



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} A61P 35/00; C07K 7/54; A61K 38/12; (13) B
A61K 47/50



1-0049678

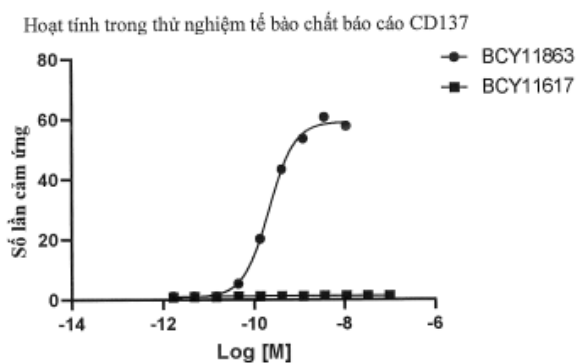
-
- (21) 1-2022-01217 (22) 30/07/2020
(86) PCT/GB2020/051828 30/07/2020 (87) WO 2021/019244 04/02/2021
(30) 62/880,191 30/07/2019 US; 62/910,088 03/10/2019 US; 62/931,442 06/11/2019 US;
63/022,667 11/05/2020 US; 63/024,715 14/05/2020 US
(45) 25/08/2025 449 (43) 26/09/2022 414A
(73) Bicycletx Limited (GB)
Blocks A & B, Portway Building, Granta Park, Great Abington, Cambridge CB21
6GS, United Kingdom
(72) Kevin MCDONNELL (US); Punit UPADHYAYA (NP); Johanna LAHDENRANTA
(US); Gemma MUDD (GB).
(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)
-

- (54) PHỨC HỢP PEPTIT HAI VÒNG KHÁC NHAU NỐI TIẾP VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA PHỨC HỢP PEPTIT NÀY

(21) 1-2022-01217

(57) Sáng chế đề cập đến phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp bao gồm phối tử peptit thứ nhất, liên kết với Nectin-4, được liên hợp thông qua cầu nối với hai phối tử peptit thứ hai, liên kết với CD137. Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp này trong ngăn ngừa, phòng chống hoặc điều trị bệnh ung thư.

A



B

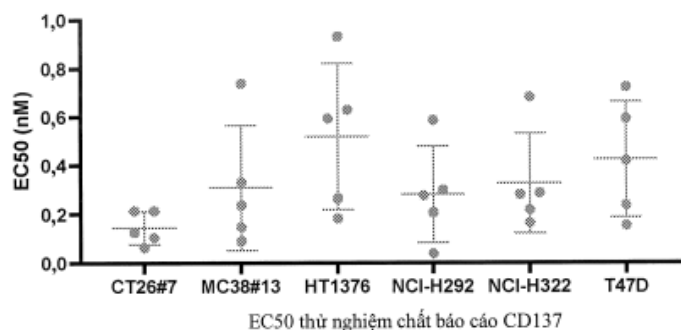


Fig. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp mà chứa phối tử peptit thứ nhất, mà liên kết với Nectin-4, được liên hợp thông qua cầu nối với hai phối tử peptit thứ hai, mà liên kết với CD137. Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp này trong ngăn ngừa, phòng chống hoặc điều trị bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Peptit vòng có thể liên kết bằng ái lực cao và hướng tính đặc hiệu đến các đích protein và do đó là lớp phân tử hấp dẫn để nghiên cứu phát triển các liệu pháp trị liệu. Trong thực tế, một vài peptit vòng đã được sử dụng thành công trong lâm sàng, như ví dụ, peptit kháng khuẩn vancomycin, thuốc ức chế miễn dịch cyclosporin hoặc thuốc chống ung thư octreotide (Driggers *et al.* (2008), Nat Rev Drug Discov 7 (7), 608-24). Đặc tính liên kết tốt do bề mặt tương tác tương đối lớn được tạo ra giữa peptit và đích cũng như độ linh động cấu hình của cấu trúc vòng giảm đi. Thông thường, các vòng lớn liên kết với bề mặt bằng một vài trăm angstrom vuông, ví dụ như peptit vòng CXCR4 chất đối kháng CVX15 (400 Å²; Wu *et al.* (2007), Science 330, 1066-71), peptit vòng có môtip Arg-Gly-Asp liên kết với integrin αVβ3 (355 Å²) (Xiong *et al.* (2002), Science 296 (5565), 151-5) hoặc chất ức chế peptit vòng upain-1 liên kết với chất hoạt hóa plasminogen kiểu urokinase (603 Å²; Zhao *et al.* (2007), J Struct Biol 160 (1), 1-10).

Do kết cấu vòng của chúng, các vòng peptit lớn ít linh động hơn so với peptit mạch thẳng, dẫn đến mất ít entropi hơn khi liên kết với các đích và dẫn đến có ái lực liên kết cao hơn. Độ linh động giảm đi cũng dẫn đến làm khóa cấu hình đặc hiệu đích, làm tăng tính đặc hiệu liên kết so với peptit mạch thẳng. Tác dụng này đã được chứng minh bằng chất ức chế có chọn lọc và hiệu nghiệm của cơ chất metalloproteinase 8 (MMP-8), mà làm mất tính chọn lọc của nó với các MMP khác khi vòng của nó được mở ra (Cherney *et al.* (1998), J Med Chem 41 (11), 1749-51). Các đặc tính liên kết có lợi đạt được thông qua việc tạo vòng lớn thậm chí còn rõ ràng hơn ở peptit đa vòng có nhiều hơn một vòng peptit ví dụ như trong vancomycin, nisin và actinomycin.

Các đội nghiên cứu khác nhau trước đây đã gắn polypeptit với gốc xystein thành một cấu trúc phân tử tổng hợp (Kemp and McNamara (1985), J. Org. Chem; Timmerman *et al.* (2005), ChemBioChem). Meloen và cộng sự đã sử dụng tris(brommetyl)benzen và các phân tử liên quan để tạo vòng nhanh và nhiều thông lọng peptit đa vòng lên trên khung tổng hợp để bắt chước cấu trúc của bề mặt protein (Timmerman *et al.* (2005), ChemBioChem). Phương pháp tạo ra hợp chất thuốc ứng viên trong đó hợp chất này được tạo ra bằng cách liên kết xystein chứa polypeptit với khung phân tử ví dụ như 1,1',1''-(1,3,5-triazinan-1,3,5-triyl)triprop-2-en-1-on (TATA) đã được bộc lộ trong WO 2019/122860 và WO 2019/122863.

Các cách tiếp cận tổ hợp dựa trên trình diện thực khuẩn thể đã được nghiên cứu phát triển để tạo và sàng lọc các thư viện lớn của các peptit hai vòng để hướng đến các đích quan tâm (Heinis *et al.* (2009), Nat Chem Biol 5 (7), 502-7 and WO 2009/098450). Tóm lại, các thư viện tổ hợp của peptit mạch thẳng chứa ba gốc xystein và hai vùng gồm sáu axit amin ngẫu nhiên (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys) được trình diện trên thực khuẩn thể và được tạo vòng bằng cách liên kết cộng hóa trị chuỗi bên xystein với phân tử nhỏ (tris-(brommetyl)benzen).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, sáng chế đề xuất phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp bao gồm:

(a) phối tử peptit thứ nhất liên kết với Nectin-4 và có trình tự C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 1; BCY8116); được liên hợp thông qua cầu nối N-(axit-PEG₃)-N-bis(PEG₃-azit) với

(b) hai phối tử peptit thứ hai liên kết với CD137, cả hai đều có trình tự Ac-C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 2; BCY8928);

trong đó mỗi phối tử trong các phối tử peptit đã nêu bao gồm polypeptit chứa ba nhóm xystein phản ứng (C_i, C_{ii} và C_{iii}), được phân tách bởi hai trình tự thông lọng, và một khung phân tử là 1,1',1''-(1,3,5-triazinan-1,3,5-triyl)triprop-2-en-1-on (TATA) và tạo thành liên kết cộng hóa trị với các nhóm xystein phản ứng của polypeptit sao cho hai thông lọng polypeptit được tạo ra trên khung phân tử;

trong đó Ac tương ứng với axetyl, HArg tương ứng với homoarginin, HyP ương

ứng với trans-4-hydroxy-L-prolin, lNal ương ứng với 1-naphtylalanin, tBuAla tương ứng với t-butyl-alanin, PYA tương ứng với axit 4-pentynoic và Nle tương ứng với norleuxin.

Theo khía cạnh tiếp theo của sáng chế, được đề xuất là được phẩm chứa phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp như được định nghĩa ở trên kết hợp với một hoặc nhiều tá được được dụng.

Theo khía cạnh tiếp theo của sáng chế, được đề xuất là phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp như được định nghĩa ở trên để sử dụng trong ngăn ngừa, phòng chống hoặc điều trị ung thư.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: (A) Phân tích phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 trong thử nghiệm chất báo cáo Promega CD137 luciferaza với sự có mặt của các tế bào H292 biểu hiện Nectin-4. BCY11617 là phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp mà liên kết với Nectin-4 bằng ái lực tương tự như với BCY11863 nhưng không liên kết với CD137. (B) Sơ lược về EC50 (nM) của BCY11863 trong thử nghiệm chất báo cáo Promega CD137 luciferaza khi đồngnuôi cấy với các dòng tế bào khác nhau, mà biểu hiện Nectin-4 nội sinh hoặc được thiết kế để biểu hiện quá mức Nectin-4.

Fig.2: Phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 gây tiết xytokin IFN- γ (Fig.2A) và IL-2 (Fig 2B) trong thử nghiệm cùng nuôi cấy PBMC-4T1. Tế bào 4T1 được thiết kế để biểu hiện Nectin-4. BCY11617 là phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp mà liên kết với Nectin-4 bằng ái lực tương tự như với BCY11863 nhưng không liên kết với CD137. Fig.2C trình bày sơ lược về EC50 (nM) của BCY11863 trong thử nghiệm tiết xytokin với nhiều người cho PBMC ở người và dòng tế bào khối u.

Fig.3: Dược động học của phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp BCY11863 ở chuột đồng SD và khỉ đuôi dài (cyno) dùng theo đường tĩnh mạch lần lượt tại 2 mg/kg (n = 3) và 1 mg/kg (n = 2).

Fig.4: Hoạt tính chống khối u của BCY11863 ở mô hình khối u MC38 biểu hiện quá mức Nectin-4 ở chuột nhà đồng gen (MC38#13). Thử nghiệm khối u trong và sau khi điều trị BCY11863. Số lượng chuột nhà đáp ứng hoàn toàn (CR) vào ngày D69 được

ghi trong ngoặc đơn. QD: liều lượng hàng ngày; Q3D: liều lượng mỗi ba ngày; ip: dùng trong màng bụng.

Fig.5: Điều trị bằng BCY11863 tạo ra ghi nhớ miễn dịch với tế bào khối u MC38 biểu hiện quá mức Nectin-4 (MC38#13). Thử nghiệm khối u được đưa ra sau khi tiêm cho chuột nhà C57BL/6J-hCD137 chưa từng thử nghiệm hoặc những chuột nhà có đáp ứng hoàn toàn (CR) với BCY11863. Lưu ý rằng không có con chuột nào trong số các chuột nhà CR phát triển khối u vào cuối khoảng thời gian quan sát (22 ngày).

Fig.6: BCY11863 chứng minh hoạt tính chống khối u trong mô hình khối u CT26 biểu hiện quá mức Nectin-4 đồng gen ở chuột nhà (CT26#7). Thử nghiệm khối u trong khi điều trị BCY11863. Q3D: liều lượng mỗi ba ngày; ip: dùng trong màng bụng.

Fig.7: Tế bào T tổng số và tế bào T CD8⁺ tăng lên ở mô khối u CT26#7 1 giờ sau khi liều lượng Q3D cuối cùng (liều thứ 6) của BCY11863. Phân tích (A) tế bào T tổng số, tế bào T CD8⁺, tế bào T CD4⁺, tế bào Tregs và (B) tỷ lệ tế bào T CD8⁺/Treg trong mô khối u CT26#7 1 giờ sau liều Q3D cuối cùng của BCY11863.

Fig.8: Đặc tính dược động học của BCY11863 trong huyết tương và mô khối u của động vật mang khối u đồng gen CT26#7 sau khi dùng một lần duy nhất theo đường tĩnh mạch (iv) 5 mg/kg BCY11863.

Fig.9: Nồng độ huyết tương theo thời gian của BCY11863 từ liều lượng 15 mg/kg theo đường trong màng bụng ở chuột nhà CD-1 (n =3) và thời gian bán hủy cuối trong huyết tương đối với BCY11863.

Fig.10: Nghiên cứu liên kết cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface plasmon resonance - SPR) của BCY11863 với (A) Nectin-4 và (B) CD137 được cố định. Thử nghiệm SPR liên kết đôi cố định (C) CD137 và (D) Nectin-4 trên chip SPR, sau đó được bắt giữ bằng BCY11863. Ái lực của BCY11863 liên kết với Nectin-4 (C) hoặc CD137 (D) ở người hòa tan được đo bằng cách cho thụ thể hòa tan được chảy qua chip ở các nồng độ khác nhau. (E) Liên kết BCY13582 (BCY11863 được biotin hóa) được cố định trên chip SPR streptavidin với CD137 người hòa tan.

Fig.11: Kỹ thuật microarray tế bào của Retrogenix được sử dụng để khám phá các tương tác chệch đích không đặc hiệu của BCY13582 (BCY11863 được biotin hóa). Được trình bày ở đây là dữ liệu sàng lọc cho thấy rằng 1 μ M BCY13582 được thêm vào

các bản kính microarray biểu hiện 11 protein khác nhau chỉ liên kết với CD137 và Nectin-4 (được phát hiện bằng cách sử dụng streptavidin có gắn nhãn AlexaFluor647). Tín hiệu liên kết bị thay thế khi ủ với BCY11863.

Fig.12: Đường cong sinh trưởng khối u của khối u MC38 #13 ở chuột nhà huCD137 C57Bl/6 chứng minh hoạt tính chống khối u của BCY11863 sau các liều lượng và khoảng cách liều khác nhau. Số lượng động vật đáp ứng hoàn toàn (CR; không sờ thấy khối u) vào ngày thứ 15 sau khi bắt đầu điều trị được ghi trong ngoặc đơn.

Fig.13: Đường cong sinh trưởng khối u (trung bình $\pm$ SEM) của khối u MC38#13 ($n = 6$ /đợt) ở chuột nhà huCD137 C57Bl/6 chứng minh hoạt tính chống khối u của BCY11863 tại các liều lượng và phác đồ liều khác nhau. Số lượng động vật đáp ứng hoàn toàn (CR; không sờ thấy khối u) vào ngày thứ 52 sau khi bắt đầu điều trị được ghi trong ngoặc đơn. (A) đợt liều lượng với tá được lỏng hoặc hoặc 3 mg/kg tổng liều hàng tuần của BCY11863. (B) đợt liều lượng với tá được lỏng hoặc hoặc 10 mg/kg tổng liều hàng tuần của BCY11863. (C) đợt liều lượng với tá được lỏng hoặc hoặc 30 mg/kg tổng liều hàng tuần của BCY11863.

Fig.14: Dược động học của phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp BCY11863 ở chuột đồng SD dùng theo đường tĩnh mạch với 100 mg/kg ($n = 3$) và đo nồng độ của BCY11863 và các chất chuyển hóa tiềm năng BCY15155 và BCY14602 trong huyết tương.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, sáng chế đề xuất phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp bao gồm:

(a) phối tử peptit thứ nhất mà liên kết với Nectin-4 và có trình tự $C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 1; BCY8116); được liên hợp thông qua cầu nối N-(axit-PEG₃)-N-bis(PEG₃-azit) với

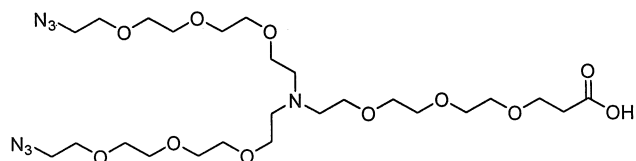
(b) hai phối tử peptit thứ hai, mà liên kết với CD137, cả hai đều có trình tự $Ac-C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A$ (SEQ ID NO: 2; BCY8928);

trong đó mỗi phối tử trong các phối tử peptit đã nêu bao gồm polypeptit chứa ba nhóm xystein phản ứng (C_i , C_{ii} và C_{iii}), được phân tách bằng hai trình tự thông lỏng, và một khung phân tử là 1,1',1''-(1,3,5-triazinan-1,3,5-triyl)triprop-2-en-1-on (TATA) và

tạo thành liên kết cộng hóa trị với các nhóm xystein phản ứng của polypeptit sao cho hai thông lọng polypeptit được tạo ra trên khung phân tử;

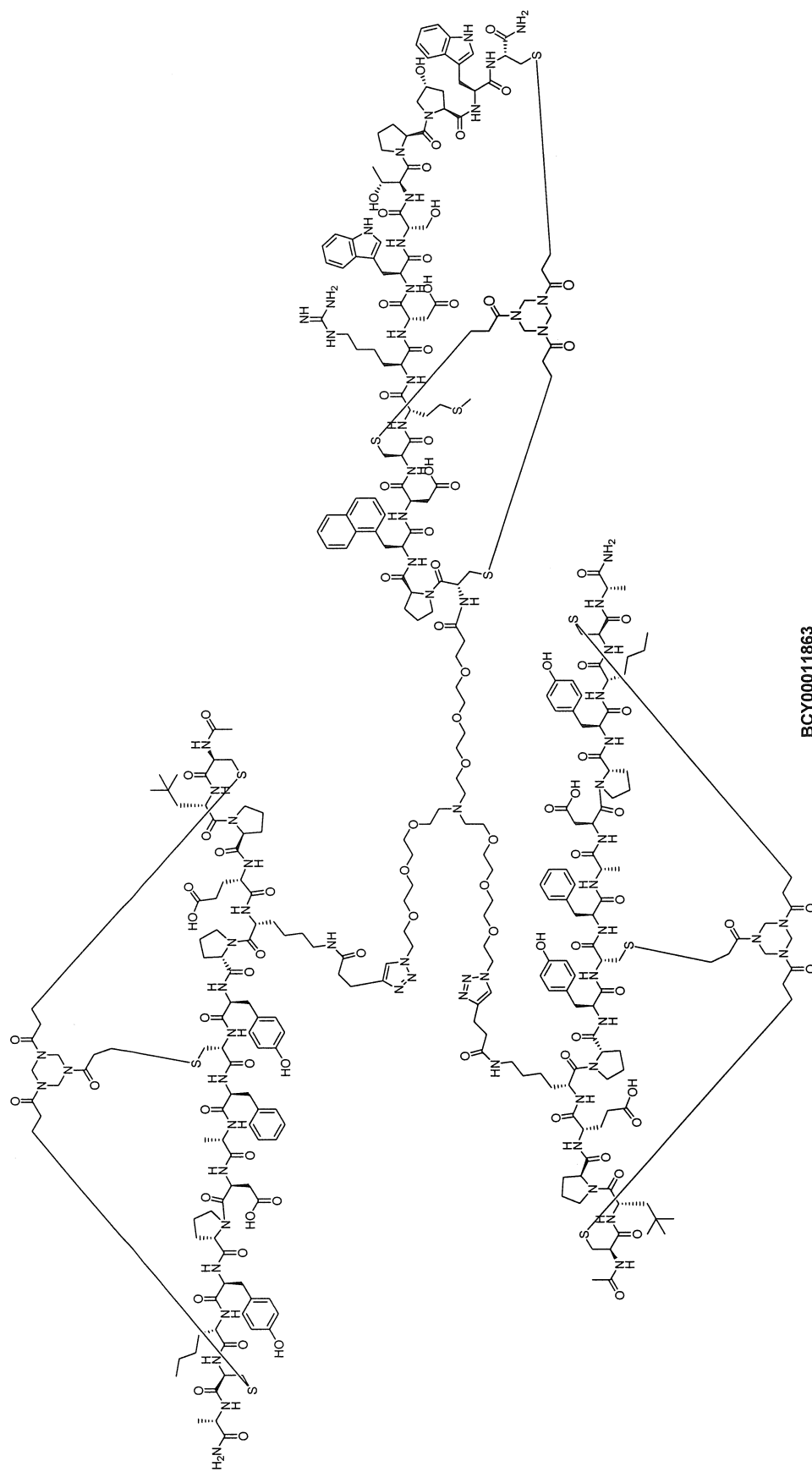
trong đó Ac tương ứng với axetyl, HArg tương ứng với homoarginin, HyP tương ứng với trans-4-hydroxy-L-prolin, 1Nal tương ứng với 1-naphtylalanin, tBuAla tương ứng với t-butyl-alanin, PYA tương ứng với axit 4-pentynoic và Nle tương ứng với norleuxin.

Các tham chiếu ở đây đến cầu nối N-(axit-PEG₃)-N-bis(PEG₃-azit) bao gồm:



N-(axit-PEG₃)-N-bis(PEG₃-azit).

Trong một phương án, phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp là BCY11863:



Chi tiết đầy đủ về BCY11863 được trình bày trong bảng A dưới đây:

Bảng A: Thành phần của BCY11863

Phức hợp số	Nectin-4 BCY số	Điểm gắn kết	Cầu nối	CD137 BCY số	Điểm gắn kết
BCY11863	BCY8116	Đầu N	N-(axit-PEG3)-N-bis(PEG3-azit)	BCY8928, BCY8928	dLys (PYA)4

Dữ liệu được trình bày ở đây trong Fig.1 và bảng 1 cho thấy rằng BCY11863 chứng minh có hoạt tính CD137 mạnh trong thử nghiệm chất báo cáo CD137. Ngoài ra, dữ liệu được trình bày trong Fig.2 và bảng 2 cho thấy rằng BCY11863 gây ra sự tiết cytokin IL-2 và IFN- γ mạnh mẽ trong thử nghiệm đồng nuôi cấy PBMC với nhiều dòng tế bào khối u và người cho PBMC ở người. Hơn nữa, dữ liệu được trình bày ở đây trong Fig.3 và Bảng 5 cho thấy rằng BCY11863 chứng minh đặc tính PK ưu việt với thời gian bán hủy cuối là 4,1 giờ ở chuột đồng SD và 5,3 giờ ở khi đuôi dài. Dữ liệu được trình bày trong Fig.10 và 11 cùng với các phân phương pháp 11 và 12 chứng minh tính liên kết và tính chọn lọc nhạy bén của BCY11863 đối với các đích Nectin-4 và CD137 của nó. Fig.4 và 5 chứng minh hoạt tính chống khối u mạnh mẽ của BCY11863 ở chuột nhà đồng gen MC38#13 và tạo ra ghi nhớ miễn dịch sau khi điều trị bằng BCY11863. Fig.6 và 7 chứng minh hoạt tính chống khối u của BCY11863 trong mô hình đồng gen CT26#7 với sự xâm nhập tương ứng của các tế bào T gây độc tế bào vào khối u. Fig.12 và 13 chứng minh rõ ràng rằng BCY11863 không phải duy trì nồng độ trong huyết tương có thể đo được khi dùng liều lượng 1,5 mg/kg BIW và 5 mg/kg tại 0,24 giờ trong tuần tạo ra hoạt tính chống khối u mạnh mẽ.

Sự tham chiếu ở đây được thực hiện cho một số chất tương tự (tức là, các dẫn xuất được biến đổi) và các chất chuyển hóa của BCY11863, mỗi chất tạo thành các khía cạnh bổ sung của sáng chế và được tóm tắt trong Bảng B dưới đây:

Bảng B: Thành phần của chất tương tự và chất chuyển hóa BCY11863

Phức hợp số	Nectin-4 BCY số	Điểm gắn kết	Cầu nối	CD137 BCY số	Điểm gắn kết	Chất điều biến
BCY13390	BCY8116	Đầu N	N-(axit-PEG ₃)-N-bis(PEG ₃ -azit)	BCY8928,	dLys(PYA)4	

				BCY13389	dLys(PYA)4	
BCY13582	BCY8116	Đầu N	N-(axit-PEG ₃)- N-bis(PEG ₃ -azit)	BCY8928, BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Biotin- Peg12
BCY13583	BCY8116	Đầu N	N-(axit-PEG ₃)- N-bis(PEG ₃ -azit)	BCY8928, BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Alexa Fluor 488
BCY13628	BCY8116	Đầu N	N-(axit-PEG ₃)- N-bis(PEG ₃ -azit)	BCY8928, BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Xyanin 5
BCY15155	BCY8116	Đầu N	N-(axit-PEG ₃)- N-bis(PEG ₃ -azit)	BCY8928, BCY14601	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	
BCY14602	BCY8116	Đầu N	N-(axit-PEG ₃)- N-bis(PEG ₃ -azit)	BCY14601	dLys(PYA)4	

trong đó BCY14601 tương ứng với phôi tử peptit hai vòng có trình tự C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 3) với TATA làm khung phân tử;

và trong đó BCY13389 tương ứng với phôi tử peptit hai vòng có trình tự [Ac]C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-K (SEQ ID NO : 4) với TATA làm khung phân tử.

Trừ khi được chỉ ra theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có cùng ý nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, chẳng hạn như trong lĩnh vực hóa học peptit, nuôi cấy tế bào và trình diện thực khuẩn thể, hóa học axit nucleic và hóa sinh. Kỹ thuật tiêu chuẩn được sử dụng trong sinh học phân tử, di truyền và phương pháp hóa sinh (xem, 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.), được kết hợp vào đây để tham khảo.

Danh pháp

Đánh số

Khi đề cập đến vị trí gốc axit amin trong hợp chất theo sáng chế, gốc xystein (C_i, C_{ii} và C_{iii}) được bỏ qua khi đánh số do chúng không thay đổi, do đó, việc đánh số gốc

axit amin trong SEQ ID NO: 1 được đề cập đến như sau:

C_i-P₁-1Nal₂-dD₃-C_{ii}-M₄-HArg₅-D₆-W₇-S₈-T₉-P₁₀-HyP₁₁-W₁₂-C_{iii} (SEQ ID NO: 1).

Theo mục đích của phần mô tả này, peptit hai vòng được tạo vòng với 1,1',1''-(1,3,5-triazinan-1,3,5-triyl)triprop-2-en-1-on (TATA) và thu được cấu trúc được thể ba lần. Việc tạo vòng với TATA xảy ra trên C_i, C_{ii}, và C_{iii}.

