



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114901317 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 12

(21) 申请号 202080071881.X

(22) 申请日 2020.10.15

(30) 优先权数据

1914872.5 2019.10.15 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2020/052590 2020.10.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/074622 EN 2021.04.22

(71) 申请人 拜斯科技术开发有限公司

地址 英国剑桥

(72) 发明人 P·贝斯维克 G·马德

M·里格比

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟 韩文华

(51) Int.Cl.

A61K 47/64 (2017.01)

A61K 45/00 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

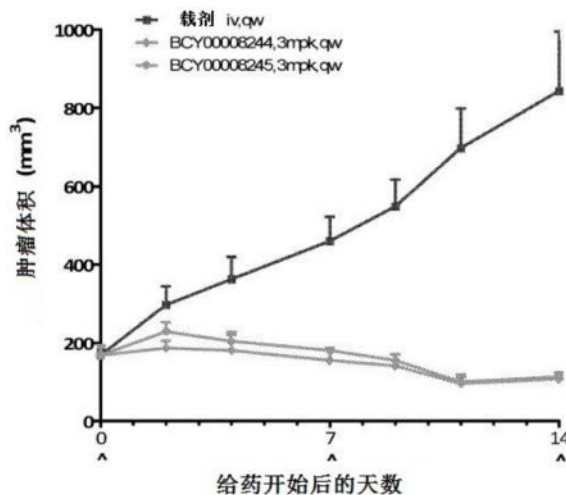
权利要求书3页 说明书24页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

双环肽配体药物偶联物

(57) 摘要

本发明涉及包含至少两个多肽的药物偶联物,所述多肽每个与非芳香族分子支架共价结合,使得在连接点与支架之间对向存在两个或更多个肽环。本发明还涉及包含所述药物偶联物的药物组合物,以及所述药物偶联物在预防、抑制或治疗疾病中的用途,例如可以通过细胞死亡来缓解的疾病,特别是以有缺陷的细胞类型为特征的疾病、增殖性疾病(如癌症)和自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎)。



1. 一种药物偶联物,其包含至少两个肽配体,所述肽配体可以相同或不同,所述肽配体中的每一个包含多肽和非芳香族分子支架,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个反应性基团,并且所述非芳香族分子支架与所述多肽的反应性基团形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

2. 根据权利要求1所定义的药物偶联物,其中所述肽配体特异于相同或不同靶标。

3. 根据权利要求1或权利要求2所定义的药物偶联物,其中所述肽配体中的至少一个特异于癌细胞上存在的表位。

4. 根据权利要求1至3中任一项所定义的药物偶联物,其包含两个肽配体,所述两个肽配体都特异于相同靶标。

5. 根据权利要求1至4中任一项所定义的药物偶联物,其中所述肽配体中的至少一个特异于粘连蛋白-4。

6. 根据权利要求5所定义的药物偶联物,其包含两个肽配体,所述两个肽配体都特异于粘连蛋白-4。

7. 根据权利要求5或权利要求6定义的药物偶联物,其包含两个肽配体,所述两个肽配体都特异于粘连蛋白-4以及所述两个肽配体都包含相同的肽序列。

8. 根据权利要求5至7中任一项所定义的药物偶联物,其中所述环序列包含3或9个氨基酸。

9. 根据权利要求5至8中任一项所定义的药物偶联物,其中所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列中的一个由3个氨基酸组成以及所述两个环序列中的另一个由9个氨基酸组成。

10. 根据权利要求5至9中任一项所定义的药物偶联物,其中所述特异于粘连蛋白-4的肽配体中的至少一个具有核心序列:

CP[1Na1][dD]CMKDWSTP[HyP]WC (SEQ ID NO:1)。

11. 根据权利要求5至10中任一项所定义的药物偶联物,其中所述特异于粘连蛋白-4的肽配体中的至少一个具有全序列:

(β -Ala)-Sar₁₀-CP[1Na1][dD]CMKDWSTP[HyP]WC (SEQ ID NO:2)。

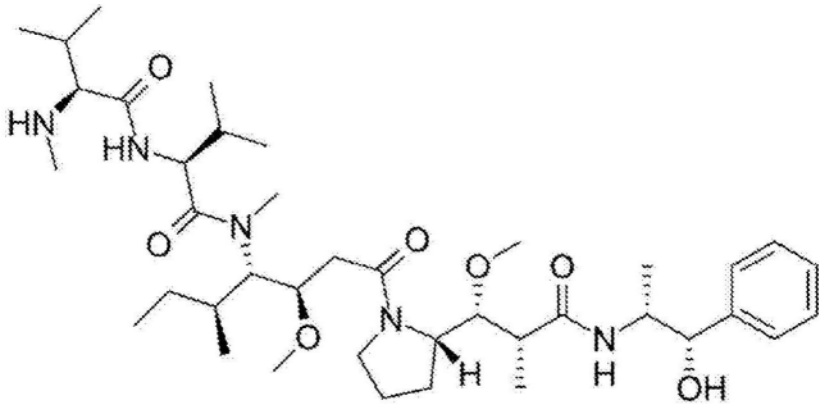
12. 根据权利要求1至11中任一项所定义的药物偶联物,其中所述反应性基团包含半胱氨酸。

13. 根据权利要求1至12中任一项所定义的药物偶联物,其中所述非芳香族分子支架选自1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA)。

14. 根据权利要求1至13中任一项所定义的药物偶联物,其偶联至一个或多个活性剂,例如小分子、抑制剂、激动剂、拮抗剂、部分激动剂和拮抗剂、反向激动剂和拮抗剂以及细胞毒性剂。

15. 根据权利要求1至14中任一项所定义的药物偶联物,其偶联至一个或多个细胞毒性剂。

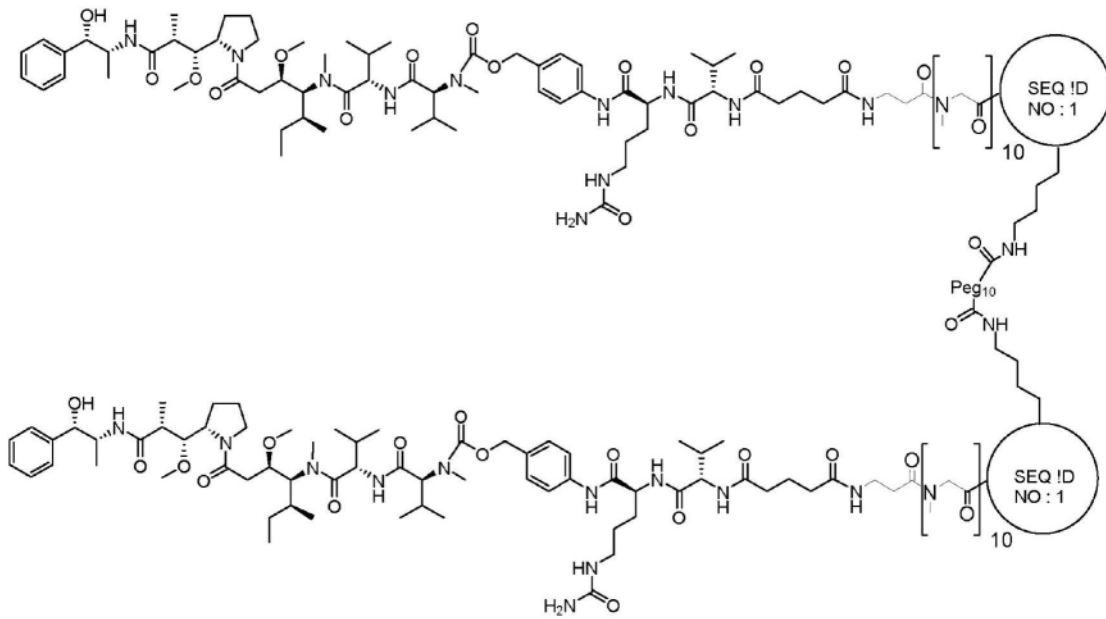
16. 根据权利要求15所定义的药物偶联物,其中所述细胞毒性剂是(S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)-N,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲氨基)丁酰胺基)丁酰胺(单甲基澳瑞他汀E;MMAE):



17. 根据权利要求15或权利要求16所定义的药物偶联物,其还包括在所述肽配体和每个所述细胞毒性剂之间的接头。

18. 根据权利要求17所定义的药物偶联物,其中所述接头选自以下的一个或多个:Val-Cit、 β -Ala、对氨基苄基氨基甲酸酯(PABC)、Glu以及一个或多个(例如,10个)肌氨酸(Sar)残基,例如,-PABC-Val-Cit-Glu- β Ala-Sar₁₀-接头,其中所述双环肽在两个赖氨酸残基处通过PEG10部分结合(即,所得的双环肽药物偶联物包含(MMAE-PABC-Val-Cit-Glu- β Ala-Sar₁₀-双环肽)-PEG₁₀-(双环肽-Sar₁₀- β Ala-Glu-Cit-Val-PABC-MMAE)部分)。

19. 根据权利要求15至18中任一项所定义的药物偶联物,其是式(A)的化合物:



BCY00008244

(A)。

20. 一种药物组合物,其包含权利要求1至19中任一项所述的药物偶联物,与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

21. 根据权利要求1至19中任一项所定义的药物偶联物用于预防、抑制或治疗疾病的用途。

22. 根据权利要求21所定义的用途的所述药物偶联物,其中所述疾病是可通过细胞死亡来缓解的疾病。

23. 根据权利要求22所定义的用途的所述药物偶联物,其中所述疾病选自有缺陷的

细胞类型为特征的疾病、增殖性疾病如癌症和自身免疫性疾病如类风湿性关节炎。

双环肽配体药物偶联物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含至少两个多肽的药物偶联物,所述多肽每个与非芳香族分子支架共价结合,使得在连接点与支架之间对向存在(subtend)两个或更多个肽环。本发明还涉及包含所述药物偶联物的药物组合物以及所述药物偶联物在预防、抑制或治疗疾病中的用途,例如可以通过细胞死亡来缓解的疾病,特别是以有缺陷的细胞类型为特征的疾病、增殖性疾病(如癌症)和自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎)。

背景技术

[0002] 环肽能够以高亲和力和靶标特异性与蛋白质靶标结合,因此是用于治疗剂开发的有吸引力的分子类别。事实上,临床上已经成功使用了几种环肽,例如抗菌肽万古霉素、免疫抑制药环孢霉素或抗癌药奥曲肽(Driggers等人(2008),Nat Rev Drug Discov 7(7), 608-24)。良好的结合特性是由于肽与靶标之间形成的相对较大的相互作用表面以及环状结构的构象柔韧性降低所致。通常,大环与数百平方埃的表面结合,例如环肽CXCR4拮抗剂CVX15(400 Å²;Wu等人(2007),Science 330,1066-71)、具有与整合蛋白αVβ3(355 Å²)结合的Arg-Gly-Asp基序的环肽(Xiong等人(2002),Science 296(5565),151-5)或结合尿激酶型纤溶酶原激活因子的环肽抑制剂upain-1(603 Å²;Zhao等人(2007),J Struct Biol 160(1),1-10)。

[0003] 由于其环状构型,肽大环比线性肽柔韧性差,导致与靶标结合后熵损失较小,并导致更高的结合亲和力。与线性肽相比,降低的柔韧性还导致锁定靶标特异性构象,增加了结合特异性。这种作用已通过一种基质金属蛋白酶8(MMP-8)的有效的和选择性抑制剂得到了例证,该抑制剂在开环时失去相对于其他MMP的选择性(Cherney等人(1998),J Med Chem 41(11),1749-51)。通过大环化获得的有利的结合性质在具有多于一个肽环的多环肽中更为显著,例如在万古霉素、乳酸链球菌肽和放线菌素中。

