

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046810**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.24

(21) Номер заявки
202191651

(22) Дата подачи заявки
2019.12.13

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)

(54) **БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К МТ1-ММР**

(31) **1820288.7**

(32) **2018.12.13**

(33) **GB**

(43) **2021.09.13**

(86) **PCT/GB2019/053537**

(87) **WO 2020/120981 2020.06.18**

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

(72) Изобретатель:
**Стейс Кэтрин, Тьюфел Дэниел, Уокер
Эдвард (GB)**

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

(56) **WO-A1-2016067035**
WO-A1-2018127699

(57) Изобретение относится к полипептидам, ковалентно связанным с неароматическими молекулярными каркасами, так что между точками прикрепления к каркасу расположены две или более пептидные петли. В частности, в изобретении описаны пептиды, способные с высокой аффинностью связываться с мембранной металлопротеазой типа 1 (MT1-ММР), например, с коллаген-связывающим участком МТ1-ММР. В изобретении также описаны лекарственные конъюгаты, содержащие указанные пептиды, конъюгированные с одной или более эффекторными и/или функциональными группами, которые можно использовать для визуализации и направленной терапии рака.

B1

046810

046810
B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к полипептидам, ковалентно связанным с неароматическими молекулярными каркасами, так что между точками прикрепления к каркасу расположены две или более пептидные петли. В частности, в изобретении описаны пептиды, способные с высокой аффинностью связываться с мембранной металлопротеазой типа 1 (MT1-MMP), например, с коллаген-связывающим участком MT1-MMP. В изобретении также описаны лекарственные конъюгаты, содержащие указанные пептиды, конъюгированные с одной или более эффекторными и/или функциональными группами, которые можно использовать для визуализации и направленной терапии рака.

Уровень техники

Циклические пептиды способны связываться с белками-мишенями с высокой аффинностью и специфичностью и, следовательно, представляют собой перспективный класс молекул для разработки терапевтических средств. Фактически несколько циклических пептидов уже успешно используются в клинике, например, противобактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессант циклоспорин или противораковый препарат октреотид (Driggers et al. (2008), *Nat. Rev. Drug. Discov.* 7(7), 608-24). Хорошие связывающие свойства обуславливаются относительно большой поверхностью взаимодействия между пептидом и мишенью, а также пониженной конформационной гибкостью циклических структур. Обычно макроциклы связываются с поверхностями площадью в несколько сотен квадратных ангстрем, как, например, антагонист CVX15 циклического пептида CXCR4 (400 \AA^2 ; Wu et al. (2007), *Science*, 330, 1066-71), циклический пептид с мотивом Arg-Gly-Asp, связывающийся с интегрином $\alpha V\beta 3$ (355 \AA^2) (Xiong et al. (2002), *Science*, 296(5565), 151-5), или циклический пептидный ингибитор упаин-1, связывающийся с активатором плазминогена урокиназного типа (603 \AA^2 ; Zhao et al. (2007), *J. Struct. Biol.* 160(1), 1-10).

Вследствие циклической конфигурации пептидные макроциклы менее гибки, чем линейные пептиды, что обуславливает уменьшение потери энтропии при связывании с мишенями и более высокое сродство связывания. Пониженная гибкость также приводит к фиксации специфичных для мишени конформаций, повышая специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Данный эффект можно проиллюстрировать на примере мощного и селективного ингибитора матриксной металлопротеиназы 8 (MMP-8), который теряет избирательность по сравнению с другими MMP после раскрытия цикла (Cherney et al. (1998), *J. Med. Chem.* 41(11), 1749-51). Благоприятные связывающие свойства, достигаемые за счет макроциклизации, еще более выражены у полициклических пептидов, содержащих более одного пептидного кольца, таких как, например, ванкомицин, низин и актиномицин.

Разные исследовательские группы ранее присоединяли полипептиды, содержащие остатки цистеина, к синтетической молекулярной структуре (Kemp and McNamara (1985), *J. Org. Chem.*; Timmerman et al. (2005), *ChemBioChem*). Melloe и соавторы использовали трис-(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной циклизации множества пептидных петель на синтетических каркасах с целью структурной имитации белковых поверхностей (Timmerman et al. (2005), *ChemBioChem*). Способы получения лекарственных соединений-кандидатов, в которых указанные соединения получают путем присоединения цистеинсодержащих полипептидов к молекулярному каркасу, такому как, например, ТАТА (1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он, Heinis et al. *Angew Chem., Int. Ed.*, 2014; 53:1602-1606).

Комбинаторные подходы с использованием фаговых дисплеев разработаны для получения и скрининга больших библиотек бициклических пептидов с целью выявления представляющих интерес мишеней (Heinis et al. (2009), *Nat. Chem. Biol.* 5(7), 502-7 и WO 2009/098450). Вкратце, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащих три остатка цистеина и два участка из шести произвольных аминокислот (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys), представляют на фаге и подвергают циклизации путем ковалентного связывания боковых цепей цистеина к небольшой молекуле (трис-(бромметил)бензолу).

Сущность изобретения

Согласно первому аспекту изобретение относится к пептидному лиганду, специфичному к коллаген-связывающему участку MT1-MMP, в состав которого входит полипептид, содержащий по меньшей мере три остатка цистеина, разделенных по меньшей мере двумя петлеобразными последовательностями, и неароматический молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с остатками цистеина полипептида с получением по меньшей мере двух полипептидных петель на молекулярном каркасе.

В соответствии с другим аспектом изобретение относится к лекарственному конъюгату, содержащему описанный здесь пептидный лиганд, конъюгированный с одной или более эффекторными и/или функциональными группами.

В соответствии со следующим аспектом изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей описанный здесь пептидный лиганд или лекарственный конъюгат, в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В соответствии с другим аспектом изобретение относится к описанному здесь пептидному лиганду или лекарственному конъюгату для профилактики, подавления или лечения заболевания или расстройства, опосредованного MT1-MMP.

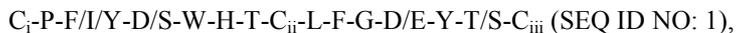
Подробное описание изобретения

В одном варианте осуществления указанные петлеобразные последовательности содержат шесть

аминокислот.

В другом варианте осуществления указанные петлеобразные последовательности содержат три остатка цистеина, разделенные двумя петлеобразными последовательностями, каждая из которых состоит из шести аминокислот.

В одном варианте осуществления пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:



где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина соответственно или их фармацевтически приемлемые соли.

В одном варианте осуществления пептидный лиганд $C_i\text{-P-F/I/Y-D/S-W-H-T-C}_{ii}\text{-L-F-G-D/E-Y-T/S-C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 1) выбран из:

CPYSWETCLFGDYRC (SEQ ID NO: 2);
 CPFDWHTCLFGDYTC (SEQ ID NO: 3);
 CPFDWHTCLFGEYSC (SEQ ID NO: 4);
 CPIDWHTCLFGDYTC (SEQ ID NO: 5);
 CPFSWHTCLFGEYSC (SEQ ID NO: 6);
 CPFSWHTCLFGDYTC (SEQ ID NO: 7);
 CPISWHTCLFGDYSC (SEQ ID NO: 8);
 CPYSWHTCLFGDYSC (SEQ ID NO: 9).

