

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091991 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.15(22) Дата подачи заявки
2019.02.22(51) Int. Cl. C07K 17/02 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 17/14 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)

(54) МУЛЬТИМЕРНЫЕ БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ

(31) 1802931.4; 1805848.7; 1818158.6

(32) 2018.02.23; 2018.04.09; 2018.11.07

(33) GB

(86) PCT/GB2019/050485

(87) WO 2019/162682 2019.08.29

(71) Заявитель:
БАЙЦИКЛТЭКС ЛИМИТЕД (GB)

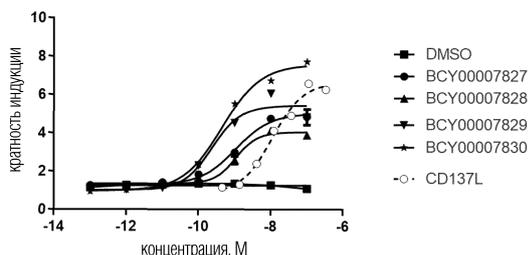
(72) Изобретатель:

Чэнь Люхун, Лани Рашид,
Макдоннелл Кевин, Мадд Джемма,
Парк Питер, Упадхияа Пунит (GB)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к мультимерам полипептидов, которые ковалентно связаны с молекулярными каркасами, так что две или более пептидных петли замыкаются между точками присоединения к каркасу. Также изобретение относится к мультимеризации полипептидов посредством различных химических линкеров и шарнирных групп различной длины и жесткости с использованием различных участков присоединения в полипептидах. В частности, изобретение относится к мультимерам пептидов, которые представляют собой высокоаффинные связывающие агенты и активаторы CD137. Также изобретение относится к конъюгатам лекарственных средств, содержащим указанные пептиды, конъюгированные с одной или несколькими эффекторными и/или функциональными группами, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные пептидные лиганды и конъюгаты лекарственных средств, и к применению указанных пептидных лигандов и конъюгатов лекарственных средств для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого CD137.



A1

202091991

202091991

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563983EA/042

МУЛЬТИМЕРНЫЕ БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к мультимерам полипептидов, которые ковалентно связаны с молекулярными каркасами, так что две или более пептидных петли замыкаются между точками присоединения к каркасу. Также изобретение относится к мультимеризации полипептидов посредством различных химических линкеров и шарнирных групп различной длины и жесткости с использованием различных участков присоединения в полипептидах. В частности, изобретение относится к мультимерам пептидов, которые представляют собой высокоаффинные связывающие агенты и активаторы CD137. Также изобретение относится к конъюгатам лекарственных средств, содержащим указанные пептиды, конъюгированные с одной или несколькими эффекторными и/или функциональными группами, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные пептидные лиганды и конъюгаты лекарственных средств, и к применению указанных пептидных лигандов и конъюгатов лекарственных средств для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого CD137.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОМУ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Белок-белковые взаимодействия являются важными регуляторами клеточных функций. Эти взаимодействия, как правило, вовлекают большие площади поверхности и по существу не могут ни легко ингибироваться, ни имитироваться, с использованием типичных низкомолекулярных терапевтических средств. Кроме того, многие важные классы рецепторов (рецепторные тирозинкиназы, рецепторы цитокинов, рецепторы фактора некроза опухоли (TNF), T-клеточные рецепторы и сопряженные с G-белком рецепторы) требуют олигомеризации мономерных единиц рецептора в конкретной ориентации для активации каскада передачи сигнала рецептора. Рекомбинантные белки, такие как моноклональные антитела и слитые белки (например, слитые конструкции лиганд-Fc) способны связывать и индуцировать олигомеризацию таких рецепторов вследствие высокой аффинности и больших площадей поверхностей взаимодействия с потенциалом к мультивалентному связыванию. Однако большие белки являются неэффективными в отношении проникновения в ткани и могут не быть идеальным терапевтическим режимом для модулирования рецепторов, особенно рецепторов, находящихся на клетках, которые слабо кровоснабжаются или окружены барьерами для проникновения, такими как стромальный барьер, встречающийся при раке поджелудочной железы. Небольшие синтетические и модульные терапевтические средства с большей поверхностью взаимодействия, чем у низкомолекулярных средств, были бы идеальными вследствие обхода барьера проницаемости и активации рецепторов-мишеней посредством олигомеризации.

Недавний успех ингибиторов иммунной точки контроля, таких как антитела против

PD-1 и против PD-L1, в отношении лечения различных типов злокачественных опухолей, повысил интерес к молекулам, которые активируют костимулирующие мишени, в том числе CD137, на Т-клетках. CD137 (4-1BB/TNFRSF9) принадлежит суперсемейству рецепторов TNF и обеспечивает костимулирующую передачу сигнала для Т-клеток.

Индукцибельная экспрессия CD137 встречается на активированных Т-, В-, дендритных клетках и натуральных киллерах (NK). Стимуляция CD137 его природным лигандом, CD137L, или антителом-агонистом индуцирует энергичную пролиферацию Т-клеток и препятствует индуцируемой активацией клеточной смерти. 4-1BB образует гетеротримерный комплекс, состоящий из двух комплексов ассоциированного с рецептором TNF фактора TRAF-2 совместно с TRAF-1. Это взаимодействие через лейкоцит-специфический белок 1 (LSP-1), усиливает передачу сигнала через каскады JNK и ERK, а также через β -катенин и АКТ. Эти каскады передачи сигнала сходятся на основном факторе транскрипции NF- κ B, регулирующем передачу сигнала 4-1BB, а также иммунные ответы эффекторов.

Антитела-агонисты CD137 продемонстрировали мощную часто излечивающую противоопухолевую активность в моделях на мышах. Их противоопухолевая активность еще более усиливается в комбинации с антителом против PD-1 или антителом против CTLA-4. Эти эффекты в основном опосредуются цитотоксическими Т-клетками и формируют длительные ответы памяти. Два антитела человека против CD137 в настоящее время проходят клинические испытания: урелумаб продемонстрировало частичные ответы на введение в качестве единственного средства при меланоме, однако в дозах ≥ 1 мг/кг наблюдалась гепатотоксичность, и, в результате, его комбинируют с другими способами иммунотерапии в субоптимальной дозе 0,1 мг/кг; утолимумаб также проходит оценку при солидных опухолях в комбинации с другими способами иммунотерапии, однако, хотя не наблюдалось гепатотоксичности в дозе вплоть до 5 мг/кг, он имеет небольшую или не имеет активности в качестве единственного средства.