Định dạng phân tử

Các phần mở rộng đầu N hoặc C cho trình tự lõi hai vòng được thêm vào phía bên phải hoặc trái của trình tự, được phân tách bằng dấu gạch ngang. Ví dụ, đuôi βAla-Sar10 đầu N nên được ký hiệu là:

βAla-Sar10-A-(SEQ ID NO: X).

Trình tự peptit đảo ngược

Theo bộc lộ trong Nair *et al* (2003) J Immunol 170(3), 1362-1373, người ta dự đoán rằng trình tự peptit được bộc lộ ở đây cũng sẽ có ích khi ở dạng đảo ngược của chúng. Ví dụ, trình tự được đảo ngược (tức là, đầu N trở thành đầu C và *ngược lại*) và hóa học lập thể của chúng cũng bị đảo ngược (tức là axit amin-D trở thành axit amin-L và *ngược lại*). Để tránh nhầm lẫn, các tham chiếu đến axit amin hoặc dưới dạng tên đầy đủ của chúng hoặc mã ba chữ cái hoặc một chữ cái của axit amin được dự định trình bày ở đây là axit amin-L trừ khi được chỉ ra khác. Nếu một axit amin được dự định trình bày dưới dạng axit amin-D thì axit amin này sẽ được bắt đầu bằng chữ cái d thường trong dấu ngoặc vuông, ví dụ, [dA], [dD], [dE], [dK], [d1Nal], [dNle], v.v..

Ưu điểm của phối tử peptit

Các phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp nhất định theo sáng chế có một số đặc tính có lợi mà khiến cho chúng được xem là phân tử giống thuốc thích hợp để tiêm, hít, dùng theo đường mũi, mắt, đường miệng hoặc dùng tại chỗ. Các đặc tính có lợi bao gồm:

- Phản ứng chéo loài. Đây là yêu cầu thông thường đối với việc đánh giá được lực học tiền lâm sàng và được động học;
- Độ ổn định proteaza. Lý tưởng nhất là phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp nên chứng minh độ ổn định với proteaza huyết tương, proteaza biểu mô (“màng

neo”), proteaza dạ dày và ruột, proteaza bề mặt phổi, proteaza nội bào và tương tự. Độ ổn định proteaza nên được duy trì giữa các loài khác nhau sao cho ứng viên peptit hai vòng khác nhau nối tiếp được nghiên cứu phát triển trong mô hình động vật cũng như được dùng cho người nói riêng;

- Đặc tính độ tan mong muốn. Đây là hàm của tỷ lệ giữa gốc tích điện và ưa nước so với gốc kỵ nước và liên kết H nội phân tử/liên phân tử, rất quan trọng đối với mục đích hấp thụ và bào chế;

- Độ chọn lọc. Các phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp nhất định theo sáng chế chứng minh độ chọn lọc tốt trên các đích khác nhau;

- Thời gian bán hủy trong huyết tương tối ưu trong tuần hoàn. Phụ thuộc vào chỉ định lâm sàng và phác đồ điều trị, có thể cần nghiên cứu phát triển phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp để phơi nhiễm ngắn trong điều kiện điều trị bệnh cấp tính, hoặc nghiên cứu phát triển phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp có thời gian lưu trong tuần hoàn tăng lên, và do đó là tối ưu để điều trị nhiều tình trạng bệnh mãn tính. Các yếu tố khác thúc đẩy thời gian bán hủy trong huyết tương mong muốn là điều kiện cần thiết của phơi nhiễm được duy trì liên tục để đạt hiệu quả trị liệu tối đa so với độc tố đi kèm do phơi nhiễm được duy trì liên tục với tác nhân.

Quan trọng là, dữ liệu được trình bày ở đây trong đó phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp theo sáng chế chứng minh hiệu quả chống khối u khi được cho dùng theo liều lượng tại tần suất mà không duy trì nồng độ huyết tương cao hơn giá trị EC_{50} *in vitro* của hợp chất. Điều này trái ngược với các phương pháp tiếp cận sinh học (tức là dựa trên kháng thể) tái tổ hợp nói chung đối với cơ chế chủ vận CD137 hoặc cơ chế chủ vận CD137 đặc hiệu kép (Segal *et al.*, Clin Cancer Res., 23(8):1929-1936 (2017), Claus *et al.*, Sci Trans Med., 11(496): eaav5989, 1-12 (2019), Hinner *et al.*, Clin Cancer Res., 25(19):5878-5889 (2019)). Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, lý do cho nhận định này được cho là do thực tế là các phức hợp hai vòng khác nhau nối tiếp có khối lượng phân tử tương đối thấp (thường <15 kDa), chúng được tổng hợp hoàn toàn và chúng là chất chủ vận hướng đích đến cơ chế chủ vận của CD137. Do đó, chúng có thời gian bán hủy trong huyết tương tương đối ngắn nhưng khả năng xâm nhập và lưu giữ trong khối u tốt. Dữ liệu được trình bày ở đây hỗ trợ đầy đủ những ưu điểm này. Ví dụ, hiệu quả chống khối u trong mô hình động vật gặm nhấm đồng gen ở chuột nhà có CD137 được nhân

hóa được chứng minh hoặc hàng ngày hoặc mỗi ngày thứ 3. Ngoài ra, dữ liệu được động học trong màng bụng cho thấy thời gian bán hủy trong huyết tương là <3 giờ, điều này có thể dự đoán rằng nồng độ tuần hoàn của phức hợp sẽ liên tục giảm xuống dưới EC_{50} *in vitro* giữa các liều. Hơn nữa, số liệu được động học khối u cho thấy rằng mức độ của phức hợp hai vòng khác nhau nối tiếp trong mô khối u có thể cao hơn và duy trì lâu hơn so với mức độ trong huyết tương.

Sẽ được đánh giá cao rằng quan sát này tạo thành một khía cạnh quan trọng tiếp theo của sáng chế. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm bước dùng phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp như được xác định trong tài liệu này với tần suất liều lượng không duy trì liên tục nồng độ của phức hợp này trong huyết tương cao hơn EC_{50} *in vitro* của phức hợp này.

- Ghi nhớ miễn dịch. Liên kết phối tử peptit hai vòng liên kết tế bào ung thư với phối tử peptit hai vòng liên kết tế bào miễn dịch mang lại ưu điểm hiệp đồng của ghi nhớ miễn dịch. Dữ liệu được trình bày ở đây đã chứng minh rằng phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp theo sáng chế được cho là không chỉ loại bỏ khối u mà khi dùng tác nhân gây khối u, không có chuột nhà nào trong số các chuột nhà đã được tiêm đáp ứng hoàn toàn phát triển khối u. (xem Fig.5). Điều này chỉ ra rằng việc điều trị bằng phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp được chọn lọc theo sáng chế gây ra ghi nhớ gây miễn dịch ở chuột nhà đáp ứng hoàn toàn. Điều này có một lợi thế đáng kể về mặt lâm sàng để ngăn ngừa sự tái phát của khối u nói trên khi nó đã được kiểm soát và loại bỏ ban đầu.

Phối tử peptit

Phối tử peptit, như được đề cập ở đây, dùng để chỉ peptit liên kết cộng hóa trị với khung phân tử. Thông thường, các peptit này chứa hai hoặc nhiều nhóm phản ứng (tức là gốc xystein) mà có khả năng tạo thành liên kết cộng hóa trị với khung, và trình tự nằm đối diện giữa các nhóm phản ứng đã nêu mà được gọi là trình tự thông lọng, do đó, nó tạo thành thông lọng khi peptit được liên kết với khung. Trong trường hợp này, peptit chứa ít nhất ba nhóm phản ứng được chọn từ xystein, axit 3-mercaptopropionic và/hoặc xysteamin và tạo thành ít nhất hai thông lọng trên khung.

Muối được dụng

Sẽ được đánh giá cao rằng các dạng muối nằm trong phạm vi của sáng chế này,

và việc tham chiếu đến các phối tử peptit chứa các dạng muối của phối tử đã nêu.

Các muối của sáng chế có thể được tổng hợp từ hợp chất mẹ chứa gốc bazơ hoặc axit bằng các phương pháp hóa học truyền thống chẳng hạn như phương pháp được mô tả trong *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002. Thông thường, các muối này có thể được điều chế bằng cách cho các dạng axit hoặc bazơ tự do của các hợp chất này phản ứng với axit hoặc bazơ thích hợp trong nước hoặc dung môi hữu cơ, hoặc trong hỗn hợp của cả hai.

Các muối cộng axit (muối đơn hoặc đôi) có thể được tạo thành bằng nhiều loại axit, cả hữu cơ và vô cơ. Ví dụ về các muối cộng axit bao gồm muối đơn hoặc đôi được tạo thành bằng axit được chọn từ nhóm bao gồm axetic, 2,2-dicloaxetic, adipic, alginic, ascobic (ví dụ, L-ascobic), L-aspartic, benzensulfonic, benzoic, 4-axetamidobenzoic, butanoic, (+) camphoric, camphor-sulfonic, (+)-(1*S*)-camphor-10-sulfonic, capric, caproic, caprylic, xinnamic, xitric, xyclamic, dodecylsulfuric, etan-1,2-disulfonic, etansulfonic, 2-hydroxyetansulfonic, fomic, fumaric, galactaric, gentisic, glucoheptonic, D-gluconic, glucuronic (ví dụ, D-glucuronic), glutamic (ví dụ, L-glutamic), α -oxoglutaric, glycolic, hippuric, axit hydrohalic (ví dụ hydrobromic, hydrochloric, hydriodic), isethionic, lactic (ví dụ, (+)-L-lactic, ($\pm$)-DL-lactic), lactobionic, maleic, malic, (-)-L-malic, malonic, ($\pm$)-DL-mandelic, metansulfonic, naphtalen-2-sulfonic, naphtalen-1,5-disulfonic, 1-hydroxy-2-naphthoic, nicotinic, nitric, oleic, orotic, oxalic, palmitic, pamoic, phosphoric, propionic, pyruvic, L-pyroglutamic, salixylic, 4-amino-salixylic, sebacic, stearic, succinic, sulfuric, tannic, (+)-L-tartaric, thioxyanic, *p*-toluensulfonic, undexylenic và axit valeric, cũng như axit amin được axyl hóa và nhựa trao đổi cation.

Một nhóm muối cụ thể bao gồm muối được tạo thành từ axit axetic, clohydric, hydriodic, phosphoric, nitric, sulfuric, xitric, lactic, succinic, maleic, malic, isethionic, fumaric, benzensulfonic, toluensulfonic, sulfuric, metansulfonic (mesylat), etansulfonic, naphtalensulfonic, valeric, propanoic, butanoic, malonic, glucuronic và lactobionic. Một muối cụ thể là muối hydroclorua. Muối cụ thể khác là muối axetat.

Nếu hợp chất là anion, hoặc có nhóm chức có thể là anion (ví dụ, -COOH có thể là -COO⁻), sau đó muối có thể được tạo thành với bazơ vô cơ hoặc hữu cơ, để tạo ra

cation thích hợp. Ví dụ về cation vô cơ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ion kim loại kiềm, chẳng hạn như Li^+ , Na^+ và K^+ , cation kim loại kiềm thổ chẳng hạn như Ca^{2+} và Mg^{2+} , và cation khác chẳng hạn như Al^{3+} hoặc Zn^+ . Ví dụ về cation hữu cơ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ion amoni (tức là, NH_4^+) và ion amoni được thế (ví dụ, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Ví dụ về một vài ion amoni được thế là những ion có nguồn gốc từ: metylamin, etylamin, dietylamin, propylamin, dixyclohexylamin, trietylamin, butylamin, etylendiamin, etanolamin, dietanolamin, piperazin, benzylamin, phenylbenzylamin, colin, meglumin, và tromethamin, cũng như axit amin, chẳng hạn như lysin và arginin. Ví dụ về ion amoni bậc bốn thông thường là $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Khi hợp chất theo sáng chế chứa nhóm chức amin, chúng có thể tạo thành muối amoni bậc bốn, ví dụ, bằng cách phản ứng với chất alkyl hóa theo phương pháp đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Các hợp chất amoni bậc bốn này nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các dẫn xuất được biến đổi

Sẽ được đánh giá cao rằng các dẫn xuất được biến đổi của phối tử peptit như được xác định trong bản mô tả này nằm trong phạm vi của sáng chế. Ví dụ về các dẫn xuất được biến đổi thích hợp bao gồm một hoặc nhiều biến đổi được chọn từ: biến đổi đầu N và/hoặc đầu C; thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin bằng một hoặc nhiều gốc không phải axit amin (chẳng hạn như thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin phân cực bằng một hoặc nhiều axit amin có cùng vị trí hoặc có cùng số electron; thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin không phân cực bằng axit amin có cùng vị trí hoặc có cùng số electron phi tự nhiên khác); thêm nhóm đệm; thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin nhạy cảm với quá trình oxi hóa bằng một hoặc nhiều gốc axit amin chống oxi hóa; thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin bằng alanin, thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin-L bằng một hoặc nhiều gốc axit amin-D; N-alkyl hóa một hoặc nhiều liên kết amit bằng phối tử peptit hai vòng; thay thế một hoặc nhiều liên kết peptit bằng liên kết thay thế; biến đổi chiều dài mạch peptit; thay thế hydro trên cacbon anpha của một hoặc nhiều gốc axit amin bằng nhóm hóa học khác, biến đổi axit amin chẳng hạn như xystein, lysin, glutamin/aspartat và tirosin bằng amin thích hợp, thiol, axit cacboxylic và chất phản ứng phenol phản ứng để chức hóa các axit amin đã nêu, và đưa vào hoặc thay thế các axit amin mà mở đầu cho khả năng phản ứng trực giao thích hợp để chức hóa, ví dụ, nhóm

azit hoặc alkyn mang axit amin mà cho phép chức hóa bằng gốc mang alkyn hoặc azit, một cách tương ứng.

Theo một phương án, dẫn xuất được biến đổi bao gồm biến đổi đầu N và/hoặc đầu C. Theo phương án tiếp theo, trong đó dẫn xuất được biến đổi bao gồm biến đổi đầu N sử dụng chất phản ứng amino thích hợp và/hoặc biến đổi đầu C sử dụng chất phản ứng cacboxy thích hợp. Theo phương án tiếp theo, việc biến đổi đầu N hoặc đầu C đã nêu bao gồm thêm nhóm tác động, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chất gây độc tế bào, chất chelat phóng xạ hoặc nhóm mang màu.

Theo phương án khác, dẫn xuất được biến đổi bao gồm biến đổi đầu N. Theo phương án khác, dẫn xuất được biến đổi bao gồm nhóm axetyl đầu N. Theo phương án này, nhóm xystein đầu N (nhóm được gọi ở đây là C_i) được gắn mũ với axetic anhydrit hoặc chất phản ứng thích hợp khác trong quá trình tổng hợp peptit tạo ra phân tử được axetyl hóa đầu N. Phương án này mang lại ưu điểm là loại bỏ điểm nhận biết tiềm năng đối với aminopeptidaza và tránh được khả năng peptit hai vòng bị phân hủy.

Theo phương án thay thế, biến đổi đầu N bao gồm việc thêm nhóm phân tử đệm để tạo điều kiện thuận lợi cho việc liên hợp của nhóm phản ứng lại kích thích và duy trì hiệu nghiệm của peptit hai vòng với đích của nó.

Theo phương án khác, dẫn xuất được biến đổi bao gồm biến đổi đầu C. Theo phương án khác, biến đổi đầu C bao gồm nhóm amit. Theo phương án này, nhóm xystein đầu C (nhóm được gọi ở đây là C_{iii}) được tổng hợp dưới dạng amit trong quá trình tổng hợp peptit tạo ra phân tử được amit hóa đầu C. Phương án này mang lại ưu điểm là loại bỏ điểm nhận biết tiềm năng đối với cacboxypeptidaza và giảm được khả năng peptit hai vòng bị ly giải protein.

Theo một phương án, dẫn xuất được biến đổi bao gồm sự thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin bằng một hoặc nhiều gốc axit amin phi tự nhiên. Trong phương án này, axit amin phi tự nhiên có thể được chọn có chuỗi bên có cùng vị trí/có cùng số eletron mà không được nhận ra bằng proteaza phân hủy hoặc không có bất kỳ tác dụng phụ nào lên hiệu nghiệm đích.

Ngoài ra, axit amin phi tự nhiên có thể được sử dụng có chuỗi bên axit amin bị hạn chế, sao cho quá trình thủy phân protein của liên kết peptit gần đó bị cản trở một cách phù hợp và có định hướng. Cụ thể là, các chất tương tự prolin liên quan, chuỗi bên

không lồ, dẫn xuất được thế hai lần C α -(ví dụ, axit aminoisobutyric, Aib), và axit amin vòng, dẫn xuất đơn giảm là axit amino-xyclopropylcacboxylic.

Theo một phương án, dẫn xuất được biến đổi bao gồm việc thêm nhóm đệm. Theo phương án tiếp theo, dẫn xuất được biến đổi bao gồm việc thêm nhóm đệm vào xystein đầu N (C_i) và/hoặc xystein đầu C (C_{iii}).

Theo một phương án, dẫn xuất được biến đổi bao gồm việc thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin nhạy với oxi hóa bằng một hoặc nhiều gốc axit amin chống oxi hóa. Theo phương án tiếp theo, dẫn xuất được biến đổi bao gồm việc thay thế gốc tryptophan bằng gốc naphthylalanin hoặc alanin. Phương án này mang lại ưu điểm là cải thiện đặc tính ổn định được phẩm của phối tử peptit hai vòng thu được.

Theo một phương án, dẫn xuất được biến đổi bao gồm việc thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin tích điện bằng một hoặc nhiều gốc axit amin kỵ nước. Theo phương án thay thế, dẫn xuất được biến đổi bao gồm việc thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin kỵ nước bằng một hoặc nhiều gốc axit amin tích điện. Sự cân bằng chính xác của gốc axit amin tích điện so với axit amin kỵ nước là đặc tính quan trọng của phối tử peptit hai vòng. Ví dụ, gốc axit amin kỵ nước ảnh hưởng đến mức độ liên kết của protein huyết tương và do đó nồng độ của phần tự do có sẵn trong huyết tương, trong khi gốc axit amin tích điện (cụ thể là arginin) có thể ảnh hưởng đến tương tác của peptit với màng phospholipit trên bề mặt tế bào. Cả hai kết hợp với nhau có thể ảnh hưởng đến thời gian bán hủy, thể tích phân bố và phơi nhiễm của thuốc peptit, và có thể được biến đổi tùy theo điểm cuối lâm sàng. Ngoài ra, việc kết hợp chính xác và số lượng gốc axit amin tích điện so với gốc axit amin kỵ nước có thể làm giảm kích ứng tại vị trí tiêm (nếu thuốc peptit được dùng dưới da).

Theo một phương án, dẫn xuất được biến đổi bao gồm việc thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin L bằng một hoặc nhiều gốc axit amin D. Phương án này được tin là làm tăng tính ổn định ly giải protein bằng cản trở sự bố trí các nguyên tử trong không gian và bằng thiên hướng của axit amin D để ổn định cấu hình dạng-quay (Tugyi et al (2005) PNAS, 102(2), 413–418).

Theo một phương án, dẫn xuất được biến đổi bao gồm việc loại bỏ gốc axit amin bất kỳ và thay thế bằng alanin. Phương án này mang lại ưu điểm là loại bỏ (các) vị trí tấn công có khả năng ly giải protein.

Cần lưu ý rằng mỗi biến đổi trong số các biến đổi nêu trên đều nhằm mục đích cải thiện hiệu lực hoặc độ ổn định của peptit. Có thể đạt được các cải thiện hiệu lực hơn nữa dựa trên các biến đổi thông qua các cơ chế sau:

- Kết hợp các gốc kỵ nước giúp khai thác hiệu ứng kỵ nước và dẫn đến giảm tốc độ hơn, để đạt được ái lực cao hơn;

- Kết hợp các nhóm tích điện giúp khai thác các tương tác ion khoảng rộng, dẫn đến tốc độ nhanh hơn và ái lực cao hơn (xem ví dụ Schreiber *et al*, *Rapid, electrostatically assisted association of proteins* (1996), *Nature Struct. Biol.* 3, 427-31); và

- Kết hợp ràng buộc bổ sung vào peptit, bằng cách hạn chế các chuỗi bên của axit amin một cách chính xác sao cho việc mất đi entropi là nhỏ nhất khi liên kết đích, hạn chế các góc xoắn của mạch chính sao cho việc mất entropi là nhỏ nhất khi liên kết đích và mở đầu tạo vòng bổ sung trong phân tử vì những lý do giống hệt nhau.

(để xem lại, xem Gentilucci *et al*, *Curr. Pharmaceutical Design*, (2010), 16, 3185-203, and Nestor *et al*, *Curr. Medicinal Chem* (2009), 16, 4399-418).

Các biến thể đồng vị

Sáng chế bao gồm tất cả các phối tử peptit được đánh dấu đồng vị (phóng xạ) được dụng, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử được thay thế bằng các nguyên tử có cùng số nguyên tử, nhưng khối lượng nguyên tử hoặc số khối khác so với khối lượng nguyên tử hoặc số khối thường được tìm thấy trong tự nhiên, và phối tử peptit theo sáng chế, trong đó các nhóm chelat kim loại được gắn vào (được gọi là “chất tác động”) có khả năng giữ các đồng vị (phóng xạ) thích hợp, và phối tử peptit theo sáng chế, trong đó các nhóm chức nhất định được thay thế cộng hóa trị bằng đồng vị (phóng xạ) hoặc nhóm chức được dán nhãn đồng vị.

Ví dụ về các đồng vị thích hợp để đưa vào phối tử peptit theo sáng chế bao gồm các đồng vị của hydro, chẳng hạn như ^2H (D) và ^3H (T), cacbon, chẳng hạn như ^{11}C , ^{13}C và ^{14}C , clo, chẳng hạn như ^{36}Cl , flo, chẳng hạn như ^{18}F , iốt, chẳng hạn như ^{123}I , ^{125}I và ^{131}I , nitơ, chẳng hạn như ^{13}N và ^{15}N và ^{15}N , oxy, chẳng hạn như ^{15}O , ^{17}O và ^{18}O , phospho, chẳng hạn như ^{32}P , lưu huỳnh, chẳng hạn như ^{35}S , đồng, chẳng hạn như ^{64}Cu , gali, chẳng hạn như ^{67}Ga hoặc ^{68}Ga , ytri, chẳng hạn như ^{90}Y và luteli, chẳng hạn như

^{177}Lu và Bitmut, chẳng hạn như ^{213}Bi .

Các phối tử peptit được đánh dấu đồng vị nhất định theo sáng chế, ví dụ, các phối tử kết hợp đồng vị phóng xạ, có ích trong các nghiên cứu phân bố mô thuốc và/hoặc cơ chất, và để đánh giá lâm sàng sự có mặt và/hoặc vắng mặt của đích Nectin-4 trên các mô bệnh. Các phối tử peptit theo sáng chế có thể còn có đặc tính chẩn đoán có giá trị ở chỗ chúng có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định sự tạo thành phức hợp giữa hợp chất được đánh dấu và các phân tử, peptit, protein, enzym hoặc thụ thể khác. Các phương pháp phát hiện hoặc xác định có thể sử dụng các hợp chất được gắn nhãn với chất dán nhãn như đồng vị phóng xạ, enzym, chất huỳnh quang, chất phát sáng (ví dụ, chất phát quang, dẫn xuất chất phát quang, luciferin, aequorin và luciferaza), v.v.. Đồng vị phóng xạ triti, tức là ^3H (T) và cacbon-14, tức là ^{14}C , đặc biệt hữu ích cho mục đích này do dễ kết hợp và các phương tiện phát hiện sẵn sàng.

Việc thay thế bằng các đồng vị nặng hơn như đơteri, tức là 2H (D), có thể mang lại các ưu điểm trị liệu nhất định do tính chuyển hóa ổn định hơn, ví dụ, thời gian bán hủy *in vivo* tăng lên hoặc nhu cầu liều dùng giảm đi và, do đó có thể được ưu tiên trong một số trường hợp.

Việc thay thế bằng đồng vị phát positron, như ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O và ^{13}N , có thể được sử dụng trong nghiên cứu chụp cắt lớp phát xạ positron (Positron Emission Topography - PET) để kiểm tra sự cư trú của đích.

Hợp chất được đánh dấu đồng vị của phối tử peptit nói chung có thể được điều chế bằng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hoặc bằng quy trình tương tự với quy trình được mô tả trong phần ví dụ đính kèm sử dụng chất phản ứng được đánh dấu đồng vị thích hợp thay cho chất phản ứng không được đánh dấu được dùng trước đó.

Tổng hợp

Các peptit theo sáng chế có thể được sản xuất theo kiểu tổng hợp bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, sau đó phản ứng với khung phân tử *in vitro*. Khi tiến hành, hóa chất tiêu chuẩn có thể được sử dụng. Điều này cho phép chuẩn bị nhanh chóng trên quy mô lớn vật liệu hòa tan cho các thử nghiệm hoặc xác nhận tiếp theo. Các phương pháp như vậy có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hóa chất thông thường như được tiết lộ trong Timmerman và cộng sự (ở trên).

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến việc sản xuất polypeptit hoặc các liên hợp được chọn như được trình bày ở đây, trong đó quá trình sản xuất còn bao gồm các bước tùy chọn như được giải thích bên dưới. Theo một phương án, các bước này được thực hiện trên polypeptit/liên hợp sản phẩm cuối cùng được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học.

Các gốc axit amin tùy ý trong polypeptit được quan tâm có thể được thay thế khi sản xuất liên hợp hoặc phức hợp.

Peptit cũng có thể được kéo dài, để kết hợp ví dụ một thông lượng khác và do đó tạo ra tính đa đặc hiệu.

Để kéo dài peptit, peptit này có thể đơn giản được kéo dài về mặt hóa học tại đầu N hoặc đầu C của nó hoặc trong các thông lượng bằng cách sử dụng lysin được bảo vệ trực giao (và các chất tương tự) bằng cách sử dụng hóa chất pha rắn tiêu chuẩn hoặc pha dung dịch. Các kỹ thuật liên hợp (sinh học) tiêu chuẩn có thể được sử dụng để tạo ra một đầu N hoặc C được hoạt hóa hoặc có thể hoạt hóa. Ngoài ra, việc bổ sung có thể được thực hiện bằng cách ngưng tụ mảnh hoặc nối bằng hóa chất tự nhiên, ví dụ: như được mô tả trong (Dawson et al. 1994. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. Science 266:776-779), hoặc bằng enzym, ví dụ sử dụng subtiligaza như được mô tả trong (Chang *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 20; 91(26):12544-8 hoặc trong Hikari *et al* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003).