В другом варианте осуществления пептидный лиганд $C_i\text{-P-F/I/Y-D/S-W-H-T-C}_{ii}\text{-L-F-G-D/E-Y-T/S-C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 1) выбран из:

A-(SEQ ID NO: 2)-A (BCY1026);
 A-(SEQ ID NO: 3)-A (BCY1057);
 A-(SEQ ID NO: 4)-A (BCY1065);
 A-(SEQ ID NO: 5)-A (BCY1067);
 A-(SEQ ID NO: 6)-A (BCY1073);
 A-(SEQ ID NO: 7)-A (BCY1074);
 A-(SEQ ID NO: 8)-A (BCY1075);
 A-(SEQ ID NO: 9)-A (BCY1076).

В одном варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой TATA, а пептидный лиганд $C_i\text{-P-F/I/Y-D/S-W-H-T-C}_{ii}\text{-L-F-G-D/E-Y-T/S-C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 1) выбран из:

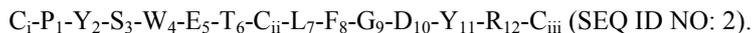
A-(SEQ ID NO: 2)-A (BCY1026);
 A-(SEQ ID NO: 3)-A (BCY1057);
 A-(SEQ ID NO: 4)-A (BCY1065);
 A-(SEQ ID NO: 5)-A (BCY1067);
 A-(SEQ ID NO: 6)-A (BCY1073);
 A-(SEQ ID NO: 7)-A (BCY1074);
 A-(SEQ ID NO: 8)-A (BCY1075);
 A-(SEQ ID NO: 9)-A (BCY1076).

Если не указано иное, все используемые здесь технические и научные термины имеют обычные значения, известные специалистам в данной области, например в области химии пептидов, клеточных культур и фаговых дисплеев, химии нуклеиновых кислот и биохимии. Используют стандартные методы молекулярной биологии, генетики и биохимии (см. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999), 4th ed., John Wiley & Sons, Inc.), которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Номенклатура.

Нумерация.

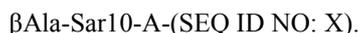
При упоминании положений аминокислотных остатков в пептидах по настоящему изобретению остаток цистеина (C_i , C_{ii} и C_{iii}) не включают в нумерацию, поскольку они являются инвариантными, поэтому нумерацию аминокислотных остатков в пептидах по настоящему изобретению осуществляют следующим образом:



В целях настоящего изобретения принимают, что все бициклические пептиды циклизованы 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипропан-1-оном (TATA) с получением тризамещенной структуры. Циклизацию с участием TATA проводят по C_i , C_{ii} и C_{iii} .

Молекулярный формат.

N- или C-концевые удлинения последовательности бициклического ядра добавляют к левой или правой стороне последовательности и отделяют дефисом. Например, N-концевой хвост $\beta\text{Ala-Sar10-Ala}$ обозначают следующим образом:



Инверсированные пептидные последовательности.

Информация, приведенная в Naig et al. (2003), J. Immunol. 170(3), 1362-1373, позволяет предположить, что описанные здесь пептидные последовательности также найдут применение в их ретроинверсированной форме. Например, используют обратную последовательность (т.е. N-конец становится C-концом, и наоборот), стереохимия которой также меняется на противоположную (т.е. D-аминокислоты становятся L-аминокислотами, и наоборот).

Пептидные лиганды.

Пептидный лиганд, в соответствии с настоящим описанием, относится к пептиду, ковалентно связанному с молекулярным каркасом. Как правило, такие пептиды содержат две или более реакционноспособные группы (таких как остатки цистеина), которые способны образовывать ковалентные связи с каркасом, и последовательность между указанными реакционноспособными группами, которая называется петлеобразной последовательностью, поскольку она образует петлю, когда пептид связывается с каркасом. В данном случае пептиды содержат по меньшей мере три остатка цистеина (обозначаемые здесь как C_i, C_{ii} и C_{iii}) и образуют по меньшей мере две петли на каркасе.

Преимущества пептидных лигандов.

Некоторые бициклические пептиды по настоящему изобретению обладают рядом полезных свойств, которые позволяют считать их лекарственными молекулами, подходящими для инъекционного, ингаляционного, назального, окулярного, перорального или местного введения. К таким полезным свойствам относятся.

Межвидовая перекрестная реактивность. Некоторые лиганды демонстрируют перекрестную реактивность в отношении РВР разных видов бактерий и, следовательно, могут использоваться для лечения инфекций, вызванных несколькими видами бактерий. Другие лиганды могут быть высокоспецифичными к РВР определенных видов бактерий, что может быть полезно для лечения инфекции без побочного ущерба для полезной флоры пациента;

Протеазная стабильность. Бициклические пептидные лиганды должны в идеале демонстрировать устойчивость к действию плазматических протеаз, эпителиальных ("заякоренных в мембране") протеаз, протеаз желудка и кишечника, протеаз поверхности легких, внутриклеточных протеаз и т.п. Протеазная стабильность должна поддерживаться среди разных видов, чтобы основной бициклический кандидат можно было разрабатывать на животных моделях, а также с уверенностью вводить людям;

Желаемый профиль растворимости. Растворимость зависит от отношения заряженных и гидрофильных остатков к гидрофобным остаткам и числа внутри/межмолекулярных водородных связей, она является параметром, важным для получения композиций и достижения абсорбции;

Оптимальный период полужизни в плазме кровотока. В зависимости от клинических показаний и схемы лечения может потребоваться разработка бициклического пептида для кратковременного воздействия в условиях лечения острого заболевания, или разработка бициклического пептида с повышенным временем удержания в кровотоке, который является оптимальным для лечения хронических болезненных состояний. Другими факторами, определяющими желаемый период полужизни в плазме, являются требования длительного воздействия для обеспечения максимальной терапевтической эффективности по сравнению с сопутствующей токсикологией вследствие длительного воздействия средства; и

Селективность. Некоторые пептидные лиганды по настоящему изобретению демонстрируют селективность в отношении МТ1-ММР, но не способны перекрестно взаимодействовать с такими изоформами ММР, как ММР-1, ММР-2, ММР-15 и ММР-16.

Фармацевтически приемлемые соли.

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

Соли по настоящему изобретению можно синтезировать из исходного соединения, содержащего основной или кислотный фрагмент, с помощью обычных химических методов, таких как методы, описанные в Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, твердый переплет, 388 страниц, август 2002 г. Обычно такие соли получают путем взаимодействия свободных кислотных или основных форм указанных соединений с подходящим основанием или подходящей кислотой в воде или в органическом растворителе, или в их смеси.

Кислотно-аддитивные соли (моно- или дисоли) можно получить с использованием широкого ряда кислот, как неорганических, так и органических. Примеры кислотно-аддитивных солей включают моно- или дисоли, полученные с использованием кислоты, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацетамидобензойной, бутановой, (+)-камфорной, камфоросульфоновой, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламиновой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, фумаровой, галактарной, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой кислоты), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α-оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, галогеноводородной кислоты (например, бромистоводородной, хлористоводородной, йодистоводородной), изетионовой, молочной (например, (+)-L-молочной,

(±)-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, (±)-DL-миндальной, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, щавелевой, пальмитиновой, паноиновой, фосфорной, пропионовой, пировиноградной, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-аминосалициловой себаценовой, 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, полученных из уксусной, соляной, 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. Конкретная соль представляет собой гидрохлорид. Другой конкретной солью является ацетат.

