средняя люминесценция для эксперимента без NK-TICA произвольно показана при 0,05 пМ для референса. Значения EC_{50} бициклов вычисляли с использованием четырехпараметрической логистической регрессии с помощью GraphPad Prism™ 8.0.2.

На фигуре 8 показано повышенной дозозависимое уничтожение опухоли NK-клетками, обработанными конструкцией CD16-связывающего бицикла и NKp46-связывающего бицикла NK-TICA (BCY20793_01_01). Туморицидную активность NK-клеток наблюдали в случае BCY20793_01_01 ($EC_{50}=6,5$ пМ). Способное к ADCC антитело против EGFR (InvivoGen®, hegfr-mab1) использовали в анализе в качестве положительного референсного контроля для NK-индуцированной цитотоксичности ($EC_{50}=0,45$ пМ). Не наблюдали повышенного, дозозависимого эффекта при уничтожении опухолевых клеток в случае несвязывающего NK-TICA (BCY15667_01_01) по сравнению с совместной культурой NK:HT1080-luc без добавления NK-TICA. Средняя люминесценция для эксперимента без NK-TICA произвольно показана при 0,02 пМ для референса. Значения EC_{50} бициклов вычисляли с использованием четырехпараметрической логистической регрессии с помощью GraphPad Prism™ 8.0.2.

На фигуре 9 показаны альтернативные NKp46-связывающие бициклы в при NK-TICA-индуцированном повышенном уничтожении клеток HT1080-luc. NKp46-связывающие конструкции NK-TICA BCY18049_01_01 (EC_{50} =нестабильная), BCY18042_01_01 (EC_{50} =нестабильная) и BCY15924_01_01 ($EC_{50}=0,5$ нМ) повышали цитотоксичность NK-клеток в отношении линии опухолевых клеток HT1080-luc по

сравнению с совместной культурой NK:HT1080-luc без добавления NK-TICA. ВСУ15667_01_01 (несвязывающий NK-TICA) не имеет активности по сравнению с совместной культурой NK:HT1080-luc без добавления NK-TICA. Средняя люминесценция для эксперимента без NK-TICA произвольно показана при 0,001 пМ для референса. Способное к ADCC антитело против EGFR (InvivoGen®, hegfr-mab1, 6,7 нМ) использовали в анализе в качестве положительного референсного контроля для NK-индуцированной цитотоксичности. Значения EC_{50} вычисляли с использованием четырехпараметрической логистической регрессии с помощью GraphPad Prism™ 8.0.2.

На фигуре 10 показано, что NK-TICA, включающие дополнительные связывающиеся с опухолью плечи бицикла в NKp46-связывающей конструкции NK-TICA, индуцируют повышенное уничтожение клеток HT1080-luc. PD-L1-связывающая конструкция бицикла NK-TICA (ВСУ18603_01_01; $EC_{50}=3,0$ пМ) или МТ1-связывающая конструкция бицикла NK-TICA (ВСУ18604_01_01; $EC_{50}=7,9$ пМ) повышали цитотоксичность NK-клеток в отношении линии опухолевых клеток HT1080-luc по сравнению с совместной культурой NK:HT1080-luc без добавления NK-TICA. Несвязывающая контрольная конструкция NK-TICA (ВСУ15667_01_02) не имеет активности по сравнению с совместной культурой NK:HT1080-luc без добавления NK-TICA. Средняя люминесценция для эксперимента без NK-TICA произвольно показана при 0,005 пМ для референса. Способное к ADCC антитело против EGFR (InvivoGen®, hegfr-mab1) использовали в анализе в качестве положительного референсного контроля для NK-индуцированной цитотоксичности ($EC_{50}=0,70$ пМ). Значения EC_{50} вычисляли с использованием четырехпараметрической логистической регрессии с помощью GraphPad Prism™ 8.0.2.

3. Анализ секреции цитокинов

Гетеротандемные бициклические пептидные комплексы оценивали на функциональные данные NK-клеток (цитотоксичность и секреция цитокинов) в совместных культурах NK-клеток и линии опухолевых клеток.

NK-клетки выделяли с использованием набора для отрицательного выделения (STEMCELL Technologies® 17955) из популяции тотальных РВМС, очищенной из цельной крови. Затем осадок NK-клеток ресуспендировали в среде DMEM (Corning™ 10-013-CV) с 10% термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; Corning® 35-011-CV), 10 мМ HEPES (Gibco™ 15-630-080), 1% пенициллина/стрептомицина (Corning™ 30-002-CI) и 50 МЕ/мл ИЛ-2 человека (Miltenyi Biotec® 130-097-748) в концентрации 4×10^5 клеток/мл. Для анализа секреции цитокинов NK-клетками 2×10^5 NK-клеток в 50 мкл суспензии клеток высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном (Grenier Bio One™ 650180), содержащий 50 мкл (4×10^4) клеток HT1080-luc (ATCC® CCL-121-luc2) в DMEM (Gibco™ 11875-093; с L-глутамином) с 10% термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; Corning® 35-011-CV), 10 мМ HEPES (Gibco™ 15-630-080) и 1% пенициллина/стрептомицина (Corning™ 30-002-CI). Тестируемые изделия или антитело (InvivoGen®, hegfr-mab1) разводили в среде DMEM

(Corning™ 10-013-CV) с 10% термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; Corning® 35-011-CV), 10 mM HEPES (Gibco™ 15-630-080) и 1% пенициллина/стрептомицина (Corning™ 30-002-CI) и добавляли на соответствующий планшет с клетками (50 мкл) в предлагаемой начальной концентрации 10 нМ, титрованной в серии разведений 1/5 для получения серийного разведения с 8 точками. Затем планшеты инкубировали в течение 4 часов при 37°C и 5% CO₂. После инкубации планшеты центрифугировали при 250×g в течение 5 минут и собирали 100 мкл супернатанта. Образцы незамедлительно помещали на хранение при -20°C или оценивали на уровни цитокинов. Уровни интерферона-гамма или ФНО альфа измеряли в 50 мкл собранных супернатантов с помощью набора для ELISA ИФН гамма человека Quantikine™ (R&D Systems DIF50C) или набора для ELISA ФНО альфа человека Quantikine™ (R&D Systems DTA00D). Данные получали при длине волны 450 нм с помощью спектрофотометра для чтения планшетов CLARIOstar®, аппроксимировали с помощью опции четырехпараметрической нелинейной регрессии в программном обеспечении MARS Data Analysis™ для спектрофотометра для чтения планшетов CLARIOstar® и анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism™ 8.0.2 для количественного анализа уровней цитокинов. Альтернативно, цитокины ФНО альфа и ИФН гамма измеряли в 25 мкл собранного супернатанта с помощью набора Human XL Cytokine Discovery Premixed Kit для анализа Luminex (R&D Systems, FCSTM18-05), проточного цитометра Luminex 200™ и аналитического программного обеспечения xPONENT™.

Выбранные гетеротандемные бициклические пептидные комплексы по изобретению тестировали в этом анализе, и результаты показаны на фигурах 5, 11 и 12.

На фигуре 5 показано, что NK-клетки, сокультивированные с линией опухолевых клеток HT1080-luc в присутствии BCY17226 или несвязывающего гетеротандемного бициклического пептидного комплекса BCY15667. В качестве положительного контроля использовали способное к ADCC антитело против EGFR (InvivoGen, hegfr-mab1). Высвобождение цитокина (ИФН γ) измеряли посредством ELISA (R&D systems, DIF50C), используя опцию четырехпараметрической нелинейной регрессии в спектрофотометре для чтения планшетов CLARIOstar™ и программного обеспечения MARS Data Analysis™.

