

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046294**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.02.22**

(21) Номер заявки  
**202290418**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.07.30**

(51) Int. Cl. **A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 47/50** (2017.01)  
**A61K 38/12** (2006.01)  
**C07K 7/54** (2006.01)

---

(54) **ГЕТЕРОТАНДЕМНЫЙ БИЦИКЛИЧЕСКИЙ ПЕПТИДНЫЙ КОМПЛЕКС**

---

(31) **62/880,191; 62/910,088; 62/931,442;  
63/022,667; 63/024,715**

(32) **2019.07.30; 2019.10.03; 2019.11.06;  
2020.05.11; 2020.05.14**

(33) **US**

(43) **2022.05.16**

(86) **PCT/GB2020/051827**

(87) **WO 2021/019243 2021.02.04**

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

(72) Изобретатель:  
**Макдоннелл Кевин, Упадхияа Пунит,  
Лехденрента Джоанна, Мадд Джемма  
(GB)**

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

(56) WO-A1-2019193328  
Punit Upadhyaya: "Activation of  
CD137 using multivalent and tumour  
targeted bicyclic peptides", 25 April 2019  
(2019-04-25), XP055669343, Retrieved from the  
Internet: URL:https://www.bicycletherapeutics.com/  
wp-content/uploads/PU\_2019-Peptide-  
Congress\_publication.pdf [retrieved on 2020-02-17]  
pages 3, 16

WO-A1-2018156740

WO-A1-2017182672

WO-A1-2010089115

---

(57) Изобретение относится к гетеротандемному бициклическому пептидному комплексу, который включает первый пептидный лиганд, который связывается с EphA2, конъюгированный через линкер с двумя вторыми пептидными лигандами, которые связываются с CD137. Изобретение также относится к применению указанных гетеротандемным бициклических пептидных комплексов для предотвращения, подавления или лечения рака.

---

**B1**

**046294**

**046294**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к гетеротандемному бициклическому пептидному комплексу, который включает первый пептидный лиганд, который связывается с EphA2, конъюгированный через линкер с двумя вторыми пептидными лигандами, которые связываются с CD137. Изобретение также относится к применению указанных гетеротандемным бициклических пептидных комплексов для предотвращения, подавления или лечения рака. Изобретение также относится к применению указанных гетеротандемным бициклических пептидных комплексов для предотвращения, подавления или лечения рака.

### Уровень техники

Циклические пептиды могут связываться с высокой аффинностью и специфичностью с белками-мишенями и, вследствие этого, они представляют собой перспективный класс молекул для разработки терапевтических средств. В действительности, несколько циклических пептидов уже успешно используются в клинической практике, например, антибактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессант циклоспорин или противораковый препарат октреотид (Driggers et al. (2008), *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 608-24). Высокая способность к связыванию обусловлена относительно большой поверхностью взаимодействия, образующейся между пептидом и мишенью, а также пониженной конформационной гибкостью циклических структур. Обычно макроциклы связываются с поверхностями площадью несколько сотен квадратных ангстрем, как, например, циклический пептидный антагонист CXCR4-CVX15 (400 Å<sup>2</sup>; Wu et al. (2007), *Science* 330, 1066-71), циклический пептид с мотивом Arg-Gly-Asp, связывающийся с интегрином αVβ3 (355 Å<sup>2</sup>) (Xiong et al. (2002), *Science* 296 (5565), 151-5) или циклический пептидный ингибитор упаин-1, связывающийся с активатором плазминогена урокиназного типа (603 Å<sup>2</sup>; Zhao et al. (2007), *J Struct Biol* 160 (1), 1-10).

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

Ранее, различные группы исследователей проводили связывание полипептидов с остатками цистеина с синтетической молекулярной структурой (Kemp and McNamara (1985), *J. Org. Chem*; Timmerman et al. (2005), *ChemBioChem*). Meloen с соавторами использовали трис(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной циклизации множества пептидных петель на синтетических каркасах для структурной имитации поверхности белков (Timmerman et al. (2005), *ChemBioChem*). Способы получения перспективных лекарственных соединений, в которых указанные соединения получают путем связывания цистеинсодержащих полипептидов с молекулярным каркасом, таким как, например, 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА), раскрыты в патентных документах WO 2019/122860 and WO 2019/122863.

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

### Сущность изобретения

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

(а) первый пептидный лиганд, который связывается с EphA2 и который имеет последовательность A-[HArg]-D-C<sub>i</sub>[HuP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[d1NaI]WTC<sub>iii</sub> (SEQ ID NO: 1; BCY13118), конъюгированный через линкер N-(кислота-PEG<sub>3</sub>)-N-бис(PEG<sub>3</sub>-азид) с

(б) вторыми пептидными лигандами, которые связываются с CD137, оба из которых имеют последовательность Ac-C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub>-A (SEQ ID NO: 2; BCY8928);

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

где Ac представляет ацетил, HArg представляет гомоаргинин, HuP представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, d1NaI представляет D-1-нафтилаланин, tBuAla представляет третбутил-аланин, PYA представляет 4-пентиноевую кислоту и Nle представляет норлейцин.

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

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

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Анализ гетеротандемного EphA2/CD137 бициклического пептидного комплекса BCY13272 путем проведения анализа репортерного гена люциферазы на CD137 фирмы Promega в присутствии экспрессирующих EphA2 клеток A549, PC-3 и HT29 (n=3). BCY13626 представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, аналогичный BCY13272 но который включает D-аминокислоты и не связывается с EphA2 или CD137.

Фиг. 2. Кривая зависимости концентрации BCY13272 в плазме от времени при внутривенном введении дозы 5,5 мг/кг мышам CD1 (n=3), при внутривенной инфузии дозы 3,6 мг/кг (15 мин) крысам SD (n=3) и при внутривенной инфузии дозы 8,9 мг/кг (15 мин) яванским макакам (n=2). Фармакокинетический профиль для BCY13272 характеризуется конечным периодом полувыведения 2,9 ч в случае мышей CD-1, 2,5 ч в случае крыс SD и 8,9 ч в случае яванских макаков.

Фиг. 3. Противоопухолевая активность BCY13272 в модели сингенной опухоли MC38. (А) Объемы опухолей MC38 в процессе лечения и после лечения с помощью BCY13272. Число мышей с полным ответом (CR) на день D28 (и сколько остается мышей с полным ответом на день D62) указано в скобках. ВІW: дозирование два раза в неделю; IV: внутривенное введение. (В) Кривые роста опухоли в случае животных с полным ответом на лечение с помощью BCY13272 и в случае наивных соответствующих возрастной группе контрольных животных после имплантации им клеток опухоли MC38. CR: животное с полным ответом.

Фиг. 4. BCY13272 индуцирует секрецию цитокина IFN- $\gamma$  при проведении анализа совместной культуры (А) РВМС/МС38 и (В) РВМС/HT29. BCY12762 представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, который связывается с EphA2, но не связывается с CD137. BCY13692 представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, который связывается с CD137, но не связывается с EphA2. (С) Графическая зависимость между величинами EC<sub>50</sub> (нМ) для BCY13272 и индуцированной секрецией IL-2 и IFN- $\gamma$  при проведении анализа в совместной культуре РВМС с клеточной линией MC38 (мышь) в случае 5 доноров РВМС и с клеточной линией HT1080 (человек) в случае 4 доноров РВМС.

Фиг. 5. Данные исследования методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) связывания BCY13272 с иммобилизованными (А) EphA2 и (В) CD137.

#### Подробное описание изобретения

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

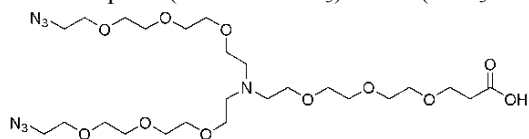
(а) первый пептидный лиганд, который связывается с EphA2 и который имеет последовательность A-[NArg]-D-C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[d1Nal]WTC<sub>iii</sub> (SEQ ID NO: 1; BCY13118), конъюгированный через линкер N-(кислота-PEG<sub>3</sub>)-N-бис(PEG<sub>3</sub>-азид) с

(б) вторыми пептидными лигандами, которые связываются с CD137, оба из которых имеют последовательность Ac-C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub>-A (SEQ ID NO: 2; BCY8928),

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

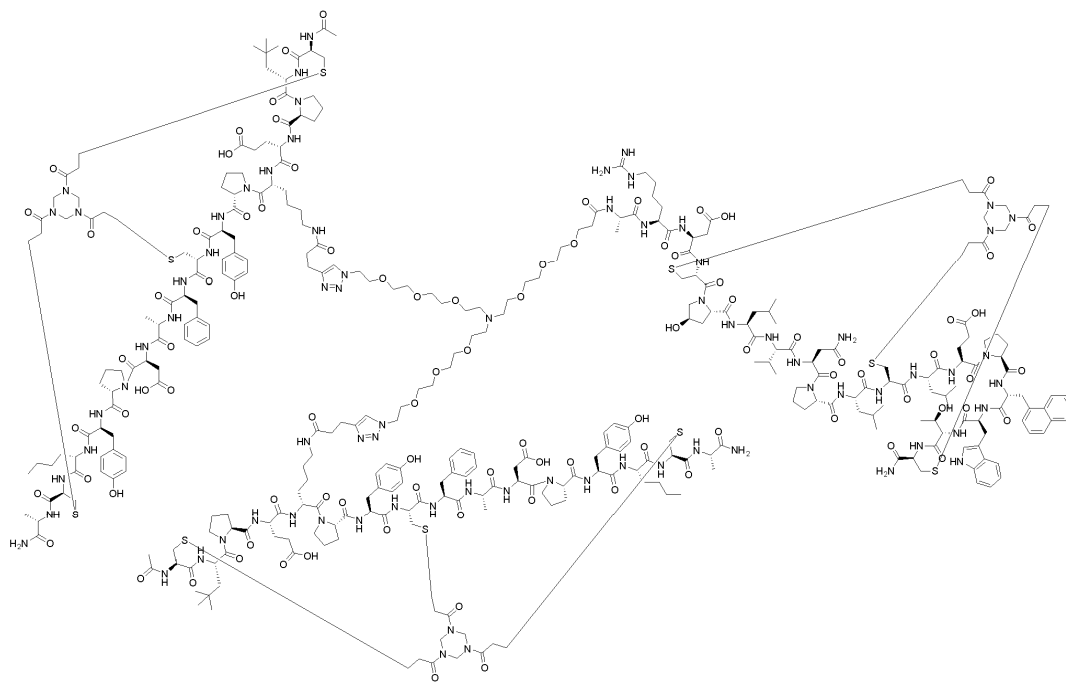
где Ac представляет ацетил, NArg представляет гомоаргинин, HyP представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, d1Nal представляет D-1-нафтилаланин, tBuAla представляет третбутил-аланин, PYA представляет 4-пентиную кислоту и Nle представляет норлейцин.

Упоминание в изобретении линкера N-(кислота-PEG<sub>3</sub>)-N-бис(PEG<sub>3</sub>-азид) включает:



N-(кислота-PEG<sub>3</sub>)-N-бис(PEG<sub>3</sub>-азид).

В одном варианте осуществления, гетеротандемный бициклический пептидный комплекс представляет собой BCY13272:

**BCY13272.**

Подробные сведения по BCU13272 приведены в табл. А ниже.

Таблица А

Композиция BCU13272

№ комплекса	№ BCU для EphA2	Точка присоединения	Линкер	№ BCU для CD137	Точка присоединения
BCY13272	BCY13118	N-конец	N-(кислота-PEG <sub>3</sub> )-N-бис(PEG <sub>3</sub> -азид)	BCY8928, BCU8928	dLys (PYA)4

На фиг. 3 представлены данные, которые демонстрируют, что BCU13272 вызывает значительный противоопухолевый эффект в модели опухоли MC38 на мышах.

В изобретении упоминаются конкретные аналоги (то есть модифицированные производные) и метаболиты BCU13272, каждый из которых образуют дополнительные аспекты изобретения, и данные по которым приведены в табл. В ниже.