Циклические пептиды способны связываться с высокой аффинностью и специфичностью с белковыми мишенями и, таким образом, они являются привлекательным классом молекул для разработки терапевтических средств. В действительности, несколько циклических пептидов уже успешно используется в клинике, например, таких как антибактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессивное лекарственное средство циклоспорин или лекарственное средство против злокачественной опухоли октреотид (Driggers *et al.* (2008), *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 608-24). Хорошие связывающие свойства являются результатом относительно большой поверхности взаимодействия между пептидом и мишенью, а также сниженной конформационной гибкости циклических структур. Как правило, макроциклы связываются с поверхностями размером несколько сот квадратных ангстрем, как например, циклический пептидный антагонист CXCR4 CVX15 (400 Å²; Wu *et al.* (2007), *Science* 330, 1066-71), циклический пептид с мотивом Arg-Gly-Asp, связывающийся с интегрином α V β 3 (355 Å²) (Xiong *et al.* (2002), *Science* 296 (5565), 151-5) или циклический

пептидный ингибитор упаин-1, связывающийся с активатором плазминогена урокиназного типа (603 Å²; Zhao *et al.* (2007), J Struct Biol 160 (1), 1-10).

Bicycle® представляют собой новый терапевтический класс полностью синтетических ограниченных бициклических пептидов, которые обладают высокой аффинностью и исключительной специфичностью к мишени, недостижимой с использованием общепринятых низкомолекулярных подходов. В платформе Bicycle® используется фаговый дисплей для быстрой идентификации и оптимизации связывающих соединений, которые затем можно без труда химически оптимизировать для коррекции аффинности и физико-химических свойств. Их малый размер (1,5-2 кДа) обеспечивает преимущества в отношении проникновения в опухоль и быстрое выведение почками предотвращает печеночную и желудочно-кишечную токсичность, часто ассоциированную с другими лекарственными средствами, включая определенные антитела. Агонисты CD137 Bicycle® с быстрым выведением почками и отсутствием взаимодействия с Fc-гамма рецепторами могут индуцировать противоопухолевую активность при избегании печеночной токсичности.

Существует потребность в предоставлении альтернативных бициклических пептидов, которые связывают и активируют их мишени с высоким диапазоном действенности и эффективности.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом изобретения предусматривается мультимерный связывающий комплекс, который содержит по меньшей мере два бициклических пептидных лиганда, где указанные пептидные лиганды могут быть одинаковыми или могут различаться, причем каждый из них содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособных группы, разделенных по меньшей мере двумя последовательностями петель, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида, так что на молекулярном каркасе образуется по меньшей мере две полипептидных петли.

В соответствии со следующим аспектом изобретения, предусматривается конъюгат лекарственного средства, содержащий мультимерный связывающий комплекс, как определено в настоящем описании, конъюгированный с одной или несколькими эффекторными и/или функциональными группами.

В соответствии со следующим аспектом изобретения, предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая мультимерный связывающий комплекс или конъюгат лекарственного средства, как определено в настоящем описании, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В соответствии со следующим аспектом изобретения, предусматривается мультимерный связывающий комплекс или конъюгат лекарственного средства, как определено в настоящем описании, для применения для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, такого как заболевание или нарушение, опосредуемое CD137.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1: Данные анализа активности репортерных клеток, полученные для тримеров ВСУ7827 и ВСУ7828 и тетрамеров ВСУ7829 и ВСУ7830, по сравнению с CD137L.

Фиг.2: Данные анализа активности репортерных клеток, полученные для тримеров ВСУ7749 и ВСУ7750 и тетрамеров ВСУ7751 и ВСУ7752, по сравнению с мономером ВСУ592 и лигандом CD137.

Фиг.3: Данные анализа активности репортерных клеток, полученные для тетрамеров ВСУ7845 и ВСУ7846, по сравнению с контролем в виде DMSO и лигандом CD137.

Фиг.4: Данные, демонстрирующие стабильность ВСУ7829 в плазме.

Фиг.5А: Данные, демонстрирующие среднюю концентрацию ВСУ7829 в плазме после в/в дозирования 5 мг/кг (измеренные 6,35 мг/кг) мышам CD-1.

Фиг.5В: Данные, демонстрирующие среднюю концентрацию в плазме ВСУ7835 и ВСУ7838 после в/в дозирования мышам CD-1.

Фиг.6: Данные, демонстрирующие стабильность мультимеров CD137 в плазме мыши.

Фиг.7: Кривая объема опухоли после введения мультимеров CD137 гуманизированным мышам C57BL/6J B-h4-1BB, имеющим сингенные опухоли MC38. Точки данных соответствуют средним объемам опухоли для группы. Планки погрешности соответствуют стандартному отклонению (SD).

Фиг.8: Кривая объема опухоли после введения мультимерных бициклических пептидов гуманизированным мышам C57BL/6J B-h4-1BB, имеющим сингенные опухоли MC38. Точки данных соответствуют средним объемам опухоли для группы. Планки погрешности соответствуют стандартному отклонению (SD). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, 2-сторонний ANOVA с критерием Даннетта для множественных сравнений.

Фиг.9: Процент CD3⁺ клеток среди CD45⁺ клеток в опухолевой ткани после введения мультимерных бициклических пептидов гуманизированным мышам C57BL/6J B-h4-1BB, имеющим сингенные опухоли MC38, в течение периода лечения 21 сутки. Точки данных соответствуют проценту клеточных популяций от отдельных мышей и линии, и планки погрешностей соответствуют среднему значению и стандартному отклонению (SD). ** $p < 0,01$, односторонний ANOVA с критерием Даннетта для множественных сравнений.

Фиг.10: Процент CD8⁺ клеток среди CD45⁺CD3⁺ клеток в опухолевой ткани после введения мультимерных бициклических пептидов гуманизированным мышам C57BL/6J B-h4-1BB, имеющим сингенные опухоли MC38, на протяжении периода лечения 21 сутки. Точки данных соответствуют проценту клеточных популяций от отдельных мышей и линии, и планки погрешностей соответствуют среднему значению и стандартному отклонению (SD). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, односторонний ANOVA с критерием Даннетта для множественных сравнений.

Фиг.11: Процент CD4⁺ клеток среди CD45⁺CD3⁺ клеток в опухолевой ткани после

введения мультимерных бициклических пептидов гуманизированным мышам C57BL/6J B-h4-1BB, имеющим сингенные опухоли MC38, в течение периода лечения 21 сутки. Точки данных соответствуют проценту клеточных популяций от отдельных мышей и линии, и планки погрешностей соответствуют среднему значению и стандартному отклонению (SD). (SD). ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, односторонний ANOVA с критерием Даннетта для множественных сравнений.

Фиг.12: Процент клеточной смерти, нормализованный к контролю без лечения, после 2 суток в 3D-сфероидной культуре двух опухолей меланомы. (А) Опухолевые клетки представляют собой живую отрицательную по CD45 популяцию и (В) лимфоциты представляют собой живую положительную по CD45 популяцию при определении посредством проточной цитометрии. Значимость вычисляют с использованием 2-стороннего множественного сравнения ANOVA, $p < 0,05$.

Фиг.13: Мультимеры CD137 сохраняют активность после вымывания. Репортерные клетки CD137 подвергают воздействию соединения в течение 30, 60 или 120 минут до вымывания соединения и определяют активность через 5,5, 5 или 4 часа, соответственно. В условиях "без вымывания" клетки подвергают воздействию соединения в ходе полной инкубации в течение 6 часов.