[0004] 不同的研究团队先前已将具有半胱氨酸残基的多肽系于(tether)合成的分子结构上(Kemp和McNamara(1985),J.Org.Chem;Timmerman等人(2005),ChemBioChem)。Meloan和同事已使用三(溴甲基)苯和相关分子将多个肽环快速且定量地环化到合成支架上,以结构模拟蛋白质表面(Timmerman等人(2005),ChemBioChem)。WO 2004/077062和WO 2006/078161中公开了用于生成候选药物化合物的方法,其中所述化合物是通过将包含半胱氨酸的多肽连接到分子支架上而生成的,所述分子支架例如为三(溴甲基)苯。此外,分子支架的合适示例包括非芳香族支架,描述见于Heinis等人(2014)Angewandte Chemie,国际版53(6)1602-1606。

[0005] 已经开发了基于噬菌体展示的组合方法以生成和筛选针对目标靶标的双环肽的大型文库(Heinis等人(2009),Nat Chem Biol 5(7),502-7和WO 2009/098450)。简而言之,在噬菌体上展示了包含三个半胱氨酸残基和两个六随机氨基酸的区域(Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys)的线性肽的组合文库,并通过将半胱氨酸侧链共价连接至小分子(三(溴甲基)苯)而环化。

发明内容

[0006] 根据本发明的第一个方面,提供了一种包含至少两个肽配体的药物偶联物,所述肽配体可以相同或可以不同,每一个所述肽配体包含多肽和非芳香族分子支架,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个反应性基团,并且所述非芳香族分子支架与所述多肽的反应性基团形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

[0007] 根据本发明的第二个方面,提供一种药物偶联物,其包含与至少两个肽配体偶联的一个或多个细胞毒性剂,所述肽配体可以相同或可以不同,每一个所述肽配体包含多肽和非芳香族分子支架,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个反应性基团,并且所述非芳香族分子支架与所述多肽的反应性基团形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

[0008] 根据本发明的进一步的方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所定义的药物偶联物与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0009] 根据本发明的进一步的方面,提供了如本文所定义的药物偶联物,其用于预防、抑制或治疗疾病,例如可以通过细胞死亡来缓解的疾病,特别是以有缺陷的细胞类型为特征的疾病、增殖性疾病(如癌症)和自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎)。

附图说明

[0010] 图1:向携带NCI-H292异种移植物的雌性Balb/c裸鼠施用BCY8244后的体重变化和肿瘤体积轨迹。数据点代表组平均体重。误差棒代表平均值的标准误差(SEM)。

具体实施方式

[0011] 根据本发明的第一个方面,提供了一种包含至少两个肽配体的药物偶联物,所述肽配体可以相同或可以不同,每一个所述肽配体包含多肽和非芳香族分子支架,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个反应性基团,并且所述非芳香族分子支架与所述多肽的反应性基团形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

[0012] 还应当理解,药物偶联物包含多个具有潜在的不同序列的肽配体,所述肽配体可特异于相同或不同靶标。其中药物偶联物包含特异于一种靶标的肽配体和特异于不同靶标的一种或多种其他肽配体的排列称为双互补位(bi-paratopic)结合。

[0013] 在一个实施方案中,所述肽配体中的至少一个特异于癌细胞上存在的表位。

[0014] 在一个实施方案中,所述肽配体中的至少一个特异于粘连蛋白,例如粘连蛋白-4。粘连蛋白-4是表面分子,属于蛋白质的粘连蛋白家族,该家族包括4个成员。粘连蛋白是细胞粘附分子,在发育和成年期间在上皮细胞、内皮细胞、免疫细胞和神经元细胞的各种生物过程(如极性、增殖、分化和迁移)中发挥关键作用。粘连蛋白在人中参与若干病理过程。它们是脊髓灰质炎病毒、单纯疱疹病毒和麻疹病毒的主要受体。编码粘连蛋白-1(PVRL1)或粘连蛋白-4(PVRL4)的基因突变导致与其他异常相关的外胚层发育不良综合征。粘连蛋白-4在胎儿发育过程中表达。在成人组织中,其表达比该家族的其他成员的表达更受限制。粘连蛋白-4是肿瘤相关抗原,分别存在于50%、49%和86%的乳腺癌、卵巢癌和肺癌中,主要存在于预后不良的肿瘤中。在相应的正常组织中未检测到其表达。在乳腺肿瘤中,粘连蛋白-4主要在三阴性和ERBB2+癌中表达。在患有这些癌症的患者的血清中,检测到可溶形式的粘

连蛋白-4与预后不良有关。血清粘连蛋白-4的水平在转移性进展期间升高,在治疗后降低。这些结果表明粘连蛋白-4可能是治疗癌症的可靠靶标。因此,在现有技术中已经描述了若干种抗粘连蛋白-4抗体。特别地,Enfortumab Vedotin (ASG-22ME) 是靶向粘连蛋白-4的抗体药物偶联物(ADC),目前正在用于治疗患实体瘤患者的临床研究中。

[0015] 在GB 1810250.9和GB 1815684.4中描述了合适的粘连蛋白-4特异的肽配体的示例,其双环肽配体通过引用并入本文。

[0016] 在其中所述肽配体中的至少一个特异于粘连蛋白-4的实施方案中,所述环序列包含3或9个氨基酸。在进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列中的一个由3个氨基酸组成,另一个由9个氨基酸组成。

[0017] 在一个实施方案中,至少一个特异于粘连蛋白-4的肽配体具有核心序列:

[0018] CP[1Na1][dD]CMKDWSTP[HyP]WC (SEQ ID NO:1)

[0019] (在GB 1815684.4中称为SEQ ID NO:212)。

[0020] 在进一步的实施方案中,至少一个特异于粘连蛋白-4的肽配体具有全序列:

[0021] (β -Ala)-Sar₁₀-CP[1Na1][dD]CMKDWSTP[HyP]WC (SEQ ID NO:2)

[0022] (在GB 1815684.4中称为BCY8238)。

[0023] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义,如肽化学、细胞培养和噬菌体展示、核酸化学和生物化学领域。分子生物学、遗传和生化方法使用标准技术(参见Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,2001,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY;Ausubel等人,Short Protocols in Molecular Biology(1999),第4版,John Wiley&Sons,Inc.),其通过引用并入本文。

[0024] 在一个实施方案中,所述药物偶联物包含两个肽配体,两个都特异于同一靶标。在进一步的实施方案中,所述药物偶联物包含两个肽配体,两个都特异于粘连蛋白-4。在一个仍进一步实施方案中,所述药物偶联物包含两个肽配体,两个都特异于粘连蛋白-4以及两个都包含相同的肽序列。

[0025] 术语

[0026] 编号

[0027] 当提及本发明的双环肽内的氨基酸残基位置时,由于其不变而从编号中省略了半胱氨酸残基(C_i、C_{ii}和C_{iii}),因此,本发明的所选择的双环肽内的氨基酸残基的编号参照如下:

[0028] -C_i-P₁-[1Na1]₂-[dD]₃-C_{ii}-M₄-K₅-D₆-W₇-S₈-T₉-P₁₀-[HyP]₁₁-W₁₂-C_{iii} (SEQ ID NO:1)。

[0029] 为了本说明的目的,假设所有双环肽与1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA)环化并产生三取代的结构。与TATA的环化发生在C_i、C_{ii}和C_{iii}上。

[0030] 分子形式

[0031] 双环核心序列的N-或C-末端延伸添加于序列的左侧或右侧,以连字符分隔。例如,N-末端的 β Ala-Sar₁₀-Ala尾将表示为:

[0032] β Ala-Sar₁₀-A- (SEQ ID NO:X)。

[0033] 反向肽序列

[0034] 根据Nair等人(2003), J Immunol 170 (3), 1362-1373中的公开, 设想本文公开的肽序列也将以其逆-反形式使用。例如, 该序列逆转(即N-末端变为C-末端, 反之亦然), 其立体化学同样也逆转(即D-氨基酸变为L-氨基酸, 反之亦然)。

[0035] 肽配体

[0036] 如本文所指的, 肽配体是指与分子支架共价结合的肽、肽的(peptidic)或拟肽物(peptidomimetic)。通常, 这样的肽、肽的或拟肽物包含具有天然或非天然氨基酸的肽、两个或更多个能够与支架形成共价键的反应性基团(即半胱氨酸残基)和在所述反应性基团之间对向存在的序列, 所述序列因为当所述肽、肽的或肽模拟物与所述支架结合时形成环而被称为环序列。在本案例中, 所述肽、肽的或肽模拟物包含至少三个半胱氨酸残基(在本文中称为C_i、C_{ii}和C_{iii}), 并且在所述支架上形成至少两个环。

[0037] 肽配体的优点

[0038] 本发明的某些双环肽具有许多有利的性质, 其使它们被认为是适合注射、吸入、经鼻、经眼、口服或局部施用的类药物分子。这样的有利的性质包括:

[0039] -物种交叉反应性。这是临床前药效学和药代动力学评估的典型要求;

[0040] -蛋白酶稳定性。双环肽配体理想地应表现出对血浆蛋白酶、上皮(“膜锚定的”)蛋白酶、胃和肠蛋白酶、肺表面蛋白酶、细胞内蛋白酶等的稳定性。蛋白酶的稳定性应当在不同物种之间保持, 使得可以在动物模型中开发双环先导候选物, 并可以有把握地对人施用;

[0041] -理想的溶解度曲线。其是带电荷的和亲水的残基相对于疏水的残基和分子内/分子间氢键的比例的函数, 其对于制剂和吸收目的很重要;

[0042] -在循环中最佳的血浆半衰期。取决于临床适应症和治疗方案, 可能需要开发用于短时间暴露的双环肽, 开发在循环中保留增强的双环肽, 其因此对于管理更慢性的疾病状态是最佳的。导致理想的血浆半衰期的其他因素是持续暴露以实现最大治疗效率的要求, 相对于由于持续暴露于试剂而伴随的毒理; 和

[0043] -选择性。本发明的某些肽配体相较于其他受体亚型表现出良好的选择性。例如, 当双环肽特异于粘连蛋白-4时, 所述双环肽相较于其他粘连蛋白将理想地选择性用于粘连蛋白-4。

[0044] 药学上可接受的盐

[0045] 应当理解, 盐形式在本发明的范围内, 并且提及肽配体包括所述配体的盐形式。

[0046] 本发明的盐可以由包含碱性或酸性部分的母体化合物通过常规化学方法如 Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. Heinrich Stahl (编辑), Camille G. Wermuth (编辑), ISBN: 3-90639-026-8, 精装, 388页, 2002年8月中所述的方法合成。通常, 这样的盐可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与合适的碱或酸在水中或在有机溶剂中、或在两者的混合物中反应来制备。

[0047] 可以用很多种无机和有机酸形成酸加成盐(单盐或二盐)。酸加成盐的示例包括与酸形成的单盐或二盐, 所述酸选自乙酸、2, 2-二氯乙酸、己二酸、藻酸、抗坏血酸(例如L-抗坏血酸)、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、丁酸、(+)-樟脑、樟脑磺酸、(+)-(1S)-樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、肉桂酸、柠檬酸、环己氨磺酸、十二烷基硫酸、乙烷-1, 2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、甲酸、富马酸、半乳酸、龙胆酸、葡庚糖酸、D-葡萄糖酸、葡糖醛酸(例如D-葡糖醛酸)、谷氨酸(例如L-谷氨酸)、 α -氧代戊二酸、乙醇酸、马尿酸、氢卤