На фигуре 11 показано, что NK-клетки продуцируют ФНО альфа и ИФН гамма при совместном культивировании с линией опухолевых клеток HT1080-luc в присутствии 2 нМ NKp46-связывающих конструкции бицикла NK-TICA с разной валентностью бицикла NKp46. Продукцию цитокинов NK-клетками наблюдали при добавлении BCY00017225_01_02, BCY21686_01_01, BCY21687_01_01 по сравнению с несвязывающей конструкции NK-TICA (BCY15667_01_01). Способное к ADCC антитело против EGFR (InvivoGen, hegfr-mab1) использовали в качестве положительного референсного контроля для NK-индуцированной продукции цитокинов (1,34 нМ). Высвобождение цитокинов (ИФН гамма и ФНО альфа) измеряли с помощью набора Human XL Cytokine Discovery Premixed Kit для анализа Luminex (R&D Systems, FCSTM18-05), проточного цитометра Luminex 200 и аналитического программного обеспечения xPONENT.

На фигуре 12 показано, что НК-клетки секретируют цитокины при совместном культивировании с линией опухолевых клеток HT1080-luc в присутствии 10 нМ НКp46-связывающей конструкции бицикла НК-TICA со структурными модификациями. НКp46-связывающий бицикл НК-TICA (BCY18048_01_01) индуцировал секрецию ИФН гамма и ФНО альфа по сравнению с отсутствием продукции цитокинов при обработке несвязывающими НК-TICA (BCY15667_01_01 или BCY15666_01_01). В качестве положительного контроля использовали способное к ADCC антитело против EGFR (InvivoGen, hegfr-mab1) в концентрации 6,7 нМ. Высвобождение цитокинов (ИФН гамма и ФНО альфа) измеряли посредством ELISA (R&D systems, DIF50C, DTA00D), используя опцию четырехпараметрической нелинейной регрессии в спектрофотометре для чтения планшетов CLARIOstar™ и программном обеспечении MARS Data Analysis™.

ССЫЛКИ

Chinnery F *et al.* Oncoimmunology. 2012 Sep 1;1(6):874-883. doi: 10.4161/onci.20636. PMID: 23162755; PMCID: PMC3489743.

Arnon TI *et al.* Blood. 2004 Jan 15;103(2):664-72. doi: 10.1182/blood-2003-05-1716. Epub 2003 Sep 22. PMID: 14504081.

Moretta L *et al.* Semin Immunol. 2006 Jun;18(3):151-8. doi: 10.1016/j.smim.2006.03.002. Epub 2006 May 26. PMID: 16730454.

Costello RT *et al.* Blood. 2002 May 15;99(10):3661-7. doi: 10.1182/blood.v99.10.3661. PMID: 11986221.

Garcia-Iglesias T *et al.* BMC Cancer. 2009 Jun 16;9:186. doi: 10.1186/1471-2407-9-186. PMID: 19531227; PMCID: PMC2704222.

Nayyar G *et al.* Front Oncol. 2019 Feb 11;9:51. doi: 10.3389/fonc.2019.00051. PMID: 30805309; PMCID: PMC6378304.

Stojanovic A, Cerwenka A. J Innate Immun. 2011;3(4):355-64. doi: 10.1159/000325465. Epub 2011 Apr 18. PMID: 21502747.

Sordo-Bahamonde C *et al.* Cell Immunotherapy. Cancers (Basel). 2020 Apr 7;12(4):893. doi: 10.3390/cancers12040893. PMID: 32272610; PMCID: PMC7226138.

Watanabe M *et al.* Dis Esophagus. 2010 Nov;23(8):675-81. doi: 10.1111/j.1442-2050.2010.01073.x. PMID: 20545975.

Izawa S *et al.* Cancer Immunol Immunother. 2011 Dec;60(12):1801-10. doi: 10.1007/s00262-011-1082-7. Epub 2011 Aug 3. PMID: 21811786.

Koo KC *et al.* PLoS One. 2013 Nov 4;8(11):e78049. doi: 10.1371/journal.pone.0078049. PMID: 24223759; PMCID: PMC3817174.

Sun C *et al.* Cell Mol Immunol. 2015 May;12(3):292-302. doi: 10.1038/cmi.2014.91. Epub 2014 Oct 13. PMID: 25308752; PMCID: PMC4654321.

Hasmim M *et al.* Front Immunol. 2015 Sep 23;6:482. doi: 10.3389/fimmu.2015.00482. PMID: 26441986; PMCID: PMC4585210.

Han B *et al.* J Immunol Res. 2018 Sep 3;2018:6248590. doi: 10.1155/2018/6248590. PMID: 30255106; PMCID: PMC6140275.

- Stringaris K *et al.* *Haematologica*. 2014 May;99(5):836-47. doi: 10.3324/haematol.2013.087536. Epub 2014 Jan 31. PMID: 24488563; PMCID: PMC4008119.
- Rocca YS *et al.* *Front Immunol*. 2016 Oct 10;7:413. doi: 10.3389/fimmu.2016.00413. PMID: 27777574; PMCID: PMC5056190.
- Gauthier L *et al.* *Cell*. 2019 Jun 13;177(7):1701-1713.e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.041. Epub 2019 May 30. PMID: 31155232.
- Fauriat C *et al.* *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):323-30. doi: 10.1182/blood-2005-08-027979. Epub 2006 Aug 29. PMID: 16940427.
- Mamessier E *et al.* *Cancer Res*. 2011 Nov 1;71(21):6621-32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0792. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21937679.
- Platonova S *et al.* *Cancer Res*. 2011 Aug 15;71(16):5412-22. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4179. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21708957.
- Levi I *et al.* *Oncotarget*. 2015 May 30;6(15):13835-43. doi: 10.18632/oncotarget.3453. PMID: 26079948; PMCID: PMC4537053.
- Kim HS *et al.* *Immunity*. 2010 Feb 26;32(2):175-86. doi: 10.1016/j.immuni.2010.02.004. PMID: 20189481; PMCID: PMC2843589.
- MacFarlane AW 4th *et al.* *Oncoimmunology*. 2017 May 19;6(7):e1330235. doi: 10.1080/2162402X.2017.1330235. PMID: 28811973; PMCID: PMC5543845.
- Muta T *et al.* Erratum in: *Nature*. 1994 May 26;369(6478):340. PMID: 8107887.
- Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:275-90. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.275. PMID: 11244038.
- Arnould L *et al.* *Br J Cancer*. 2006 Jan 30;94(2):259-67. doi: 10.1038/sj.bjc.6602930. PMID: 16404427; PMCID: PMC2361112.
- Zhang W *et al.* *J Clin Oncol*. 2007 Aug 20;25(24):3712-8. doi: 10.1200/JCO.2006.08.8021. PMID: 17704420.
- Zhang X *et al.* *Mol Immunol*. 2020 Mar;119:48-58. doi: 10.1016/j.molimm.2020.01.009. Epub 2020 Jan 21. PMID: 31978707.
- Wu SY *et al.* *Mol Cancer*. 2020 Aug 6;19(1):120. doi: 10.1186/s12943-020-01238-x. PMID: 32762681; PMCID: PMC7409673.
- Manches O *et al.* *Blood*. 2003 Feb 1;101(3):949-54. doi: 10.1182/blood-2002-02-0469. Epub 2002 Oct 3. PMID: 12393572.
- Clynes RA *et al.* *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):443-6. doi: 10.1038/74704. PMID: 10742152.
- Riddle DS *et al.* *Hum Gene Ther*. 2005 Jul;16(7):830-44. doi: 10.1089/hum.2005.16.830. PMID: 16000065.
- Rataj F *et al.* *Br J Cancer*. 2019 Jan;120(1):79-87. doi: 10.1038/s41416-018-0341-1. Epub 2018 Nov 15. PMID: 30429531; PMCID: PMC6325122.
- Caratelli S *et al.* *Front Immunol*. 2017 Apr 27;8:457. doi: 10.3389/fimmu.2017.00457. PMID: 28496440; PMCID: PMC5406408.
- Felices M *et al.* *Methods Mol Biol*. 2016;1441:333-46. doi: 10.1007/978-1-4939-3684-7_28. PMID: 27177679; PMCID: PMC5823010.