Если соединение является анионным или содержит функциональную группу, которая может быть анионной (например, -COOH может превращаться в -COO⁻), то можно получить соль, образованную органическим или неорганическим основанием, генерирующим подходящий катион. Примеры подходящих неорганических катионов включают, без ограничения, ионы щелочных металлов, такие как Li⁺, Na⁺ и K⁺, катионы щелочноземельных металлов, такие как Ca²⁺ и Mg²⁺, и другие катионы, такие как Al³⁺ или Zn⁺. Примеры подходящих органических катионов включают, без ограничения, ион аммония (т.е. NH₄⁺) и замещенные ионы аммония (например, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются ионы, полученные из метиламина, этиламина, диэтиламина, пропиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также из аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером обычного иона четвертичного аммония является N(CH₃)₄⁺.

Если пептиды по настоящему изобретению содержат аминокгруппу, они могут образовывать соли четвертичного аммония, например, в результате взаимодействия с алкилирующим средством по способам, хорошо известным специалисту в данной области. Такие соединения четвертичного аммония входят в объем пептидов по настоящему изобретению.

Модифицированные производные.

Следует понимать, что определенные здесь модифицированные производные пептидных лигандов входят в объем настоящего изобретения. Примеры таких подходящих модифицированных производных включают в себя одну или более модификаций, выбранных из N-концевых и/или C-концевых модификаций; замены одного или более аминокислотных остатков одним или более неприродными аминокислотными остатками (например, 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; изменения длины пептидного остова; замещения водорода на альфа-углероде одного или более аминокислотных остатков другой химической группой, модификации аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат/аспартат и тирозин, подходящими аминами, тиолами, карбоновой кислотой и реагентами, взаимодействующими с фенолом, с целью функционализации указанных аминокислот, а также введения или замены аминокислот с достижением ортогональных реакционных свойств, обеспечивающих функционализацию, например, аминокислот, несущих азидные или алкиновые группы, которые делают возможной функционализацию алкиновыми или содержащими азид фрагментами соответственно.

В одном варианте осуществления модифицированное производное содержит модификацию на N-конце и/или C-конце. В другом варианте осуществления модифицированное производное получают путем N-концевой модификации с использованием подходящих реагентов, взаимодействующих с аминокгруппой, и/или C-концевой модификации с использованием подходящих реагентов, взаимодействующих с карбоксигруппой. В другом варианте осуществления указанные N-концевая или C-концевая модификация включают добавление эффекторной группы, неограничиваемыми примерами которой являются цитотоксическое средство, радиохелатор или хромофор.

В другом варианте осуществления модифицированное производное содержит N-концевую модификацию. В другом варианте осуществления N-концевая модификация включает введение N-концевой ацетильной группы. В данном варианте осуществления N-концевую цистеиновую группу (обозначаемую здесь как C₁) кэпируют уксусным ангидридом или другими подходящими реагентами во время пептидного синтеза с получением молекулы, ацетилированной по N-концу. Преимуществами данного варианта осуществления являются удаление потенциального участка распознавания аминокпептидазами и избежа-

ние возможной деградации бициклического пептида.

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

В другом варианте осуществления модифицированное производное содержит C-концевую модификацию. В другом варианте осуществления C-концевая модификация включает в себя введение амидной группы. В данном варианте осуществления C-концевую цистеиновую группу (обозначаемую здесь C_{iii}) присоединяют во время пептидного синтеза в виде амида с получением молекулы, амидированной по C-концу. Преимущество данного варианта осуществления заключается в удалении потенциального участка распознавания карбоксипептидазой и снижении возможности протеолитической деградации бициклического пептида.

В одном варианте осуществления модифицированное производное содержит замену одного или более аминокислотных остатков одним или более неприродными аминокислотными остатками. В этом варианте осуществления могут быть выбраны неприродные аминокислоты, содержащие изостерические/изоэлектронные боковые цепи, которые не распознаются деградирующими протеазами и не оказывают какого-либо неблагоприятного воздействия на активность в отношении мишени.

Альтернативно, можно использовать неприродные аминокислоты, содержащие пространственно ограниченные боковые цепи, обеспечивающие конформационные и стерические затруднения для протеолитического гидролиза соседней пептидной связи. В частности, в качестве таких аминокислот можно использовать аналоги пролина, аминокислоты с объемными боковыми цепями, C-дизамещенные производные (такие как аминокислота Aib) и циклоаминокислоты, простое производное представляет собой аминоклопропилкарбовую кислоту.

В одном варианте осуществления модифицированное производное получают путем добавления спейсерной группы. В другом варианте осуществления модифицированное производное получают путем добавления спейсерной группы к N-концевому цистеину (C_i) и/или C-концевому цистеину (C_{iii}).

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 одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более заряженных аминокислотных остатков одним или более гидрофобными аминокислотными остатками. В альтернативном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более гидрофобных аминокислотных остатков одним или более заряженными аминокислотными остатками. Правильный баланс заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков является важной характеристикой бициклических пептидных лигандов. Например, гидрофобные аминокислотные остатки влияют на степень связывания плазматических белков и, следовательно, на концентрацию свободной доступной фракции в плазме, тогда как заряженные аминокислотные остатки (в частности, аргинин) могут влиять на взаимодействие пептида с фосфолипидными мембранами на поверхности клеток. Сочетание двух указанных видов аминокислот может влиять на период полувыведения, объем распределения и экспозицию пептидного лекарственного средства и может быть оптимизировано в соответствии с клиническим результатом. Кроме того, правильное сочетание заряженных аминокислотных остатков и гидрофобных аминокислотных остатков и их число может уменьшить раздражение в месте инъекции (если пептидный препарат вводят подкожно).

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает замену одного или более остатков L-аминокислот одним или более остатками D-аминокислот. Считается, что этот вариант осуществления позволяет увеличивать протеолитическую стабильность за счет стерических затруднений и за счет способности D-аминокислот стабилизировать конформации β-изгибов (Tugyi et al. (2005), PNAS, 102(2), 413-418).

В одном варианте модифицированное производное получают путем удаления любых аминокислотных остатков и замену их на остатки аланина. Преимуществом этого варианта осуществления является удаление потенциального сайта (сайтов) протеолитической атаки.

Следует отметить, что каждую из вышеупомянутых модификаций преднамеренно осуществляют для повышения активности или стабильности пептида. Дальнейшего, обусловленного модификациями, повышения активности можно достичь с помощью следующих механизмов:

введение гидрофобных фрагментов, гидрофобность которых приводит к снижению скоростей диссоциации и, как следствие, к повышению сродства;

введение заряженных групп, которые характеризуются ионными взаимодействиями дальнего действия, приводящими к повышению скоростей ассоциации и, следовательно, сродства (см., например, Schreiber et al., Rapid, electrostatically assisted association of proteins (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31); и

введение в пептид дополнительного пространственного ограничения, например, путем надлежащего пространственного ограничения боковых цепей аминокислот, чтобы потеря энтропии была минимальной при связывании с мишенью, пространственного ограничения торсионных углов основной цепи так, чтобы потеря энтропии была минимальной при связывании с мишенью, и введение дополнительных

циклизаций в молекулу по идентичным причинам,

(обзоры можно найти в Gentilucci et al., *Curr. Pharmaceutical Design* (2010), 16, 3185-203, и Nestor et al., *Curr. Medicinal Chem* (2009), 16, 4399-418).

Изотопные варианты.

Настоящее изобретение включает все фармацевтически приемлемые (радио)изотопно меченые пептидные лиганды по настоящему изобретению, в которых один или более атомов заменены атомами, имеющими такой же атомный номер, но атомную массу или массовое число, отличные от атомной массы или массового числа изотопа, обычно встречающегося в природе, а также пептидные лиганды по настоящему изобретению, к которым присоединены металлохелатирующие группы (называемые "эффекторными"), которые способны удерживать релевантные (радио)изотопы, и пептидные лиганды по настоящему изобретению, в которых определенные функциональные группы ковалентно замещены соответствующими (радио)изотопами или функциональными группами, мечеными изотопами.