Ngoài ra, các peptit có thể được kéo dài hoặc biến đổi bằng cách tiếp tục liên hợp thông qua các liên kết disulfua. Điều này có thêm lợi thế là cho phép peptit thứ nhất và thứ hai phân ly khỏi nhau khi trong môi trường khử của tế bào. Trong trường hợp này, khung phân tử (ví dụ TATA) có thể được thêm vào trong quá trình tổng hợp hóa học của peptit thứ nhất để phản ứng với ba nhóm xystein; một xystein hoặc thiol tiếp theo sau đó có thể được nối vào đầu N hoặc C của peptit thứ nhất, sao cho xystein hoặc thiol này chỉ phản ứng với xystein hoặc thiol tự do của peptit thứ hai, tạo thành liên hợp peptit-peptit hai vòng có cầu nối disulfua.

Các kỹ thuật tương tự cũng áp dụng tương tự cho việc tổng hợp/liên kết của hai phân tử vòng lớn đặc hiệu kép và hai vòng, có khả năng tạo ra một phân tử đặc hiệu bốn.

Ngoài ra, việc bổ sung thêm các nhóm chức hoặc nhóm tác động khác có thể

được thực hiện theo cách tương tự, sử dụng hóa chất thích hợp, liên kết ở đầu N hoặc C hoặc thông qua chuỗi bên. Theo một phương án, việc liên kết được tiến hành theo cách mà không cản trở hoạt tính của một trong hai thực thể.

Dược phẩm

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phối tử peptit như được xác định trong tài liệu này kết hợp với một hoặc nhiều tá dược được dụng.

Thông thường, phối tử peptit theo sáng chế sẽ được sử dụng ở dạng đã tinh sạch cùng với tá dược hoặc chất mang dược lý thích hợp. Điển hình là, các tá dược hoặc chất mang này bao gồm dung dịch rượu/dung dịch chứa nước, nhũ tương hoặc huyền phù, bao gồm nước muối và/hoặc môi trường đệm. Tá dược lỏng dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch natri clorua, dextroza Ringer, dextroza và natri clorua và Ringer lactat hóa. Chất phụ gia thích hợp có thể chấp nhận về mặt sinh lý học, nếu cần để giữ phức hợp polypeptit trong huyền phù, có thể được chọn từ chất làm đầy chẳng hạn như cacboxymetylxenluloza, polyvinylpyrrolidon, gelatin và alginat.

Chất dẫn thuốc dùng theo đường tĩnh mạch bao gồm chất lỏng và các chất bổ sung dinh dưỡng và các chất bổ sung chất điện giải, như các chất dựa trên Ringer dextroza. Chất bảo quản và các chất phụ gia khác, chẳng hạn như chất kháng khuẩn, chất chống oxy hóa, chất tạo chelat, cũng có thể có mặt (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition).

Phối tử peptit theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm được dùng riêng rẽ hoặc kết hợp với các chất khác. Chúng có thể bao gồm kháng thể, mảnh kháng thể và các thuốc liệu pháp miễn dịch khác nhau, chẳng hạn như xylcosporin, methotrexat, adriamycin hoặc cisplatinum và kháng độc tố. Dược phẩm có thể bao gồm “dung dịch hỗn hợp thuốc” gồm nhiều chất gây độc tế bào hoặc nhiều chất khác nhau kết hợp với phối tử protein theo sáng chế, hoặc thậm chí kết hợp với các polypeptit được chọn lọc theo sáng chế có tính đặc hiệu khác nhau, chẳng hạn như polypeptit được chọn sử dụng các phối tử đích khác nhau, cho dù có hay không có việc chúng được gộp lại trước khi dùng.

Đường dùng dược phẩm theo sáng chế có thể là bất kỳ đường dùng nào đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Để trị liệu,

phối tử peptit theo sáng chế có thể được dùng cho bất kỳ bệnh nhân nào theo đúng kỹ thuật tiêu chuẩn. Việc dùng cho thể bằng bất kỳ đường dùng nào phù hợp, bao gồm, dùng ngoài đường tiêu hóa, theo đường tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, qua da, thông qua đường phổi, hoặc ngoài ra, thích hợp, bằng cách truyền trực tiếp với một ống thông đường tiêu. Tốt hơn nếu, được phẩm theo sáng chế được dùng bằng cách hít vào. Liều lượng và tần suất sử dụng sẽ phụ thuộc vào độ tuổi, giới tính và tình trạng của bệnh nhân, việc sử dụng đồng thời với các thuốc khác, chống chỉ định và thông số khác phải được bác sỹ lưu tâm đến.

Phối tử peptit theo sáng chế có thể được làm khô lạnh để bảo quản và hoàn nguyên trong chất mang thích hợp trước khi sử dụng. Kỹ thuật này đã được chứng minh là có hiệu quả và các kỹ thuật làm khô lạnh và hoàn nguyên đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng sẽ đánh giá cao rằng quá trình làm khô lạnh và hoàn nguyên có thể dẫn đến làm thay đổi mức độ mất hoạt tính và mức độ đó có thể phải được điều chỉnh lên để bù vào.

Chế phẩm chứa phối tử peptit theo sáng chế hoặc dung dịch hỗn hợp thuốc của chúng có thể được dùng để điều trị dự phòng và/hoặc trị liệu. Trong ứng dụng trị liệu nhất định, hàm lượng đủ để đạt được ức chế ít nhất một phần, cản trở, điều biến, tiêu diệt, hoặc thông số có thể đo được khác nào đó, quần thể của tế bào được chọn được gọi là “liều lượng có hiệu quả trị liệu”. Hàm lượng cần để đạt được liều lượng này sẽ phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của bệnh và tình trạng chung của hệ miễn dịch của chính bệnh nhân, nhưng khoảng thông thường từ 0,005 đến 5,0 mg của phối tử peptit được chọn trên mỗi kilogram thể trọng, với liều lượng là 0,05 đến 2,0 mg/kg/liều thường được sử dụng hơn. Để dùng trong dự phòng bệnh, chế phẩm chứa phối tử peptit theo sáng chế hoặc dung dịch hỗn hợp thuốc của nó cũng sẽ được dùng với liều lượng tương tự hoặc ít hơn một chút.

Chế phẩm chứa phối tử peptit theo sáng chế có thể được sử dụng trong phòng ngừa và điều trị để hỗ trợ cho việc biến đổi, bất hoạt, tiêu diệt hoặc loại bỏ quần thể tế bào đích được chọn ở động vật có vú. Ngoài ra, các phối tử peptit được mô tả ở đây có thể được sử dụng ngoài cơ thể hoặc *in vitro* một cách chọn lọc để tiêu diệt, làm suy yếu hoặc loại bỏ quần thể tế bào đích ra khỏi tập hợp không đồng nhất. Máu từ động vật có vú có thể được kết hợp ngoài cơ thể với các phối tử peptit được chọn trong đó các tế bào

không mong muốn bị tiêu diệt hoặc loại bỏ ra khỏi máu để đưa trở lại động vật có vú theo các kỹ thuật tiêu chuẩn.

Sử dụng trong trị liệu

Theo khía cạnh tiếp theo của sáng chế, được đề xuất là phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp như được định nghĩa ở trên để sử dụng trong ngăn ngừa, phòng chống hoặc điều trị ung thư.

Các ví dụ về ung thư (và các đối tác lành tính của chúng) có thể được điều trị (hoặc ức chế) bao gồm, nhưng không giới hạn ở các khối u có nguồn gốc biểu mô (u tuyến và ung thư biểu mô của các loại khác nhau bao gồm ung thư biểu mô tuyến, ung thư biểu mô vảy, ung thư biểu mô tế bào chuyển tiếp và ung thư biểu mô khác) như ung thư biểu mô của bàng quang và đường tiết niệu, vú, đường tiêu hóa (bao gồm thực quản, bụng (dạ dày), ruột non, kết tràng, trực tràng và hậu môn), gan (ung thư biểu mô tế bào gan), túi mật và hệ đường mật, tuyến tụy ngoại tiết, thận, phổi (ví dụ ung thư biểu mô tuyến, ung thư biểu mô phổi tế bào nhỏ, ung thư biểu mô phổi không tế bào nhỏ, ung thư biểu mô phế quản và trung thất), đầu và cổ (ví dụ ung thư lưỡi, khoang miệng, thanh quản, hầu họng, vòm họng, amidan, tuyến nước bọt, khoang mũi và xoang cánh mũi), buồng trứng, ống dẫn trứng, màng bụng, âm đạo, âm hộ, dương vật, cổ tử cung, cơ tử cung, nội mạc tử cung, tuyến giáp (ví dụ ung thư biểu mô nang tuyến giáp), tuyến thượng thận, tuyến tiền liệt, da và cấu trúc ngoại phôi (ví dụ khối u ác tính, ung thư biểu mô tế bào đáy, ung thư biểu mô tế bào vảy, u gai sừng, nevi loạn sản); nhóm bệnh máu ác tính (tức là bệnh bạch cầu, u lympho) và rối loạn máu tiền ác tính và rối loạn ác tính ranh giới bao gồm các u máu ác tính và các điều kiện liên quan của dòng lympho (ví dụ bệnh bạch cầu cấp tính dòng tế bào lympho [ALL], bệnh bạch cầu mãn tính dòng tế bào lympho [CLL], u lympho tế bào B như u lympho tế bào B lớn lan tỏa [DLBCL], u lympho thể nang, u lympho Burkitt, u lympho tế bào vò, u lympho và bệnh bạch cầu tế bào T, u lympho tế bào tiêu diệt tự nhiên, u lympho Hodgkin, bệnh bạch cầu tế bào lông, bệnh gammopathy thể đơn không xác định, ung thư tế bào plasma, đa u tủy, và rối loạn tăng sinh lympho sau ghép), và u máu ác tính và các điều kiện liên quan của dòng lympho (ví dụ bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy [AML], bệnh bạch cầu mãn tính dòng tủy [CML], bệnh bạch cầu mãn dòng đơn cầu tủy [CMML], hội chứng tăng bạch cầu ái toan, hội chứng tăng sinh dòng tủy như bệnh đa hồng cầu, tăng tiểu cầu tiền phát và xơ hóa tủy xương nguyên phát, hội chứng tăng sinh tủy, hội chứng loạn sinh tủy, và bệnh

bạch cầu tiền tủy bào); khối u có nguồn gốc trung mô, ví dụ Saccom mô mềm, xương hoặc sụn như Saccom xương, Saccom xơ, Saccom sụn, Saccom cơ vân, Saccom cơ trơn, Saccom mỡ, Saccom mạch máu, Saccom Kaposi, Saccom Ewing, Saccom hoạt dịch, Saccom biểu mô, u mô đệm đường tiêu hóa, u mô bào lành tính và ác tính, và Saccom u sợi bì; khối u hệ thần kinh trung ương hoặc ngoại vi (ví dụ u tế bào hình sao, u thần kinh đệm và u nguyên bào thần kinh đệm, u màng não, u màng não thất, u tuyến tùng và u bao sợi thần kinh); khối u nội tiết (ví dụ khối u tuyến yên, khối u thượng thận, khối u tế bào tiểu đảo tụy, khối u tuyến cận giáp, khối u carcinoid và ung thư biểu mô tủy của tuyến giáp); khối u ở mắt và phần phụ (ví dụ như u nguyên bào võng mạc); khối u tế bào mầm và lá nuôi phôi (ví dụ u quái, u tinh, u tế bào mầm chưa biệt hóa, nốt ruồi dạng nang sán và ung thư dạ con); và các khối u ở trẻ em và phôi thai (ví dụ như u nguyên bào tủy, u nguyên bào thần kinh, u Wilms, và u biểu bì thần kinh nguyên thủy); hoặc các hội chứng bẩm sinh hoặc các hội chứng khác khiến bệnh nhân dễ mắc bệnh ác tính (ví dụ như bệnh khô da nhiễm hắc sắc tố).

Theo phương án khác, bệnh ung thư được chọn từ bệnh ác tính tạo máu như được chọn từ: u lympho không Hodgkin (NHL), u lympho Burkitt (BL), bệnh đa u tủy (MM), bệnh bạch cầu mãn tính dòng tế bào lympho B (B-CLL), bệnh bạch cầu cấp tính dòng lympho B và T (ALL), u lympho tế bào T (TCL), bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML), bệnh bạch cầu tế bào lông (HCL), u lympho Hodgkin (HL), và bệnh bạch cầu dòng tủy mãn tính (CML).

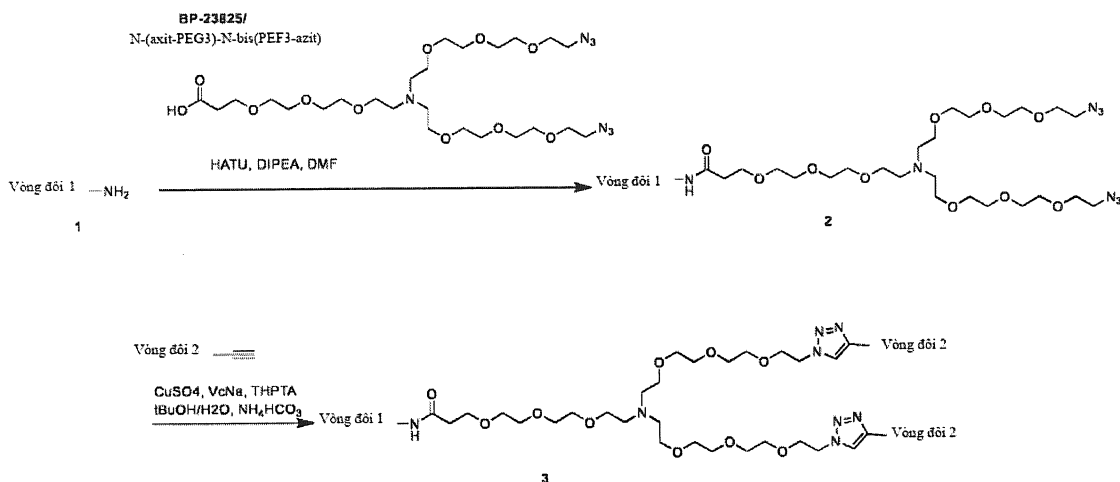
Tham chiếu ở đây đến thuật ngữ “ngăn ngừa” bao gồm việc dùng chế phẩm bảo vệ trước khi mắc bệnh. “Phòng chống” dùng để chỉ việc dùng chế phẩm sau sự kiện cảm ứng, nhưng trước khi có biểu hiện lâm sàng của bệnh. “Điều trị” bao gồm việc dùng chế phẩm bảo vệ sau khi các triệu chứng bệnh trở nên rõ ràng.

Hệ thống mô hình động vật có thể được sử dụng để sàng lọc hiệu quả của các phối tử peptit trong việc bảo vệ chống lại bệnh hoặc điều trị bệnh là có sẵn. Sáng chế tạo điều kiện cho việc sử dụng các hệ thống mô hình động vật, cho phép nghiên cứu phát triển các phối tử polypeptit mà có thể phản ứng chéo với các đích ở người và động vật, để cho phép sử dụng các mô hình động vật.

Sáng chế được mô tả thêm cùng với việc tham khảo các ví dụ sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nói chung, phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp theo sáng chế có thể được điều chế theo phương pháp chung sau đây:

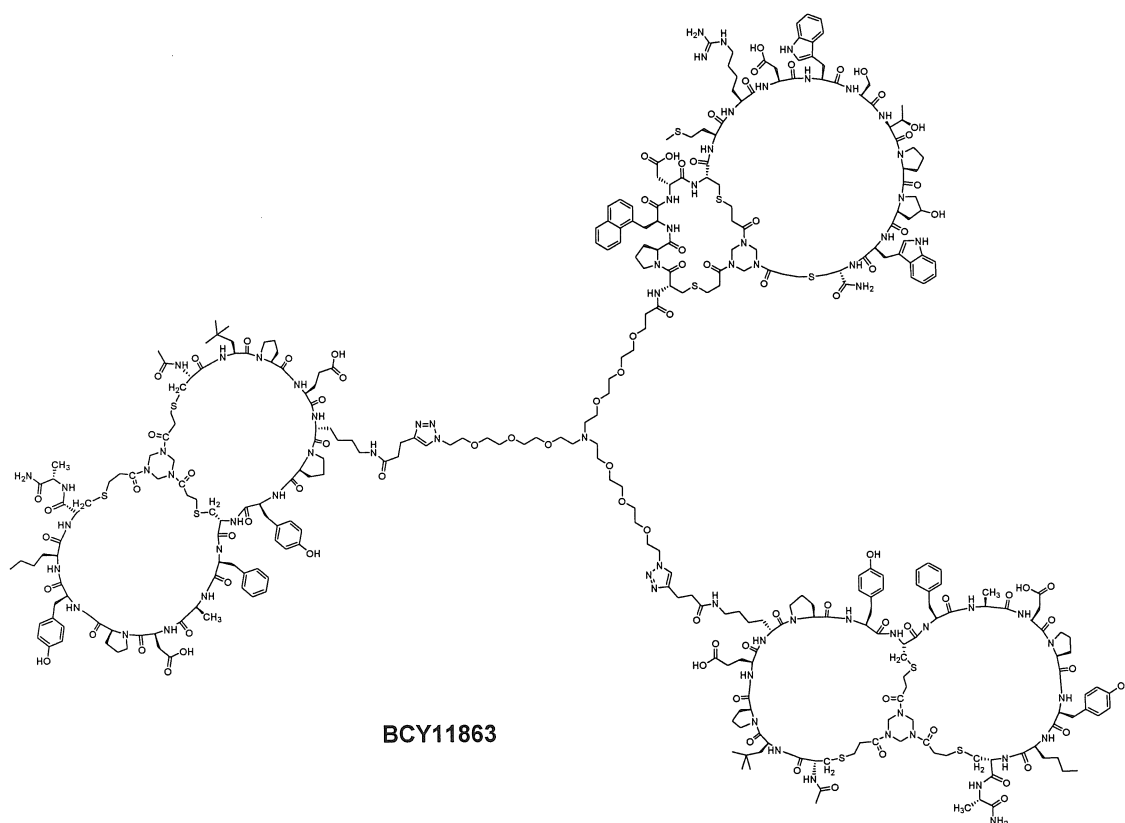


Tất cả các dung môi được khử khí và làm sạch bằng khí N₂ 3 lần. Dung dịch của BP-23825 (1,0 đương lượng), HATU (1,2 đương lượng) và DIEA (2,0 đương lượng) trong DMF được trộn trong 5 phút, sau đó bổ sung thêm Vòng đôi 1 (1,2 đương lượng). Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 40°C trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng sau đó được cô đặc trong điều kiện áp suất rút gọn để loại bỏ dung môi và tinh sạch bằng HPLC điều chế để tạo ra chất trung gian 2.

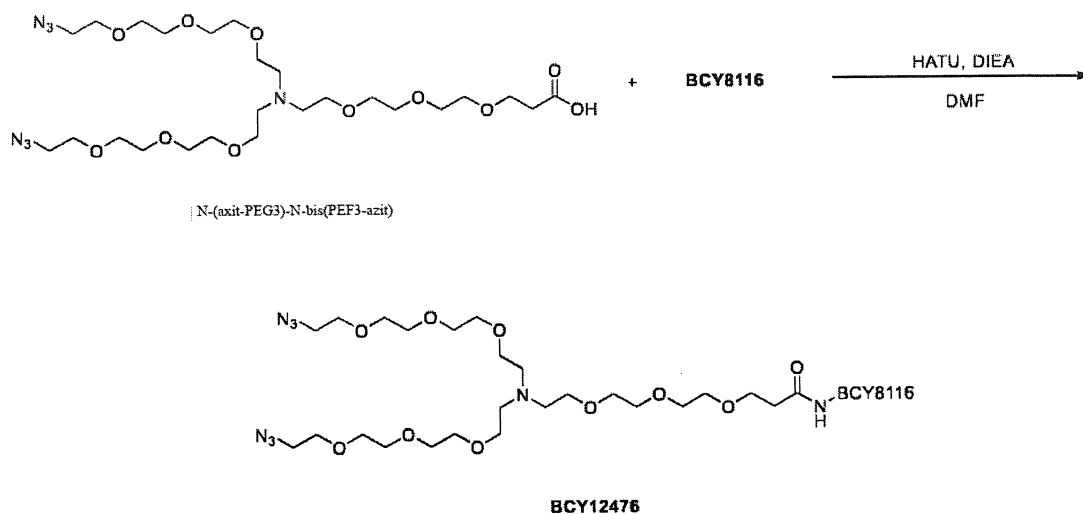
Hỗn hợp của chất trung gian 2 (1,0 đương lượng) và Vòng đôi 2 (2,0 đương lượng) được hòa tan trong t-BuOH/H₂O (1:1), và sau đó CuSO₄ (1,0 đương lượng), VcNa (4,0 đương lượng), và THPTA (2,0 đương lượng) được thêm vào. Cuối cùng, NH₄HCO₃ 0,2 M được thêm vào để điều chỉnh pH thành pH 8. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 40°C trong 16 giờ trong môi trường chứa nhiều N₂. Hỗn hợp phản ứng được tinh sạch trực tiếp bằng HPLC điều chế.

Thử nghiệm chi tiết hơn đối với phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp theo sáng chế được cung cấp dưới đây trong tài liệu này :

Ví dụ 1: Tổng hợp BCY11863



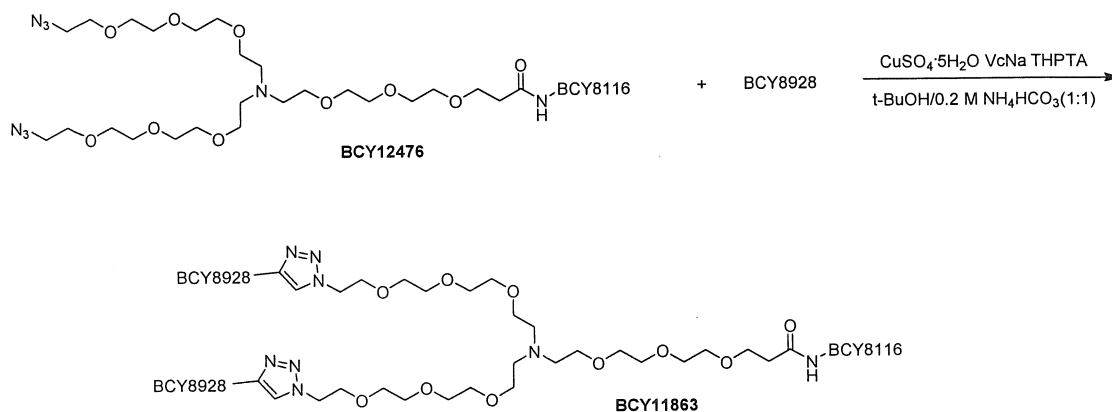
Quy trình điều chế BCY12476



Hỗn hợp của N-(axit-PEG3)-N-bis(PEG3-azit) (70,0 mg, 112,2 μ mol, 1,0 đương lượng), HATU (51,2 mg, 134,7 μ mol, 1,2 đương lượng) và DIEA (29,0 mg, 224,4 μ mol, 40 μ L, 2,0 đương lượng) được hòa tan trong DMF (2 mL), và được trộn trong 5 phút. Sau đó BCY8116 (294,0 mg, 135,3 μ mol, 1,2 đương lượng) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được khuấy tại 40°C trong 16 giờ. LC-MS cho thấy một đỉnh sản phẩm chính với m/z mong muốn. Cô đặc hỗn hợp phản ứng trong điều kiện áp suất rút gọn để loại

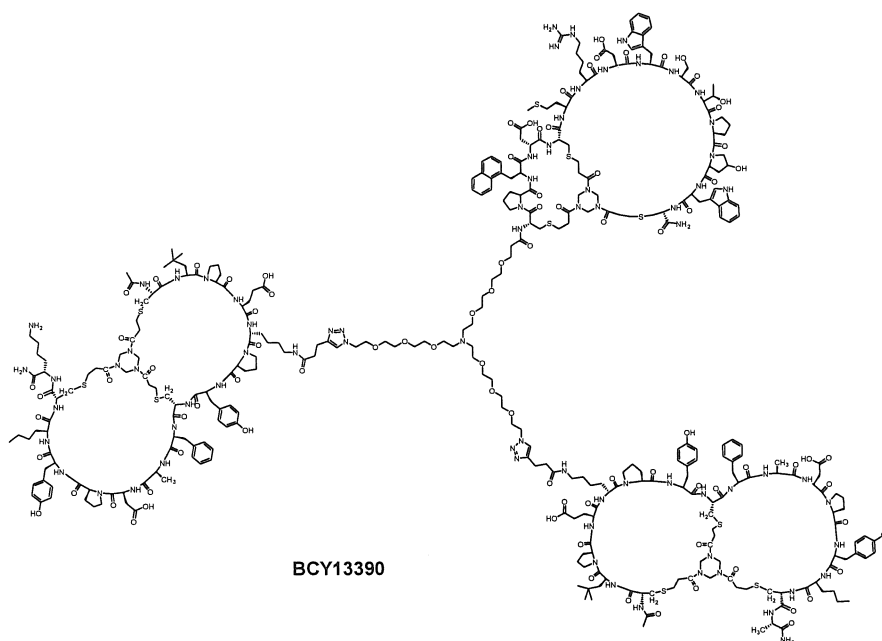
bỏ dung môi và tạo ra phần bã. Phần bã được tinh sạch bằng HPLC điều chế. Thu được BCY12476 (194,5 mg, 66,02 μmol , hiệu suất 29%, độ tinh sạch 94%) dưới dạng chất rắn màu trắng. MW được tính toán: 2778,17, m/z quan sát được: 1389,3 ($M+2H$)²⁺; 926,7 ($M+3H$)³⁺.