Moore GL *et al.* *MAbs*. 2011 Nov-Dec;3(6):546-57. doi: 10.4161/mabs.3.6.18123. Epub 2011 Nov 1. PMID: 22123055; PMCID: PMC3242841.

Gleason MK *et al.* *Blood*. 2014 May 8;123(19):3016-26. doi: 10.1182/blood-2013-10-533398. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24652987; PMCID: PMC4014844.

Davis ZB *et al.* *Semin Immunol*. 2017 Jun;31:64-75. doi: 10.1016/j.smim.2017.07.011. Epub 2017 Sep 5. PMID: 28882429; PMCID: PMC5632228.

Felices M *et al.* *Blood Adv*. 2019 Mar 26;3(6):897-907. doi: 10.1182/bloodadvances.2018029371. PMID: 30890546; PMCID: PMC6436008.

Gauthier L *et al.* *Cell*. 2019 Jun 13;177(7):1701-1713.e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.041. Epub 2019 May 30. PMID: 31155232.

Ben-Shmuel A *et al.* *Front Immunol*. 2020 Feb 21;11:275. doi: 10.3389/fimmu.2020.00275. PMID: 32153582; PMCID: PMC7046808.

Tarazona R *et al.* *Cancer Immunol Immunother*. 2020 May;69(5):879-899. doi: 10.1007/s00262-020-02532-9. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32130453.

Davis ZB *et al.* *Semin Immunol*. 2017 Jun;31:64-75. doi: 10.1016/j.smim.2017.07.011. Epub 2017 Sep 5. PMID: 28882429; PMCID: PMC5632228.

Pasero C *et al.* *Oncotarget*. 2015 Jun 10;6(16):14360-73. doi: 10.18632/oncotarget.3965. PMID: 25961317; PMCID: PMC4546472.

Stringaris K *et al.* *Haematologica*. 2014 May;99(5):836-47. doi: 10.3324/haematol.2013.087536. Epub 2014 Jan 31. PMID: 24488563; PMCID: PMC4008119.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс содержащий:

(а) первый пептидный лиганд, связывающийся с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке, конъюгированный через линкер с

(b) одним или более вторыми пептидными лигандами, связывающимися с одним или более компонентами, присутствующими на естественном киллере (NK);

где каждый из указанных пептидных лигандов содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, образующий ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида таким образом, что на молекулярном каркасе образуются по меньшей мере две полипептидные петли.

2. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.1, где указанная реакционноспособная группа представляет собой остатки цистеина.

3. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.1 или п.2, где один или более компонентов, присутствующих на естественном киллере (NK), представляют собой природный цитотоксический рецептор, присутствующий на поверхности NK-клетки, такой как NKp30, NKp44 и NKp46, в частности NKp46, где один или более вторых пептидных лигандов содержат один или более NKp46-связывающих бициклических пептидных лигандов.

4. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.3, где один или более NKp46-связывающих бициклических пептидных лигандов содержат аминокислотную последовательность, выбранную из:

$C_i Y[Cba]PDYLC_{ii}[dA]DEYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 5);

$C_i YLPDYLC_{ii}GDEYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 6);

$C_i DLTTHNC_{ii}QWGIC_{iii}$ (SEQ ID NO: 7);

$C_i NLQAPC_{ii}MQTGKVC_{iii}$ (SEQ ID NO: 8);

$C_i NLQNPC_{ii}MKFPC_{iii}$ (SEQ ID NO: 9);

$C_i YLPDYLC_{ii}[dK(PYA)]DEYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 10); и

$C_i LLHDHC_{ii}PNTHPKLC_{iii}$ (SEQ ID NO: 11);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, и где Cba представляет собой β -циклобутилаланин, dA представляет собой D-аланин, и PYA представляет собой пентиноевую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль, в частности:

где молекулярный каркас представляет собой TATA, и один или более NKp46-связывающих бициклических пептидных лигандов необязательно содержат N-концевые и/или C-концевые модификации и содержат:

Ac-(SEQ ID NO: 5)-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY17224);

A-(SEQ ID NO: 6)-A-[dK(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY15452);

A-(SEQ ID NO: 7)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как

BCY15686);

A-(SEQ ID NO: 8)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY15687);

A-(SEQ ID NO: 9)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY18004);

A-(SEQ ID NO: 10)-A (в настоящем описании обозначаемый как BCY17662); и

A-(SEQ ID NO: 11)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY18005);

где PYA представляет собой пентиноевую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

5. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.1 или п.2, где один или более компонентов, присутствующих на естественном киллере (НК), представляют собой Fc-рецептор, присутствующий на поверхности НК-клетки, такой как низкоаффинный Fc-рецептор гамма (FcγR), выбранный из FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIA и FcγRIIB, в частности, FcγRIIA (также известный как CD16a), где один или более вторых пептидных лигандов содержат один или более CD16a-связывающих бициклических пептидных лигандов.

6. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.5, где один или более CD16a-связывающих бициклических пептидных лигандов содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

C_iVGLEELGPC_{ii}SDLC_{iii} (SEQ ID NO: 12);

C_iRWHFSEPC_{ii}GAWC_{iii} (SEQ ID NO: 13); и

C_iRWSVEDPC_{ii}GAWC_{iii} (SEQ ID NO: 14);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемую соль, в частности:

где молекулярный каркас представляет собой ТВМТ, и один или более CD16a-связывающих бициклических пептидных лигандов необязательно содержат N-концевые и/или C-концевые модификации и содержат:

A-(SEQ ID NO: 12)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY13886);

A-(SEQ ID NO: 13)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY20361); и

A-(SEQ ID NO: 14)-A-[K(PYA)] (в настоящем описании обозначаемый как BCY13883);

где PYA представляет собой пентиноевую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

7. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп. 1-6, где злокачественная клетка выбрана из опухолевых клеток HT1080, A549, SC-OV-3, PC3, HT1376, NCI-H292, LnCap, MC38, MC38 #13, 4T1-D02, H322, HT29, T47D и RKO.

8. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп. 1-7, где

компонент, присутствующий на злокачественной клетке, представляет собой EphA2, где первый пептид содержит EphA2-связывающий бициклический пептидный лиганд.

9. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.8, где EphA2-связывающий бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой:



где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляет собой первую (i), вторую (ii) и третью (iii) реакционноспособные группы, HyP представляет собой транс-4-гидрокси-L-пролин, HArg представляет собой гомоаргинин или его фармацевтически приемлемую соль, в частности:

где молекулярный каркас представляет собой ТАТА, и EphA2-связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно содержит N-концевые модификации и содержит:



где HArg представляет собой гомоаргинин или его фармацевтически приемлемую соль.

10. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп. 1-7, где компонент, присутствующий на злокачественной клетке, представляет собой PD-L1, где первый пептид содержит PD-L1-связывающий бициклический пептидный лиганд.

11. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.10, где PD-L1-связывающий бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой:



где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первую (i), вторую (ii) и третью (iii) группы цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемую соль, в частности:

где молекулярный каркас представляет собой ТАТА, и PD-L1-связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно содержит N-концевые и/или C-концевые модификации и содержит:

Ac-D-[Harg]- (SEQ ID NO: 3)-PSH (в настоящем описании обозначаемый как BCY11865);

где Harg из представляет собой гомоаргинин или его фармацевтически приемлемую соль.

12. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп. 1-7, где компонент, присутствующий на злокачественной клетке, представляет собой MT1, где первый пептид содержит MT1-связывающий бициклический пептидный лиганд.

13. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.12, где MT1-связывающий бициклический пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой:



где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первую (i), вторую (ii) и третью (iii) группы цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемую соль, в частности:

где молекулярный каркас представляет собой ТАТА, и МТ1-связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно содержит N-концевые и/или С-концевые модификации и содержит:

LPP-(SEQ ID NO: 4) (в настоящем описании обозначаемый как ВСУ14320);
или его фармацевтически приемлемую соль.

14. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп. 1-13, являющийся любым из комплексов, приведенных в таблицах А1, А2, А3, В1, С, D и Е.

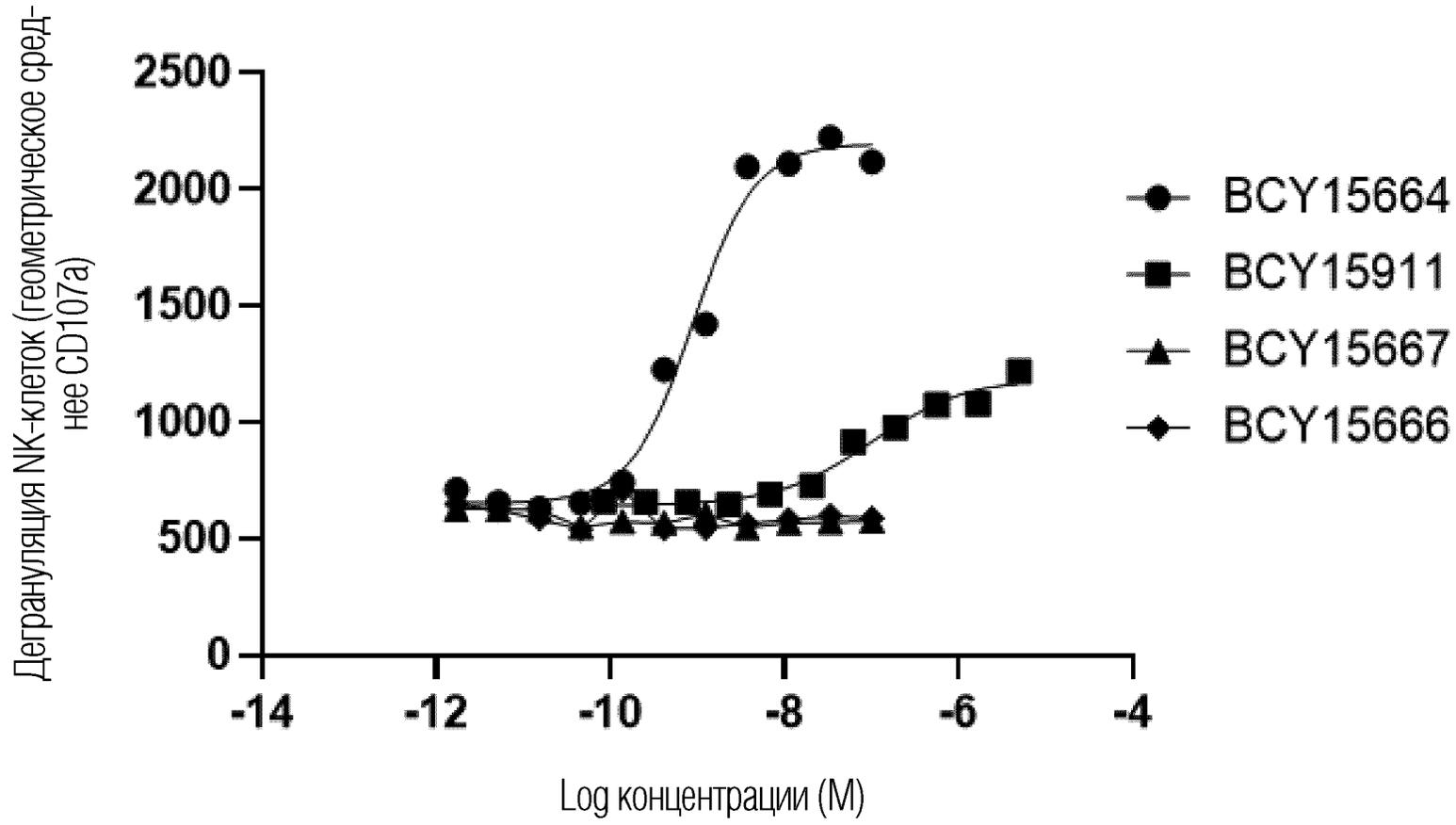
15. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп. 1-14, где фармацевтически приемлемая соль выбрана из соли свободной кислоты или натрия, калия, кальция, аммония.

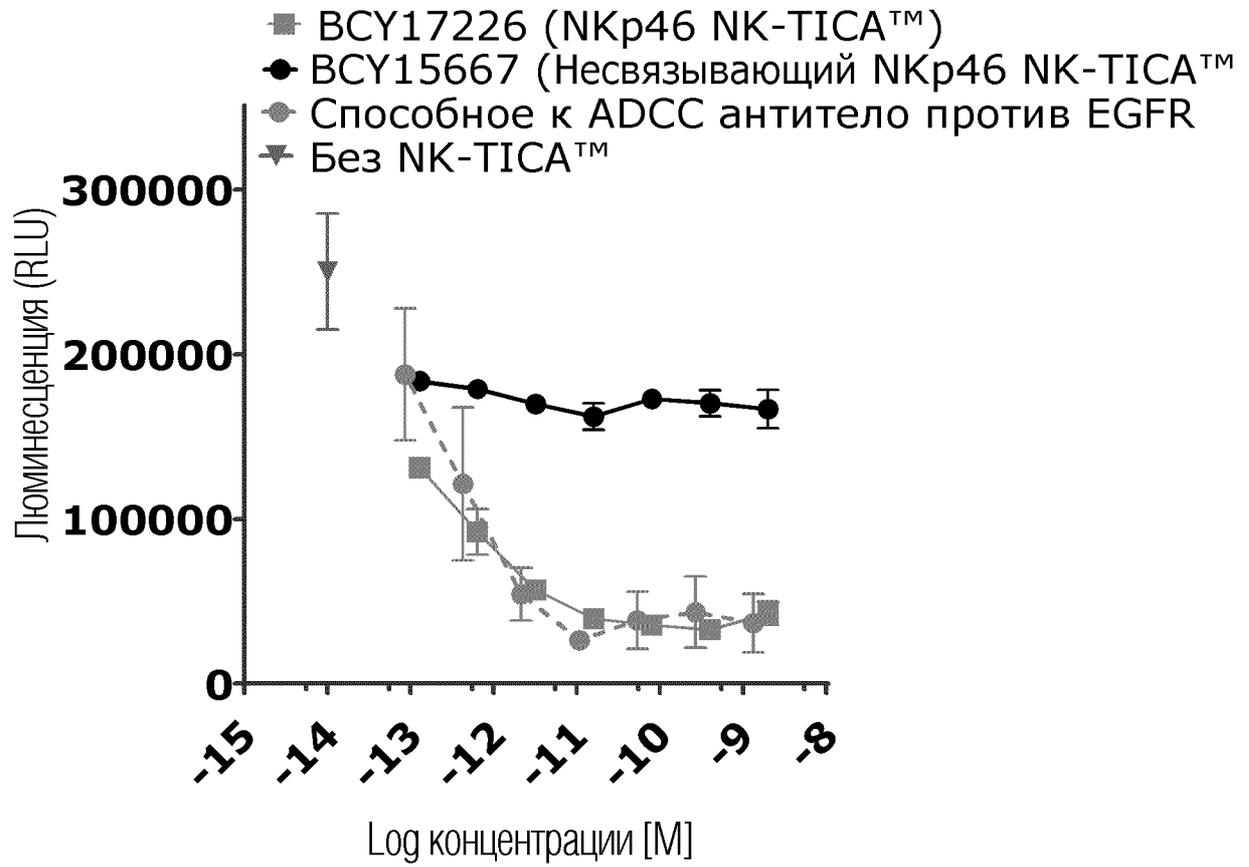
16. Фармацевтическая композиция, содержащая гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп. 1-15 в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

17. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому из пп. 1-15 или фармацевтическая композиция по п. 16 для применения в профилактике, супрессии или лечении злокачественного новообразования.