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

Некоторые изотопно меченые пептидные лиганды по настоящему изобретению, например, содержащие радиоактивный изотоп, можно использовать для исследования распределения лекарственных средств и/или субстратов в тканях. Пептидные лиганды по настоящему изобретению могут дополнительно обладать ценными диагностическими свойствами, благодаря которым их можно использовать для детекции или идентификации образования комплекса между меченым соединением и другими молекулами, такими как пептиды, белки, ферменты или рецепторы. В методах детекции или идентификации можно использовать соединения, меченные такими средствами, как радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества (например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин и люцифераза) и др. Особенно широко используют такие радиоактивные изотопы, как тритий, т.е. ^3H (T), и углерод-14, т.е. ^{14}C , вследствие простоты их введения и детекции.

Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, например ^2H (D), может дать определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например увеличенным периодом полужизни *in vivo* или возможностью использования более низких доз, и, следовательно, может быть предпочтительным в некоторых обстоятельствах.

Замещение изотопами, излучающими позитроны, такими как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , можно использовать для изучения занятости мишени методом позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ).

Меченные изотопами соединения пептидных лигандов по настоящему изобретению, как правило, можно получить с помощью традиционных способов, известных специалистам в данной области, или способов, аналогичных описанным в прилагаемых примерах, с использованием меченного соответствующим изотопом реагента вместо ранее используемого немеченного реагента.

Неароматический молекулярный каркас.

Ссылки в данном документе на термин "неароматический молекулярный каркас" относятся к любому молекулярному каркасу, определенному здесь, который не содержит ароматический (т.е. ненасыщенный) карбоциклический или гетероциклический фрагмент.

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

Как отмечено в вышеуказанных документах, молекулярный каркас может представлять собой небольшую молекулу, такую как небольшая органическая молекула.

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

В одном варианте осуществления молекулярный каркас содержит реактивные группы, способные взаимодействовать с функциональной группой (группами) полипептида с образованием ковалентных связей.

Молекулярный каркас может содержать химические группы, способные образовывать связи с пептидом, такие как амины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, нитрилы, карбоновые кислоты, сложные эфиры, алкены, алкины, азиды, ангидриды, сукцинимиды, малеимиды, алкилгалогениды и ацилгалогениды.

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

Эффекторные и функциональные группы.

В соответствии с другим аспектом изобретение относится к лекарственному конъюгату, содержащему определенный здесь пептидный лиганд, конъюгированный с одной или более эффекторными и/или функциональными группами.

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

Соответствующие эффекторные группы включают антитела и их части или фрагменты. Например, эффекторная группа может содержать константный участок легкой цепи (C_L) антитела, домен C_{H1} тяжелой цепи антитела, домен C_{H2} тяжелой цепи антитела, домен C_{H3} тяжелой цепи антитела или любое их сочетание в дополнение к одному или нескольким доменам константного участка. Эффекторная группа может также содержать шарнирный участок антитела (такой участок обычно находится между доменами C_{H1} и C_{H2} молекулы IgG).

В следующем варианте осуществления этого аспекта изобретения эффекторная группа согласно настоящему изобретению представляет собой Fc-участок молекулы IgG. Предпочтительно пептидная лиганд-эффекторная группа согласно настоящему изобретению содержит или включает гибридный пептидный лиганд-Fc, имеющий период полужизни $t_{1/2}$ 1 день или более, 2 дня или более, 3 дня или более, 4 дня или более, 5 дней или более, 6 дней или более или 7 дней или более. Наиболее предпочтительно пептидный лиганд согласно настоящему изобретению включает или содержит гибридный пептидный лиганд-Fc, имеющий период полужизни $t_{1/2}$ 1 день или более.

Функциональные группы включают, как правило, связывающие группы, лекарственные средства, реактивные группы для присоединения других фрагментов, функциональные группы, которые способствуют захвату макроциклических пептидов клетками и т.п.

Способность пептидов проникать в клетки позволяет пептидам действовать против внутриклеточных мишеней. Мишени, на которые могут быть направлены пептиды, способные проникать в клетки, включают факторы транскрипции, внутриклеточные сигнальные молекулы, такие как тирозинкиназы, и молекулы, участвующие в пути апоптоза. Функциональные группы, обеспечивающие проникновение в клетки, включают пептиды или химические группы, присоединенные либо к пептиду, либо к молекулярному каркасу. Можно использовать такие пептиды, как производные, например VP22, HIV-Tat, гомеобоксного белка *Drosophila* (*Antennapedia*), например, как описано в Chen and Harrison, *Biochemical Society Transactions* (2007), Volume 35, part 4, p. 821; Gupta et al. in *Advanced Drug Discovery Reviews* (2004) Volume 57, 9637. Примеры коротких пептидов, которые, как было показано, эффективно переносятся через плазматические мембраны, включают пептид пенетратин из белка *Antennapedia Drosophila* (Derossi et al. (1994), *J. Biol. Chem.* Volume 269, p. 10444), содержащий 16 аминокислот, "модель амфипатического пептида" (Oehlke et al. (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, Volume 1414, p. 127), содержащую 18 аминокислот, и богатые аргинином участки белка ТАТ ВИЧ. Непептидные подходы включают использование низкомолекулярных имитаторов или SMOС, которые можно легко присоединять к биомолекулам (Okuyama et al. (2007), *Nature Methods*, Volume 4, p. 153). Другие химические стратегии, заключающиеся в добавлении гуанидиниевых групп к молекулам, также увеличивают проникновение в клетки (Elson-Scwab et al. (2007), *J. Biol. Chem.* Volume 282, p. 13585). Молекулы с низкой молекулярной массой, такие как стероиды, можно присоединить к молекулярному каркасу для увеличения поглощения клетками.

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

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

В одном конкретном варианте осуществления изобретения функциональная группа выбрана из хелатора металлов, способного образовывать комплексы с радиоизотопами металлов, используемыми в медицине.

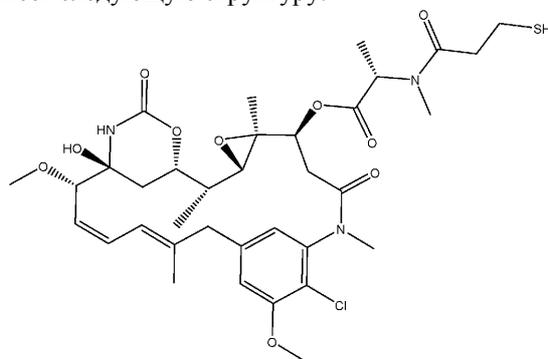
Возможные эффекторные группы также включают ферменты, например, такие как карбоксипептидаза G2, для использования в ферментной/пролекарственной терапии, где пептидный лиганд заменяет антитела в ADEPT.

