

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044591**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.13

(21) Номер заявки
201991551

(22) Дата подачи заявки
2017.12.20

(51) Int. Cl. **C07K 7/08** (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)

(54) ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ С МТ1-ММР

(31) **1622142.6; 1713560.9**

(32) **2016.12.23; 2017.08.23**

(33) **GB**

(43) **2020.03.02**

(86) **PCT/EP2017/083954**

(87) **WO 2018/115204 2018.06.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙСИКЛТЭКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Тьюфел Дэниел, Мадд Джемма, Паван
Сильвия (GB)**

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

(56) **WO-A1-2016067035
WO-A2-2009098450**

(57) Пептидный лиганд, специфический в отношении МТ1-ММР, включающий полипептид, включающий два остатка диаминопропионовой кислоты (Dap) или N-алкилдиаминопропионовой кислоты (N-AlkDap), и третий остаток, выбранный из цистеина, Dap или N-AlkDap, разделенные по меньшей мере последовательностями двух петель, и молекулярный каркас, при этом пептид связан с каркасом ковалентными алкиламино связями с Dap или N-AlkDap остатками полипептида и ковалентными тиоэфирными связями с цистеином, когда третий остаток представляет собой цистеин, таким образом, на молекулярном каркасе образуются полипептидные петли, где пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность формулы (II): $-A_1-X_1-U/O_2-X_3-X_4-G_5-A_2-E_6-D_7-F_8-Y_9-X_{10}-X_{11}-A_3-$ (SEQ ID NO: 1) (II) или его фармацевтически приемлемую соль; где: A_1 , A_2 , и A_3 независимо представляют собой цистеин, L-2,3-диаминопропионовую кислоту (Dap), N-бета-алкил-L-2,3-диаминопропионовую кислоту (N-AlkDap) или N-бета-галогеналкил-L-2,3-диаминопропионовую кислоту (N-HAlkDap), при условии, что по меньшей мере один из A_1 , A_2 и A_3 представляет собой Dap, N-AlkDap или N-HAlkDap; X представляет собой любой аминокислотный остаток; U представляет собой полярный незаряженный аминокислотный остаток, выбранный из N, C, Q, M, S и T; и O представляет собой неполярный алифатический аминокислотный остаток, выбранный из G, A, I, L, P и V.

044591
B1

044591
B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к пептидным лигандам, демонстрирующим высокую аффинность связывания с МТ1-ММР. В частности, изобретение относится к пептидным лигандам этого типа, имеющим новые химические структуры для образования двух или более связей между пептидом и каркасной молекулой.

Предпосылки создания изобретения

Различные команды исследователей ранее связывали пептиды с фрагментами каркаса путем образования двух или более тиоэфирных связей между цистеиновыми остатками пептида и подходящими функциональными группами каркасной молекулы. Например, способы получения потенциальных лекарственных соединений путем связывания цистеин-содержащих пептидов с молекулярным каркасом, как, например трис(бромметил)бензолом, раскрыты в WO 2004/077062 и WO 2006/078161.

Преимущество использования цистеинтиолов для получения ковалентных тиоэфирных связей для достижения циклизации остатков состоит в их селективной и биортогональной реакционной способности. Тиол-содержащие линейные пептиды могут быть циклизованы с реакционноспособным по отношению к тиолу каркасным соединением, таким как 1,3,5-трис-бромметилбензол (ТВМВ), с образованием Бициклических Пептидов, и полученный продукт содержит три тиоэфира в местах расположения бензила. Общая реакция линейного пептида с ТВМВ с образованием петлевого бициклического пептида с тиоэфирными связями показана на фиг. 1.

Существует потребность в альтернативных химических технологиях для связывания пептидов с фрагментами каркаса с образованием петлевых пептидных структур, применяя подходящие замены тиоэфирного фрагмента, тем самым достигая совместимости с различными пептидами, изменений физико-химических свойств, таких как улучшенная растворимость, изменений в биораспределении и других преимуществ.

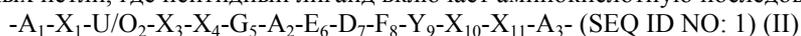
WO 2011/018227 описывает способ изменения конформации первого пептидного лиганда или группы пептидных лигандов, причем каждый пептидный лиганд включает по меньшей мере две реакционноспособные группы, разделенные последовательностью петли, ковалентно связанной с молекулярным каркасом, который образует ковалентные связи с указанными реакционноспособными группами, с получением второго пептидного лиганда или группы пептидных лигандов, включающий объединение указанного второго производного или группы производных из пептида(ов) и каркаса указанного первого производного или группы производных, включая одно из следующих: (а) изменение по меньшей мере одной реакционноспособной группы; или (b) изменение типа молекулярного каркаса; или (с) изменение связи между по меньшей мере одной реакционноспособной группой и молекулярным каркасом; или любую комбинацию (а), (b) или (с).

Более ранее опубликованная заявка авторов настоящего изобретения WO 2016/067035 и находящаяся на рассмотрении заявка GB 1607827.1, поданная 4^{го} мая 2016 года, описывают бициклические пептидные лиганды, имеющие высокую аффинность связывания в отношении МТ1-ММР. Эти заявки также описывают конъюгаты пептидных лигандов с терапевтическими средствами, в частности с цитотоксическими средствами. Полное раскрытие этих заявок явным образом включено в настоящую заявку.

Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что замещение тиоэфирных связей в петлевых пептидах, обладающих аффинностью к МТ1-ММР, алкиламино связями приводит к петлевым пептидным конъюгатам, которые проявляют схожие аффинности к МТ1-ММР, как у соответствующих конъюгатов, полученных со всеми тиоэфирными связями. Ожидают, что замещение тиоэфирных связей алкиламино связями приведет к улучшенной растворимости и/или улучшенной устойчивости к окислению конъюгатов в соответствии с настоящим изобретением.

Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение обеспечивает пептидный лиганд, специфический в отношении МТ1-ММР, включающий полипептид, включающий три остатка, выбранных из цистеина, L-2,3-диаминопропионовой кислоты (Dap), N-бета-алкил-L-2,3-диаминопропионовой кислоты (N-AlkDap) и N-бета-галогеналкил-L-2,3-диаминопропионовой кислоты (N-HAlkDap), причем указанные три остатка разделены по меньшей мере последовательностями двух петель, и молекулярный каркас, при этом пептид связан с каркасом ковалентными алкиламино связями с Dap или N-AlkDap или N-HAlkDap остатками полипептида и тиоэфирными связями с цистеиновыми остатками полипептида, когда указанные три остатка включают цистеин, таким образом, на молекулярном каркасе образуются две полипептидных петли, где пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность формулы (II):



или его фармацевтически приемлемую соль;

где:

A₁, A₂, и A₃ независимо представляют собой цистеин, L-2,3-диаминопропионовую кислоту (Dap), N-бета-алкил-L-2,3-диаминопропионовую кислоту (N-AlkDap) или N-бета-галогеналкил-L-2,3-диаминопропионовую кислоту (N-HAlkDap), при условии, что по меньшей мере один из A₁, A₂, и A₃ представляет собой Dap, N-AlkDap или N-HAlkDap;

X представляет собой любой аминокислотный остаток;

U представляет собой полярный, незаряженный аминокислотный остаток, выбранный из N, C, Q, M, S и T; и

O представляет собой неполярный алифатический аминокислотный остаток, выбранный из G, A, I, L, P и V.

Как можно видеть, производные по настоящему изобретению включают пептидную петлю, связанную с каркасом по меньшей мере одной алкиламино связью с Dar или N-AlkDar остатков N-HAlkDar и до двух тиоэфирных связей с цистеином. Соответственно, A₁, A₂, и A₃ состоят из одного цистеина и двух остатков, выбранных из Dar, N-AlkDar или N-HAlkDar. Префикс "алкил" в N-AlkDar и N-HAlkDar относится к алкильной группе, содержащей от одного до четырех атомов углерода, предпочтительно к метилу. Префикс "галоген" используют в данном контексте в обычном смысле для обозначения алкильных групп, имеющих один или более, предпочтительно один, фтор-, хлор-, бром- или йод- заместителей.

Когда присутствует цистеин, тиоэфирная связь(и) обеспечивает якорь в процессе образования циклических пептидов, как объяснено ниже. В этих вариантах осуществления тиоэфирная связь предпочтительно представляет собой центральную связь бициклического пептидного конъюгата, то есть в последовательности пептида два остатка, образующих алкиламино связи в пептиде, расположены на расстоянии с обеих сторон цистеинового остатка, образующего тиоэфирную связь. Петлевая структура пептида, следовательно, представляет собой бициклический пептидный конъюгат, имеющий центральную тиоэфирную связь и две периферические алкиламино связи. В альтернативных вариантах осуществления тиоэфирная связь находится на N-конце или C-конце пептидов, при этом центральная связь и другая концевая связь выбраны из Dar, N-AlkDar или N-HAlkDar.

В вариантах осуществления настоящего изобретения все три из A₁, A₂, и A₃ предпочтительно могут представлять собой Dar или N-AlkDar или N-HAlkDar. В этих вариантах осуществления пептидные лиганды по настоящему изобретению предпочтительно являются бициклическими конъюгатами, имеющими центральную алкиламино связь и две периферические алкиламино связи, при этом пептид образует две петли, для которых центральная алкиламино связь является общей. В этих вариантах осуществления A₁, A₂, и A₃ все предпочтительно выбраны из N-AlkDar или N-HAlkDar, наиболее предпочтительно N-AlkDar, благодаря благоприятной кинетике реакции с алкилированными Daps.

Подходящим образом, X₁ выбран из любой одной из следующих аминокислот: Y, M, F или V, такой как Y, M или F, в частности Y или M, более конкретно Y.

Подходящим образом, U/O₂ выбран из U, такого как N, или O, такого как G.

Подходящим образом, X₃ выбран из U или Z, где U представляет собой полярный незаряженный аминокислотный остаток, выбранный из N, C, Q, M, S и T, и Z представляет собой полярный отрицательно заряженный аминокислотный остаток, выбранный из D или E, в частности, U в положении 3 выбран из Q, или Z в положении 3 выбран из E.

Подходящим образом, X₄ выбран из J, где J представляет собой неполярный ароматический аминокислотный остаток, выбранный из F, W и Y.

Подходящим образом, X₁₀ выбран из Z, где Z представляет собой полярный, отрицательно заряженный аминокислотный остаток, выбранный из D или E, такой как D.

Подходящим образом, X₁₁ выбран из O, где O представляет собой неполярный алифатический аминокислотный остаток, выбранный из G, A, I, L, P и V, такой как I.

Подходящим образом, бициклическое соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIa):

- A₁-Y/M/F/V-U/O-U/Z-J-G-A₂-E-D-F-Y-Z-O-A₃ - (SEQ ID NO: 6) (IIa),

где U, O, J и Z такие, как определено выше; или соединение формулы (IIb):

- A₁-Y/M/F/V-N/G-E/Q-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃ - (SEQ ID NO: 7) (IIb); или

соединение формулы (IIc):

- A₁-Y/M/F-N/G-E/Q-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃ - (SEQ ID NO: 8) (IIc); или

соединение формулы (IId):

- A₁-Y/M-N-E/Q-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃ - (SEQ ID NO: 9) (IId); или

соединение формулы (IIe):

- A₁-Y-N-E-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃ - (17-69-07) (SEQ ID NO: 2) (IIe).

Подходящим образом, бициклическое соединение формулы (II) включает последовательность, выбранную из:

- A₁-Y-N-E-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃ (17-69-07) (SEQ ID NO: 2);

- A₁-M-N-Q-F-G- A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃ (17-69-12) (SEQ ID NO: 10);

- A₁-F-G-E-F-G- A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃ (17-69-02) (SEQ ID NO: 11);

- A₁-V-N-E-F-G- A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃ (17-69-03) (SEQ ID NO: 12);

- A₁-F-N-E-F-G- A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃ (17-69-04) (SEQ ID NO: 13);

- A₁-Y-N-E-Y-G- A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃ (SEQ ID NO: 14); и

- A₁-Y-N-E-W-G- A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃ (SEQ ID NO: 15), такую как:

- A₁-Y-N-E-F-G- A₂-E-D-F-Y-D-I- A₃ (17-69-07) (SEQ ID NO: 2); и

- A₁-M-N-Q-F-G- A₂-E-D-F-Y-D-I- A₃ (17-69-12) (SEQ ID NO: 10),

в частности:

- A₁-Y-N-E-F-G- A₂-E-D-F-Y-D-I- A₃ (17-69-07) (SEQ ID NO: 2),

более конкретно:

Дар гомологи 17-69-07-N241, обозначенные как SEQ ID 16: ((bAla)-Sar10-AA₁ (D-Ala)NE(1Nal) (D-Ala) A₂EDFYD (tBuGly)A₃;

и Дар гомологи 17-69-07-N268, обозначенные как SEQ ID 17: AA₁ (D-Ala) NE (1Nal) (D-Ala) A₂EDFYD (tBuGly) A₃.

Во всех вышеперечисленных последовательностях A₁, A₂, и A₃ такие, как определено выше. Подходящие и предпочтительные типы и положения A₁, A₂, и A₃ такие, как определено выше.

В вариантах осуществления пептидный лиганд по настоящему изобретению дополнительно включает 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 (например, замену одного или более полярных аминокислотных остатков одной или более изостерическими или изоэлектронными аминокислотами; замены одного или более гидрофобных аминокислотных остатков другими неприродными изостерическими или изоэлектронными аминокислотами); добавления спейсерной группы; замены одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или более устойчивыми к окислению аминокислотными остатками; замены одного или более аминокислотных остатков 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; замещения водорода на α-углероде одного или более аминокислотных остатков другой химической группой, и постсинтетической биоортогональной модификации аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат и тирозин, подходящими реагентами, реакционноспособными по отношению к амину, тиолу, карбоновой кислоте и фенолу.

Подходящим образом, эти варианты осуществления могут включать N-концевую модификацию с использованием подходящей амино-реактивной химии и/или C-концевую модификацию с использованием подходящей карбокси-реактивной химии. Например, N-концевая модификация может включать добавление молекулярной спейсерной группы, которая облегчает конъюгирование эффекторных групп и сохранение активности бициклического пептида к его мишени. Спейсерная группа предпочтительно представляет собой олигопептидную группу, содержащую от около 5 до около 30 аминокислот, таких как Ala, G-Sar10-A группа или bAla-Sar10-A группа. Альтернативно или дополнительно, N-концевая и/или C-концевая модификация включает добавление цитотоксического агента.

Другие возможные пептидные модификации включают модификацию в положении аминокислоты 1 и/или 9.

В вариантах осуществления пептидная модификация включает замену одного или более аминокислотных остатков одним или более неприродными аминокислотными остатками. Например, где замена неприродным аминокислотным остатком происходит в положении 4, и остаток выбран из: 1-нафтилаланина; 2-нафтилаланина; 3,4-дихлорфенилаланина; и гомофенилаланина, такого как 1-нафтилаланин; 2-нафтилаланина; и 3,4-дихлорфенилаланина, в частности 1-нафтилаланина. Альтернативно или дополнительно, замена неприродным аминокислотным остатком происходит в положении 9 и/или 11, и остаток выбран из: 4-бромфенилаланина или пентафтор-фенилаланина для положения 9 и/или трет-бутилглицина для положения 11. В этих вариантах осуществления неприродные аминокислотные остатки, такие как те, которые присутствуют в положении 9, могут быть выбраны из: 4-бромфенилаланина, и/или неприродные аминокислотные остатки, такие как те, которые присутствуют в положении 11, выбраны из: трет-бутилглицина.

В вариантах осуществления аминокислотный остаток в положении 1 заменяют D-аминокислотой, такой как D-аланин. В других вариантах осуществления, аминокислотный остаток в положении 5 заменяют D-аминокислотой, такой как D-аланин или D-аргинин.

Подходящим образом, пептидный лиганд может включать множество вышеуказанных модификаций, например, 2, 3, 4 или 5 или более из следующих модификаций, например все из следующих 5 модификаций: D-аланин в положении 1 и/или 5, 1-нафтилаланин в положении 4, 4-бромфенилаланин в положении 9 и трет-бутилглицин в положении 11.

Во всех из пептидных последовательностей, определенных в настоящем изобретении, один или более тирозиновых остатков могут быть заменены фенилаланином. Было обнаружено, что это улучшает выход бициклического пептидного продукта в процессе катализируемой основанием реакции сочетания пептида с каркасной молекулой.

Подходящим образом, пептидный лиганд по настоящему изобретению представляет собой высокоаффинное связующее гемопексинового домена MT1-MMP человека, мыши и собаки. Предпочтительно аффинность связывания K_d составляет менее чем около 100 нМ, менее чем около 50 нМ, менее чем около 25 нМ или менее чем около 10 нМ.

Соответственно, пептидный лиганд по настоящему изобретению является селективным по отношению к MT1-MMP, но не вступает в перекрестную реакцию с MMP-1, MMP-2, MMP-15 и MMP-16. Соот-

ветственно, аффинность связывания k_f с каждым из этих лигандов составляет более чем около 500 нМ, более чем около 1000 нМ или более чем около 10000 нМ.

Подходящим образом, каркас включает (гетеро)ароматический или (гетеро)алициклический фрагмент. Подходящим образом, каркас включает трис-замещенный (гетеро)ароматический или (гетеро)алициклический фрагмент, например трис-метилен-замещенный (гетеро)ароматический или (гетеро)алициклический фрагмент. (Гетеро)ароматический или (гетеро)алициклический фрагмент предпочтительно представляет собой шести-членную кольцевую структуру, предпочтительно трис-замещенную, таким образом, каркас имеет ось симметрии 3-го порядка. Таким образом, в некоторых предпочтительных вариантах осуществления каркас представляет собой 1,3,5-трис-метилбензол. В других предпочтительных вариантах осуществления каркас представляет собой 1,3,5-трис-(ацетамидо)бензольную группу, которая может быть образована путем реакции сочетания пептида с 1,3,5-трис-(бромацетамидо)бензолом (ТВАВ), как описано более подробно ниже.

Во втором аспекте настоящее изобретение обеспечивает пептид, включающий аминокислотную последовательность формулы (II), как определено выше в отношении первого аспекта настоящего изобретения. Соответственно, пептид является подходящим для получения пептидного лиганда по настоящему изобретению путем связывания с подходящей каркасной молекулой, как описано ниже. Подходящим образом, пептид представляет собой линейный пептид.

В следующем аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения пептидного лиганда в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, при этом способ включает: обеспечение пептида в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения; обеспечение каркасной молекулы, имеющей по меньшей мере три реакционноспособных сайта для образования алкиламино связей с амино группами боковых цепей указанных цистеиновых остатков и диаминопропионовой кислоты или β -N-алкилдиаминопропионовой кислоты; и образование указанных алкиламино связей между пептидом и каркасной молекулой.

Реакционноспособные сайты также подходят для образования тиоэфирных связей с группами -SH цистеина в вариантах осуществления, где третий остаток представляет собой цистеин. Группа -SH цистеина является высоконуклеофильной, и в этих вариантах осуществления, как ожидают, она сначала будет реагировать с электрофильными центрами каркасной молекулы для закоривания пептида на каркасной молекуле, после чего амино группы взаимодействуют с оставшимися электрофильными центрами каркасной молекулы с образованием петлевого пептидного лиганда.

В вариантах осуществления пептид содержит защитные группы на нуклеофильных группах, отличных от амино групп и групп -SH (когда они присутствуют), предназначенных для образования алкиламино связей.

Подходящим образом, способ по настоящему изобретению включает взаимодействие, в реакции нуклеофильного замещения, пептида, определенного в настоящем изобретении, с каркасной молекулой, имеющей три или более удаляемых групп.

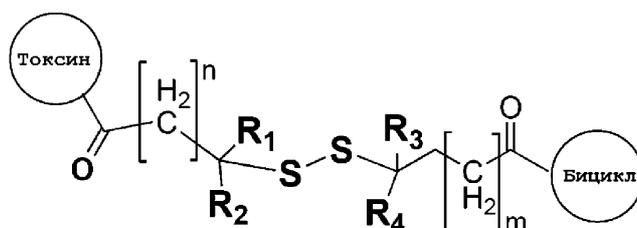
В альтернативных способах соединения по настоящему изобретению можно получить путем преобразования двух или более групп боковых цепей пептида в удаляемые группы с последующим взаимодействием пептида, в реакции нуклеофильного замещения, с каркасной молекулой, имеющей две или более амино группы.

Реакции нуклеофильного замещения можно осуществлять в присутствии основания, когда удаляемая группа представляет собой обычную анионную удаляемую группу. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что выходы циклизованных пептидных лигандов можно значительно увеличить путем подходящего выбора растворителя и основания для реакции нуклеофильного замещения, и, кроме того, что предпочтительный растворитель и основание отличаются от известных комбинаций растворителя и основания, которые приводят только к формированию тиоэфирных связей. В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что улучшенные выходы достигаются при использовании триалкиламинового основания, то есть основания формулы $NR_1R_2R_3$, где R_1 , R_2 и R_3 независимо представляют собой C1-C5 алкильные группы, предпочтительно C2-C4 алкильные группы, в частности C2-C3 алкильные группы. Особенно подходящими основаниями являются триэтиламин и диизопропилэтиламин (DIPEA). Эти основания обладают таким свойством, что являются лишь слабо нуклеофильными, и считается, что это свойство объясняет меньшее количество побочных реакций и более высокие выходы, наблюдаемые с этими основаниями. Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что предпочтительными растворителями для реакции нуклеофильного замещения являются полярные и протонные растворители, в частности MeCN/H₂O (50:50).

В следующем аспекте настоящее изобретение обеспечивает конъюгат лекарственного средства, включающий пептидный лиганд по настоящему изобретению, конъюгированный с одной или более эффекторными и/или функциональными группами, такими как цитотоксический агент или металлохелатор.

Подходящим образом, конъюгат содержит цитотоксический агент, связанный с пептидным лигандом расщепляемой связью, такой как дисульфидная связь. Подходящим образом, цитотоксический агент выбран из DM1 или MMAE.

В вариантах осуществления конъюгат лекарственного средства имеет следующую структуру:



где R_1 , R_2 , R_3 и R_4 представляют собой водород или C1-C6 алкильные группы;

Токсин относится к любому подходящему цитотоксическому агенту;

Бициклическое соединение представляет собой петлевую пептидную структуру;

n представляет собой целое число, выбранное из 1-10; и

m представляет собой целое число, выбранное из 0-10.

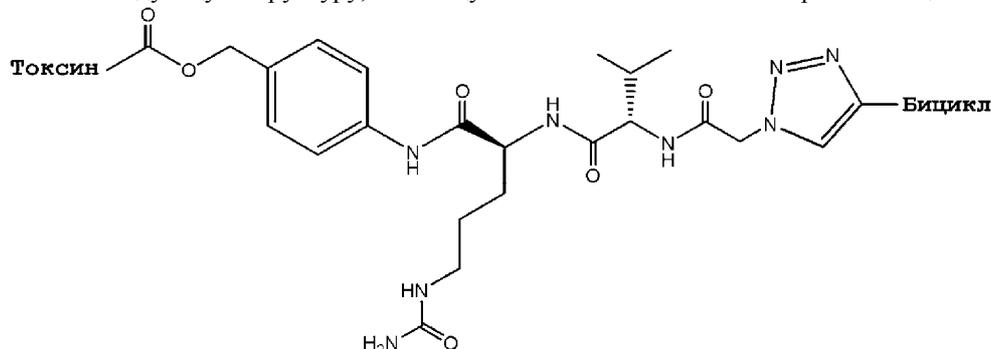
Соответственно, либо: R_1 , R_2 , R_3 и R_4 все представляют собой H; либо R_1 , R_2 , R_3 все представляют собой H и R_4 =метил; либо R_1 , R_2 =метил и R_3 , R_4 =H; либо R_1 , R_3 =метил и R_2 , R_4 =H; либо R_1 , R_2 =H и R_3 , R_4 =C1-C6 алкил.

Линкер между токсином и бициклическим пептидом может включать триазольную группу, образованную путем клик-реакции между азид-функционализированным токсином и алкин-функционализированной бициклической пептидной структурой (или наоборот). В других вариантах осуществления бициклический пептид может содержать амидную связь, образованную путем взаимодействия между карбоксилат-функционализированным токсином и N-концевой амино группой бициклического пептида.

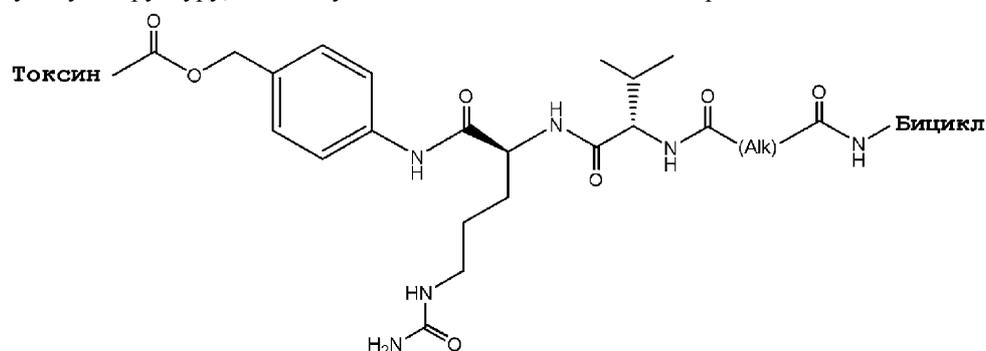
Линкер между токсином и бициклическим пептидом может включать расщепляемую катепсином группу для обеспечения селективного высвобождения токсина в клетках-мишенях. Подходящая расщепляемая катепсином группа представляет собой валин-цитруллин.

Линкер между токсином и бициклическим пептидом может включать одну или более спейсерных групп для обеспечения желаемой функциональности, например, аффинности связывания или расщепляемости катепсином, конъюгата. Подходящей спейсерной группой является пара-аминобензилкарбамат (РАВС), который может находиться между валин-цитруллиновой группой и токсинным фрагментом.

Таким образом, в вариантах осуществления конъюгат бициклический пептид-лекарственное средство может иметь следующую структуру, состоящую из Токсин-РАВС-cit-val-триазол-Бицикла:



В других вариантах осуществления конъюгат бициклический пептид-лекарственное средство может иметь следующую структуру, состоящую из Токсин-РАВС-cit-val-дикарбоксилат-Бицикла:



Где (alk) представляет собой алкиленовую группу формулы C_nH_{2n} , где n имеет значение от 1 до 10, и может быть линейным или разветвленным, предпочтительно (alk) представляет собой n -пропилен или n -бутилен.

В другом аспекте настоящее изобретение также обеспечивает набор, включающий по меньшей мере пептидный лиганд или конъюгат по настоящему изобретению.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, включающую пептидный

лиганд или конъюгат по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания с использованием пептидного лиганда, конъюгата или композиции по настоящему изобретению. Подходящим образом, заболевание представляет собой неопластическое заболевание, такое как рак.

В следующем аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ диагностики, включающий диагностику заболевания с использованием пептидного лиганда или композиции по настоящему изобретению. Таким образом, как правило, связывание анализита с пептидным лигандом можно использовать для вытеснения агента, что приводит к генерации сигнала при вытеснении. Например, связывание анализита (вторая мишень) может вытеснить фермент (первую мишень), связанный с пептидным лигандом, обеспечивая основу для анализа связывания, особенно если фермент удерживается с пептидным лигандом через его активный сайт.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 демонстрирует схему реакции для получения тиоэфир-связанных бициклических пептидных лигандов в соответствии с предшествующим уровнем техники.