酸(例如氢溴酸、盐酸、氢碘酸)、羟基乙磺酸、乳酸(例如(+)-L-乳酸、(±)-DL-乳酸)、乳糖酸、马来酸、苹果酸、(-)-L-苹果酸、丙二酸、(±)-DL-扁桃酸、甲磺酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸、1-羟基-2-萘酸、烟酸、硝酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、扑酸、磷酸、丙酸、丙酮酸、L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、鞣酸、(+)-L-酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、十一碳烯酸和戊酸,以及酰化的氨基酸和阳离子交换树脂。

[0048] 一组特别的盐由以下形成的盐组成:乙酸、盐酸、氢碘酸、磷酸、硝酸、硫酸、柠檬酸、乳酸、琥珀酸、马来酸、苹果酸、羟基乙磺酸、富马酸、苯磺酸、甲苯磺酸、硫酸、甲磺酸(mesylate)、乙磺酸、萘磺酸、戊酸、丙酸、丁酸、丙二酸、葡糖醛酸和乳糖酸。一种特别的盐是盐酸盐。另一种特别的盐是乙酸盐。

[0049] 如果化合物是阴离子的,或具有可以是阴离子的官能团(例如, -COOH可以是-COO⁻),则可以与有机或无机碱形成盐,生成合适的阳离子。合适的无机阳离子的示例包括但不限于:碱金属离子如Li⁺、Na⁺和K⁺,碱土金属阳离子如Ca²⁺和Mg²⁺,和其他阳离子如Al³⁺或Zn⁺。合适的有机阳离子的示例包括但不限于:铵离子(即NH₄⁺)和被取代的铵离子(例如, NH₃R⁺、NH₂R₂⁺、NHR₃⁺、NR₄⁺)。一些合适的被取代的铵离子的示例是那些衍生自以下的:甲胺、乙胺、二乙胺、丙胺、二环己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、苄胺、苯基苄胺、胆碱、葡甲胺和氨丁三醇,以及氨基酸,如赖氨酸和精氨酸。常见的季铵离子的一个示例是N(CH₃)₄⁺。

[0050] 当本发明的化合物含有胺官能团时,其可以例如根据技术人员众所周知的方法与烷基化剂反应而形成季铵盐。这样的季铵化合物在本发明的化合物的范围内。

[0051] 修饰衍生物

[0052] 应当理解,本文所定义的肽配体的修饰衍生物在本发明的范围内。这样的合适的修饰衍生物的示例包括选自以下的一种或多种修饰:N-末端和/或C-末端修饰;用一个或多个非天然氨基酸残基替换一个或多个氨基酸残基(如用一个或多个电子等排的或等电子的氨基酸替换一个或多个极性氨基酸残基;用其他非天然电子等排的或等电子的氨基酸替换一个或多个非极性氨基酸残基);间隔基团的添加;用一个或多个抗氧化氨基酸残基替换一个或多个对氧化敏感的氨基酸残基;用一个或多个取代氨基酸(如丙氨酸)替换一个或多个氨基酸残基,用一个或多个D-氨基酸残基替换一个或多个L-氨基酸残基;双环肽配体中一个或多个酰胺键的N-烷基化;用替代键替换一个或多个肽键;肽骨架长度的修饰;用另一个化学基团取代一个或多个氨基酸残基的α-碳上的氢,用合适的胺、硫醇、羧酸和酚反应性试剂修饰氨基酸如半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸/天冬氨酸和酪氨酸以官能化所述氨基酸,以及引入或替换引入适合于官能化的正交反应活性的氨基酸,例如带有叠氨基或炔基的氨基酸,其分别允许用带有炔基或叠氨基的部分进行官能化。

[0053] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包含N-末端和/或C-末端修饰。在进一步的实施方案中,其中所述修饰衍生物包含使用合适的氨基反应性化学的N-末端修饰和/或使用合适的羧基反应性化学的C-末端修饰。在进一步的实施方案中,所述N-末端或C-末端修饰包括添加效应基团,所述效应基团包括但不限于细胞毒性剂、放射螯合剂或发色团。

[0054] 在进一步的实施方案中,所述修饰衍生物包含N-末端修饰。在进一步的实施方案中,所述N-末端修饰包含N-末端乙酰基。在该实施方案中,在肽合成过程中,N-末端残基被乙酸酐或其他合适的试剂封端,产生N-末端乙酰化的分子。该实施方案提供了去除氨基肽

酶的潜在识别点的优点,从而避免了所述双环肽降解的可能性。

[0055] 在一个可选的实施方案中,所述N-末端修饰包括添加分子间隔基团,其促进效应基团偶联和保持所述双环肽对其靶标的效力。

[0056] 在进一步的实施方案中,修饰衍生物包含C-末端修饰。在进一步的实施方案中,C-末端修饰包含酰胺基。在该实施方案中,在肽合成过程中,C-末端残基被合成为酰胺,产生C-末端乙酰化的分子。该实施方案提供了去除羧肽酶的潜在识别点的优点,降低了所述双环肽的蛋白水解降解的可能性。

[0057] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个非天然氨基酸残基替换一个或多个氨基酸残基。在该实施方案中,可以选择具有电子等排的/等电子的侧链的非天然氨基酸,其既不被降解蛋白酶识别,也不对靶标效力产生任何不利影响。

[0058] 可选地,可以使用具有受约束的氨基酸侧链的非天然氨基酸,使得附近的肽键的蛋白水解在构象和空间上受到阻碍。特别地,其涉及脯氨酸类似物、大型侧链、C_α-二取代的衍生物(例如,氨基异丁酸,Aib)和环氨基酸,一个简单的衍生物是氨基-环丙基羧酸。

[0059] 在一个实施方案中,修饰衍生物包括添加间隔基团。在进一步的实施方案中,修饰衍生物包括在N-末端半胱氨酸(C_i)和/或C-末端半胱氨酸(C_{iii})上添加间隔基团。

[0060] 在一个实施方案中,修饰衍生物包括用一个或多个抗氧化的氨基酸残基替换一个或多个对氧化敏感的氨基酸残基。在进一步的实施方案中,修饰衍生物包括用萘丙氨酸或丙氨酸残基替换色氨酸残基。该实施方案提供了改善所得双环肽配体的药物稳定性特征的优点。

[0061] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个疏水氨基酸残基替换一个或多个带电荷的氨基酸残基。在一个可选的实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个带电荷的氨基酸残基替换一个或多个疏水氨基酸残基。带电荷的与疏水的氨基酸残基的正确平衡是所述双环肽配体的重要特征。例如,疏水氨基酸残基影响血浆蛋白结合的程度,从而影响血浆中游离可利用部分的浓度,而带电荷的氨基酸残基(特别是精氨酸)可以影响所述肽与细胞表面磷脂膜的相互作用。两者组合起来可以影响所述肽药物的半衰期、分布体积和暴露,并且可以根据临床终点进行调整。另外,带电荷的和疏水的氨基酸残基的正确组合和数量可以减少在注射部位的刺激(如果所述肽药物已经皮下施用)。

[0062] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个D-氨基酸残基替换一个或多个L-氨基酸残基。该实施方案被认为通过空间位阻和通过D-氨基酸稳定β-转角构象的倾向来增加蛋白水解稳定性(Tugyi等人(2005),PNAS,102(2),413-418)。

[0063] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括去除任何氨基酸残基并用丙氨酸(例如,D-丙氨酸)取代。该实施方案提供了识别核心结合残基和去除潜在的蛋白水解进攻位点的优点。

[0064] 应当指出的是,每个上述修饰用于有意地改善所述肽的效力或稳定性。可以通过以下机制进一步提高基于修饰的效力:

[0065] -并入利用疏水作用并导致较低的解离速率的疏水部分,使得实现更高的亲和力;

[0066] -并入利用长距离离子相互作用的带电基团,导致更快的结合速率和更高的亲和力(参见例如Schreiber等人,Rapid,electrostatically assisted association of proteins(1996),Nature Struct.Biol.3,427-31);和

[0067] -将附加的约束并入肽中,例如通过正确地约束氨基酸的侧链使得在靶结合时熵的损失最小,通过限制骨架的扭转角使得在靶结合时熵的损失最小,以及出于相同的原因在分子中引入另外的环化。

[0068] (综述见Gentilucci等人,Curr.Pharmaceutical Design (2010) 16,3185-203和Nestor等人(2009),Curr.Medicinal Chem 16,4399-418)。

[0069] 同位素变体

[0070] 本发明包括本发明的所有药学上可接受的(放射性)同位素标记的肽配体,其中一个或多个原子被具有相同原子序数但原子质量或质量数不同于通常自然界中存在的原子质量或质量数的原子替换,和本发明的肽配体,其中连接能够持有相关的(放射性)同位素的金属螯合基团(称为“效应子”),和本发明的肽配体,其中某些官能团被相关的(放射性)同位素或同位素标记的官能团共价取代。

[0071] 适用于包含在本发明的肽配体中的同位素的示例包括氢同位素如 ^2H (D)和 ^3H (T),碳同位素如 ^{11}C 、 ^{13}C 和 ^{14}C ,氯同位素如 ^{36}Cl ,氟同位素如 ^{18}F ,碘同位素如 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{131}I ,氮同位素如 ^{13}N 和 ^{15}N ,氧同位素如 ^{15}O 、 ^{17}O 和 ^{18}O ,磷同位素如 ^{32}P ,硫同位素如 ^{35}S ,铜同位素如 ^{64}Cu ,镓同位素如 ^{67}Ga 或 ^{68}Ga ,钇同位素如 ^{90}Y ,和镥同位素如 ^{177}Lu ,和铋同位素如 ^{213}Bi 。

[0072] 本发明的某些同位素标记的肽配体(例如并入放射性同位素的那些)可用于药物和/或底物的组织分布研究,以及用于在临床上评估患病组织上EphA2靶标的存在和/或不存在。本发明的肽配体进一步可以具有有价值的诊断特性,其可用于检测或鉴定标记的化合物与其他分子、肽、蛋白质、酶或受体之间的复合物的形成。检测或鉴定方法可以使用用标记剂标记的化合物,如放射性同位素、酶、荧光物质、发光物质(例如鲁米诺、鲁米诺衍生物、荧光素、水母发光蛋白和荧光素酶)等。放射性同位素氚即 ^3H (T)和碳-14即 ^{14}C ,由于其易于并入和现成的检测方法而对于这一目的特别有用。

[0073] 用更重的同位素如氘即 ^2H (D)取代,可以由于更大的代谢稳定性而提供某些治疗优势,例如增加的体内半衰期或减少的剂量要求,因此在某些情况下可能是优选的。

[0074] 用正电子发射同位素如 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 和 ^{13}N 取代,可以用于正电子发射成像(PET)研究以检查靶标占有率。

[0075] 本发明的肽配体的同位素标记的化合物通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过所附实施例中描述的那些方法类似的方法,使用合适的同位素标记的试剂代替之前采用的非标记的试剂来制备。

[0076] 反应性基团

[0077] 本发明的分子支架可以通过多肽上的官能团或反应性基团结合至多肽。这些通常由多肽聚合物中存在的特定氨基酸的侧链形成。

[0078] 反应性基团是能够与分子支架形成共价键的基团。通常,反应性基团存在于肽中的氨基酸侧链上。示例是赖氨酸、精氨酸、组氨酸和含硫基团,如半胱氨酸、甲硫氨酸以及类似物,如硒代半胱氨酸。

[0079] 在一个实施方案中,所述反应性基团包括半胱氨酸。

[0080] 天然氨基酸的反应性基团的示例是半胱氨酸的硫醇基、赖氨酸的氨基、天冬氨酸或谷氨酸的羧基、精氨酸的胍基、酪氨酸的酚基或丝氨酸的羟基。非天然氨基酸可以提供范围广泛的反应性基团,包括叠氮化物、酮羰基、炔基、乙烯基或芳基卤基团。多肽末端的氨基