Quy trình điều chế BCY11863

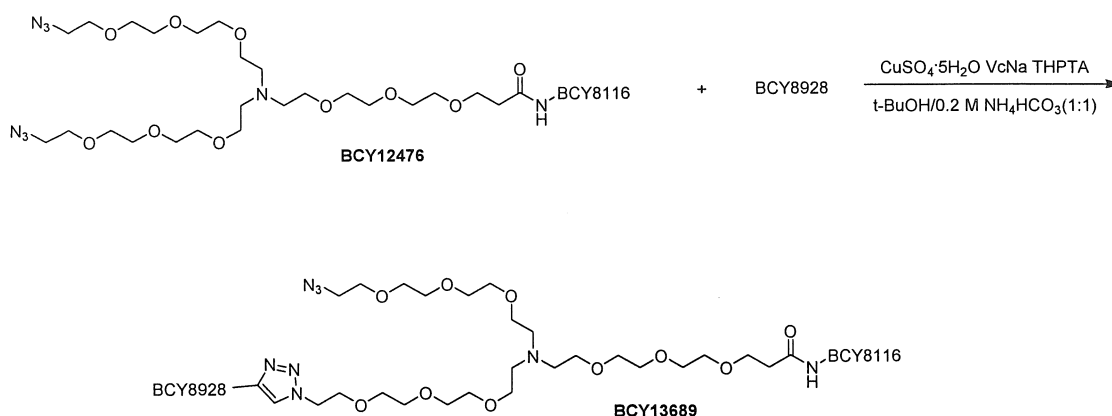


Hỗn hợp của BCY12476 (100,0 mg, 36,0 μmol , 1,0 đương lượng), BCY8928 (160,0 mg, 72,0 μmol , 2,0 đương lượng) đầu tiên được hòa tan trong 2 mL $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1), và sau đó CuSO_4 (0,4 M, 180 μL , 1,0 đương lượng) và VcNa (28,5 mg, 143,8 μmol , 4,0 đương lượng), THPTA (31,2 mg, 71,8 μmol , 2,0 đương lượng) được thêm vào. Cuối cùng, NH_4HCO_3 0,2 M được thêm vào để điều chỉnh pH thành pH 8. Tất cả các dung môi được khử khí và được làm sạch bằng khí N_2 . Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 40°C trong 16 giờ trong môi trường chứa nhiều N_2 . LC-MS cho thấy BCY8928 còn lại và m/z mong muốn cũng phát hiện được. Hỗn hợp phản ứng được tinh sạch trực tiếp bằng HPLC điều chế. Tinh sạch lần thứ nhất tạo ra BCY11863 (117,7 mg, 15,22 μmol , hiệu suất 42,29%, độ tinh sạch 93,29%) dưới dạng muối TFA, trong khi các phần ít tinh sạch hơn được tinh sạch lại lần nữa bằng HPLC điều chế, tạo ra BCY11863 (33,2 mg, 4,3 μmol , hiệu suất 12%, độ tinh sạch 95%) dưới dạng muối TFA. MW được tính toán: 7213,32, m/z quan sát được: 1444,0 ($[M+5H]$)⁵⁺.

Ví dụ 2: Tổng hợp BCY13390



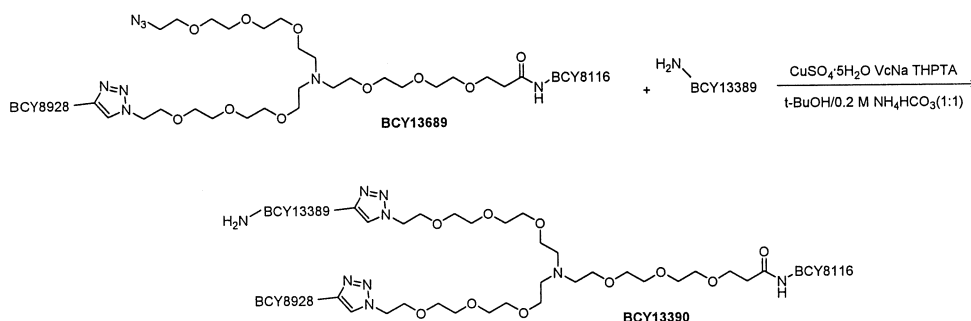
Quy trình điều chế BCY13689



Hỗn hợp của BCY12476 (47,0 mg, 16,91 μmol , 1,0 đương lượng), BCY8928 (30,0 mg, 13,53 μmol , 0,8 đương lượng), và THPTA (36,7 mg, 84,55 μmol , 5,0 đương lượng) được hòa tan trong t-BuOH/H₂O (1:1, 8 mL, khử khí trước và làm sạch bằng N₂), và sau đó CuSO₄ (0,4 M, 21,0 μL , 0,5 đương lượng) và VcNa (67,0 mg, 338,21 μmol , 20,0 đương lượng) được thêm vào dưới khí N₂. pH của dung dịch này được điều chỉnh thành 8 bằng cách thêm từng giọt NH₄HCO₃ 0,2 M (trong 1:1 t-BuOH/H₂O), và dung dịch chuyển sang màu vàng nhạt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 1,5 giờ trong môi trường chứa nhiều N₂. LC-MS cho thấy rằng một vài BCY12476 vẫn còn, BCY8928 được tiêu thụ hoàn toàn, và phát hiện ra đỉnh có m/z mong muốn. Hợp phản ứng được lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất rút gọn để tạo ra phần bã. Sản phẩm thô được tinh sạch bằng HPLC điều chế, và thu được BCY13689 (25,3 mg, 4,56 μmol , hiệu

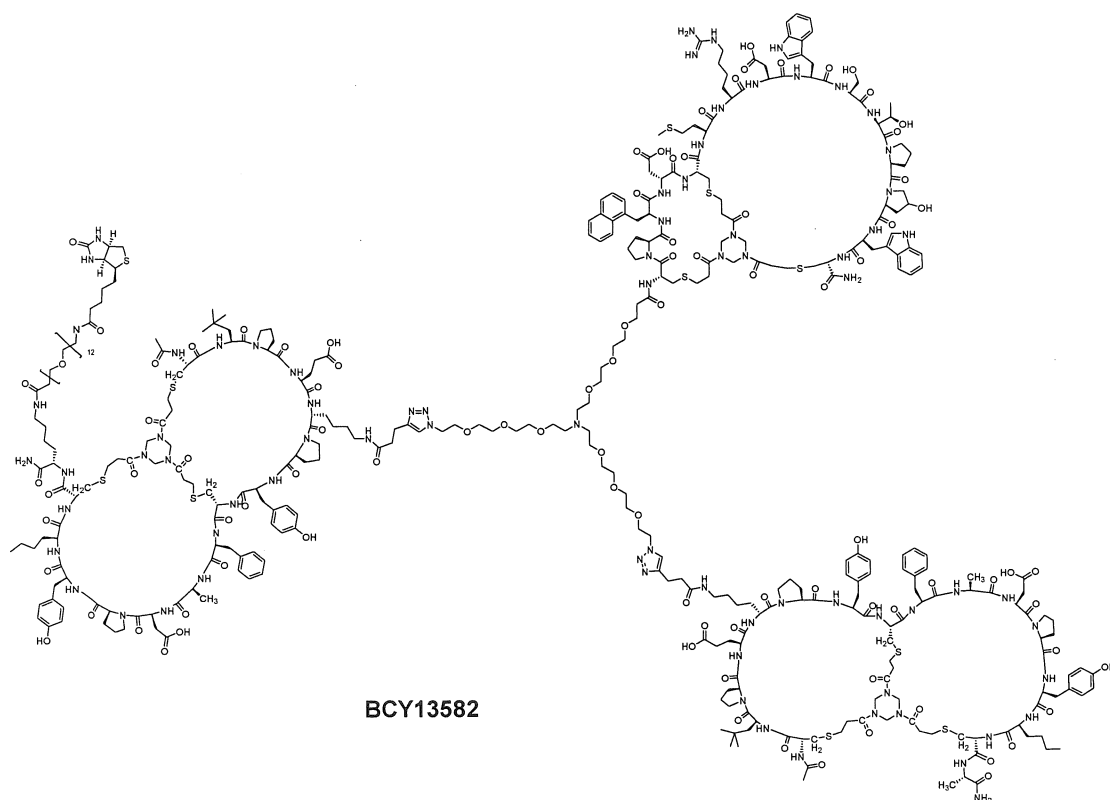
suất 27%, độ tinh sạch 90%) dưới dạng chất rắn màu trắng. MW được tính toán: 4995,74, m/z quan sát được: 1249,4 ($[M+4H]^{4+}$), 999,9 ($[M+5H]^{5+}$).

Quy trình điều chế BCY13390

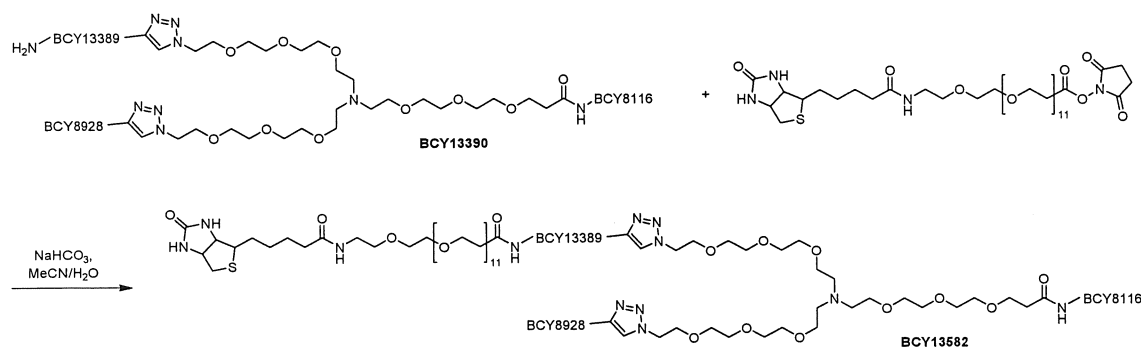


Hỗn hợp của BCY13689 (43,6 mg, 8,73 μ mol, 1,0 đương lượng), BCY13389 (20,8 mg, 9,16 μ mol, 1,05 đương lượng), và THPTA (3,8 mg, 8,73 μ mol, 1,0 đương lượng) được hòa tan trong t-BuOH/H₂O (1:1, 1 mL, khử khí trước và làm sạch bằng khí N₂), và sau đó CuSO₄ (0,4 M, 22,0 μ L, 1,0 đương lượng) và VcNa (3,5 mg, 17,45 μ mol, 2,0 đương lượng) được thêm vào dưới khí N₂. pH của dung dịch này được điều chỉnh đến 8 bằng cách thêm từng giọt NH₄HCO₃ 0,2 M (trong 1:1 t-BuOH/H₂O) và dung dịch chuyển sang màu vàng nhạt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở 25°C trong 2 giờ trong môi trường N₂. LC-MS cho thấy một đỉnh quan trọng tương ứng với m/z mong muốn. Hỗn hợp phản ứng được lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất rút gọn để tạo ra phần bã. Sản phẩm thô được tinh sạch bằng HPLC điều chế, và thu được BCY13390 (33,8 mg, 4,21 μ mol, hiệu suất 48%, độ tinh sạch 90%) dưới dạng chất rắn màu trắng. MW được tính toán: 7270,41, m/z quan sát được: 1454,9 ($[M+5H]^{5+}$), 1213,2 ($[M+6H]^{6+}$).

Ví dụ 3: Tổng hợp BCY13582



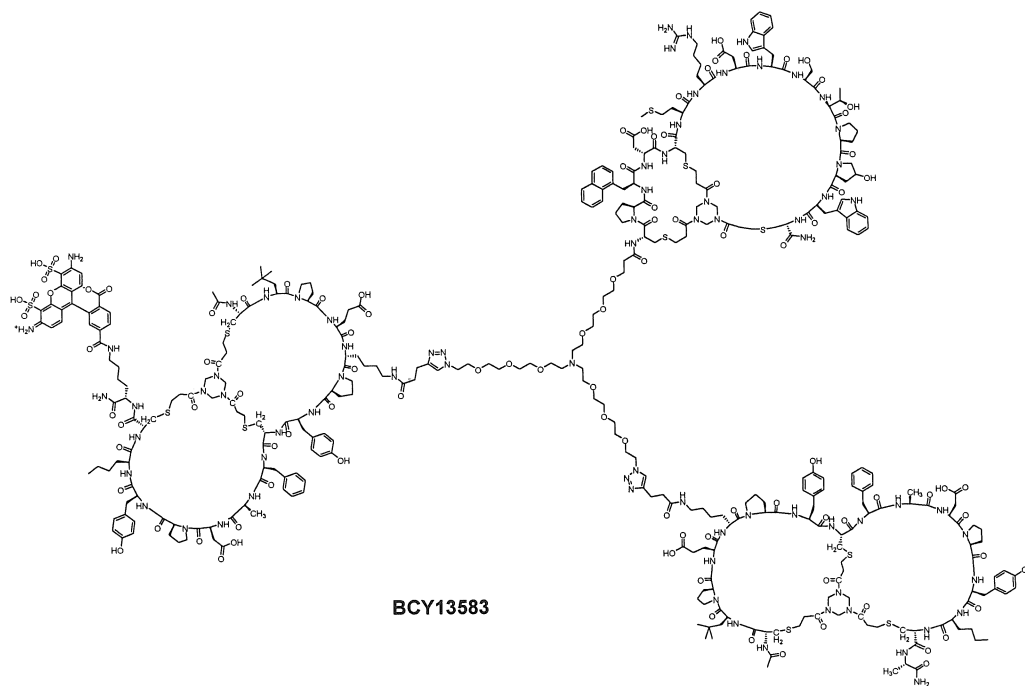
Quy trình điều chế BCY13582



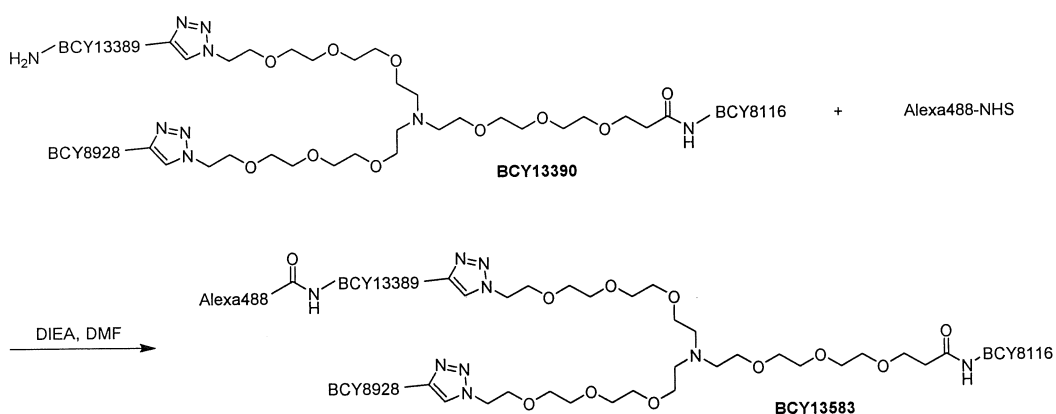
Hỗn hợp của BCY13390 (5,0 mg, 0,6 μmol , 1,0 đương lượng), este biotin-PEG12-NHS (CAS 365441-71-0, 0,7 mg, 0,72 μmol , 1,1 đương lượng) được hòa tan trong MeCN/H₂O (1:1, 2 mL). pH của dung dịch này được điều chỉnh đến 8 bằng cách thêm từng giọt NaHCO₃ 1,0M. Hỗn hợp phản ứng được khuấy tại 25°C trong 0,5 giờ. LC-MS cho thấy BCY13390 được tiêu thụ hoàn toàn, và một đỉnh chính với m/z mong muốn được phát hiện. Hợp phản ứng được lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất rút gọn để tạo ra phần bã. Sản phẩm thô được tinh sạch bằng HPLC điều chế, và thu được BCY13582 (2,5 mg, 0,30 μmol , hiệu suất 43%, độ tinh khiết 96%) dưới dạng chất rắn màu trắng. MW được tính toán: 8096,43, m/z quan sát được: 1351,1 ([M+6H]⁶⁺), 1158,5

$([M+7H]^{7+})$.

Ví dụ 4: Tổng hợp BCY13583



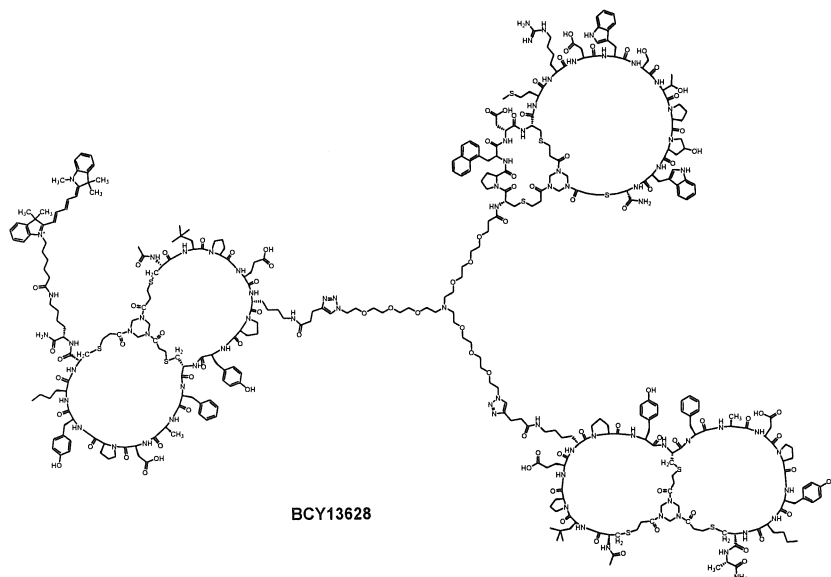
Quy trình điều chế BCY13583



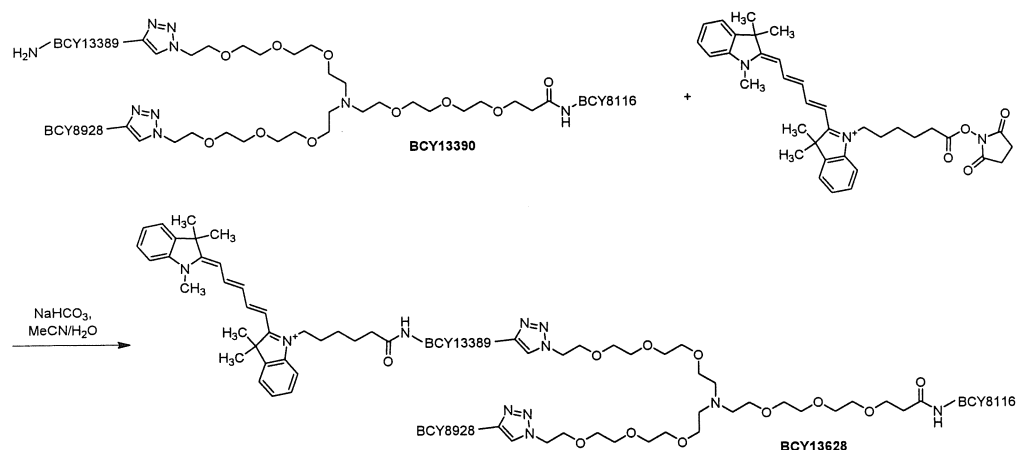
Hỗn hợp của BCY13390 (15,0 mg, 2,06 μmol , 1,0 đương lượng) và este Alexa fluor® 488 NHS (2,5 mg, 4,12 μmol , 2,0 đương lượng) được hoà tan trong DMF (0,5 mL). DIEA (2,6 mg, 20,63 μmol , 3,6 μL , 10 đương lượng) sau đó được thêm vào từng giọt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy tại 25°C trong 1 giờ. LC-MS cho thấy BCY14964 vẫn còn, và một đỉnh chính có m/z mong muốn được phát hiện. Este Alexa fluor® 488 NHS (2,0 mg, 3,09 μmol , 1,5 đương lượng) nữa được thêm vào hỗn hợp phản ứng, và hỗn hợp phản ứng được khuấy tại 25°C trong thêm một giờ nữa. HPLC cho thấy BCY13390 được tiêu thụ hoàn toàn. Hỗn hợp phản ứng được lọc và cô đặc trong điều

kiện áp suất rút gọn để tạo ra phần bã. Tinh sạch sản phẩm thô bằng HPLC điều chế và thu được BCY13583 (5 mg, 0,61 μmol , hiệu suất 29%, độ tinh sạch 95%) dưới dạng chất rắn màu đỏ. MW được tính toán: 7787,9, m/z quan sát được: 1948,8 ($[\text{M}+4\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^{4+}$), 1558,6 ($[\text{M}+5\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^{5+}$), 1299,1 ($[\text{M}+7\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^{7+}$).

Ví dụ 5: Tổng hợp BCY13628



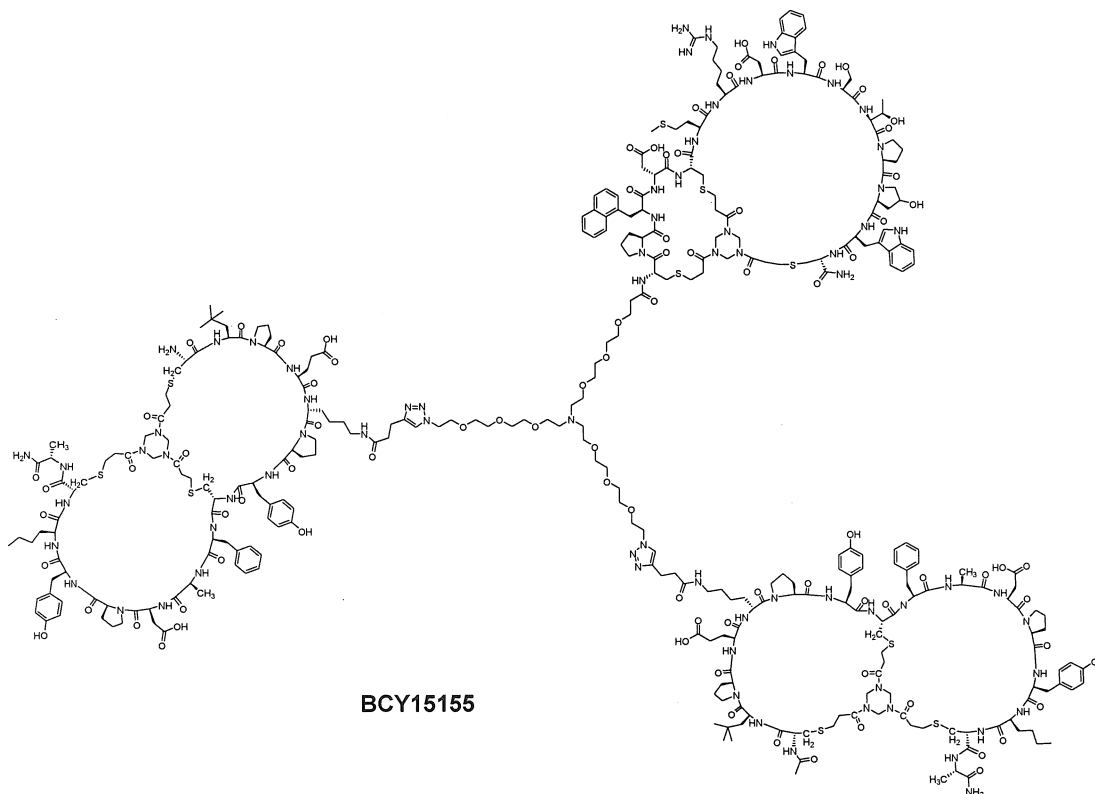
Quy trình điều chế BCY13628



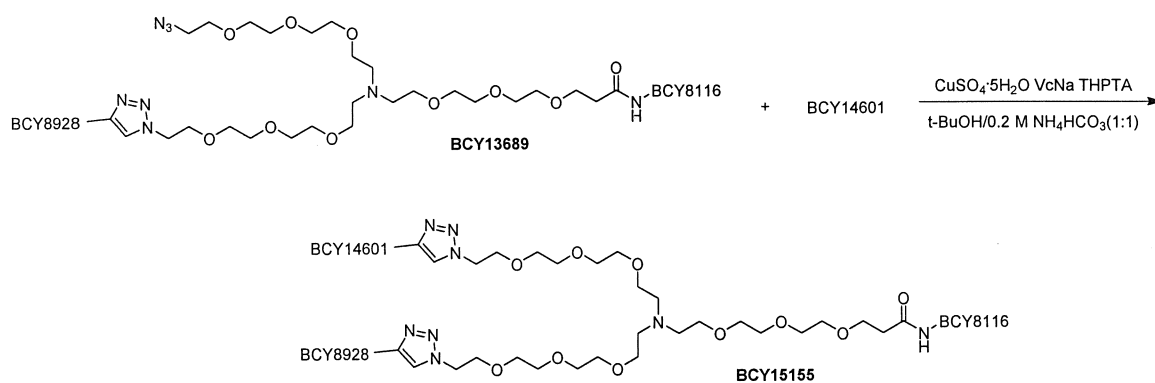
Hỗn hợp của BCY13390 (5,6 mg, 0,77 μmol , 1,0 đương lượng) và este xyanin 5 NHS (0,5 mg, 0,85 μmol , 1,1 đương lượng) được hòa tan trong MeCN/ H_2O (1:1, 2 mL). pH của dung dịch này được điều chỉnh thành 8 bằng cách thêm từng giọt NaHCO_3 1,0 M. Hỗn hợp phản ứng được khuấy tại 25°C trong 0,5 giờ. LC-MS cho thấy BCY13390 được tiêu thụ hoàn toàn và một đỉnh chính với m/z mong muốn được phát hiện. Hỗn hợp phản ứng được lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất rút gọn để tạo ra phần bã. Tinh

sạch sản phẩm thô bằng HPLC điều chế, và thu được BCY13628 (2,9 mg, 0,36 μmol , hiệu suất 46%, độ tinh sạch 95%) là chất rắn màu xanh. MW được tính toán: 7736,06, m/z quan sát được: 1289,9 ($[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$), 1105,5 ($[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$).