Фиг.14: Мультимеры CD137 приводят к увеличенной секреции цитокинов в анализе с первичными Т-клетками. Экспансию CD137 индуцируют в Т-клетках (выделенных из PBMC человека) с использованием антитела против CD3. Затем Т-клетки обрабатывают мультимерами CD137, мономером CD137 (отрицательный контроль) или моноклональным антителом-агонистом CD137 в течение 48 часов, и уровни IL-2 (А) и IFN γ (В) количественно определяют в супернатанте с использованием анализа HTRF.

Фиг.15: Данные анализа активности репортерных клеток, полученные для VCY7839, VCY7842, VCY8945 и VCY8947.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом изобретения, предусматривается мультимерный связывающий комплекс, который содержит по меньшей мере два бициклических пептидных лиганда, где указанные пептидные лиганды могут быть одинаковыми или могут различаться, каждый из которых содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособных группы, разделенных по меньшей мере двумя последовательностями петель, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида, так что на молекулярном каркасе образуется по меньшей мере две полипептидных петли.

Настоящее изобретение относится к серии мультимеризованных бициклических пептидов с различными химическими линкерами и шарнирными группами различной длины и жесткости с использованием различных участков присоединения в указанном бициклическом пептиде, который связывает и активирует мишени (такие как CD137) с широким диапазоном действенности и эффективности.

Специалисту в данной области будет понятно, что идея изобретения состоит в

осознании того, что множество упорядоченных (мультимерных) бициклических пептидов обеспечивают синергическую пользу вследствие результирующих свойств указанных мультимерных связывающих комплексов по сравнению с соответствующими мономерными связывающими комплексами, которые содержат один бициклический пептид. Например, мультимерные связывающие комплексы по изобретению, как правило, имеют более высокие уровни эффективности связывания или авидности (как определяют в настоящем описании с помощью величин K_d), чем их мономерные аналоги. Более того, мультимерные связывающие комплексы по изобретению сконструированы так, чтобы они имели достаточно малый размер, чтобы выводиться почками.

Комплексы по настоящему изобретению особенно пригодны для лечения злокачественной опухоли. Таким образом, в одном варианте осуществления, один из указанных пептидных лигандов специфичен к эпитопу, присутствующему на Т-клетке или злокачественной клетке. В следующем варианте осуществления каждый из указанных пептидных лигандов специфичен к эпитопу, присутствующему на Т-клетке или злокачественной клетке.

Без связи с теорией полагают, что мультимеризованные бициклические пептиды способны активировать рецепторы посредством гомогенного сшивания более одного из одинаковых рецепторов. Таким образом, в одном варианте осуществления указанные бициклические пептидные лиганды являются специфическими в отношении одной и той же мишени. В следующем варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит по меньшей мере два идентичных бициклических пептидных лиганда. Под "идентичными" подразумевают бициклические пептиды, обладающие одинаковой аминокислотной последовательностью, наиболее принципиальным является то, что одинаковая аминокислотная последовательность находится в связывающей части указанного бициклического пептида (например, последовательность может варьироваться в положении присоединения). В этом варианте осуществления каждый из бициклических пептидов в мультимерном связывающем комплексе может связываться только с одним эпитопом на одной и той же мишени - таким образом, полученный связанный с мишенью комплекс будет образовывать гомодимер (если мультимерный комплекс содержит два идентичных бициклических пептида), гомотример (если мультимерный комплекс содержит три идентичных бициклических пептида) или гомотетрамер (если мультимерный комплекс содержит четыре идентичных бициклических пептида), и т.д.

В альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит по меньшей мере два различных бициклических пептидных лиганда. Под "различными" подразумевают бициклические пептиды, обладающие различной аминокислотной последовательностью. В этом варианте осуществления различные бициклические пептидные лиганды в мультимерном связывающем комплексе связываются с различными эпитопами на одной и той же мишени - таким образом, полученный связанный с мишенью комплекс будет бипаратопным (если мультимерный комплекс содержит два различных бициклических пептида), трипаратопным (если

мультимерный комплекс содержит три различных бициклических пептида) или тетрапаратопным (если мультимерный комплекс содержит четыре различных бициклических пептида), и т.д.

Без связи с теорией полагают, что мультимеризованные бициклические пептиды способны активировать рецепторы посредством гетерологичного сшивания различных мишеней, таких как различные рецепторы-мишени. Таким образом, в одном варианте осуществления указанные бициклические пептидные лиганды являются специфичными к различным мишеням. Будет понятно, что в этом варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит по меньшей мере два различных бициклических пептидных лиганда (т.е. бициклические пептидные лиганды, имеющие различные аминокислотные последовательности). В этом варианте осуществления каждый из бициклических пептидов в мультимерном связывающем комплексе связывает отличающийся эпитоп на отличающейся мишени - таким образом, полученный связанный с мишенью комплекс образует биспецифический мультимерный связывающий комплекс (если мультимерный комплекс содержит два различных бициклических пептида), триспецифический мультимерный связывающий комплекс (если мультимерный комплекс содержит три различных бициклических пептида), тетраспецифический мультимерный связывающий комплекс (если мультимерный комплекс содержит четыре различных бициклических пептида) и т.д.

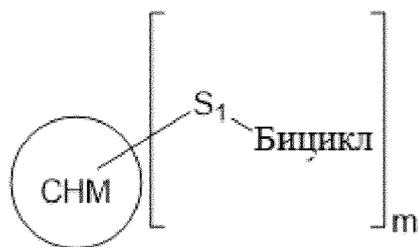
Будет понятно, что можно конструировать мультимерные связывающие комплексы по изобретению, способные связываться с рядом различных мишеней, таких как рецепторы. Подходящие примеры включают любую мишень (т.е. рецептор), вовлеченную в злокачественную опухоль, такую как представители суперсемейства рецепторов TNF (т.е. CD137), рецепторная тирозинкиназа (RTK), рецепторы с доменом Ig (иммунная точка контроля) и т.д. Будет понятно, что для би-, три- и тетраспецифических мультимерных связывающих комплексов, упоминаемых выше, бициклические пептиды могут связываться с мишенями по меньшей мере на двух различных клетках (таких как T-, NK- или другие иммунные клетки).

Бициклические пептиды в мультимерных связывающих комплексах по изобретению можно собирать рядом различных путей. Например, может существовать центральная шарнирная область или ветвящаяся часть со спейсерными или плечевыми элементами, исходящими из указанной шарнирной области или точки ветвления, каждый из которых содержит бициклический пептид. Альтернативно может предусматриваться, что кольцевой опорный представитель может содержать ряд выступающих внутрь или наружу бициклических пептидов.

В одном варианте осуществления каждый бициклический пептидный лиганд соединен с центральной шарнирной частью спейсерной группой.