Фиг. 2 демонстрирует тиоэфир-связанный бициклический пептидный лиганд в соответствии с предшествующим уровнем техники, обозначенный как 17-69-07-N241.

Фиг. 3 демонстрирует первый вторичный аминокислотный бициклический пептидный лиганд по настоящему изобретению.

Фиг. 4 демонстрирует третичный N-метил аминокислотный бициклический пептидный лиганд по настоящему изобретению.

Фиг. 5 демонстрирует третий вторичный аминокислотный бициклический пептидный лиганд по настоящему изобретению, который является Дар аналогом 17-69-07-N241.

Фиг. 6 демонстрирует четвертый вторичный аминокислотный бициклический пептидный лиганд по настоящему изобретению, циклизированный с ТВАВ каркасом.

Фиг. 7 демонстрирует данные анализа конкурентного аффинного связывания в отношении МТ1-ММР для производного фиг. 3.

Фиг. 8 демонстрирует данные анализа конкурентного аффинного связывания в отношении МТ1-ММР для производного фиг. 4.

Фиг. 9 демонстрирует данные анализа конкурентного аффинного связывания в отношении МТ1-ММР для еще одного производного по настоящему изобретению.

Фиг. 10 демонстрирует схематические структуры некоторых бициклических пептид-ТВМВ производных в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг. 11 демонстрирует схематические структуры других бициклических пептид-ТВМВ производных в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг. 12 демонстрирует схематические структуры других бициклических пептид-ТВМВ производных в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг. 13 демонстрирует схематические структуры других бициклических пептид-ТВМВ производных в соответствии с настоящим изобретением.

Фиг. 14 демонстрирует схему реакции для получения конъюгата бициклического пептид-лекарственное средство по настоящему изобретению путем клик-реакции с образованием триазольной связи.

Фиг. 15 демонстрирует схему реакции для получения конъюгата бициклического пептид-лекарственное средство по настоящему изобретению при наличии амидо связи.

Фиг. 16 демонстрирует объем опухоли и массу тела с течением времени для Balb/c бестимусных мышей, имеющих опухоли с НТ1020 опухолевыми клетками, после обработки конъюгатом бициклического пептид-лекарственное средство по настоящему изобретению.

Фиг. 17 демонстрирует объем опухоли и массу тела с течением времени для Balb/c бестимусных мышей, имеющих опухоли с НТ1020 опухолевыми клетками, после обработки еще одним конъюгатом бициклического пептид-лекарственное средство по настоящему изобретению.

Фиг. 18 демонстрирует объем опухоли и массу тела с течением времени для Balb/c бестимусных мышей, имеющих опухоли с НТ1020 опухолевыми клетками, после обработки еще одним конъюгатом бициклического пептид-лекарственное средство по настоящему изобретению.

Фиг. 19 демонстрирует объем опухоли и массу тела с течением времени для Balb/c бестимусных мышей, имеющих опухоли с НТ1020 опухолевыми клетками, после обработки еще одним конъюгатом бициклического пептид-лекарственное средство по настоящему изобретению;

Фиг. 20 демонстрирует объем опухоли и массу тела с течением времени для Balb/c бестимусных мышей, имеющих опухоли с НТ1020 опухолевыми клетками, после обработки еще одним конъюгатом бициклического пептид-лекарственное средство по настоящему изобретению.

Подробное описание изобретения

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в данной области техники, напри-

мер, в области химии пептидов, клеточной культуры и фагового дисплея, химии нуклеиновых кислот и биохимии. Стандартные методики используют для молекулярной биологии, генетических и биохимических методов (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.), которые включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Настоящее изобретение обеспечивает петлевую пептидную структуру, определенную в п.1 формулы изобретения, включающую две пептидные петли, стянутые между тремя связями на молекулярном каркасе, при этом центральная связь является общей для двух петель. Центральная связь предпочтительно представляет собой тиоэфирную связь, образованную с цистеиновым остатком пептида, или она представляет собой алкиламино связь, образованную с Dap или N-AlkDap остатком пептида. Две внешние связи предпочтительно представляют собой алкиламино связи, образованные с Dap или N-AlkDap остатками пептида, или одна из внешних связей может быть тиоэфирной связью, образованной с цистеиновым остатком пептида.

Специалисту будет понятно, что X в положениях 1, 3, 4, 10 и 11 формулы (II) может представлять собой любую аминокислоту в соответствии с результатами аланинового сканирования и результатов отбора, которые допускают хорошо переносимые замены в этих положениях.

В одном варианте осуществления X в положении 1 формулы (II) выбран из любой одной из следующих аминокислот: Y, M, F или V. В следующем варианте осуществления X в положении 1 формулы (II) выбран из Y, M или F. Еще в одном варианте осуществления X в положении 1 формулы (II) выбран из Y или M. Еще в одном варианте осуществления X в положении 1 формулы (II) выбран из Y.

В одном варианте осуществления U/O в положении 2 формулы (II) выбран из U, такого как N. В альтернативном варианте осуществления U/O в положении 2 формулы (II) выбран из O, такого как G.

В одном варианте осуществления X в положении 3 формулы (II) выбран из U или Z, где U представляет собой полярный, незаряженный аминокислотный остаток, выбранный из N, C, Q, M, S и T, и Z представляет собой полярный, отрицательно заряженный аминокислотный остаток, выбранный из D или E. В следующем варианте осуществления U в положении 3 формулы (II) выбран из Q. В альтернативном варианте осуществления Z в положении 3 формулы (II) выбран из E.

В одном варианте осуществления X в положении 4 формулы (II) выбран из J, где J представляет собой неполярный ароматический аминокислотный остаток, выбранный из F, W и Y. В следующем варианте осуществления J в положении 4 формулы (II) выбран из F. В альтернативном варианте осуществления J в положении 4 формулы (II) выбран из Y. В альтернативном варианте осуществления J в положении 4 формулы (II) выбран из W.

В одном варианте осуществления X в положении 10 формулы (II) выбран из Z, где Z представляет собой полярный отрицательно заряженный аминокислотный остаток, выбранный из D или E. В одном варианте осуществления Z в положении 10 формулы (II) выбран из D.

В одном варианте осуществления X в положении 11 формулы (II) выбран из O, где O представляет собой неполярный алифатический аминокислотный остаток, выбранный из G, A, I, L, P и V. В одном варианте осуществления O в положении 11 формулы (II) выбран из I.

В одном варианте осуществления соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIa):



где U, O, J и Z такие, как определено выше.

В одном варианте осуществления соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIb):



В одном варианте осуществления соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIc):



В одном варианте осуществления соединение формулы (II)

представляет собой соединение формулы (IId):



В одном варианте осуществления соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIe):



Еще в одном варианте осуществления пептид формулы (II) включает последовательность, выбранную из:

- A₁-Y-N-E-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃- (17-69-07) (SEQ ID NO: 2);
- A₁-M-N-Q-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃- (17-69-12) (SEQ ID NO: 10);
- A₁-F-G-E-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃- (17-69-02) (SEQ ID NO: 11);
- A₁-V-N-E-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃- (17-69-03) (SEQ ID NO: 12);
- A₁-F-N-E-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃- (17-69-04) (SEQ ID NO: 13);
- A₁-Y-N-E-Y-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃- (17-69-07-N057) (SEQ ID NO: 14); и

- A₁-Y-N-E-W-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃- (17-69-44-N002) (SEQ ID NO: 15).

Пептиды этого варианта осуществления были идентифицированы как сильные кандидаты после созревания аффинности в отношении гемопексинового домена MT1-MMP.

Еще в одном варианте осуществления пептид формулы (II) включает последовательность, выбранную из:

- A₁-Y-N-E-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃- (17-69-07) (SEQ ID NO: 2); и

- A₁-M-N-Q-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃- (17-69-12) (SEQ ID NO: 10).

Пептиды этого варианта осуществления были идентифицированы как кандидаты с наибольшей аффинностью после созревания аффинности в отношении гемопексинового домена MT1-MMP, синтеза коровых последовательностей бициклического соединения и количественного измерения аффинности с использованием конкурентных экспериментов.

В следующем варианте осуществления пептид формулы (II) включает последовательность, выбранную из - A₁-Y-N-E-F-G-A₂-E-D-F-Y-D-I-A₃- (17-69-07) (SEQ ID NO: 2). Пептид этого варианта осуществления был идентифицирован как наиболее сильный и стабильный член семейства пептидных лигандов формулы (II).

Еще в одном варианте осуществления пептид формулы (II) включает последовательность, выбранную из:

(bAla)-Sar10-AA₁ (D-Ala)NE(1Nal) (D-Ala) A₂EDFYD(tBuGly)A₃); или

AA₁ (D-Ala)NE(1Nal)(D-Ala)A₂EDFYD (tBuGly) A₃), соответственно, где N-конец предпочтительно присутствует в виде свободной аминогруппы, а C-конец предпочтительно амидирован.

Во всех вышеперечисленных последовательностях A₁, A₂, и A₃ такие, как определено выше. Подходящие и предпочтительные типы и положения A₁, A₂, и A₃ такие, как определено выше.

В одном варианте осуществления некоторые пептиды формулы (II) являются полностью перекрестно-реактивными с MT1-MMP мыши, собаки, яванского макака и человека. В следующем варианте осуществления конкретные приведенные в качестве примера пептидные лиганды по настоящему изобретению являются полностью перекрестно-реактивными с MT1-MMP мыши, собаки, яванского макака и человека. Например, как нестабилизированные, так и стабилизированные производные 17-69-07 (то есть 17-69-07-N219, 17-69-07-N241 и 17-69-07-N268) являются полностью перекрестно-реактивными.

Еще в одном варианте осуществления пептид формулы (II) является селективным по отношению к MT1-MMP, но не вступает в перекрестную реакцию с MMP-1, MMP-2, MMP-15 и MMP-16. Коровая последовательность 17-69-07 и стабилизированный вариант 17-69-07-N258 являются уникально селективными в отношении MT1-MMP. Предпочтительно, аффинность связывания K_i с MT1-MMP составляет менее чем около 100 нМ, менее чем около 50 нМ, менее чем около 25 нМ, или менее чем около 10 нМ. Соответственно, аффинность связывания K_i с MMP-1, MMP-2, MMP-15 и MMP-16 составляет более чем около 500 нМ, более чем около 1000 нМ или более чем около 10000 нМ.

Должно быть понятно, что модифицированные производные пептидных лигандов, определенных в настоящем изобретении, 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; замены 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 устойчивыми 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; замещения водорода на альфа-углероде одного или более аминокислотных остатков другой химической группой, модификации аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат/аспартат и тирозин, подходящими амин, тиол, карбоновая кислота и фенол-реактивными реагентами так, чтобы функционализировать указанные аминокислоты, и введения или замены аминокислот, которые вводят ортогональные реактивности, которые являются подходящими для функционализации, например аминокислот, несущих азидную или алкиновую группу, которые обеспечивают возможность функционализации с алкин- или азид-содержащими фрагментами, соответственно.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает модификация в положении аминокислоты 1 и/или 9. Эти положения, особенно там, где присутствует тирозин, наиболее подвержены протеолитическому разложению.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает N-концевую и/или C-концевую модификацию. В следующем варианте осуществления модифицированное производное включает N-концевую модификацию с использованием подходящей амино-реактивной химии и/или C-концевую модификацию с использованием подходящей карбокси-реактивной химии. В следующем варианте осуществления указанная N-концевая или C-концевая модификация включает добавление эффек-

торной группы, включающей, но не ограничиваясь этим, цитотоксический агент, радиохелатор или хромофор.

В следующем варианте осуществления модифицированное производное включает N-концевую модификацию. В следующем варианте осуществления N-концевая модификация включает N-концевую ацетильную группу. В этом варианте осуществления N-концевая цистеиновая группа (группа, указанная в настоящем изобретении как C_i) кэппируется уксусным ангидридом или другими подходящими реагентами во время пептидного синтеза, приводя к молекуле, которая ацетилирована на N-конце. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциальной точки распознавания для аминокептидаз и позволяет избежать потенциального разложения бициклического пептида.

В альтернативном варианте осуществления N-концевая модификация включает добавление молекулярной спейсерной группы, которая облегчает конъюгирование эффекторных групп и сохранение активности бициклического пептида в отношении его мишени. Спейсерная группа предпочтительно представляет собой олигопептидную группу, содержащую от около 5 до около 30 аминокислот, такую как группа Ala, G-Sar10-A или bAla-Sar10-A. В одном варианте осуществления спейсерная группа выбрана из bAla-Sar10-A (т.е. 17-69-07-N241). Добавление этих спейсерных групп к бициклическому пептиду 17-69-07 не изменяет активность в отношении белка-мишени.

В следующем варианте осуществления модифицированное производное включает C-концевую модификацию. В следующем варианте осуществления C-концевая модификация включает амидную группу. В этом варианте осуществления C-концевая цистеиновая группа (группа, указанная в настоящем изобретении как C_{iii}) синтезируется в виде амида в процессе пептидного синтеза, приводя к молекуле, которая является амидированной на C-конце. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциальной точки распознавания для карбоксипептидазы и снижает возможность протеолитического разложения бициклического пептида.

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

Альтернативно, можно использовать неприродные аминокислоты, имеющие ограниченные аминокислотные боковые цепи, так что протеолитический гидролиз соседней пептидной связи

конформационно и стерически затруднен. В частности, это касается аналогов пролина, объемных боковых цепей, C-дизамещенных производных (например, аминокислоты, Aib) и циклоаминокислот, простого производного, представляющего собой аминоклопропилкарбоновую кислоту.

В одном варианте осуществления замена неприродным аминокислотным остатком происходит в положении 4. Различные неприродные аминокислотные остатки хорошо переносятся в этом положении. В следующем варианте осуществления неприродные аминокислотные остатки, такие как те, которые присутствуют в положении 4, выбраны из: 1-нафтилаланина; 2-нафтилаланина; циклогексилглицина, фенилглицина; трет-бутилглицина; 3,4-дихлорфенилаланина; циклогексилаланина и гомофенилаланина.

Еще в одном варианте осуществления неприродные аминокислотные остатки, такие как те, которые присутствуют в положении 4, выбраны из: 1-нафтилаланина; 2-нафтилаланина и 3,4-дихлорфенилаланина. Эти замены усиливают аффинность по сравнению с немодифицированной последовательностью дикого типа.

Еще в одном варианте осуществления неприродные аминокислотные остатки, такие как те, которые присутствуют в положении 4, выбраны из: 1-нафтилаланина. Эта замена обеспечила наибольший уровень усиления аффинности (более чем в 7 раз) по сравнению с диким типом.

В одном варианте осуществления неприродный аминокислотный остаток введен в положении 9 и/или 11. Ряд неприродных аминокислотных остатков хорошо переносятся в этих положениях.

В следующем варианте осуществления неприродные аминокислотные остатки, такие как те, которые присутствуют в положении 9, выбраны из: 4-бромфенилаланина, пентафтор-фенилаланина, например 4-бромфенилаланина.

Еще в одном варианте осуществления неприродные аминокислотные остатки, такие как те, которые присутствуют в положении 11, выбраны из: трет-бутилглицина. Повышение активности и сильная защита вицинального аминокислотного остова от протеолитического гидролиза достигается путем стерического затруднения.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает множество вышеуказанных модификаций, например 2, 3, 4 или 5 или более модификаций. В следующем варианте осуществления модифицированное производное включает 2, 3, 4 или 5 или более из следующих модификаций, например, все из следующих 5 модификаций: D-аланин в положении 1 и 5, 1-нафтилаланин в положении 4, 4-бромфенилаланин в положении 9 и трет-бутилглицин в положении 11. Эта мульти-замена является допустимой в сочетании с эффективностью, которая превосходит дикий тип. Еще в одном варианте осуществления модифицированное производное включает следующие модификации: D-аланин в положении 1 и 5, 1-нафтилаланин в положении 4 и трет-бутилглицин в положении 11. Эта мульти-замена является допустимой в сочетании с эффективностью, которая превосходит дикий тип.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает добавление спейсерной группы.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или более устойчивыми к окислению аминокислотными остатками. В следующем варианте осуществления модифицированное производное включает замену триптофанового остатка нафтилаланиновым или аланиновым остатком. Этот вариант осуществления обеспечивает такое преимущество, как улучшение профиля фармацевтической стабильности получаемого бициклического пептидного лиганда.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более заряженных аминокислотных остатков одним или более гидрофобными аминокислотными остатками. В альтернативном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более гидрофобных аминокислотных остатков одним или более заряженными аминокислотными остатками. Правильный баланс заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков является важной

характеристикой бициклических пептидных лигандов. Например, гидрофобные аминокислотные остатки влияют на степень связывания с белками плазмы и, таким образом, на концентрацию свободной доступной фракции в плазме, тогда как заряженные аминокислотные остатки (в частности, аргинин) могут влиять на взаимодействие пептида с фосфолипидными мембранами на поверхности клеток. Такие два в комбинации могут влиять на период полужизни, объем дистрибуции и экспозицию пептидного лекарственного средства, и могут быть адаптированы в соответствии с клиническим результатом. Кроме того, правильная комбинация и соотношение заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков могут уменьшить раздражение в месте инъекции (если пептидный препарат вводят подкожно).

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более L-аминокислотных остатков одним или более D-аминокислотными остатками. Полагают, что этот вариант осуществления повышает протеолитическую стабильность за счет стерического затруднения и склонности D-аминокислот стабилизировать -поворотные конформации (Tugui et al (2005) PNAS, 102 (2), 413-418).

Во всех пептидных последовательностях, определенных в настоящем изобретении, один или более тирозиновых остатков могут быть заменены фенилаланином. Было обнаружено, что это улучшает выход бициклического пептидного продукта в катализируемой основанием реакции сочетания пептида с карбонильной молекулой.

В следующем варианте осуществления аминокислотный остаток в положении 1 заменяют D-аминокислотой, такой как D-аланин. Этой заменой достигается сохранение эффективности без последующего разложения.

В следующем варианте осуществления аминокислотный остаток в положении 5 заменяют D-аминокислотой, такой как D-аланин или D-аргинин. Этой заменой достигается сохранение эффективности без последующего разложения.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает удаление любых аминокислотных остатков и замену аланинами. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциального сайта(ов) протеолитической атаки.

Следует отметить, что каждая из вышеуказанных модификаций служит для продуманного улучшения активности или стабильности пептида. Дальнейшие улучшения эффективности на основе модификаций можно достичь через следующие механизмы:

включение гидрофобных фрагментов, которые используют гидрофобный эффект и приводят к более низким скоростям диссоциации, таким образом достигаются более высокие аффинности;

включение заряженных групп, которые используют широкий диапазон ионных взаимодействий, приводящих к более быстрым скоростям ассоциации 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, путем правильного затруднения боковых цепей аминокислот таким образом, чтобы потеря энтропии была минимальной при связывании мишени, ограничение торсионных углов основной цепи таким образом, чтобы потеря энтропии была минимальной при связывании мишени, и введение дополнительных циклизаций в молекуле по тем же причинам. (См. Gentilucci et al, Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203, and Nestor et al, Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418.)

Настоящее изобретение включает все фармацевтически приемлемые (радио)изотопно-меченные соединения по настоящему изобретению, то есть соединения формулы (II), где один или более атомов заменены атомами, имеющими тот же атомный номер, но атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе, и соединения формулы (II), в которых присоединены металл-хелатные группы (называемые "эффекторами"), которые способны удерживать соответствующие (радио)изотопы, и соединения формулы (1), где некоторые функциональные группы ковалентно замещены соответствующими (радио)изотопами или изотопно-мечеными функциональными группами.

Примеры изотопов, подходящих для включения в соединения по настоящему изобретению, вклю-

чают 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-меченные соединения формулы (II), например, те, которые включают радиоактивный изотоп, полезны в исследованиях распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях, а также для клинической оценки наличия и/или отсутствия МТ1-ММР мишени на пораженных тканях, таких как опухоли, и в других местах. Соединения формулы (II) могут также иметь ценные диагностические свойства, поскольку их можно использовать для детекции или идентификации образования комплекса между меченым соединением и другими молекулами, пептидами, белками, ферментами или рецепторами. Методы детекции или идентификации могут использовать соединения, которые помечены метящими агентами, такими как радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества (например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин и люцифераза) и т.д. Радиоактивные изотопы тритий, то есть ^3H (T), и углерод-14, то есть ^{14}C , особенно полезны для этой цели, учитывая легкость их включения и детекции.

Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, то есть ^2H (D), может дать определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличенный период полувыведения *in vivo* или сниженные требования к дозировке, и, следовательно, может быть предпочтительным в некоторых обстоятельствах.

Замещение позитрон-испускающими изотопами, такими как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , может быть полезным в исследованиях методом позитрон-эмиссионной томографии (PET) для изучения занятости мишени.

Включение изотопов в металл-хелатные эффекторные группы, такие как ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , и ^{177}Lu , может быть полезным для визуализации опухолевых специфических антигенов с использованием PET или SPECT визуализации.

Включение изотопов в металл-хелатные эффекторные группы, такие как, но не ограничиваясь ими, ^{90}Y , ^{177}Lu , и ^{213}Bi , может предоставить возможность направленной лучевой терапии, при которой металл-хелатор-содержащие соединения формулы (II) переносят терапевтический радионуклид к белку-мишени и месту действия.

Изотопно-меченные соединения формулы (II), как правило, могут быть получены обычными способами, известными специалистам в данной области техники, или способами, аналогичными тем, которые описаны в прилагаемых примерах, с использованием подходящего изотопно-меченого реагента вместо ранее используемого немеченого реагента.

Специфичность в контексте настоящего описания относится к способности лиганда связываться или иным образом взаимодействовать со своей родственной мишенью, исключая объекты, которые похожи на мишень. Например, специфичность может относиться к способности лиганда ингибировать взаимодействие человеческого фермента, но не гомологичного фермента из других видов. С использованием подхода, описанного в настоящем изобретении, можно модулировать специфичность, которая увеличивается или уменьшается, чтобы сделать лиганды более или менее способными к взаимодействию с гомологами или паралогами предполагаемой мишени. Специфичность не должна рассматриваться как синоним активности, аффинности или авидности, а эффективность действия лиганда на его мишень (такого как, например, аффинность связывания или уровень ингибирования) не обязательно связана с его специфичностью.

Активность связывания, в контексте настоящей заявки, относится к количественным показателям связывания, взятым из анализов связывания, например, как описано в настоящем изобретении. Следовательно, активность связывания относится к количеству пептидного лиганда, которое связывается при заданной целевой концентрации.

Мультиспецифичность представляет собой способность связываться с двумя или более целями. Как правило, связывающиеся пептиды способны связываться с одной мишенью, такой как эпитоп в случае антитела, благодаря их конформационным свойствам. Однако могут быть разработаны пептиды, которые могут связываться с двумя или более мишенями; антитела с двойной специфичностью, например, как известно в данной области, как указано выше. В настоящем изобретении пептидные лиганды могут быть способны связываться с двумя или более мишенями и поэтому являются мультиспецифичными. Соответственно, они связываются с двумя мишенями и обладают двойной специфичностью. Связывание может быть независимым, что будет означать, что сайты связывания для мишеней на пептиде структурно не затруднены связыванием одной или другой из мишеней. В этом случае обе мишени могут быть связаны независимо. В более общем смысле ожидают, что связывание одной мишени будет по меньшей мере частично препятствовать связыванию другой.

Существует фундаментальное различие между лигандом с двойной специфичностью и лигандом со специфичностью, которая охватывает две взаимосвязанные мишени. В первом случае лиганд является специфическим для обеих мишеней индивидуально и взаимодействует с каждой специфическим образом. Например, первая петля в лиганде может связываться с первой мишенью, а вторая петля со второй мишенью. Во втором случае лиганд является неспецифическим, потому что он не различает две мишени,

например, взаимодействуя с эпитопом мишеней, который является общим для обеих.

В контексте настоящего изобретения возможно, что лиганд, который обладает активностью в отношении, например, мишени и ортолога, может быть биспецифическим лигандом. Однако в одном варианте осуществления лиганд не является биспецифическим, но имеет менее точную специфичность, например, он связывает как мишень, так и один или более ортологов. Как правило, лиганд, который не был выбран против и мишени и ее ортолога, с меньшей вероятностью будет биспецифическим из-за отсутствия селективного давления в отношении биспецифичности. Длина петли в бициклическом пептиде может иметь решающее значение для обеспечения подходящей поверхности связывания, так что может достигаться хорошая перекрестная реактивность мишени и ортолога при сохранении высокой селективности в отношении менее близких гомологов.

Если лиганды действительно биспецифичны, в одном варианте осуществления по меньшей мере одна из целевых специфичностей лигандов будет общей среди выбранных лигандов, и уровень этой специфичности может модулироваться способами, раскрытыми в настоящем изобретении. Вторая или дополнительные специфичности необязательно должны быть общими, и не должны рассматриваться в процедурах, описанных в настоящем изобретении.

Молекулярный каркас представляет собой любую молекулу, которая способна связывать пептид в нескольких точках для придания пептиду одной или более структурных особенностей. Предпочтительно молекулярный каркас включает по меньшей мере три точки связывания пептида, называемые реакционноспособными группами каркаса. Эти группы способны взаимодействовать с Dap или N-AlkDap или цистеиновыми остатками (когда присутствуют) на пептиде с образованием стабильных ковалентных алкиламино и тиоэфирных связей. Предпочтительные структуры для молекулярных каркасов описаны ниже.

Таким образом, соединения по изобретению включают, состоят по существу или состоят из пептида, ковалентно связанного с молекулярным каркасом. Термин "каркас" или "молекулярный каркас" в настоящем изобретении относится к химическому фрагменту, который связан с пептидом алкиламино связями и тиоэфирной связью (когда третий остаток представляет собой цистеин) в соединениях по настоящему изобретению. Термин "каркасная молекула" или "молекула молекулярного каркаса" в настоящем изобретении относится к молекуле, которая способна вступать в реакцию с пептидом или пептидным лигандом с образованием производных по настоящему изобретению, имеющих алкиламино и, в некоторых вариантах осуществления, также тиоэфирные связи. Таким образом, каркасная молекула имеет ту же структуру, что и каркасный фрагмент, за исключением того, что соответствующие реакционноспособные группы (такие, как удаляемые группы) молекулы замещены алкиламино и тиоэфирными связями с пептидом в каркасном фрагменте.

Молекула молекулярного каркаса представляет собой любую молекулу, которая способна связываться с пептидом в нескольких точках с образованием тиоэфирных и алкиламино-связей с пептидом. Это не перекрестный линкер, поскольку он обычно не связывает два пептида; вместо этого она обеспечивает две или более точек присоединения для одного пептида. Молекула молекулярного каркаса включает по меньшей мере три точки присоединения для пептида, называемые реакционноспособными группами каркаса. Эти группы способны к взаимодействию с -SH и аминок группами на пептиде с образованием тиоэфирных и алкиламино-связей. Таким образом, молекулярный каркас представляет собой каркасный фрагмент вплоть до, но не включая тиоэфирные и алкиламино-связи в конъюгатах по настоящему изобретению. Каркасная молекула имеет структуру каркаса, но с реакционноспособными группами в местах расположения тиоэфирных и алкиламино связей в конъюгате по настоящему изобретению.