Ví dụ 6: Tổng hợp BCY15155



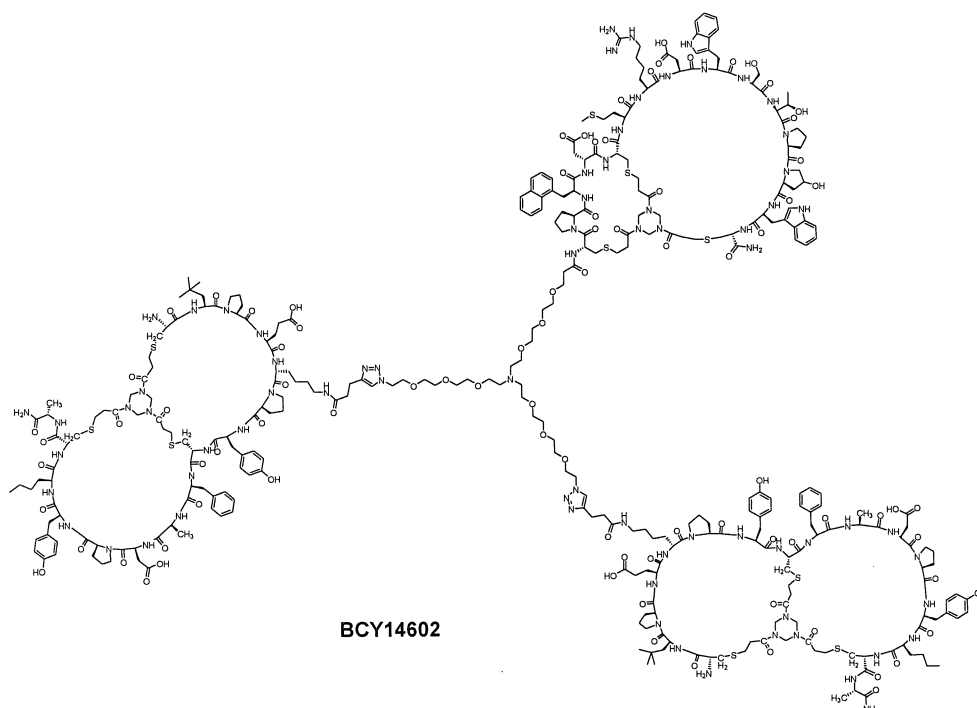
Quy trình điều chế BCY15155



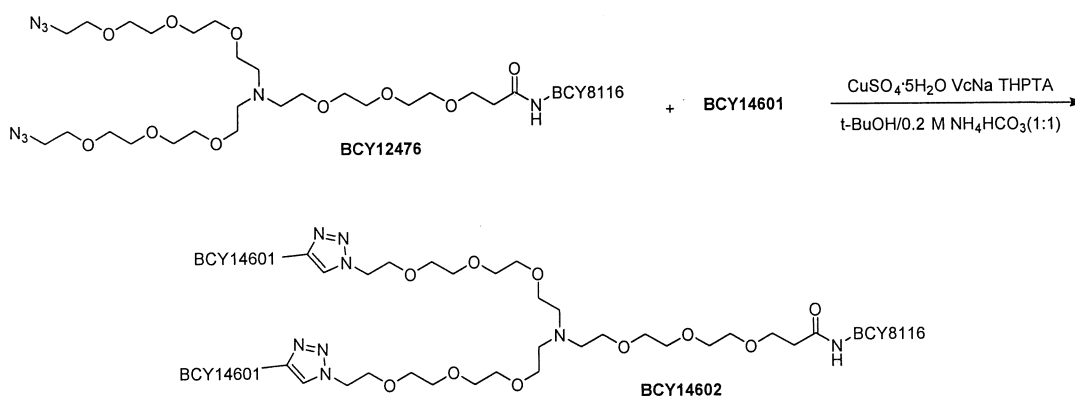
Hỗn hợp của BCY13689 (25,0 mg, 5,00 μmol , 1,0 đương lượng), BCY14601 (13,0 mg, 6,01 μmol , 1,2 đương lượng), và THPTA (2,0 mg, 5,00 μmol , 1,0 đương lượng) được hòa tan trong t-BuOH/ NH_4HCO_3 0,2 M (1:1, 0,5 mL, khử khí trước và làm sạch bằng N_2), và sau đó CuSO_4 (0,4 M, 12,5 μL , 1,0 đương lượng) và Vc (3,5 mg,

20,02 μmol , 4,0 đương lượng) được thêm vào dưới khí N_2 . pH của dung dịch này được điều chỉnh thành 8 và dung dịch chuyển sang màu vàng nhạt. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 25°C trong 2 giờ trong môi trường N_2 . LC-MS cho thấy BCY13689 được tiêu thụ hoàn toàn, một số BCY14601 vẫn còn và một đỉnh chính với m/z mong muốn được phát hiện. Hỗn hợp phản ứng được lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất rút gọn để tạo ra phần bã. Sản phẩm thô được tinh sạch bằng HPLC điều chế, và thu được BCY15155 (19,7 mg, 2,41 μmol , hiệu suất 36%, độ tinh sạch 97%) dưới dạng chất rắn màu trắng. MW được tính toán: 7171,3, m/z quan sát được: 1434,7 ($[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$), 1196,2 ($[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$).

Ví dụ 7: Tổng hợp BCY14602



Quy trình điều chế BCY14602



Hỗn hợp của BCY12476 (100,0 mg, 36,00 μmol , 1,0 đương lượng), BCY14601

(158,0 mg, 72,63 μmol , 2,04 đương lượng), và THPTA (15,6 mg, 36,00 μmol , 1,0 đương lượng) được hòa tan trong t-BuOH/ NH_4HCO_3 0,2 M (1:1, 2 mL, khử khí trước và làm sạch bằng N_2), và sau đó CuSO_4 (0,4 M, 89,0 μL , 1,0 đương lượng) và VcNa (28,5 mg, 143,98 μmol , 4,0 đương lượng) được thêm vào dưới khí N_2 . pH của dung dịch này được điều chỉnh thành 8 và dung dịch chuyển sang màu vàng nhạt. THPTA và VcNa được thêm vào hai lần, và toàn bộ dung dịch được khuấy tại 25°C trong 48 giờ dưới không khí chứa nhiều N_2 . LC-MS cho thấy BCY12476 được tiêu thụ hoàn toàn, BCY14601 vẫn còn, và một đỉnh chính với m/z mong muốn được phát hiện. Sản phẩm phụ nào đó cũng được phát hiện. Hợp phản ứng được lọc và cô đặc trong điều kiện áp suất rút gọn để tạo ra phân bã. Sản phẩm thô được tinh sạch bằng HPLC điều chế, và thu được BCY14602 (45,2 mg, 5,51 μmol , hiệu suất 15%, độ tinh sạch 86%) dưới dạng chất rắn màu trắng. MW được tính toán: 7129,2, m/z quan sát được: 1426,6 ($[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$), 1189,1 ($[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$).

Số liệu phân tích

Phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp sau đây theo sáng chế được phân tích sử dụng phương pháp khối phổ và HPLC. Thiết lập HPLC như sau:

Pha động: A: TFA 0,1% trong H_2O ; B: TFA 0,1% trong ACN

Lưu lượng: 1,0 ml/phút

Cột: Gemini-NX C18 5 μm 110A 150*4,6mm

Thiết bị: Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)

Gradient được sử dụng là 30-60% B trong 20 phút và số liệu được tạo ra như sau:

ID phức hợp	Dữ liệu phân tích - Khối phổ	Thời gian lưu HPLC (phút)
BCY11863	MW: 7213,32, m/z quan sát được: 1444,0 ($[\text{M}/5+\text{H}]^+$)	10,649

Dữ liệu sinh học

1. Thử nghiệm chất báo cáo CD137 đồng nuôi với tế bào khối u

Môi trường nuôi cấy, được gọi là môi trường R1, được chuẩn bị bằng cách bổ sung FBS 1% vào RPMI-1640 (thành phần của kit Promega CS196005). Chuẩn bị dung

dịch pha loãng nối tiếp của các mẫu thử trong R1 trong đĩa 96 giếng. Bổ sung 25 μL mỗi giếng của mẫu thử hoặc R1 (là đối chứng nền) vào các giếng được chỉ định trong đĩa nuôi cấy tế bào trắng. Thu hoạch tế bào khối u* và tạo huyền phù lại với nồng độ 400.000 tế bào/mL trong môi trường R1. Hai mươi lăm (25) μL /giếng tế bào khối u được thêm vào đĩa môi trường nuôi cấy trắng. Rã đông tế bào Jurkat (kit Promega CS196005, 0,5 mL) trong bể nước và sau đó thêm vào 5 ml môi trường R1 đã làm ấm sẵn. Sau đó bổ sung thêm hai mươi lăm (25) μL /giếng tế bào Jurkat vào đĩa môi trường nuôi cấy trắng. Ủ tế bào và mẫu thử trong 6 giờ ở 37°C, CO₂ 5%. Vào cuối 6 giờ, thêm Bio-Glo™ 75 μL /giếng thuốc thử (Promega) và ủ trong 10 phút trước khi đọc độ phát quang trong máy đọc đĩa (Clariostar, BMG). Tính toán số lần thay đổi so với các tế bào đơn lẻ (tế bào Jurkat + Dòng tế bào được sử dụng trong đồng nuôi cấy) và vẽ biểu đồ trong GraphPad Prism dưới dạng log(chất chủ vận) so với sự đáp ứng để xác định EC₅₀ (nM) và Số lần Cảm Ứng trên nền (Tối đa).

Loại tế bào khối u được sử dụng trong đồng nuôi cấy là NCI-H292, CT26 #7, MC38 #13, HT1376, NCI-H322 và T47D mà đã được chứng minh là biểu hiện Nectin-4.

Dữ liệu được trình bày trong Fig.1A cho thấy rằng phức hợp khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 (BCY11863) làm hoạt hóa mạnh CD137 trong thử nghiệm chất báo cáo CD137 và việc hoạt hóa phụ thuộc vào liên kết của phức hợp khác nhau nối tiếp với CD137. BCY11617, phân tử trong đó peptit hai vòng CD137 chứa tất cả các axit amin-D loại bỏ liên kết không gây ra cơ chế chủ vận CD137.

Sơ lược về EC₅₀ (nM) gây ra bởi phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp BCY11863 và chất tương tự gần gũi trong thử nghiệm chất báo cáo CD137 trong đồng nuôi cấy với dòng tế bào khối u biểu hiện Nectin-4 được báo cáo trong bảng 1 bên dưới và được trình bày trong Fig.1B. Dữ liệu này chứng minh tiềm năng của BCY11863 trong việc gây ra cơ chế chủ vận CD137 trong đồng nuôi cấy với dòng tế bào mà có phạm vi biểu hiện Nectin-4.

Bảng 1: EC₅₀ (nM) của số lần cảm ứng trên nền được tạo ra bởi phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 trong thử nghiệm chất báo cáo CD137

ID phức hợp	Loại dòng tế bào khối u	Dòng tế bào được sử dụng trong đồng	EC ₅₀ (nM) trung bình số học
-------------	-------------------------	-------------------------------------	---

		nuôi cấy	
BCY11863	Chuột nhà	CT26#7	$0,14 \pm 0,07$
BCY11863	Chuột nhà	MC38#13	$0,31 \pm 0,26$
BCY11863	người	NCI-H292	$0,28 \pm 0,20$
BCY11863	người	HT1376	$0,52 \pm 0,30$
BCY11863	người	NCI-H322	$0,33 \pm 0,21$
BCY11863	người	T47D	$0,42 \pm 0,24$
BCY11863	người	MDA-MB-468	$0,23 \pm 0,01$
BCY13582	người	HT1376	$0,58 \pm 0,27$
BCY13582	người	MDA-MB-468	$0,34 \pm 0,02$
BCY13583	người	HT1376	$1,7 \pm 0,9$
BCY13583	người	MDA-MB-468	$0,84 \pm 0,07$

2. Thử nghiệm đồng nuôi cấy PBMC người (giải phóng Xytokin)

Các tế bào khối u người và chuột nhà được đồng nuôi cấy theo hướng dẫn của nhà sản xuất. PBMC đông lạnh từ người cho khỏe mạnh được rã đông và rửa sạch một lần trong PBS nhiệt độ phòng, và sau đó được tạo huyền phù lại trong môi trường R10. 100 μ l PBMC (1000000 PBMC/ml) và 100 μ l tế bào khối u (100000 tế bào khối u/ml) (Tỷ lệ chất tác động: tế bào đích (E:T) (10:1) được đưa vào trong mỗi giếng của đĩa 96 giếng đáy phẳng dùng cho thử nghiệm đồng nuôi cấy. Bổ sung thêm 100 ng/ml mAb kháng CD3 hòa tan (dòng OKT3) vào môi trường nuôi cấy ở ngày 0 để kích thích PBMC ở người. Pha loãng các hợp chất thử nghiệm, đối chứng hoặc đối chứng tá được lỏng trong môi trường R10 và lần lượt bổ sung thêm 50 μ L vào các giếng để đưa thể tích cuối cùng của mỗi giếng lên 250 μ L. Đậy các đĩa bằng màng thoáng khí và ủ trong buồng làm ẩm ở 37°C với CO₂ 5% trong hai ngày. Thu phần dịch nổi 48 giờ sau khi kích thích, và IL-2 và IFN γ người được phát hiện bằng Luminex. Tóm lại, bổ sung các chất chuẩn và mẫu vào đĩa 96 giếng màu đen. Bổ sung dung dịch hỗn hợp vi hạt (được cung cấp trong kit Luminex, R&D Systems) và lắc trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Đĩa được rửa 3 lần bằng cách sử dụng giá đỡ từ tính. Sau đó, dung dịch hỗn hợp Biotin được thêm vào đĩa và lắc trong 1 giờ tại nhiệt độ phòng. Đĩa được rửa 3 lần bằng cách sử dụng giá đỡ

từ tính. Dung dịch hỗn hợp Streptavidin được thêm vào đĩa và lắc trong 30 phút tại nhiệt độ phòng. Đĩa được rửa 3 lần bằng cách sử dụng giá đỡ từ tính, tạo huyền phù lại trong 100 μ L đệm rửa, lắc trong 2 phút ở nhiệt độ phòng, và đọc bằng Luminex 2000. Phân tích số liệu thô bằng phần mềm Luminex tích hợp sẵn để tạo ra các đường cong chuẩn và nội suy nồng độ protein, tất cả các phân tích dữ liệu và vẽ đồ thị khác được thực hiện bằng Excel và Prism. Số liệu đại diện cho một nghiên cứu với 3-5 PBMC của người cho độc lập được thử nghiệm trong thử nghiệm lặp lại ba lần.

Dữ liệu trình bày trong Fig.2A và 2B chứng minh rằng phức hợp khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 (BCY11863) gây tiết nhiều xytokin IL-2 và IFN- γ trong thử nghiệm đồng nuôi cấy PBMC-4T1. BCY11617 là đối chứng âm liên kết với Nectin-4 nhưng không liên kết với CD137.

Sơ lược về EC₅₀ (nM) và việc tiết xytokin IFN- γ tối đa (pg/ml) gây ra bởi phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 được chọn trong thử nghiệm đồng nuôi cấy PBMC ở người (giải phóng xytokin) được báo cáo trong bảng 2 bên dưới và trình bày trong Fig.2C. Điều này chứng minh tiềm năng của BCY11863 trong việc gây ra tiết xytokin khi có mặt một số dòng tế bào khối u khác nhau biểu hiện Nectin-4.

Bảng 2: EC₅₀ của việc tiết xytokin IFN- γ gây ra bởi phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 trong thử nghiệm đồng nuôi cấy PBMC ở người (giải phóng xytokin) được chọn

Dòng tế bào	IL-2 (nM)	IFN γ (nM)	Số lượng người cho
MC38#13 (chuột nhà)	0,25 $\pm$ 0,08	0,17 $\pm$ 0,11	4
4T1-D02 (chuột nhà)	0,16 $\pm$ 0,22	0,04 $\pm$ 0,04	4
HT1376 (người)	0,39 $\pm$ 0,29	0,23 $\pm$ 0,15	5
T-47D (người)	0,20 $\pm$ 0,07	0,08 $\pm$ 0,06	3
H322 (người)	0,84 $\pm$ 0,15	0,85 $\pm$ 0,66	3
BCY11863	4T1-mẹ (Nectin4-)	Không có cảm ứng lên đến 100 nM	

3. Dược động học của phức hợp khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 BCY11863 trong chuột đồng SD

Chuột đồng SD đực được cho dùng theo liều lượng với phức hợp khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 BCY11863 được bào chế trong Histidin Hcl 25 mM, sucroza 10% pH 7 bằng cách tiêm nhanh IV, truyền IV (15 phút) hoặc tiêm dưới da. Tiến hành lấy máu theo thứ tự (khoảng 80 μ L máu/thời điểm) dưới hoặc qua tĩnh mạch hiển tại mỗi thời điểm. Chuyển ngay lập tức tất cả các mẫu máu vào ống ly tâm siêu nhỏ được làm lạnh sẵn có chứa 2 μ L K2-EDTA (0,5M) làm chất chống đông và đặt trên đá ướt. Xử lý ngay lập tức mẫu máu để lấy huyết tương bằng cách ly tâm ở nhiệt độ khoảng 4°C, 3000g. Kết tủa bao gồm chất chuẩn nội ngay lập tức được thêm vào huyết tương, trộn đều và ly tâm ở 12000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút. Dịch nổi được chuyển sang ống ly tâm nhỏ polypropylen được gắn nhãn sẵn, và sau đó đông lạnh nhanh trên đá khô. Bảo quản mẫu ở 70°C hoặc thấp hơn nếu cần cho đến khi phân tích. Bơm trực tiếp 7,5 μ L dịch nổi để phân tích LC-MS/MS bằng cách sử dụng Orbitrap Q Exactive ở chế độ ion dương để xác định nồng độ của chất phân tích. Phân tích số liệu nồng độ huyết tương theo thời gian bằng phương pháp tiếp cận không phân vùng sử dụng chương trình phần mềm Phoenix WinNonlin 6.3. Báo cáo C₀, C₁, V_{dss}, T_{1/2}, AUC(0-last), AUC(0-inf), MRT(0-last), MRT(0-inf) và đồ thị của đặc điểm nồng độ huyết tương theo thời gian. Các tham số dược động học từ thử nghiệm như được trình bày trong Bảng 3:

Bảng 3: Tham số dược động học trên chuột đồng SD

Hợp chất	Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng	T _{1/2} (giờ)	V _{dss} (L/kg)	Cl _p (ml/phút/kg)	% F
BCY11863	1,9	Tiêm nhanh IV	4,1	1,6	7,7	-
	3,2	Truyền IV (15 phút)	3,1	1,3	9,3	-
	6,3	SC	2,5	-	-	95%

Dữ liệu trong bảng 3 ở trên và Fig.5 cho thấy rằng BCY11863 là phân tử thanh thải thấp với thể tích phân bố lớn hơn so với thể tích huyết tương. Ngoài ra, khả dụng sinh học từ liều SC của BCY11863 cao ở chuột đồng.

Bảng 4: Tham số dược động học của BCY11863 và chất chuyển hóa tiềm năng trong nghiên cứu dược động học chuột đồng SD sau khi dùng liều lượng 100 mg/kg theo đường tĩnh mạch

Chất phân tích	Cmax (ng/mL)	AUC (ng.h/mL)	T1/2(giờ)	Vdss (L/kg)	Clp (ml/phút/kg)
BCY11863	279540	129863	5,4	2,3	13
BCY15155	2854	1296	3,1	-	-
BCY14602	-	-	-	-	-

Dữ liệu trong Bảng 4 và Fig.14 cho thấy rằng < 1% của BCY11863 được chuyển hóa thành BCY15155 khi dùng BCY11863 theo đường tĩnh mạch cho chuột đồng SD. Không có chuyển đổi đáng kể nào thành BCY14602 được ghi nhận trong 24 giờ đầu tiên của nghiên cứu.

4. Dược động học của phức hợp khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 BCY11863 trong khi đuôi dài

Khi đuôi dài đã được thử nghiệm được cho dùng theo liều lượng thông qua truyền tĩnh mạch (15 hoặc 30 phút) vào tĩnh mạch đầu với 1 mg/kg phức hợp khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 BCY11863 được bào chế trong Histidin HCl 25 mM, sucroza 10% pH 7. Tiến hành lấy máu theo thứ tự (khoảng 1,2 ml máu/ thời điểm) từ mạch ngoại vi của động vật bị nhốt giữ, không cho dùng thuốc an thần tại mỗi thời điểm vào ống bán sẵn có chứa kali (K2) EDTA*2H₂O (0,85-1,15 mg) trên đá ướt và được xử lý huyết tương. Ly tâm mẫu (3000 x g trong 10 phút ở 2 đến 8°C) ngay sau khi thu. 0,1 mL huyết tương được chuyển vào trong ống ly tâm nhỏ polypropylen đã dán nhãn. 5 lần của kết tủa bao gồm chất chuẩn nội 100 ng/mL Labetalol & 100 ng/mL dexametason & 100 ng/mL tolbutamit & 100 ng/mL Verapamil & 100 ng/mL Glyburide & 100 ng/mL Celecoxib trong MeOH ngay lập tức được thêm vào huyết tương, trộn đều và ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 10 phút ở 2 đến 8°C. Chuyển mẫu dịch nổi vào các ống ly tâm nhỏ polypropylen được dán nhãn sẵn và đông lạnh trên đá khô. Bảo quản mẫu tại -60°C hoặc thấp hơn nếu cần cho đến khi phân tích LC-MS/MS. Bỏ sung phần phân ước của 40 µL chất chuẩn chuẩn độ, đối chứng chất lượng, mẫu trống đơn và mẫu trống đôi vào ống 1,5 mL. Dập tắt lần lượt mỗi mẫu (ngoại trừ mẫu trống đôi) bằng 200 µL IS1 (dập tắt mẫu trống đôi bằng 200 µL MeOH với tritonX-100 0,5%), và sau đó trộn xoáy kỹ

hỗn hợp (ít nhất 15 giây) với máy xoáy và ly tâm trong 15 phút ở 12000 g, 4°C. Bơm 10 µL dịch nổi để phân tích LC-MS/MS bằng cách sử dụng Orbitrap Q Exactive ở chế độ ion dương để xác định nồng độ chất phân tích. Phân tích số liệu nồng độ huyết tương theo thời gian bằng phương pháp tiếp cận không phân vùng sử dụng chương trình phần mềm Phoenix WinNonlin 6.3. C₀, C₁, V_{dss}, T_{1/2}, AUC(0-last), AUC(0-inf), MRT(0-last), MRT(0-inf) và đồ thị nồng độ huyết tương theo thời gian được báo cáo. Các tham số dược động học đối với BCY13272 như được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5: Tham số dược động học ở khi đuôi dài

Hợp chất	Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng	T _{1/2} (giờ)	Clp (ml/phút/kg)	V _{dss} (L/kg)
BCY11863	0,93	Truyền IV (30 phút)	5,3	3,3	0,62
	0,97	Truyền IV (15 phút)	4,5	4,8	0,91
	9,4	Truyền IV (15 phút)	8,9	3,9	1,1

Fig.3 cho thấy đường cong nồng độ huyết tương theo thời gian của BCY11863 từ liều lượng 2 mg/kg theo đường tĩnh mạch ở chuột đồng SD (n =3) và truyền 1 mg/kg theo đường tĩnh mạch ở khi đuôi dài (n = 2). BCY11863 có thể tích phân bố ở trạng thái ổn định (V_{dss}) là 1,6 L/kg và độ thanh thải là 7,7 mL/phút/kg ở chuột đồng, dẫn đến thời gian bán hủy cuối là 4,1 giờ. BCY11863 có thể tích phân bố ở trạng thái ổn định (V_{dss}) là 0,62 L/kg và độ thanh thải là 3,3 mL/phút/kg ở khi đuôi dài, dẫn đến thời gian bán hủy cuối là 5,3 giờ. Các nghiên cứu sau đó thống nhất với nghiên cứu này. Tham số dược động học từ nghiên cứu theo đường tĩnh mạch ở khi đuôi dài cho thấy rằng đây là phân tử thanh thải huyết tương thấp với thể tích phân bố tương tự như tổng lượng nước cơ thể.

5. Dược động học của phức hợp khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 BCY11863 trong chuột nhà CD1

6 chuột nhà CD-1 được cho dùng theo liều lượng 15 mg/kg phức hợp khác nhau nối tiếp Nectin-4/CD137 BCY11863 được bảo chế trong Histidin HCl 25 mM, sucroza 10% pH 7 bằng cách dùng trong màng bụng hoặc tĩnh mạch. Tiến hành lấy máu

theo thứ tự (khoảng 80 μ L máu/thời điểm) dưới hàm dưới hoặc qua tĩnh mạch hiển tại mỗi thời điểm. Chuyển ngay lập tức tất cả các mẫu máu vào ống ly tâm siêu nhỏ được làm lạnh sẵn có chứa 2 μ L K2-EDTA (0,5M) làm chất chống đông máu và đặt trên đá ướt. Xử lý ngay lập tức mẫu máu để lấy huyết tương bằng cách ly tâm ở khoảng 4°C, 3000g. Kết tủa bao gồm chất chuẩn nội được thêm ngay lập tức vào huyết tương, trộn đều và ly tâm ở 12000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút. Dịch nổi được chuyển sang ống ly tâm nhỏ polypropylen được gắn nhãn sẵn, và sau đó đông lạnh nhanh trên đá khô. Bảo quản mẫu tại 70°C hoặc thấp hơn nếu cần thiết cho đến khi phân tích. Bom trực tiếp 7,5 μ L dịch nổi để phân tích LC-MS/MS bằng cách sử dụng Orbitrap Q Exactive ở chế độ ion dương để xác định nồng độ của chất phân tích. Phân tích số liệu nồng độ huyết tương theo thời gian bằng phương pháp tiếp cận không phân vùng sử dụng chương trình phần mềm Phoenix WinNonlin 6.3. C₀, C₁, V_{dss}, T_{1/2}, AUC(0-last), AUC(0-inf), MRT(0-last), MRT(0-inf) và đồ thị nồng độ huyết tương theo thời gian được báo cáo.

Fig.9 cho thấy đường cong nồng độ huyết tương theo thời gian của BCY11863 từ liều lượng 15 mg/kg theo đường tĩnh mạch ở chuột nhà CD1 (n =3) và thời gian bán hủy cuối trong huyết tương đối với BCY11863.