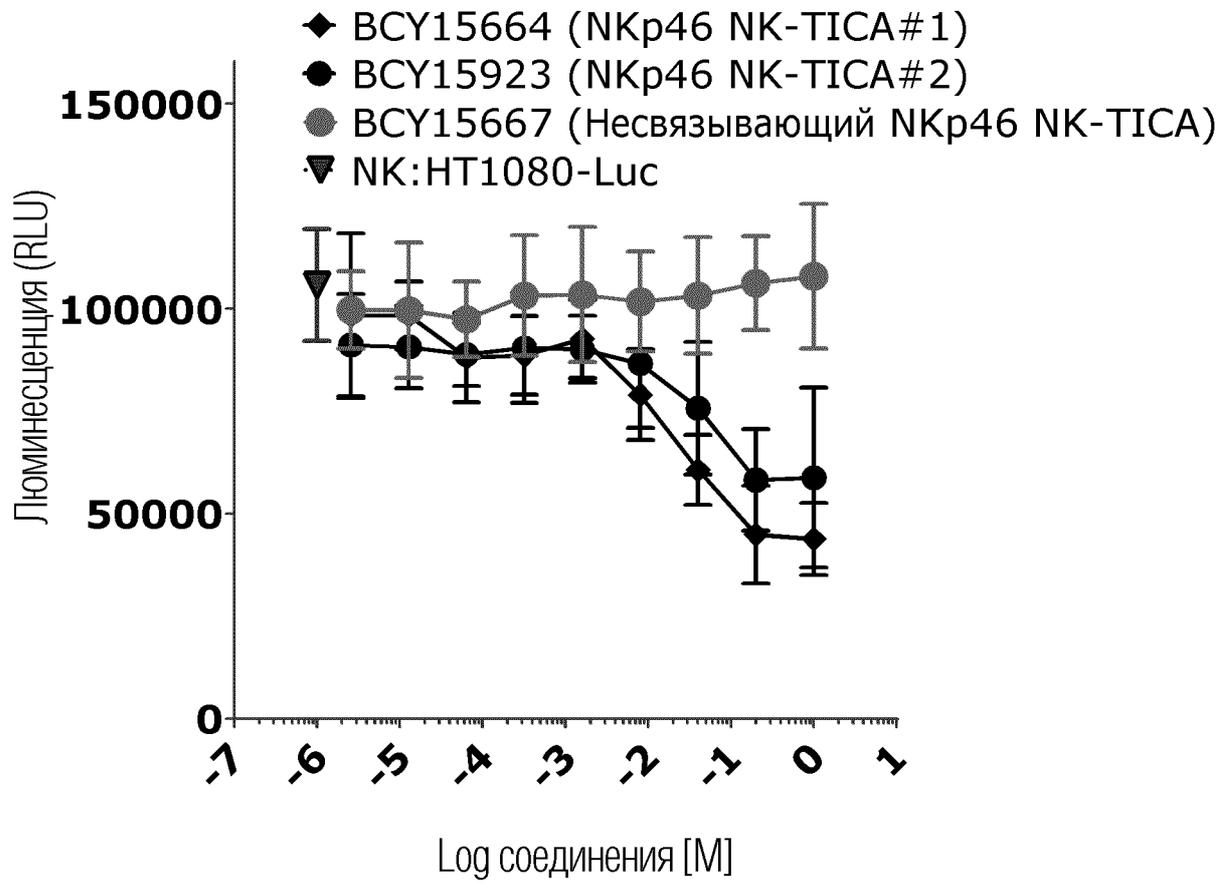
По доверенности

ФИГ. 1

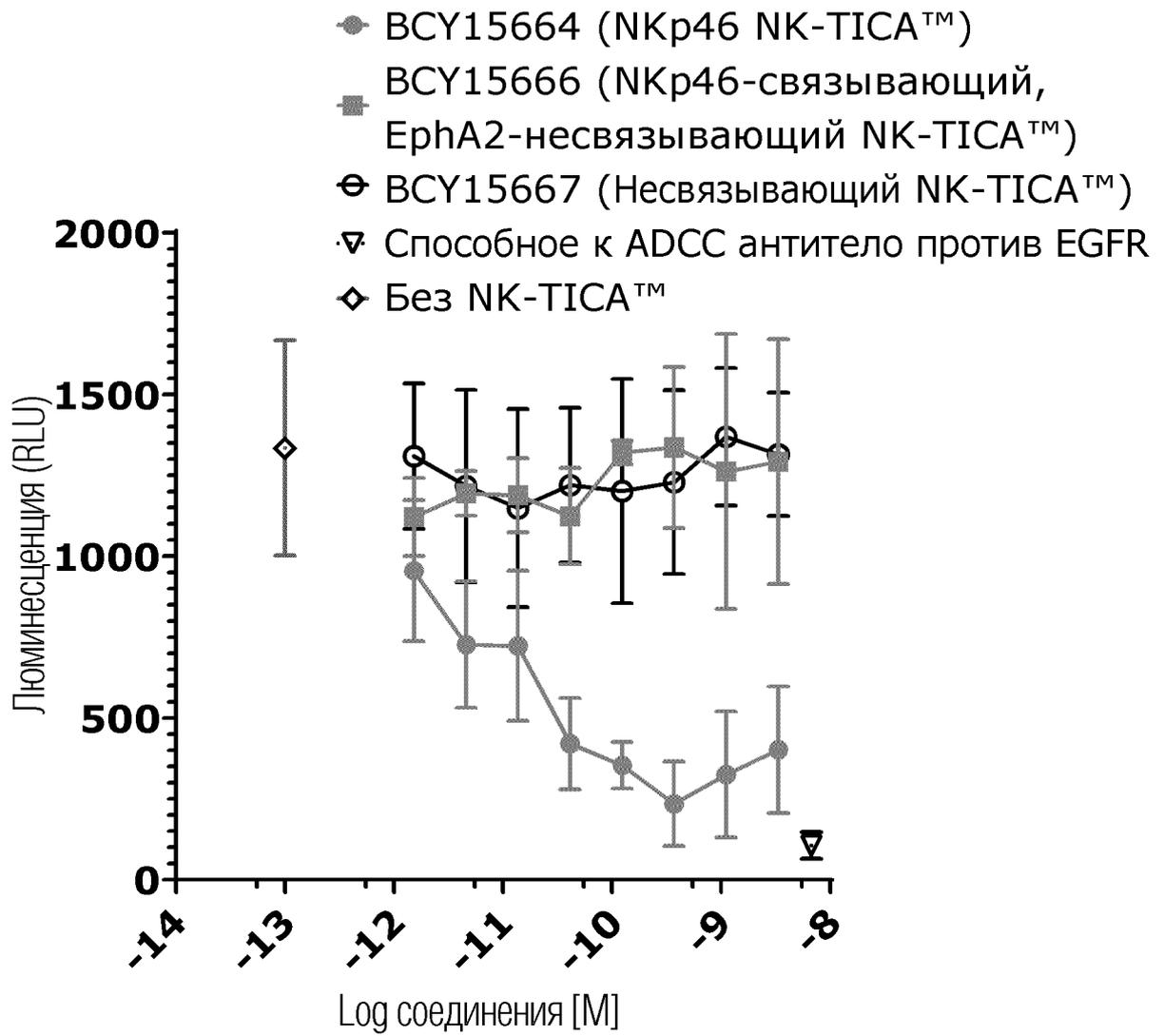




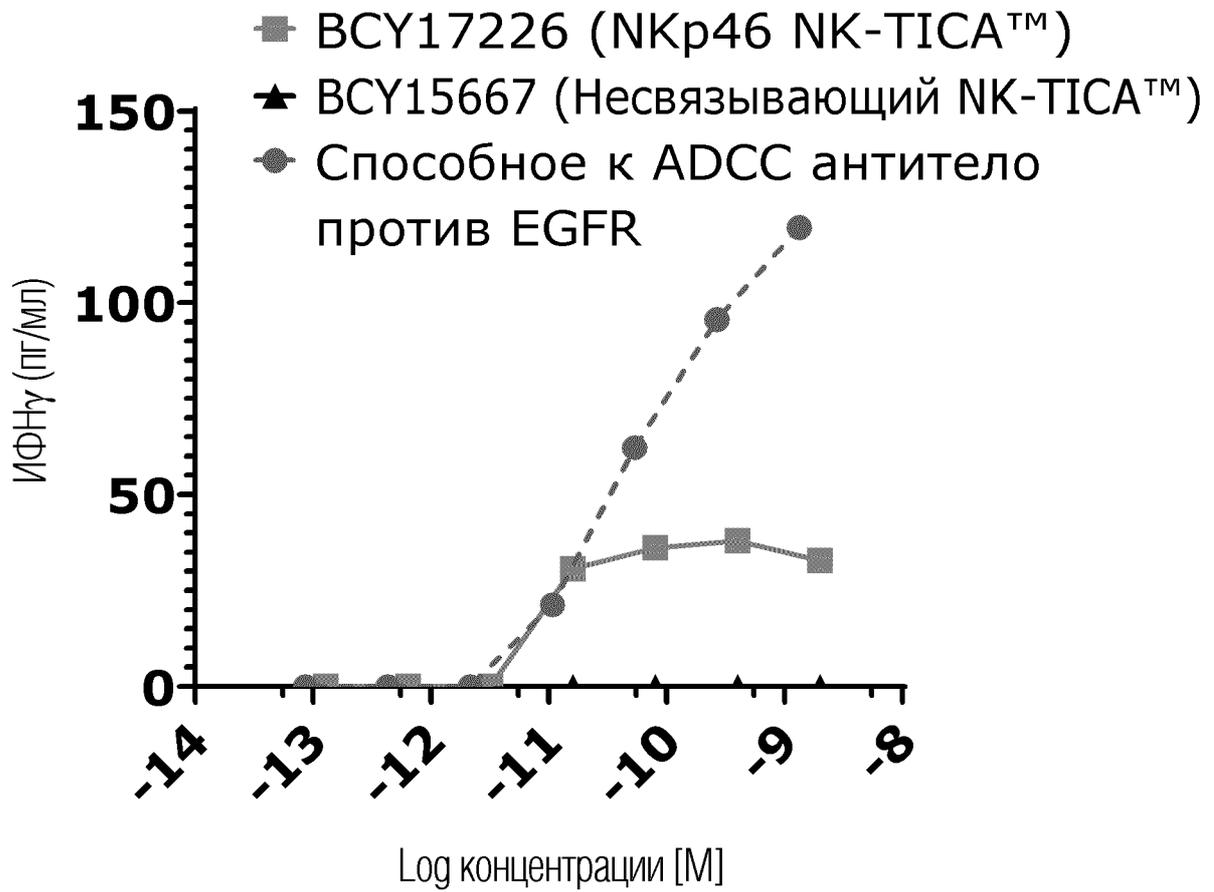