Подходящим образом, каркас включает, состоит по существу или состоит из (гетеро)ароматического или (гетеро)алициклического фрагмента.

В контексте настоящей заявки, "(гетеро)арил" включает ароматические кольца, например ароматические кольца, имеющие от 4 до 12 членов, такие как фенильные кольца. Эти ароматические кольца могут необязательно содержать один или более гетероатомов (например, один или более из N, O, S, и P), такие как тиенильные кольца, пиридильные кольца и фуранильные кольца. Ароматические кольца могут быть необязательно замещены. "(Гетеро)арил" также включает ароматические кольца, с которыми конденсированы одно или более других арильных колец или не-арильных колец. Например, нафтильные группы, индольные группы, тиенотиенильные группы, дитиенотиенильные и 5,6,7,8-тетрагидро-2-нафтильные группы (каждая из которых может быть необязательно замещенной) являются арильными группами для целей настоящей заявки. Как указано выше, арильные кольца могут быть необязательно замещенными. Подходящие заместители включают алкильные группы (которые могут быть необязательно замещенными), другие арильные группы (которые могут сами быть замещенными), гетероциклические кольца (насыщенные или ненасыщенные), алкоксигруппы (которые подразумевают включение арилоксигрупп (например, феноксигрупп)), гидроксигруппы, альдегидные группы, нитрогруппы, аминные группы (например, незамещенные или моно- или дизамещенные арильными или алкильными группами), карбоновокислотные группы, производные карбоновых кислот (например, эфиры, амиды карбоновых кислот и т.д.), атомы галогенов (например, Cl, Br и I) и т.п.

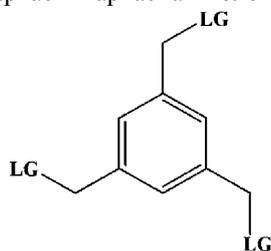
В контексте настоящей заявки "(гетеро)алициклический" относится к гомоциклическому или гетероциклическому насыщенному кольцу. Кольцо может быть незамещенным или оно может быть замеще-

но одним или более заместителями. Заместители могут быть насыщенными или ненасыщенными, ароматическими или неароматическими, и примеры подходящих заместителей включают заместители, указанные выше при обсуждении, касающемся заместителей в алкильных и арильных группах. Кроме того, два или более заместителей кольца могут объединяться, образуя другое кольцо, таким образом, термин "кольцо", используемый в настоящем документе, включает конденсированные кольцевые системы.

Предпочтительно каркас включает трис-замещенный (гетеро)ароматический или (гетеро)алициклический фрагмент, например, трис-метилен-замещенный (гетеро)ароматический или (гетеро)алициклический фрагмент. (Гетеро)ароматический или (гетеро)алициклический фрагмент предпочтительно представляет собой шести-членную кольцевую структуру, предпочтительно трис-замещенную, таким образом, каркас имеет ось симметрии 3-го порядка.

В вариантах осуществления каркас представляет собой трис-метилен (гетеро)арильный фрагмент, например 1,3,5-трис-метиленбензольный фрагмент. В этих вариантах осуществления соответствующая каркасная молекула предпочтительно имеет удаляемую группу на атомах углерода метилена. Метиленовая группа затем образует R_1 фрагмент алкиламино связи, как определено в настоящем изобретении. В этих метилен-замещенных (гетеро)ароматических соединениях электроны ароматического кольца могут стабилизировать переходное состояние в процессе нуклеофильного замещения. Так, например, бензилгалогениды в 100-1000 раз более реакционноспособны по отношению к нуклеофильному замещению, чем алкилгалогениды, которые не связаны с (гетеро)ароматической группой.

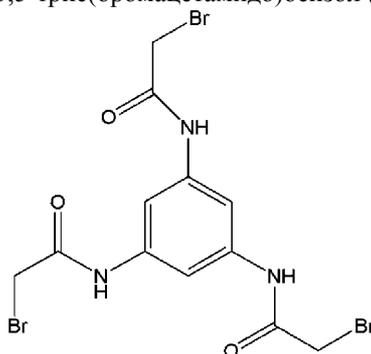
В этих вариантах осуществления каркас и каркасная молекула имеют общую формулу:



Где LG представляет собой удаляемую группу, описанную ниже для каркасной молекулы, или LG (включая соседнюю метиленовую группу, образующую R_1 фрагмент алкиламино группы) представляет собой алкиламино связь с пептидом в конъюгатах по настоящему изобретению.

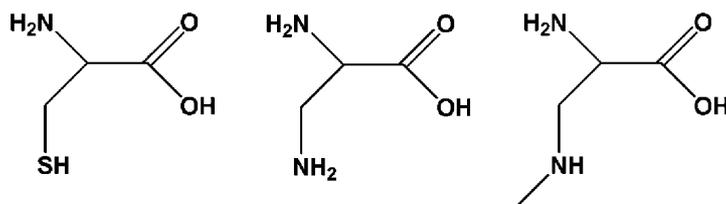
В вариантах осуществления указанная выше LG группа может представлять собой галоген, такой как, но не ограничиваясь этим, атом брома, и в этом случае каркасная молекула представляет собой 1,3,5-Трис(бромметил)бензол (ТВМВ). Другая подходящая молекула молекулярного каркаса представляет собой 2,4,6-трис(бромметил)мезитилен. Он подобен 1,3,5-трис(бромметил)бензолу, но содержит дополнительно три метильные группы, присоединенные к бензольному кольцу. В случае этого каркаса дополнительные метильные группы могут образовывать дополнительные контакты с пептидом и, следовательно, добавлять дополнительные структурные затруднения. Таким образом, достигается другой диапазон разнообразия, чем с 1,3,5-трис (бромметил)бензолом.

Другой предпочтительной молекулой для образования каркаса для реакции с пептидом путем нуклеофильного замещения является 1,3,5-трис(бромацетиламино)бензол (ТВАВ):



В других вариантах осуществления молекулярный каркас может иметь тетраэдрическую геометрию, так что в результате реакции четырех функциональных групп кодируемого пептида с молекулярным каркасом образуется не более двух изомеров продукта. Другие геометрии также возможны; действительно, возможно почти бесконечное число геометрий каркаса, что приводит к большим возможностям для диверсификации пептидного лиганда.

Пептиды, используемые для образования лигандов по настоящему изобретению, включают Дар или N-AlkДар или N-HAlkДар остатки для образования алкиламино связей с каркасом. Структура диаминопропионовой кислоты аналогична и изостерична структуре цистеина, который использовали для образования тиоэфирных связей с каркасом в предшествующем уровне техники, с заменой концевой -SH-группы цистеина на-NH₂:



Цистеин

DAP

N-MeDAP

Термин "алкиламино" используется в настоящем изобретении в его обычном химическом смысле для обозначения связи, состоящей из NH или N(R₃), связанных с двумя атомами углерода, где атомы углерода независимо выбраны из атомов углерода алкила, алкилена или арила, и R₃ представляет собой алкильную группу. Соответственно, алкиламино связи по настоящему изобретению включают группу NH, связанную с двумя насыщенными атомами углерода, наиболее предпочтительно атомами углерода метилена (-CH₂-). Алкиламино связи настоящего изобретения имеют общую формулу:



где:

S представляет собой каркасное ядро, например,

(гетеро)ароматическое или (гетеро)алициклическое кольцо, как объяснено ниже;

R₁ представляет собой C1-C3 алкиленовые группы, предпочтительно метиленовые или этиленовые группы, и наиболее предпочтительно метилен (CH₂);

R₂ представляет собой метиленовую группу боковой цепи Dap или N-AlkDap;

R₃ представляет собой C1-4 алкил, включая разветвленный алкил и циклоалкил, например метил, или H; и

P представляет собой пептидный остов, то есть R₂ группа вышеуказанной связи связана с атомом углерода в пептидном остове, смежном с углеродом карбоксила остатка Dap или N-AlkDap.

Некоторые бициклические пептиды формулы (II) обладают рядом преимуществ, которые позволяют рассматривать их в качестве подходящих лекарственно-подобных молекул для инъекций, ингаляций, назального, глазного, перорального или местного введения. Такие преимущества включают: Межвидовую перекрестную реактивность. Это типичное требование для доклинической фармакодинамики и фармакокинетической оценки.

Устойчивость к действию протеаз.

Бициклические пептидные лиганды в идеале должны демонстрировать устойчивость к плазменным протеазам, эпителиальным ("мембрано-связанным") протеазам, желудочным и кишечным протеазам, протеазам поверхности легкого, внутриклеточным протеазам и т.п. Устойчивость к действию протеаз должна поддерживаться между различными видами так, чтобы бициклический ведущий кандидат можно было разработать на животных моделях, а также с уверенностью вводить людям.

Желательный профиль растворимости.

Он зависит от соотношения заряженных и гидрофильных против гидрофобных остатков и внутри/межмолекулярного H-связывания, что важно для целей формулирования и абсорбции.

Оптимальный период полужизни в плазме крови.

В зависимости от клинических показаний и схемы лечения может потребоваться разработка бициклического пептида для кратковременного воздействия для неотложного лечения острых заболеваний или разработка бициклического пептида с более длительным удерживанием в кровотоке, и поэтому оптимального для лечения большего количества хронических заболеваний. Другими факторами, определяющими желаемый период полужизни в плазме, являются требования длительного воздействия для максимальной терапевтической эффективности в противовес сопутствующей токсикологии из-за длительного воздействия агента.

Должно быть понятно, что солевые формы входят в объем данного изобретения, и ссылки на бициклические пептидные соединения формулы (II) включают солевые формы указанных соединений.

Соли по настоящему изобретению можно синтезировать из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную группу, обычными 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 получить взаимодействием этих соединений в форме свободной кислоты или основания с подходящим основанием или кислотой в воде или в органическом растворителе или в их смеси.

Кислотно-аддитивные соли (моно- или ди-соли) могут образовываться с широким спектром кислот, как неорганических, так и органических. Примеры кислотно-аддитивных солей включают моно- или ди-соли, образованные с кислотой, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацетамидобензойной, бугановой, (+)камфорной, камфорсульфоновой, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламиновой, додецилсер-

ной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоной, 2-гидроксиэтансульфоной, муравьиной, fumarовой, галактаровой, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α -оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, галогенводородных кислот (например, бромистоводородной, хлористоводородной, йодистоводородной), изетионовой, молочной (например, (+)-L-молочной, (\pm)-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, (\pm)-DL-миндальной, метансульфоной, нафталин-2-сульфоной, нафталин-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, шавелевой, пальмитиновой, памовой, фосфорной, пропионовой, пирувиновой, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-аминсалициловой, себадиновой, стеариновой, янтарной, серной, дубильной, (+)-L-винной, тиоциановой, п-толуолсульфоной, ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированных аминокислот и катионообменных смол.

Одна конкретная группа солей состоит из солей, образованных из уксусной, хлористоводородной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной, молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изетионовой, fumarовой, бензолсульфоной, толуолсульфоной, серной, метансульфоной (мезилат), этансульфоной, нафталинсульфоной, валериановой, пропановой, бутановой, малоновой, глюкуроновой и лактобионовой кислот. Одной конкретной солью является гидрохлоридная соль. Другой конкретной солью является ацетатная соль.

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

Когда соединения формулы (II) содержат функциональную аминогруппу, они могут образовывать четвертичные аммониевые соли, например, путем реакции с алкилирующим агентом в соответствии со способами, хорошо известными специалистам в данной области. Такие четвертичные аммониевые соединения входят в объем формулы (II).

Несколько конъюгированных пептидов могут быть включены вместе в одну и ту же молекулу согласно настоящему изобретению. Например, два таких пептидных конъюгата с одинаковой специфичностью могут быть связаны друг с другом через молекулярный каркас, увеличивая avidность производного для его мишеней. Альтернативно, в другом варианте осуществления множество пептидных конъюгатов объединены с образованием мультимера. Например, два разных пептидных конъюгата объединяются для создания мультиспецифической молекулы. Альтернативно, три или более пептидных конъюгата, которые могут быть одинаковыми или разными, могут быть объединены с образованием мультиспецифических производных. В одном варианте осуществления мультивалентные комплексы могут быть сконструированы путем связывания молекулярных каркасов, которые могут быть одинаковыми или разными.

В следующем аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения пептидного лиганда по настоящему изобретению, который включает: обеспечение пептида по настоящему изобретению и каркасной молекулы; и образование тиоэфирной (когда третий остаток представляет собой цистеин) и алкиламино- связей между пептидом и каркасной молекулой.

Детали каркасной молекулы и пептида предпочтительно такие, как описано выше в связи с первым аспектом настоящего изобретения.

Пептиды для использования в способах по настоящему изобретению можно получить с использованием обычного твердофазного синтеза из аминокислотных исходных веществ, которые могут включать подходящие защитные группы, как описано в настоящем изобретении. Эти способы для получения пептидов хорошо известны в данной области.

Предпочтительно пептид имеет защитные группы на нуклеофильных группах, отличных от $-\text{SH}$ и аминогрупп, предназначенных для образования алкиламино-связей.

Нуклеофильность аминокислотных боковых цепей была предметом нескольких исследований, и они перечислены в порядке убывания: тиолат в цистеинах, амины в лизине, вторичный амин в гистидине и триптофане, гуанидинамины в аргинине, гидроксилы в серине/треонине и, наконец, карбоксилаты в аспартате и глутамате. Соответственно, в некоторых случаях может потребоваться применение защитных групп для более нуклеофильных групп на пептиде для предотвращения нежелательных побочных реакций с этими группами.

В вариантах осуществления способ по изобретению включает: синтез пептида, имеющего защитные

группы на нуклеофильных группах, отличных от аминогрупп, предназначенных для образования алкиламино-связей, и вторых защитных групп на аминогруппах, предназначенных для образования алкиламино-связей, где защитные группы на аминогруппах, предназначенных для образования алкиламино-связей, можно удалить в условиях, отличных от используемых для защитных групп на других нуклеофильных группах, с последующей обработкой пептида в условиях, выбранных для снятия защиты с аминогрупп, предназначенных для образования алкиламино-связей, без снятия защиты с других нуклеофильных групп. Затем осуществляют реакцию связывания с каркасом с последующим удалением оставшихся защитных групп с получением пептидного конъюгата.

Предпочтительно способ по настоящему изобретению включает взаимодействие, в реакции нуклеофильного замещения, пептида, имеющего реакционноспособные -SH и аминогруппы боковой цепи, с каркасной молекулой, имеющей три или более удаляемых групп.

Термин "удаляемая группа" в настоящем изобретении используют в его обычном химическом смысле для обозначения фрагмента, способного к нуклеофильному замещению аминогруппой. Любую такую удаляемую группу можно использовать в настоящем изобретении при условии, что ее легко удалить путем нуклеофильного замещения при помощи амина. Подходящими удаляемыми группами являются конъюгатные основания кислот, имеющие pK_a менее чем около 5. Неограничивающие примеры удаляемых групп, полезных в изобретении, включают галоген, такой как бром, хлор, йод, О-тозилат (OTos), О-мезилат (OM), О-трифлат (OTf) или О-триметилсилил (OTMS).

Реакции нуклеофильного замещения можно осуществлять в присутствии основания, например, когда удаляемая группа представляет собой обычную анионную удаляемую группу. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что выход циклизированных пептидных лигандов может быть значительно увеличен путем подходящего выбора растворителя и основания (и pH) для реакции нуклеофильного замещения, и, кроме того, что предпочтительный растворитель и основание отличаются от комбинаций растворителя и основания предшествующего уровня техники, которые приводят к образованию только тиоэфирных связей. В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что улучшенные выходы достигаются при использовании триалкиламинового основания, то есть основания формулы $NR_1R_2R_3$, где R_1 , R_2 и R_3 независимо представляют собой C1-C5 алкильные группы, предпочтительно C2-C4 алкильные группы, в частности C2-C3 алкильные группы. Особенно подходящими основаниями являются триэтиламин и диизопропилэтиламин (DIPEA). Эти основания обладают таким свойством, что являются лишь слабо нуклеофильными, и считается, что это свойство объясняет меньшее количество побочных реакций и более высокие выходы, наблюдаемые с этими основаниями. Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что предпочтительными растворителями для реакции нуклеофильного замещения являются полярные и протонные растворители, в частности MeCN/H₂O содержащие MeCN и H₂O в объемных соотношениях от 1:10 до 10:1, предпочтительно от 2:10 до 10:2, и более предпочтительно от 3:10 до 10:3, в частности от 4:10 до 10:4.

Дополнительная связь или функциональные активности могут быть присоединены к N или C концу пептида, ковалентно связанного с молекулярным каркасом. Функциональную группу, например, выбирают из группы, состоящей из: группы, способной связываться с молекулой, которая продлевает период полужизни пептидного лиганда *in vivo*, и молекулы, которая продлевает период полужизни пептидного лиганда *in vivo*. Такой молекулой может быть, например, HSA или белок клеточного матрикса, и группа, способная связываться с молекулой, которая продлевает период полужизни пептидного лиганда *in vivo*, представляет собой антитело или фрагмент антитела, специфический в отношении HSA или белка клеточного матрикса. Такая молекула также может быть конъюгатом с высокомолекулярными ПЭГ.

В одном варианте осуществления функциональная группа представляет собой связывающуюся молекулу, выбранную из группы, состоящей из второго пептидного лиганда, включающего пептид, ковалентно связанный с молекулярным каркасом, и антитела или фрагмента антитела. 2, 3, 4, 5 или более пептидных лигандов могут быть объединены вместе. Специфичности любых двух или более из этих производных могут быть одинаковыми или разными; если они одинаковы, образуется многовалентная связывающая структура, которая обладает повышенной avidностью для мишени по сравнению с одновалентными связывающимися молекулами. Более того, молекулярные каркасы могут быть одинаковыми или разными и могут включать одинаковое или разное количество петель.

Кроме того, функциональная группа может быть эффекторной группой, например Fc-областью антитела.

Присоединения к N или C-концу можно осуществить до связывания пептида с молекулярным каркасом или после. Таким образом, пептид может быть получен (синтетически или при помощи систем экспрессии биологического происхождения) с уже имеющейся N- или C-концевой пептидной группой. Предпочтительно, однако, присоединение к N- или C-концу происходит после того, как пептид был объединен с молекулярным остовом с образованием конъюгата. Например, флуоренилметилоксикарбонилхлорид можно использовать для введения защитной группы Fmoc на N-конце пептида. Fmoc связывается с сывороточными альбуминами, включая HSA, с высокой аффинностью, и Fmoc-Trp или Fmoc-Lys связываются с повышенной аффинностью. Пептид можно синтезировать с оставшейся на защитной группой Fmoc, и затем связать с каркасом через алкиламино-группы. Альтернативой является пальмитоильный

фрагмент, который также связывается с HSA и, например, используется в лираглутиде для продления периода полужизни этого GLP-1 аналога.

Альтернативно, можно получить конъюгат пептида с каркасом и затем модифицировать по N-концу, например, с амин- и сульфгидрил-реактивным линкером N-ε-малеимидапроилокси сукцинимидным эфиром (EMCS). Посредством этого линкера пептидный конъюгат может быть связан с другими пептидами, например Fc фрагментом антитела.

Функцией связывания может быть другой пептид, связанный с молекулярным каркасом, с образованием мультимера; другой связывающий белок, включая антитело или фрагмент антитела; или любое другое желаемое соединение, включая сывороточный альбумин или эффекторную группу, например Fc-область антитела.

Кроме того, дополнительные связывающие или функциональные активности могут быть связаны непосредственно с молекулярным каркасом.

В вариантах осуществления каркас может дополнительно включать реакционноспособную группу, с которой могут быть связаны дополнительные активности. Предпочтительно, эта группа является ортогональной по отношению к другим реакционноспособным группам на молекулярном каркасе, чтобы избежать взаимодействия с пептидом. В одном варианте осуществления реакционноспособная группа может быть защищена, и защита может быть снята, при необходимости, для конъюгирования дополнительных активностей.

Соответственно, в следующем аспекте настоящего изобретения обеспечивается конъюгат лекарственного средства, включающий пептидный лиганд, как определено в настоящем изобретении, конъюгированный с одной или более эффекторными и/или функциональными группами.

Эффекторные и/или функциональные группы могут быть присоединены, например, к N или C-концам полипептида или к молекулярному каркасу.

Подходящие эффекторные группы включают антитела и их части или фрагменты. Например, эффекторная группа может включать константную область легкой цепи антитела (CL), домен тяжелой цепи антитела CH1, домен тяжелой цепи антитела CH2, домен тяжелой цепи антитела CH3 или любую их комбинацию, в дополнение к одному или более доменам константной области. Эффекторная группа также может включать шарнирную область антитела (такая область обычно находится между CH1 и CH2 доменами молекулы IgG).

В следующем варианте осуществления этого аспекта настоящего изобретения эффекторная группа по настоящему изобретению представляет собой Fc область молекулы IgG. Предпочтительно, эффекторная группа пептидного лиганда по настоящему изобретению включает или состоит из слияния Fc с пептидным лигандом, имеющего период полужизни $t_{1/2}$ один день или более, два дня или более, 3 дня или более, 4 дня или более, 5 дней или более, 6 дней или более или 7 дней или более. Наиболее предпочтительно, пептидный лиганд по настоящему изобретению включает или состоит из слияния Fc с пептидным лигандом, имеющего период полужизни $t_{1/2}$ один день или более.

Функциональные группы, как правило, включают связывающие группы, лекарственные средства, реакционноспособные группы для присоединения других групп, функциональные группы, которые способны поглощению макроциклических пептидов клетками и т.п.

Способность пептидов проникать в клетки позволит пептидам быть эффективными против внутриклеточных мишеней. Мишени, к которым могут получать доступ пептиды со способностью проникать в клетки, включают факторы транскрипции, молекулы внутриклеточной сигнализации, такие как тирозинкиназы, и молекулы, участвующие в пути апоптоза. Функциональные группы, которые обеспечивают проникновение в клетки, включают пептиды или химические группы, которые были добавлены либо к пептиду, либо к молекулярному каркасу. Пептиды, например происходящие из таких, как VP22, HIV-Tat, гомеобокс-белок *Drosophila* (Antennapedia), описаны, например, в Chen and Harrison, *Biochemical Society Transactions* (2007) Volume 35, part 4, p821; Gupta et al. in *Advanced Drug Discovery Reviews* (2004) Volume 57 9637. Примеры коротких пептидов, которые, как было показано, эффективны при транслокации через плазматические мембраны, включают пептид пенетратин, состоящий из 16 аминокислот, из белка *Drosophila* Antennapedia (Derossi et al (1994) *J Biol. Chem.* Volume 269 p10444), "модельный амфипатический пептид" из 18 аминокислот (Oehlke et al (1998) *Biochim Biophys Acts* Volume 1414 p127) и богатые аргинином участки белка TAT ВИЧ. Непептидные подходы включают использование малых молекул-миметиков или SMOC, которые можно легко присоединить к биомолекулам (Okuyama et al (2007) *Nature Methods* Volume 4 p153). Другие химические стратегии по добавлению групп гуанидиния к молекулам также улучшают проникновение в клетки (Elson-Scwab et al (2007) *J Biol Chem* Volume 282 p13585). Молекулы с небольшой молекулярной массой, такие как стероиды, могут быть добавлены к молекулярному каркасу для усиления поглощения в клетки.

Один класс функциональных групп, которые могут быть присоединены к пептидным лигандам, включает антитела и их связывающие фрагменты, такие как Fab, Fv или однодоменные фрагменты. В частности, можно использовать антитела, которые связываются с белками, способными увеличивать время полужизни пептидного лиганда *in vivo*.

Также могут быть включены RGD пептиды, которые связываются с интегринами, присутствующими во многих клетках.

В одном варианте осуществления пептидный лиганд-эффекторная группа по настоящему изобретению имеет период полужизни $t_{1/2}$, выбранный из группы, состоящей из: 12 часов или более, 24 часа или более, 2 дня или более, 3 дня или более, 4 дня или более, 5 дней или более, 6 дней или более, 7 дней или более, 8 дней или более, 9 дней или более, 10 дней или более, 11 дней или более, 12 дней или более, 13 дней или более, 14 дней или более, 15 дней или более или 20 дней или более. Предпочтительно, пептидный лиганд-эффекторная группа или композиция по настоящему изобретению будет иметь период полужизни $t_{1/2}$ в диапазоне от 12 до 60 часов. В следующем варианте осуществления период полужизни $t_{1/2}$ будет один день или более. В следующем варианте осуществления период полужизни будет в диапазоне от 12 до 26 часов.

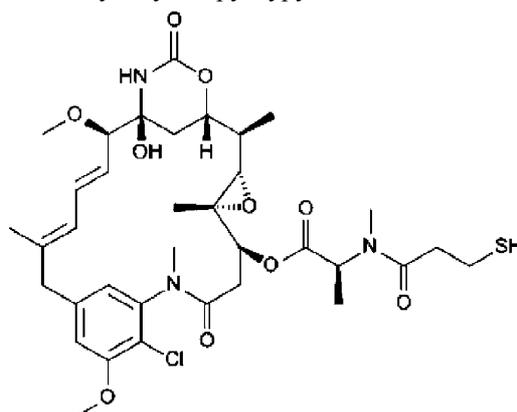
В одном конкретном варианте осуществления настоящего изобретения функциональная группа, конъюгированная с петлевым пептидом, выбрана из металлохелатора, который является подходящим для комплексообразования радиоизотопов металла, имеющих медицинское значение. Такие эффекторы при образовании комплекса с указанными радиоизотопами могут представлять полезные агенты для терапии рака. Подходящие примеры включают DOTA, NOTA, EDTA, DTPA, HENa, SarAr и другие (Targeted Radionuclide therapy, Tod Speer, Wolters/Kluwer Lippincott Williams & Wilkins, 2011).

Возможные эффекторные группы также включают ферменты, например, такие как карбоксипептидаза G2, для применения в ферментной/пролекарственной терапии, где пептидный лиганд заменяет антигена в ADEPT.

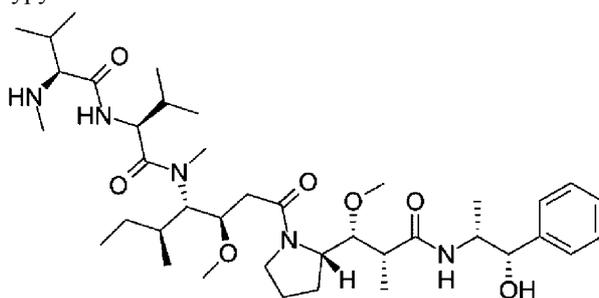
В одном конкретном варианте осуществления этого аспекта настоящего изобретения функциональная группа выбрана из лекарственного средства, такого как цитотоксическое средство для терапии рака. Подходящие примеры включают: алкилирующие средства, такие как цисплатин и карбоплатин, а также оксалиплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, ифосфамид; антиметаболиты, включая пуриновые аналоги азатиоприн и меркаптопурин или пиримидиновые аналоги; растительные алкалоиды и терпеноиды, включая алкалоиды барвинка, такие как винкрестин, винбластин, винорелбин и виндезин; подофиллотоксин и его производные этопозид и тенипозид; таксаны, включая паклитаксел, первоначально известный как таксол; ингибиторы топоизомеразы, включая камптотецины: иринотекан и топотекан, и ингибиторы типа II, включая амсакрин, этопозид, этопозид фосфат и тенипозид. Другие средства могут включать противоопухолевые антибиотики, которые включают иммунодепрессант дактиномицин (который используется при трансплантации почки), доксорубин, эпирубицин, блеомицин и другие.