和羧基也可以用作反应性基团以与分子支架/分子核心形成共价键。

[0081] 本发明的多肽包含至少三个反应性基团。所述多肽还可以包含四个或更多个反应性基团。所用的反应性基团越多,在分子支架中可以形成越多的环。

[0082] 在一个优选的实施方案中,生成具有三个反应性基团的多肽。所述多肽与具有三重旋转对称性的分子支架/分子核心的反应生成单一产物异构体。出于若干原因,单一产物异构体的生成是有利的。化合物文库的核酸仅编码多肽的一级序列,而不编码在多肽与分子核心反应后形成的分子的异构态。如果仅可以形成一种产物异构体,则清楚地定义了产物异构体的核酸排布。如果形成多种产物异构体,则核酸不能提供关于在筛选或选择过程中分离出的产物异构体的性质的信息。如果合成的是本发明文库的特定成员,则单一产物异构体的形成也是有利的。在本案例中,多肽与分子支架的化学反应产生单一产物异构体而不是异构体的混合物。

[0083] 在另一个实施方案中,生成具有四个反应性基团的多肽。所述多肽与具有四面体对称性的分子支架/分子核心的反应生成两种产物异构体。尽管所述两种不同的产物异构体由同一核酸编码,也可以通过化学合成两种异构体、分离这两种异构体并测试这两种异构体与靶标配体的结合来确定分离出的异构体的异构性质。

[0084] 在本发明的一个实施方案中,所述多肽的反应性基团中的至少一个与其余的反应性基团正交。正交反应性基团的使用允许将所述正交反应性基团引导至分子核心的特定位置。涉及正交反应性基团的连接策略可用于限制形成的产物异构体的数量。换言之,通过为至少三个键中的一个或多个选择反应性基团,所述反应性基团相对于为该至少三个键的其余部分所选择的反应基团是独特的或不同的,可以有效地实现特定的顺序,以该特定的顺序将所述多肽的特定反应性基团键合或定向至所述分子支架上的特定位置。

[0085] 在另一个实施方案中,本发明的多肽的反应性基团与分子接头反应,其中所述接头能够与分子支架反应,使得接头将以最终的键合状态插入所述分子支架和所述多肽之间。

[0086] 替代硫醇介导的偶联的方法可以用于通过共价相互作用将分子支架连接到肽上。可选地,这些技术可以用于在根据本发明选择或分离多肽后,将进一步的部分(如不同于分子支架的感兴趣的小分子)修饰或连接到多肽上—在本实施方案中,然后显然所述连接不必是共价的并可以包含非共价的连接。这些方法可以代替(或结合)硫醇介导的方法,通过生产展示带有具有必需化学反应性基团的非天然氨基酸的蛋白质和肽的噬菌体,结合带有互补反应性基团的小分子使用,或在选择/分离阶段之后制备分子时,通过将所述非天然氨基酸合并至化学或重组合成的多肽使用。进一步的详情可见于WO 2009/098450或Heinis等人,Nat Chem Biol 2009,5(7),502-7。

[0087] 应当理解,环状双环肽结构进一步通过至少一个硫醚键连接到分子支架上。在双环肽的形成过程中,硫醚键提供锚点。在一个实施方案中,仅有一个这样的硫醚键。在进一步的实施方案中,仅有一个这样的硫醚键和两个氨基键。在进一步的实施方案中,仅有一个这样的硫醚键和两个烷基氨基键。合适地,硫醚键是双环或多环肽偶联物的中心键,即在肽序列中形成肽中氨基键的两个残基(例如,二氨基丙酸残基)被形成硫醚键的氨基酸残基(例如,赖氨酸)隔开,并位于其两侧。合适地,因此环状肽结构是具有中心硫醚键和两个外围氨基键的双环肽偶联物。在一些实施方案中,硫醚键的位置可以在两个N-烷基氨基键的

N-末端或C-末端。

[0088] 在一个实施方案中,反应性基团包含一个半胱氨酸残基和两个L-2,3-二氨基丙酸(Dap)或N- β -C₁₋₄烷基-L-2,3-二氨基丙酸(N-AlkDap)残基。

[0089] 非芳香族分子支架

[0090] 本文提及的术语“非芳香族分子支架”是指不包含芳香族(即不饱和)碳环或杂环系统的如本文所定义的任何分子支架。

[0091] 非芳香族分子支架的合适示例描述于Heinis等人(2014),*Angewandte Chemie*,国际版53(6),1602-1606中。

[0092] 如上述文档中所提及,所述分子支架可以是小分子,如有机小分子。

[0093] 在一个实施方案中,所述分子支架可以是高分子。在一个实施方案中,所述分子支架是由氨基酸、核苷酸或碳水化合物组成的大分子。

[0094] 在一个实施方案中,所述分子支架包含能够与多肽的官能团反应以形成共价键的反应性基团。

[0095] 所述分子支架可以包含与肽形成连接的化学基团,如胺、硫醇、醇、酮、醛、腈、羧酸、酯、烯烃、炔烃、叠氮化物、酸酐、琥珀酰亚胺、马来酰亚胺、烷基卤和酰基卤。

[0096] 含有 $\alpha\beta$ 不饱和羰基的化合物的示例是1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA)(*Angewandte Chemie*国际版(2014),53(6),1602-1606)。

[0097] 添加剂

[0098] 在一个实施方案中,所述药物偶联物还偶联至一个或多个活性剂。

[0099] 合适的“活性”剂的示例包括能够在双环肽复合物与其靶标结合时发挥细胞活性的任何合适的试剂。此类试剂包括小分子、抑制剂、激动剂、拮抗剂、部分激动剂和拮抗剂、反向激动剂和拮抗剂以及细胞毒性剂。

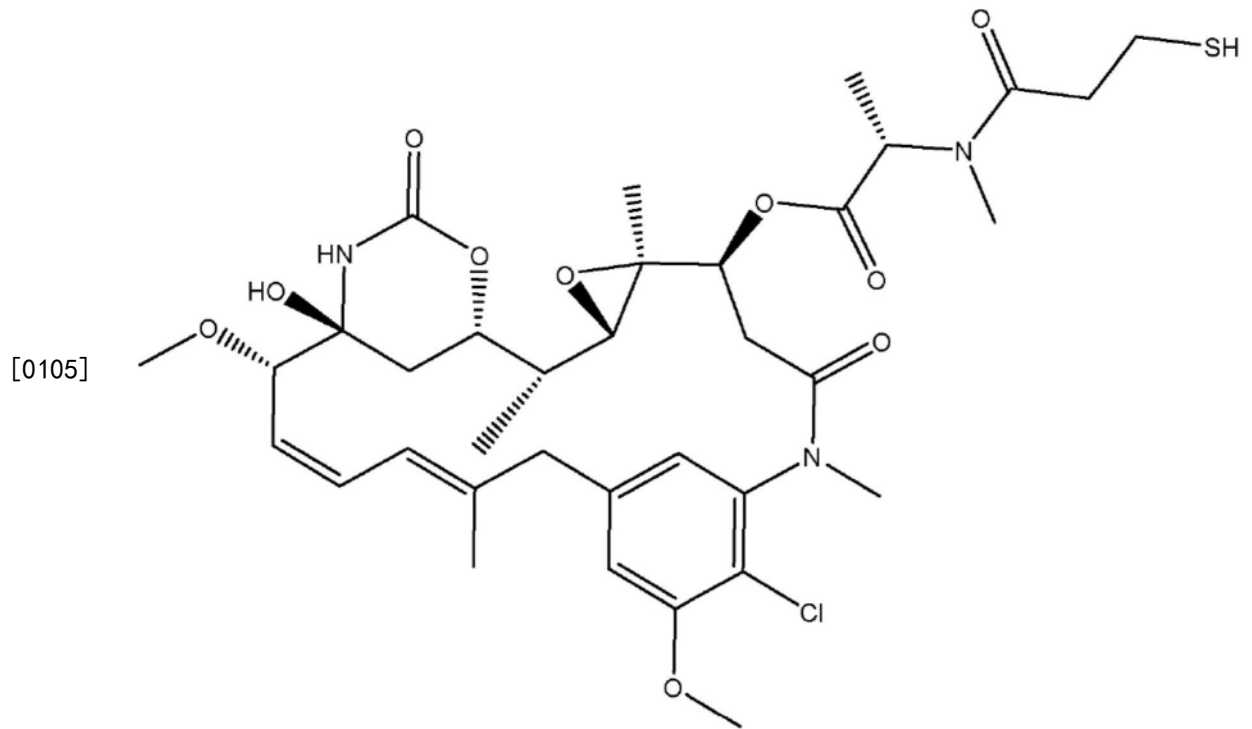
[0100] 在进一步的实施方案中,所述药物偶联物还偶联至一个或多个细胞毒性剂。

[0101] 因此,根据本发明的第二个方面,提供药物偶联物,其包含偶联到至少两个肽配体的一个或多个细胞毒性剂,所述肽配体可以相同或不同,每个包含多肽和非芳香族分子支架,所述多肽含有被至少两个环序列隔开的至少三个反应性基团,所述非芳香族分子支架与多肽的反应性基团形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

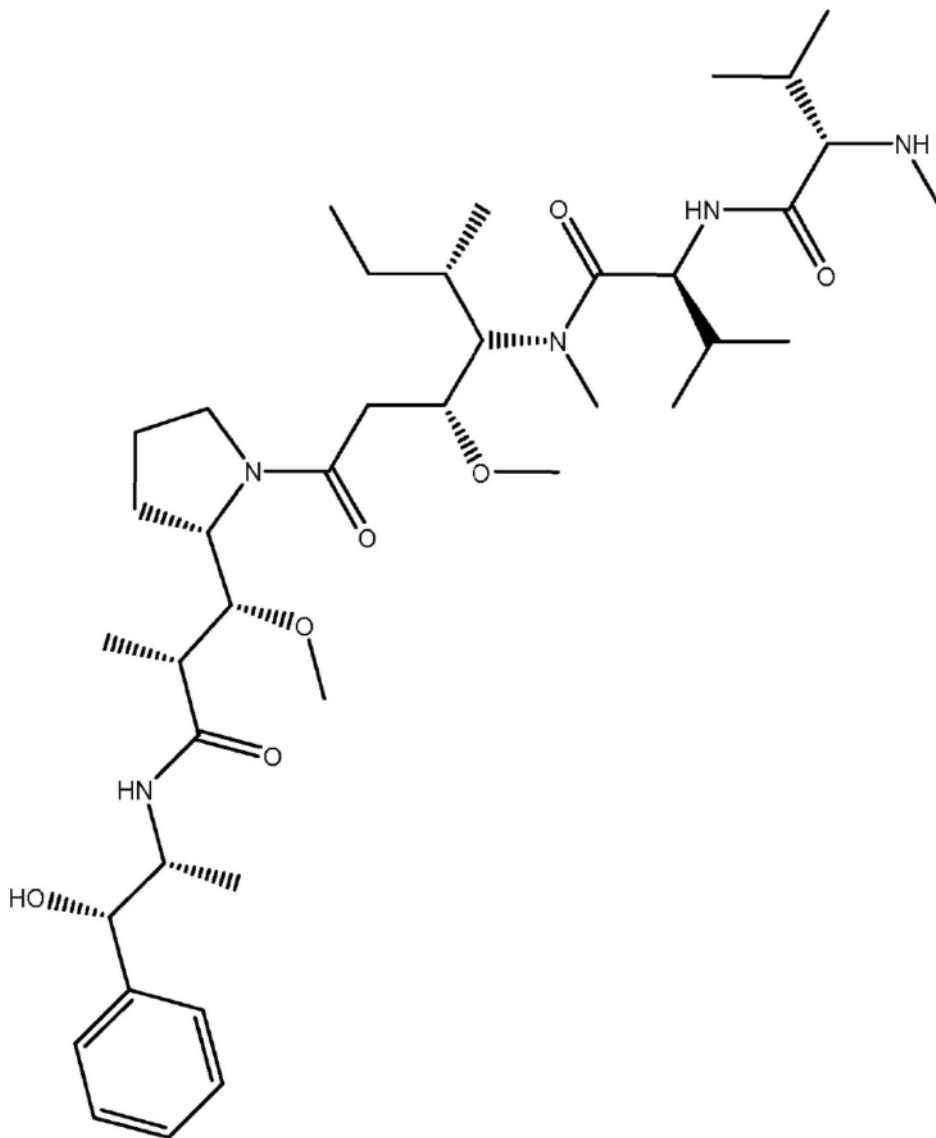
[0102] 合适的细胞毒性剂的示例包括:烷基化剂如顺铂和卡铂,以及奥沙利铂、二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺;抗代谢物,包括嘌呤类似物咪唑硫嘌呤和巯嘌呤或嘧啶类似物;植物生物碱和萜类化合物,包括长春花生物碱如长春新碱、长春花碱、长春瑞滨和长春地辛;鬼臼毒素及其衍生物依托泊苷和替尼泊苷;紫杉烷类,包括紫杉醇(paclitaxel),原名紫杉醇(Taxol);拓扑异构酶抑制剂,包括喜树碱:伊立替康(irinotecan)和托泊替康(topotecan),和II型抑制剂包括安吡啶、依托泊苷(etoposide)、磷酸依托泊苷和替尼泊苷。进一步的试剂可包括抗肿瘤抗生素,其包括免疫抑制剂放线菌素(用于肾脏移植)、阿霉素、表柔比星、博来霉素、刺孢霉素(calicheamycins)及其他。