Bảng 6: Tham số dược động học trong chuột nhà CD-1

Hợp chất	Liều lượng (mg/kg)	Đường dùng	T _{1/2} (giờ)	V _{dss} (L/kg)	Clp (ml/phút/kg)	% F
BCY11863	5,6	Tiêm nhanh IV	2,6	1,6	9,7	
	0,96	Tiêm nhanh IV	1,7	2,9	21	
	12	Tiêm nhanh IV	2,6	2,5	17	
	32	Tiêm nhanh IV	2,4	2,1	16	
	15,5	IP	2,5	-	-	100

Dữ liệu trong Fig.9 và Bảng 6 ở trên cho thấy rằng BCY11863 có thể được dùng theo đường tiêm nhanh IV và đường IP ở chuột nhà. Khả dụng sinh học từ liều IP của BCY11863 cao ở chuột nhà. Tham số dược động học từ nghiên cứu theo đường tĩnh

mạch cho thấy rằng đây là phân tử thanh thải thấp với thể tích phân bố rộng hơn so với thể tích huyết tương.

6. Hoạt tính chống khối u của BCY11863 ở mô hình khối u MC38 biểu hiện quá mức Nectin-4 đồng gen

Chuột nhà cái C57BL/6J-hCD137 6-8 tuần tuổi được tiêm vào trong sườn với 1×10^6 tế bào MC38 biểu hiện quá mức Nectin-4 đồng gen (MC38#13). Khi khối u đạt đến kích thước trung bình 72 mm^3 , chuột nhà được nhận ngẫu nhiên chất dẫn thuốc hoặc BCY11863 (theo đường trong màng bụng). BCY11863 được dùng ($n=6$ / đợt điều trị) tại 1 mg/kg hoặc 10 mg/kg hằng ngày (QD) hoặc mỗi 3 ngày (Q3D). Chuột được cho dùng theo liều lượng QD nhận 16 liều BCY11863 và chuột được cho dùng theo liều lượng Q3D nhận 10 liều BCY11863. Theo dõi sự sinh trưởng của khối u bằng thước kẹp cho đến ngày 69 kể từ khi bắt đầu điều trị. Kết quả của thử nghiệm này được trình bày trong Fig.4 trong đó quan sát thấy sinh trưởng của khối u giảm đi đáng kể ($p < 0,05$, ANOVA 2 chiều với thử nghiệm Dunnett cho kiểm định nhiều giả thuyết) trong 2 đợt điều trị vào ngày 7 và ngày 14 ở tất cả các nhóm điều trị khác đáng kể so với nhóm tá dược lỏng. Vào ngày 48, 22 trên 24 động vật được điều trị bằng BCY11863 có đáp ứng hoàn toàn với điều trị và không còn khối u sờ thấy.

Dựa trên thời gian bán hủy trong huyết tương của BCY11863 ở chuột nhà sau khi tiêm IP (2,5 giờ), nồng độ chạm đáy huyết tương sẽ gần bằng 0 sau cả hai liều lượng BCY11863 (1 và 10 mg/kg) và khoảng thời gian giữa các liều (QD và Q3D) do đó chứng minh rằng phơi nhiễm huyết tương của BCY11863 ít liên tục hơn từ liều lượng ngắt quãng là đủ để dẫn đến hoạt tính chống khối u đáng kể tạo ra đáp ứng lâu bền hoàn toàn.

7. Điều trị bằng BCY11863 tạo ra ghi nhớ miễn dịch với mô hình khối u MC38 biểu hiện quá mức Nectin-4

Vào ngày 69, 5 động vật đáp ứng hoàn toàn với điều trị BCY11863 được cấy lại với 1×10^6 tế bào MC38#13. Một đợt gồm 5 chuột nhà cái C57BL/6J-hCD137 chưa thử nghiệm bao giờ được tiêm 1×10^6 tế bào MC38#13 làm đối chứng. Kết quả của thử nghiệm này có thể thấy trong Fig.5 trong đó tất cả 5 chuột nhà cái C57BL/6J-hCD137 chưa được tiêm chủng đều sinh trưởng khối u vào ngày 13 sau khi tiêm trong khi không có chuột nào trong số các chuột đáp ứng hoàn toàn đã tiêm phát triển khối u. Điều này chứng minh rằng động vật đạt được đáp ứng chống khối u hoàn toàn nhờ điều trị

BCY11863 đã phát triển ghi nhớ miễn dịch.

8. BCY11863 chứng minh hoạt tính chống khối u trong mô hình khối u CT26 biểu hiện quá mức Nectin-4 đồng gen (CT26#7)

Chuột nhà cái BALB/c-hCD137 6-8 tuần tuổi được tiêm vào trong sườn với 3×10^5 tế bào CT26 biểu hiện quá mức Nectin-4 đồng gen (CT26#7). Khi khối u đạt đến kích thước trung bình khoảng 70 mm^3 , chuột nhà được nhận ngẫu nhiên chất dẫn thuốc hoặc 5 mg/kg BCY11863 theo đường trong màng bụng mỗi ba ngày (tổng cộng 6 liều). Theo dõi sự sinh trưởng của khối u bằng thước kẹp cho đến ngày 14 kể từ khi bắt đầu điều trị. Kết quả của thử nghiệm này cũng thấy trong Fig.6 trong đó điều trị BCY11863 giảm đáng kể sinh trưởng khối u ($p < 0,0001$, Student's t-test) từ ngày 7 trở đi.

Dựa trên thời gian bán hủy tuần hoàn trong huyết tương của BCY11863 ở chuột nhà khi tiêm IP (2,5 giờ), phơi nhiễm huyết tương sẽ không được liên tục trong suốt thời gian giữa các liều chứng minh rằng phơi nhiễm huyết tương của BCY11863 ít liên tục hơn là đủ để tạo ra hoạt tính chống khối u đáng kể.

9. Tế bào T tổng số và tế bào T CD8+ tăng lên ở mô khối u CT26#7 1 giờ sau khi liều lượng Q3D cuối cùng (liều thứ 6) của BCY11863

1 giờ sau khi liều chất dẫn thuốc hoặc BCY11863 cuối cùng, chuột nhà mang CT26#7 bị giết và thu lấy khối u, tiến hành xử lý một mảnh huyền phù tế bào và nhuộm để phân tích tế bào theo dòng chảy đối với tế bào T tổng số (CD45+CD3+), tế bào T CD8+ (CD45+CD3+CD8+), tế bào T CD4+ (CD45+CD3+CD4+) và tế bào T điều hòa (Tregs; CD45+CD3+CD4+Foxp3+). Kết quả của thử nghiệm này có thể thấy trong Fig.7 trong đó có thể thấy rằng điều trị bằng BCY11863 dẫn đến giảm đáng kể tế bào T tổng số ($p < 0,0001$, Student's t-test) và tế bào T CD8+ ($p < 0,0001$, Student's t-test) cũng như giảm đáng kể trong tỷ lệ tế bào T CD8+/Treg ($p < 0.05$, Student's t-test).

Điều này chứng minh rằng việc điều trị bằng BCY11863 có thể dẫn đến làm tăng nồng độ tế bào T nằm trong mô khối u sau khi dùng ngắt quãng.

10. Đặc tính dược động học của BCY11863 trong huyết tương và mô khối u của động vật mang khối u đồng gen CT26#7 sau khi dùng một lần duy nhất theo đường tĩnh mạch (iv) 5 mg/kg of BCY11863

Chuột nhà cái BALB/c 6-8 tuần tuổi được tiêm vào trong sườn với 3×10^5 tế bào

CT26 biểu hiện quá mức Nectin-4 (CT26#7) đồng gen. Khi khối u đạt đến kích thước trung bình khoảng 400 mm³, chuột được nhận ngẫu nhiên một liều duy nhất chất dẫn thuốc hoặc 5 mg/kg BCY11863 theo đường tĩnh mạch. Một nhóm chuột (n=3/thời điểm) bị giết tại các thời điểm 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 và 24 giờ và thu hoạch huyết tương và mô khối u được phân tích đối với BCY11863. Để phân tích hàm lượng BCY11863 trong khối u, chất đồng nhất khối u được tạo ra bằng cách đồng nhất hóa mô khối u với 10 thể tích (trọng lượng:thể tích) dung dịch đồng nhất hóa (MeOH/15 mM PBS (1:2, thể tích/thể tích)). 40 µL mẫu được đập tắt bằng 200 µL IS1 và hỗn hợp được trộn bằng cách lắc trong 10 phút ở 800 vòng/phút và ly tâm trong 15 phút ở 3220 g ở 4°C. Dịch nổi được chuyển sang một đĩa 96 giếng sạch khác và ly tâm trong 5 min ở 3220 g ở 4°C, và 10,0 µL dịch nổi sau đó được tiêm để phân tích LC-MS/MS bằng cách sử dụng Orbitrap Q Exactive ở chế độ ion dương để xác định nồng độ của chất phân tích. Để phân tích hàm lượng BCY11863 trong huyết tương, mẫu máu được thu thập vào trong ống K2-EDTA và xử lý ngay lập tức thành huyết tương bằng cách ly tâm tại xấp xỉ 4°C, 3000g. 40 µL mẫu huyết tương được đập tắt bằng 200 µL IS1 và hỗn hợp được trộn bằng cách lắc trong 10 phút ở 800 vòng/phút và ly tâm trong 15 phút ở 3220 g ở 4°C. Dịch nổi được chuyển sang một đĩa 96 giếng sạch khác và ly tâm trong 5 min ở 3220 g ở 4°C, và 10,0 µL dịch nổi sau đó được tiêm để phân tích LC-MS/MS bằng cách sử dụng Orbitrap Q Exactive ở chế độ ion dương để xác định nồng độ của chất phân tích.

Kết quả của thử nghiệm này được trình bày trong Fig.8 trong đó có thể thấy rằng BCY11863 được giữ lại trong mô khối u sau khi BCY11863 huyết tương được loại bỏ ra khỏi hệ tuần hoàn như được chỉ ra bởi sự khác nhau giữa $T_{1/2}$ của BCY11863 trong huyết tương (1,65 giờ) và $T_{1/2}$ trong khối u (13,4 giờ).

11. Liên kết của BCY11863 với Nectin-4 và CD137 trên bốn loài tiền lâm sàng

Liên kết của BCY11863 với đích nguyên thủy Nectin-4 và CD137 được định rõ đặc điểm sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR).

(a) *Nectin-4*

BCY11863 liên kết với Nectin-4 khi đuôi dài, chuột đồng, chuột nhà và người với K_D nằm trong khoảng từ 5 – 27 nM như được đo bằng cách liên kết trực tiếp với vùng ngoại bào mà đã được biotin hóa và bắt giữ trên bề mặt chip cảm biến streptavidin.

Bảng 7: ái lực liên kết của BCY11863 với vùng ngoại bào Nectin-4 được biotin

hóa: Dữ liệu SPR

SPR K_D (nM)	Loại thử nghiệm	Người (25°C)	Người (37°C)	NHP (25°C)	Chuột đồng (25°C)	Chuột nhà (25°C)
BCY11863	Liên kết trực tiếp	$5,0 \pm 2,1$ n = 7	$5,2 \pm 1,1$ n = 9	27 ± 15 n = 9	15 ± 1 n = 6	$4,6 \pm 2,1$ n = 9

Để hiểu liệu liên kết của BCY11863 với Nectin-4 có bị thay đổi trong bối cảnh của phức hợp bậc ba hay không, tức là khi cũng liên kết với CD137, một thử nghiệm liên kết SPR nhiều thành phần đã được phát triển. Đầu tiên BCY11863 được bắt giữ với CD137 ở người được cố định trên bề mặt chip SPR và sau đó Nectin-4 từ các loài khác nhau được chuyển qua chip để xác định ái lực của chúng với BCY11863 bị bắt giữ (xem Fig.10C). Ái lực với Nectin-4 thường được duy trì khi có mặt liên kết CD137 như được trình bày bên dưới:

Bảng 8: Ái lực liên kết của BCY11863 với vùng ngoại bào Nectin-4 sử dụng CD137 ở người được biotin hóa làm chất bắt giữ

SPR K_D (nM)	Loại thử nghiệm	Người	NHP	Chuột đồng	Chuột nhà
BCY11863	Thử nghiệm sandwich	12 ± 2 n = 4	28 ± 5 n = 3	25 ± 2 n = 3	$6,7 \pm 1,7$ n = 3

(b) *CD137*

Liên kết trực tiếp của BCY11863 với CD137 liên kết bề mặt không thể được đo chính xác bằng SPR vì ái lực do hai vòng đôi liên kết CD137 trong BCY11863 dẫn đến k_{off} cực kỳ chậm (xem Fig.10B). Ngoài ra, việc biotin hóa CD137 khi đuôi dài loại bỏ liên kết của BCY11863, có thể là do sự biến đổi của lysin trên protein khi đuôi dài mà rất quan trọng đối với liên kết BCY11863. Do đó, chất tương tự BCY11863 chứa lyssin được biotin hóa đầu C (BCY13582) được thử nghiệm trong SPR để xác định tính đặc hiệu chéo loài của BCY11863. BCY13582 được bắt giữ vào chip cảm ứng sử dụng kit bắt giữ biotin thuận nghịch và ái lực với Nectin-4 từ các loài khác nhau được xác định. Cả hai chiến lược đều cho thấy rằng chất tương tự BCY11863 này liên kết với CD137

khí đuôi dài và người với $K_D < 10$ nM và có liên kết không đáng kể với cả CD137 chuột đồng và chuột nhà.

Bảng 9: Ái lực liên kết của chất tương tự BCY11863 được biotin hóa với vùng ngoại bào CD137: dữ liệu SPR

SPR K_D (nM)	Loại thử nghiệm	Người	NHP	Chuột đồng	Chuột nhà
BCY13582	Liên kết trực tiếp	$8,4 \pm 4,2$ n = 3	4,23 n = 1	NB n = 1	NB n = 1

Để hiểu liệu liên kết của BCY11863 với CD137 có bị thay đổi trong bối cảnh của phức hợp bậc ba hay không, tức là khi cũng liên kết với Nectin-4, một thử nghiệm liên kết SPR hai thành phần đã được phát triển. Đầu tiên BCY11863 được bắt giữ với Nectin-4 được cố định trên bề mặt chip SPR và sau đó CD137 hòa tan từ các loài khác nhau được chuyển qua chip để xác định ái lực của chúng với BCY11863 bị bắt giữ (xem Fig.10D). Ái lực với CD137 thường được duy trì khi có mặt liên kết Nectin-4 như được trình bày bên dưới:

Bảng 10: Ái lực liên kết của BCY11863 với vùng ngoại bào CD137 sử dụng Nectin-4 người được biotin hóa làm chất bắt giữ

SPR K_D (nM)	Loại thử nghiệm	Người	NHP	Chuột đồng	Chuột nhà
BCY11863	Liên kết hai thành phần	$6,3 \pm 0,7$ n = 4	18 ± 6 n = 3	NB n = 2	NB n = 2

Fig.10A trình bày một đồ thị cảm biến mẫu chứng minh rằng BCY11863 liên kết với Nectin-4 (ở người) với ái lực là 4,1 nM. Fig.10B thể hiện đồ thị cảm biến rằng BCY11863 liên kết với CD137 (ở người) với ái lực cao. Do sự có mặt của 2 phân tử vòng đôi liên kết với CD137 trong BCY11863, tỷ lệ không tương tác từ protein CD137 cố định là rất thấp và K_D được báo cáo có thể là đánh giá quá cao (Fig.10B). Fig.10C cho thấy rằng BCY11863 liên kết với Nectin-4 trong khi nhánh CD137 được liên kết với protein CD137 được cố định trên chip để tạo thành phức hợp bậc bốn. Fig.10D cho thấy rằng BCY11863 liên kết với CD137 trong khi nhánh Nectin-4 được liên kết với protein Nectin-4 được cố định trên chip để tạo thành phức hợp bậc bốn. Fig.10E chứng

minh khả năng của BCY13582 được cố định trên chip SPR liên kết với CD137 ở người.

12. Độ chọn lọc của BCY11863 đối với Nectin-4 và CD137

Sàng lọc gen Nectin – 4 có cùng nguồn gốc: Liên kết của BCY11863 được đánh giá bằng cách sử dụng SPR chống lại Nectin-1 (2880-N1, R&D Systems), Nectin-2 (2229-N2, R&D Systems), Nectin-3 (3064-N3, R&D Systems), Nectin-like-1 (3678-S4-050, R&D Systems), Nectin-giống-2 (3519-S4-050, R&D Systems), Nectin-giống-3 (4290-S4-050, R&D Systems), Nectin-giống-4 (4164-S4, R&D Systems) và Nectin-giống-5 (2530-CD-050, R&D Systems) bằng cách dán nhãn chúng với biotin và cố định chúng trên bề mặt streptavidin. BCY11863 không thể hiện bất kỳ liên kết nào với các đích này với nồng độ lên đến 5000 nM.

Sàng lọc gen CD137 có cùng nguồn gốc: Liên kết của BCY13582 được bắt giữ trên streptavidin (BCY11863 được biotin hóa) được đánh giá bằng cách sử dụng SPR chống lại thụ thể họ TNF hòa tan OX40 và CD40. BCY13582 không liên kết với các đích này với nồng độ lên đến 100 nM.

Sàng lọc microarray Retrogenix: Kỹ thuật microarray tế bào của Retrogenix được sử dụng để sàng lọc tương tác liên kết chệch đích cụ thể của BCY11863 được biotin hóa được gọi là BCY13582.

Nghiên cứu về mức độ liên kết của peptit thử nghiệm với tế bào HEK293 cố định, chưa biến nạp, và với tế bào biểu hiện quá mức Nectin-4 và CD137 (TNFRSF9), cho thấy 1 μ M peptit thử nghiệm là nồng độ thử nghiệm phù hợp. Dưới các điều kiện này, peptit thử nghiệm được sàng lọc để liên kết chống lại tế bào HEK293 ở người, biểu hiện riêng rẽ 5484 protein màng sinh chất ở người đầy đủ chiều dài và protein được tiết ra. Điều này cho thấy 9 đích chính bao gồm, Nectin-4 và CD137.

Mỗi đích chính được biểu hiện lại, cùng với hai thụ thể đối chứng (TGFB2 và EGFR), và được thử nghiệm lại với 1 μ M peptit thử nghiệm BCY13582, 1 μ M peptit thử nghiệm BCY13582 khi có mặt 100 μ M BCY11863, và các điều trị đối chứng dương và âm khác (Fig.4). Sau khi loại bỏ các đích không đặc hiệu, không tái tạo và không quan trọng, còn lại ba tương tác đặc hiệu đối với peptit thử nghiệm. Đây là các dạng đã gắn và chưa gắn của Nectin-4, và CD137 - các đích chính.

Không có tương tác chệch đích đặc hiệu nào được xác định đối với BCY13582,

cho thấy tính đặc hiệu cao đối với các đích nguyên thủy của nó.

13. Hoạt tính chống khối u của BCY11863 ở mô hình khối u MC38 biểu hiện quá mức Nectin-4 đồng gen (MC38#13) trên liều lượng hai lần một tuần tại 5mg/kg tại 0,24 giờ và 10 mg/kg tại 0 giờ

Chuột nhà cái C57BL/6J-hCD137 6-8 tuần tuổi [chuột nhà B-hTNFRSF9(CD137); Biocytogen] được cấy dưới da 1×10^{10} tế bào MC38 (tế bào MC38 được thiết kế để biểu hiện quá mức tế bào Nectin-4 chuột). Chuột nhà được phân ngẫu nhiên thành các nhóm điều trị ($n=6$ /đợt) khi thể tích khối u đạt đến khoảng 95 mm^3 và được điều trị với liều chất dẫn thuốc hàng tuần (histidin 25 mM, sucroza 10%, pH7) hoặc 10 mg/kg BCY11863 với hai phác đồ liều khác nhau đối với hai chu trình liều (5 mg/kg BCY11863 tại 0 giờ và 24 giờ vào ngày D0 và D7, hoặc 10 mg/kg tại 0 giờ vào ngày D0 và D7). Tất cả điều trị đều được dùng theo đường tĩnh mạch (IV). Theo dõi sự phát triển của khối u đến ngày 15 kể từ khi bắt đầu điều trị.

BCY11863 tạo ra hoạt tính chống khối u đáng kể với cả hai phác đồ liều, nhưng phác đồ liều với liều lượng 5 mg/kg tại 0 giờ và 24 giờ vượt trội hơn so với liều lượng 10 mg/kg tại 0 giờ khi đáp ứng hoàn toàn được phân tích vào ngày 15 sau khi điều trị ban đầu (Fig.12). Liều lượng 5 mg/kg BCY11863 tại 0 giờ và 24 giờ vào ngày D0 và D7 tạo ra 4 trên 6 đáp ứng khối u hoàn toàn trong khi liều lượng 10 mg/kg BCY11863 tại 0 giờ vào ngày D0 và D7 tạo ra một trên 6 đáp ứng khối u hoàn toàn. Dữ liệu này cùng với dữ liệu PK huyết tương chuột nhà BCY11863 cho thấy rằng việc duy trì phơi nhiễm huyết tương BCY11863 tại nồng độ tạo ra bởi liều lượng 5 mg/kg 0 giờ và 24 giờ trong một chu kỳ hàng tuần tạo ra phản ứng chống khối u gần như hoàn toàn trong mô hình khối u MC38#13.

14. Hoạt tính chống khối u của BCY11863 ở mô hình khối u MC38 biểu hiện quá mức Nectin-4 đồng gen

Ở 3 liều hàng tuần là 3, 10 và 30 mg/kg với liều hàng tuần được chia nhỏ, hai tuần một lần và hàng ngày, chuột nhà cái C57BL/6J-hCD137 từ 6 đến 8 tuần tuổi chuột [B-hTNFRSF9 (CD137) chuột; Biocytogen] được cấy dưới da với 1×10^6 MC38#13 (tế bào MC38 được thiết kế để tạo ra để biểu hiện quá mức tế bào Nectin-4 chuột). Các con chuột được chia ngẫu nhiên thành các nhóm điều trị ($n = 6$ /đợt) khi thể tích khối u trung bình đạt khoảng 107 mm^3 và được điều trị với 21 liều tá được lỏng hàng ngày (histidin

25 mM, sucroza 10%, pH 7). Tiến hành điều trị BCY11863 ở ba mức liều tổng số khác nhau (3, 10 và 30 mg/kg liều hàng tuần tổng số) được chia thành ba phác đồ khác nhau (QD: hàng ngày; BIW: hai lần một tuần hoặc QW: hàng tuần). Các đợt điều trị BCY11863 khác nhau được nhận 21 liều hàng ngày (0,43, 1,4 hoặc 4,3 mg/kg), 6 liều hai lần một tuần (1,5, 5 hoặc 15 mg/kg) hoặc 3 liều hàng tuần (3, 10 hoặc 30 mg/kg). Tất cả điều trị đều được dùng theo đường tĩnh mạch (IV). Sinh trưởng của của khối u được theo dõi cho đến khi khối u đạt thể tích trên 2000 mm³ hoặc cho đến 31 ngày sau khi bắt đầu điều trị. Các đáp ứng hoàn toàn (động vật không có khối u sờ thấy) được theo dõi cho đến ngày D52.