В одном конкретном варианте осуществления изобретения функциональная группа выбрана из лекарственного средства, такого как цитотоксическое средство для лечения рака. Подходящие примеры включают алкилирующие средства, такие как цисплатин и карбоплатин, а также оксалиплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, ифосфамид; антиметаболиты, такие как аналоги пурина, азатиоприн и меркаптопурин, или аналоги пиримидина; растительные алкалоиды и терпеноиды, включающие в себя алкалоиды барвинка, такие как винкристин, винбластин, винорелбин и виндезин; подофиллотоксин и его производные этопозид и тенипозид; таксаны, такие как паклитаксел, первоначально

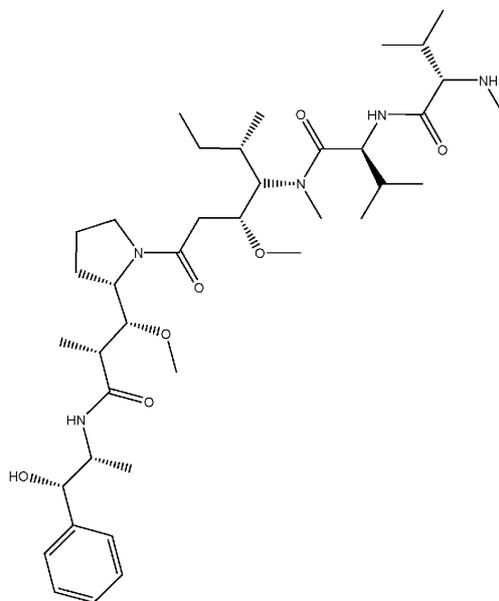
известный как таксол; ингибиторы топоизомеразы, такие как камптотецины: иринотекан и топотекан, и ингибиторы типа II, такие как амсакрин, этопозид, этопозида фосфат и тенипозид. Другие средства могут включать в себя противоопухолевые антибиотики, такие как иммунодепрессант дактиномицин (который используется при трансплантации почек), доксорубин, эпирубин, блеомицин, калихемицины и др.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения цитотоксическое средство выбрано из майтансиноидов (таких как DM1) или монометилауристатинов (таких как MMAE).

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



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



В следующем конкретном варианте осуществления изобретения цитотоксическое средство выбрано из монометилауристатина E (MMAE). Данные демонстрируют эффекты пептидных лигандов, конъюгированных с токсином, содержащим MMAE.

В одном варианте осуществления цитотоксическое средство связано с бициклическим пептидом расщепляемой связью, такой как дисульфидная связь или чувствительная к протеазе связь. В дополнительном варианте осуществления группы, смежные с дисульфидной связью, модифицируют, чтобы контролировать блокировку дисульфидной связи и, таким образом, скорость расщепления и сопутствующего высвобождения цитотоксического средства.

В опубликованной работе определяют возможность изменения чувствительности дисульфидной связи к восстановлению путем введения стерических препятствий с обеих сторон дисульфидной связи (Kellogg et al. (2011), *Bioconjugate Chemistry*, 22, 717). Более высокая степень стерических затруднений снижает скорость восстановления внутриклеточным глутатионом, а также внеклеточными (системными) восстанавливающими средствами, в результате чего снижается легкость высвобождения токсина как внутри, так и вне клетки. Таким образом, оптимальной степени стабильности дисульфида в кровотоке (которая сводит к минимуму нежелательные побочные эффекты токсина) по сравнению с эффективным высвобождением во внутриклеточную среду (которое максимизирует терапевтический эффект) можно достичь путем тщательного выбора степени стерических затруднений с обеих сторон дисульфидной связи.

Затрудненность с обеих сторон дисульфидной связи модулируют путем введения одной или более метильных групп либо на направляющем фрагменте (здесь бициклический пептид), либо на токсинной

стороне молекулярной конструкции.

В одном варианте осуществления цитотоксическое средство и линкер выбирают из любых сочетаний, описанных в WO 2016/067035 (цитотоксические агенты и линкеры включены в настоящее описание в качестве ссылки).

Синтез.

Пептиды по настоящему изобретению можно получить синтетическим путем с помощью стандартных методов с последующим взаимодействием с молекулярным каркасом *in vitro*. затем можно использовать стандартные химические методы. Это обеспечивает быстрое крупномасштабное получение растворимого вещества для последующих экспериментов или проверки. Такие способы можно осуществить с использованием обычных химических методов, таких как описанные в Timmerman et al. (выше).

Таким образом, изобретение также относится к получению полипептидов, выбранных в соответствии с настоящим изобретением, где получение включает необязательные дополнительные стадии, описанные ниже. В одном варианте осуществления указанные стадии проводят на конечном продукте полипептида, полученном путем химического синтеза.

Пептиды также можно удлинить, например, для добавления другой петли и, следовательно, для введения нескольких специфичностей.

Пептид можно удлинить с помощью обычных химических методов по N-концу или C-концу или внутри петель с использованием ортогонально защищенных лизинов (и их аналогов) с помощью стандартных методов твердофазной химии или жидкофазной химии. Стандартные методы (био)конъюгации можно использовать для введения активированного или активируемого N- или C-конца. Альтернативно, можно ввести добавления путем конденсации фрагментов или методом нативного химического лигирования, например, как описано в (Dawson et al. 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science, 266:776-779), или с использованием ферментов, таких как субтилигазы, как описано в (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).

Альтернативно, пептиды можно удлинить или модифицировать путем дальнейшей конъюгации посредством дисульфидных связей. Дополнительное преимущество такой конъюгации заключается в том, что она обеспечивает возможность отделения первого и второго пептидов друг от друга в восстановительной среде клетки. В этом случае молекулярный каркас (например, ТАТА) может быть добавлен во время химического синтеза первого пептида так, чтобы он взаимодействовал с тремя цистеиновыми группами; затем к N- или C-концу первого пептида можно присоединить дополнительно остаток цистеина или тиол, так чтобы этот цистеин или тиол взаимодействовал только со свободным цистеином или тиолом второго пептида с образованием связанного дисульфидной связью бициклического пептид-пептидного конъюгата.

Подобные методы в равной степени применимы к синтезу/соединению двух бициклических и биспецифических макроциклов с возможным получением тетраспецифической молекулы.

Кроме того, добавление других функциональных или эффекторных групп можно проводить подобным образом, путем присоединения их к N- или C-концу или к боковым цепям с использованием соответствующих химических методов. В одном варианте осуществления присоединение осуществляют таким образом, что оно не блокирует активность ни одного фрагмента.

Фармацевтические композиции.

В соответствии с другим аспектом изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей описанный здесь пептидный лиганд в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Как правило, пептидные лиганды по настоящему изобретению используют в очищенном виде вместе с фармакологически приемлемыми эксципиентами или носителями. Как правило, такие эксципиенты или носители включают водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, такие как физиологический раствор и/или забуференные среды. Среда для парентерального применения включает раствор хлорида натрия, раствор Рингера, содержащий декстрозу, раствор Рингера, содержащий декстрозу и хлорид натрия, а также лактат. Если нужно поддерживать полипептидный комплекс в суспензии, добавляют подходящие физиологически приемлемые эксципиенты, выбранные из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Среды для внутривенного применения включают жидкие и питательные восполняющие средства, а также восполняющие средства, содержащие электролиты, например среды на основе раствора Рингера, содержащего декстрозу. Среды также могут содержать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е издание).

Соединения по изобретению можно использовать отдельно или в комбинации с другим средством или другими средствами. Другое средство для использования в комбинации может представлять собой, например, другой антибиотик или антибиотический "адьювант", такой как средство, улучшающее проникновение в грамотрицательные бактерии, ингибитор детерминант устойчивости или ингибитор механизмов вирулентности.