[0103] 在本发明的一个实施方案中,所述细胞毒性剂选自美登木素生物碱(maytansinoids)(如DM1)或单甲基澳瑞他汀(auristatins)(如MMAE)。

[0104] DM1是一种细胞毒性剂,其为美登素的含硫醇衍生物并具有以下结构:



[0107]



[0108] 在本发明的一个又进一步的具体实施方案中,细胞毒性剂是(S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙烷-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)-N,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲氨基)丁酰胺基)丁酰胺(单甲基澳瑞他汀E;MMAE)。

[0109] 在一个实施方案中,细胞毒性剂通过可裂解键(例如,二硫键或对蛋白酶敏感的键)与双环肽连接。在进一步的实施方案中,与二硫键相邻的基团得到修饰以控制二硫键的阻碍,并由此控制裂解的速率和伴随的细胞毒性剂的释放。

[0110] 已发表的工作确定通过在二硫键的任一侧引入空间位阻,以改变二硫键对还原的易感性的可能性(Kellogg等人(2011),Bioconjugate Chemistry,22,717)。更大程度的空间位阻会降低通过细胞内谷胱甘肽以及细胞外(系统性)还原剂的还原率,从而降低了细胞内和细胞外毒素释放的容易程度。因此,可以通过仔细选择所述二硫键任一侧的阻碍程度,来选择循环中二硫化物稳定性(其将毒素的不期望的副作用最小化)相对于细胞内环境中的有效释放(其将治疗效果最大化)的优化。

[0111] 可以通过在分子构建体的靶向实体(此处为双环肽)或毒素侧引入一个或多个甲基来调节所述二硫键任一侧的阻碍。

[0112] 在一个实施方案中,所述细胞毒性剂和接头选自WO 2016/067035(其细胞毒性剂及接头通过引用并入本文)中描述的那些的任何组合。

[0113] 在一个实施方案中,所述细胞毒性剂与所述双环肽之间的接头包含一个或多个氨基酸残基。适合作为合适接头的氨基酸残基的示例包括Ala、Cit、Lys、Trp和Val。在进一步的实施方案中,所述细胞毒性剂与所述双环肽之间的接头包含Val-Cit部分。在进一步的实施方案中,所述细胞毒性剂与所述双环肽之间的接头包含 β -Ala部分。

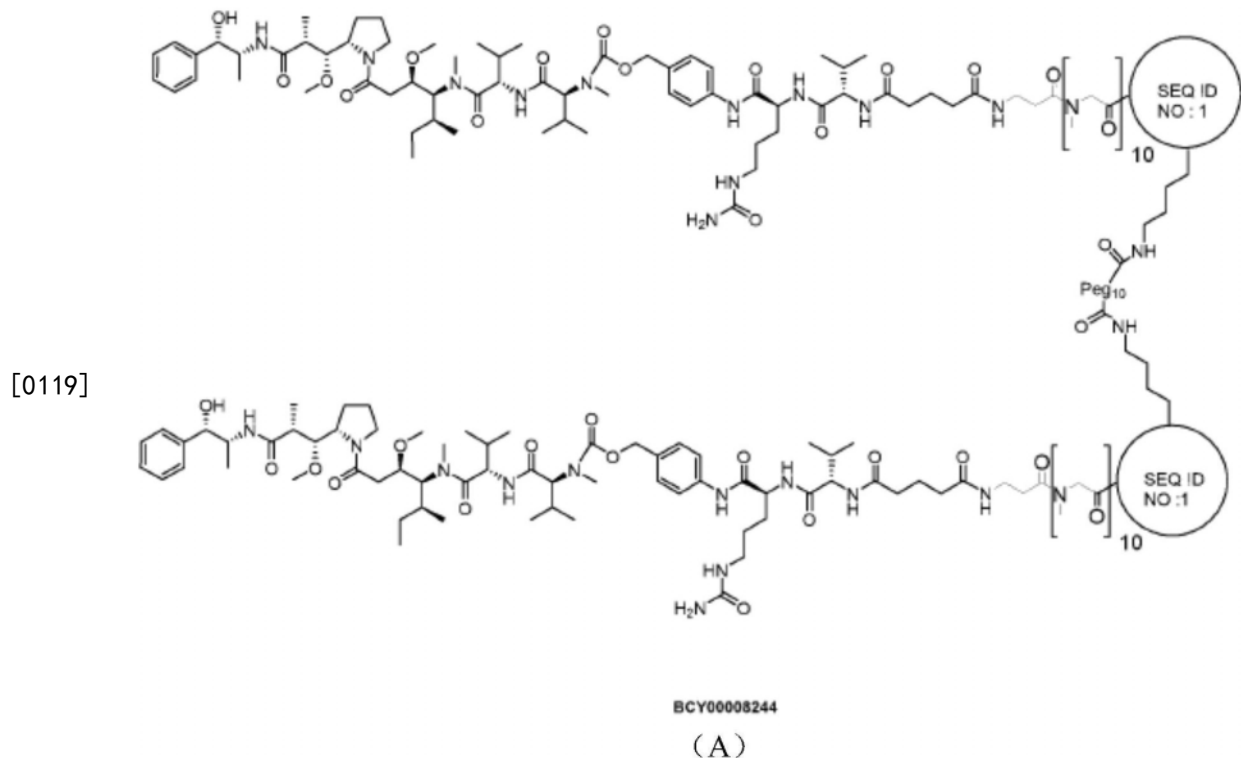
[0114] 在一个实施方案中,所述细胞毒性剂与所述双环肽之间的接头包含对氨基苄基氨基甲酸酯(PABC)。

[0115] 在一个实施方案中,所述细胞毒性剂与所述双环肽之间的接头包含戊二酰部分。

[0116] 在一个实施方案中,所述细胞毒性剂与所述双环肽之间的接头包含一个或多个(例如,10个)肌氨酸(Sar)残基。

[0117] 在进一步的实施方案中,所述细胞毒性剂与所述双环肽之间的接头包含-PABC-Val-Cit-Glu- β Ala-Sar₁₀-接头,其中所述双环肽在两个赖氨酸残基处通过PEG10部分结合(即,所得的双环肽药物偶联物包含(MMAE-PABC-Val-Cit-Glu- β Ala-Sar₁₀-双环肽)-PEG₁₀-(双环肽-Sar₁₀- β Ala-Glu-Cit-Val-PABC-MMAE)部分)。

[0118] 在一个实施方案中,所述偶联物包含两个双环肽,两个双环肽都特异于粘连蛋白-4(即,粘连蛋白-4同串联),细胞毒性剂是MMAE,并且所述药物偶联物包含式(A)的化合物:



[0120] 式(A)的BDC在本文中已知为BCY8244。数据在本文中显示在表1中,其显示BCY8244在SPR结合测定中显示良好的结合水平。特别地,粘连蛋白-4同串联的BCY8244在SPR结合测定中比单体的粘连蛋白-4双环肽BCY8126显示3.5倍更强的结合活性。数据还在图1以及表4和表5中显示,其显示BCY8244在H292异种移植模型中有效地使肿瘤消退。

[0121] 合成

[0122] 本发明的肽可以通过标准技术合成制造,然后与分子支架在体外反应。进行此操

作时,可以使用标准化学方法。这使得能够快速大规模地制备可溶性材料,以用于进一步的下游实验或验证。这样的方法可以使用如Timmerman等人(同上)中公开的常规化学方法来完成。

[0123] 因此,本发明还涉及如本文所述选择的多肽或偶联物的制造,其中所述制造包括如下所述的任选的进一步的步骤。在一个实施方案中,这些步骤在通过化学合成制备的最终产物多肽/偶联物上进行。

[0124] 制造偶联物或复合物时,目的多肽中的氨基酸残基可任选地被取代。

[0125] 肽也可以延伸,以并入例如另一个环并因此引入多种特异性。

[0126] 为了延伸所述肽,可以使用常规固相或溶液相化学方法,使用正交保护的赖氨酸(和类似物)简单地在其N-末端或C-末端或环内进行化学延伸。可以使用标准的(生物)偶联技术来引入已激活的或可激活的N-或C-末端。可选地,可以通过片段缩合或天然化学连接进行添加,例如(Dawson等人1994.Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation.Science 266:776-779)中描述的,或通过酶进行添加,例如使用变位酶(subtiligase),如(Chang等人,Proc Natl Acad Sci U S A.1994年12月20;91(26):12544-8或Hikari等人,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters第18卷,第22期,2008年11月15日,6000-6003页)中所述。

[0127] 可选地,可以通过二硫键的进一步偶联来延伸或修饰所述肽。这具有额外的优点,即允许第一和第二肽一旦在细胞的还原环境中即彼此解离。在这种情况下,可以在第一肽的化学合成过程中加入分子支架(例如,TATA),以便与三个半胱氨酸基团反应;然后可以进一步将半胱氨酸或硫醇附加到第一肽的N-或C-末端,使得该半胱氨酸或硫醇仅与第二肽的游离半胱氨酸或硫醇反应,形成二硫连接的双环肽-肽偶联物。

[0128] 类似的技术同样用于两个双环和双特异性大环的合成/偶联,潜在地产生四特异性分子。

[0129] 此外,可以使用适当的化学方法,以相同的方式实现在N-或C-末端或经由侧链偶联来添加其他官能团或效应子基团。在一个实施方案中,以不阻断任一个实体的活性的方式进行偶联。

[0130] 药物组合物

[0131] 根据本发明的进一步的方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所定义的肽配体或药物偶联物与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0132] 一般地,本发明的肽配体将以纯化形式与药理学上合适的赋形剂或载体(carrier)一起使用。通常,这些赋形剂或载体包括水性或醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和/或缓冲介质。肠胃外载剂(vehicle)包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠以及乳酸林格氏液。如果需要使多肽复合物保持悬浮,则合适的生理学上可接受的佐剂可以选自增稠剂如羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、明胶和藻酸盐。

[0133] 静脉内载剂包括液体和营养补充剂和电解质补充剂,如基于林格氏葡萄糖的那些。也可以存在防腐剂和/或其他添加剂,如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体(Mack(1982),Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版)。