Будет понятно, что спейсерная группа может быть линейной и может соединять один бициклический пептид с центральной шарнирной частью. Таким образом, в одном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит соединение

формулы (I):



(I)

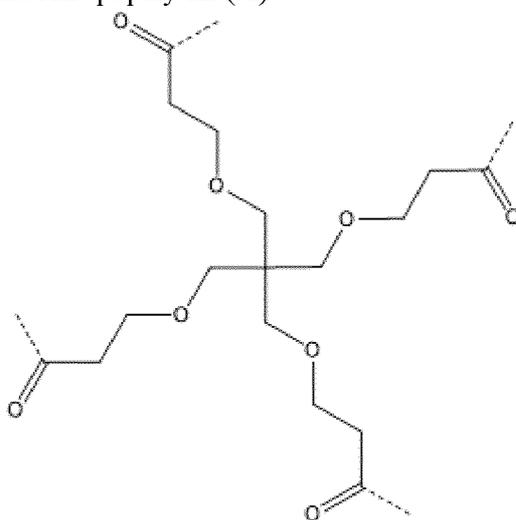
где СНМ обозначает центральную шарнирную часть;

S_1 обозначает спейсерную группу;

Бицикл обозначает бициклический пептидный лиганд, как определено в настоящем описании; и

m обозначает целое число, выбранное из от 2 до 10.

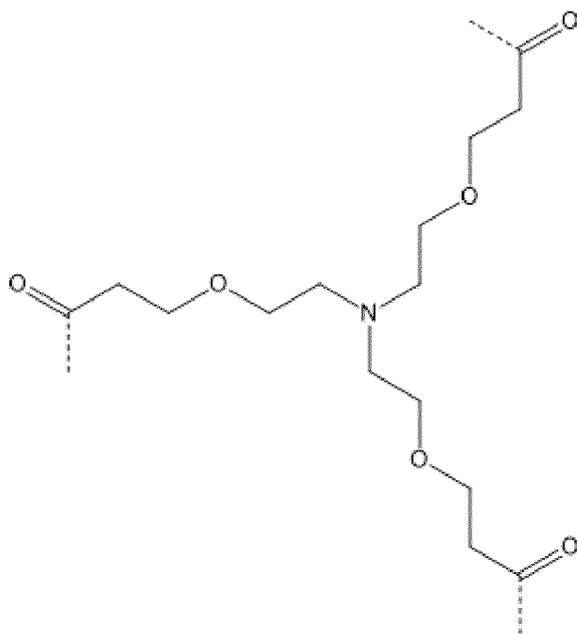
В одном варианте осуществления m обозначает целое число, выбранное из от 3 до 10. В следующем варианте осуществления m обозначает целое число, выбранное из 3 или 4. В настоящем описании приведены данные, которые показывают, что оптимальные результаты достигались с использованием тримеров ($m=3$) и тетрамеров ($m=4$). Когда m обозначает 4, будет понятно, что потребуется 4 точки присоединения в центральной шарнирной части. Таким образом, в одном варианте осуществления m обозначает 4 и СНМ представляет собой мотив формулы (A):



(A)

где "-----" обозначает точку присоединения каждой группы S_1 .

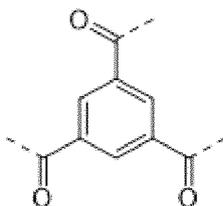
Когда m обозначает 3, будет понятно, что потребуется 3 точки присоединения в центральной шарнирной части. Таким образом, в одном варианте осуществления m обозначает 3 и СНМ представляет собой мотив формулы (B):



(B)

где "-----" обозначает точку присоединения каждой группы S_1 .

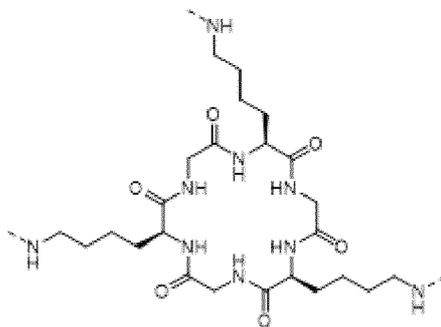
В альтернативном варианте осуществления m обозначает 3 и СНМ представляет собой мотив формулы (C):



(C)

где "-----" обозначает точку присоединения каждой группы S_1 .

В альтернативном варианте осуществления m обозначает 3 и СНМ представляет собой мотив формулы (D):



(D)

где "-----" обозначает точку присоединения каждой группы S_1 .

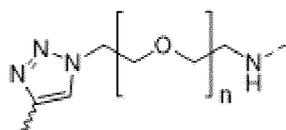
Специалисту в данной области будет хорошо понятно, как можно конструировать альтернативные центральные шарнирные части в зависимости от величины m .

Будет понятно, что спейсер (S_1) может представлять собой любую подходящую конструкцию для связывания бициклической пептидной центральной шарнирной части с

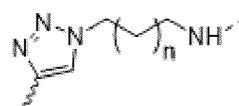
бициклическим пептидом. В одном варианте осуществления спейсер (S_1) содержит триазиольную часть. Преимущество этого варианта осуществления состоит и в том, что триазиольная часть может быть включена в синтез с использованием широко доступной "клик"-химии. Примеры подходящих спейсерных (S_1) групп включают одну или несколько частей ПЭГ, пептидных последовательностей, углеводов, липидов и т.п.

В следующем варианте осуществления спейсер (S_1) содержит одну или несколько частей ПЭГ. Упоминание в настоящем описании "ПЭГ" относится к линейному полимеру с регулярным повторяющимся элементом общей структуры: $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ - (где n обозначает любое число, такое как от 1 до 30).

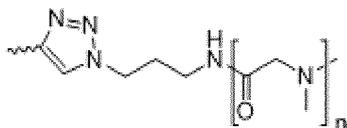
Таким образом, в следующем варианте осуществления спейсер (S_1) выбирают из любого из спейсеров S_{1A} , S_{1B} , S_{1C} , S_{1D} , S_{1E} , S_{1F} , S_{1G} и S_{1H} :



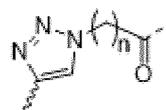
S_{1A}
 $n = 5, 10$ и 23



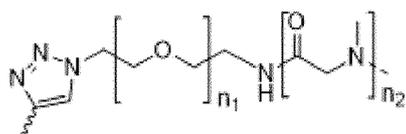
S_{1E}
 $n = 1$



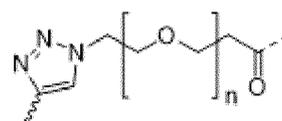
S_{1B}
 $n = 5, 10$



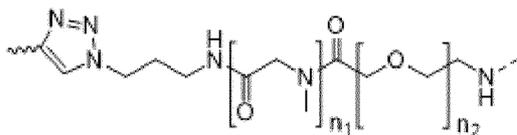
S_{1F}
 $n = 1$



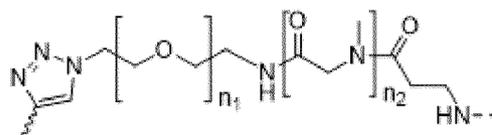
S_{1C}
 $n_1 = 5, n_2 = 5$
 $n_1 = 10, n_2 = 10$



S_{1G}
 $n = 5$ и 10



S_{1D}
 $n_1 = 5, n_2 = 5$
 $n_1 = 10, n_2 = 10$

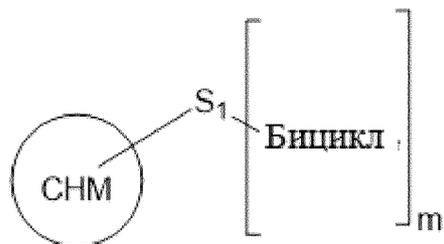


S_{1H}
 $n_1 = 5, n_2 = 5$
 $n_1 = 10, n_2 = 10$

где "-----" обозначает точку присоединения к группе CH_2N ; и
" ~~~~ " обозначает точку присоединения к бициклической группе.