Таблица В

Композиция меченых аналогов и возможных метаболитов BCU13272

№ комплекса	№ BCU для EphA2	Точка присоединения	Линкер	№ BCU для CD137	Точка присоединения	Модификатор
BCY14414	BCY13118	N-конец	N-(кислота-PEG <sub>3</sub> )-N-бис(PEG <sub>3</sub> -азид)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	N/A
BCY14417	BCY13118	N-конец	N-(кислота-PEG <sub>3</sub> )-N-бис(PEG <sub>3</sub> -азид)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Peg12-Биотин

			азид)			
BCY14418	BCY13118	N-конец	N-(кислота-PEG <sub>3</sub> )-N-бис(PEG <sub>3</sub> -азид)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Alexa Fluor® 488
BCY15217	BCY13118	N-конец	N-(кислота-PEG <sub>3</sub> )-N-бис(PEG <sub>3</sub> -азид)	BCY14601 BCY14601	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	N/A
BCY15218	BCY13118	N-конец	N-(кислота-PEG <sub>3</sub> )-N-бис(PEG <sub>3</sub> -азид)	BCY8928 BCY14601	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	N/A

где BCY14601 представляет бициклический пептидный лиганд, имеющий последовательность C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub>-A (SEQ ID NO: 3), с TATA в качестве молекулярного каркаса;

и где BCY13389 представляет бициклический пептидный лиганд, имеющий последовательность [Ac]C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub>-K (SEQ ID NO: 4), с TATA в качестве молекулярного каркаса.

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

Номенклатура.

Нумерация.

При указании положений аминокислотного остатка в соединениях по изобретению, для остатков цистеина (C<sub>i</sub>, C<sub>ii</sub> и C<sub>iii</sub>) нумерация не приводится, поскольку они являются инвариантными, поэтому нумерация аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 1 является такой, как показано ниже:

C<sub>i</sub>-HuP<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>-V<sub>3</sub>-N<sub>4</sub>-P<sub>5</sub>-L<sub>6</sub>-C<sub>ii</sub>-L<sub>7</sub>-E<sub>8</sub>-P<sub>9</sub>-d1Nal<sub>10</sub>-W<sub>11</sub>-T<sub>12</sub>-C<sub>iii</sub> (SEQ ID NO: 1).

Применительно к настоящему изобретению, предполагается, что все бициклические пептиды циклизованы с помощью 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (TATA) с образованием тризамещенной структуры. Циклизация с помощью TATA происходит по C<sub>i</sub>, C<sub>ii</sub> и C<sub>iii</sub>.

Молекулярный формат.

N- или C-концевые удлинения для коровой последовательности бицикла добавляются к левой или правой стороне последовательности и отделяются дефисом. Например, N-концевой βAla-Sar10-Ala хвост будет обозначаться как:

βAla-Sar10-A-(SEQ ID NO: X).

Обратные пептидные последовательности.

В свете публикации Nair et al (2003) *J Immunol* 170(3), 1362-1373, предполагается, что раскрытые в изобретении пептидные последовательности могут также найти применение в их ретро-инверсной форме. Например, порядок последовательности изменяют на обратный (то есть N-конец становится C-концом и наоборот), и ее стереохимия таким же образом становится обратной (то есть D-аминокислоты становятся L-аминокислотами и наоборот). Во избежание неправильного толкования, предполагается, что при указании аминокислот, либо в виде их полного названия, либо в виде их буквенного кода из одной или трех букв, в изобретении они представляются как L-аминокислоты, если не заявлено иное. Если предполагается, что такая аминокислота должна быть представлена в изобретении как D-аминокислота, то, в этом случае, перед обозначением аминокислоты будет стоять строчная буква d и все обозначение будет взято в квадратные скобки, например, [dA], [dD], [dE], [dK], [d1Nal], [dNle], и так далее.

Преимущества пептидных лигандов.

Конкретные гетеротандемные бициклические пептидные комплексы по настоящему изобретению имеют ряд предпочтительных свойств, благодаря которым они могут рассматриваться в качестве подходящих молекул, подобных лекарственным средствам, для инъекционного, ингаляционного, назального,

глазного, перорального или местного введения. Такие предпочтительные свойства включают:

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

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

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

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

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

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

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

Иммунологическая память.

Сочетание связывающегося с раковой клеткой бициклического пептидного лиганда со связывающимся с иммунной клеткой бициклическим пептидным лигандом обеспечивает синергетический положительный эффект для иммунологической памяти. Предполагается, что гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по изобретению позволяют не только уничтожить опухоли, но при повторном введении вызывающего образование опухоли средства, ни у одной из инокулированных мышей с полным ответом не развивались опухоли. Это указывает на то, что лечение с помощью выбранных гетеротандемных бициклических пептидных комплексов по изобретению вызывало иммунологическую память у мышей с полным ответом. Это является значительным клиническим преимуществом с точки зрения предотвращения повторного возникновения указанной опухоли, после того как она первоначально была подвергнута противоопухолевой терапии и уничтожена.

Пептидные лиганды.

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

Фармацевтически приемлемые соли.

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

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

Соли присоединения кислот (моно- или дисоли) могут быть образованы с широким спектром кислот, как неорганических, так и органических. Примеры солей включают моно- или дисоли, образованные с кислотой, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацетамидобензойной, бутановой, (+)-камфорной, камфорносульфоновой, (+)-(1S)-камфора-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламовой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, фумаровой, слизевой, гентиизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой),  $\alpha$ -оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, гидрогалогеновых кислот (например, бромистоводородной, хлористоводородной, йодистоводородной), изетионовой, молочной (например, (+)-L-молочной, ( $\pm$ )-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, ( $\pm$ )-DL-миндальной, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оровой, щавелевой, пальмитиновой, палмовой, фосфорной, пропионовой, пировиноградной, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-амино-салициловой, себациновой, стеариновой, янтарной, серной, дубильной, (+)-L-винной, тиоциановой, п-толуолсульфоновой, ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированных аминокислот и катионообменных смол.

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

Если соединение является анионным или имеет функциональную группу, которая может быть анионной (например, -COOH может находиться в форме аниона -COO<sup>-</sup>), то соль может быть образована с органическим или неорганическим основанием, генерирующим подходящий катион. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но этим не ограничивая, ионы щелочных металлов, такие как Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>, катионы щелочно-земельных металлов, такие как Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, и другие катионы, такие как Al<sup>3+</sup> или Zn<sup>2+</sup>. Примеры подходящих органических катионов включают, но этим не ограничивая, ион аммония (то есть, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) и ионы замещенного аммония (например, NH<sub>3</sub>R<sup>+</sup>, NH<sub>2</sub>R<sub>2</sub><sup>+</sup>, NHR<sub>3</sub><sup>+</sup>, NR<sub>4</sub><sup>+</sup>). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются ионы, которые образованы из метиламина, этиламина, диэтиламина, пропиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером типичного иона четвертичного аммония является N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>.

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

Модифицированные производные.

Следует иметь в виду, что описанные в изобретении модифицированные производные пептидных лигандов входят в объем настоящего изобретения. Примеры таких подходящих модифицированных производных включают одну или более модификаций, выбранных из N-концевых и/или C-концевых моди-

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

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

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

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

В дополнительном варианте осуществления, модифицированное производное включает C-концевую модификацию. В дополнительном варианте осуществления, C-концевая модификация включает амидную группу. В этом варианте осуществления, C-концевую цистеиновую группу (обозначаемая в изобретении как C<sub>iii</sub>) синтезирую в форме амида в процессе синтеза пептида, что приводит к образованию молекулы с амидированным C-концом. В этом варианте осуществления обеспечивается преимущество, связанное с удалением потенциальной точки распознавания карбоксипептидазы и снижением вероятности протеолитической деградации бициклического пептида.

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

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

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает добавление спейсерной группы. В дополнительном варианте осуществления, модифицированное производное включает добавление спейсерной группы к N-концевому цистеину (C<sub>i</sub>) и/или к C-концевому цистеину (C<sub>iii</sub>).

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



В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более заряженных аминокислотных остатков одним или более гидрофобными аминокислотными остатками. В альтернативном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более гидрофобных аминокислотных остатков одним или более заряженными аминокислотными остатками. Благоприятный баланс между заряженными и гидрофобными аминокислотными остатками является важной характеристикой бициклических пептидных лигандов. Например, гидрофобные аминокислотные остатки влияют на степень связывания с белками плазмы и, таким образом, на концентрацию доступной свободной фракции в плазме, в то время как заряженные аминокислотные остатки (в частности, аргинин) могут влиять на взаимодействие пептида с фосфолипидными мембранами на поверхности клеток. Эти два типа остатков в комбинации могут влиять на период полувыведения, объем распределения и воздействие пептидного лекарственного средства, и могут быть подобраны в соответствии с требуемым клиническим результатом. Кроме того, благоприятная комбинация и число заряженных аминокислотных остатков относительно гидрофобных аминокислотных остатков могут снижать раздражение в месте инъекции (при подкожном введении пептидного лекарственного средства).

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

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

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

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

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

введение в пептид дополнительных ограничений степеней свободы путем, например, правильного выбора ограничения степеней свободы боковых цепей аминокислоты, благодаря чему минимизируется потеря энтропии при связывании с мишенью, ограничения степеней свободы торсионных углов основной цепи, благодаря чему минимизируется потеря энтропии при связывании с мишенью, и путем введения дополнительных циклов в молекулу по тем же самым причинам (обзорную информацию можно найти в публикациях Gentilucci et al, Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203, и Nestor et al, Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418).

Изотопные варианты.

Настоящее изобретение включает все фармацевтически приемлемые (радиоактивно)изотопно-меченые пептидные лиганды по изобретению, в которых один или более атомов заменены атомами, имеющими тот же атомный номер, но атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе, и пептидные лиганды по изобретению, к которым присоединены хелатирующие металлы группы (называемые "эффекторными"), которые способны удерживать соответствующие (радиоактивные)изотопы, и пептидные лиганды по изобретению, в которых некоторые функциональные группы ковалентно заменены соответствующими (радиоактивными)изотопами или изотопно-мечеными функциональными группами.

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

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

диоактивные изотопы тритий, то есть  $^3\text{H}$  (Т), и углерод-14, то есть  $^{14}\text{C}$ , в виду простоты их введения и доступности средств для их детекции.

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

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

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

Синтез.

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

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

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

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

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

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

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

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

Фармацевтические композиции.

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

Как правило, пептидные лиганды по настоящему изобретению должны использоваться в очищенной форме вместе с фармакологически приемлемыми вспомогательными веществами или носителями. Обычно, эти вспомогательные вещества или носители включают водный или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физиологический раствор и/или забуференные среды. Среды для парентерального введения включают раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, раствор

декстрозы и хлорида натрия и раствор Рингера с лактатом. Подходящие физиологически приемлемые вспомогательные вещества, если необходимо поддерживать полипептидный комплекс в форме суспензии, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

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

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

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

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

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

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

Терапевтическое применение.

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

Примеры видов рака (и их доброкачественных аналогов), которые могут быть подвергнуты лечению (или подавлены) включают, но этим не ограничивая, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциномы, плоскоклеточный рак, переходные клеточные карциномы и другие карциномы), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевых путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (включая карциномы пищевода, желудка (желудочные), тонкой кишки, толстой кишки, прямой кишки и заднего прохода), печени (гепатоцеллюлярную карциному), желчного пузыря и желчевыведительной системы, экзокринной части поджелудочной железы, по-

чек, легких (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легких, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), карциномы головы и шеи (например, рак языка, ротовой полости, гортани, глотки, носоглотки, миндалин, слюнных желез, полости носа и околоносовых пазух), яичников, маточных труб, брюшной полости, влагалища, вульвы, пениса, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярную карциному щитовидной железы), надпочечников, предстательной железы, кожи и прилежащих органов (например, меланому, базальноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, кератоакантому, диспластический невус); гематологические злокачественные опухоли (например, лейкозы, лимфомы) и предраковые гематологические нарушения и нарушения с пограничной злокачественностью, включая гематологические злокачественные заболевания и связанные с ними состояния клеток лимфоидного ряда (например, острый лимфолейкоз [ALL], хронический лимфолейкоз [CLL], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лимфома клеток мантлийной зоны, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы натуральных клеток-киллеров [NK], лимфомы Ходжкина, лейкоз ворсистых клеток, моноклональную гаммапатию неясного генеза, плазмодитому, множественную миелому и лимфопротиферативные нарушения после трансплантации), а также гематологические злокачественные и родственные состояния клеток миелоидного ряда (например, острый миелолейкоз [AML], хронический миелолейкоз [CML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелопротиферативные расстройства, такие как полицитемия вера, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелопротиферативный синдром, синдром миелодисплазии и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимального происхождения, например, саркомы мягких тканей, кости или хряща, такие как остеосаркомы, фибросаркомы, хондросаркомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, саркому Капоши, саркому Юинга, синовиальную саркому, эпителиоидные саркомы, желудочно-кишечные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные гистiocитомы и дерматофибросаркому протуберанс; опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитомы, глиомы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, опухоли эпифиза и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островковых клеток, опухоли паращитовидных желез, карциноидные опухоли и медулярную карциному щитовидной железы); опухоли глаз и их придатков (например, ретинобластому); опухоли зародышевых клеток и трофобласта (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы, пузырьный занос и хориокарциному); и педиатрические и эмбриональные опухоли (например, медуллобластомы, нейробластомы, опухоль Вильмса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, которые делают больного восприимчивым к возникновению злокачественного новообразования (например, пигментной ксеродермы).