В еще одном конкретном варианте осуществления настоящего изобретения в соответствии с этим аспектом цитотоксическое средство выбрано из DM1 или MMAE.

DM1 представляет собой цитотоксическое средство, которое представляет собой тиол-содержащее производное майтансина и имеет следующую структуру:



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



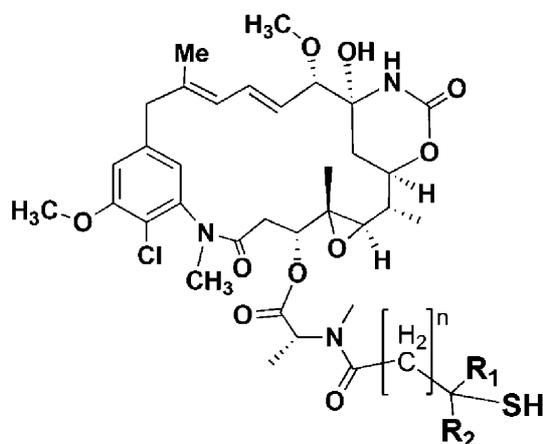
В одном варианте осуществления цитотоксическое средство связано с бициклическим пептидом

при помощи расщепляемой связи, такой как дисульфидная связь. В дополнительном варианте осуществления группы, смежные с дисульфидной связью, модифицированы для контроля затруднения дисульфидной связи и тем самым скорости расщепления и сопутствующего высвобождения цитотоксического средства.

Опубликованная работа установила потенциал для модификации восприимчивости дисульфидной связи к восстановлению путем введения стерического затруднения по обеим сторонам дисульфидной связи (Kellogg et al (2011) *Bioconjugate Chemistry*, 22, 717). Большая степень стерического затруднения снижает скорость восстановления посредством внутриклеточного глутатиона, а также внеклеточных (системных) восстановителей, следовательно, уменьшая легкость, с которой выделяется токсин, как внутри, так и снаружи клетки. Таким образом, выбор оптимальной дисульфидной стабильности в кровотоке (которая минимизирует нежелательные побочные эффекты токсина) в сравнении с эффективным высвобождением во внутриклеточной среде (которая максимизирует терапевтический эффект) может быть достигнута путем тщательного выбора степени затруднения с обеих сторон дисульфидной связи.

Затруднения на каждой стороне дисульфидной связи модулируют путем введения одной или более метильных групп либо на стороне нацеливающегося фрагмента (здесь бициклический пептид), либо на стороне токсина молекулярной конструкции.

Таким образом, в одном варианте осуществления цитотоксическое средство выбрано из соединения формулы:



где n представляет собой целое число, выбранное из 1-10; и

R_1 и R_2 независимо представляют собой водород или метильные группы.

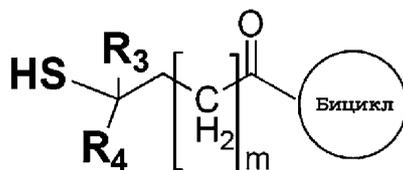
В одном варианте осуществления соединения вышеуказанной формулы n имеет значение 1, и R_1 и R_2 оба представляют собой водород (то есть, производное майтансина DM1).

В альтернативном варианте осуществления соединения вышеуказанной формулы n имеет значение 2, R_1 представляет собой водород, и R_2 представляет собой метильную группу (то есть, производное майтансина DM3).

В одном варианте осуществления соединения n имеет значение 2, и R_1 и R_2 оба представляют собой метильные группы (то есть, производное майтансина DM4).

Должно быть понятно, что цитотоксическое средство может образовывать дисульфидную связь, и в структуре конъюгата с бициклическим пептидом дисульфидную связь между тиолом-токсином и тиолом-бициклическим пептидом вводят посредством нескольких возможных схем синтеза.

В одном варианте осуществления бициклический пептидный компонент конъюгата имеет следующую структуру:



где m представляет собой целое число, выбранное из 0-10.

Бицикл представляет собой любую подходящую петлевую пептидную структуру, как описано в настоящем изобретении; и

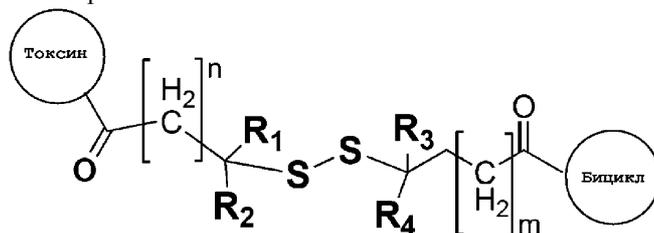
R_3 и R_4 независимо представляют собой водород или метил.

Соединения вышеуказанной формулы, где R_3 и R_4 оба представляют собой водород, считаются незатрудненными, а соединения вышеуказанной формулы, где один или все из R_3 и R_4 представляют собой метил, считаются затрудненными.

Должно быть понятно, что бициклический пептид вышеуказанной формулы может образовывать дисульфидную связь, и в структуре конъюгата с цитотоксическим средством, описанной выше, дисуль-

фидную связь между тиолом-токсином и тиолом-бициклическим пептидом вводят посредством нескольких возможных схем синтеза.

В одном варианте осуществления цитотоксическое средство связано с бициклическим пептидом при помощи следующего линкера:



где R_1 , R_2 , R_3 и R_4 представляют собой водород или C1-C6 алкильные группы;

Токсин относится к любому подходящему цитотоксическому средству, определенному в настоящем изобретении.

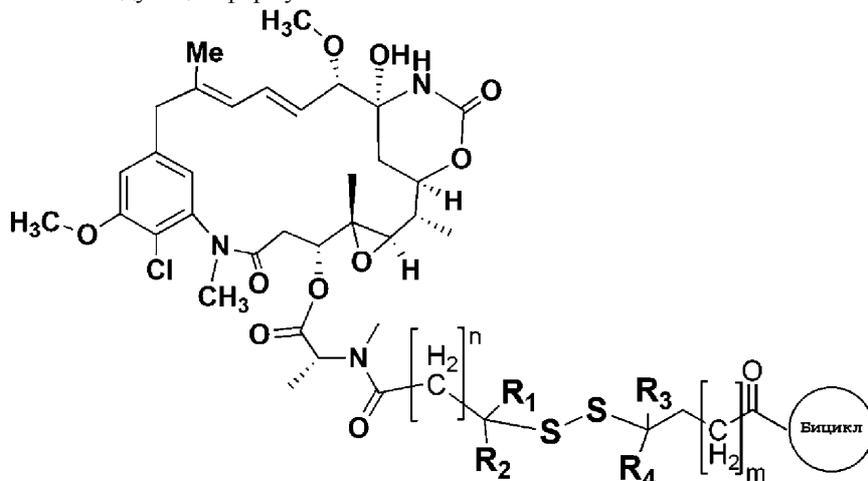
Бициклическое соединение представляет собой любую подходящую петлевую пептидную структуру, как описано в настоящем изобретении;

n представляет собой целое число, выбранное из 1-10; и

m представляет собой целое число, выбранное из 0-10.

Когда R_1 , R_2 , R_3 и R_4 каждый представляют собой водород, дисульфидная связь является наименее затрудненной и наиболее подвержена восстановлению. Когда R_1 , R_2 , R_3 и R_4 каждый представляют собой алкил, дисульфидная связь является наиболее затрудненной и наименее подвержена восстановлению. Частичные замещения водорода и алкила приводят к постепенному увеличению устойчивости к восстановлению, а также к сопутствующему расщеплению и высвобождению токсина. Предпочтительные варианты осуществления включают: R_1 , R_2 , R_3 и R_4 все H; R_1 , R_2 , R_3 все H и R_4 =метил; R_1 , R_2 =метил и R_3 , R_4 =H; R_1 , R_3 =метил и R_2 , R_4 =H; и R_1 , R_2 =H, R_3 , R_4 =C1-C6 алкил.

В одном варианте осуществления токсин соединения представляет собой майтансин, и конъюгат включает соединение следующей формулы:



где R_1 , R_2 , R_3 и R_4 такие, как определены выше;

Бициклическое соединение представляет собой любую подходящую петлевую пептидную структуру, как определено в настоящем изобретении;

n представляет собой целое число, выбранное из 1-10; и

m представляет собой целое число, выбранное из 0-10.

Дополнительные подробности и способы получения вышеописанных конъюгатов бициклических пептидных лигандов с токсинами подробно описаны в опубликованной заявке на патент WO 2016/067035 авторов настоящего изобретения и находящейся на рассмотрении заявке GB 1607827.1, поданной 4 мая 2016. Полное раскрытие этих заявок явным образом включено в настоящую заявку посредством ссылки.

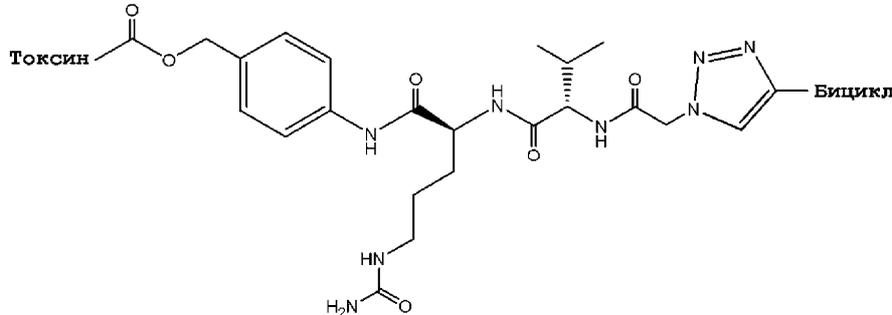
Линкер между токсином и бициклическим пептидом может включать триазольную группу, образованную путем клик-реакции между азид-функционализированным токсином и алкин-функционализированной бициклической пептидной структурой (или наоборот). В других вариантах осуществления бициклический пептид может содержать амидную связь, образованную взаимодействием между карбоксилат-функционализированным токсином и N-концевой амино группой бициклического пептида.

Линкер между токсином и бициклическим пептидом может включать расщепляемую катепсином

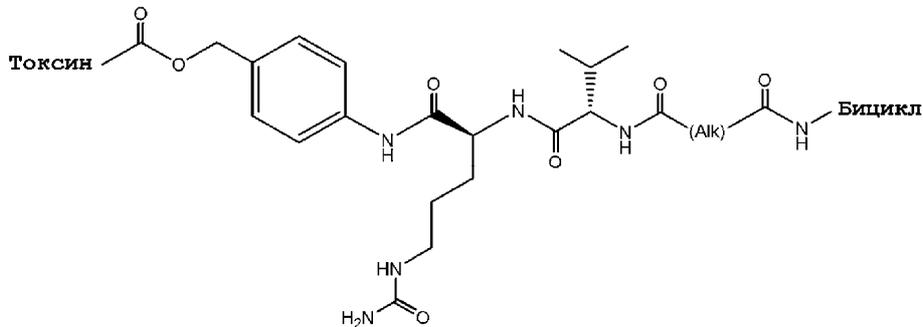
группу для обеспечения селективного высвобождения токсина в клетках-мишенях. Подходящая расщепляемая катепсином группа представляет собой валин-цитруллин.

Линкер между токсином и бициклическим пептидом может включать одну или более спейсерных групп для обеспечения желаемой функциональности, например, аффинности связывания или расщепляемости катепсином, конъюгата. Подходящей спейсерной группой является пара-аминобензилкарбамат (РАВС), который может находиться между группой валин-цитруллина и токсинным фрагментом.

Таким образом, в вариантах осуществления конъюгат бициклический пептид-лекарственное средство может иметь следующую структуру, состоящую из Токсин-РАВС-cit-val-триазол-Бицикл:



В других вариантах осуществления конъюгат бициклический пептид-лекарственное средство может иметь следующую структуру, состоящую из Токсин-РАВС-cit-val-дикарбоксилат-Бицикл:



где (alk) представляет собой алкиленовую группу формулы C_nH_{2n} , где n имеет значение от 1 до 10, и может быть линейной или разветвленной, предпочтительно (alk) представляет собой n-пропилен или n-бутилен.

Предпочтительно, конъюгат бициклический пептид-лекарственное средство выбран из группы, состоящей из VT17BDC53, VT17BDC59, VT17BDC61, VT17BDC62 и VT17BDC68, как определено ниже.

Пептидные лиганды по настоящему изобретению можно использовать в терапевтических и профилактических применениях *in vivo*, диагностических применениях *in vitro* и *in vivo*, анализах *in vitro* и применения в качестве реагентов, и т.п.

Как правило, применение пептидного лиганда может заменить применение антитела. Производные, выбранные в соответствии с изобретением, используют для диагностики в Вестерн-анализе и для детекции белка *in situ* стандартными иммуногистохимическими методами; для использования в этих применениях производные выбранного спектра могут быть помечены в соответствии с методами, известными в данной области техники. Кроме того, такие пептидные лиганды могут использоваться препаративно в процедурах аффинной хроматографии, когда они образуют комплекс с хроматографическим носителем, таким как смола. Все такие методы хорошо известны специалистам в данной области. Пептидные лиганды в соответствии с настоящим изобретением обладают способностями связывания, аналогичными способностям антител, и могут заменять антитела в таких анализах.

Диагностические применения включают любые виды применения, где обычно применяют антитела, включая анализы с тест-полосками, лабораторные анализы и иммунодиагностические анализы.

Терапевтические и профилактические применения пептидных лигандов, полученных в соответствии с изобретением, включают введение производных, выбранных в соответствии с изобретением, млекопитающему-реципиенту, такому как человек. По существу чистые пептидные лиганды с гомогенностью по меньшей мере от 90 до 95% предпочтительны для введения млекопитающему, и гомогенность от 98 до 99% или более наиболее предпочтительна для фармацевтического применения, особенно когда млекопитающее представляет собой человека. После очистки, частично или до гомогенности, по желанию, выбранные пептиды можно использовать диагностически или терапевтически (в том числе экстракорпорально) или при разработке и осуществлении процедур анализа, иммунофлуоресцентных окрашиваний и т.п. (Lefkovite and Pernis, (1979 и 1981) *Immunological Methods*, Volumes I и II, Academic Press, NY).

Как правило, пептидные лиганды по настоящему изобретению будут использоваться в очищенной форме вместе с фармакологически подходящими носителями. Обычно эти носители включают водные

или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, любые из которых включают насыщенный солевой раствор и/или забуференную среду. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, раствор декстрозы Рингера, растворы декстрозы и хлорида натрия и лактат Рингера. Подходящие физиологически приемлемые адъюванты, если необходимо поддерживать пептидный комплекс в суспензии, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

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

Пептидные лиганды по настоящему изобретению можно использовать в виде отдельно вводимых композиций или в сочетании с другими средствами. Они могут включать антитела, фрагменты антител и различные иммунотерапевтические препараты, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин, и иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать "коктейли" различных цитотоксических или других средств в сочетании с wybranymi антителами, их рецепторами или связывающими белками по настоящему изобретению или даже комбинации выбранных пептидов по настоящему изобретению, имеющих различные специфичности, таких как пептиды, выбранные с использованием различных целевых производных, независимо от того, объединяли их до введения или нет.

Путь введения фармацевтических композиций по изобретению может быть любым из тех, которые обычно известны специалистам в данной области. Для терапии, включая без ограничения иммунотерапию, выбранные антитела, рецепторы или их связывающие белки по настоящему изобретению можно вводить любому пациенту в соответствии со стандартными методами. Введение можно осуществлять любым подходящим способом, включая парентеральное, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, трансдермальное, через легкие или также, в соответствующих случаях, путем прямой инфузии при помощи катетера. Дозировка и частота введения будут зависеть от возраста, пола и состояния пациента, одновременного приема других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые должен принимать во внимание врач.

Пептидные лиганды по настоящему изобретению можно лиофилизировать для хранения и восстановить в подходящем носителе перед использованием. Было показано, что этот метод является эффективным, и могут быть использованы известные в данной области техники способы лиофилизации и восстановления. Специалистам в данной области будет понятно, что лиофилизация и восстановление могут приводить к различной степени потери активности и что используемые уровни, возможно, придется корректировать в сторону увеличения, чтобы компенсировать это.

Композиции, содержащие пептидные лиганды по изобретению или их смесь, можно вводить для профилактического и/или терапевтического лечения. В некоторых терапевтических применениях адекватное количество для достижения по меньшей мере частичного ингибирования, подавления, модуляции, уничтожения, или некоторого другого измеримого параметра, популяции выбранных клеток определяется как "терапевтически эффективная доза". Количество, необходимые для достижения этой дозировки, будут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния собственной иммунной системы пациента, но обычно составляют 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/доза более широко используются. Для профилактических применений композиции, содержащие пептидные лиганды по изобретению или их смесь, также можно вводить в аналогичных или слегка более низких дозировках.

Композиция, содержащая пептидный лиганд по настоящему изобретению, может использоваться в профилактических и терапевтических условиях для содействия изменению, инактивации, уничтожению или удалению выбранной популяции клеток-мишеней у млекопитающего. Кроме того, выбранный репертуар пептидов, описанных в настоящем изобретении, можно использовать экстракорпорально или селективно *in vitro* для уничтожения, истощения или иного эффективного удаления популяции клеток-мишеней из гетерогенной группы клеток. Кровь от млекопитающего может быть экстракорпорально объединена с выбранными пептидными лигандами, в результате чего нежелательные клетки убиваются или иным образом удаляются из крови, возвращаемой млекопитающему в соответствии со стандартными методиками.

Настоящее изобретение далее описано со ссылкой на следующие примеры.

Примеры

Материалы и методы.

Экспрессия белка.

MT1-MMP гемопексин-подобные повторы (также известные как гемопексиновый домен MT1-MMP), остаток Cys319-Gly511 из гена человека, транзientно экспрессировали в клетках HEK293 в виде секретиремого на N-конце His6-меченного растворимого белка, с использованием вектора экспрессии rEXPR-IBA42 (IBA). После экспрессии белок очищали при помощи Nickel-NTA аффинной хроматографии с последующей гель-фильтрацией и чистоту проверяли при помощи SDS-PAGE. Вариабельность между партиями также контролировали при помощи экспериментов с тепловым сдвигом флуоресценции

в присутствии/отсутствии бицикла, связывающегося с гемопексиновым доменом.

Синтез пептидов.

Синтез пептидов основан на Fmoc-химии с использованием синтезатора пептидов Symphony, производимого Peptide Instruments, и синтезатора Sygo II от MultiSynTech. Использовали стандартные Fmoc-аминокислоты (Sigma, Merck) со следующими защитными группами боковой цепи: Arg(Pbf); Asn(Trt); Asp(OtBu); Cys(Trt); Glu(OtBu); Gln(Trt); His(Trt); Lys(Boc); Ser(tBu); Thr(tBu); Trp(Boc); и Tyr(tBu) (Sigma). Реагент для реакций сочетания представлял собой HCTU (Percepticals), в качестве основания использовали диизопропилэтиламин (DIPEA, Sigma), и снятие защиты достигали при помощи 20% пиперидина в DMF (AGTC). Синтезы осуществляли с использованием 0,37 ммоль/г Fmoc-Rink амидной АМ смолы (AGTC), Fmoc-аминокислоты использовали в четырехкратном избытке, а основание в четырехкратном избытке по отношению к аминокислотам. Аминокислоты растворяли при концентрации 0,2М в DMSO, HCTU при 0,4М в DMF, и DIPEA при 1,6М в N-метилпирролидоне (Alfa Aesar). Условия были такими, что реакции сочетания содержали от 20 до 50% DMSO в DMF, что уменьшало агрегацию и делеции в процессе твердофазного синтеза и повышало выходы. Время связывания обычно составляло 30 минут, а время снятия защиты 2x5 минут. Fmoc-N-метилглицин (Fmoc-Sar-OH, Merck) подвергали реакции сочетания в течение 1 часа, и время снятия защиты и связывания для следующего остатка составляли 20 минут и 1 час, соответственно. После синтеза смолу промывали дихлорметаном и сушили. Отщепление защитных групп боковой цепи и от носителя осуществляли с использованием 10 мл 95:2,5:2,5:2,5 об/об/об/масс TFA/H₂O/iPr₃SiH/дителиотреитол в течение 3 ч. После отщепления отработанную смолу удаляли фильтрацией и фильтрат добавляли к 35 мл диэтилового эфира, который был охлажден при -80°C. Пептидный осадок центрифугировали, эфирный супернатант отбрасывали, а пептидный осадок промывали холодным эфиром еще два раза. Затем пептиды повторно растворяли в 5-10 мл ацетонитрил-вода и лиофилизировали. Небольшой образец отбирали для анализа чистоты неочищенного продукта при помощи масс-спектрометрии (MALDI-TOF, Voyager DE от Applied Biosystems). После лиофилизации пептидные порошки помещали в 10 мл 6 М раствора гидрохлорида гуанидиния в H₂O, дополненного 0,5 мл 1 М дителиотреитола, и загружали в колонку препаративной ВЭЖХ C8 Luna (Phenomenex). Растворители (H₂O, ацетонитрил) подкисляли 0,1% раствором гептафтормасляной кислоты. Использовали градиент от 30-70% ацетонитрила за 15 минут при скорости потока 15-20 мл/мин с использованием системы препаративной ВЭЖХ Gilson. Фракции, содержащие чистый линейный пептид (как определено методом MALDI), использовали для получения бициклических производных путем связывания с каркасной молекулой, как описано ниже.

Все аминокислоты, если не указано иное, использовали в L-конфигурации. Неприродные аминокислоты были включены в пептидную последовательность с использованием общих методов, описанных выше. Перечень использованных предшественников неприродных аминокислот приведен в таблице ниже.

Поставщик	Краткое название	Полное химическое название
AGTC	D-Asp	Fmoc-D-Asp (tBu) -OH
Iris Biotech	H ₂ Phe	Fmoc-L-Гомофенилаланин
Alfa Aesar	5FPhe	Fmoc-пентафтор-L-фенилаланин
PolyPeptide Group	4BrPhe	Fmoc-4-бром-L-фенилаланин

Iris Biotech	bAla	Fmoc-бета-Ala-OH
Iris Biotech	3Pal	Fmoc-L-3Pal-OH
Iris Biotech	4Pal	Fmoc-L-4Pal-OH
Iris Biotech	D-Pro	Fmoc-D-Pro-OH
Merck Novabiochem	Aib	Fmoc-Aib-OH
Merck Novabiochem	D-Ala	Fmoc-D-Ala-OH
Merck Novabiochem	D-Arg	Fmoc-D-Arg (Pbf) -OH
Merck Novabiochem	D-Gln	Fmoc-D-Gln (Trt) -OH
Merck Novabiochem	D-His	Fmoc-D-His (Trt) -OH
Merck Novabiochem	Hyp	Fmoc-Hyp (tBu) -OH
Merck Novabiochem	D-Leu	Fmoc-D-Leu-OH
Merck Novabiochem	HArg	Fmoc-L-HArg (Boc) 2-OH
Peptech Corporation	4,4-BPal	Fmoc-L-4,4'-бифенилаланин
Peptech Corporation	3,3-DPA	Fmoc-L-3,3-дифенилаланин
Peptech Corporation	Dpg	Fmoc-дипропилглицин
Peptech Corporation	1Nal	Fmoc-L-1-Нафтилаланин
Peptech Corporation	2Nal	Fmoc-L-2-Нафтилаланин
Peptech Corporation	Pip	Fmoc-L-пипеколиновая кислота
Polypeptide Group	Aze	Fmoc-L-азетидин-2-карбоновая кислота
Polypeptide Group	Cha	Fmoc-бета-циклогексил-L-аланин
Polypeptide Group	4FluoPro	(2S, 4R) -Fmoc-4-фтор-пирролидин-2-карбоновая кислота
AGTC	D-Asp	Fmoc-D-Asp (tBu) -OH
Merck	tBuGly	Fmoc-α-трет-бутилглицин
Iris Biotech	Chg	Fmoc-L-циклогексилглицин
Fluorochem	Phg	Fmoc-Фенилглицин-OH
Iris Biotech	3Pal	Fmoc-L-3Pal-OH
Iris Biotech	4Pal	Fmoc-L-4Pal-OH
Merck Novabiochem	D-Leu	Fmoc-D-Leu-OH
Merck Novabiochem	HArg	Fmoc-L-HArg (Boc) 2-OH
Polypeptide Group	3,4 DCPhe	Fmoc-3,4-дихлор-L-фенилаланин
Polypeptide Group	Cha	Fmoc-бета-циклогексил-L-аланин

Кроме того, для получения модифицированных пептидов DAP и N-MeDAP использовали следующие предшественники неприродных аминокислот:

Соединение	CAS	Мол.масса	Поставщик
Fmoc-L-Dap (Boc, Me) -OH	446847-80-9	440,49	Iris Biotech GMBH
Fmoc-Dap (Boc) -OH	162558-25-0	426,46	Sigma Aldrich

Аффинность связывания с МТ1-ММР.

Аффинность связывания измеряли с использованием конкурентных анализов с использованием поляризации флуоресценции (анизотропия).

Флуоресцентные метки, упоминаемые в настоящем изобретении, представляют собой бициклические пептиды, которые подвергали мечению с использованием 5,6-карбоксифлуоресцеина.

Флуоресцентное мечение можно осуществить на N-концевой аминогруппе пептида, которая отделена от коровой последовательности бицикла саркозиновым спейсером (обычно Sar5). Это можно осуществить в процессе Fmoc твердофазного синтеза или после синтеза (после циклизации с ТВМВ и очистки), если N-концевая аминогруппа является уникальной для пептида. Флуоресцентное мечение также можно осуществить на C-конце, обычно на лизине, введенном как первый C-концевой остаток, который затем отделяют от коровой последовательности бицикла саркозиновым спейсером (обычно Sar6). Таким образом, N-концевые метки могут иметь молекулярный формат, описанный как Fluo-Gly-Sar5-A (БициклКороваяПоследовательность), и (БициклКороваяПоследовательность)-A-Sar6-K(Fluo) для конструкции, меченной флуоресцеином на C-конце. Флуоресцентные метки, используемые в примерах, представляют собой A-(17-69)-A-Sar6-K(Fluo), A-(17-69-07)-A-Sar6-K(Fluo) и A-(17-69-12)-A-Sar6-K(Fluo). Из-за кислотной природы флуоресцентных пептидов 17-69 их обычно получали в виде концентрированных исходных растворов в DMSO, из которых получали разбавления в 100 мМ Трис буфере с рН 8.

Благодаря их высокой аффинности к Гемопексиновому домену МТ1-ММР (РЕХ), меченные флуоресцеином производные можно использовать для конкурентных экспериментов (с использованием FP для детекции). В данном случае, предварительно образованный комплекс РЕХ с флуоресцентной РЕХ-

связывающей меткой титровали со свободным, не меченным флуоресцеином бициклическим пептидом. Поскольку ожидают, что все 17-69-основанные пептиды связываются на одном и том же сайте, титрующее вещество вытеснит флуоресцентную метку из РЕХ. Диссоциацию комплекса можно измерить количественно и определить K_d конкурирующего вещества (титрующее вещество) в отношении целевого белка. Преимущество конкурентного метода заключается в том, что аффинности не меченных флуоресцеином бициклических пептидов можно определить точно и быстро.