В следующем варианте осуществления спейсер (S_1) представляет собой S_{1A} .

В альтернативной организации спейсерная группа может быть разветвленной и, таким образом, одна спейсерная группа может соединять множество бициклических пептидов с центральной шарнирной частью. Таким образом, в альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает соединение формулы (II):



(II)

где СНМ обозначает центральную шарнирную часть;

S₁ обозначает спейсерную группу;

Бицикл обозначает бициклический пептидный лиганд, как определено в настоящем описании; и

m обозначает целое число, выбранное из от 2 до 10.

Будет понятно, что бициклический пептидный лиганд может быть связан со спейсером рядом способов. В одном варианте осуществления бициклический пептидный лиганд конъюгирован с половиной связывающей пары, а указанная другая половина указанной связывающей пары связывает каждый из бициклических пептидов со спейсером.

В одном варианте осуществления указанная связывающая пара содержит биотин и стрептавидин. Таким образом, каждый бициклический пептидный лиганд конъюгирован с биотином и связан со спейсером через стрептавидин.

Бициклические пептиды

Будет понятно, что мультимерные связывающие комплексы, описанные в настоящем описании, содержат множество мономерных бициклических пептидов. В одном варианте осуществления каждый из указанных пептидных лигандов (т.е. мономеров) специфичен к CD137.

Бициклические пептидные мономеры для CD137

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат 5 или 6 аминокислотных остатков.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, обе из которых состоят из 6 аминокислот.

В следующем варианте осуществления указанный пептидный лиганд содержит центральную аминокислотную последовательность, выбранную из:

C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 23);

C_i IKEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 24);
 C_i IEKGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 25);
 C_i IEE(D-K)QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 26);
 C_i IEEGKYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 27);
 C_i IEEGQYC_{ii}KADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 28);
 C_i IEEGQYC_{ii}FADKY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 29); и
 C_i IEEGQYC_{ii}FADPYKC_{iii} (SEQ ID NO: 30);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно и Nle обозначает норлейцин или его фармацевтически приемлемую соль.

В следующем варианте осуществления указанный пептидный лиганд содержит N- и C-концевые модификации и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 31; обозначаемая в настоящем описании как мономер 1 и BCY3814);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-Dap (SEQ ID NO: 32; обозначаемая в настоящем описании как мономер 2 и BCY7732);

Ac-A-C_iIKEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 33; обозначаемая в настоящем описании как мономер 3 и BCY7733);

Ac-A-C_iIEKGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 34; обозначаемая в настоящем описании как мономер 4 и BCY7734);

Ac-A-C_iIEE(D-K)QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 35; обозначаемая в настоящем описании как мономер 5 и BCY7735);

Ac-A-C_iIEEGKYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 36; обозначаемая в настоящем описании как мономер 6 и BCY7736);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}KADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 37; обозначаемая в настоящем описании как мономер 7 и BCY7737);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADKY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 38; обозначаемая в настоящем описании как мономер 8 и BCY7738);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPYKC_{iii}-A (SEQ ID NO: 39; обозначаемая в настоящем описании как мономер 9 и BCY7739);

A-C_iIEEGQYC_{ii}F[D-A]DPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 58; обозначаемая в настоящем описании как мономер 10 и BCY8217);

Ac-C_i[tBuAla]PK[D-A]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 59; обозначаемая в настоящем описании как мономер 11 и BCY8919);

Ac-C_i[tBuAla]PE[D-K]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 60; обозначаемая в настоящем описании как мономер 12 и BCY8920);

Ac-A-C_iIE[D-K]GQYC_{ii}F[D-A]DPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 61; обозначаемая в настоящем описании как мономер 13 и BCY8914);

Ac-A-C_iIE[D-K]GQYC_{ii}F[D-A]DPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 62; обозначаемая в настоящем описании как мономер 14 и BCY8915); и

[Ac]-[D-A]-[D-C_i][D-I][D-E][D-E]K[D-Q][D-Y][D-C_{ii}][D-F][D-A][D-D][D-P][D-Y][D-Nle][D-C_{iii}]-[D-A] (SEQ ID NO: 63; обозначаемая в настоящем описании как мономер 15 и BCY11072);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, Ac обозначает N-концевую ацетильную группу, Dap обозначает диаминопропионовую кислоту, tBuAla обозначает трет-бутилаланин и Nle обозначает норлейцин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В следующем варианте осуществления указанный пептидный лиганд содержит N- и C-концевые модификации и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 31; обозначаемая в настоящем описании как мономер 1 и BCY3814);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-Dap (SEQ ID NO: 32; обозначаемая в настоящем описании как мономер 2 и BCY7732);

Ac-A-C_iIEKGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 33; обозначаемая в настоящем описании как мономер 3 и BCY7733);

Ac-A-C_iIEKGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 34; обозначаемая в настоящем описании как мономер 4 и BCY7734);

Ac-A-C_iIEE(D-K)QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 35; обозначаемая в настоящем описании как мономер 5 и BCY7735);

Ac-A-C_iIEEGKYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 36; обозначаемая в настоящем описании как мономер 6 и BCY7736);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}KADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 37; обозначаемая в настоящем описании как мономер 7 и BCY7737);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADKY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 38; обозначаемая в настоящем описании как мономер 8 и BCY7738); и

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPYKC_{iii}-A (SEQ ID NO: 39; обозначаемая в настоящем описании как мономер 9 и BCY7739);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, Ac обозначает N-концевую ацетильную группу, Dap обозначает диаминопропионовую кислоту и Nle обозначает норлейцин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В следующем варианте осуществления указанный пептидный лиганд включает присоединение части PYA на N-конце, C-конце или остатка лизина в указанной последовательности и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

(PYA)-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 40; обозначаемая в настоящем описании как мономер 1A и BCY7740);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-Dap(PYA) (SEQ ID NO: 41; обозначаемая в настоящем описании как мономер 2A и BCY7741);

Ac-A-C_iIK(PYA)EGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 42; обозначаемая в

настоящем описании как мономер 3A и BCY7742);