[0134] 本发明的肽配体可以用作单独施用的组合物或与其他试剂联用。其可以包括抗体、抗体片段和各种免疫治疗药物,如环孢霉素、甲氨蝶呤、阿霉素或顺铂和免疫毒素。药物

组合物可以包括各种细胞毒性或其他试剂的“混合物(cocktails)”与本发明的蛋白质配体组合,或甚至与具有不同特异性的根据本发明选择的多肽组合,如使用不同靶标配体选择的多肽,无论其在施用前合并与否。

[0135] 根据本发明的药物组合物的施用途径可以是本领域普通技术人员通常已知的任何途径。为了治疗,可以根据标准技术将本发明的肽配体施用于任何患者。施用可以通过任何合适的方式进行,包括肠胃外、静脉内、肌肉内、腹膜内、经皮、经由肺途径、或者还适当地通过用导管直接输注进行。优选地,根据本发明的药物组合物将通过吸入施用。施用的剂量和频率将取决于患者的年龄、性别和病状、其他药物的同时施用、禁忌症和临床医生要考虑的其他参数。

[0136] 可以将本发明的肽配体冻干用于储存,并在使用前在合适的载体中重构。已经表明该技术是有效的,并且可以采用本领域已知的冻干和重构技术。本领域技术人员将认识到,冻干和重构可以导致不同程度的活性损失,并且可能必须向上调节水平以进行补偿。

[0137] 可以施用包含本发明的肽配体或其混合物的组合物以进行预防性和/或治疗性治疗。在某些治疗应用中,将足以完成所选择的细胞群体的至少部分抑制(inhibition)、抑制(suppression)、调节、杀死或一些其他可测量参数的量定义为“治疗有效剂量”。达到该剂量所需的量将取决于疾病的严重程度和患者自身免疫系统的一般状态,但一般为每千克体重0.005至5.0mg选择的肽配体,更常用的剂量为0.05至2.0mg/kg/剂。对于预防性应用,也可以以相似或稍低的剂量施用包含本发明的肽配体或其混合物的组合物。

[0138] 包含根据本发明的肽配体的组合物可以用于预防和治疗环境,以协助哺乳动物中所选择的靶细胞群体的改变、失活、杀死或去除。另外,本文所述的肽配体可以在体外(extracorporeally)或体外(in vitro)选择性地用于从异质细胞集合中杀死、消耗或以其他方式有效地去除靶细胞群体。可以将来自哺乳动物的血液与所选择的肽配体在体外组合,从而将不期望的细胞杀死或以其他方式从血液中去掉,用于根据标准技术返回至哺乳动物。

[0139] 治疗用途

[0140] 由于细胞毒性剂的存在,本发明的药物偶联物在治疗可通过细胞死亡缓解的疾病中具有特定用途。合适的疾病的示例包括以有缺陷的细胞类型为特征的疾病、增殖性疾病(如癌症)和自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎)。

[0141] 由于存在与结合癌细胞的双环肽偶联的细胞毒性剂,本发明的双环肽在癌症治疗中具有特定用途。因此,根据本发明的进一步的方面,提供了如本文所定义的药物偶联物用于预防、抑制或治疗癌症(例如,肿瘤)中的用途。

[0142] 根据本发明的进一步的方面,提供了一种预防、抑制或治疗癌症(例如,肿瘤)的方法,其包括向需要其的患者施用如本文所定义的药物偶联物。

[0143] 可以治疗(或抑制)的癌症(及其良性对应物)的示例包括但不限于:上皮起源的肿瘤(腺瘤和各种类型的癌,包括腺癌、鳞状癌、移行细胞癌和其他癌)如膀胱和泌尿道癌、乳腺癌、胃肠道癌(包括食道、胃(胃部)、小肠、结肠、直肠和肛门的癌症)、肝癌(肝细胞癌)、胆囊和胆道系统癌、胰腺外分泌癌、肾癌、肺癌(例如腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、支气管肺泡癌和间皮瘤)、头颈癌(例如舌癌、颊腔癌、喉癌、咽癌、鼻咽癌、扁桃体癌、唾液腺癌、鼻腔癌和鼻旁窦癌)、卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌、阴道癌、外阴癌、阴茎癌、宫颈癌、子宫肌层

癌、子宫内膜癌、甲状腺癌(例如甲状腺滤泡癌)、肾上腺癌、前列腺癌、皮肤和附件癌(例如黑色素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、角膜棘皮瘤和增生性痣);血液系统恶性肿瘤(即白血病、淋巴瘤)和血液系统癌前疾患以及边缘恶性肿瘤,包括淋巴系的血液学恶性肿瘤和相关病状的病症(例如,急性淋巴细胞性白血病[ALL]、慢性淋巴细胞性白血病[CLL]、B细胞淋巴瘤如弥漫性大B细胞淋巴瘤[DLBCL]、滤泡性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和白血病、自然杀伤性[NK]细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、毛细胞白血病、原因不明的单克隆丙种球蛋白病、浆细胞瘤、多发性骨髓瘤和移植后的淋巴增生性疾病),和骨髓系的血液系统恶性肿瘤和相关病症(例如,急性粒细胞性白血病[AML]、慢性粒细胞性白血病[CML]、慢性粒细胞性单核细胞性白血病[CMML]、高嗜酸细胞综合征、骨髓增生性疾病,如真性红细胞增多症、原发性血小板增多症和原发性骨髓纤维化、骨髓增生综合征、骨髓增生异常综合征和早幼粒细胞白血病);间充质起源的肿瘤,例如软组织肉瘤、骨或软骨肉瘤如骨肉瘤、纤维肉瘤、软骨肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、尤因氏肉瘤、滑膜肉瘤、上皮样肉瘤、胃肠道间质瘤、良性和恶性组织细胞瘤和隆突性皮肤纤维肉瘤;中枢或周围神经系统的肿瘤(例如,星形细胞瘤、神经胶质瘤和成胶质细胞瘤、脑膜瘤、室管膜瘤、松果体瘤和神经鞘瘤);内分泌肿瘤(例如,垂体瘤、肾上腺瘤、胰岛细胞瘤、甲状旁腺肿瘤、类癌瘤和甲状腺髓样癌);眼部和附属器肿瘤(例如,视网膜母细胞瘤);生殖细胞和滋养细胞肿瘤(例如畸胎瘤、精原细胞瘤、无性细胞瘤、葡萄胎和绒毛膜癌);以及小儿和胚胎肿瘤(例如,髓母细胞瘤、神经母细胞瘤、维尔姆斯瘤和原始神经外胚层肿瘤);或先天性或其他形式的综合征,其使患者容易患恶性肿瘤(例如,着色性干皮病)。

[0144] 在进一步的实施方案中,癌症选自:乳腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌、肝癌、胶质母细胞瘤和血管生成。

[0145] 本文提及的术语“预防”涉及在诱导疾病之前施用保护性组合物。“抑制”是指在诱导事件之后但在疾病的临床表现之前施用组合物。“治疗”涉及在疾病症状变得明显之后施用保护性组合物。

[0146] 已有可以用于筛选肽配体在预防或治疗疾病中的有效性的动物模型系统。本发明促进了动物模型系统的使用,其允许开发可以与人和动物靶标交叉反应的多肽配体,从而允许使用动物模型。

[0147] 以下参考下列实施例进一步描述本发明。

[0148] 实施例

[0149] 缩写

缩写	名称	前体名	供应商	目录编号
1NAI	1-萘丙氨酸	Fmoc-3-(1-萘基)-L-丙氨酸	Fluorochem	96402-49-2
β -Ala	β -丙氨酸	Fmoc- β -丙氨酸	Fluorochem	35737-10-1
Sar	肌氨酸,例如 Sar _x 表示 x 个 Sar 残基	Fmoc-肌氨酸 -OH	Sigma	77128-70-2
tBuGly	叔亮氨酸	Fmoc-L-叔亮氨酸	Fluorochem	132684-60-7

[0151] 材料和方法

[0152] 肽合成

[0153] 肽合成基于Fmoc化学,使用Peptide Instruments制造的Symphony肽合成仪和MultiSynTech制造的Syro II合成仪。使用标准的Fmoc-氨基酸(Sigma,Merck),其带有适当的侧链保护基团:在每种情况下均使用适用的标准偶联条件,然后使用标准方法进行脱保护。

[0154] 可选地,使用HPLC纯化肽,并在分离后将其用1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪(TATA,Sigma)修饰。为此,将线性肽用50:50的MeCN:H₂O稀释至约35mL,加入约500μL的100mM TATA的乙腈溶液,并用5mL的1M NH₄HCO₃的H₂O溶液引发反应。使反应在室温进行约30-60分钟,一旦反应完成即冻干(通过MALDI判断)。一旦完成,将1ml的1M L-半胱氨酸盐酸盐一水合物(Sigma)的H₂O溶液加入反应,在室温下持续约60分钟以淬灭任何过量的TATA。

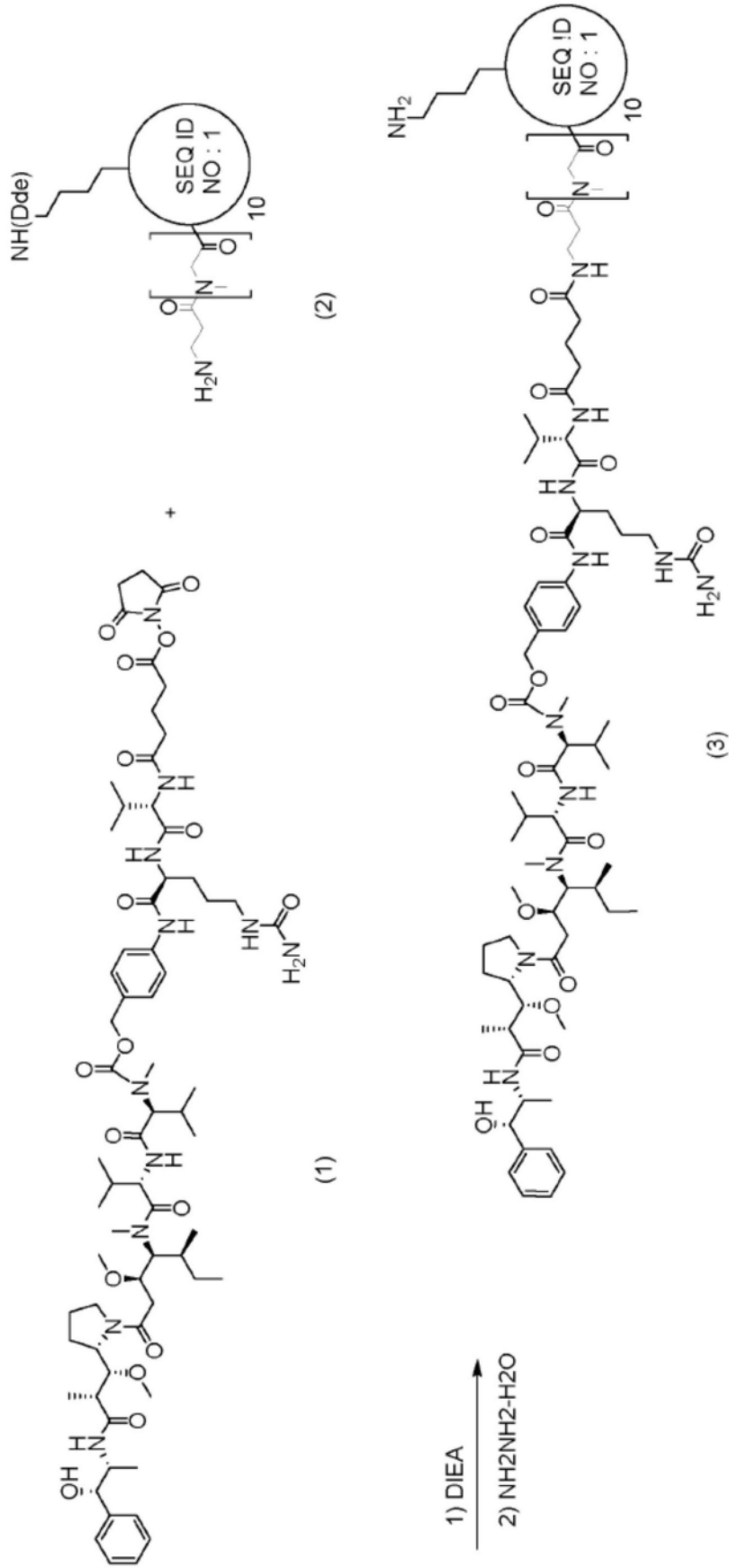
[0155] 冻干后,如上纯化修饰的肽,同时用Gemini C18柱(Phenomenex)替换LunaC8,并将酸改为0.1%的三氟乙酸。合并包含正确的TATA修饰材料的纯级分,冻干并在-20℃进行保存。