Концентрации меченого вещества обычно находятся на уровне K_d или ниже (здесь 1 нМ), а связывающий белок (здесь гемопексин МТ1-ММР) находится в 15-кратном избытке, так что связывается >90% меченого вещества. После этого нефлуоресцентный конкурирующий бициклический пептид (обычно просто коровая последовательность бицикла) титруют так, что он вытесняет флуоресцентную метку из целевого белка. Вытеснение меченого вещества измеряют и связывают с падением поляризации флуоресценции. Снижение поляризации флуоресценции пропорционально фракции целевого белка, связанной с нефлуоресцентным титрующим веществом, и таким образом, это является показателем аффинности титрующего вещества к целевому белку.

Исходные данные используют для подгонки для аналитического решения кубического уравнения, которое описывает равновесие между флуоресцентной меткой, титрующим веществом и связывающимся белком. Для подгонки требуется значение аффинности флуоресцентной метки к белку-мишени, которое можно определить отдельно с помощью экспериментов прямого связывания FP (см. предыдущий раздел). Подбор кривой осуществляли с использованием Sigmaplot 12.0 и использовали адаптированную версию уравнения, описанного Zhi-Xin Wang (FEBS Letters 360 (1995) 111-114).

Ссылочный пример 1.

Бициклический Пептид, выбранный для сравнения тиоэфирной и алкиламино каркасной связи обозначали как 17-69-07-N241. Он представляет собой бициклический конъюгат тиоэфир-образующего пептида с триметиленбензолным каркасом. Структура этого бициклического производного схематически показана на фиг. 2. Линейный пептид до конъюгации имеет последовательность:

H-(β -Ala)-Sar10-Ala-Cys-(D-Ala)-Asn-Glu-(1Nal)-(D-Ala)-Cys-Glu-Asp-Phe-Тур-Asp-(tBuGly)-Cys-NH₂

Конъюгацию с 1,3,5-трис(бромметил)бензолом (ТВМВ, Sigma) осуществляли следующим образом. Линейный пептид разбавляли при помощи H₂O до ~35 мл, добавляли ~500 мкл 100 мМ ТВМВ в ацетонитриле и реакцию инициировали при помощи 5 мл 1 М раствора NH₄HCO₃ в H₂O. Реакции давали осуществиться в течение ~30-60 мин при комнатной температуре и лиофилизировали после завершения реакции (по данным MALDI). После лиофилизации модифицированный пептид очищали, как указано выше, заменяя Luna C8 на колонку Gemini C18 (Phenomenex) и заменяя кислоту 0,1% раствором трифторуксусной кислоты. Чистые фракции, содержащие нужное ТМВ-модифицированное вещество, объединяли, лиофилизировали и поддерживали при -20°C для хранения.

Полученное бициклическое производное, обозначенное 17-69-07-N241, показало высокую аффинность к МТ1-ММР. Измеренная аффинность (K_d) этого производного к МТ1-ММР составляла 0,23 нМ. Следовательно, производное рассматривают как перспективный кандидат для таргетирования опухолевых клеток, которые экспрессируют металлопротеиназу МТ1-ММР на клеточной поверхности.

Пример 1.

Получали бициклический пептид, обозначенный 17-69-07-N385, соответствующий бициклической области пептидного лиганда ссылочного примера 1, минус b-Ala -Sar10 хвост, и с заменой первого и третьего цистеиновых остатков DAP остатками, образующими алкиламино-связи с ТВМВ каркасом. Структура этого производного схематически показана на фиг. 3.

Линейный пептид, используемый для образования этого бицикла, был следующим:

Ac-A(Dap)(D-Ala)NE(1Nal)(D-Ala)CEDFYD(tBuGly)(Dap)

Линейный пептид и бициклический пептид имели следующие ЖХМС характеристики:

	Время удерживания	присутствующее m/z
Линейный пептид	4,17 мин.	886,1, 1771,7
Циклизированный пептид	4,39 мин.	942,7

Различные реагенты для стадии циклизации опробовали следующим образом. Реагенты получали до концентраций, указанных в таблице ниже, в выбранном растворителе. К объему раствора пептида добавляли половину этого объема раствора ТВМВ, смесь, которую тщательно перемешивали, затем составляла половину объема основного раствора. Реакционную смесь периодически перемешивали и отбирали образцы для анализа ЖХМС.

Реагент	Начальная концентрация раствора	Объемные эквиваленты, добавленные в реакцию	Конечная концентрация раствора
Пептид	1,0 мМ	1,0	0,5 мМ
ТВМВ	2,6 мМ	0,5	0,65 мМ
Основание	200 мМ	0,5	50 мМ

Пример: к 50 мкл раствора пептида добавляли 25 мкл раствора TBMB. Раствор тщательно перемешивали, затем добавляли 25 мкл раствора основания.

В тех случаях, когда используемый растворитель представлял собой DMF, все реагенты получали в DMF. В тех случаях, когда используемый растворитель представлял собой DMSO, все реагенты получали в DMSO. В тех случаях, когда используемый растворитель представлял собой MeCN/H₂O, растворы пептида получали в 50% MeCN/H₂O, растворы TBMB получали в MeCN и растворы основания получали в H₂O, за исключением случая, когда основание представляет собой DIPEA, в этом случае раствор основания получали в MeCN. Все циклизации осуществляли при комнатной температуре. Результаты были следующими (диапазон спектра установлен при 3,5-5,5 мин. Спектр при 220 нм интегрировали и брали сумму основных пиков):

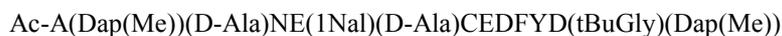
Растворитель	Основание	Суммарная интеграция	Интеграция продукта	% продукта	Время
MeCN/H ₂ O	NEt ₃	4641,0	2857,1	62%	5 часов
	Na ₂ CO ₃	5470,8	546,1	10%	5 часов
	NaHCO ₃	9956,5	3530,4	35%	4 часа
	NH ₄ HCO ₃	6948,9	0	0%	5 часов
	тетраметилгуанидин	12130,5	211,9	2%	5 часов
	DIPEA	9081,1	5951,6	66%	16 часов

Можно видеть, что чистота после циклизации сильно зависит от выбора основания. Чистота продукта находится в диапазоне от 2 до 66%, где последняя включает смесь ацетонитрил/вода в присутствии DIPEA. В отличие от циклизации сылочного примера 1, выход является относительно низким при использовании обычного NaHCO₃ в качестве основания. Наилучшие выходы достигаются при использовании триалкиламинов, а именно триэтиламина и диизопропилэтиламина (DIPEA).

Сравнительные данные связывания с MT1-MMP показаны на фиг. 7. Измеренное значение K_d составляет 0,45 нМ, что демонстрирует, что изменение до алкиламино-связей в этом примере привело к удивительно небольшому изменению аффинности связывания по сравнению с тиоэфирно-связанным производным сылочного примера 1.

Пример 2.

Получали бициклический пептид, обозначенный 17-69-07-N426, соответствующий бициклическому пептиду примера 1, с заменой DAP остатков остатками N-MeDAP. Структура этого производного схематически показана на фиг. 4. Линейный пептид, используемый для образования этого бицикла, был следующим:



Линейный пептид и бициклический пептид имели следующие ЖХМС характеристики:

	Время удерживания	присутствующее m/z
Линейный пептид	4,19 мин.	900,1, 1799,1
Циклизированный пептид	4,38 мин.	956,0, 1913,7

Различные условия реакции, растворители и основания использовали для стадии циклизации, как описано в примере 1, со следующими результатами (все циклизации осуществляли при комнатной температуре):

Растворитель	Основание	Суммарная интеграция	Интеграция продукта	% Продукта	Время
MeCN/H ₂ O	Na ₂ CO ₃	21659,8	12714,5	59%	1 час
MeCN/H ₂ O	DIPEA	10547,7	9841,3	93%	16 часов

Чистота после циклизации снова зависит от природы основания. Как и ожидалось, чистота с Na₂CO₃ в качестве основания низкая (см. пример 1). При использовании оптимального условия ацетонитрил/вода в присутствии DIPEA чистота после циклизации очень высокая (93%), что свидетельствует о том, что N-метилирование Dap снижает уровень побочных реакций.

Сравнительные данные связывания с MT1-MMP показаны на фиг. 8. Измеренное значение K_d составляет 0,36 нМ, которое практически не изменяется по сравнению с тиоэфирно-связанным производным сылочного примера 1. Эта активность сохраняется, несмотря на два N-метилирования на связи и, таким образом, производное настоящего примера представляет особый интерес.

Пример 3.

Получали бициклический пептид, обозначенный 17-69-07-N428, соответствующий бициклическому пептиду примера 1 с заменой Tug9 на Phe9 (удаления гидроксила Tug). Линейный пептид, используемый для образования этого бицикла, был следующим:

Ac-A(Dap) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFF₉D (tBuGly) (Dap) Линейный пептид и бициклический пептид имели следующие ЖХМС характеристики:

	Время удерживания	присутствующее m/z
Линейный пептид	4,51 мин.	876,5, 1755,4
Циклизированный пептид	4,80 мин.	935,3

Различные условия реакции, растворители и основания использовали для стадии циклизации, как описано в примере 1, со следующими результатами (ЖХМС диапазон спектра установлен при 4-6 мин. Спектр при 220 нм интегрировали и брали сумму основных пиков):

Растворитель	Основание	Темп.	Суммарная интеграция	Интеграция продукта	% Продукта	Время
MeCN/H ₂ O	DIPEA	комн. темп.	5962,8	4209,3	71%	6 часов
MeCN/H ₂ O	DIPEA	50°C	5936,4	2898,3	49%	1 час
DMF	DIPEA	комн. темп.	4804,6	84,7	2%	1 час
DMF	DIPEA	50°C	4384,8	309,7	7%	1 час
MeCN/H ₂ O	TMG	комн. темп.	5050,8	2023,8	40%	1 час
MeCN/H ₂ O	K ₂ CO ₃	комн. темп.	6366,7	4109,2	65%	4 часа
MeCN/H ₂ O	K ₂ CO ₃	50°C	5314,5	2306,7	43%	1 час

Можно видеть, что чистота продукта находится в диапазоне от 2 до 71%, причем последняя включает смесь ацетонитрил/вода в присутствии DIPEA. Удаление Tug-OH (Tug→Phe9) значительно увеличивает выход продукта по сравнению с той же реакцией с тирозин-содержащим пептидом в условиях MeCN/H₂O/TMG/комн.темп, или MeCN/H₂O/K₂CO₃/комн. темп. Использование DMSO в качестве растворителя давало очень грязные хроматограммы с несколькими пиками, которые не могли быть легко проанализированы.

Сравнительные данные связывания этого производного 17-69-07-N428 с MT1-MMP показаны на фиг. 9. Измеренное значение K_d составляет 3,5 нМ. Небольшое снижение аффинности связывания по сравнению с тиоэфир-связанным производным ссылочного примера 1, как представляется, в основном связано с заменой Tug9 на Phe9.

Пример 4.

Получали бициклический пептид, обозначенный 17-69-07-N434, соответствующий бициклическому пептиду примера 1, с N-концевым спейсером Sar10, подобным используемому в ссылочном примере 1, и конъюгирующей группой PYA (4-пентиновой кислотой, для "клик"-дерииватизации токсином). Структура этого производного схематически показана на фиг. 5. Линейный пептид, используемый для образования этого бицикла, был следующим:

(PYA)-(B-Ala)-Sar10-A(Dap)(D-Ala)NE(1Nal)(D-Ala)CEDFYD(tBuGly)(Dap)

Линейный пептид и бициклический пептид имели следующие ЖХМС характеристики:

	Время удерживания	присутствующее m/z
Линейный пептид	4,18	863,7, 1294,8
Циклизованный пептид	4,37	902,6, 1353,0

Циклизацию осуществляли следующим образом:

Растворитель	Основание	Темп.	Суммарная интеграция	Интеграция продукта	% Продукта	Время
MeCN/H ₂ O	DIPEA	комн. темп.	4445,6	2666,5	60%	4 часа

Полученное производное 17-69-07-N434 представляет собой Dap1/3 эквивалент N241 (ссылочный пример 1) с N-концевым алкином, необходимым для дерииватизации с эффекторами, т.е. токсинами. Этот пептид может быть циклизован с ТВМВ при чистоте 60%. Измеренное значение k_d с MT1-MMP составляло 1,52 нМ, что делает этот бициклический пептид очень подходящим для таргетирования MT1-MMP.

Пример 5.

Замену каркасной молекулы ТВМВ, используемой в примерах 1-3, на ТВАВ осуществляли следующим образом.

Линейные пептиды, используемые для образования 17-69-07-N385, 17-69-07-N426 и 17-69-07-N428 в примерах 1-3, циклизовали с ТВАВ в тех же концентрациях и эквивалентах, что и те, которые использовали для ТВМВ. Структура ТВАВ производного с N385 пептидом схематически показана на фиг. 6.

DIPEA использовали в качестве выбранного основания со смесью растворителя MeCN/H₂O при комнатной температуре. Получали следующие результаты.

Пептид	Время удерживания продукта	Суммарная интеграция	Интеграция продукта	% Продукта	Время
17-69-07-N385	4,28 мин.	9399,8	8830,0	94%	16 часов
17-69-07-N426	4,47 мин.	11941,6	11485,1	96%	16 часов
17-69-07-N428	4,70 мин.	8321,8	7941,5	95%	16 часов

Эти результаты показывают, что ТВАВ (галогенацетил-) химия предлагает более высокие скорости

циклизации и более высокую селективность, чем ТВМВ, как видно из графы % продукта.

Пример 6.

Получали бициклический пептид, обозначенный 17-69-07-N474, соответствующий бициклическому пептиду Примера 1, с заменой Cys6 на Dap(Me). Линейный пептид, используемый для образования этого бицикла, был следующим:



Структура ТВМВ производного с N385 пептидом схематически показана на фиг. 10.

Линейный пептид и бициклический пептид имели следующие ЖХМС характеристики:

	Время удерживания	присутствующее m/z
Линейный пептид	3,61 мин.	599,64, 898,96, 1795,90
Циклизированный пептид	3,98 мин.	637,68, 956,03, 1910,04

Циклизацию осуществляли в соответствии со следующей процедурой: 50 мкл 1мМ раствора пептида в MeCN/H₂O (1:1) смешивали с 25 мкл 2,6 мМ ТВМВ в MeCN, затем добавляли 25 мкл 200 мМ раствора DIPEA в MeCN/H₂O (рН доводили до 10 при помощи уксусной кислоты) и раствор перемешивали. (1,3 эквивалента ТВМВ и 100 эквивалентов основания относительно пептида, присутствующего в реакции). Образцы для ЖХМС отбирали через 4 часа и в течение ночи, причем реакция протекала, как показано в таблице ниже.

Суммарная интеграция	Интеграция продукта	% Продукта	Время
3120	1248	40	4 часа
3784	3632	96	18 часов (в течение ночи)

Связывание с MT1-MMP оценивали так же, как и в других примерах. Измеренное значение K_d составляет 8,0 нМ, что меньше, чем для тиоэфир-связанного производного ссылочного примера 1. Это соединение все еще связывается с высокой аффинностью, несмотря на три N-метил Daps на связи, и, таким образом, производное настоящего примера представляет особый интерес.

Пример 7.

Следующие дополнительные бициклические пептиды по настоящему изобретению получали и испытывали на аффинность связывания с MT1-MMP с использованием описанных выше методов. Схематические структуры этих бициклических пептидных соединений показаны на фиг. 10-13.

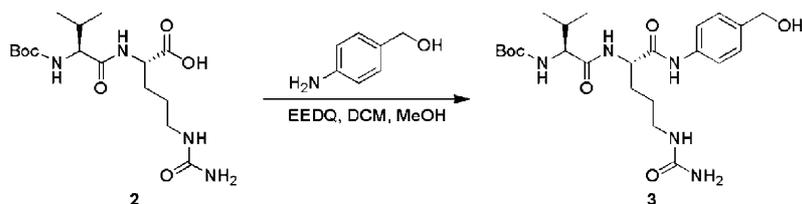
Идентификационный код соединения	Последовательность	Аффинность связывания
17-69-07-N428	Ac-A (Dap) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFFD (tBuGly) (Dap)	нет данных
17-69-07-N438	PYA-A (Dap) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFYD (tBuGly) (Dap)	Ki (h)=3,1 нМ
17-69-07-N455	Ac-(B-Ala)-Sar10-A (Dap) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFYD (tBuGly) (Dap)	Ki (h)=4 нМ
17-69-07-N470	Ac-A (Dap (Me)) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala) (Dap (Me))EDFYD (tBuGly) C	Ki (h)=8,3 нМ
17-69-07-N473	(PYA)-(D-Asp)3-Sar2-A (Dap (Me)) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala) (Dap (Me))EDFYD (tBuGly) C	Ki (h)=7,3 нМ
17-69-07-N443	PYA-A (Dap (Me)) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFYD (tBuGly) (Dap (Me))	Ki (h)=3,2 нМ
17-69-07-N471	(PYA)-(D-Asp)3-Sar2-A (Dap (Me)) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFYD (tBuGly) (Dap (Me))	Ki (h)=4,6 нМ
17-69-07-N472	(PYA)-(B-Ala)-Sar5-A (Dap (Me)) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFYD (tBuGly) (Dap (Me))	Ki (h)=3,4 нМ
17-69-07-N454	Ac-(B-Ala)-Sar10-A (Dap (Me)) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFYD (tBuGly) (Dap (Me))	Ki (h)=3,0 нМ
17-69-07-N452	A (Dap (Me)) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFYD (tBuGly) (Dap (Me))	Ki (h)=4,0 нМ
17-69-07-N450	(PYA)-(B-Ala)-Sar10-A (Dap (Me)) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFYD (tBuGly) (Dap (Me))	Ki=3,7 нМ; Kd=1,91 (SPR)
17-69-07-N451	(B-Ala)-Sar10-A (Dap (Me)) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFYD (tBuGly) (Dap (Me))	Ki (h)=3,7 нМ
17-69-07-N461	Ac (Dap (Me)) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFYD (tBuGly) (Dap (Me))	Ki (h)=6,0 нМ
17-69-07-N479	Ac-A (Dap (Me)) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala)CEDFYD (tBuGly) (Dap (Me))	Ki (h)=15,6 нМ
17-69-07-N474	Ac-A (Dap (Me)) (D-Ala)NE (1Nal) (D-Ala) (Dap (Me))EDFYD (tBuGly) (Dap (Me))	Ki (h)=7,5 нМ

Можно видеть, что высокая аффинность с МТ1-ММР достигается с этими алкиламино-связанными бициклическими соединениями по настоящему изобретению. Дальнейшие исследования показали полную перекрестную реактивность бициклических пептидов по настоящему изобретению с МТ1-ММР собаки, мыши/крысы и человека. Дальнейшие исследования показали высокую специфичность бициклических пептидов по настоящему изобретению, без значительной перекрестной реактивности с эктодоменом ММР1, эктодоменом ММР2, эктодоменом ММР15 (гемопексиновый домен) или гемопексиновым доменом ММР16. Также было определено, что фармакокинетика бициклических пептидов по настоящему изобретению аналогична соответствующим бициклическим пептидам, имеющим три тиоэфирных связи с карбасом, но с немного более длительным периодом полужизни при измерениях в сыворотке для бициклических пептидов по настоящему изобретению.

Пример 8.

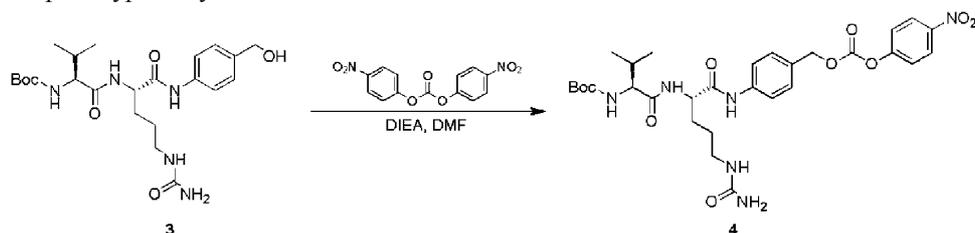
Конъюгаты бициклический пептид-лекарственное средство (BCDs), в которых бициклические пептиды по настоящему изобретению связаны с монометилауристатином Е (ММАЕ) при помощи реакции циклизации триазола, получали в соответствии со схемой реакции, показанной на фиг. 14. В дополнение к триазольной группе линкерные группы в конъюгатах включают валин-цитруллин (расщепляемая катепсином группа) и пара-аминобензилкарбамат (ПАВС), спейсерную группу. Стадии схемы реакции осуществляли следующим образом.

Общая процедура получения соединения 3.



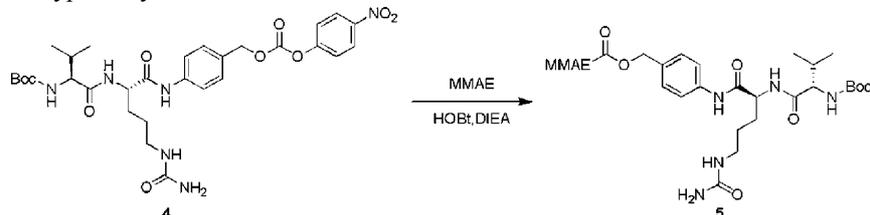
К раствору соединения 2 (30 г, 80 ммоль) в DCM (300 мл) и MeOH (150 мл) добавляли 4-аминофенилметанол (11 г, 88 ммоль) и EEDQ (40 г, 160 ммоль) в темноте. Смесь перемешивали при 30°C в течение 16 часов. ТСХ (DCM:MeOH=10/1, $R_f=0,43$) показала, что соединение 2 было полностью израсходовано и образовалось много новых пятен. По данным ТСХ реакционная смесь была чистой. Полученную реакционную смесь концентрировали с получением остатка, который очищали при помощи флэш-хроматографии на силикагеле (ISCO®; 330 г × 3 Колонка с силикагелем для флэш-хроматографии SepaFlash®, Элюент 0~20% MeOH/Дихлорметан @ 100 мл/мин). Соединение 3 (20 г, 52% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Общая процедура получения соединения 4.



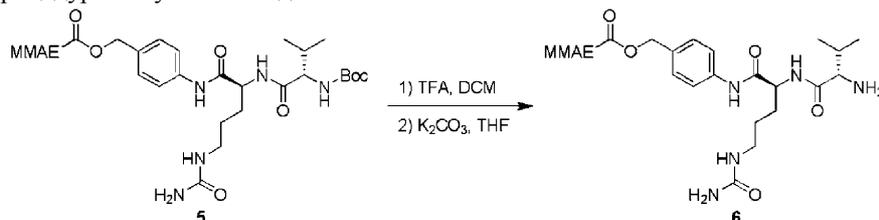
К раствору соединения 3 (5,0 г, 10,4 ммоль) в DMF (40 мл) добавляли DIEA (5,4 г, 7,26 мл, 41,7 ммоль) и бис(4-нитрофенил)карбонат (12,7 г, 41,7 ммоль). Смесь перемешивали при 0°C и в атмосфере азота в течение 1 часа. ТСХ (DCM:MeOH=10/1, $R_f=0,66$) показала, что соединение 3 было полностью израсходовано и образовалось одно новое пятно. По данным ТСХ реакционная смесь была чистой, и ЖХМС (ES8241-10-P1A, продукт: RT=1,15 мин.) показывала образование требуемого продукта. Полученную реакционную смесь очищали непосредственно при помощи препаративной ВЭЖХ в нейтральных условиях. Соединение 4 (12 г, 60% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Общая процедура получения соединения 5.



Реакцию одной партии осуществляли следующим образом: к раствору соединения 4 (1,2 г, 1,68 ммоль) в DMF (10 мл) добавляли DIEA (1,22 мл, 6,98 ммоль), в атмосфере азота, раствор перемешивали при 0°C в течение 10 мин, затем к этой смеси добавляли HOBT (22,6 мг, 1,68 ммоль) и MMAE (1,00 г, 1,40 ммоль), смесь дегазировали и продували при помощи N_2 3 раза и перемешивали при 35°C в течение 16 часов. ЖХ-МС (ES8396-1-P1A1, продукт: RT=1,19 мин.) показала, что соединение 4 было полностью израсходовано и был обнаружен один основной пик с требуемой массой. Полученную реакционную смесь из пяти партий объединяли в лабораторном химическом стакане объемом 1 л и добавляли 500 мл воды, затем образовавшийся осадок фильтровали для сбора. Осадок растирали в порошок с EtOAc в течение ночи. Соединение 5 (5 г, 59% выход) получали в виде белого твердого вещества.

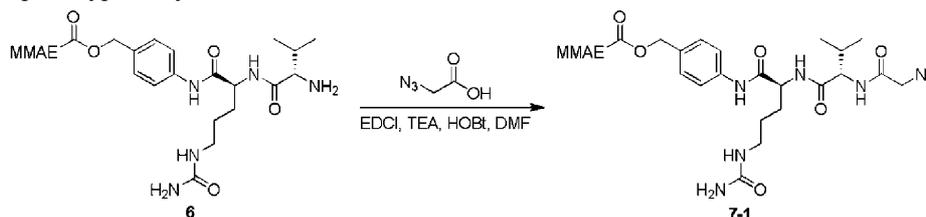
Общая процедура получения соединения 6.



Соединение 5 (3,3 г, 2,7 ммоль) растворяли в DCM (18 мл) в присутствии TFA (44 ммоль, 3,5 мл), затем раствор перемешивали при 25°C в течение 3 часов. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления DCM и TFA с получением остатка. Остаток растворяли в THF (20 мл), обрабатывали при помощи K_2CO_3 (1,8 г, 13 ммоль) и смесь далее перемешивали при 25°C еще в течение 12 часов. ЖХ-МС (ES8396-2-P1B1, продукт: RT=1,04 мин.) показала, что обнаружен один основ-

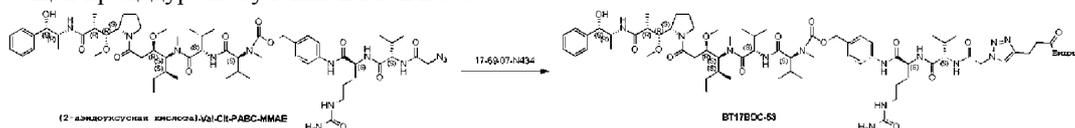
ной пик с требуемой массой. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток растворяли в 10 мл DMF и очищали при помощи препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия). Соединение 6 (1,6 г, 53% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Общая процедура получения соединения 7-1.



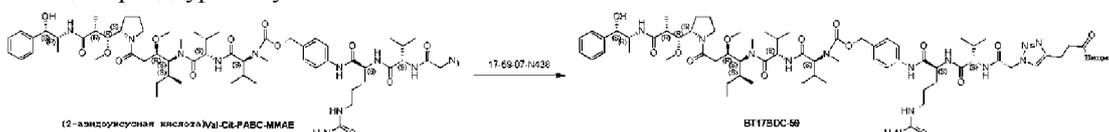
Соединение 6 (1,2 г, 1,1 ммоль) и 2-азидоуксусную кислоту (162 мг, 1,6 ммоль) растворяли в DMF (10 мл). К раствору добавляли TEA (4 50 мкл, 3,2 ммоль), HOBT (217 мг, 1,6 ммоль) и EDCI (307 мг, 1,6 ммоль) в атмосфере азота и смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин, затем смесь медленно нагревали до 25°C с последующим перемешиванием в течение 15,5 часов. ЖХ-МС (ES8396-3-P1A, продукт: RT=1,04 мин.) показала, что соединение 6 полностью израсходовано и обнаружен один основной пик с требуемой массой. К реакционной смеси добавляли 2 мл воды с образованием прозрачного раствора. Затем раствор очищали непосредственно при помощи препаративной ВЭЖХ в нейтральных условиях. Соединение 7-1 (0,9 г, 70% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Общая процедура получения BT17BDC-53.