Ac-A-C_iIEK(PYA)GQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 43; обозначаемая в настоящем описании как мономер 4A и BCY7743);

Ac-A-C_iIEE(D-K)(PYA)QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 44; обозначаемая в настоящем описании как мономер 5A и BCY7744);

Ac-A-C_iIEEGK(PYA)YC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 45; обозначаемая в настоящем описании как мономер 6A и BCY7745);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}K(PYA)ADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 46; обозначаемая в настоящем описании как мономер 7A и BCY7746);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADK(PYA)Y(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 47; обозначаемая в настоящем описании как мономер 8A и BCY7747);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPYK(PYA)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 48; обозначаемая в настоящем описании как мономер 9A и BCY7748);

(PYA)-A-C_iIEEGQYC_{ii}F[D-A]DPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 64; обозначаемая в настоящем описании как мономер 10A и BCY8935);

Ac-C_i[tBuAla]PK(PYA)[D-A]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 65; обозначаемая в настоящем описании как мономер 11A и BCY8927);

Ac-C_i[tBuAla]PE[D-K(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 66; обозначаемая в настоящем описании как мономер 12A и BCY8929);

Ac-A-C_iIE[D-K(PYA)]GQYC_{ii}F[D-A]DPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 67; обозначаемая в настоящем описании как мономер 13A и BCY8925);

Ac-A-C_iIE[K(PYA)]GQYC_{ii}F[D-A]DPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 68; обозначаемая в настоящем описании как мономер 14A и BCY8926); и

[Ac]-[D-A]-[D-C_i][D-I][D-E][D-E][K(PYA)][D-Q][D-Y][D-C_{ii}][D-F][D-A][D-D][D-P][D-Y][D-Nle][D-C_{iii}]-[D-A] (SEQ ID NO: 69; обозначаемая в настоящем описании как мономер 15A и BCY11506);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, Ac обозначает N-концевую ацетильную группу, Dap обозначает диаминопропионовую кислоту, PYA обозначает пропаргил-кислоту, tBuAla обозначает трет-бутилаланин и Nle обозначает норлейцин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В следующем варианте осуществления указанный пептидный лиганд включает присоединение части PYA на N-конце, C-конце или остатка лизина в указанной последовательности и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

(PYA)-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 40; обозначаемая в настоящем описании как мономер 1A и BCY7740);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-Dap(PYA) (SEQ ID NO: 41; обозначаемая в настоящем описании как мономер 2A и BCY7741);

Ac-A-C_iIK(PYA)EGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 42; обозначаемая в настоящем описании как мономер 3A и BCY7742);

Ac-A-C_iIEK(PYA)GQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 43; обозначаемая в настоящем описании как мономер 4A и BCY7743);

Ac-A-C_iIEE(D-K)(PYA)QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 44; обозначаемая в настоящем описании как мономер 5A и BCY7744);

Ac-A-C_iIEEGK(PYA)YC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 45; обозначаемая в настоящем описании как мономер 6A и BCY7745);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}K(PYA)ADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 46; обозначаемая в настоящем описании как мономер 7A и BCY7746);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADK(PYA)Y(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 47; обозначаемая в настоящем описании как мономер 8A и BCY7747); и

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPYK(PYA)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 48; обозначаемая в настоящем описании как мономер 9A и BCY7748);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, Ac обозначает N-концевую ацетильную группу, Dap обозначает диаминопропионовую кислоту, PYA обозначает пропаргил-кислоту и Nle обозначает норлейцин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В следующем варианте осуществления указанный пептидный лиганд включает присоединение части BCN на N-конце или остатках лизина в указанной последовательности и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

(BCN)-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 49; обозначаемая в настоящем описании как мономер 1-BCN и BCY8141);

Ac-A-C_iIK(BCN)EGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 50; обозначаемая в настоящем описании как мономер 3-BCN и BCY8095);

Ac-A-C_iIEK(BCN)GQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 51; обозначаемая в настоящем описании как мономер 4-BCN и BCY8142);

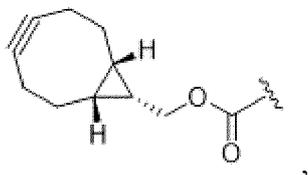
Ac-A-C_iIEE[(D-K)(BCN)]QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 52; обозначаемая в настоящем описании как мономер 5-BCN и BCY8096);

Ac-A-C_iIEEGK(BCN)YC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 53; обозначаемая в настоящем описании как мономер 6-BCN и BCY8143);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}K(BCN)ADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 54; обозначаемая в настоящем описании как мономер 7-BCN и BCY8144); и

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPYK(BCN)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 55; обозначаемая в настоящем описании как мономер 9-BCN и BCY8097);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, Ac обозначает N-концевую ацетильную группу, Nle обозначает норлейцин и BCN обозначает:



или их фармацевтически приемлемую соль.

В альтернативном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, одна из которых состоит из 5 аминокислот, а другая из которых состоит из 6 аминокислот.

Примеры следующих мономерных последовательностей, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, описаны в следующих вариантах осуществления.

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

C_1 -I-E-E-G-Q-Y- C_{ii} - X_1 - X_2 -D- X_3 -Y/Q- X_4 - C_{iii} (SEQ ID NO: 20);
 C_1 -D-I-G-P-P-Y- C_{ii} -Y-R/A-D-M/P-Y-M- C_{iii} (SEQ ID NO: 21);
 C_1 -D-E-W-G-L-F/Y- C_{ii} -I/F-P/A-H-S/P-D- C_{iii} (SEQ ID NO: 22); и
 C_1 IEPGPFC $_{ii}$ YADPYMC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 19);

где X_1 - X_4 обозначают любой аминокислотный остаток и C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или их фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, обе из которых состоят из 6 аминокислот, и указанный пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

C_1 -I-E-E-G-Q-Y- C_{ii} - X_1 - X_2 -D- X_3 -Y/Q- X_4 - C_{iii} (SEQ ID NO: 20);
 C_1 -D-I-G-P-P-Y- C_{ii} -Y-R/A-D-M/P-Y-M- C_{iii} (SEQ ID NO: 21); и
 C_1 IEPGPFC $_{ii}$ YADPYMC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 19);

где X_1 - X_4 обозначают любой аминокислотный остаток и C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или их фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте осуществления X_1 выбран из Y, F и H.

В одном варианте осуществления X_2 выбран из R, A и S.

В одном варианте осуществления X_3 выбран из M, P и H.