BCY11863 tạo ra hoạt tính chống khối u đáng kể với nhiều phác đồ liều, phác đồ liều BIW phác đồ hiệu quả nhất, đặc biệt là liều 5 mg/kg BIW. Điều này được chứng minh bằng số lượng động vật đáp ứng hoàn chỉnh vào ngày 52. Vào ngày 52 sau khi bắt đầu điều trị, 15/18 con chuột được điều trị BIW với BCY11863 là những con chuột đáp ứng hoàn toàn, 12/18 con chuột được điều trị QD với BCY11863 là những con chuột đáp ứng hoàn toàn và 6/18 con chuột được điều trị QW với BCY11863 là những con chuột đáp ứng hoàn toàn. Liều 5 mg/kg BIW dẫn đến tỷ lệ đáp ứng hoàn toàn 100% với 6/6 CR (Fig.13). Những dữ liệu này cùng với dữ liệu PK huyết tương chuột BCY11863 cho thấy rằng không cần phơi nhiễm liên tục BCY11863 trong huyết tương để đáp ứng chống khối u với BCY11863 trong mô hình khối u MC38#13.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BICYCLETX LIMITED

<120> PHỨC HỢP PEPTIT HAI VÒNG KHÁC NHAU NỐI TIẾP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHỨC HỢP PEPTIT NÀY

<130> BIC-C-P2832PCT

<150> 62/880,191

<151> 2019-07-30

<150> 62/910,088

<151> 2019-10-03

<150> 62/931,442

<151> 2019-11-06

<150> 63/022,667

<151> 2020-05-11

<150> 63/024,715

<151> 2020-05-14

<160> 4

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<220>

<221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa là 1NaI

<220>

<221> Xaa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa là HArg

<220>

<221> Xaa

<222> (13)..(13)

<223> Xaa là HyP

<400> 1

Cys Pro Xaa Asp Cys Met Xaa Asp Trp Ser Thr Pro Xaa Trp Cys
1 5 10 15

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa là tBuAla

<220>
 <221> Xaa
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa là D-Lys(PYA)

<220>
 <221> Xaa
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa là Nle

<400> 2

Cys	Xaa	Pro	Glu	Xaa	Pro	Tyr	Cys	Phe	Ala	Asp	Pro	Tyr	Xaa	Cys	Ala
1				5					10					15	

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit tổng hợp

<220>
 <221> Xaa
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa là tBuAla

<220>
 <221> Xaa
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa là D-Lys(PYA)

<220>
 <221> Xaa
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa là Nle

<400> 3

Cys	Xaa	Pro	Glu	Xaa	Pro	Tyr	Cys	Phe	Ala	Asp	Pro	Tyr	Xaa	Cys	Ala
1				5					10					15	

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit tổng hợp

<220>

<221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa là tBuAla

<220>

<221> Xaa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa là D-Lys(PYA)

<220>

<221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa là Nle

<400> 4

Cys	Xaa	Pro	Glu	Xaa	Pro	Tyr	Cys	Phe	Ala	Asp	Pro	Tyr	Xaa	Cys	Lys
1				5					10					15	

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp bao gồm:

(a) phối tử peptit thứ nhất liên kết với Nectin-4 và có trình tự $C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 1); liên hợp thông qua cầu nối N-(axit-PEG₃)-N-bis(PEG₃-azit) với

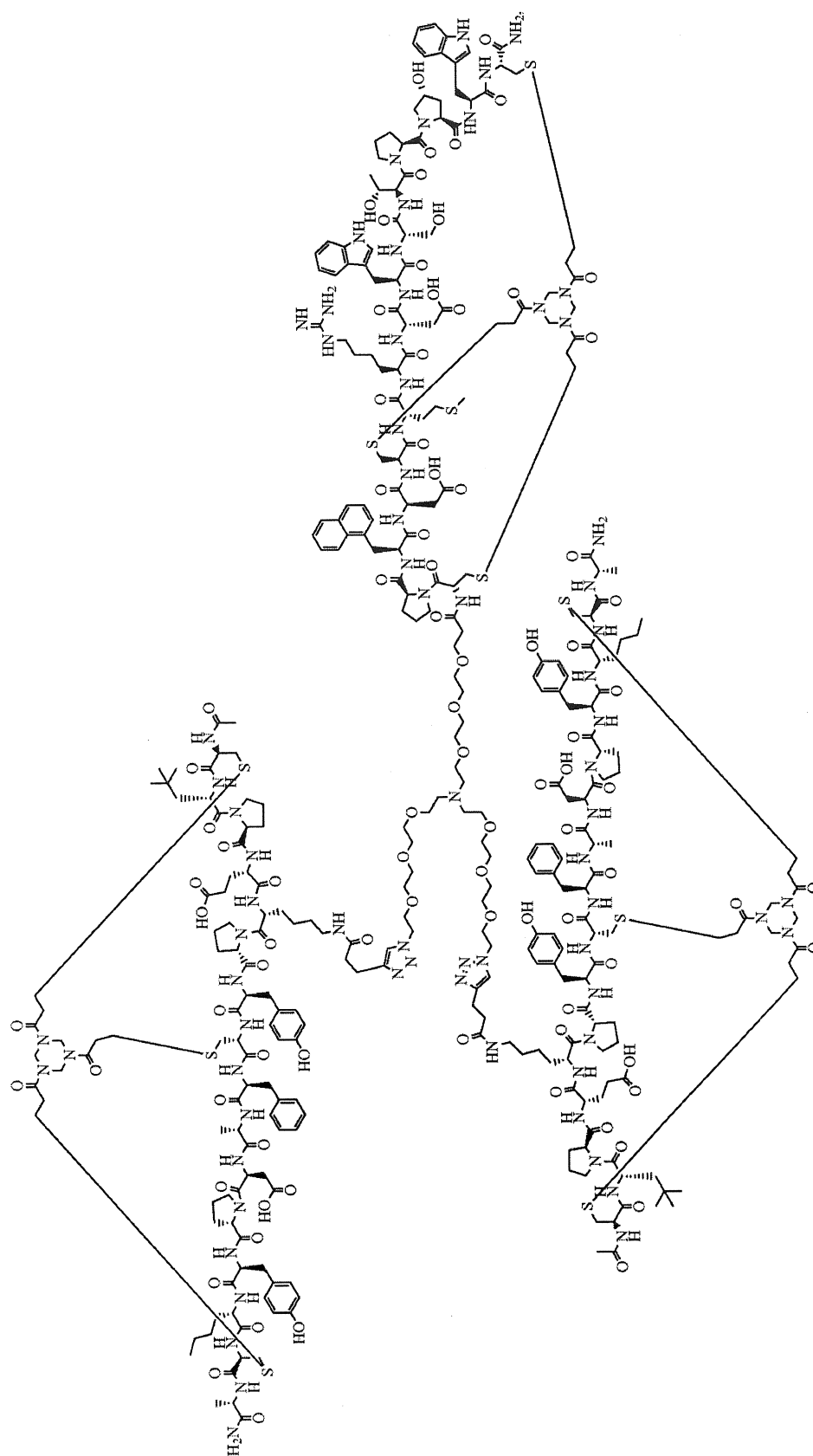
(b) hai phối tử peptit thứ hai liên kết với CD137, cả hai đều có trình tự $Ac-C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A$ (SEQ ID NO: 2);

hoặc muối được dụng của nó,

trong đó mỗi trong số các phối tử peptit đã nêu bao gồm polypeptit chứa ba nhóm xystein phản ứng (C_i , C_{ii} và C_{iii}), được phân tách bởi hai trình tự thông lọng, và khung phân tử là 1,1',1''-(1,3,5-triazinan-1,3,5-triyl)triprop-2-en-1-on (TATA) và tạo thành liên kết cộng hóa trị với các nhóm xystein phản ứng của polypeptit sao cho hai thông lọng polypeptit được tạo ra trên khung phân tử;

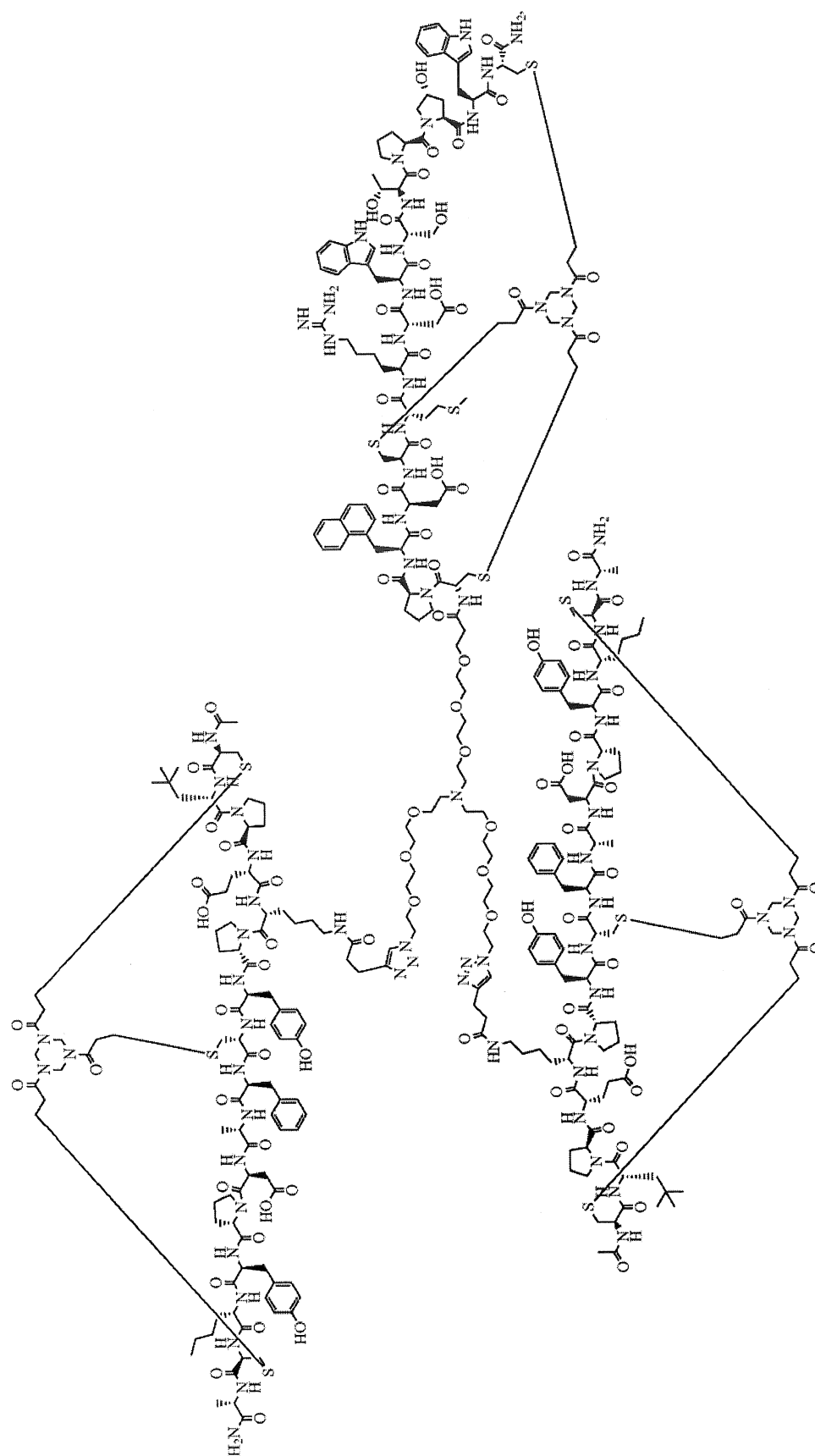
trong đó Ac biểu thị axetyl, HArg biểu thị homoarginin, HyP biểu thị trans-4-hydroxy-L-prolin, 1Nal biểu thị 1-naphtylalanin, tBuAla biểu thị t-butyl-alanin, PYA biểu thị axit 4-pentynoic và Nle biểu thị norleuxin.

2. Phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp theo điểm 1, là:



hoặc muối được dụng của nó.

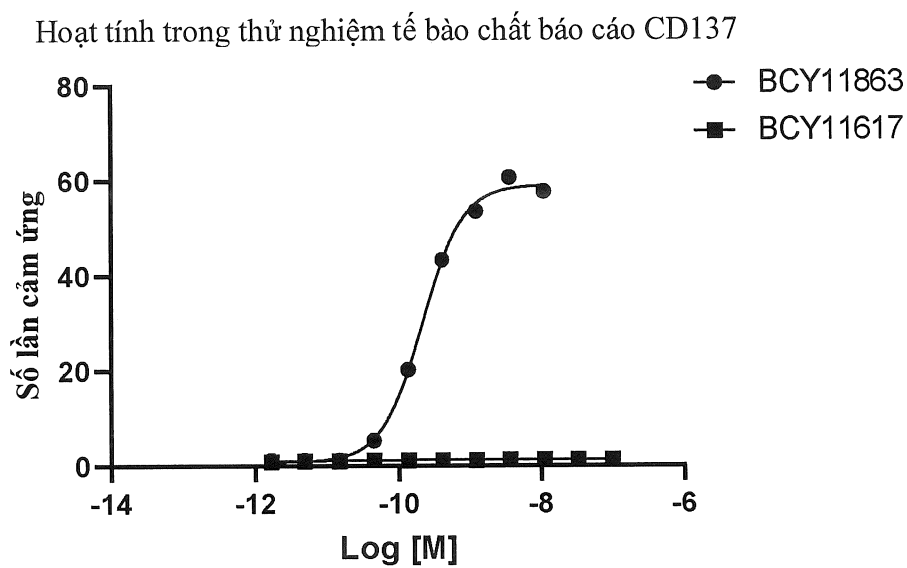
3. Phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp như được xác định theo điểm 1, trong đó muối được dụng được chọn từ axit tự do hoặc muối natri, kali, canxi, hoặc amoni.
4. Dược phẩm chứa phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp theo điểm 1, hoặc muối được dụng của nó, kết hợp với một hoặc nhiều tá dược được dụng.
5. Phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp, là:



hoặc muối được dụng của nó.

6. Phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp theo điểm 5, trong đó muối được dụng được chọn từ axit tự do hoặc muối natri, kali, canxi, hoặc amoni.
7. Dược phẩm chứa phức hợp peptit hai vòng khác nhau nối tiếp theo điểm 5, hoặc muối được dụng của nó, kết hợp với một hoặc nhiều tá dược được dụng.

A



B

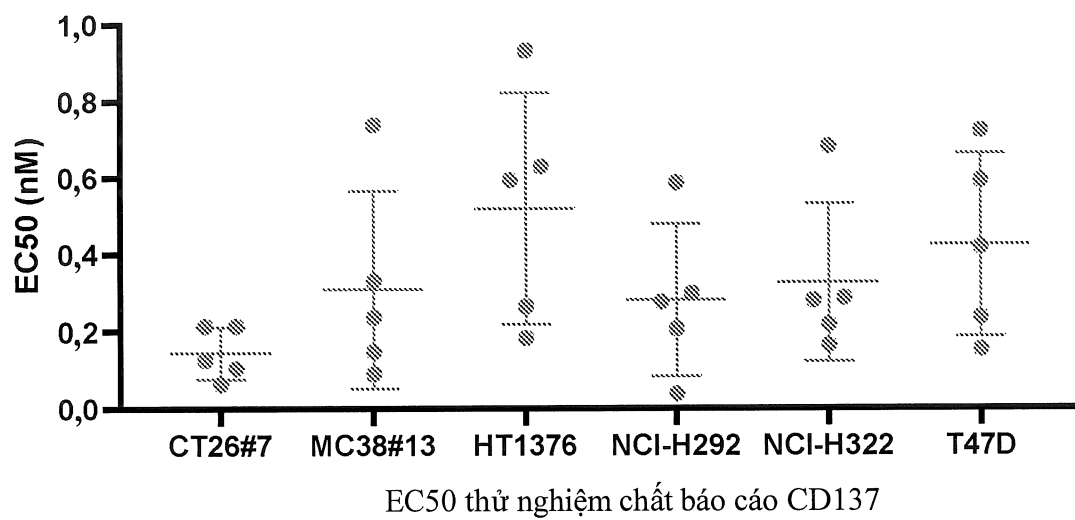
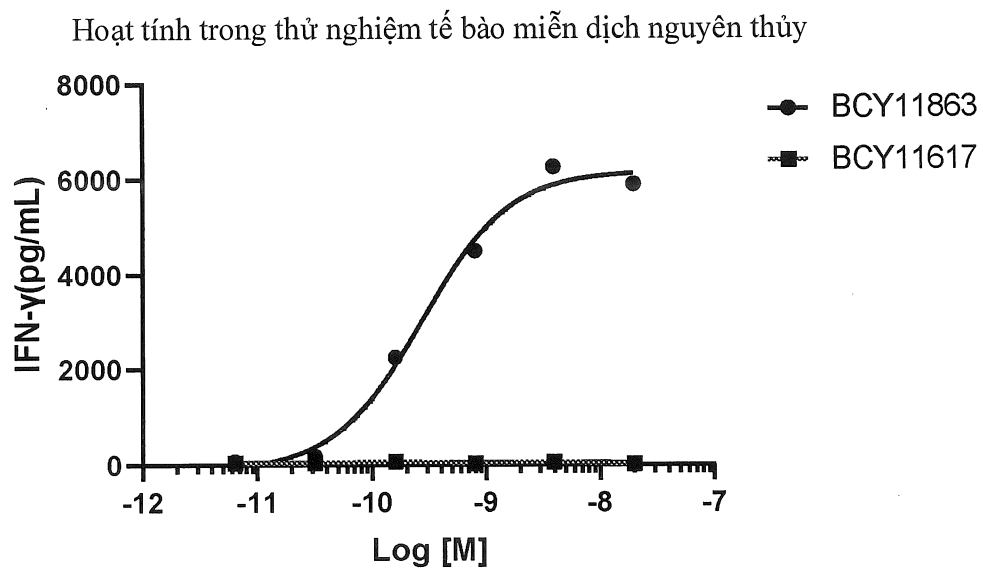


Fig. 1

A



B

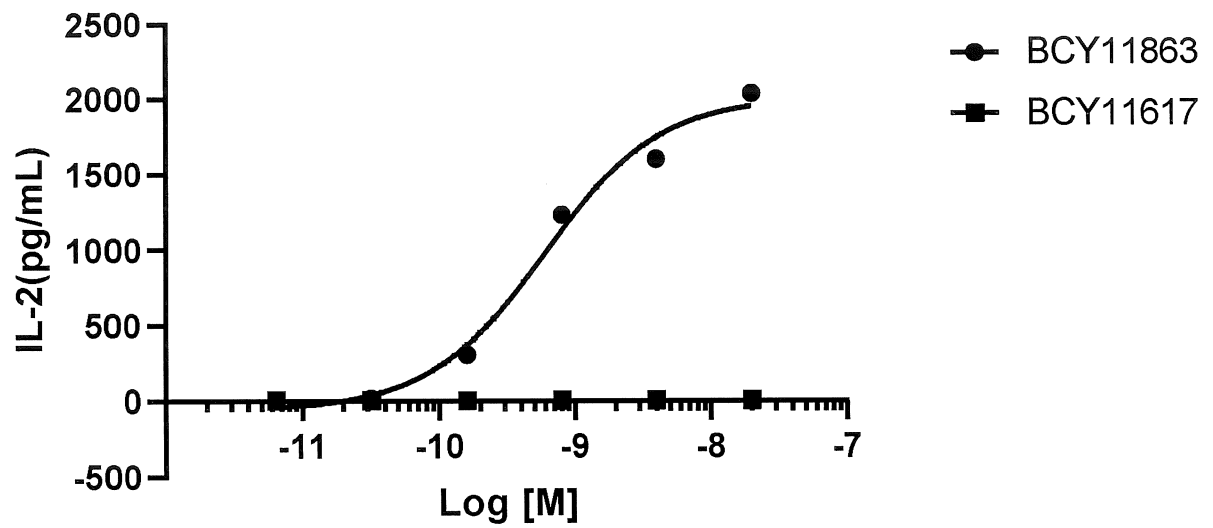


Fig. 2

C

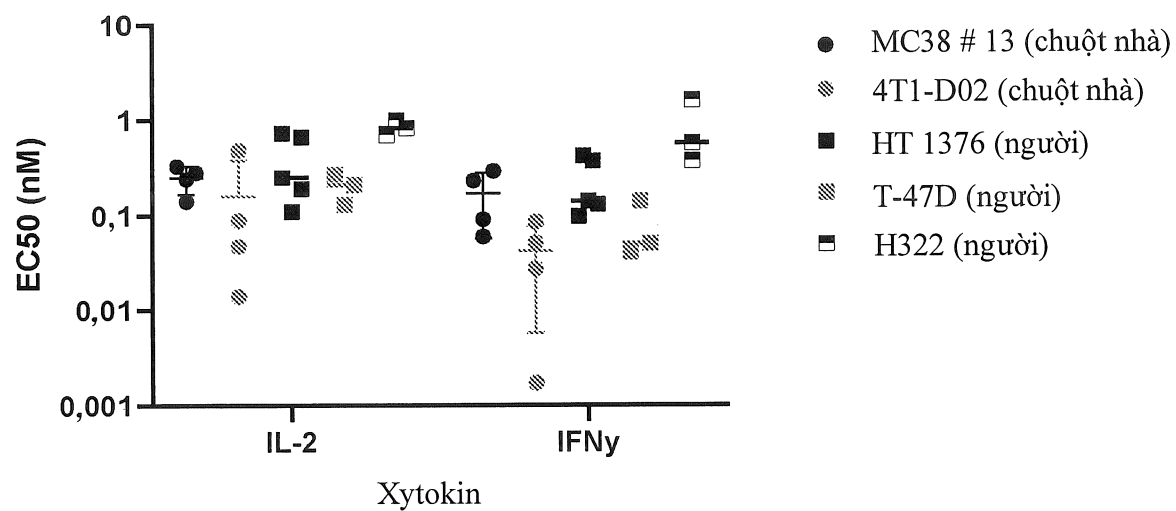


Fig. 2 (ctd)