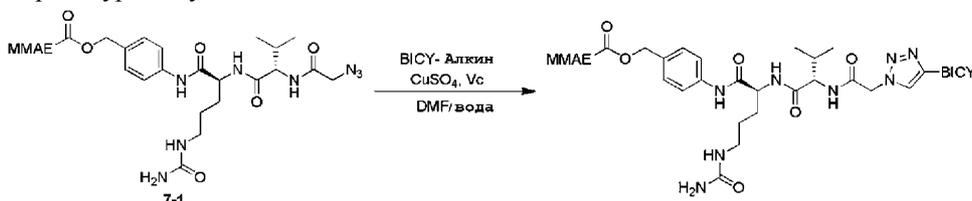
К смеси (2-азидоуксусная кислота)-Val-Cit-PABC-MMAE (16 мг, 13,26 мкмоль, 1 экв.) и БИЦИКЛ алкина (17-69-07-N434, 30 мг, 11,09 мкмоль, 0,8 экв.) в DMF (3 мл) и H₂O (2 мл) добавляли CuI (1,26 мг, 6,63 мкмоль, 0,5 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в атмосфере N₂ в течение 20 часов. ЖХ-МС показала, что (2-азидоуксусная кислота)-Val-Cit-PABC-MMAE полностью израсходован и обнаружен один основной пик с желаемой массой. Полученную реакционную смесь очищали при помощи препаративной ВЭЖХ (TFA условия). Соединение BT17BDC-53 (23,7 мг, 6,06 мкмоль, 54,64% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Общая процедура получения BT17BDC-59.



К смеси (2-азидоуксусная кислота)-Val-Cit-PABC-MMAE (31 мг, 25,69 мкмоль, 1,2 экв.) и (17-69-07-N438, 40 мг, 20,8 мкмоль, 1 экв.) в DMF (3 мл) добавляли раствор CuSO₄ (10,25 мг, 64,24 мкмоль, 3 экв.) в воде (0,4 мл) и раствор аскорбиновой кислоты (37,71 мг, 214,12 мкмоль, 10 экв.) в воде (0,4 мл) в атмосфере азота. Затем смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХ-МС показала, что (2-азидоуксусная кислота)-Val-Cit-PABC-MMAE полностью израсходован и обнаружен один основной пик с желаемой массой. Полученную реакционную смесь очищали при помощи препаративной ВЭЖХ (TFA условие). BT17BDC-59 (26,7 мг, 8,53 мкмоль, 41,02% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Общая процедура получения BT17BDC61.



Соединение 7-1 (250 мг, 207 мкмоль) и BICY-АЛКИН 17-69-07-N450 (515 мг, 188 мкмоль) добавляли в круглодонную колбу объемом 50 мл, добавляли DMF (5 мл) и затем водный раствор аскорбиновой кислоты (1 М, 1,88 мл) и водный раствор CuSO₄ (1 М, 570 мкл) в атмосфере азота, затем смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХ-МС (ES8396-8-P1A, продукт: RT=1,03 мин.) показала, что BICY-АЛКИН полностью израсходован и обнаружен один основной пик с требуемой массой. Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворенного вещества, фильтрат очищали непосредственно при помощи препаративной ВЭЖХ (TFA условия). BT17BDC61 (262 мг, 35% выход) получали в виде белого твердого вещества.

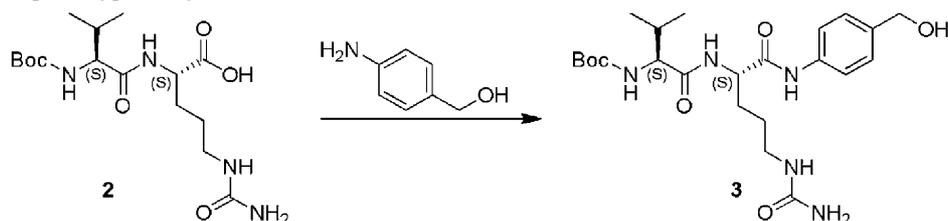
Общая процедура получения BT17BDC62.

Соединение 7-1 (250 мг, 207 мкмоль) и ВІСУ-АЛКИН 17-69-07-N443 (368 мг, 188 мкмоль) добавляли в круглодонную колбу объемом 50 мл. Добавляли DMF (5 мл), с последующим добавлением водного раствора аскорбиновой кислоты (1 М, 1,88 мл) и водного раствора CuSO_4 (1М, 570 мкл). Затем смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХ-МС (ES8396-9-P1A, продукт: RT=1,07 мин.) показала, что ВІСУ-АЛКИН полностью израсходован и обнаружен один основной пик с требуемой массой. Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворенного вещества. Полученный фильтрат очищали непосредственно при помощи препаративной ВЭЖХ (TFA условия). ВТ17ВDC62 (253 мг, 42% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Пример 9.

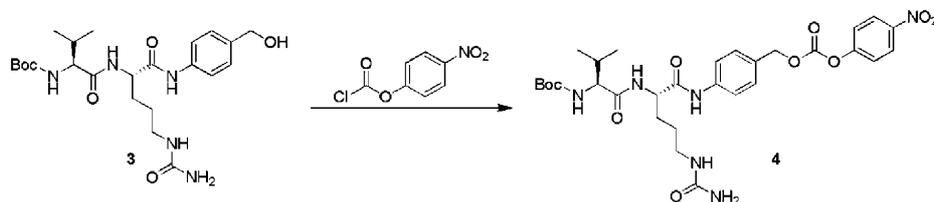
Конъюгаты бицикл-лекарственное средство (BCDs), в которых бициклические пептиды по настоящему изобретению связаны с монометилауристатином E (ММАЕ) путем образования амида между концевой глутарильной группой линкера и концевой амино группой пептида, получали в соответствии со схемой реакции, показанной на фиг. 15. Стадии схемы реакции осуществляли следующим образом.

Общая процедура получения соединения 3.



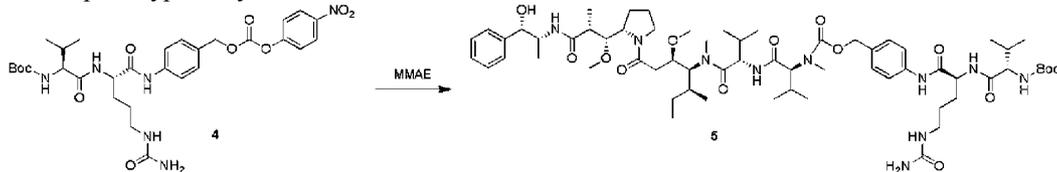
К раствору соединения 2 (7,00 г, 18,70 ммоль, 1,00 экв.) в DCM (80,00 мл) и MeOH (40,00 мл) добавляли (4-аминофенил)метанол (2,53 г, 20,56 ммоль, 1,10 экв.) и EEDQ (9,25 г, 37,39 ммоль, 2,00 экв.) в темноте, и смесь перемешивали при 25°C в течение 8 часов. ЖХ-МС показала, что соединение 2 полностью израсходовано и обнаружен один основной пик с желаемой массой. Полученную реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, с получением остатка. Остаток очищали при помощи флэш-хроматографии на силикагеле (ISCO®; 120 г Колонка с силикагелем для флэш-хроматографии SepaFlash®, Элюент 0~10% MeOH/DCM @ 85 мл/мин). Соединение 3 (7,00 г, 14,60 ммоль, 78,06% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Общая процедура получения соединения 4.



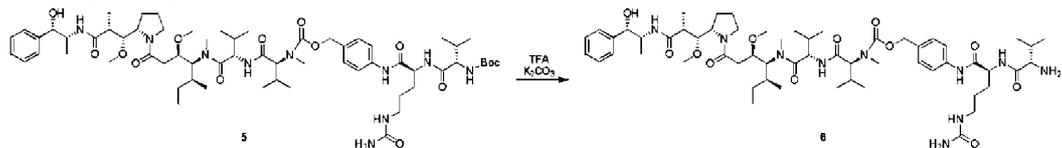
К раствору соединения 3 (4,00 г, 8,34 ммоль, 1,00 экв.) и 4-нитрофенилхлорформата (6,72 г, 33,36 ммоль, 4,00 экв.) в THF (20,00 мл) и DCM (10,00 мл) добавляли пиридин (2,64 г, 33,36 ммоль, 2,69 экв.) и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 5 часов. ЖХ-МС показала, что соединение 3 полностью израсходовано и обнаружен один основной пик с желаемой массой. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали при помощи флэш-хроматографии на силикагеле (ISCO®; 120 г Колонка с силикагелем для флэш-хроматографии SepaFlash®, Элюент 0~20% DM/MeOH @ 85 мл/мин). Соединение 4 (2,20 г, 3,41 ммоль, 40,92% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Общая процедура получения соединения 5.



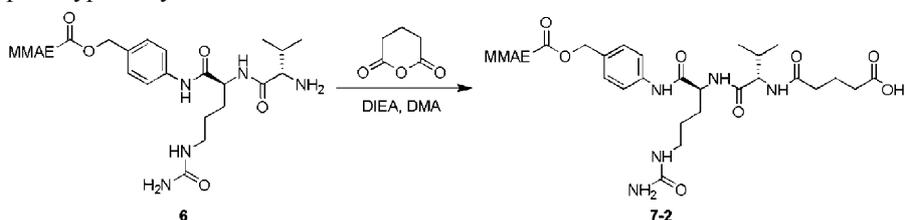
Смесь соединения 4 (500,00 мг, 775,59 мкмоль, 1,00 экв.) и DIEA (1,00 г, 7,76 ммоль, 1,35 экв.) в DMF (10,00 мл) перемешивали в атмосфере азота при 0°C в течение 30 мин и к смеси добавляли MMAE (445,49 мг, 620,47 мкмоль, 0,80 экв.) и НОВt (104,80 мг, 775,59 мкмоль, 1,00 экв.). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота при 0°C в течение 10 мин и при 30°C еще в течение 18 часов. ЖХ-МС показала, что соединение 4 полностью израсходовано и обнаружен один основной пик с желаемой массой. Полученную реакционную смесь очищали непосредственно при помощи флэш-хроматографии на силикагеле C18 (ISCO®; 330 г SepaFlash® Флэш колонка C18, Элюент 0~50% MeCN/H₂O @ 85 мл/мин). Соединение 5 (400,00 мг, 326,92 мкмоль, 42,15% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Общая процедура получения соединения 6.



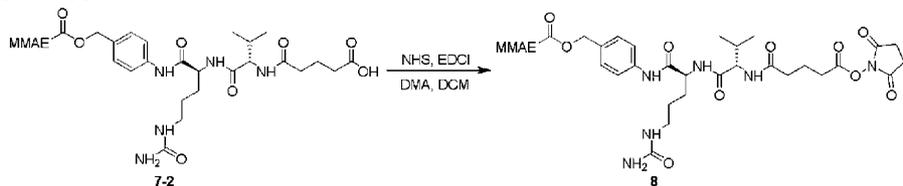
К раствору соединения 5 (430,00 мг, 351,44 мкмоль, 1,00 экв.) в DCM (36,00 мл) добавляли TFA (6,16 г, 54,03 ммоль, 4,00 мл, 153,73 экв.) и смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. Смесь затем концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который растворяли в THF (10,00 мл), и к смеси добавляли K₂CO₃ (1,21 г, 8,79 ммоль, 25,00 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 12 часов. ЖХ-МС показала, что соединение 5 полностью израсходовано и обнаружен один основной пик с желаемой массой. Полученную реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали при помощи флэш-хроматографии на силикагеле C18 (ISCO®; 120 г SepaFlash® Флэш колонка C18, Элюент 0~50% MeCN/H₂O @ 85 мл/мин). Соединение 6 (290,00 мг, 258,14 мкмоль, 73,45% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Общая процедура получения соединения 7.



Сосуд, содержащий (400 мг, 356 мкмоль), продували с использованием баллона с азотом. При перемешивании добавляли безводный DMA (5 мл) и раствор охлаждали до 0°C на бане с ледяной водой. Затем добавляли DIEA (130 мкл, 712 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 10 минут. Добавляли тетрагидропиран-2,6-дион (81 мг, 712 мкмоль) и затем ледяную баню удаляли. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХ-МС (ES8396-4-P1A, продукт: RT=1,08 мин.) показала, что соединение 6 полностью израсходовано и обнаружен один основной пик с требуемой массой. Смесь разбавляли 5 мл воды и затем очищали при помощи препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия). Соединение 7-2 (330 мг, 75% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Общая процедура получения соединения 8.



К соединению 7-2 (330 мг, 267 мкмоль) в безводном DMA (4,5 мл) и DCM (1,5 мл) добавляли HOSu (92 мг, 800 мкмоль) в атмосфере азота при перемешивании в течение 10 мин при 0°C с использованием ледяной бани. Затем к смеси добавляли EDCI (154 мг, 800 мкмоль) с дальнейшим перемешиванием при 25°C в течение 16 часов. ЖХ-МС (ES8396-5-P1A, продукт: RT=1,15 мин.) показала, что соединение 7-2 полностью израсходовано и обнаружен один основной пик с требуемой массой. Полученную реакционную смесь разбавляли при помощи 5 мл воды и затем очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия). Соединение 8 (250 мг, 70% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Общая процедура получения VT17BDC68.

Круглодонную колбу объемом 50 мл, которая содержала VICY-NH₂ 17-69-07-N451 (80,0 мг, 30 мкмоль) в DMA (4 мл), продували с использованием баллона с азотом. Затем добавляли при перемешивании DIEA (20 мкл, 114 мкмоль) при 25°C в течение 10 мин. Затем добавляли соединение 8 (40 мг, 30 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали в положительной атмосфере азота в течение 18 часов при 25°C. ЖХ-МС (ES6635-127-P1A1, продукт: RT=1,06 мин.) показала, что соединение 8 полностью израсходовано и обнаружен один основной пик с желаемой массой. Полученную реакционную смесь очищали при помощи препаративной ВЭЖХ (TFA условия). VT17BDC68 (33,9 мг, 29% выход) получали в виде белого твердого вещества.

Пример 10.

Измеряли аффинность связывания *in vitro* полученных выше конъюгатов бициклический пептид-лекарственное средство в отношении MT1-MMP, как описано выше. Результаты были следующими.

Идентификационный код соединения	Идентификационный код исходного бицикла	Линкер	Аффинность связывания (K _i в нМ)
BT17BDC-53	17-69-07-N434	Триазол-2-азидоацетил-ValCit-PABC	Человек k _i =3,6, 2,5; крыса/мышь k _i =1,8, 1,6
BT17BDC-59	17-69-07-N438	Триазол-2-азидоацетил-ValCit-PABC	Человек k _i =2,8, 2,7; крыса/мышь k _i =1,8, 1,7
BT17BDC-61	17-69-07-N450	Триазол-2-азидоацетил-ValCit-PABC	Человек k _i =3,2, 2,9; крыса/мышь k _i =1,8, 1,6
BT17BDC-62	17-69-07-N443	Триазол-2-азидоацетил-ValCit-PABC-CO ₂	Человек k _i =3,9, 3,3; крыса/мышь k _i =2,1, 1,9
BT17BDC-68	17-69-07-N451	глутарил-Val-Cit-PABC	Человек k _i =2,9, 3,3; крыса/мышь k _i =1,8, 1,6

Можно видеть, что во всех случаях аффинность связывания бициклических пептидов сохраняется после конъюгации с MMAE.

Пример 11.

Исследовали стабильность в плазме BT17BDC-53 в мышинной и человеческой сыворотках. Было обнаружено, что конъюгат является стабильным (T_{1/2} больше чем 50 часов при концентрации 4 мкМ) в обеих сыворотках мыши и человека. По всей видимости стабильность немного выше, чем у соответствующих конъюгатов, в которых пептид связан с каркасом тремя тиоэфирными связями.

Пример 12.

Эффективность против опухолей *in vivo* полученных выше конъюгатов бициклический пептид-лекарственное средство оценивали следующим образом.

Опухолевые клетки HT1080 поддерживали *in vitro* в виде монослойной культуры в среде EMEM, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и воздуха. Опухолевые клетки обычно пересеивали дважды в неделю путем обработки трипсин-EDTA. Клетки, растущие в фазе экспоненциального роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

Бестимусных мышей BALB/c инокулировали подкожно на правом боку опухолевыми клетками HT1080 (%×10⁶) в 0,2 мл PBS для развития опухоли. 39 животных были рандомизированы, когда средний объем опухоли достиг 134 мм².

Соединения BDC формулировали при концентрации 0,03 мг/мл в буфере-носителе, содержащем 25 мМ гистидина и 10% сахарозы. Композиции вводили два раза в неделю (*biw*) при концентрации 0,3, 1, 3 и 10 мг/кг. Объем опухоли и массу тела измеряли в течение 14 дней после первого введения дозы. Результаты показаны на фиг. 16-20.

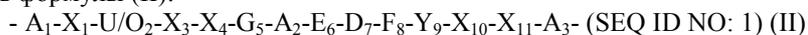
Результаты показывают, что все пять испытанных конъюгатов демонстрируют сильное дозозависимое ингибирование опухоли. При дозах 3 мг/кг и 10 мг/кг опухоли оказались полностью ликвидированными. BT17BDC53, 61 и 68 были хорошо переносимы вплоть до 10 мг/кг. BT17BDC62 был переносимым вплоть до около 5 мг/кг. BT17BDC59 был переносимым вплоть до 3 мг/кг. Это говорит о том, что присутствие N-концевого спейсера Sar10 в BT17BDC53, 61 и 68 снижает системную токсичность конъюгатов.

Все публикации, указанные в приведенном выше описании, включены в настоящую заявку посредством ссылки. Различные модификации и вариации описанных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники без отступления от объема настоящего изобретения. Хотя настоящее изобретение описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение не должно неправомерно ограничиваться такими конкретными вариантами осуществления. Действительно, различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые очевидны для специалистов в данной области техники, должны находиться в пределах объема следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептидный лиганд, специфический в отношении MT1-MMP, включающий полипептид, включающий три остатка, выбранных из цистеина, L-2,3-диаминопропионовой кислоты (Dap), N-бета-алкил-L-2,3-диаминопропионовой кислоты (N-AlkDap) и N-бета-галогеналкил-L-2,3-диаминопропионовой кислоты (N-

HAlkDap), при этом указанные три остатка разделены по меньшей мере последовательностями двух петель, и молекулярный каркас, при этом пептид связан с каркасом ковалентными алкиламино связями с Dap или N-AlkDap или N-HAlkDap остатками полипептида и тиоэфирными связями с цистеиновыми остатками полипептида, когда указанные три остатка включают цистеин, таким образом, на молекулярном каркасе образуются две полипептидные петли, где пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность формулы (II):



или его фармацевтически приемлемую соль;

где:

A_1 , A_2 , и A_3 независимо представляют собой цистеин, L-2,3-диаминопропионовую кислоту (Dap), N-бета-алкил-L-2,3-диаминопропионовую кислоту (N-AlkDap) или N-бета-галогеналкил-L-2,3-диаминопропионовую кислоту (N-HAlkDap), при условии, что по меньшей мере один из A_1 , A_2 , и A_3 представляет собой Dap, N-AlkDap или N-HAlkDap;

X представляет собой любой аминокислотный остаток;

U представляет собой полярный незаряженный аминокислотный остаток, выбранный из N, C, Q, M, S и T; и

O представляет собой неполярный алифатический аминокислотный остаток, выбранный из G, A, I, L, P и V.

2. Пептидный лиганд по п.1, где X_1 выбран из любой одной из следующих аминокислот: Y, M, F или V, такой как Y, M или F, в частности Y или M, более конкретно Y.

3. Пептидный лиганд по п.1 или 2, где U/O₂ выбран из U, такого как N, или O, такого как G.

4. Пептидный лиганд по любому из предшествующих пунктов, где X_3 выбран из U или Z, где U представляет собой полярный незаряженный аминокислотный остаток, выбранный из N, C, Q, M, S и T, и Z представляет собой полярный, отрицательно заряженный аминокислотный остаток, выбранный из D или E, в частности, U в положении 3 выбран из Q, или Z в положении 3 выбран из E.

5. Пептидный лиганд по любому из предшествующих пунктов, где X_4 выбран из J, где J представляет собой неполярный ароматический аминокислотный остаток, выбранный из F, W и Y.

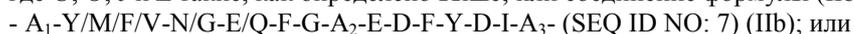
6. Пептидный лиганд по любому из предшествующих пунктов, где X_{10} выбран из Z, где Z представляет собой полярный отрицательно заряженный аминокислотный остаток, выбранный из D или E, такой как D.

7. Пептидный лиганд по любому из предшествующих пунктов, где X_{11} выбран из O, где O представляет собой неполярный алифатический аминокислотный остаток, выбранный из G, A, I, L, P и V, такой как I.

8. Пептидный лиганд по любому из предшествующих пунктов, где пептидный лиганд формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIa):



где U, O, J и Z такие, как определено выше; или соединение формулы (IIb):



или соединение формулы (IIc):



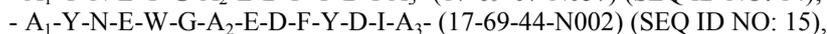
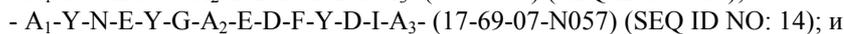
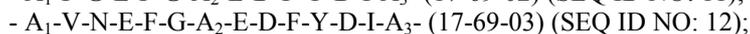
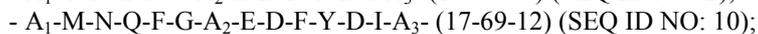
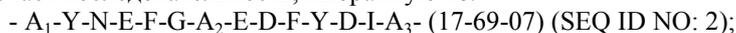
или соединение формулы (IId):



или соединение формулы (IIe):



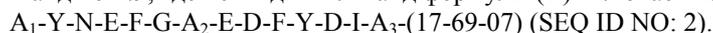
9. Пептидный лиганд по любому из предшествующих пунктов, где пептидный лиганд формулы (II) включает последовательность, выбранную из:



такую как:



10. Пептидный лиганд по п.9, где пептидный лиганд формулы (II) включает последовательность



11. Пептидный лиганд по п.9, где пептидный лиганд формулы (II) включает последовательность, выбранную из гомолога Dap, обозначенного как SEQ ID 16 ((bAla)-Sar10-AA₁ (D-Ala)NE(1Nal) (D-Ala)A₂EDFYD (tBuGly)A₃;

и гомолога Dap, обозначенного как SEQ ID 17 AA₁ (D-Ala) NE (1Nal) (D-Ala) A₂EDFYD (tBuGly)A₃.

12. Пептидный лиганд по любому из предшествующих пунктов, где два из A_1 , A_2 и A_3 выбраны из

Dap, N-AlkDap или N-HAlkDap, и третий из A_1 , A_2 и A_3 представляет собой цистеин.

13. Пептидный лиганд по п.12, где A_2 представляет собой цистеин.

14. Пептидный лиганд по любому из пп.1-9, где A_1 , A_2 и A_3 каждый представляют собой N-AlkDap или N-HalkDap.

15. Пептидный лиганд по любому из предшествующих пунктов, где один или более тирозиновых остатков заменен фенилаланиновым остатком.

16. Пептидный лиганд по любому из предшествующих пунктов, который дополнительно включает 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 гидрофобных аминокислотных остатков другими неприродными изостерическими или изоэлектронными аминокислотами); добавления спейсерной группы; замены одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или более устойчивыми к окислению аминокислотными остатками; замены одного или более аминокислотных остатков аланином, замены одного или более L-аминокислотных остатков одним или более D-аминокислотными остатками; N-алкилирования одной или более амидных связей в пептидном лиганде; замены одной или более пептидных связей суррогатной связью; модификации длины пептидного остова; замещения водорода на α -углероде одного или более аминокислотных остатков другой химической группой, и постсинтетической биоортогональной модификации аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат и тирозин, подходящими амин, тиол, карбоновая кислота и фенол-реактивными реагентами.

17. Пептидный лиганд по п.16, где N-концевая модификация включает добавление молекулярной спейсерной группы, которая облегчает конъюгирование эффекторных групп и сохранение активности пептидного лиганда к его мишени, такой как группа Ala, G-Sar10-A или группа bAla-Sar10-A.

18. Пептидный лиганд по любому одному из пп.16, 17, который включает модификацию в положении аминокислоты 1 и/или 9, и она выбрана из: D-аланина в положении 1 и/или 4-бромфенилаланин в положении 9.

19. Пептидный лиганд по любому одному из пп.16-18, который включает замену одного или более аминокислотных остатков одним или более неприродными аминокислотными остатками.

20. Пептидный лиганд по п.19, где замена неприродным аминокислотным остатком происходит в положении 4, и он выбран из: 1-нафтилаланина; 2-нафтилаланина; 3,4-дихлорфенилаланина; и гомофенилаланина, такого как 1-нафтилаланин; 2-нафтилаланина; и 3,4-дихлорфенилаланина.

21. Пептидный лиганд по п.20, где неприродный аминокислотный остаток представляет собой 1-нафтилаланин.

22. Пептидный лиганд по п.19 или п.20, где замена неприродным аминокислотным остатком происходит в положении 9 и/или 11, и он выбран из: 4-бромфенилаланина или пентафтор-фенилаланина для положения 9 и/или трет-бутилглицина для положения 11.

23. Пептидный лиганд по п.22, где неприродный аминокислотный остаток, такой как те, которые присутствуют в положении 9, представляет собой 4-бромфенилаланин.

24. Пептидный лиганд по п.22, где неприродный аминокислотный остаток, такой как те, которые присутствуют в положении 11, представляет собой трет-бутилглицин.

25. Пептидный лиганд по п.16, где аминокислотный остаток в положении 1 заменяют D-аминокислотой, такой как D-аланин.

26. Пептидный лиганд по п.16, где аминокислотный остаток в положении 5 заменяют D-аминокислотой, такой как D-аланин или D-аргинин.

27. Пептидный лиганд по п.19, который включает модификации, такие как 2, 3, 4 или 5 или более из следующих модификаций, таких как все из следующих 5 модификаций: D-аланин в положении 1 и/или 5, 1-нафтилаланин в положении 4, 4-бромфенилаланин в положении 9 и трет-бутилглицин в положении 11.

28. Пептидный лиганд по любому одному из пп.1-27, где пептидный лиганд формулы (II) представляет собой высокоаффинное связующее гемопексинового домена MT1-MMP человека, мыши и собаки.

29. Пептидный лиганд по любому одному из пп.1-28, где пептидный лиганд формулы (II) является селективным в отношении MT1-MMP, но не вступает в перекрестную реакцию с MMP-1, MMP-2, MMP-15 и MMP-16.