ФИГ. 2



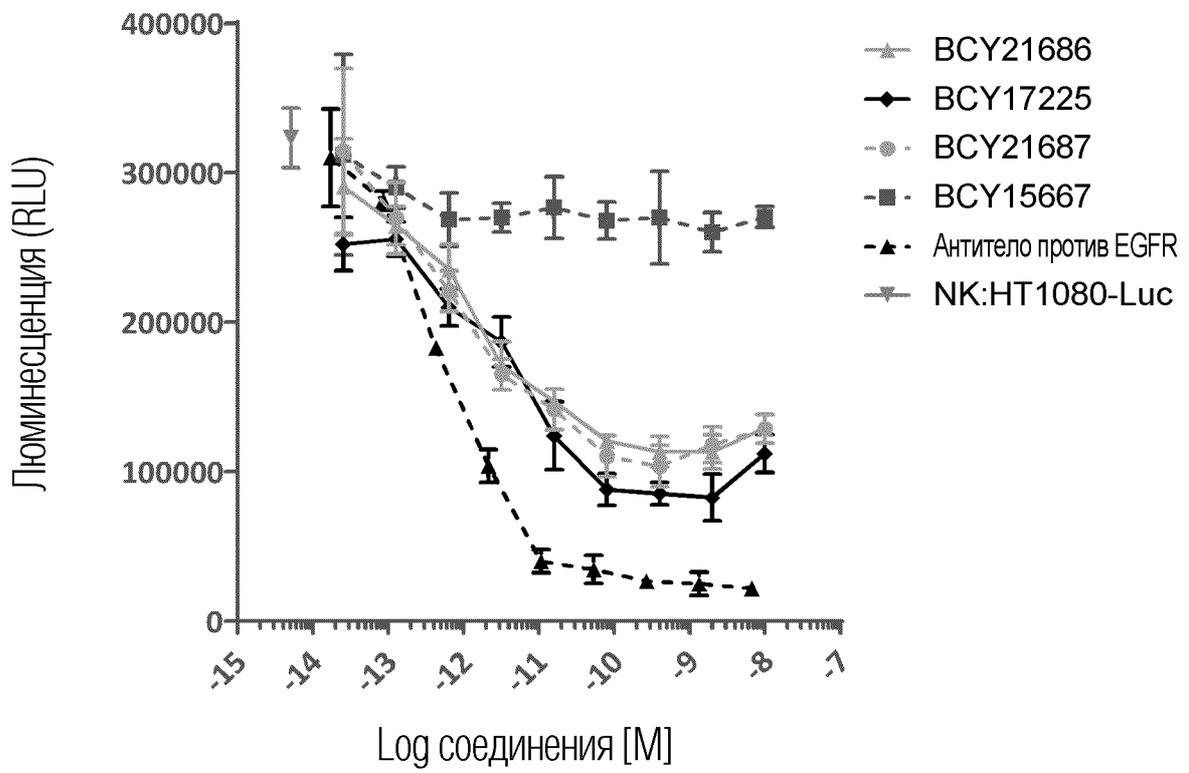
ФИГ. 3



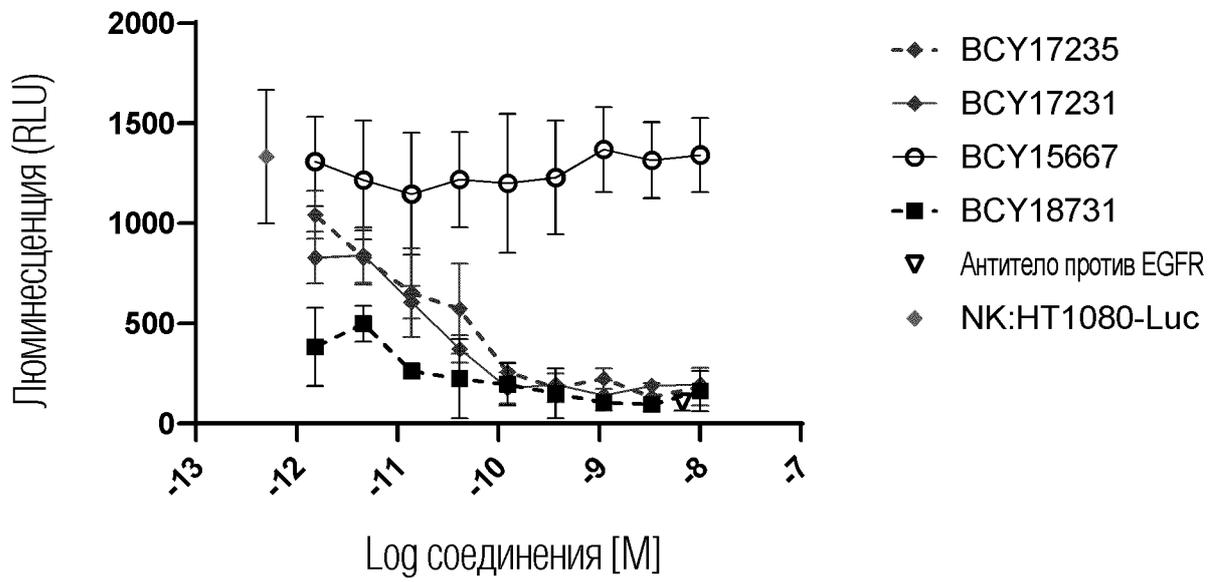
ФИГ. 4