[0156] 除非另有说明,所有氨基酸均以L-构型使用。

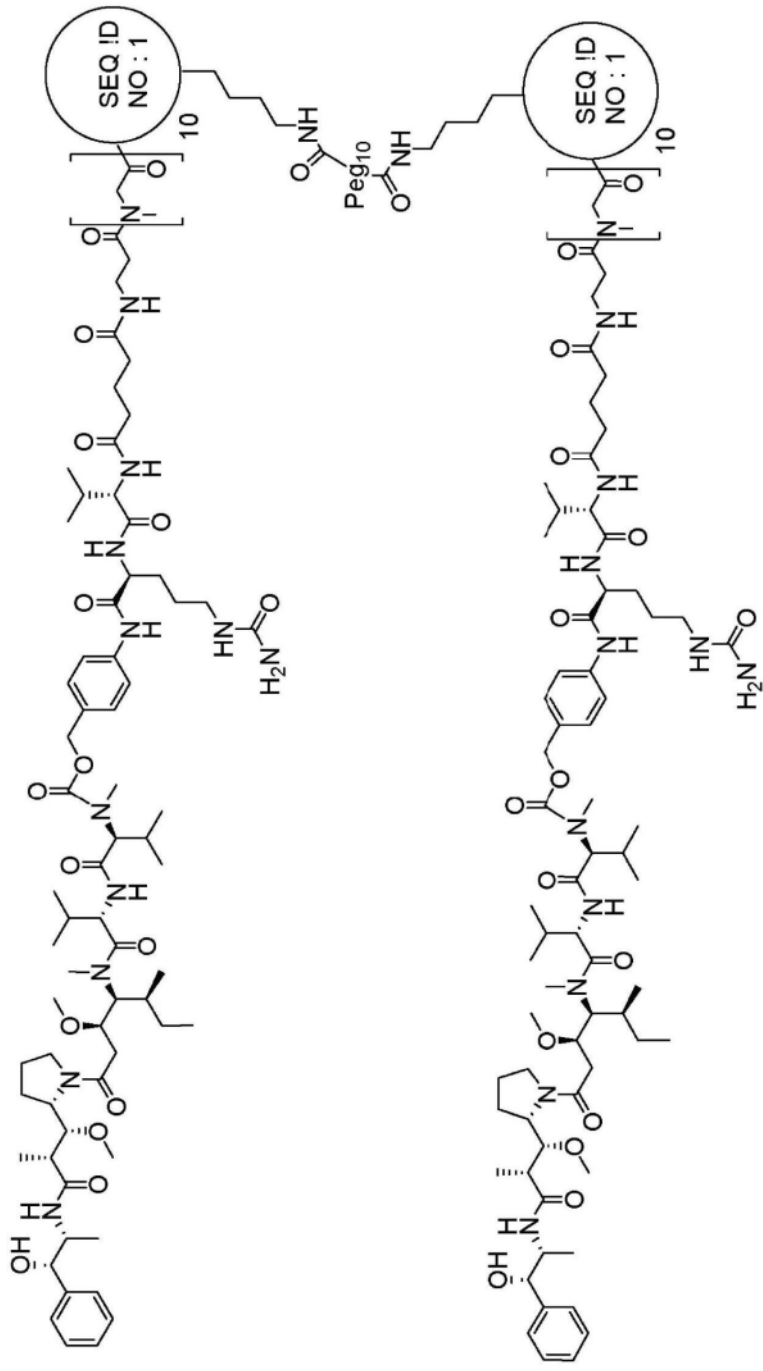
[0157] 在某些情况下,先将肽转化为激活的二硫化物,再使用以下方法将肽与毒素的游离硫醇基偶联:将干燥DMSO(1.25mol当量)中的4-甲基(琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶硫代)戊酸酯)(100mM)溶液加入到干燥DMSO(1mol当量)中的肽(20mM)溶液中。将反应充分混合并加入DIPEA(20mol当量)。通过LC/MS监测反应直至完成。

[0158]

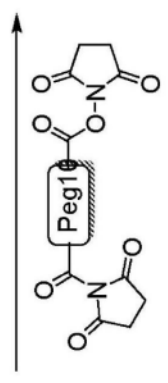
BCY8244 的制备



[0159]

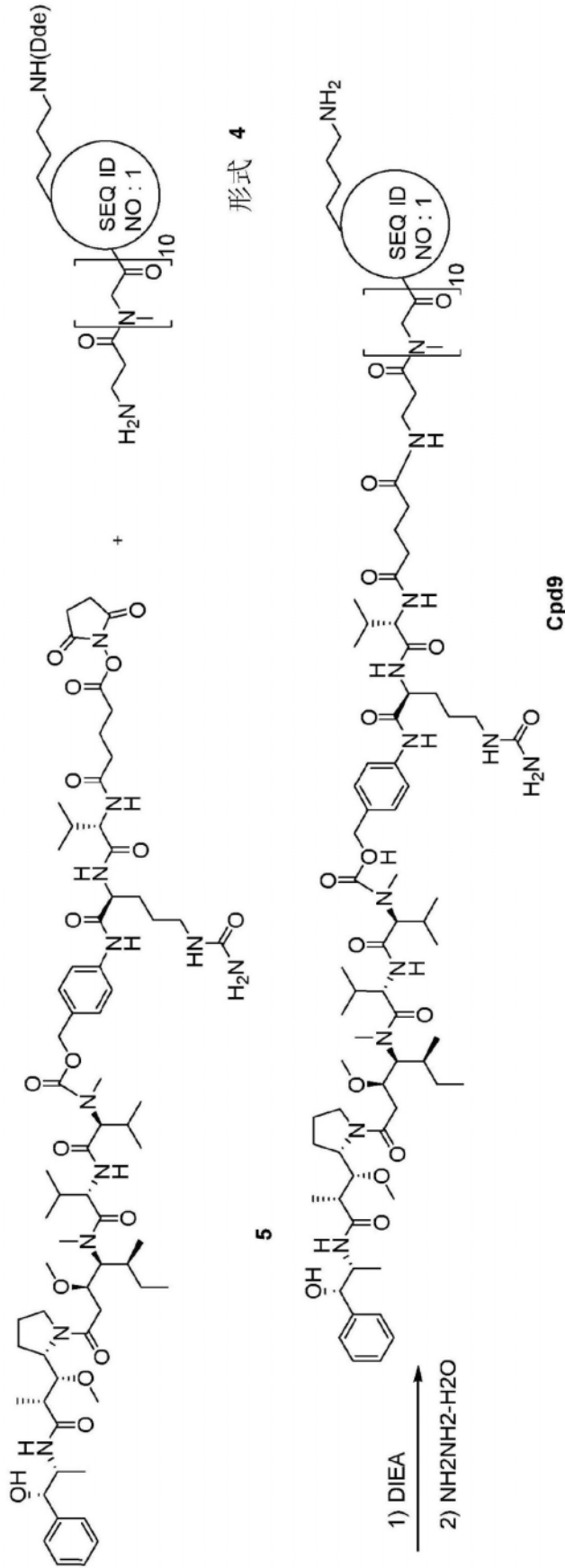


BCY00008244



[0160]

制备化合物3的通用步骤



[0161] 向化合物2 (216.11mg, 67.44 μ mol, 1.0eq) 的DMA (5mL) 溶液中加入DIEA (26.15mg, 202.31 μ mol, 35.24 μ L, 3.0eq) 和化合物1 (0.090g, 67.44 μ mol, 1.0eq)。将混合物在20 $^{\circ}$ C下搅

拌12小时。LC-MS显示化合物1被完全消耗,以及检测到一个具有期望m/z的主峰。

[0162] 加入水合肼(154.50mg,3.09mmol,0.15mL,45.88eq)。将混合物在25℃搅拌15分钟。LC-MS显示cpd9-inter被完全消耗,以及检测到一个具有期望m/z的主峰。通过制备型HPLC直接纯化反应(中性条件)。获得为白色固体的化合物3(0.192g,46.47μmol,产率69.08%)。LCMS m/z发现为1378.1[M+H]³⁺,RT=0.82分钟。

[0163] 制备BCY8244的通用步骤

[0164] 向化合物3(0.192g,46.47μmol,3.0eq)的DMA(2mL)溶液中加入DIEA(8.01mg,61.96μmol,10.79μL,4.0eq)和NHS-PEG10-NHS(11.66mg,15.49μmol,1.0eq)。将混合物在20℃下搅拌16小时。LC-MS显示化合物3被完全消耗,检测到一个具有期望m/z的主峰。通过制备型HPLC直接纯化反应(TFA条件)。获得白色固体状的化合物BCY8244(0.0354g,3.84μmol,24.81%产率,95.4%纯度)。LCMS m/z发现为1758.2[M+H]⁵⁺,RT=1.1分钟。

[0165] 数据

[0166] 粘连蛋白-4 Biacore SPR结合测定

[0167] 进行Biacore实验以确定单体肽与人粘连蛋白-4蛋白(获自Charles River)结合的 k_a (M⁻¹s⁻¹)、 k_d (s⁻¹)、 K_D (nM)值。

[0168] 将具有gp67信号序列的人粘连蛋白-4(残基Gly32-Ser349;NCBI RefSeq:NP_112178.2)和C-末端FLAG标签克隆进pFastbac-1以及使用标准的Bac-to-BacTM操作方案制备的杆状病毒(Life Technologies)中。使用P1病毒储液以2的MOI感染在27℃的在Excell-420培养基(Sigma)中的 1×10^6 ml⁻¹的Sf21细胞,在72小时收获上清。在4℃下用PBS洗涤的抗-FLAG M2亲和琼脂糖树脂(Sigma)分批结合上清液1小时,然后将树脂转移到柱上并用PBS彻底洗涤。用100μg/ml的FLAG肽洗脱蛋白。将洗脱的蛋白质浓缩至2ml,并以1ml/分钟的速度上样到PBS中的S-200 Superdex柱(GE Healthcare)上。收集2ml的级分并将含有粘连蛋白-4蛋白的级分浓缩至16mg/ml。

[0169] 按照制造商建议的操作方案,使用EZ-LinkTM Sulfo-NHS-LC-LC-生物素试剂(Thermo Fisher)在PBS中随机生物素化蛋白质。使用离心柱将蛋白质充分脱盐以将未偶联的生物素去除到PBS中。