30. Линейный пептид, включающий аминокислотную последовательность формулы (II) по любому из пп.1-27.

31. Способ получения пептидного лиганда по любому из пп.1-29, включающий: обеспечение пептида по п.30; обеспечение каркасной молекулы, имеющей по меньшей мере три реакционноспособных сайта для образования тиозфирных и алкиламино связей с -SH и амино группами боковой цепи цистеиновых остатков и остатков диаминопропионовой кислоты или β -N-алкилдиаминопропионовой кислоты пептида; и образование указанных тиозфирных и алкиламино связей между пептидом и каркасной молекулой.

32. Конъюгат лекарственного средства, включающий пептидный лиганд по любому одному из пп.1-29, конъюгированный с одним или более цитотоксическим средством.

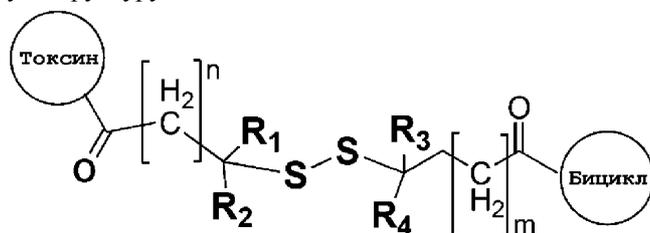
33. Конъюгат, специфический в отношении МТ1-ММР, включающий пептидный лиганд по любому одному из пп.1-29, конъюгированный с одной или более функциональной группой.

34. Конъюгат по п.32, где функциональные группы включают металлохелатор.

35. Конъюгат лекарственного средства по п.32, где цитотоксическое средство связано с пептидным лигандом расщепляемой связью, такой как дисульфидная связь.

36. Конъюгат лекарственного средства по п.32 или п.35, где цитотоксическое средство выбрано из DM1 или MMAE.

37. Конъюгат лекарственного средства по любому из пп.32, 35, 36, где конъюгат лекарственного средства имеет следующую структуру:



где R_1 , R_2 , R_3 и R_4 представляют собой водород или C1-C6 алкильные группы; токсин относится к любому подходящему цитотоксическому средству;

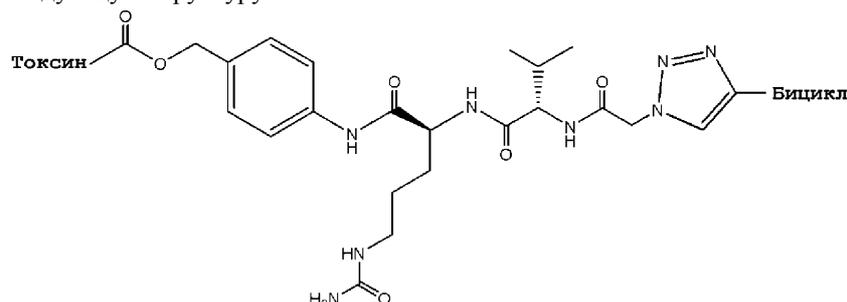
Бицикл представляет собой любой подходящий пептидный лиганд по любому одному из п.1-29;

n представляет собой целое число, выбранное из 1-10; и

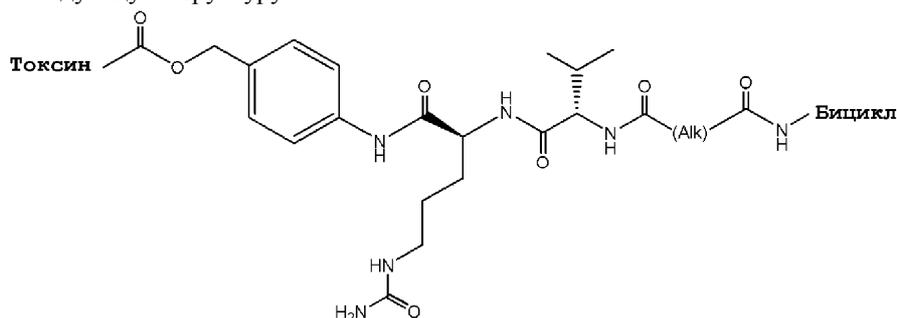
m представляет собой целое число, выбранное из 0-10.

38. Конъюгат лекарственного средства по п.37, где либо: R_1 , R_2 , R_3 и R_4 все представляют собой H; либо R_1 , R_2 , R_3 все представляют собой H и R_4 =метил; либо R_1 , R_2 =метил и R_3 , R_4 =H; либо R_1 , R_3 =метил и R_2 , R_4 =H; либо R_1 , R_2 =H и R_3 , R_4 =C₁-C₆ алкил.

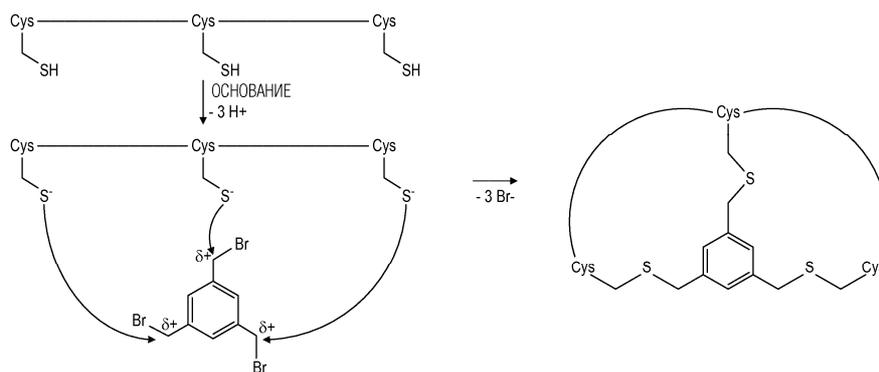
39. Конъюгат лекарственного средства по любому из пп.32, 35, 36, где конъюгат лекарственного средства имеет следующую структуру:



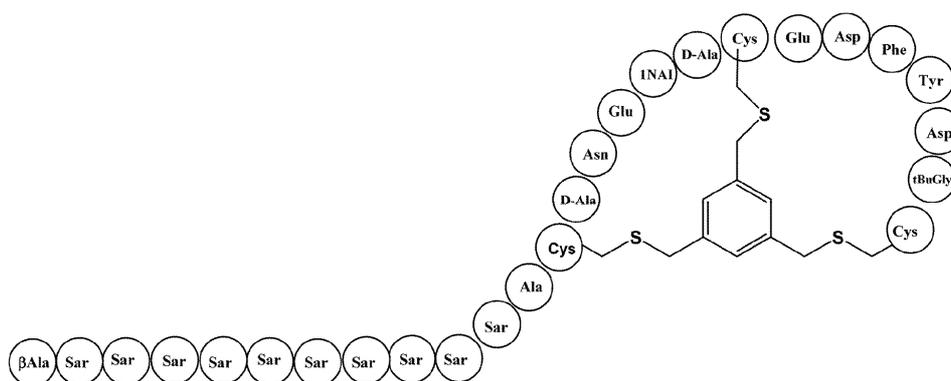
40. Конъюгат лекарственного средства по любому из пп.32, 35, 36, где конъюгат лекарственного средства имеет следующую структуру:



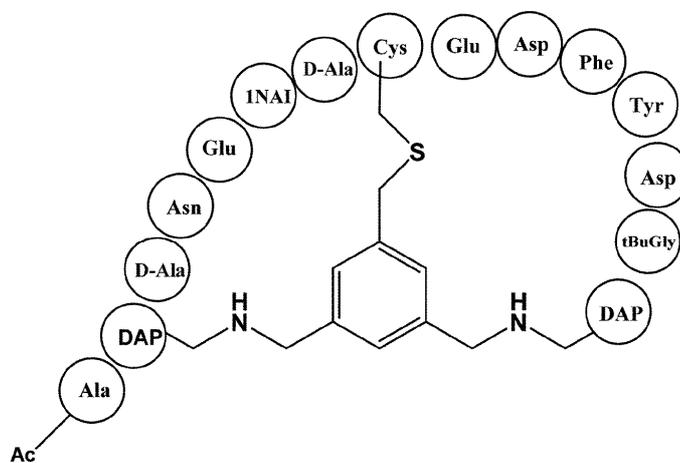
где (alk) представляет собой линейную или разветвленную алкиленовую группу формулы C_nH_{2n}, где n имеет значение от 1 до 10.



Фиг. 1

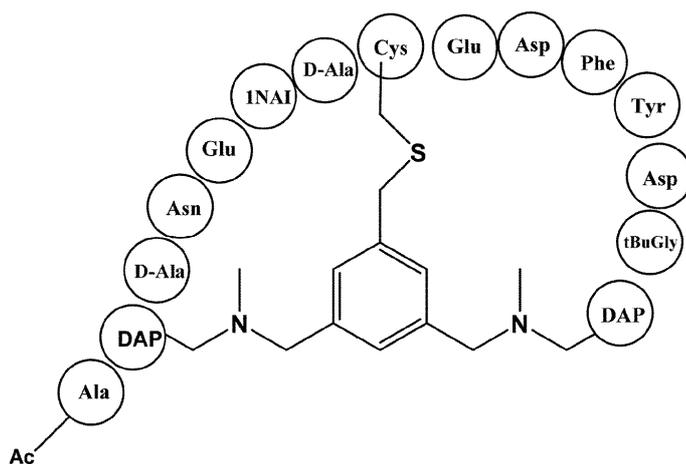


Фиг. 2

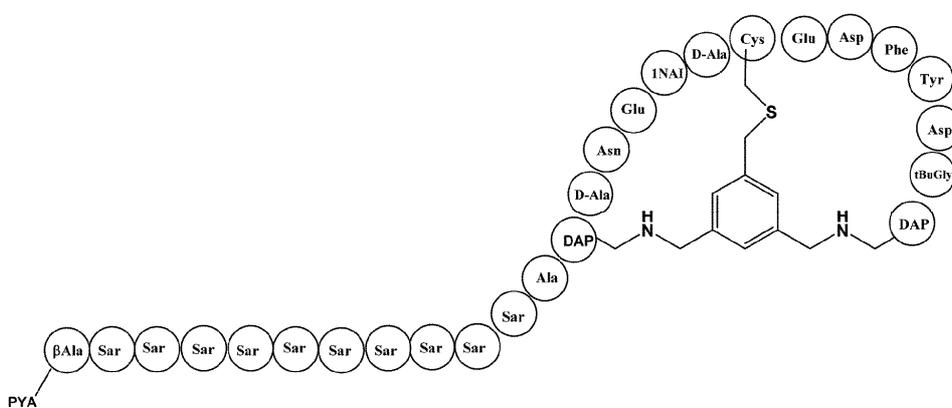


Фиг. 3

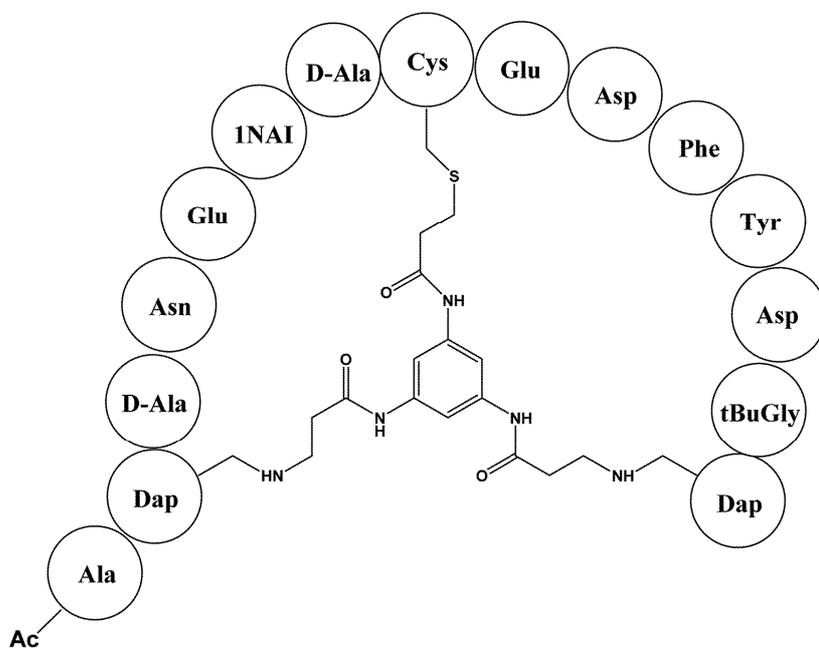
044591



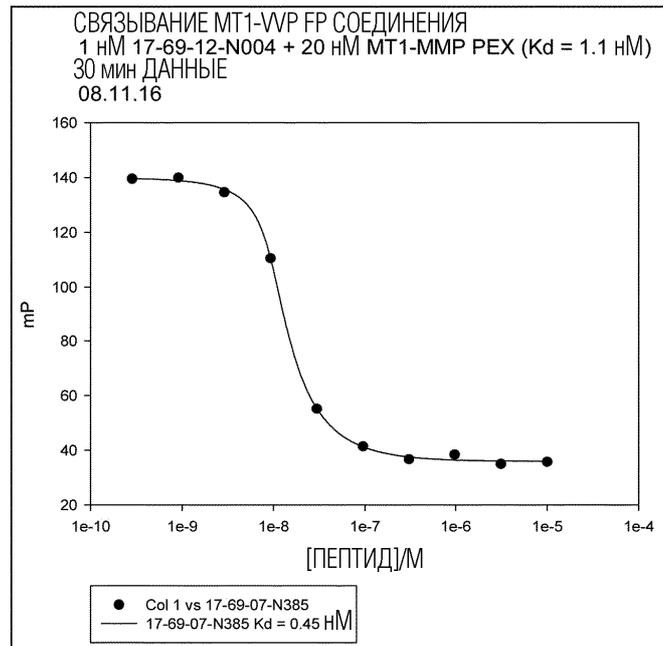
Фиг. 4



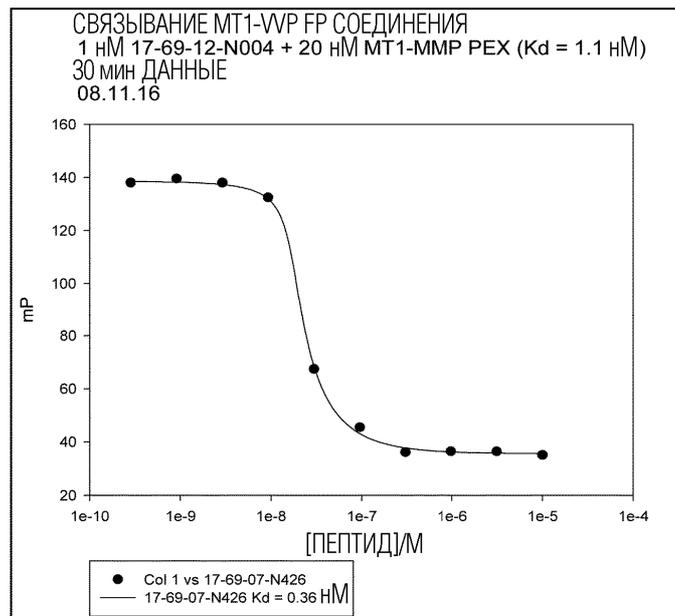
Фиг. 5



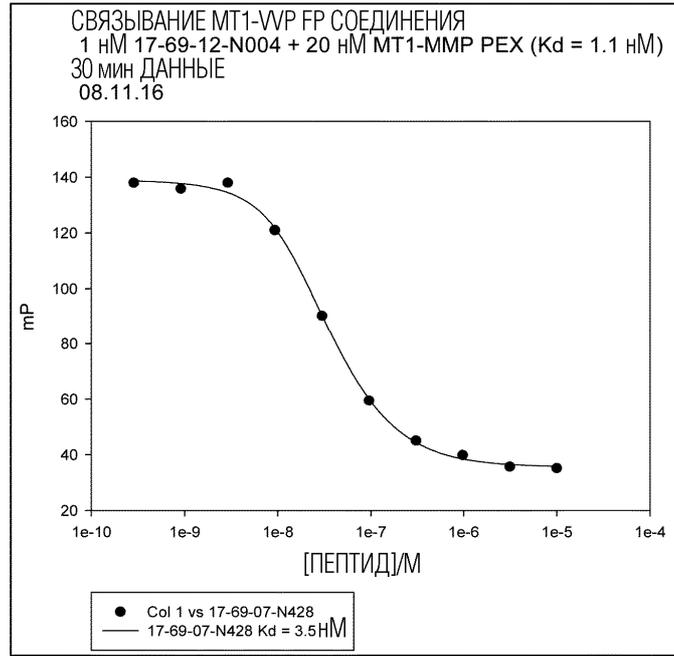
Фиг. 6



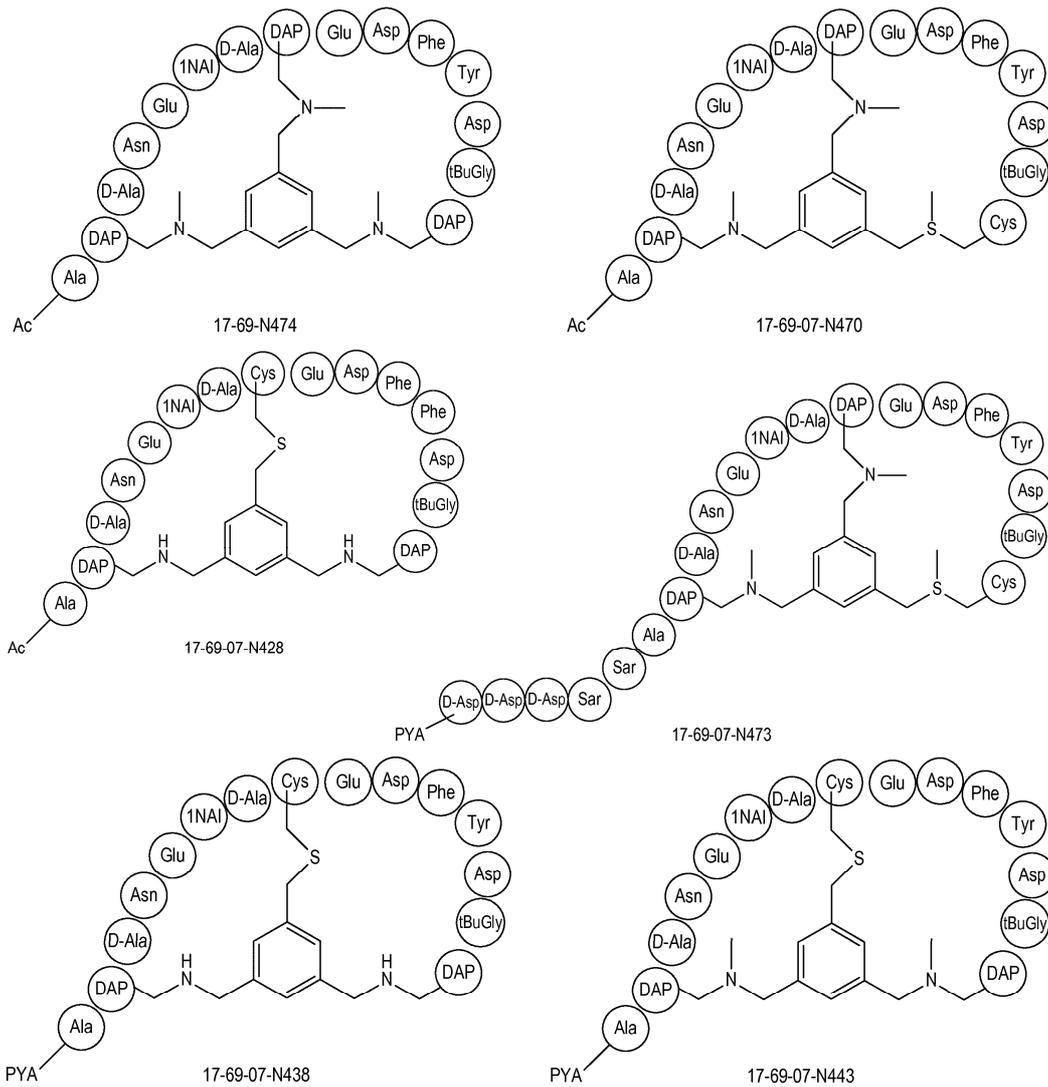
Фиг. 7



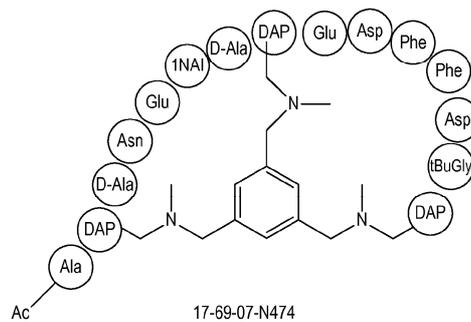
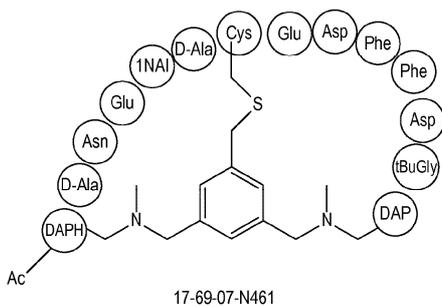
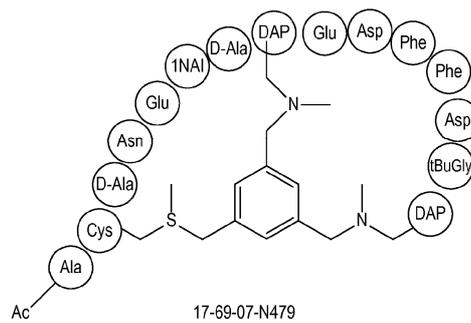
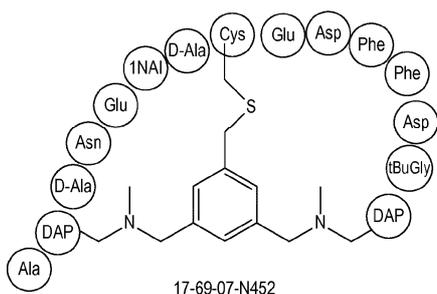
Фиг. 8