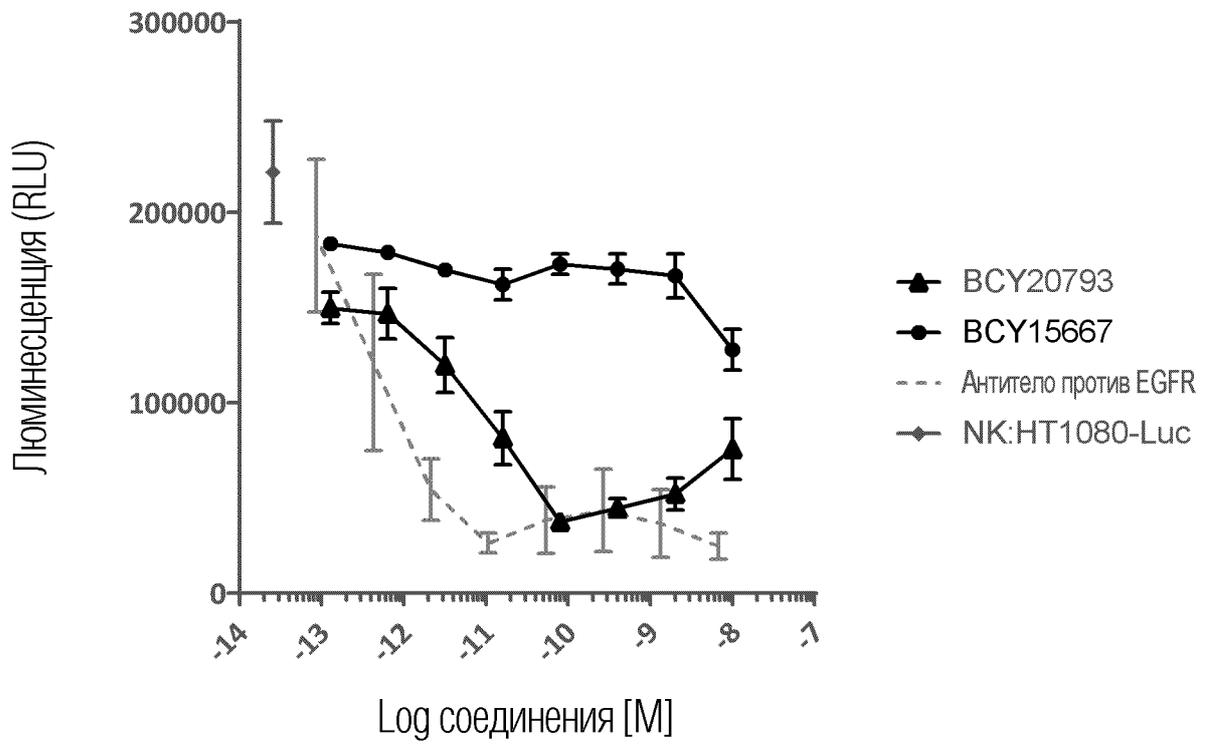
ФИГ. 5



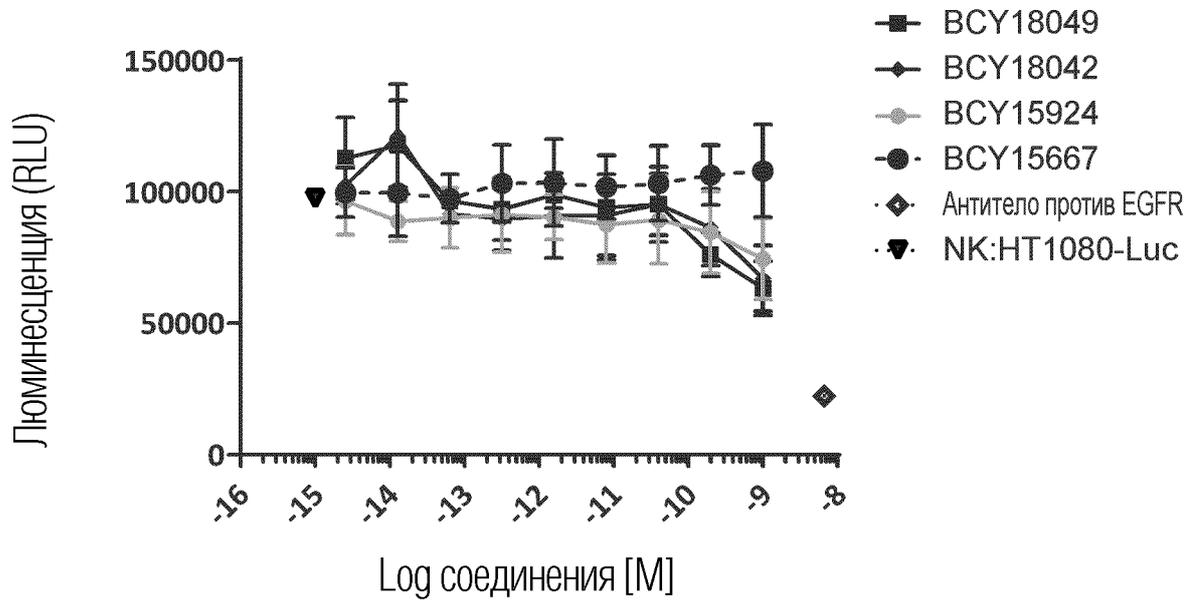
ФИГ. 6



ФИГ. 7

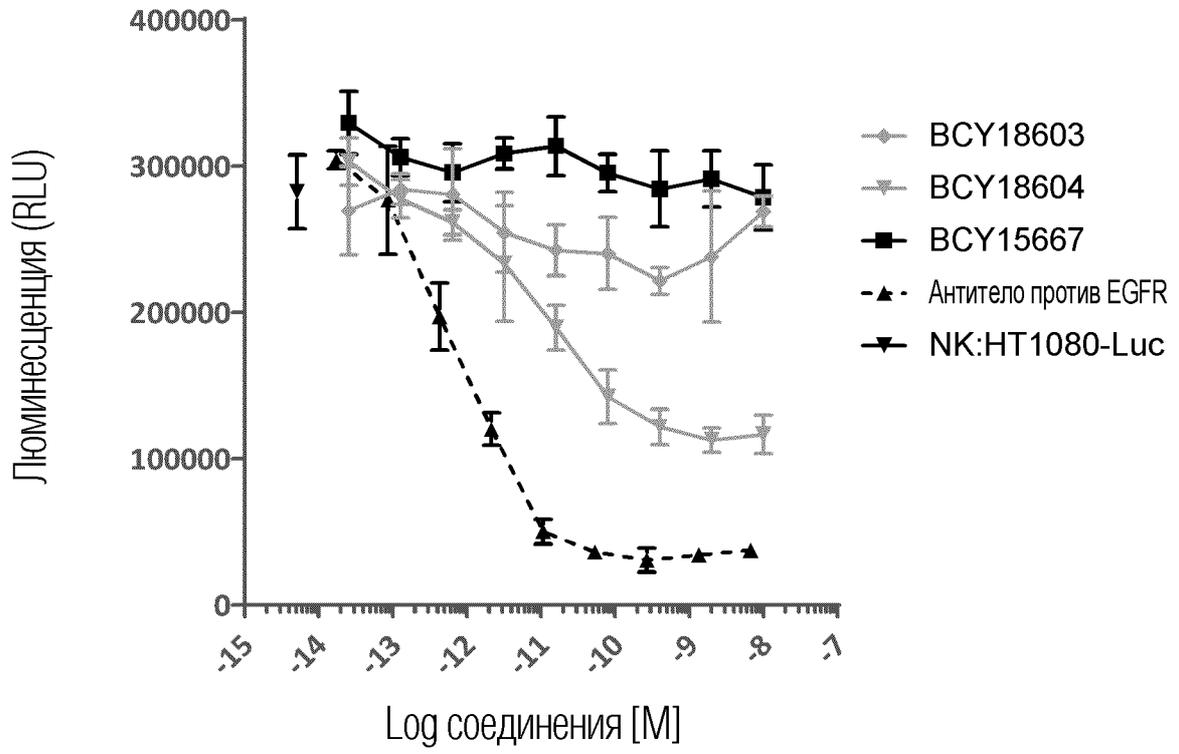