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

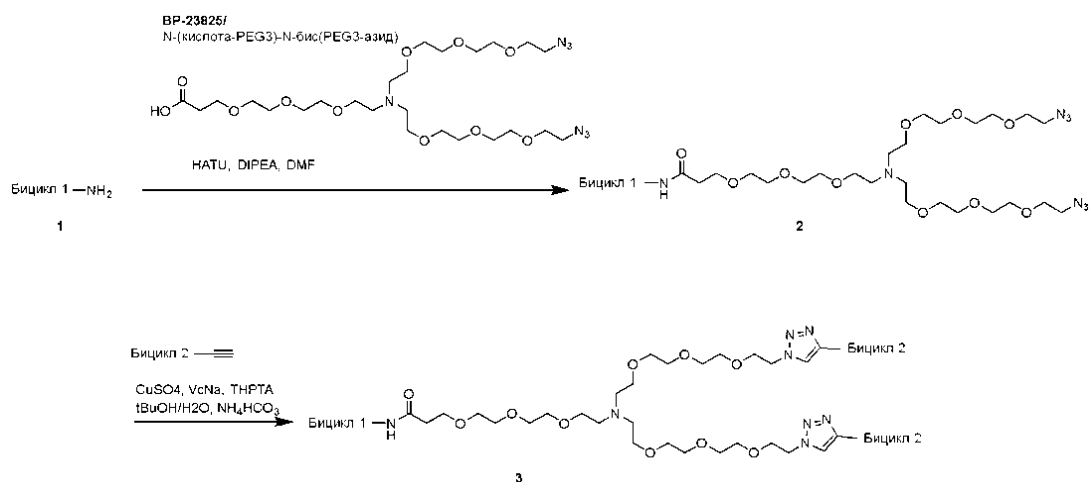
Используемый в изобретении термин "предотвращение" включает введение защищающей композиции до возникновения заболевания. "Подавление" относится к введению композиции после события, приводящего к возникновению заболевания, но до клинического проявления заболевания. "Лечение" включает введение защищающей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

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

Далее изобретение дополнительно описано с помощью представленных ниже примеров.

#### **Примеры**

В большинстве случаев, гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по изобретению может быть получен следующим общим методом:

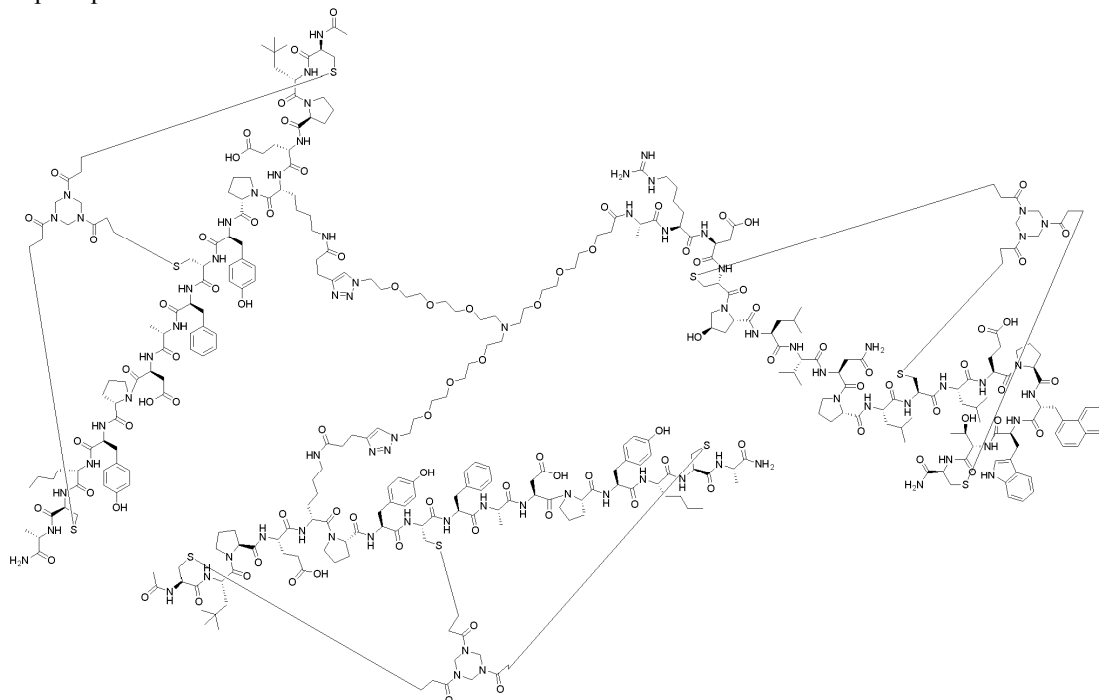


Все растворители дегазируют и продувают с помощью N<sub>2</sub> 3 раза. Раствор ВР-23825 (1,0 экв), HATU (1,2 экв) и DIEA (2,0 экв) в DMF смешивают в течение 5 мин, затем добавляют Бицикл 1 (1,2 экв). Реакционную смесь перемешивают при 40°C в течение 16 ч. Реакционную смесь затем концентрируют при пониженном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

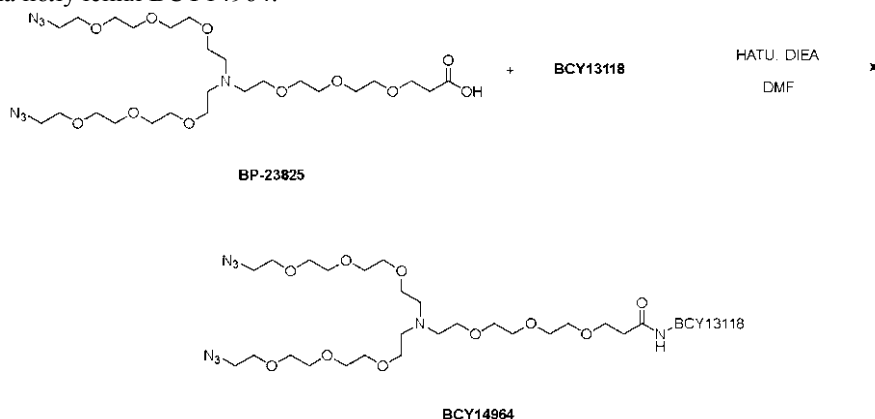
Смесь промежуточного соединения 2 (1,0 экв) и бицикла 2 (2,0 экв) растворяют в t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1), и затем добавляют CuSO<sub>4</sub> (1,0 экв), VcNa (4,0 экв) и THPTA (2,0 экв). И наконец, добавляют 0,2 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> для доведения величины pH до 8. Реакционную смесь перемешивают при 40°C в течение 16 ч в атмосфере N<sub>2</sub>. Реакционную смесь непосредственно очищают препаративной HPLC.

Более подробные описания экспериментов по получению гетеротандемного бициклического пептидного комплекса по изобретению приведены ниже.

Пример 1. Синтез ВСУ13272.

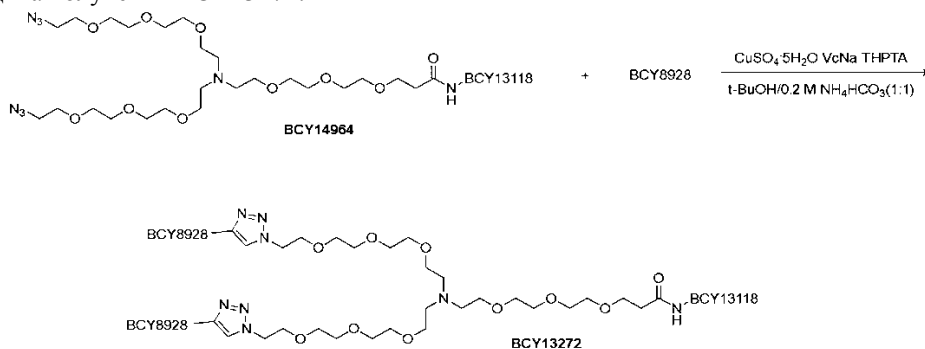


## Методика получения ВСУ14964.



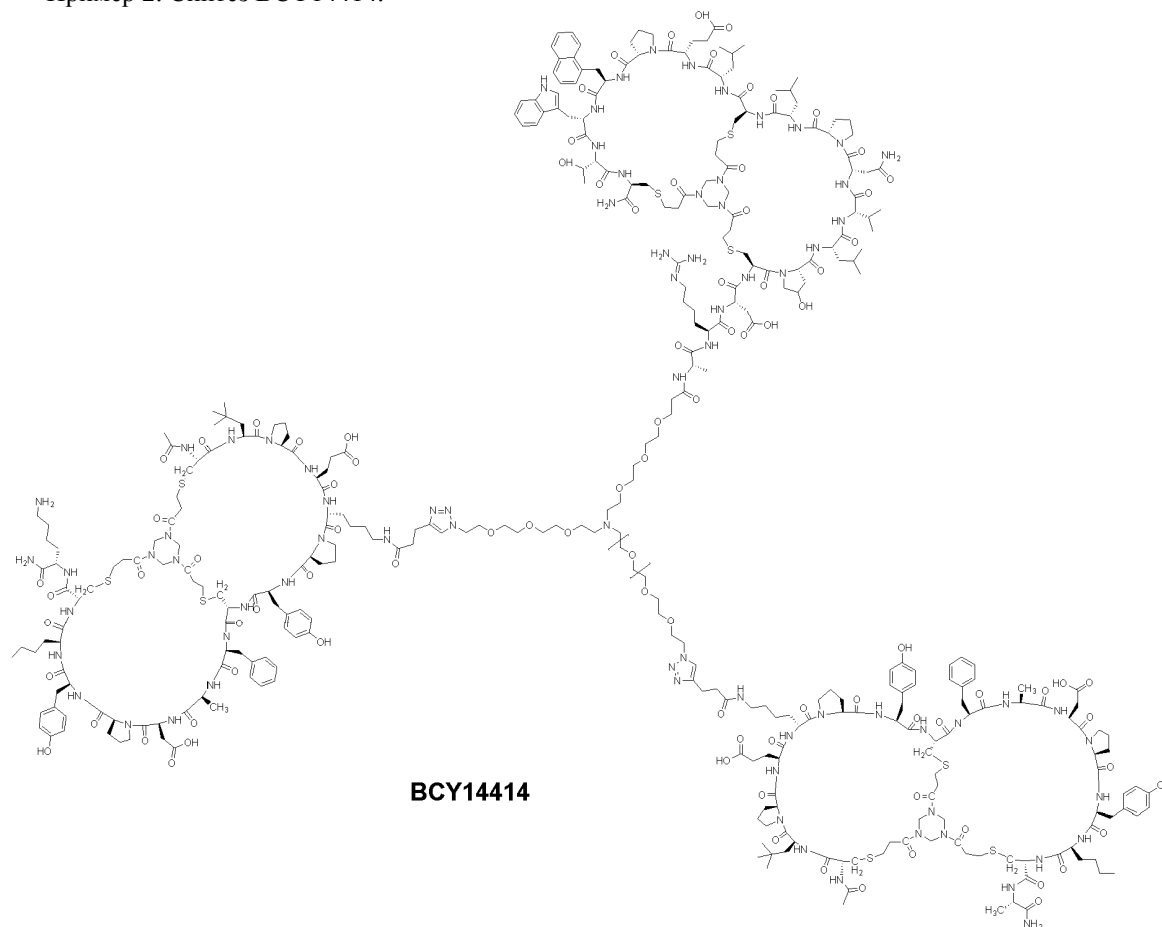
Смесь ВР-23825 (155,5 мг, 249,40 мкмоль, 1,2 экв) и HATU (95,0 мг, 249,92 мкмоль, 1,2 экв) растворяли в NMP (1,0 мл), затем величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA (64,6 мг, 499,83 мкмоль, 87,0 мкл, 2,4 экв), и затем раствор перемешивали при 25°C в течение 5 мин. ВСУ13118 (500,0 мг, 207,83 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в NMP (5,0 мл), и затем добавляли к реакционному раствору, величину pH полученного раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 45 мин. Анализ методом LC-MS показывал, что ВСУ13118 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получали остаток. Остаток затем очищали препаративной HPLC с получением ВСУ14964 (1,35 г, 403,46 мкмоль, 64,7% выход, 90% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 3011,53, наблюдаемые величины m/z: 1506,8 ( $[M+2H]^{2+}$ ), 1005,0 ( $[M+3H]^{3+}$ ).