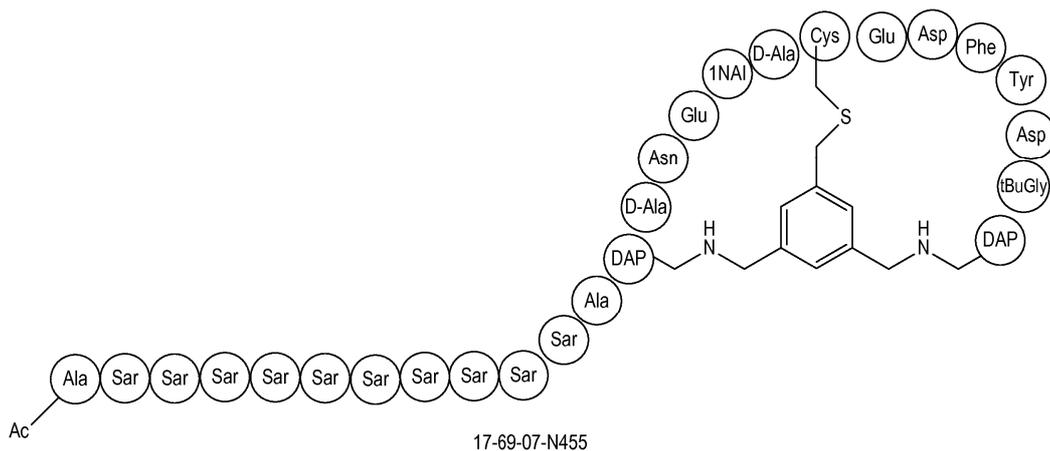
Фиг. 9



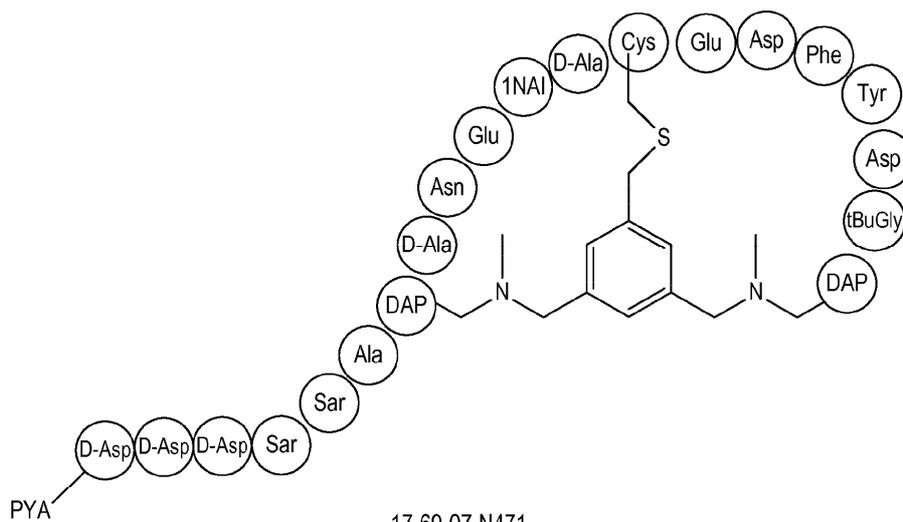
Фиг. 10



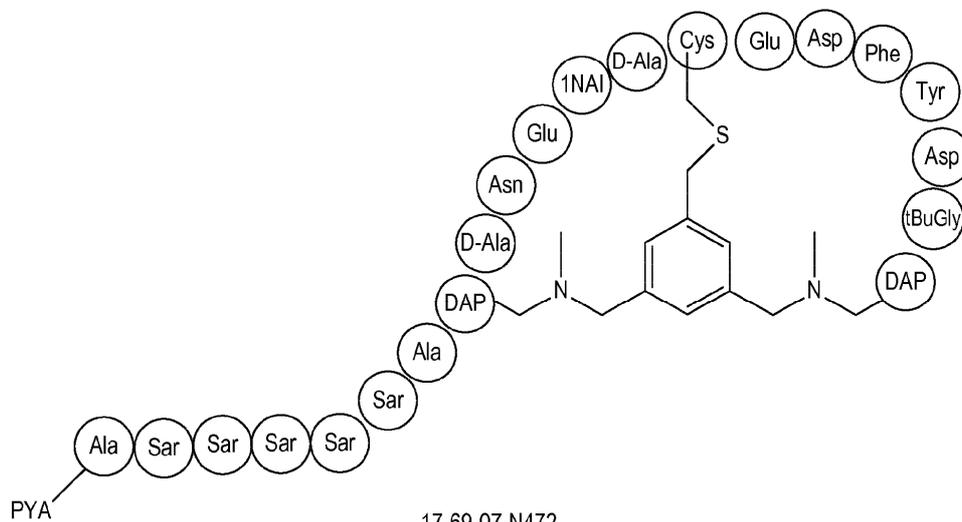
Фиг. 11



044591

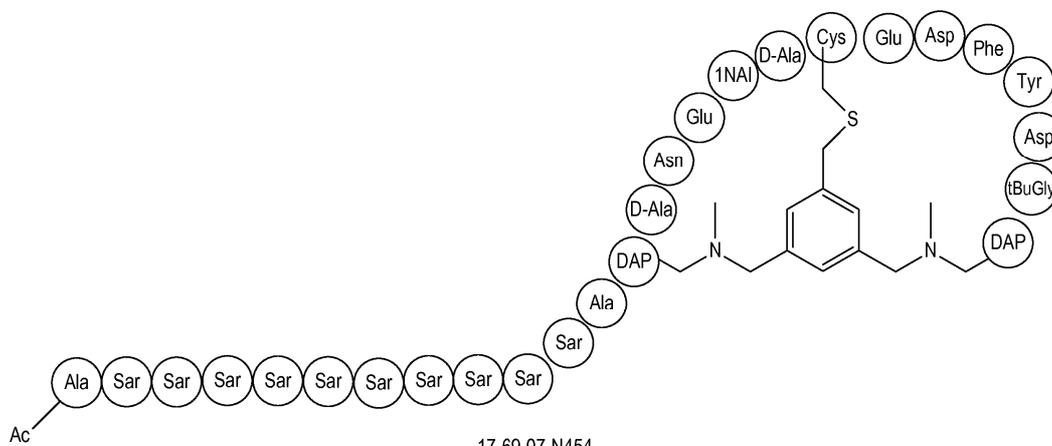


17-69-07-N471

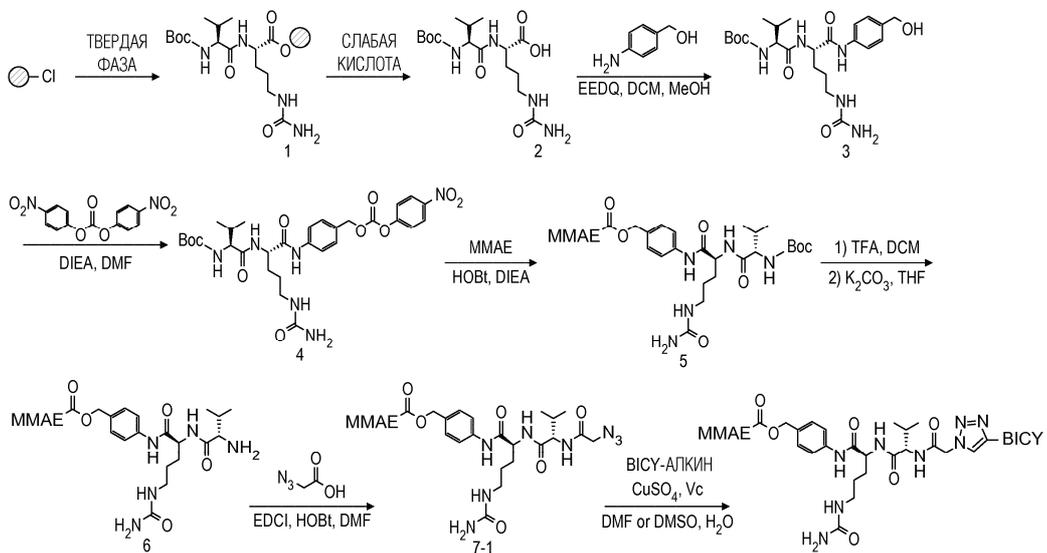
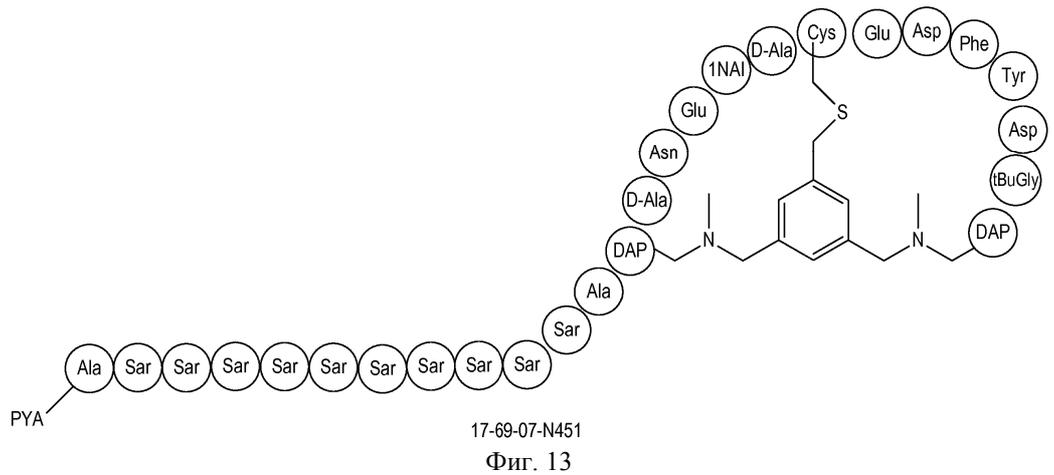
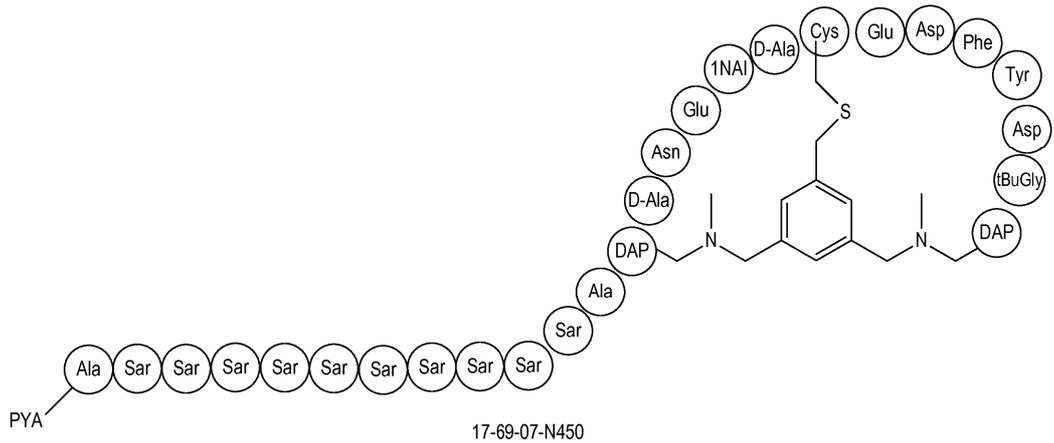


17-69-07-N472

Фиг. 12



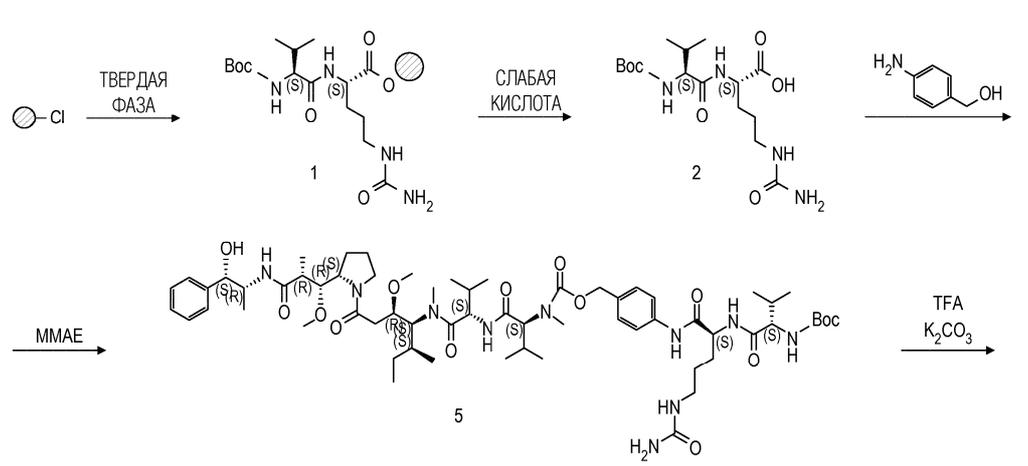
17-69-07-N454



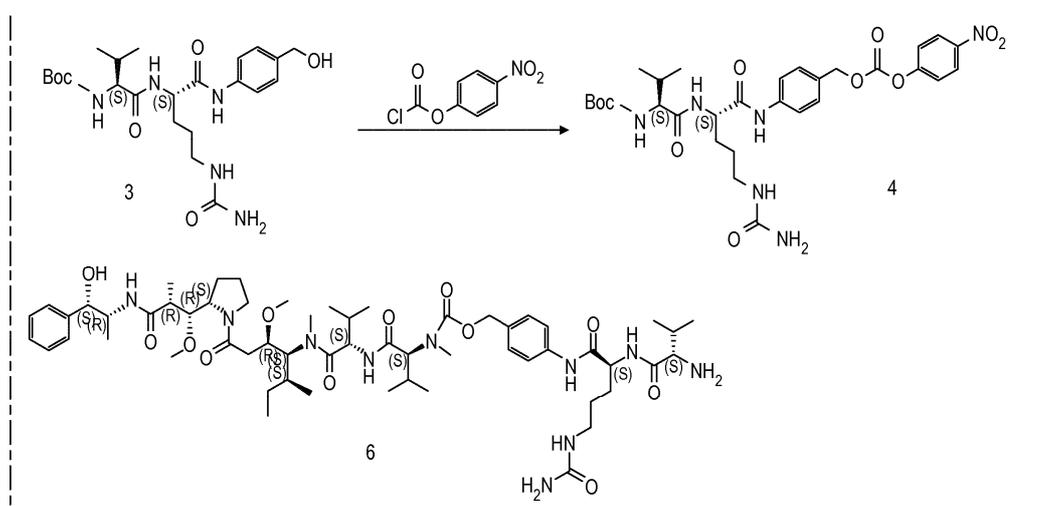
ФИГ. 15a	ФИГ. 15b
ФИГ. 15c	ФИГ. 15d

Фиг. 15

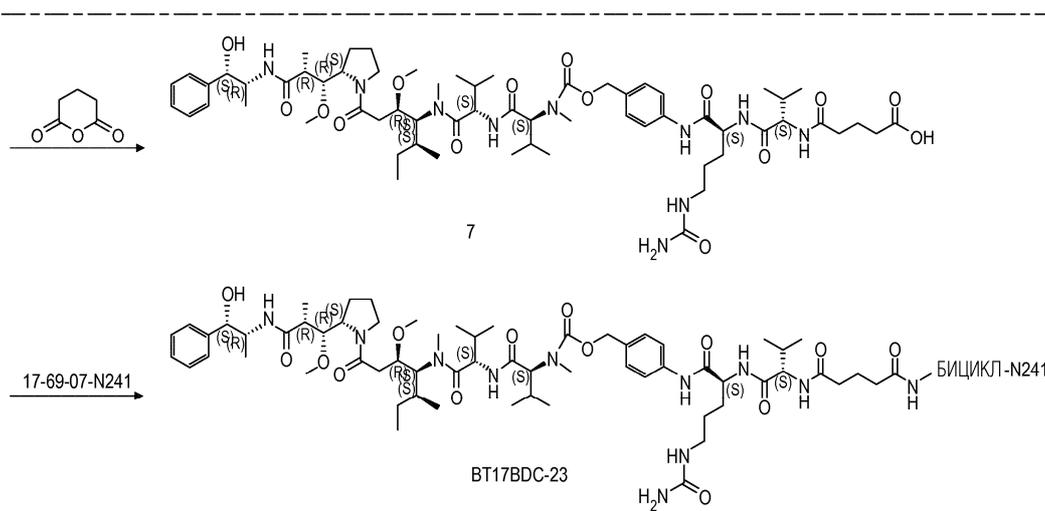
044591



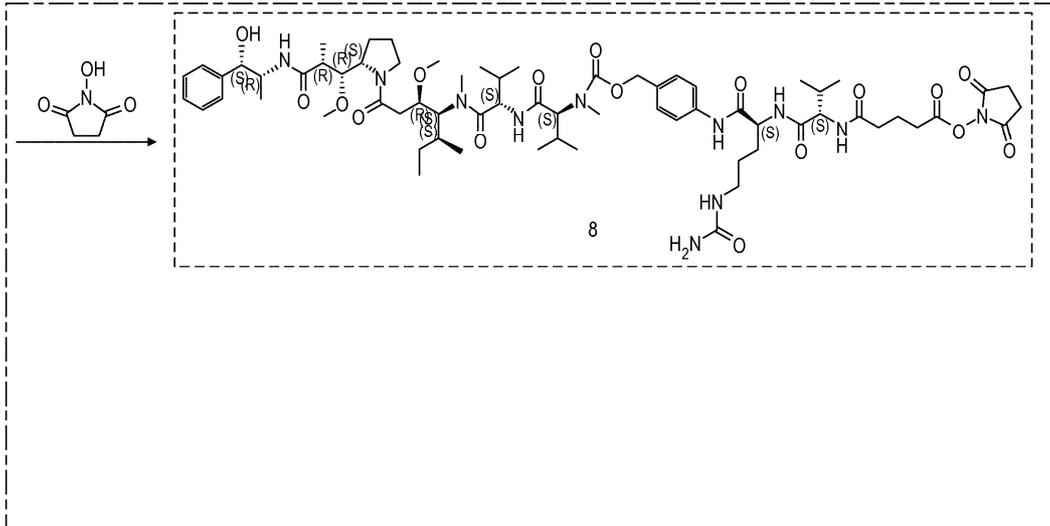
Фиг. 15a



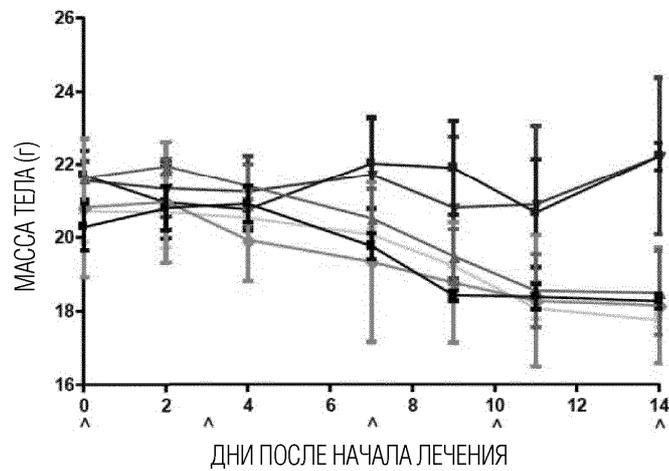
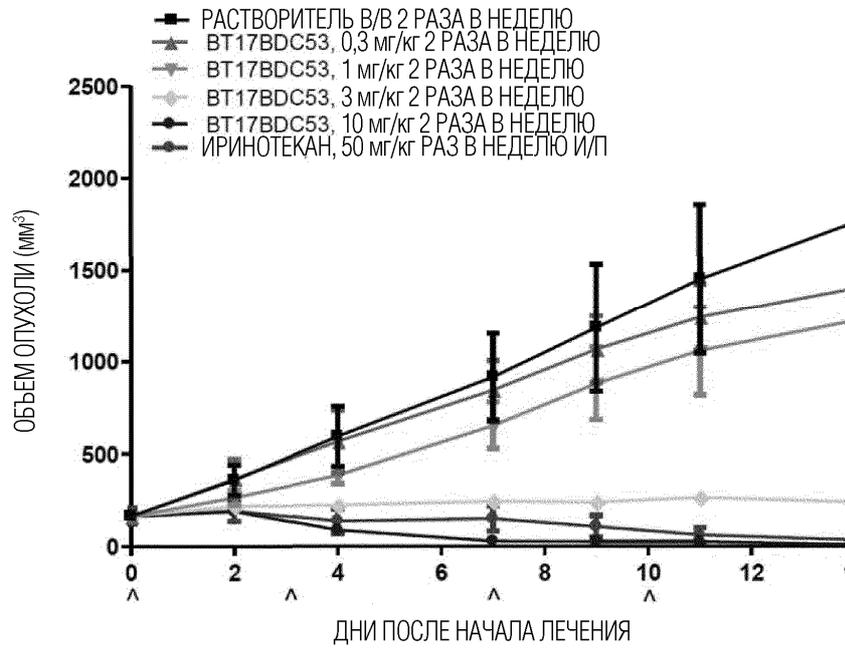
Фиг. 15b



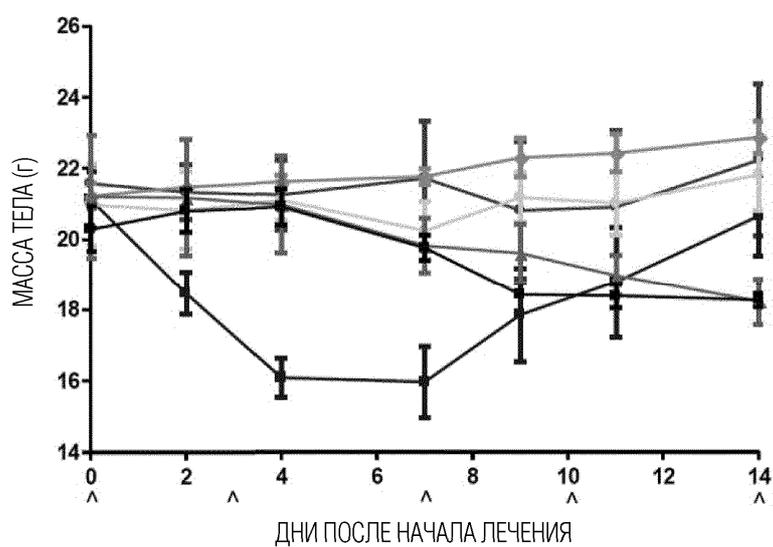
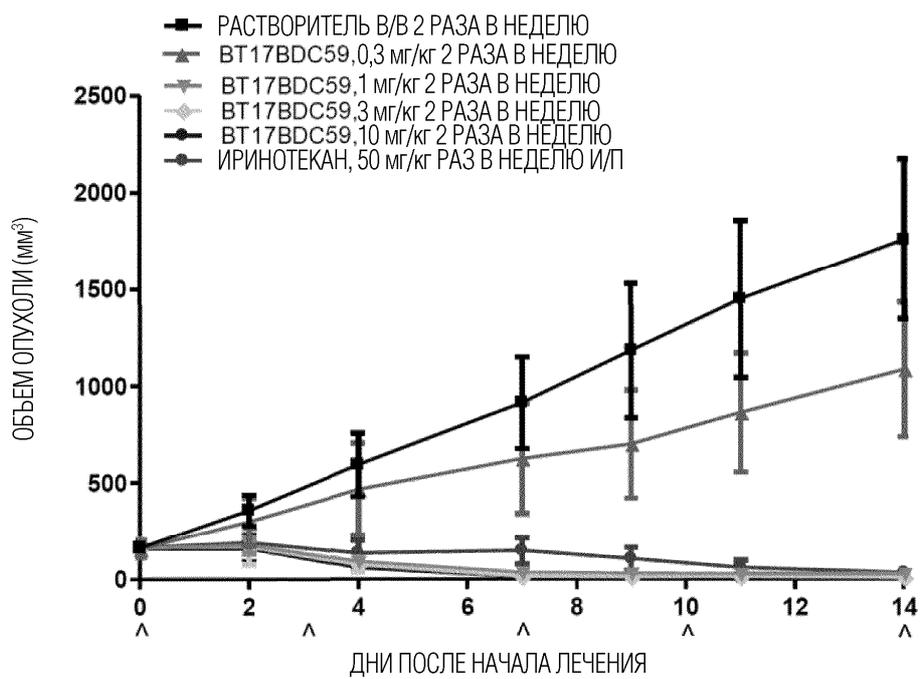
Фиг. 15c



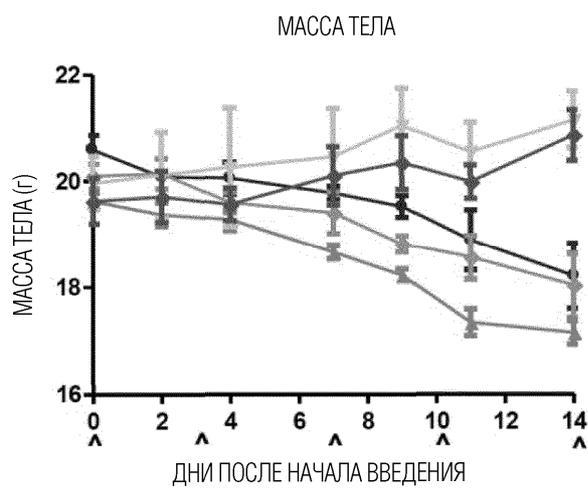
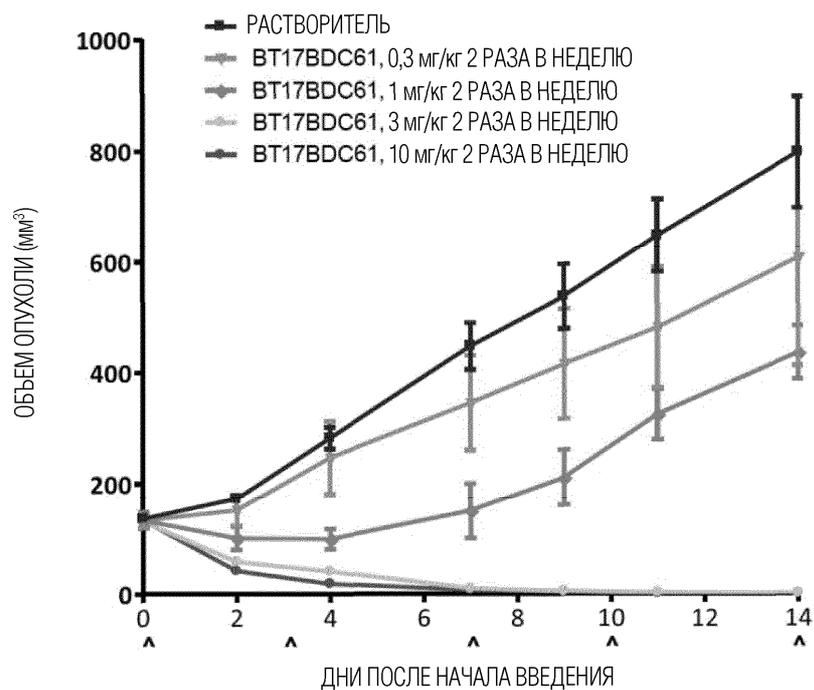
Фиг. 15d



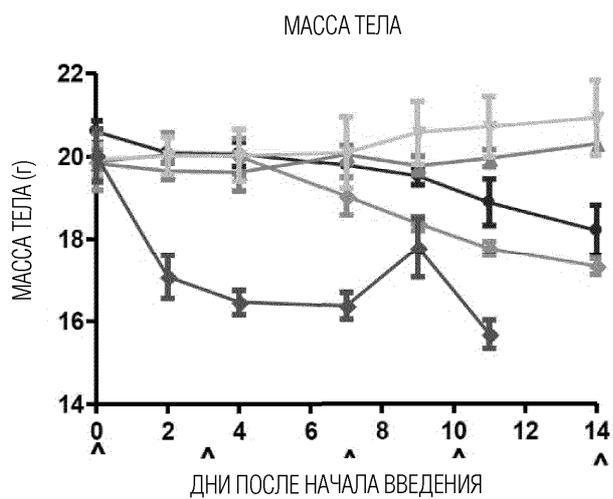
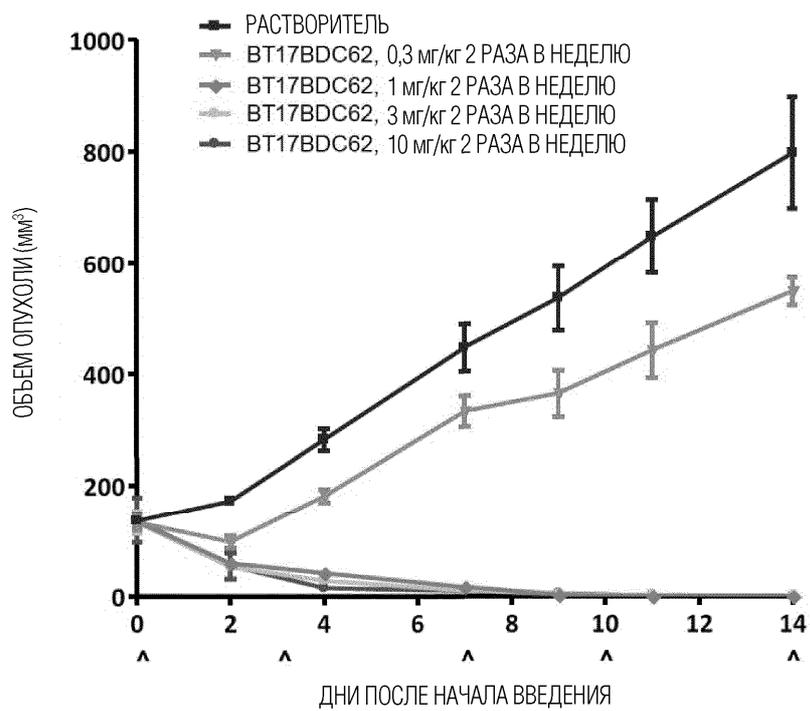
Фиг. 16



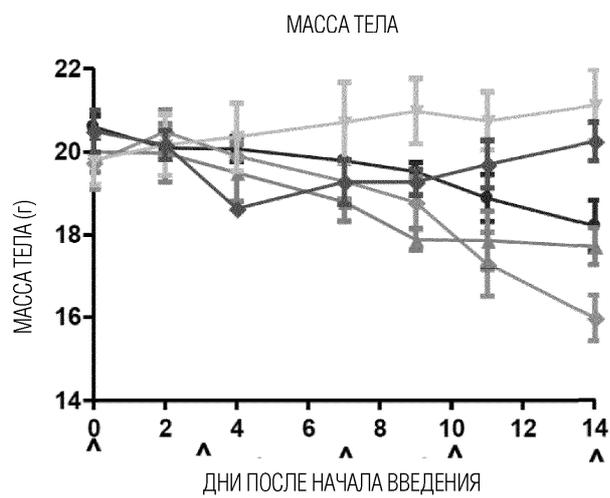
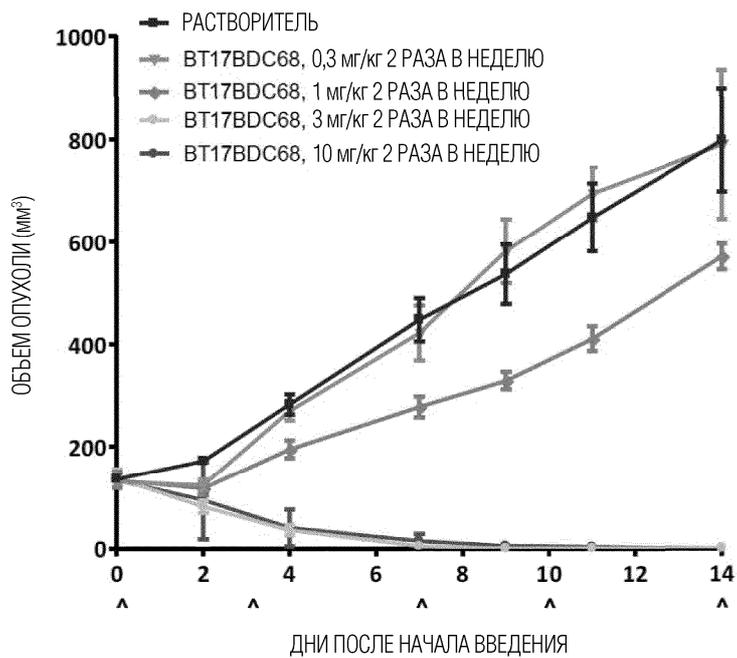
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2