В одном варианте осуществления X_4 выбран из M, Y, L и F.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 6 аминокислот и вторая из которых состоит из 5 аминокислот, и указанный пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

C_1 -D-E-W-G-L-F/Y- C_{ii} -I/F-P/A-H-S/P-D- C_{iii} (SEQ ID NO: 22);

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

В следующем варианте осуществления пептидный лиганд C_1 -I-E-E-G-Q-Y- C_{ii} - X_1 - X_2 -D- X_3 -Y/Q- X_4 - C_{iii} (SEQ ID NO: 20) содержит аминокислотную последовательность,

выбранную из:

C_i IEEGQYC_{ii}YRDMYMC_{iii} (SEQ ID NO: 1);
 C_i IEEGQYC_{ii}YADPYMC_{iii} (SEQ ID NO: 2);
 C_i IEEGQYC_{ii}YADPYC_{iii} (SEQ ID NO: 3);
 C_i IEEGQYC_{ii}YSDPYC_{iii} (SEQ ID NO: 4);
 C_i IEEGQYC_{ii}FADPYMC_{iii} (SEQ ID NO: 5);
 C_i IEEGQYC_{ii}YADHQLC_{iii} (SEQ ID NO: 6);
 C_i IEEGQYC_{ii}HADPYC_{iii} (SEQ ID NO: 7);
 C_i IEEGQYC_{ii}HADPYFC_{iii} (SEQ ID NO: 8);
 C_i IEEGQYC_{ii}YADHYMC_{iii} (SEQ ID NO: 9);
 C_i IEEGQYC_{ii}YADPYLC_{iii} (SEQ ID NO: 10);
 C_i IEEGQYC_{ii}YSDPYLC_{iii} (SEQ ID NO: 11);
 C_i IEEGQYC_{ii}FADPYLC_{iii} (SEQ ID NO: 12);
 C_i IEEGQYC_{ii}HADPYMC_{iii} (SEQ ID NO: 13); и
 C_i IEEGQYC_{ii}HADPQMC_{iii} (SEQ ID NO: 14);

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

В следующем варианте осуществления пептидный лиганд C_i -I-E-E-G-Q-Y- C_{ii} -X₁-X₂-D-X₃-Y/Q-X₄- C_{iii} (SEQ ID NO: 20) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

A-(SEQ ID NO: 1)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-00-N004);
 A-(SEQ ID NO: 2)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-01-N001);
 A-(SEQ ID NO: 3)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-02-N001);
 A-(SEQ ID NO: 4)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-03-N001);
 A-(SEQ ID NO: 5)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-04-N001);
 A-(SEQ ID NO: 6)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-05-N001);
 A-(SEQ ID NO: 7)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-06-N001);
 A-(SEQ ID NO: 8)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-07-N001);
 A-(SEQ ID NO: 9)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-08-N001);
 A-(SEQ ID NO: 10)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-09-N001);
 A-(SEQ ID NO: 10)-SVG (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-09-T03-N002);
 A-(SEQ ID NO: 11)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-10-N001);
 A-(SEQ ID NO: 12)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-11-N001);
 A-(SEQ ID NO: 13)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-13-N001); и
 A-(SEQ ID NO: 14)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-14-N001).

В следующем варианте осуществления пептидный лиганд C_i -D-I-G-P-P-Y- C_{ii} -Y-R/A-D-M/P-Y-M- C_{iii} (SEQ ID NO: 21) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

C_i DIGPPYC_{ii}YRDMYMC_{iii} (SEQ ID NO: 15); и

C_i DIGPPY C_{ii} YADPYMC C_{iii} (SEQ ID NO: 16);

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

В следующем варианте осуществления пептидный лиганд C_i -D-I-G-P-P-Y- C_{ii} -Y-R/A-D-M/P-Y-M- C_{iii} (SEQ ID NO: 21) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

A-(SEQ ID NO: 15)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-16-N001); и

A-(SEQ ID NO: 16)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-01-17-N001).

В следующем варианте осуществления пептидный лиганд C_i -D-E-W-G-L-F/Y- C_{ii} -I/F-P/A-H-S/P-D- C_{iii} (SEQ ID NO: 22) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

C_i DEWGLFC C_{ii} IPHSDC C_{iii} (SEQ ID NO: 17); и

C_i DEWGLYC C_{ii} FAHPDC C_{iii} (SEQ ID NO: 18);

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

В следующем варианте осуществления пептидный лиганд C_i -D-E-W-G-L-F/Y- C_{ii} -I/F-P/A-H-S/P-D- C_{iii} (SEQ ID NO: 22) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

Ac-A-(SEQ ID NO: 17)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-02-00-N004);

и

A-(SEQ ID NO: 18)-A (обозначаемая в настоящем описании как 74-02-01-N001).

В одном варианте осуществления пептидный лиганд C_i IEPGPFC C_{ii} YADPYMC C_{iii} (SEQ ID NO: 19) содержит аминокислотную последовательность:

A-(SEQ ID NO: 19)-NRV (обозначаемая в настоящем описании как 74-19-00-T01-N002).

В одном варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА).

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают тем же значением, которое обычно подразумевают специалисты в данной области, например, в области пептидной химии, культивирования клеток и фагового дисплея, химии нуклеиновых кислот и биохимии. Используют стандартные технологии молекулярной биологии, способы генетики и биохимические способы (см. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th ed., John Wiley & Sons, Inc.), которые включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Нумерация

При указании на положения аминокислотных остатков в пептидах по изобретению остатки цистеина (C_i , C_{ii} и C_{iii}) исключены из нумерации, поскольку они являются инвариантными, и, таким образом, нумерация аминокислотных остатков в пептидах по

изобретению является такой, как указано ниже:

C_i -I-E-E-G-Q-Y- C_{ii} -Y-R-D-M-Y-M- C_{iii} (SEQ ID NO: 1).

Для целей настоящего описания принимается, что все бициклические пептиды циклизованы с помощью ТВМВ (1,3,5-трис(бромметил)бензол) или 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триметил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА) с образованием трехзамещенной структуры. Циклизация посредством ТВМВ и ТАТА происходит по C_i , C_{ii} и C_{iii} .

Молекулярный формат

N- или C-концевые удлинения к бициклической центральной последовательности добавлены с левой или с правой стороны от последовательности, отделенные дефисом. Например, N-концевая хвостовая часть β Ala-Sar₁₀-Ala обозначается следующим образом:

β Ala-Sar₁₀-A-(SEQ ID NO: X).

Инвертированные пептидные последовательности

С учетом описания в Nair *et al* (2003) J Immunol 170(3), 1362-1373, предусматривается, что пептидные последовательности, описанные в настоящем описании, также могут быть применимыми в их ретро-инвертированной форме. Например, последовательность переворачивается (т.е. N-конец становится C-концом и наоборот) и их стереохимия аналогично также переворачивается (т.е. D-аминокислоты становятся L-аминокислотами и наоборот).

Пептидные лиганды

Пептидный лиганд, как указано в настоящем описании, относится к пептиду, ковалентно связанному с молекулярным каркасом. Как правило, такие пептиды содержат две или более реакционноспособных групп (т.е. остатков цистеина), которые способны образовывать ковалентные связи с каркасом, и последовательность, которая замыкается между указанными реакционноспособными группами, называется последовательностью петли, поскольку она формирует петлю, когда пептид связан с каркасом. В данном случае, пептиды содержат по меньшей мере три остатка цистеина (обозначаемых в настоящем описании как C_i , C_{ii} и C_{iii}), и образуют по меньшей мере две петли на каркасе.