## Методика получения ВСУ13272.

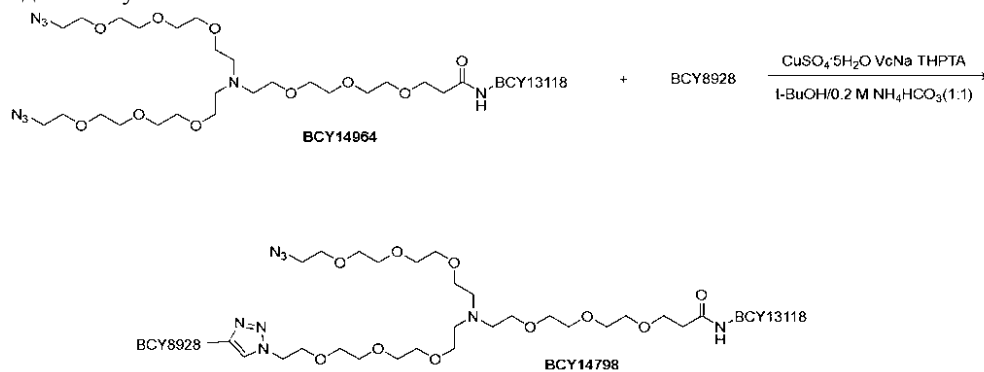


Смесь ВСУ8928 (644,0 мг, 290,55 мкмоль, 2,5 экв), THPTA (50,5 мг, 116,22 мкмоль, 1,0 экв),  $\text{CuSO}_4$  (0,4 М, 145,0 мкл, 0,5 экв) и аскорбата натрия (82,0 мг, 464,89 мкмоль, 4,0 экв) растворяли в t-BuOH/0,2 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1:1, 6,0 мл). Величину pH этого раствора доводили до 7,5 путем добавления по каплям 0,2 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (в 1:1 t-BuOH/0,2 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), и затем раствор перемешивали при 25°C в течение 3 мин. ВСУ14964 (350,0 мг, 116,22 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в t-BuOH/0,2 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1:1, 11,0 мл), и затем по каплям добавляли к перемешиваемому раствору. Все растворители предварительно дегазировали и продували с помощью  $\text{N}_2$ . Величину pH этого раствора доводили до 7,5 путем добавления по каплям 0,2 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (в 1:1 t-BuOH/0,2 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 6 ч в атмосфере  $\text{N}_2$ . Анализ методом LC-MS показывал, что был обнаружен основной пик продукта с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали ВСУ13272 (1,75 г, 235,01 мкмоль, 67,40% выход, 94% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7446,64, наблюдаемые величины m/z: 1242,0 ( $[M+6H]^{6+}$ ), 1491,0 ( $[M+5H]^{5+}$ ).

## Пример 2. Синтез BCY14414.

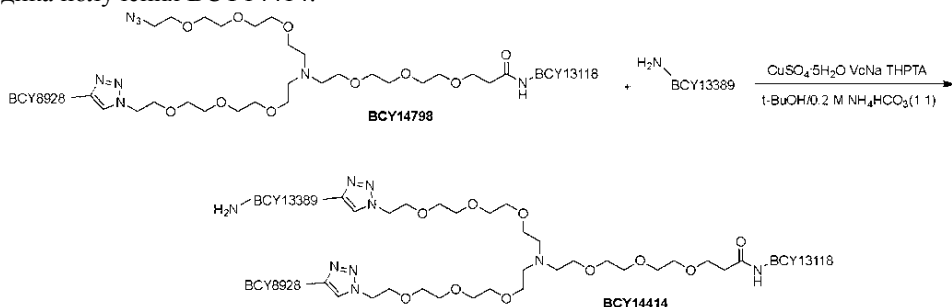


## Методика получения BCY14798.



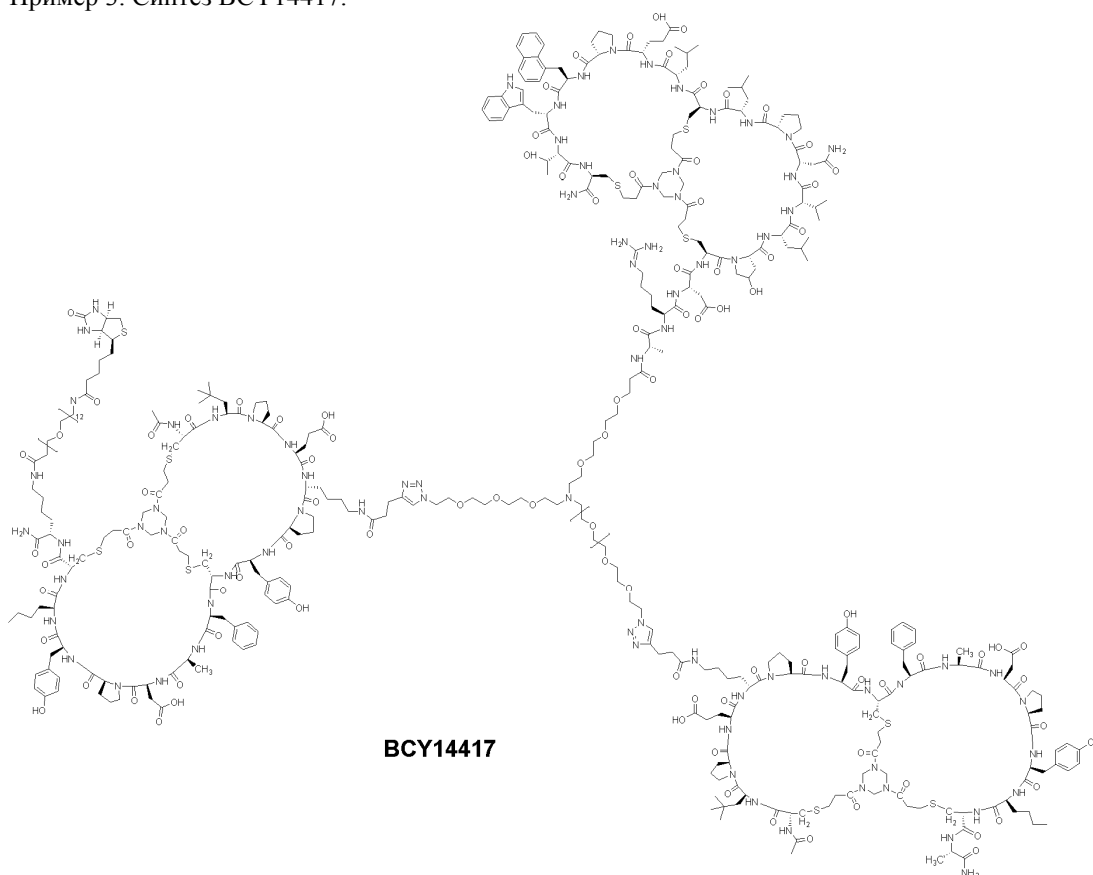
Смесь BCY14964 (55,0 мг, 18,26 мкмоль, 1,0 экв), BCY8928 (32,4 мг, 14,61 мкмоль, 0,8 экв) и THPTA (39,8 мг, 91,32 мкмоль, 5,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/0,2 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1:1, 0,5 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N<sub>2</sub>), и затем добавляли CuSO<sub>4</sub> (0,4 M, 23,0 мкл, 0,5 экв) и аскорбат натрия (72,0 мг, 365,27 мкмоль, 20,0 экв) в атмосфере N<sub>2</sub>. Величину pH этого раствора довели до 7,5 путем добавления по каплям 0,2 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (в 1:1 t-BuOH/0,2 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), и раствор приобретал светло-желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1,5 ч в атмосфере N<sub>2</sub>. Анализ методом LC-MS показывал, что BCY14964 оставалось, соединение BCY8928 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY14798 (51 мг, 9,17 мкмоль, 33,37% выход, 94% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 5229,07, наблюдаемые величины m/z: 1308,3 ([M+4H]<sup>4+</sup>), 1046,7 ([M+5H]<sup>5+</sup>).

## Методика получения ВСУ14414.



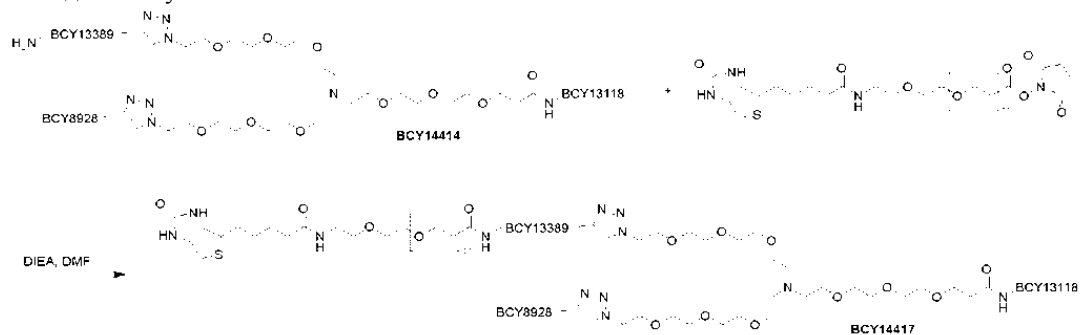
Смесь ВСУ14798 (21,0 мг, 4,02 мкмоль, 1,0 экв), ВСУ13389 (10,0 мг, 4,42 мкмоль, 1,1 экв) и THPTA (1,8 мг, 4,02 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/0,2 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1:1, 0,5 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N<sub>2</sub>), и затем добавляли CuSO<sub>4</sub> (0,4 М, 5,0 мкл, 0,5 экв) и аскорбат натрия (2,8 мг, 16,06 мкмоль, 4,0 экв) в атмосфере N<sub>2</sub>. Величину pH этого раствора доводили до 7,5 путем добавления по каплям 0,2 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (в 1:1 t-BuOH/0,2 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), и раствор приобретал светло-желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч в атмосфере N<sub>2</sub>. Анализ методом LC-MS показывал, что ВСУ14798 полностью прореагировало, оставалось некоторое количество ВСУ13389, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали ВСУ14414 (20 мг, 2,40 мкмоль, 59,73% выход, 90,9% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7503,74, наблюдаемая величина m/z: 1251,5 ([M+5H]<sup>5+</sup>), 1072,9 ([M+7H]<sup>7+</sup>).

Пример 3. Синтез ВСУ14417.