Антибиотики, подходящие для применения в комбинации с соединениями по настоящему изобретению включают, без ограничения:

бета-лактамы, такие как пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы или монобактамы. Подходящие пенициллины включают оксациллин, метициллин, ампициллин, клоксациллин, карбенициллин, пиперациллин, трикарциллин, флуклоксациллин и нафциллин; подходящие цефалоспорины включают цефазолин, цефалексин, цефалотин, цефтазидим, цефепим, цефтобипрол, цефтаролин, цефтолозан и цефидерокол; подходящие карбапенемы включают меропенем, дорипенем, имипенем, эртапенем, биапенем и тебипенем; подходящие монобактамы включают азтреонам;

линкозамиды, такие как клиндамицин и линкомицин;

макролиды, такие как азитромицин, кларитромицин, эритромицин, телитромицин и солитромицин;

тетрациклины, такие как тигециклин, омадациклин, эравациклин, доксициклин и миноциклин;

хинолоны, такие как ципрофлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин и делафлоксацин;

рифамицины, такие как рифампицин, рифабутин, рифалазил, рифапентин и рифаксимин;

аминогликозиды, такие как гентамицин, стрептомицин, тобрамицин, амикацин и плазомицин;

гликопептиды, такие как ванкомицин, тейхопланин, телаванцин, далбаванцин и оритаванцин,

плевомутилины, такие как лефамулин,

оксазолидиноны, такие как линезолид или тедизолид,

полимиксины, такие как полимиксин В или колистин;

триметоприм, иклаприм, сульфаметоксазол;

метронидазол;

фидаксомицин;

мупироцин;

фусидовая кислота;

даптомицин;

мурепавидин;

фосфомицин и

нитрофурантоин.

Подходящие антибиотические "адьюванты" включают в себя, без ограничения:

средства, которые, как известно, улучшают проникновение в бактерии, такие как средства, повышающие проницаемость внешней мембраны, или ингибиторы эффлюксного насоса; пермеабиллизаторы внешней мембраны могут включать нонапептид полимиксина В или другие аналоги полимиксина, или эдетат натрия;

ингибиторы механизмов резистентности, такие как ингибиторы бета-лактамазы;

подходящие ингибиторы бета-лактамазы включают клавулановую кислоту, тазобактам, сульбактам, авибактам, релебактам и накубактам;

ингибиторы механизмов вирулентности, таких как токсины и системы секреции, включающие в себя антитела.

Соединения по настоящему изобретению также можно использовать в комбинации с биологическими методами лечения, такими как способы лечения с использованием нуклеиновых кислот, антител, бактериофаговых или фаговых лизинов.

Способ введения фармацевтических композиций согласно изобретению может представлять собой любой из традиционных способов, известных специалистам в данной области. С целью лечения пептидные лиганды согласно изобретению можно вводить любому пациенту в соответствии со стандартными методами. Способы введения включают, без ограничения, пероральный (например, путем приема внутрь); буккальный; сублингвальный; трансдермальный (например, с использованием пластыря, гипса и т.д.); трансмукозальный (например, с использованием пластыря, гипса и т.д.); интраназальный (например, с использованием назального спрея); глазной (например, с использованием глазных капель); легочный (например, путем ингаляционной или инсуффляционной терапии с использованием, например, аэрозоля, например, через рот или нос); ректальный (например, с использованием суппозитория или клизмы); вагинальный (например, с использованием pessaria); парентеральный, например, путем инъекции, такой как подкожная, внутривенная, внутримышечная, внутривенная, внутриартериальная, интракардиальная, интратекальная, интраспинальная, интракапсулярная, субкапсулярная, внутриглазная, внутрибрюшинная, интратрахеальная, подкожная, внутрисуставная, субарахноидальная и внутригрудинная; путем имплантации депо или резервуара, например, подкожно или внутримышечно. Предпочтительно фармацевтические композиции согласно изобретению вводят парентерально. Дозировка и частота введения зависят от возраста, пола и состояния пациента, одновременного приема других лекарств, противопоказаний и других параметров, которые должны учитываться клиницистом.

Пептидные лиганды по настоящему изобретению можно лиофилизировать для хранения с перерастворением их в подходящем носителе перед использованием. Показано, что данный способ является эффективным, и для его осуществления можно использовать известные в данной области методы лиофилизации и перерастворения. Специалистам в данной области известно, что лиофилизация и перерастворение могут приводить к разным степеням потери активности, для компенсации которой, возможно, потре-

буется корректировка доз в сторону увеличения.

Композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их смесь, можно вводить с целью терапевтического лечения. При определенных терапевтических применениях количество, достаточное для достижения по меньшей мере частичного ингибирования, подавления, модуляции, уничтожения или другого измеримого параметра популяции выбранных клеток, определяют как "терапевтически эффективная доза". Количество, необходимое для достижения этой дозы, зависит от тяжести заболевания и общего состояния собственной иммунной системы пациента, но обычно варьирует от 10 мкг до 250 мг выбранного пептидного лиганда на 1 кг массы тела, причем обычно используют дозу от 100 мкг до 25 мг/кг/дозу.

Композицию, содержащую пептидный лиганд по настоящему изобретению, можно использовать в терапевтических целях для лечения микробной инфекции или для профилактики у индивидуума, подверженного риску заражения, например перенесшего операцию, химиотерапию, искусственную вентиляцию легких или другое состояние или запланированное вмешательство. Кроме того, описанные здесь пептидные лиганды можно использовать экстракорпорально или *in vitro* для селективного уничтожения, истощения или иного эффективного уменьшения популяции клеток-мишеней в гетерогенной смеси клеток. Кровь млекопитающего можно экстракорпорально объединить с выбранными пептидными лигандами, чтобы уничтожить или иным образом удалить из крови нежелательные клетки, с последующим возвращением крови млекопитающему в соответствии со стандартными методами.

Терапевтическое применение.

Бициклические пептиды по настоящему изобретению имеют конкретное применение в качестве высокоаффинных средств, связывающих мембранную металлопротеиназу типа 1 (MT1-MMP, также известную как MMP14), более конкретно, коллаген-связывающий участок гемопексинового домена (Arkadash et al. *J. Biol. Chem.* 2017, 292(8), 3481-3495). MT1-MMP представляет собой трансмембранную металлопротеиназу, которая играет важную роль в ремоделировании внеклеточного матрикса, непосредственно путем разрушения некоторых его компонентов и косвенно путем активации про-MMP2. MT1-MMP также играет ключевую роль в опухолевом ангиогенезе (Sounni et al. (2002), *FASEB J.* 16(6), 555-564) и экспрессируется на повышенном уровне в ряде солидных опухолей, поэтому лекарственные конъюгаты, содержащие MT1-MMP-связывающие бициклические пептиды по настоящему изобретению, могут конкретно использоваться для направленного лечения рака, в частности солидных опухолей, таких как немелкоклеточные карциномы легких. В одном варианте осуществления бициклический пептид по настоящему изобретению специфичен к человеческому MT1-MMP. В следующем варианте осуществления бициклический пептид по настоящему изобретению специфичен к мышшиному MT1-MMP. В другом варианте осуществления бициклический пептид по настоящему изобретению специфичен к человеческому и мышшиному MT1-MMP. В следующем варианте осуществления бициклический пептид по настоящему изобретению специфичен к человеческому, мышшиному и собачьему MT1-MMP.

Полипептидные лиганды по настоящему изобретению можно использовать в терапевтических и профилактических целях *in vivo*, в диагностических целях *in vitro* и *in vivo*, в анализах *in vitro*, в качестве реагентов и т.п. Лиганды, обладающие определенным уровнем специфичности, можно использовать в способах применения, которые включают тестирование отличных от человека животных, где желательно наличие перекрестной реактивности, или в диагностических способах, где перекрестная реактивность с гомологами или паралогами должна тщательно контролироваться. В некоторых способах применения, например в составе вакцин, способность вызывать иммунный ответ на заранее определенные диапазоны антигенов может использоваться для адаптации вакцины к конкретным заболеваниям и патогенам.