[0170] 为了进行肽结合的分析,使用了利用CM5芯片(GE Healthcare)的Biacore 3000仪器。使用标准胺偶联化学方法,使用HBS-N(10mM HEPES,0.15M NaCl,pH 7.4)作为运行缓冲液,在25℃将链霉亲和素固定在芯片上。简要地,将1:1比例的0.4M 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)/0.1M N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)以10μL/分钟的流速注入7分钟,以激活羧甲基葡聚糖表面。为了捕获链霉亲和素,将蛋白质在10mM乙酸钠(pH 4.5)中稀释至0.2mg/mL,并通过将120μL的链霉亲和素注入激活的芯片表面进行捕获。用1M乙醇胺(pH8.5)注入7分钟封闭剩余的激活的基团,以1,200-1,800RU的水平捕获生物素化的粘连蛋白-4。将缓冲液更改为PBS/0.05%吐温20,并在该缓冲液中制备系列稀释的所述肽,其DMSO终浓度为0.5%。最高肽浓度为100nM,进行6次进一步的2倍稀释。SPR分析在25℃以50μl/分钟的流速运行,其中结合为60秒,以及解离取决于个体肽在400至1,200秒之间。针对DMSO排除体积效应校正了数据。使用标准处理程序对所有数据针对空白注入和参照表面进行双重参照(double-referenced),并使用Scrubber软件2.0c版(BioLogic Software)进行数据处理和动力学拟合。使用简单1:1结合模型拟合数据,以便在适当的情况下考虑质量传

递 (mass transport) 的影响。

[0171] BCY8244 (以及其组分单体粘连蛋白-4双环肽,BCY8126) 都在上述提到的粘连蛋白-4结合测定中测试,结果显示在下表1中:

[0172] 表1

肽	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (nM)
BCY8126 (粘连蛋白-4单体)	6.62e5	9.69e-4	1.46
BCY8244 (粘连蛋白-4同串联)	7.50e5	3.19e-4	0.425

[0174] BCY8244在Ba1b/c裸鼠中治疗NCI-H292异种移植物的体内疗效研究

[0175] 1. 研究目的

[0176] 研究的目的是为了评估BCY8244在Ba1b/c裸鼠中治疗NCI-H292异种移植物的体内抗肿瘤疗效。

[0177] 2. 实验设计

[0178] 表2

组	处理	n	剂量 (mg/kg)	给药体积 (ul/g)	给药途径	方案
1	载剂	4	--	10	iv	qw
2	BCY8244	3	3	10	iv	qw

[0180] 3. 材料

[0181] 3.1 动物和饲养条件

[0182] 3.1.1. 动物

[0183] 物种:小家鼠 (Mus Musculus)

[0184] 种系:Ba1b/c裸鼠

[0185] 周龄:6-8周

[0186] 性别:雌性

[0187] 体重:18-22克

[0188] 动物数量:43只小鼠加上备用

[0189] 动物供应商:上海灵昌生物技术实验动物有限公司

[0190] 3.1.2. 饲养条件

[0191] 将小鼠以恒定的温度和湿度保持在单独的通风笼中,每笼中有3或4只动物。

[0192] • 温度:20~26℃。

[0193] • 湿度40-70%。

[0194] 笼子:由聚碳酸酯制成。尺寸是300mm×180mm×150mm。铺垫材料是玉米芯,每周更换两次。

[0195] 饮食:在整个研究期间,动物可自由食用经辐射灭菌的干燥颗粒食物。

[0196] 饮水:动物可以自由饮用无菌饮用水。

[0197] 笼识别:每个笼的识别标签包含以下信息:动物数量、性别、种系、接收日期、处理、研究编号、组号和处理开始日期。

[0198] 动物识别:用耳朵编码标记动物。

[0199] 3.2 测试和阳性对照物

- [0200] 产品识别:BCY00008244
 [0201] 制造商:Bicycle Therapeutics
 [0202] 批号:1
 [0203] 物理描述:冻干粉末
 [0204] 分子量:8786.4
 [0205] 纯度:95.00%
 [0206] 包装和储存条件:在-80℃储存
 [0207] 4. (b) 实验方法与步骤

[0208] 4.1细胞培养

[0209] 将NCI-H292肿瘤细胞在37℃、在空气中5%的CO₂气氛中在体外以单层培养物维持在RPMI-1640培养基中,该培养基补充有10%热灭活的胎牛血清。通过胰蛋白酶-EDTA处理,每周两次对肿瘤细胞进行常规传代培养。收获在指数生长期生长的细胞并计数,用于肿瘤接种。

[0210] 4.2肿瘤接种

[0211] 在每只小鼠的右侧皮下接种0.2ml的含有NCI-H292肿瘤细胞(10×10^6)的PBS用于肿瘤发生。当平均肿瘤体积达到168mm³时,对43只动物随机分组。在实验设计表中显示了每组中的测试物施用和动物数量。

[0212] 4.3测试物制剂的制备

[0213] 表3

治疗	浓度 (mg/ml)	制剂
[0214] 载剂	--	25 mM 组氨酸, 10%蔗糖, pH7
BCY8244	1	1.1 mg BCY8244 溶解在 1045 μl 载剂缓冲液中
BCY8244	0.3	使用 560 μl 载剂缓冲液稀释 240 μl 的 1 mg/ml 的 BCY8244 储液

[0215] 4.4观察报告

[0216] 本研究与动物操作、看护和处理有关的所有步骤均按照无锡AppTec动物护理和使用委员会机构(IACUC)批准的指南进行,并遵循实验室动物护理的评估与鉴定协会(AAALAC)的指导。在常规监测时,检查动物的肿瘤生长和治疗对正常行为的任何影响,例如活动性、食物和水的消耗(仅通过目测),体重增加/减少,眼睛/毛发消光以及其他任何异常影响,如规程中所规定的。根据每个亚组中的动物编号记录死亡和观察到的临床体征。

[0217] 4.5肿瘤测量和终点

[0218] 主要终点是观察是否可以延缓肿瘤生长或是否可以治愈小鼠。使用卡尺每周三次以二维测量肿瘤体积,并使用下式以mm³表示体积: $V=0.5a \times b^2$,其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。然后将肿瘤尺寸用于T/C值的计算。T/C值(百分比)是抗肿瘤疗效的指标;T和C分别是在指定天的治疗组和对照组的平均体积。

[0219] 使用下式计算每组的TGI: $TGI(\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$;T_i是指定某天的治疗组的平均肿瘤体积,T₀是治疗开始当天的治疗组的平均肿瘤体积,V_i是与T_i同一天的载剂对照组的平均肿瘤体积,以及V₀是治疗开始当天的载剂组的平均肿瘤体积。

[0220] 4.6样品收集

[0221] 在研究的终点,在末次给药之后的5分钟、15分钟、30分钟、1小时和2小时收集第2、5、9、10、11、12组小鼠的血浆。在末次给药之后的2小时针对FFPE收集第1、5、6、12组小鼠的肿瘤。

[0222] 4.7统计分析

[0223] 提供每个时间点的各组肿瘤体积的汇总统计数据,包括平均值和平均值的标准误差(SEM)。

[0224] 根据末次给药之后在最佳治疗时间点获得的数据,对各组之间的肿瘤体积差异进行统计学分析。

[0225] 进行t-检验以比较各组之间的肿瘤体积,当t-检验显著时。所有数据使用GraphPad Prism 5.0分析。 $P < 0.05$ 视为具有统计学显著性。

[0226] 5.结果

[0227] 5.1体重改变和肿瘤生长曲线

[0228] 体重和肿瘤生长曲线如图1所示。

[0229] 5.2肿瘤体积轨迹

[0230] 下表4中显示携带NCI-H292异种移植物的雌性Balb/c裸鼠中的平均肿瘤体积随时间的变化。

[0231] 表4:肿瘤体积随时间变化的轨迹

组	治疗	治疗开始后的天数						
		0	2	4	7	9	11	14
[0232] 1	载剂, qw	168±16	297±48	362±58	460±62	548±69	697±102	843±152
2	BCY8244, 3 mpk, qw	168±20	187±20	180±48	155±33	141±29	96±23	108±15

[0233] 5.3肿瘤生长抑制分析

[0234] 根据治疗开始后第14天的肿瘤体积测量,计算NCI-H292异种移植模型中测试物的肿瘤生长抑制率。

[0235] 表5:肿瘤生长抑制分析

组	治疗	肿瘤体积 (mm ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P 值
[0236] 1	载剂, qw	843±152	--	--	--
2	BCY8244, 3 mpk, qw	108±15	12.8	109.0	$p < 0.01$

[0237] a. 平均值±SEM。

[0238] b. 通过用治疗组的组平均肿瘤体积除以对照组的组平均肿瘤体积(T/C)来计算肿瘤生长抑制。

[0239] 6.结果汇总与讨论

[0240] 在该研究中,评估BCY8244在NCI-H292异种移植模型中的治疗疗效。在各个时间点所有治疗组中测量的体重和肿瘤体积显示在图1以及表4和表5中。

[0241] 在第14天,经载剂治疗的小鼠的平均肿瘤尺寸达到843mm³。

- [0242] BCY8244表现出优异级别的肿瘤抑制效果,有效地使肿瘤消退。
- [0243] 在该研究中,所有小鼠都保持良好的体重。

<223> Xaa是Sar10

<220>

<221> Xaa

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa是1Na1

<220>

<221> Xaa

<222> (15) .. (15)

<223> Xaa是HyP

<400> 2

Xaa Xaa Cys Pro Xaa Asp Cys Met Lys Asp Trp Ser Thr Pro Xaa Trp

1

5

10

15

Cys

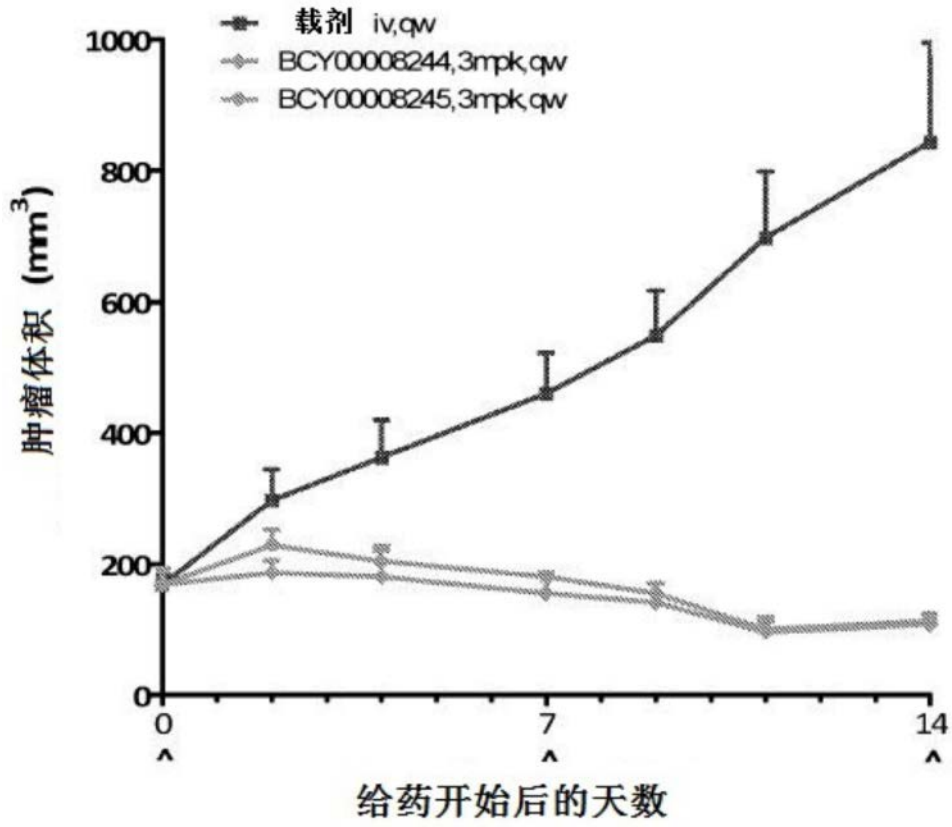


图1