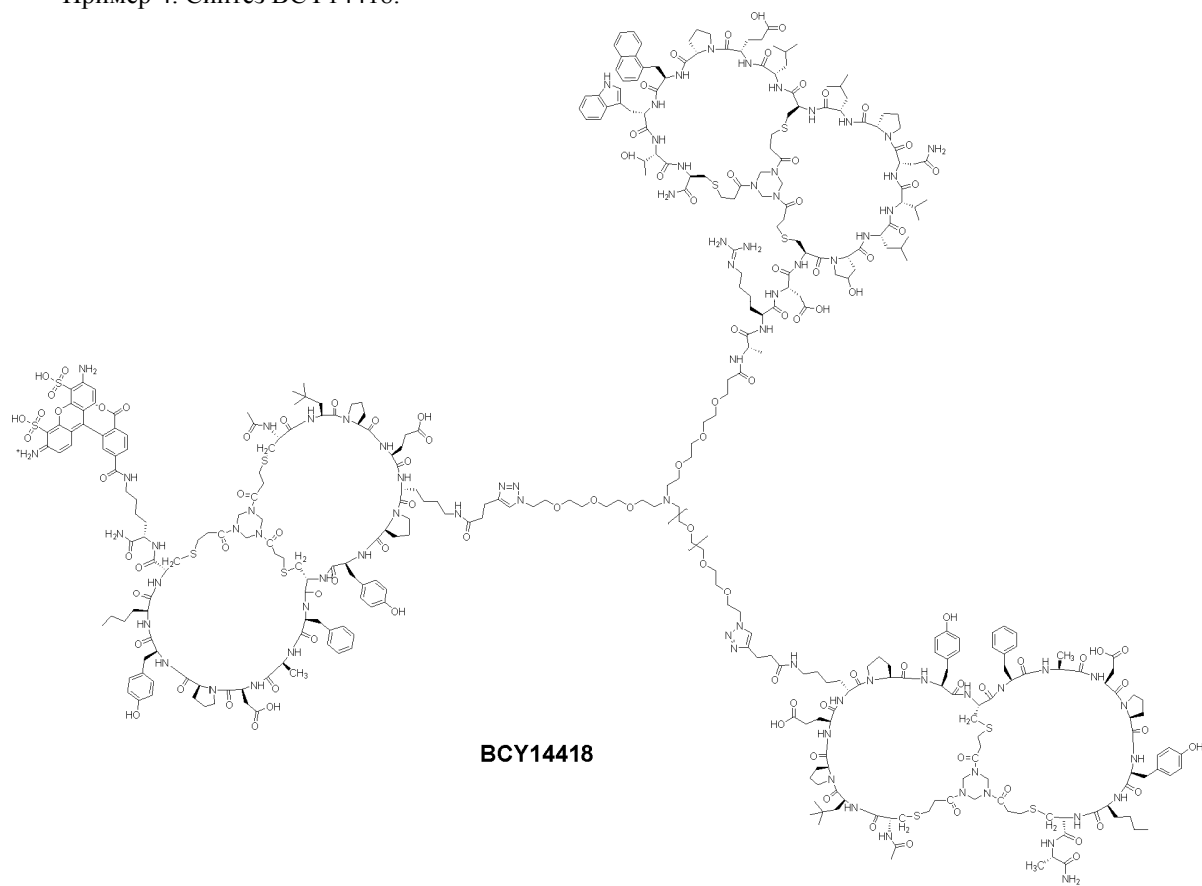


## Методика получения ВСУ14417.

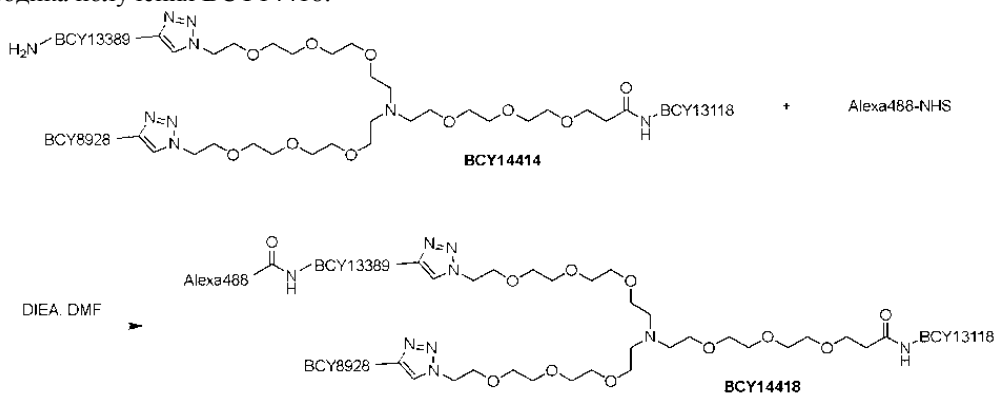


Смесь ВСУ14414 (13,0 мг, 1,73 мкмоль, 1,0 экв) и биотин-РЕG12-NHS эфира (CAS 365441-71-0, 4,2 мг, 4,50 мкмоль, 2,6 экв) растворяли в DMF (0,5 мл). Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 ч. Анализ методом LC-MS показывал, что ВСУ14414 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной  $m/z$ . Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали ВСУ14417 (9,0 мг, 1,07 мкмоль, 80,49% выход, 90,8% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 8329,74, наблюдаемые величины  $m/z$ : 1389,6 ( $[M+6H]^{6+}$ ), 1191,9 ( $[M+7H]^{7+}$ ).

Пример 4. Синтез ВСУ14418.

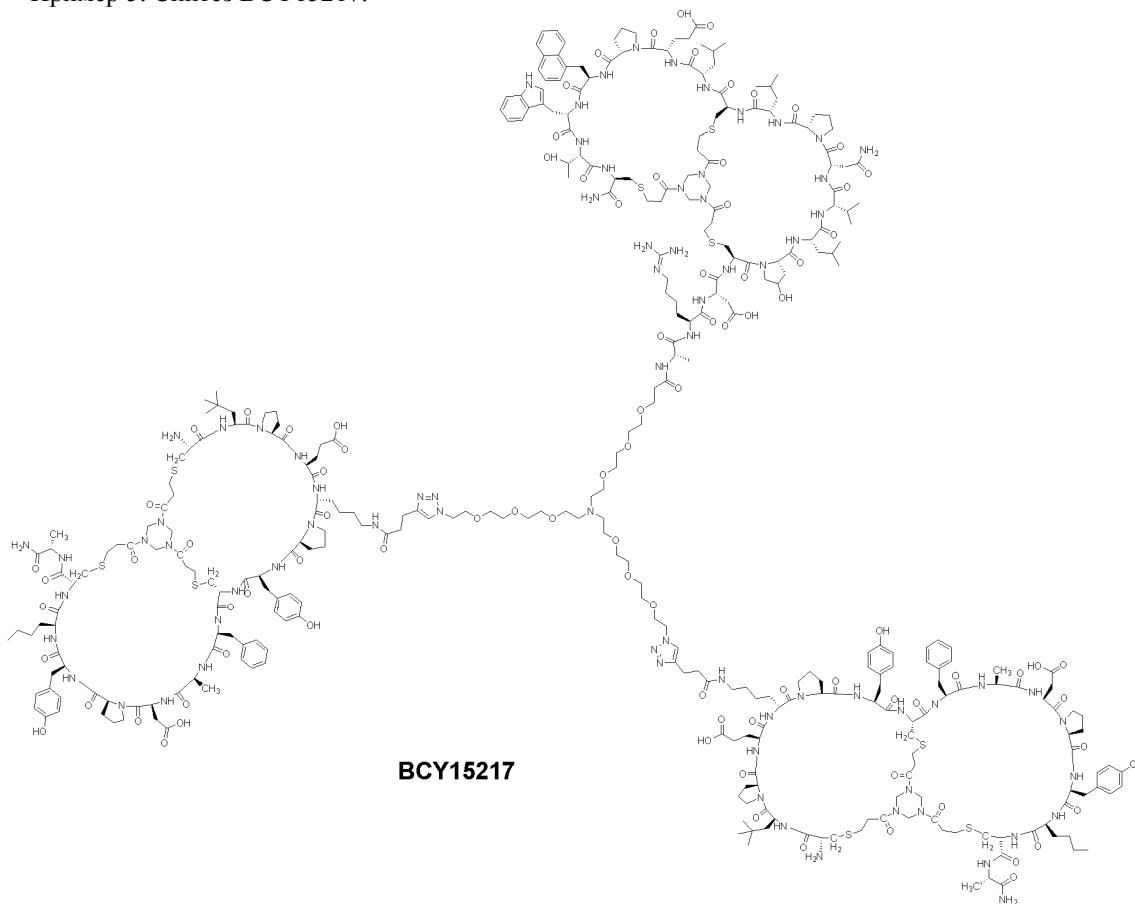


## Методика получения BCY14418.

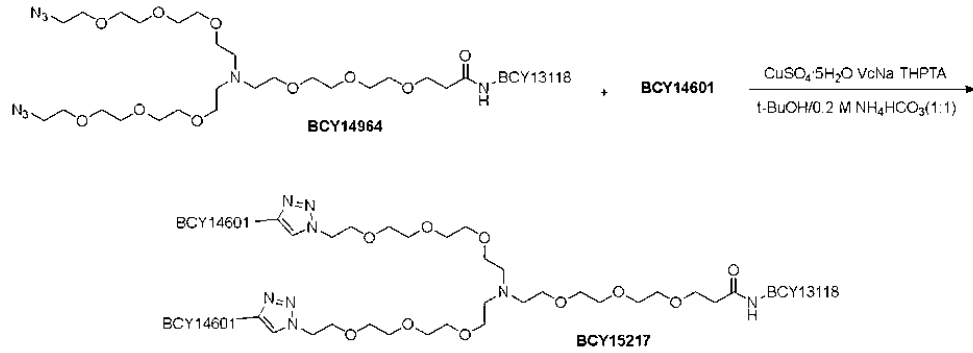


Смесь BCY14414 (5,6 мг, 0,75 мкмоль, 1,0 экв) и Alexa fluor® 488 (0,9 мг, 1,49 мкмоль, 2,0 экв) растворяли в DMF (0,3 мл). Затем величину pH этого раствора довели до 8 путем добавления по каплям DIEA. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1,0 ч. Анализ методом LC-MS показывал, что BCY14414 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной  $m/z$ . Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY14418 (2,3 мг, 0,25 мкмоль, 32,89% выход, 85,6% чистота) в виде красного твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 8020,19, наблюдаемая величина  $m/z$ : 1337,2 ( $[M+6H]^{6+}$ ).

Пример 5. Синтез BCY15217.

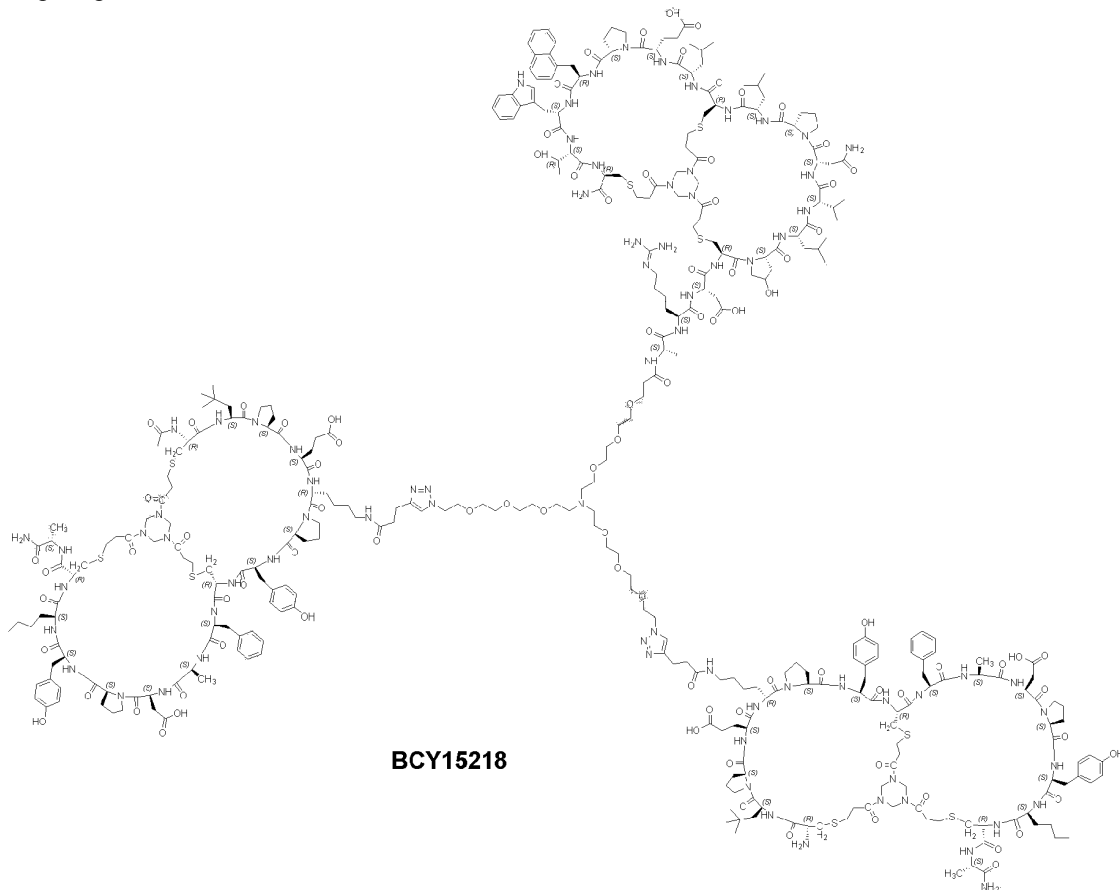


## Методика получения BCY15217.

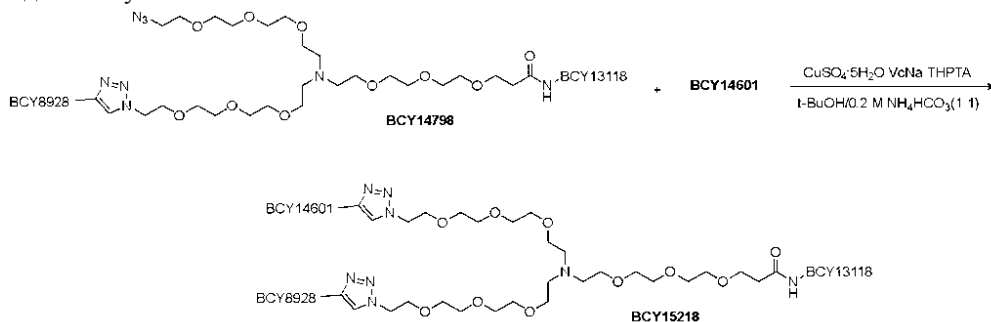


Смесь BCY14964 (20,0 мг, 6,64 мкмоль, 1,0 экв), BCY14601 (30,5 мг, 13,95 мкмоль, 2,1 экв) и THPTA (2,9 мг, 6,64 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/0,2 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1:1, 0,5 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N<sub>2</sub>), и затем добавляли CuSO<sub>4</sub> (0,4 М, 16,6 мкл, 1,0 экв) и аскорбат натрия (4,7 мг, 26,56 мкмоль, 4,0 экв) в атмосфере N<sub>2</sub>. Величину pH этого раствора доводили до 8, и раствор приобретал светло-желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч в атмосфере N<sub>2</sub>. Анализ методом LC-MS показывал, что оставался BCY14964, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY15217 (19,7 мг, 2,41 мкмоль, 36,26% выход, 96,2% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7362,5, наблюдаемые величины m/z: 1473,5 ([M+5H]<sup>5+</sup>), 1228,2 ([M+6H]<sup>6+</sup>), 1052,8 ([M+7H]<sup>7+</sup>).