По существу чистые пептидные лиганды с гомогенностью по меньшей мере от 90 до 95% предпочтительны для введения млекопитающему, а гомогенность от 98 до 99% или более является наиболее предпочтительной для фармацевтического применения, особенно когда млекопитающее представляет собой человека. После очистки, частично или до желаемой степени гомогенности, выбранные полипептиды можно использовать в диагностических или терапевтических целях (в том числе экстракорпорально) или для разработки и проведения аналитических процедур, иммунофлуоресцентного окрашивания и т.п. (Lefkovite and Pernis, (1979 and 1981) *Immunological Methods, Volumes I and II*, Academic Press, NY).

Конъюгаты пептидных лигандов по настоящему изобретению обычно находят применение в способах предотвращения, подавления или лечения рака, в частности солидных опухолей, таких как немелкоклеточные карциномы легких.

Таким образом, в соответствии с другим аспектом изобретение относится к лекарственным конъюгатам, содержащим описанный здесь пептидный лиганд, для применения в способах профилактики, подавления или лечения рака, в частности солидных опухолей, таких как немелкоклеточные карциномы легких.

В соответствии с другим аспектом изобретение относится к способу профилактики, подавления или лечения рака, в частности солидных опухолей, таких как немелкоклеточные карциномы легких, который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, лекарственного конъюгата, содержащего описанный здесь пептидный лиганд.

Примеры рака (и его доброкачественных аналогов), которые можно лечить (или подавлять), вклю-

чают, без ограничения, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы разных типов, в том числе аденокарциномы, плоскоклеточные, переходноклеточные и другие карциномы), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевыводящих путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (включающего в себя пищевод, желудок, тонкий кишечник, толстую кишку, прямую кишку и анус), печени (гепатоцеллюлярная карцинома), желчного пузыря и желчевыводящей системы, экзокринной части поджелудочной железы, почки, легкого (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легких, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), головы и шеи (например, рак языка, ротовой полости, гортани, глотки, носоглотки, миндалин, слюнных желез, носовой полости и придаточных пазух носа), яичника, маточных труб, брюшины, влагалища, вульвы, пениса, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярная карцинома щитовидной железы), надпочечников, предстательной железы, кожи и придатков (например, меланома, базальноклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, кератоакантома, диспластический невус); гематологические злокачественные заболевания (такие как лейкозы, лимфомы) и предраковые гематологические расстройства и пограничные злокачественные заболевания, такие как гематологические злокачественные заболевания и родственные состояния лимфоидной линии (например, острый лимфолейкоз [ALL], хронический лимфолейкоз [CLL], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная В-крупноклеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, мантийноклеточная лимфома, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы естественных клеток-киллеров [NK], лимфомы Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, моноклональная гаммапатия неясного генеза, плазмцитомы, множественная миелома и посттрансплантационные лимфолиферативные расстройства), гематологические злокачественные заболевания и родственные состояния миелоидного происхождения (например, острый миелогенный лейкоз [AML], хронический миелогенный лейкоз [CMML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелолиферативные расстройства, такие как истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелолиферативный синдром, миелодиспластический синдром и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимального происхождения, например саркомы мягких тканей, костей или хрящей, такие как остеосаркомы, фибросаркомы, хондросаркомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, саркома Капоши, саркома Юинга, синовиальные саркомы, эпителиоидные саркомы, гастроинтестинальные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные гистиоцитомы и возвышающиеся дерматофибросаркомы; опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитомы, глиомы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, опухоли шишковидной железы и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островковых клеток, опухоли паращитовидной железы, карциноидные опухоли и медуллярная карцинома щитовидной железы); опухоли глаза и придатков (например, ретинобластома); опухоли зародышевых клеток и трофобластов (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы, доброкачественная гестационная трофобластическая болезнь и хориокарциномы); а также педиатрические и эмбриональные опухоли (например, медуллобластома, нейробластома, опухоль Вильямса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, которые делают пациента восприимчивым к злокачественным новообразованиям (например, пигментная ксеродерма).

Ссылки на настоящем описании на термин "профилактика" включают введение защитной композиции до индукции заболевания. Термин "подавление" относится к введению композиции после индукционного события, но перед клиническим проявлением заболевания. Термин "лечение" включает введение защитной композиции после появления симптомов заболевания.

Существуют животные модельные системы, которые можно использовать для скрининга эффективности лекарственных конъюгатов в отношении профилактики или лечения заболевания. Настоящее изобретение облегчает использование животных модельных систем, поскольку полипептидные лиганды, предлагаемые изобретением, могут перекрестно взаимодействовать с человеческими и животными мишенями.

Далее изобретение описывается со ссылкой на нижеследующие примеры.

Примеры

Материалы и методы.

Синтез пептидов.

Синтез пептидов проводят с использованием Fmoc-стратегии на пептидном синтезаторе Symphony, произведенном Peptide Instruments, и синтезаторе Syro II, произведенном MultiSynTech. Используют стандартные Fmoc-аминокислоты (Sigma, Merck) с соответствующими защитными группами боковых цепей: в каждом случае по возможности используют стандартные условия конденсации с последующим удалением защитных групп стандартными методами.

Альтернативно, пептиды очищают методом ВЭЖХ и после выделения их модифицируют 1,3,5-триакрилоилгексагидро-1,3,5-триазином (TATA, Sigma). Для этого линейный пептид разводят 50:50 MeCN:H₂O до ~35 мл, добавляют ~500 мкл 100 мМ TATA в ацетонитриле и иницируют реакцию 5 мл 1 М NH₄HCO₃ в H₂O. Реакции дают протекать в течение ~30-60 мин при комнатной температуре и после завершения реакции (определяемого методом MALDI) лиофилизируют. После завершения реакции к

реакционной смеси добавляют 1 мл 1 М раствора моногидрата гидрохлорида L-цистеина (Sigma) в H₂O и держат в течение ~60 мин при комнатной температуре, чтобы погасить какой-либо избыток ТАТА.

После лиофилизации модифицированный пептид очищают описанным выше способом, с заменой колонки Luna C8 на колонку Gemini C18 (Phenomenex) и кислоты на 0,1% трифторуксусную кислоту. Чистые фракции, содержащие целевое ТАТА-модифицированное вещество, объединяют, лиофилизируют и хранят при -20°C.

Если не указано иное, все используемые аминокислоты имеют L-конфигурацию.

В некоторых случаях перед связыванием со свободной тиольной группой токсина пептиды превращают в активированные дисульфиды с помощью следующего метода: раствор 4-метил(сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноата) (100 мМ) в сухом ДМСО (1,25 моль-экв.) добавляют к раствору пептида (20 мМ) в сухом ДМСО (1 моль-экв.). Реакционную смесь тщательно перемешивают и добавляют DIPEA (20 моль-экв.). Протекание реакции отслеживают методом ЖХ/МС до завершения.

Результаты биологических анализов.

Анализ конкурентного связывания человеческих белков с поляризацией флуоресценции.