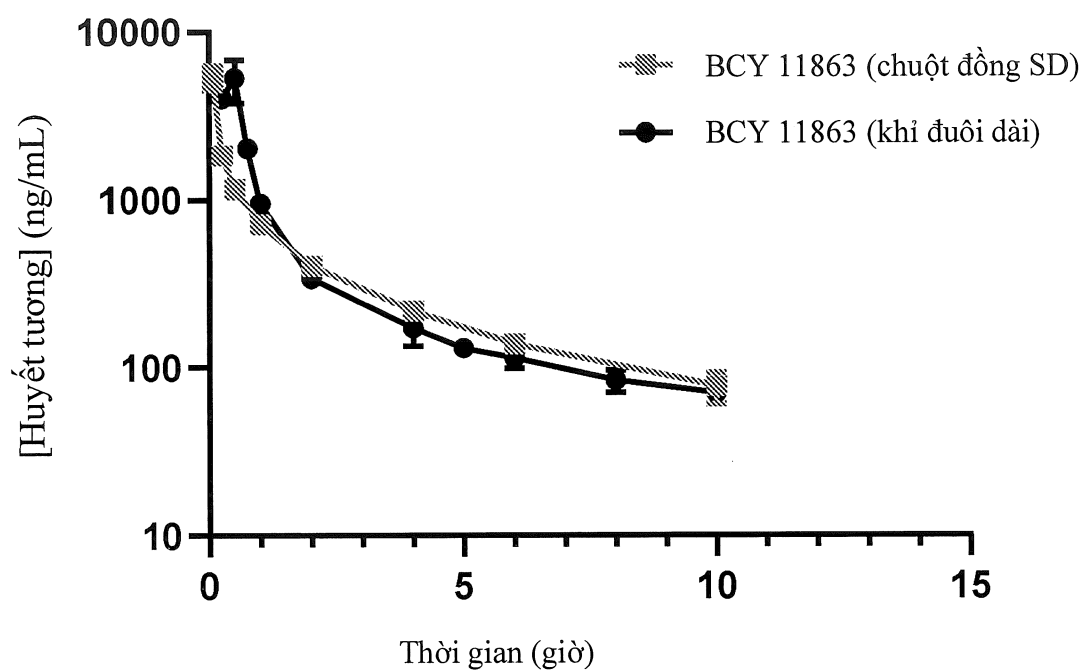


Fig. 3

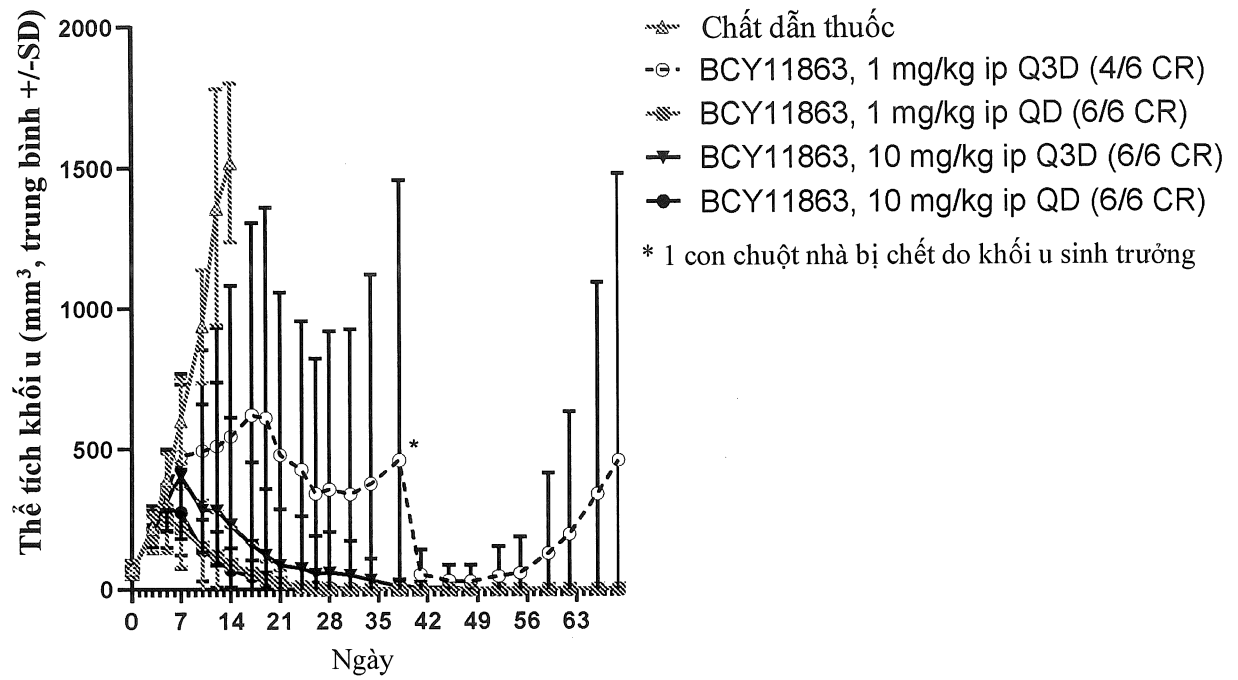


Fig. 4

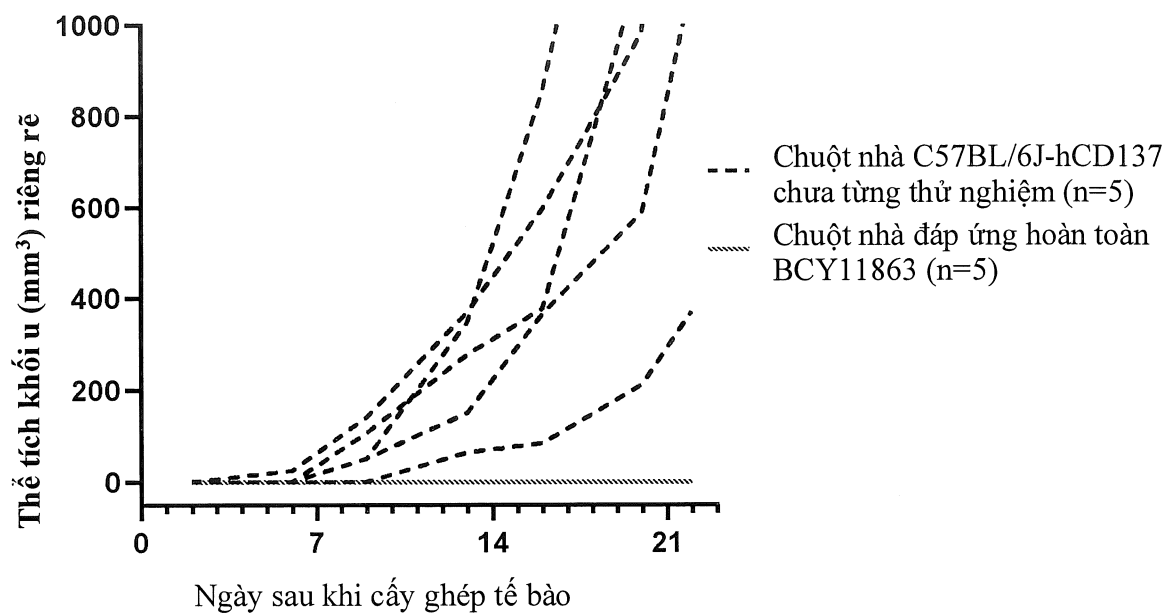


Fig. 5

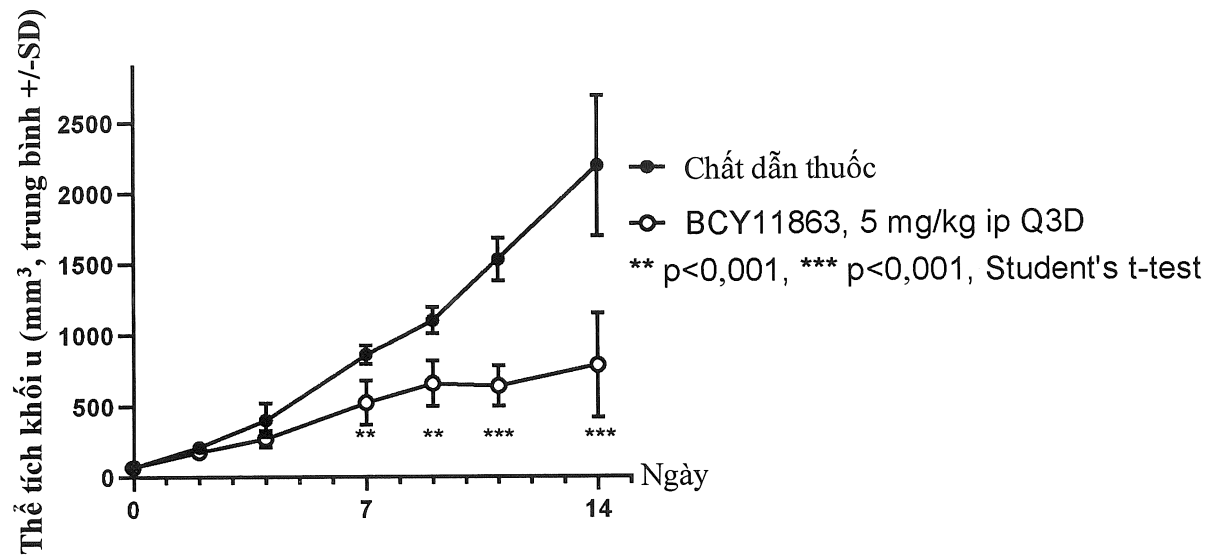


Fig. 6

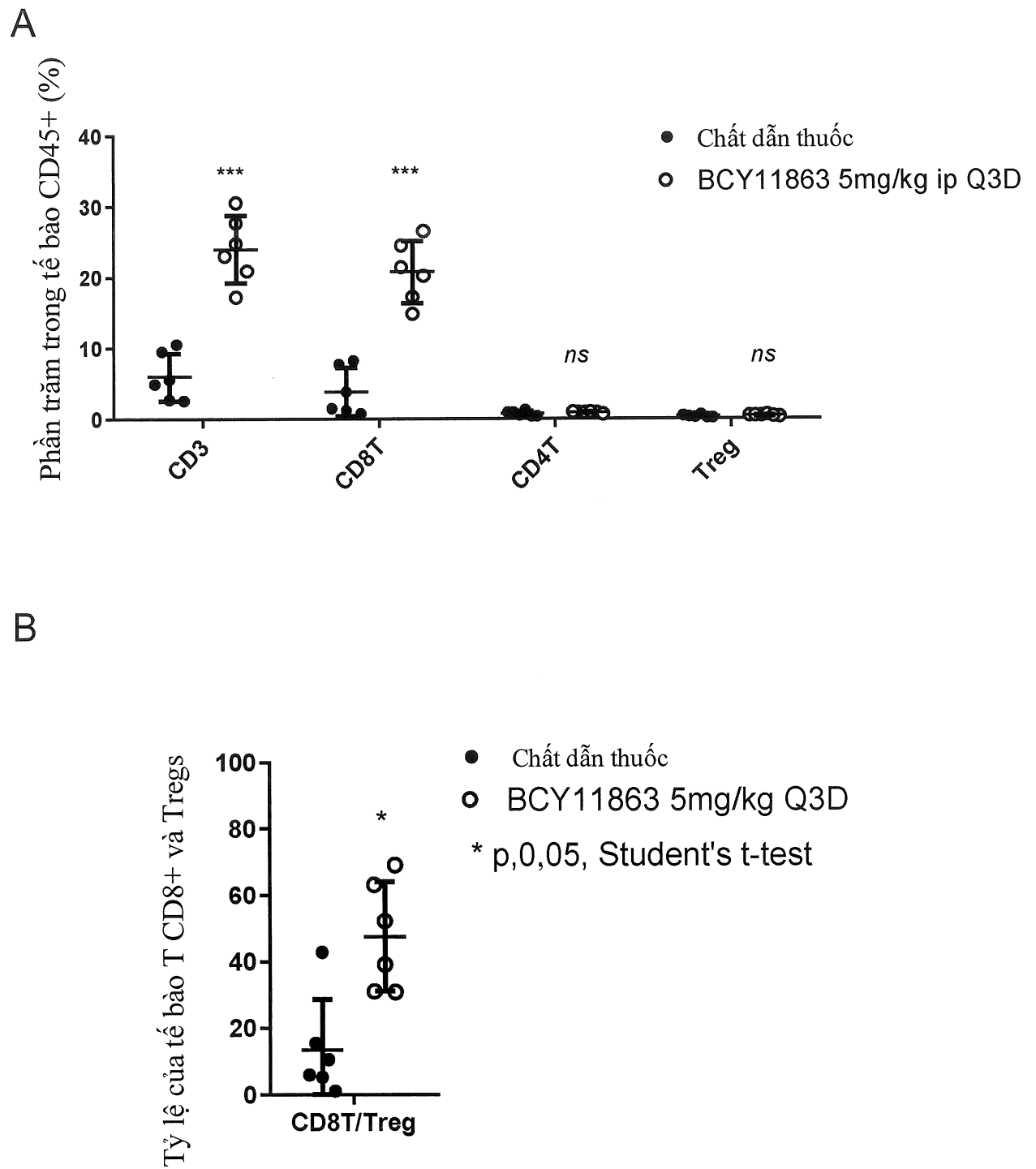


Fig. 7

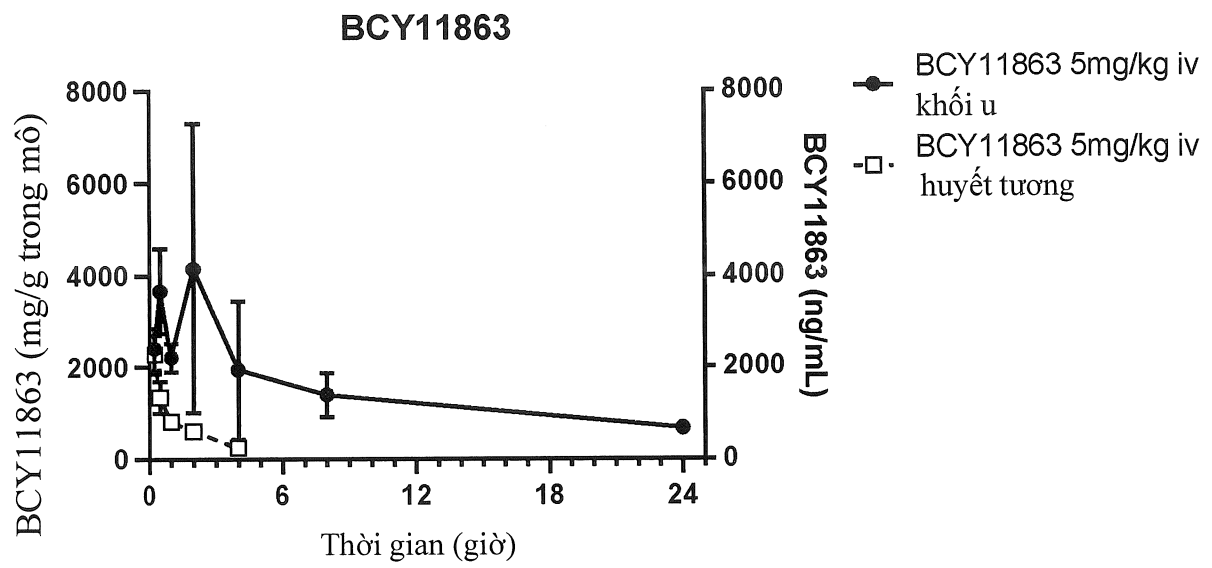
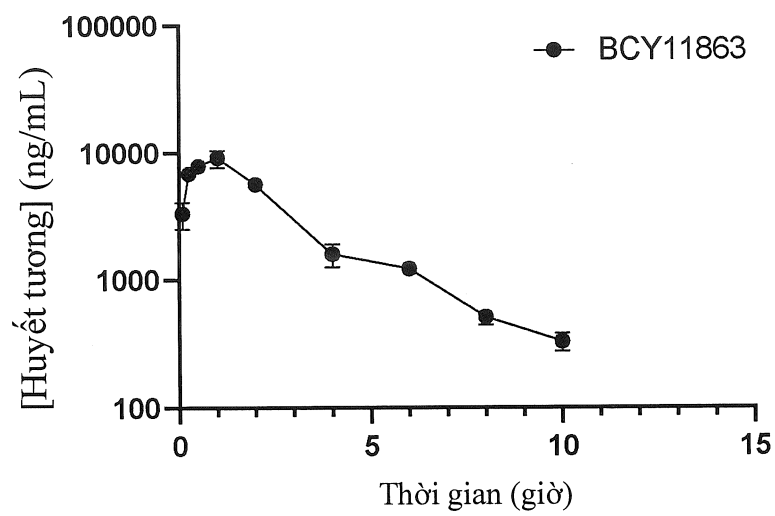


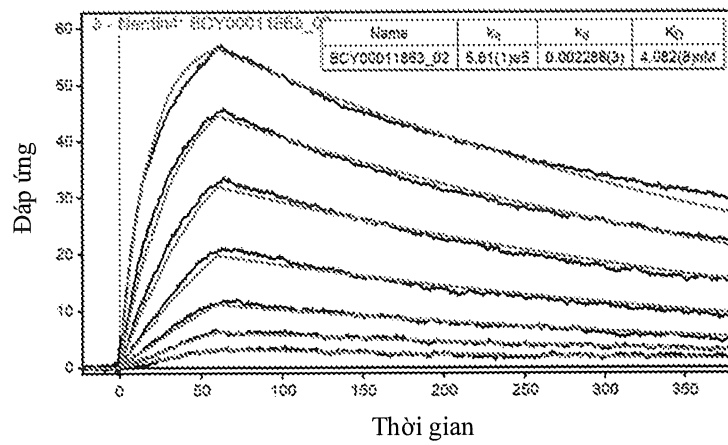
Fig. 8



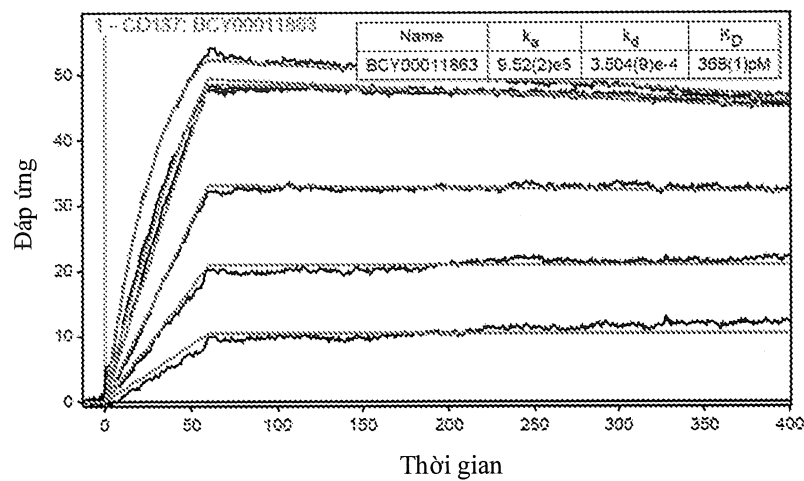
Hợp chất	Thời gian bán hủy cuối, $T_{1/2}$ (giờ)
BCY11863	2,5

Fig. 9

A



B



C

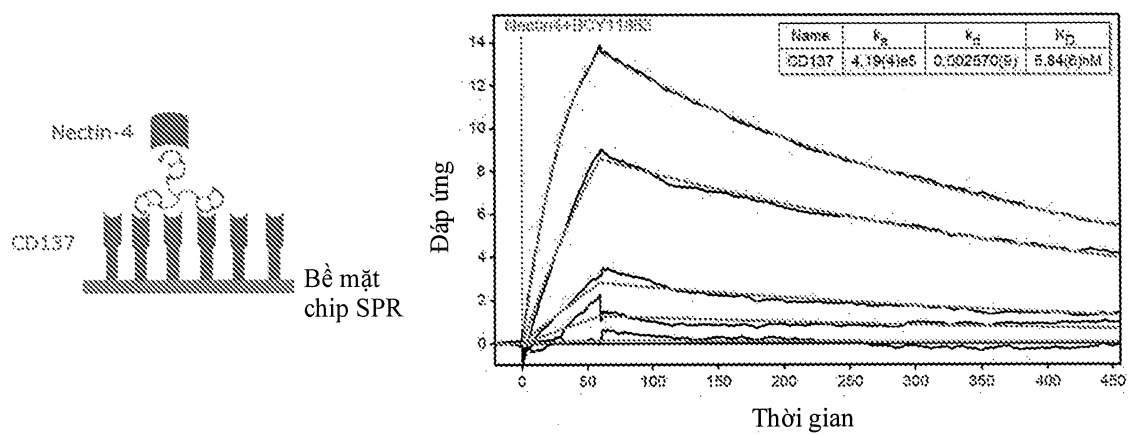
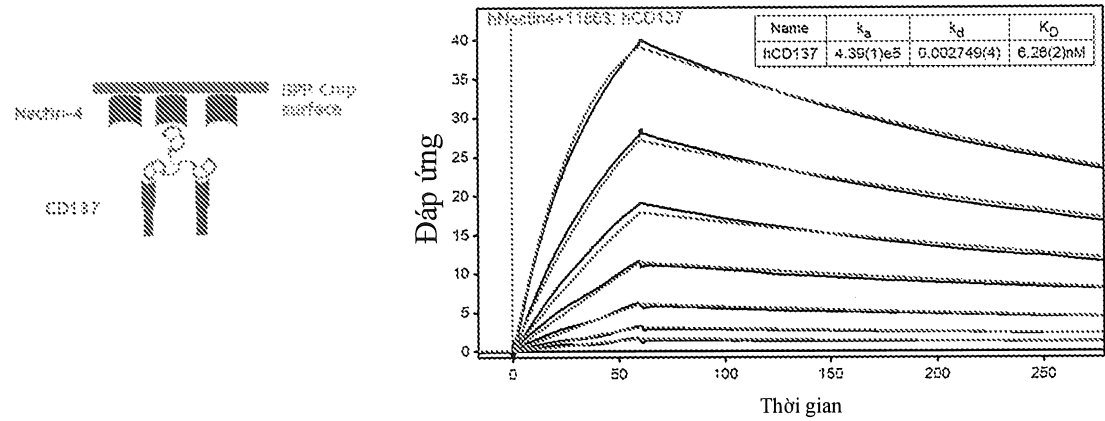


Fig. 10

D



hNectin4+11863; hCD137

Name	k_a	k_d	K_D
hCD137	4.35(1)e5	0.002749(4)	6.28(2)nM

Đáp ứng

Thời gian

E

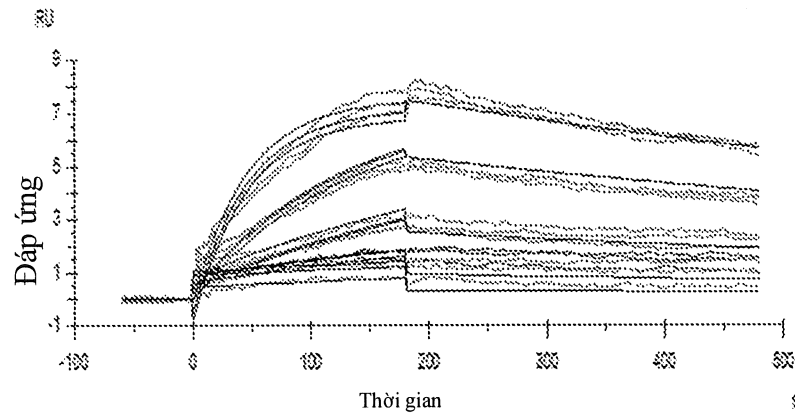


Fig. 10 (ctd)

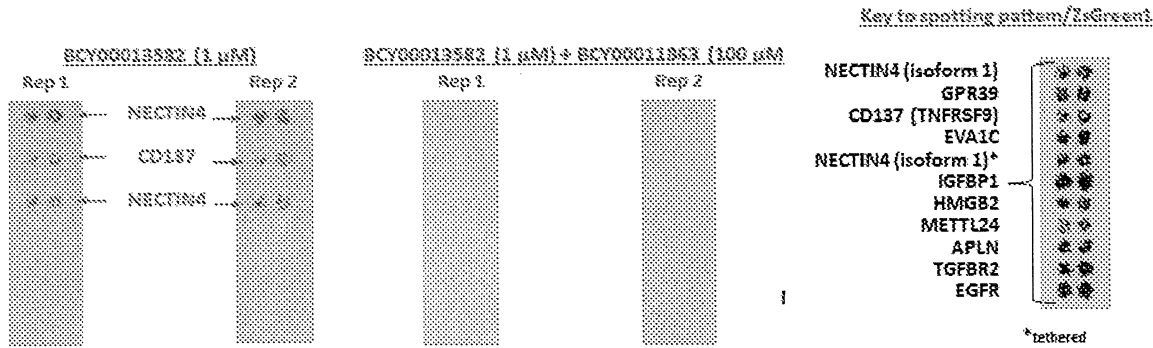


Fig. 11

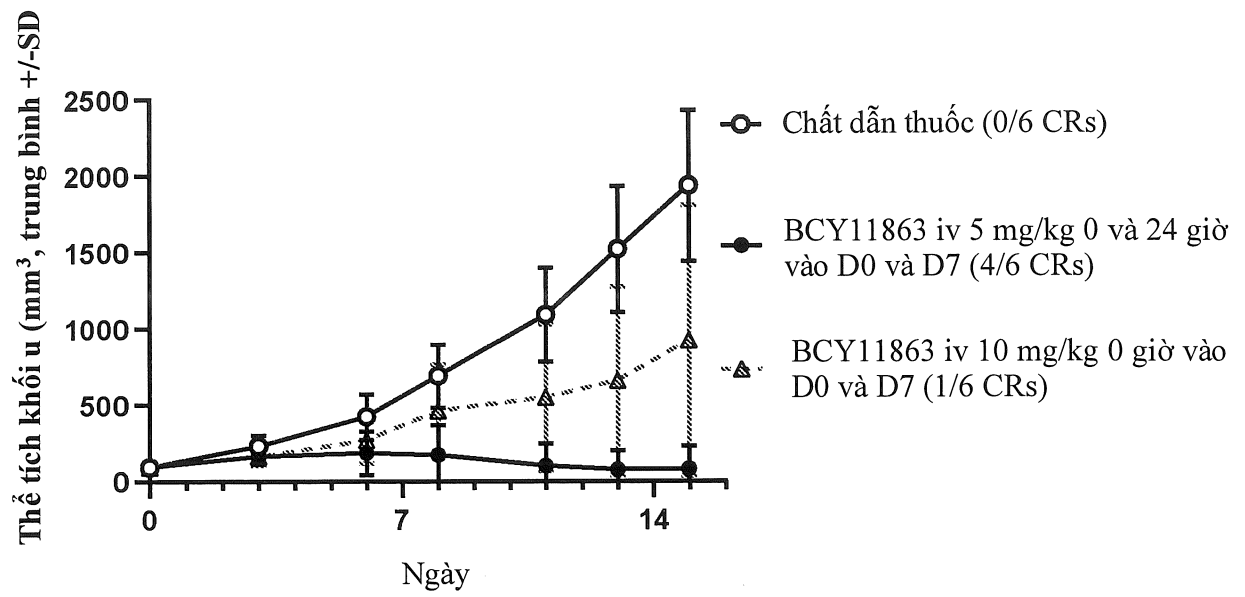
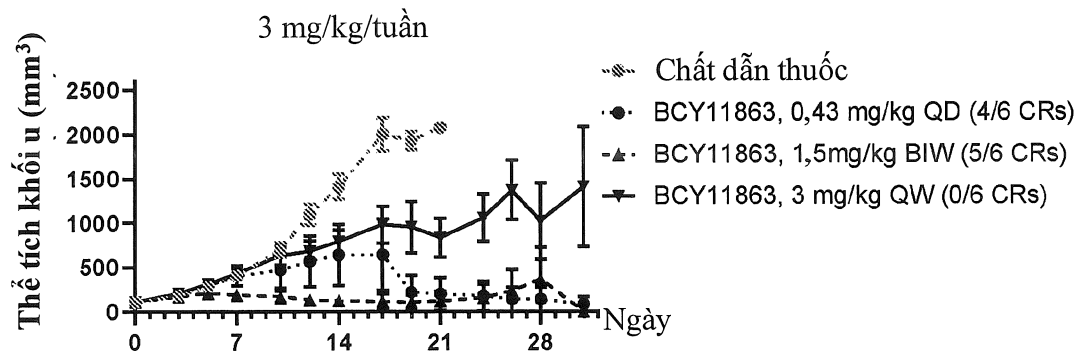
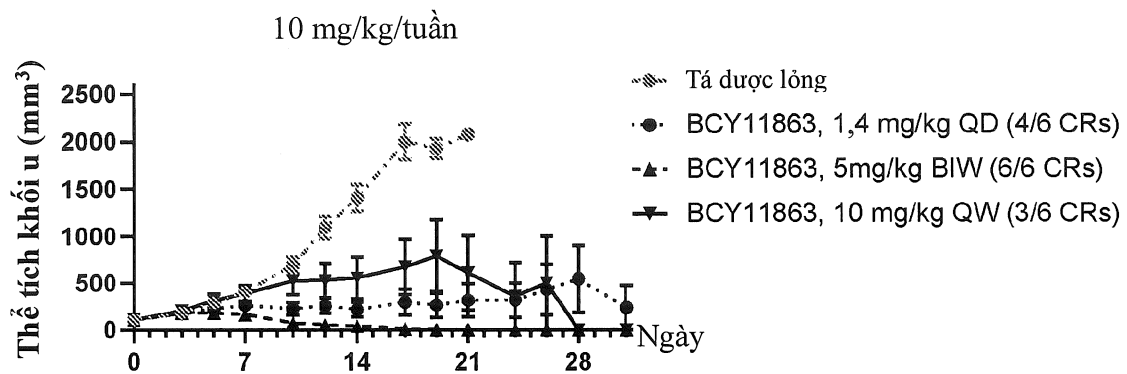


Fig. 12

A



B



C

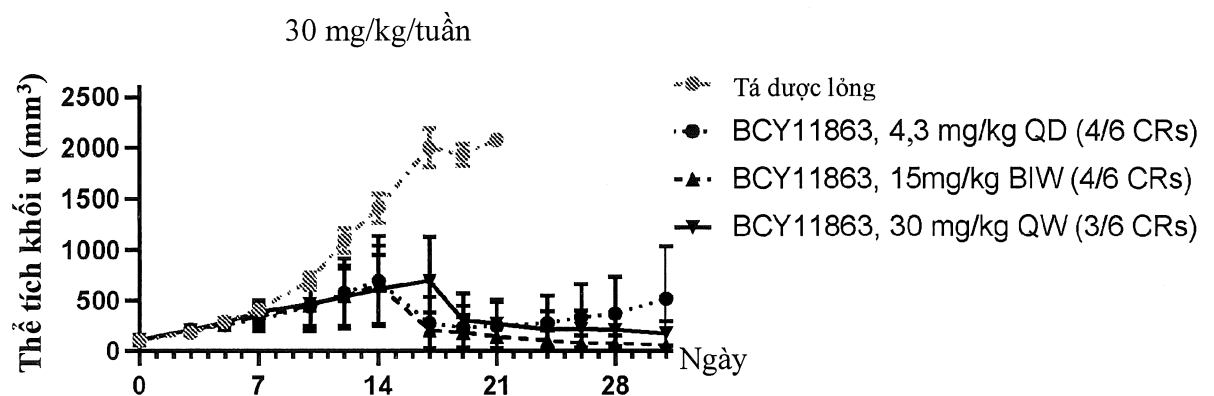


Fig. 13

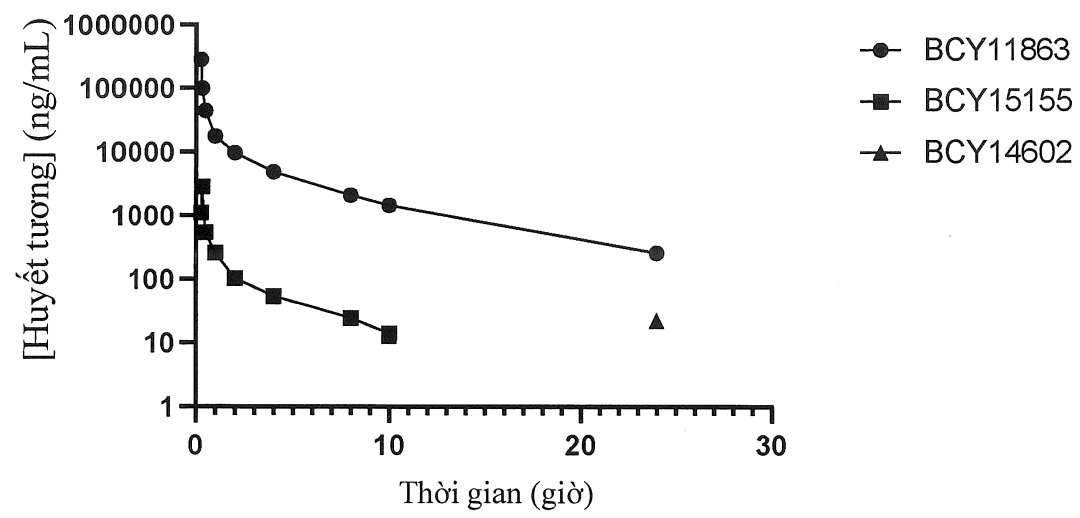


Fig. 14