Пример 6. Синтез BCY15218.



## Методика получения BCY15218.



Смесь BCY14798 (30,0 мг, 5,74 мкмоль, 1,0 экв), BCY14601 (15,0 мг, 6,88 мкмоль, 1,2 экв) и THPTA (2,5 мг, 5,74 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/0,2 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1:1, 0,5 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N<sub>2</sub>), и затем добавляли CuSO<sub>4</sub> (0,4 М, 14,0 мкл, 1,0 экв) и аскорбат натрия (4,0 мг, 22,95 мкмоль, 4,0 экв) в атмосфере N<sub>2</sub>. Величину pH этого раствора доводили до 7,5 путем добавления по каплям 0,2 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (в 1:1 t-BuOH/0,2 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч в атмосфере N<sub>2</sub>. Анализ методом LC-MS показывал, что BCY14798 полностью прореагировало, оставалось BCY14601, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY15218 (22 мг, 2,67 мкмоль, 46,61% выход, 95,0% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7404,6, наблюдаемая величина m/z: 1234,8 ([M+6H]<sup>6+</sup>).

## Данные анализа

Проводили анализ гетеротандемного бициклического пептидного комплекса по изобретению методами масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Анализы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии проводили при указанных ниже условиях:

Подвижная фаза: А: 0,1%TFA в H<sub>2</sub>O В: 0,1%TFA в ACN

Расход: 1,0 мл/мин

Колонка: Kintex 1,7 мкм C18 100A 2,1 мм × 150 мм

Прибор: Agilent UPLC 1290

Использовали градиент 30-60% В в течение 10 мин, и были получены следующие данные.

№ комплекса	Данные анализа методом масс-спектропии	Время удерживания (мин) методом HPLC
BCY13272	Рассчитанная величина MW: 7102,28, наблюдаемые величины m/z: 1776,4 [M+4H] <sup>4+</sup> , 1421,3 [M+5H] <sup>5+</sup>	7,07

## Данные исследования биологической активности

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

Культуральную среду, называемую средой R1, готовят путем добавления 1% FBS к RPMI-1640 (компонент набора Promega CS196005). Серийные разведения испытуемых образцов в R1 готовят в стерильном 96-луночном планшете. Добавляют 25 мкл на лунку исследуемых образцов или R1 (в качестве фонового контроля) в указанные лунки в планшете белого цвета для культивирования клеток. Опухолевые клетки\* собирают и ресуспендируют в среде R1 при концентрации 400000 клеток/мл. Двадцать пять (25) мкл/лунка опухолевых клеток добавляют в планшет белого цвета для культивирования клеток. Клетки Jurkat (набор Promega CS196005, 0,5 мл) размораживают на водяной бане и затем добавляют к 5 мл предварительно подогретой среды R1. Двадцать пять (25) мкл/лунка клеток Jurkat затем добавляют в планшет белого цвета для культивирования клеток. Инкубируют клетки и испытуемые образцы в течение 6 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. По истечении 6 ч, добавляют 75 мкл/лунка реагента Bio-Glo™ (Promega) и инкубируют в течение 10 мин, затем считывают люминесценцию на планшет-ридере (Clariostar, BMG). Рассчитывают кратность изменения по отношению к взятым отдельно клеткам (клетки Jurkat+клеточная линия, используемая при совместном культивировании) и строят графическую зависимость ответа от логарифма концентрации (агониста) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism для определения величины EC<sub>50</sub> (нМ) и кратности индукции относительно фона (Max).

Опухолевые клетки, используемые в совместной культуре для EphA2, представляют собой A549, PC-3 и HT29.

Данные, представленные на фиг. 1, показывают, что EphA2/CD137 гетеротандем BCY13272 индуцирует сильную активацию CD137 в репортерном анализе на CD137 в присутствии EphA2 экспресси-

рующей линии клеток (A549), тогда как несвязывающая контрольная молекула (BCY13626) не вызывает активации CD137.

Данные, представленные на фиг. 1 и в табл. 1 ниже, показывают, что BCY13272 индуцирует высокую активацию CD137 в репортерном анализе на CD137. Активация зависит от связывания гетеротандема как с CD137, так и с EphA2, что продемонстрировано отсутствием активации в случае несвязывающего контроля (BCY13626), который не связывает EphA2 или CD137.

Данные по величине  $EC_{50}$  (нМ) и кратности индукции, вызываемой BCY13272, полученные при репортерном анализе на CD137 в совместной культуре с EphA2-экспрессирующей линией опухолевых клеток, приведены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Активность EphA2/CD137 гетеротандемных бициклических пептидных комплексов в репортерном анализе на CD137

№ комплекса	Клеточная линия, экспрессирующая EphA2	$EC_{50}$ (нМ)	$E_{max}$	Средняя геометрическая величина $EC_{50}$ /клеточная линия
BCY13272	PC-3	0,245	44,5	0,117
		0,0805	44,2	
		0,0898	53	
	A549	0,1468	25,7	0,127
		0,107	23,6	
		0,132	30,2	
	HT-29	0,567	36,5	0,279
		0,187	26	
		0,205	36,4	

## 2. Исследование фармакокинетики гетеротандемного комплекса BCY13272 на крысах SD.

Самцам крыс SD вводили каждому гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, приготовленный в 25 мМ гистидина HCl, 10% сахарозы, pH 7, путем внутривенного струйного введения или внутривенного капельного введения (15 минут). Проводили последовательный отбор крови (приблизительно 80 мкл крови/ момент времени) из подчелюстной или подкожной вены в каждый момент времени. Все образцы крови незамедлительно переносили в предварительно охлажденные микроцентрифужные пробирки, содержащие 2 мкл K2-EDTA (0,5M) в качестве антикоагулянта, и помещали на натуральный лед. Образцы крови незамедлительно подвергали обработке с получением плазмы путем центрифугирования при приблизительно 4°C при 3000 g. В плазму быстро добавляли осадитель, содержащий внутренний стандарт, хорошо смешивали и центрифугировали при 12000 об/мин, при 4°C в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переносили в предварительно маркированные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки, и затем быстро замораживали на сухом льду. Образцы хранили при -70°C или ниже в необходимом количестве до проведения анализа. Образцы надосадочной жидкости объемом 7,5 мкл непосредственно вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце. Проводили анализ зависимости концентрации в плазме от времени в соответствии с некомпартментными методиками, используя программное обеспечение Phoenix WinNonlin 6.3. Регистрировали  $C_0$ ,  $C_1$ ,  $V_{dss}$ ,  $T_{1/2}$ ,  $AUC(0-last)$ ,  $AUC(0-inf)$ ,  $MRT(0-last)$ ,  $MRT(0-inf)$  и строили кривые зависимости концентрации в плазме от времени. Фармакокинетические параметры, полученные в этом эксперименте, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Фармакокинетические параметры на крысах SD

Соединение	Способ дозирования	$T_{1/2}$ (ч)	$V_{dss}$ (л/кг)	$Cl_p$ (мл/мин/кг)
BCY13272	внутривенно	2,5	1,0	7,4

## 3. Исследование фармакокинетики гетеротандемного комплекса BCY13272 на яванских макаках

Ненаивным яванским макакам вводили путем внутривенной инфузии (15 или 30 мин) в подкожную вену 1 мг/кг гетеротандемного комплекса BCY13272, приготовленный в 25 мМ гистидина HCl, 10% сахарозы, pH 7. Проводили последовательный отбор крови (приблизительно 1,2 мл крови/момент времени)

из периферического кровеносного сосуда обездвиженных, не подвергнутых воздействию седативных средств животных, в каждый момент времени в выпускаемые промышленностью пробирки, содержащие соль калий (K2) EDTA\*2H<sub>2</sub>O (0,85-1,15 мг), на натуральном льду и подвергали обработке с целью получения плазмы. Образцы центрифугировали (3000 × g в течение 10 мин при температуре от 2 до 8°C) сразу после отбора образцов. Плазму в объеме 0,1 мл переносили в маркированные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки. В плазму быстро добавляли 5-кратное количество осадителя, включающего внутренний стандарт 100 нг/мл лабеталол+100 нг/мл дексаметазон+100 нг/мл толбутамид+100 нг/мл верапамил+100 нг/мл глибурид+100 нг/мл цецекоксиб в растворе плазмы в MeOH, хорошо смешивали и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин при температуре от 2 до 8°C. Образцы надосадочной жидкости переносили в предварительно маркированные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки и замораживали на сухом льду. Образцы хранили при -60°C или ниже до проведения анализа методом LC-MS/MS. Аликвоту 40 мкл калибровочного стандарта, контроля качества, одиночного холостого и двойного холостого образцов добавляли в пробирку объемом 1,5 мл. Каждый образец (за исключением двойного холостого) гасили с помощью 200 мкл IS1, соответственно (двойной холостой образец гасили с помощью 200 мкл MeOH с 0,5% triton X-100), и затем смесь хорошо смешивали с помощью смесителя Vortex (по меньшей мере, 15 с) и центрифугировали в течение 15 мин при 12000 г при 4°C. Образцы надосадочной жидкости объемом 10 мкл вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце. Проводили анализ зависимости концентрации в плазме от времени в соответствии с некомпартментными методиками, используя программное обеспечение Phoenix WinNonlin 6.3. Регистрировали C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, V<sub>dss</sub>, T<sub>1/2</sub>, AUC(0-last), AUC(0-inf), MRT(0-last), MRT(0-inf) и кривые зависимости концентрации в плазме от времени. Фармакокинетические параметры для BCY13272 приведены в табл. 3.

Таблица 3

Фармакокинетические параметры на яванском макаке				
Соединение	Способ дозирования	T <sub>1/2</sub> (ч)	Cl <sub>p</sub> (мл/мин/кг)	V <sub>dss</sub> (л/кг)
BCY13272	внутривенная инфузия (15 мин)	8,9	4,1	0,82

На фиг. 2 приведена кривая зависимости концентрации в плазме от времени для BCY13272 после внутривенной инфузии 3,6 мг/кг (15 мин) крысам SD (n=3) и внутривенной инфузии 9,2 мг/кг (15 мин) яванским макакам (n=3). BCY13272 имеет объем распределения в равновесном состоянии (V<sub>dss</sub>) 1,0 л/кг и клиренс 7,5 мл/мин/кг у крыс, что дает в результате конечный период полувыведения 2,9 ч. BCY13272 имеет объем распределения в равновесном состоянии (V<sub>dss</sub>) 0,82 л/кг и клиренс 4,1 мл/мин/кг у яванских макаков, что дает в результате конечный период полувыведения 8,9 ч.