Вследствие высокого сродства к гемопексиновому домену MT1-MMP (PEX) меченное флуоресцентным производное 17-88-N006 (SEQ ID NO: 10) можно использовать для конкурентных анализов (детекция с использованием FP). В данном описании заранее полученный комплекс PEX с флуоресцентной PEX-связывающей меткой титруют свободным, не содержащим флуоресцеина бициклическим пептидом. Поскольку предполагается, что все пептиды на основе 17-69 связываются по одному и тому же участку, титрант вытеснит флуоресцентную метку из PEX. Диссоциацию комплекса можно измерить количественно и определить K_d конкурента (титранта) целевого белка. Преимущество метода конкуренции заключается в том, что сродство не содержащих флуоресцеина бициклических пептидов можно определять точно и быстро.

Концентрация метки обычно находится на уровне K_d или ниже (здесь 1 нМ), а связывающий белок (здесь гемопексин MT1-MMP) находится в 15-кратном избытке, так что связывается >90% метки. Затем титруют нефлуоресцентный конкурирующий бициклический пептид (обычно только последовательность бициклического ядра) так, чтобы он вытеснил флуоресцентную метку с белка-мишени. Измеряют замещение метки и соотносят его с уменьшением поляризации флуоресценции. Уменьшение поляризации флуоресценции пропорционально доле белка-мишени, связанной с нефлуоресцентным титрантом, и, следовательно, является мерой сродства титранта к белку-мишени.

Исходные данные подгоняют к аналитическому решению кубического уравнения, которое описывает равновесие между флуоресцентной меткой, титрантом и связывающим белком. Подгонка требует значения сродства флуоресцентной метки к белку-мишени, которое можно определить отдельно с помощью экспериментов по изучению непосредственного связывания FP. Подгонку кривой проводят с помощью SigmaPlot 12.0 и используют как адаптированную версию уравнения, описанного Zhi-Xin Wang (FEBS Letters (1995), 360, 111-114).

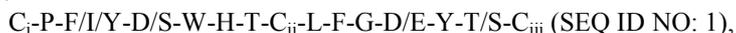
Выбранные пептиды по настоящему изобретению тестируют с помощью вышеупомянутого анализа конкурентного связывания человеческих белков с поляризацией флуоресценции, результаты представлены в таблице.

Конкурентное связывание человеческого MT1-MMP с поляризацией флуоресценции

Бициклический пептид	Молекулярный каркас	Метка	K _i	n
BCY1026	TATA	ACPYSWETCLFGDYRCA[Sar] ₆ [KFl] (17-88-N006) (SEQ ID NO: 10)	2801,67±1040,54	3
BCY1057	TATA	ACPYSWETCLFGDYRCA[Sar] ₆ [KFl] (17-88-N006) (SEQ ID NO: 10)	436,5±81,34	2
BCY1065	TATA	ACPYSWETCLFGDYRCA[Sar] ₆ [KFl] (17-88-N006) (SEQ ID NO: 10)	567±137,2	2
BCY1067	TATA	ACPYSWETCLFGDYRCA[Sar] ₆ [KFl] (17-88-N006) (SEQ ID NO: 10)	429,5±44,1	2
BCY1073	TATA	ACPYSWETCLFGDYRCA[Sar] ₆ [KFl] (17-88-N006) (SEQ ID NO: 10)	554,5±238,14	2
BCY1074	TATA	ACPYSWETCLFGDYRCA[Sar] ₆ [KFl] (17-88-N006) (SEQ ID NO: 10)	356±45,08	2
BCY1075	TATA	ACPYSWETCLFGDYRCA[Sar] ₆ [KFl] (17-88-N006) (SEQ ID NO: 10)	441±113,68	2
BCY1076	TATA	ACPYSWETCLFGDYRCA[Sar] ₆ [KFl] (17-88-N006) (SEQ ID NO: 10)	903,5±12,74	2

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептидный лиганд, специфичный к коллаген-связывающему участку МТ1-ММР, содержащий полипептид, содержащий по меньшей мере три остатка цистеина, разделенных по меньшей мере двумя петлеобразными последовательностями, и неароматический молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с остатками цистеина полипептида с получением по меньшей мере двух полипептидных петель на молекулярном каркасе, где пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:



где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина соответственно или их фармацевтически приемлемые соли.

2. Пептидный лиганд по п.1, где пептидный лиганд $C_i\text{-P-F/I/Y-D/S-W-H-T-C}_{ii}\text{-L-F-G-D/E-Y-T/S-C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 1) выбран из:

CPYSWETCLFGDYRC (SEQ ID NO: 2);
 CPFDWHTCLFGDYTC (SEQ ID NO: 3);
 CPFDWHTCLFGEYSC (SEQ ID NO: 4);
 CPIDWHTCLFGDYTC (SEQ ID NO: 5);
 CPFSWHTCLFGEYSC (SEQ ID NO: 6);
 CPFSWHTCLFGDYTC (SEQ ID NO: 7);
 CPISWHTCLFGDYSC (SEQ ID NO: 8);
 CPYSWHTCLFGDYSC (SEQ ID NO: 9).

3. Пептидный лиганд по п.1 или 2, где пептидный лиганд $C_i\text{-P-F/I/Y-D/S-W-H-T-C}_{ii}\text{-L-F-G-D/E-Y-T/S-C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 1) выбран из:

A-(SEQ ID NO: 2)-A (BCY1026);
 A-(SEQ ID NO: 3)-A (BCY1057);
 A-(SEQ ID NO: 4)-A (BCY1065);
 A-(SEQ ID NO: 5)-A (BCY1067);
 A-(SEQ ID NO: 6)-A (BCY1073);
 A-(SEQ ID NO: 7)-A (BCY1074);
 A-(SEQ ID NO: 8)-A (BCY1075);
 A-(SEQ ID NO: 9)-A (BCY1076).

4. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где молекулярный каркас представляет собой ТАТА.

5. Пептидный лиганд по п.4, где молекулярный каркас представляет собой ТАТА, а пептидный лиганд $C_i\text{-P-F/I/Y-D/S-W-H-T-C}_{ii}\text{-L-F-G-D/E-Y-T/S-C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 1) выбран из:

A-(SEQ ID NO: 2)-A (BCY1026);
 A-(SEQ ID NO: 3)-A (BCY1057);
 A-(SEQ ID NO: 4)-A (BCY1065);
 A-(SEQ ID NO: 5)-A (BCY1067);
 A-(SEQ ID NO: 6)-A (BCY1073);
 A-(SEQ ID NO: 7)-A (BCY1074);
 A-(SEQ ID NO: 8)-A (BCY1075);
 A-(SEQ ID NO: 9)-A (BCY1076).

6. Пептидный лиганд по любому из пп.1-5, где фармацевтически приемлемая соль выбрана из соли свободной кислоты или соли натрия, калия, кальция, аммония.

7. Пептидный лиганд по любому из пп.1-6, где МТ1-ММР представляет собой человеческий МТ1-ММР.

8. Лекарственный конъюгат, содержащий пептидный лиганд по любому из пп.1-7, конъюгированный с одной или более эффекторными и/или функциональными группами.

9. Лекарственный конъюгат по п.8, содержащий одно или более цитотоксических средств.

10. Лекарственный конъюгат по п.9, где указанное цитотоксическое средство выбрано из ММАЕ или DM1.

11. Фармацевтическая композиция, которая содержит пептидный лиганд по любому из пп.1-7 или лекарственный конъюгат по любому из пп.8-10 в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, которая дополнительно содержит одно или более терапевтических средств.

13. Применение лекарственного конъюгата по любому из пп.8-10 в профилактике, подавлении или лечении заболевания или расстройства, опосредованного МТ1-ММР.