ФИГ. 8

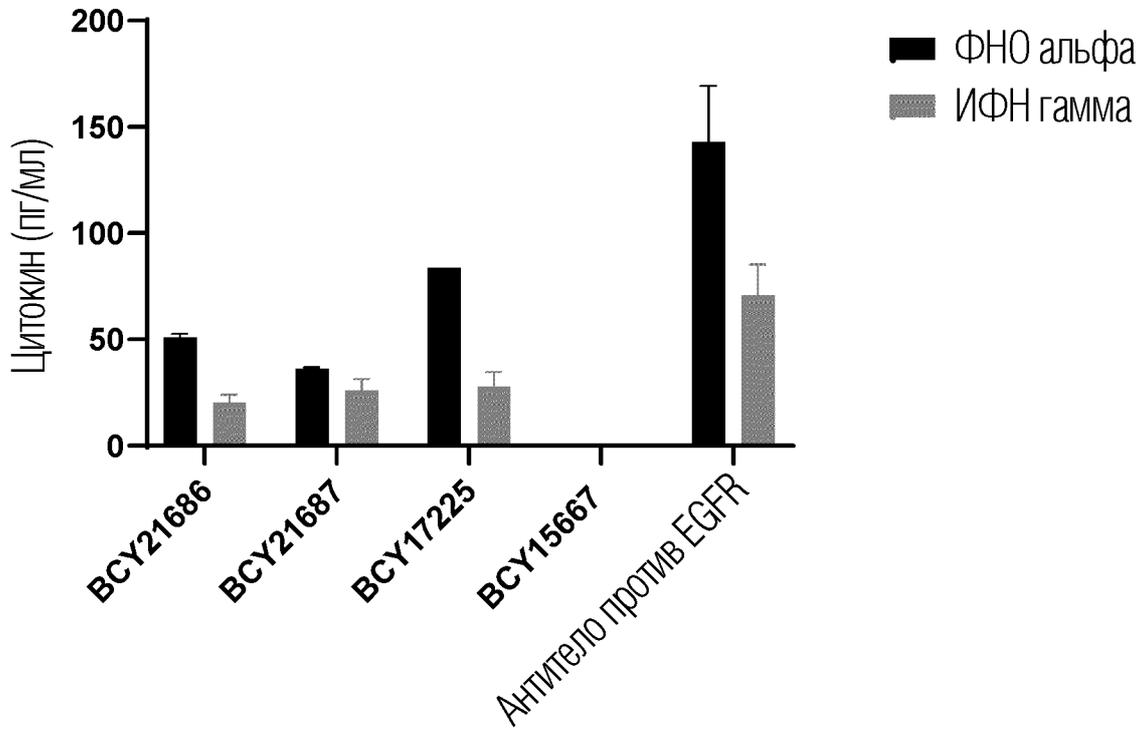


ФИГ. 9

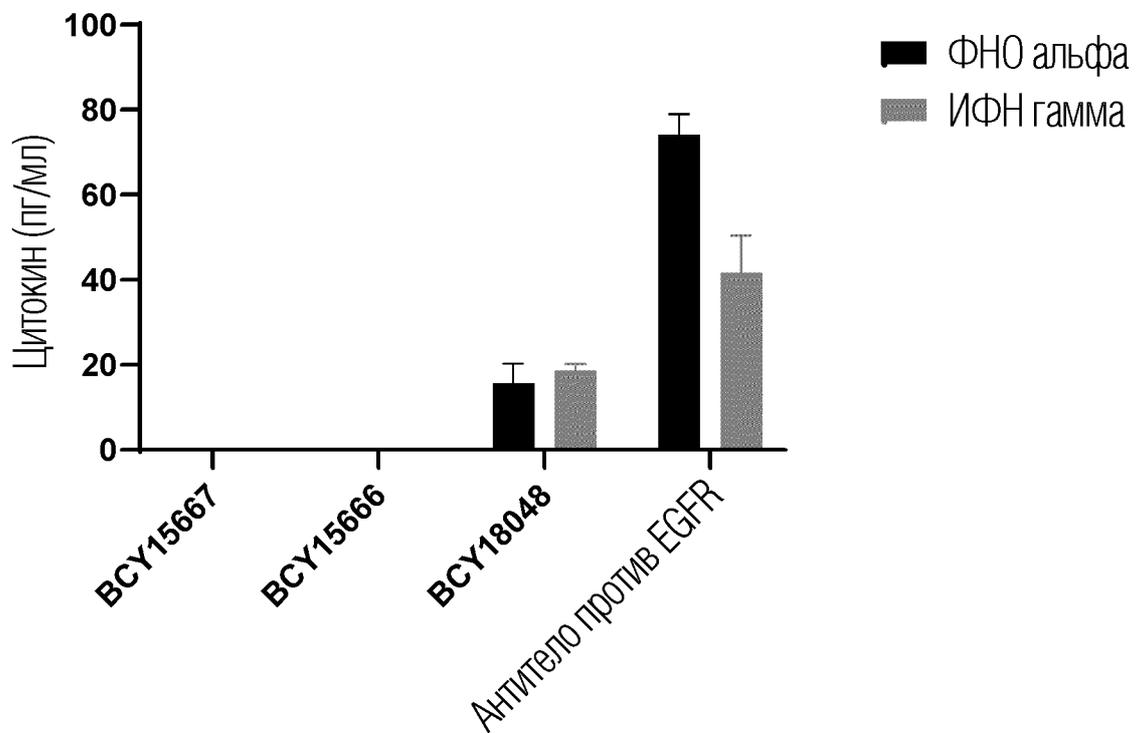
10/12



ФИГ. 10



ФИГ. 11



ФИГ. 12