#### 4. Исследование фармакокинетики гетеротандемного комплекса BCY13272 на мышях CD1.

Шести самцам мышей CD-1 вводили каждому интраперитонеально или внутривенно 15 мг/кг гетеротандемного комплекса BCY13272, приготовленного в 25 mM гистидина HCl, 10% сахарозы, pH 7. Проводили последовательный отбор крови (приблизительно 80 мкл крови/ момент времени) из подчелюстной или подкожной вены в каждый момент времени. Все образцы крови незамедлительно переносили в предварительно охлажденные микроцентрифужные пробирки, содержащие 2 мкл K<sub>2</sub>-EDTA (0,5M) в качестве антикоагулянта, и помещали на натуральный лед. Образцы крови незамедлительно подвергали обработке с получением плазмы путем центрифугирования при приблизительно 4°C при 3000 г. В плазму быстро добавляли осадитель, содержащий внутренний стандарт, хорошо смешивали и центрифугировали при 12000 об/мин, при 4°C в течение 10 мин. Надосадочную жидкость переносили в предварительно маркированные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки, и затем быстро замораживали на сухом льду. Образцы хранили при -70°C или ниже в необходимом количестве до проведения анализа. Образцы надосадочной жидкости объемом 7,5 мкл непосредственно вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце. Проводили анализ зависимости концентрации в плазме от времени в соответствии с некомпартментными методиками, используя программное обеспечение Phoenix WinNonlin 6.3. Регистрировали C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, V<sub>dss</sub>, T<sub>1/2</sub>, AUC(0-last), AUC(0-inf), MRT(0-last), MRT(0-inf) и строили кривые зависимости концентрации в плазме от времени.

На фиг. 2 представлены кривые зависимости концентрации в плазме от времени для BCY13272 при внутривенном введении 5,5 мг/кг мышам CD1 (n=3); объем распределения в равновесном состоянии (V<sub>dss</sub>) для BCY13272 составляет 1,1 л/кг с клиренсом 7,5 мл/мин/кг, что дает в результате конечный период полувыведения 2,9 ч.

#### 5. EphA2/CD137 гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY13272 индуцирует сек-

рецию цитокина IFN- $\gamma$  при проведении анализа в совместной культуре с MC38.

Клетки линии MC38 и HT1080 культивировали в соответствии с рекомендованными протоколами. Замороженные РВМС, полученные от здоровых людей-доноров, оттаивали и промывали один раз при комнатной температуре с помощью PBS с бензоназой и затем ресуспендировали в среде RPMI, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой (FBS), 1х пенициллин/стрептомицин, 10 мМ HEPES и 2 мМ L- глутамин (называемой средой R10). Высевали 100 мкл РВМС (1000000 РВМС/мл) и 100 мкл опухолевых клеток (100000 опухолевых клеток/мл) (отношение эффектор:клетка-мишень (Е:Т) 10:1) в каждой лунке 96-луночного планшета с плоским дном для проведения анализа в совместной культуре. На день 0, добавляли в культуру 100 нг/мл растворимого моноклонального антитела (mAb) против CD3 (клон ОКТ3) для стимуляции РВМС человека. Испытуемые соединения, контрольные соединения или среды в качестве плацебо разбавляли в среде R10, и добавляли 50 мкл в соответствующие лунки с доведением конечного объема лунки до 250 мкл. Планшеты накрывали воздухопроницаемой пленкой и инкубировали в увлажненной камере при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение двух дней. Собирали надосадочные жидкости через 24 и 48 ч после стимуляции и проводили анализ на IFN- $\gamma$  на анализаторе Luminex. Вкратце, стандарты и образцы добавляли в 96-луночный планшет черного цвета. Добавляли и встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре коктейль из микрочастиц (предоставляется в комплекте Luminex, R&D Systems). Планшет промывали 3 раза с использованием магнитного держателя. Затем в планшет добавляли коктейль с биотином и встряхивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали 3 раза с использованием магнитного держателя. Добавляли в планшет коктейль из стрептавидина и встряхивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза с использованием магнитного держателя, ресуспендировали в 100 мкл промывочного буфера, встряхивали в течение 2 мин при комнатной температуре и считывали с помощью анализатора Luminex 2000. Проводили анализ полученных исходных данных с использованием встроенного программного обеспечения Luminex для построения стандартных кривых и интерполяции концентраций белка, все остальные анализы данных и построение графиков проводили с использованием программного обеспечения Excel и Prism. Данные относятся к одному исследованию с тремя независимыми донорскими РВМС, подвергнутых испытанию в двух параллельных экспериментах.

Данные, представленные на фиг. 2 и в табл. 4 ниже, показывают, что BCY13272 индуцирует сильную активацию CD137, что подтверждается секрецией IFN- $\gamma$  и IL-2 после стимуляции CD3. Активация зависит от связывания гетеротандема как с CD137, так и с EphA2, о чем свидетельствует отсутствие активности несвязывающих контрольных соединений BCY12762 и BCY13692, когда связывающие CD137 и EphA2 соответственно включают D-аминокислоту, которая дает в результате несвязывающий аналог.

Таблица 4

Величины EC<sub>50</sub> секреции цитокина IL-2, индуцированной EphA2/CD137 гетеротандемным бициклическим комплексом BCY13272 в анализе совместной культуры человеческие РВМС-MC38/HT-1080

№ комплекса	Клеточная линия	EC <sub>50</sub> (нМ)	N =
BCY13272	MC38	0,79± 0,24	5
BCY13272	HT-1080	0,55± 0,47	4

#### 6. Противоопухолевая активность BCY13272 в модели сингенной опухоли MC38

6 Самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 [мыши B-hTNFRSF9(CD137); Biocytogen] в возрасте 6-8 недель имплантировали подкожно 1×10<sup>6</sup> клеток MC38. Мышей рандомизировали по группам лечения, когда средние объемы опухолей достигали приблизительно 80 мм<sup>3</sup>, и проводили лечение путем внутривенного введения плацебо (25 мМ гистидин, 10% сахароза, pH 7), внутривенного введения 8 мг/кг BCY13272, 0,9 мг/кг BCY13272 и 0,1 мг/кг BCY13272. Все лечебные процедуры проводили с частотой два раза в неделю (BIW) суммарно для 6 доз. Рост опухоли постоянно контролировали вплоть до дня 28 от начала лечения. За животными с полным ответом (n=7) проводили наблюдения вплоть до дня 62 от начала лечения и повторно имплантировали им 2×10<sup>6</sup> опухолевых клеток MC38, и рост опухоли постоянно контролировали в течение 28 дней. Одновременно, наивным соответствующим возрастной группе контрольным мышам линии huCD137 C57Bl/6 (n=5) имплантировали 2×10<sup>6</sup> опухолевых клеток MC38 и проводили наблюдения в течение 28 дней.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 3, на которой можно увидеть, что BCY13272 приводит к значительной противоопухолевой активности с полными ответами, наблюдаемыми при уровнях доз 0,9 мг/кг (2 из 6 полных ответов) и 8 мг/кг (5 из 6 полных ответов) (фиг. 3А). В отличие от наивных соответствующих возрастной группе контрольных мышей линии huCD137 C57Bl/6 (показатель приживления имплантированной опухоли 100%), не обнаруживалось возобновления роста опухоли у животных с полным ответом после лечения с помощью BCY13272 (фигура 3В). Эти данные указывают на то, что BCY13272 обладает значительной противоопухолевой активностью и что лечение с помощью BCY13272 может вызывать иммунологическую память у животных с полным ответом.

#### 7. Связывание BCY13272 с EphA2 и CD137, измеряемое методом поверхностного плазмонного ре-

зонанса (SPR).

(a) CD137.

Проводили эксперименты с использованием анализатора Biacore для определения величин  $k_a$  ( $M^{-1}c^{-1}$ ),  $k_d$  ( $c^{-1}$ ),  $K_D$  (нМ) для гетеротандемных пептидов, связывающихся с человеческим белком CD137. Рекомбинантный человеческий CD137 (R&D systems) ресуспендировали в PBS и биотинилировали, используя реагент EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Fisher) в соответствии с протоколом, предлагаемым фирмой-производителем. Белок обессоливали с удалением несвязанного биотина, используя центрифужные колонки, в PBS.

Для анализа пептидного связывания, использовали прибор Biacore T200 или Biacore 3000 с чипом XanTec CMD500D. Стрептавидин иммобилизировали на чипе, используя стандартные химические реакции сочетания с амином при 25°C с HBS-N (10 мМ HEPES, 0,15 М NaCl, pH 7,4) в качестве подвижного буфера. Вкратце, поверхность карбоксиметилдекстрана активировали с помощью инъекции в течение 7 мин смеси 1:1 0,4 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)- карбодиимида гидрохлорид (EDC)/0,1 М N-гидроксисукцинимид (NHS) при расходе 10 мкл/мин. Для захвата стрептавида, белок разбавляли до 0,2 мг/мл в 10 мМ ацетате натрия (pH 4,5) и захватывали путем инъекции 120 мкл на активированную поверхность чипа. Остаточные активированные группы блокировали путем инъекции в течение 7 мин 1 М этаноламина (pH 8,5), и биотинилированный CD137 захватывали до уровня 270-1500 RU (резонансных единиц). Буфер заменяли на PBS/0,05% Tween 20, и приготавливали последовательные разбавления пептидов в этом буфере с конечной концентрацией DMSO 0,5%. Наивысшая концентрация пептида составляла 500 нМ с 6 дополнительными 2-кратными или 3-кратными разбавлениями. Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) проводили при 25°C при расходе 90 мкл/мин с ассоциацией 60 секунд и диссоциацией 900 с. После каждого цикла использовали стадию регенерации (10 мкл 10 мМ глицина pH 2). В случае необходимости, проводили коррекцию данных с учетом эффектов исключенного объема DMSO. Все данные дважды сверяли с холостыми инъекциями и референсной поверхностью с использованием стандартных методик обработки, и проводили обработку данных и аппроксимацию кинетических данных, используя программное обеспечение Scrubber software, version 2.0c (BioLogic Software). Данные аппроксимировали, используя модель простого связывания 1:1, допускающую, в соответствующих случаях, эффекты массопереноса.

(b) EphA2.

Проводили эксперименты с использованием анализатора Biacore для определения величин  $k_a$  ( $M^{-1}c^{-1}$ ),  $k_d$  ( $c^{-1}$ ),  $K_D$  (нМ) для связывания BCY13272 с человеческим белком EphA2.

EphA2 биотинилировали с помощью EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC- Biotin в течение 1 ч в 4 мМ ацетата натрия, 100 мМ NaCl, pH 5,4 при 3х молярном избытке биотина по отношению к белку. Степень введения метки определяли с помощью набора для количественного определения биотина флуоресцентным методом Fluorescence Biotin Quantification Kit (Thermo) после диализа реакционной смеси в PBS. Для анализа пептидного связывания, использовали прибор Biacore T200 с чипом XanTec CMD500D. Стрептавидин иммобилизировали на чипе, используя стандартные химические реакции сочетания с амином при 25°C с HBS-N (10 мМ HEPES, 0,15 М NaCl, pH 7,4) в качестве подвижного буфера. Вкратце, поверхность карбоксиметилдекстрана активировали с помощью инъекции в течение 7 мин смеси 1:1 0,4 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид (EDC)/0,1 М N-гидроксисукцинимид (NHS) при расходе 10 мкл/мин. Для захвата стрептавида, белок разбавляли до 0,2 мг/мл в 10 мМ ацетате натрия (pH 4,5) и захватывали путем инъекции 120 мкл на активированную поверхность чипа. Остаточные активированные группы блокировали путем инъекции в течение 7 мин смеси 1 М этаноламина (pH 8,5):HBS-N (1:1). Буфер заменяли на PBS/0,05% Tween 20, и биотинилированный EphA2 захватывали до уровня 500-1500 RU, используя разбавление белка до 0,2 мкМ в буфере. Приготавливали последовательные разбавления пептидов в этом буфере с конечной концентрацией DMSO 0,5%, наивысшая концентрация пептида составляла 50 или 100 нМ с 6 дополнительными 2-кратными разбавлениями. Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) проводили при 25°C при расходе 90 мкл/мин с ассоциацией 60 с и диссоциацией 900-1200 секунд. Проводили коррекцию данных с учетом эффектов исключенного объема DMSO. Все данные дважды сверяли с холостыми инъекциями и референсной поверхностью с использованием стандартных методик обработки, и проводили обработку данных и аппроксимацию кинетических данных, используя программное обеспечение Scrubber software, version 2.0c (BioLogic Software). Данные аппроксимировали, используя модель простого связывания 1:1, допускающую, в соответствующих случаях, эффекты массопереноса.

На фиг. 5А представлена сенсограмма, которая показывает, что BCY13272 связывается с EphA2 (человека) с аффинностью 2,0 нМ. На фиг. 5В представлена сенсограмма, которая показывает, что BCY13272 связывается с CD137 (человека) с высокой аффинностью. Вследствие присутствия в BCY13272 двух CD137 связывающих бициклов, скорость диссоциации из иммобилизованного белка CD137 является очень медленной, и приведенная величина  $K_D$  может быть завышенной (фиг. 4В).



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, включающий:

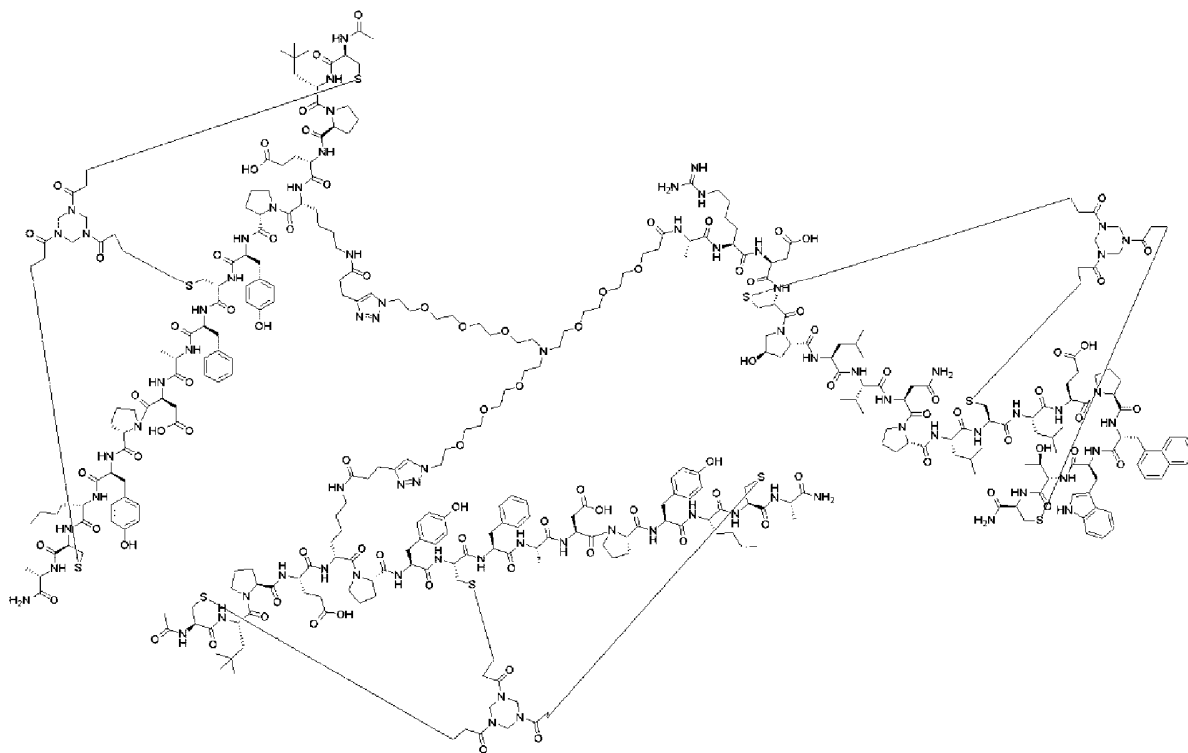
(a) первый пептидный лиганд, который связывается с EphA2 и который имеет последовательность A-[HArg]-D-C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[d1Nal]WTC<sub>iii</sub> (SEQ ID NO:1; BCY13118), конъюгированный через линкер N-(кислота-PEG<sub>3</sub>)-N-бис(PEG<sub>3</sub>-азид) с

(b) вторыми пептидными лигандами, которые связываются с CD137, оба из которых имеют последовательность Ac-C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub>-A (SEQ ID NO: 2; BCY8928),

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

где Ac представляет ацетил, HArg представляет гомоаргинин, HyP представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, d1Nal представляет D-1-нафтилаланин, tBuAla представляет третбутил-аланин, PYA представляет 4-пентиновую кислоту и Nle представляет норлейцин.

2. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п.1, который представляет собой BCY13272:



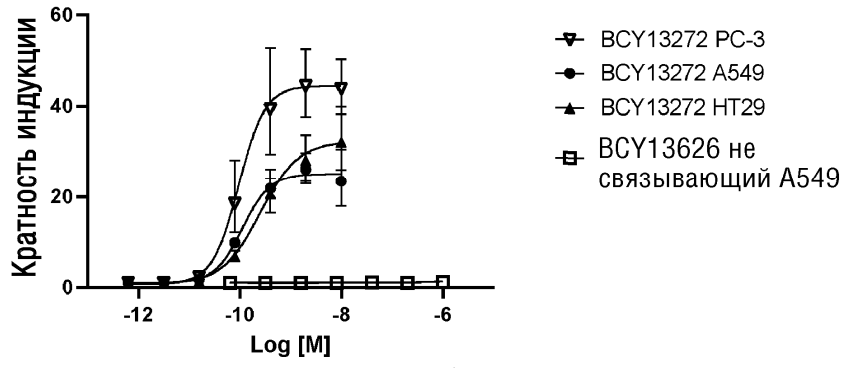
## BCY13272

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

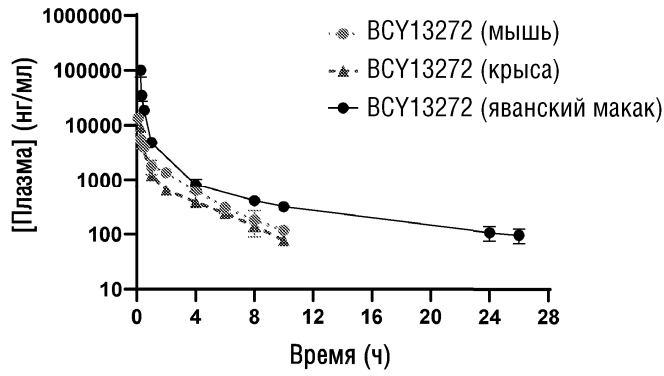
4. Фармацевтическая композиция, которая включает гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп.1-3 в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

5. Применение гетеротандемного бициклического пептидного комплекса по любому одному из пп.1-3 для предотвращения, подавления или лечения рака.

6. Способ лечения рака, который включает введение гетеротандемного бициклического пептидного комплекса по любому одному из пп.1-3 при частоте дозирования, при которой не поддерживаются концентрации указанного комплекса в плазме выше величины *in vitro* EC<sub>50</sub> для указанного комплекса.

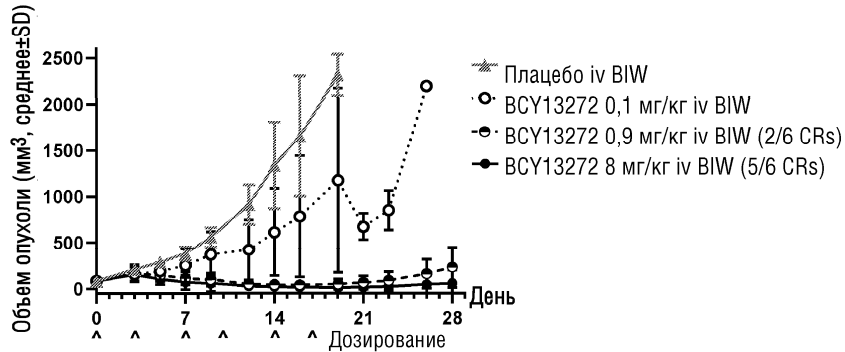


Фиг. 1

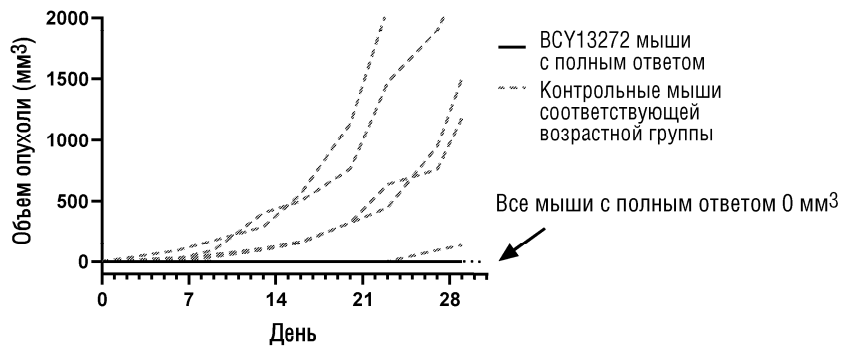


Фиг. 2

A

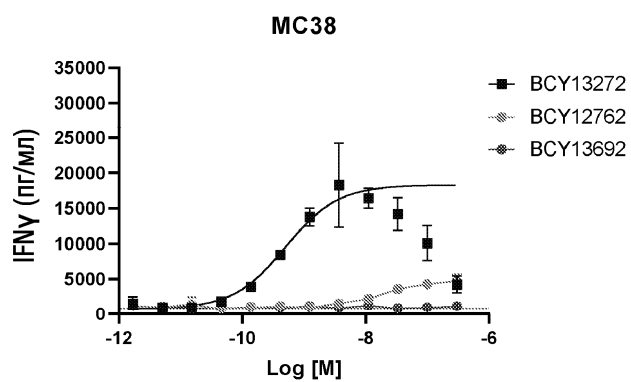


B

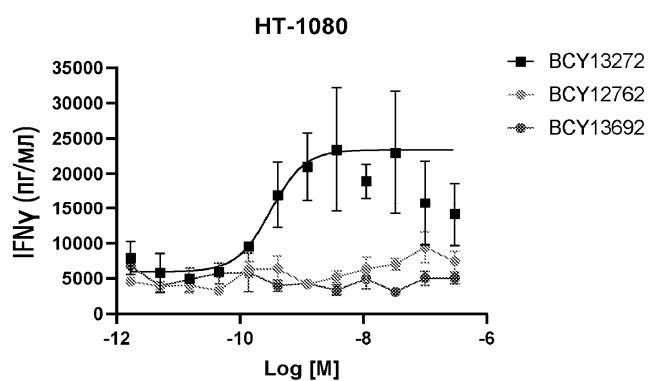


Фиг. 3

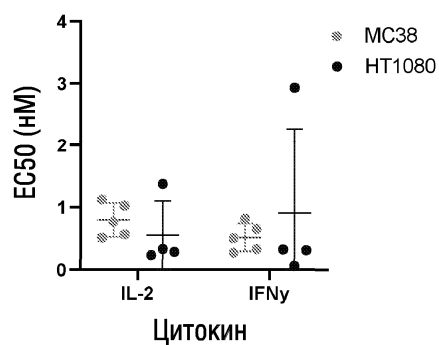
A



B

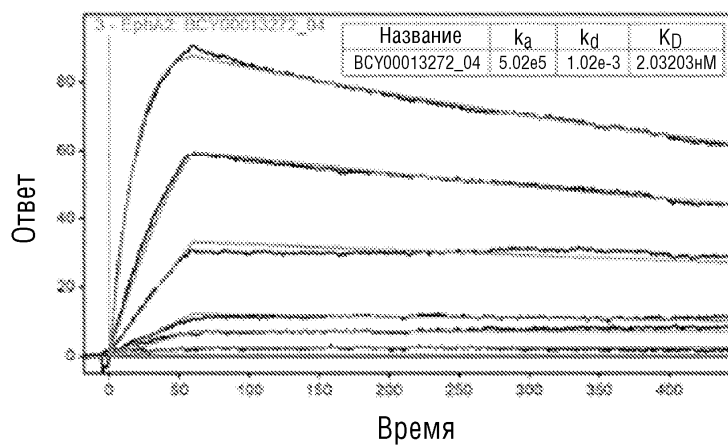


C

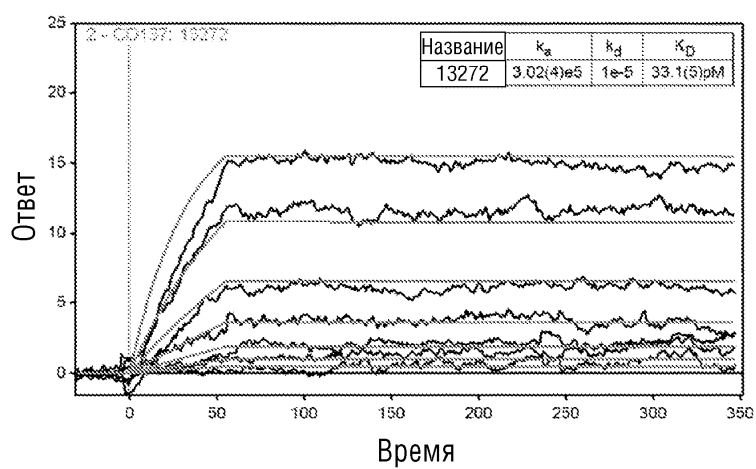


Фиг. 4

А



В



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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