Мультимерные связывающие комплексы

Тримеры

В одном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тримерный связывающий комплекс, описанный в таблице 1 ниже:

Таблица 1: Иллюстративные тримерные связывающие комплексы по изобретению

Номер мультимерного соединения	Соответствующий мономер	Количество мономеров	Центральная шарнирная часть	Спейсерная молекула	Точка присоединения
BCY7750	BCY7741	3	В (ТСА)	S ₁ A: n=10	C-концевой

					Dap(PYA)
BCY7749	BCY7741	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	C-концевой Dap(PYA)
BCY7827	BCY7740	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	N-концевой PYA
BCY7828	BCY7740	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	N-концевой PYA
BCY7831	BCY7742	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₂
BCY7832	BCY7742	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₂
BCY7835	BCY7743	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₃
BCY7836	BCY7743	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₃
BCY7839	BCY7744	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	D-Lys(PYA) ₄
BCY7840	BCY7744	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	D-Lys(PYA) ₄
BCY7843	BCY7745	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₅
BCY7844	BCY7745	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₅
BCY7847	BCY7746	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₇
BCY7848	BCY7746	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₇
BCY7851	BCY7747	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₁₀
BCY7852	BCY7747	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₁₀
BCY7855	BCY7748	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₁₂
BCY7856	BCY7748	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₁₂
BCY8102	BCY8096	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	D-Lys(BCN) ₄
BCY8103	BCY8096	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	D-Lys(BCN) ₄
BCY8106	BCY8097	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	Lys(BCN) ₁₂
BCY8107	BCY8097	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	Lys(BCN) ₁₂
BCY8098	BCY8095	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	Lys(BCN) ₂
BCY8099	BCY8095	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	Lys(BCN) ₂
BCY8145	BCY8144	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	Lys(BCN) ₇
BCY8146	BCY8144	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	Lys(BCN) ₇
BCY8151	BCY8143	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	Lys(BCN) ₅
BCY8581	BCY8935	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	N-концевой PYA
BCY8582	BCY8935	3	B (TCA)	S ₁ A: n=23	N-концевой PYA
BCY8948	BCY8928	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	D-Lys(PYA) ₄
BCY8957	BCY7743	3	B (TCA)	S ₁ B: n=5	Lys(PYA) ₃
BCY8958	BCY7743	3	B (TCA)	S ₁ A: n=5	Lys(PYA) ₃
BCY8961	BCY7743	3	B (TCA)	S ₁ C: n ₁ =5,	Lys(PYA) ₃

				$n_2=5$	
BCY8962	BCY7743	3	B (TCA)	$S_1D: n_1=5,$ $n_2=5$	$Lys(PYA)_3$
BCY8965	BCY7743	3	B (TCA)	$S_1B: n=10$	$Lys(PYA)_3$
BCY9573	BCY7743	3	B (TCA)	$S_1C:$ $n_1=10,$ $n_2=10$	$Lys(PYA)_3$
BCY9595	BCY7743	3	B (TCA)	$S_1D:$ $n_1=10,$ $n_2=10$	$Lys(PYA)_3$
BCY9775	BCY7744	3	C (тримезиновая кислота)	$S_1A: n=10$	$D-Lys(PYA)_4$
BCY9776	BCY7744	3	C (тримезиновая кислота)	$S_1A: n=23$	$D-Lys(PYA)_4$
BCY10046	BCY7744	3	D (с(KGKGKG)) (циклический (SEQ ID NO: 57))	$S_1G: n=5$	$D-Lys(PYA)_4$
BCY10047	BCY7744	3	D (с(KGKGKG)) (циклический (SEQ ID NO: 57))	$S_1G: n=10$	$D-Lys(PYA)_4$
BCY11194	BCY7744, BCY8928	2 x BCY7744 и 1 x BCY8928	B (TCA)	$S_1A: n=10$	$D-Lys(PYA)_4$
BCY11195	BCY8925, BCY8928	2 x BCY8925 и 1 x BCY8928	B (TCA)	$S_1A: n=10$	$D-Lys(PYA)_4$

BCY11196	BCY8925, BCY7744	2 x BCY8925 и 1 x BCY7744	B (TCA)	S ₁ A: n=10	D-Lys(PYA) ₄
BCY11382	BCY7744	3	C (тримезинова я кислота)	S ₁ E: n=1	D-Lys(PYA) ₄
BCY11383	BCY7744	3	D (с(KGKGKG)) (циклический (SEQ ID NO: 57))	S ₁ F: n=1	D-Lys(PYA) ₄
BCY11450	BCY11072	3	B (TCA)	S ₁ A: n=10	L-Lys(PYA) ₄

В настоящем описании приведены данные, которые демонстрируют, что определенные тримерные связывающие комплексы, приведенные в таблице 1, продемонстрировали улучшение EC₅₀ относительно лиганда CD137 (см. таблицу 4A).

В следующем варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит тример, содержащий три бициклических пептида, каждый из которых представляет собой BCY7741, как определено в настоящем описании, который связан через С-концевую часть DAP(PYA) со спейсерной молекулой (S₁A), где n означает 23 и где (S₁A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (B), как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY7749. Данные предоставлены в настоящем описании на фиг.2, на которой показаны высокие уровни антагонизма CD137 по сравнению с соответствующим мономером (BCY7741), который не продемонстрировал агонизма. Данные также предоставлены на фиг.6, на которой показана стабильность BCY7749 в плазме мыши.

В следующем альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит тример, содержащий три бициклических пептида, каждый из которых представляет собой BCY7741, как определено в настоящем описании, который связан через С-концевую часть DAP(PYA) со спейсерной молекулой (S₁A), где n обозначает 10 и где (S₁A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (B), как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY7750. Данные представлены на фиг.2, на которой показаны высокие уровни агонизма CD137 по сравнению с соответствующим мономером (BCY7741), который не продемонстрировал агонизма.

В следующем альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит тример, содержащий три бициклических пептида,

каждый из которых представляет собой BCY7743, как определено в настоящем описании, который связан через часть Lys(PYA)₃ со спейсерной молекулой (S₁A), где n обозначает 10 и где (S₁A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (B), как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY7835. Данные представлены на фиг.5B, на которой продемонстрировано, что мультимерный бициклический конъюгат BCY7835 сохранял свойство быстрого системного выведения, характерного для мономерных бициклических пептидов и конъюгатов бициклический пептид-лекарственное средство (BDC). Данные также представлены на фиг.6, на которой показана стабильность BCY7835 в плазме мыши. Данные также представлены на фиг.7, где можно видеть, что BCY7835 индуцирует диапазон противоопухолевой активности по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137, для которого ранее было показано, что оно индуцирует зависимость от CD137 противоопухолевую активность.

В следующем альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит тример, содержащий три бициклических пептида, каждый из которых представляет собой BCY7744, как определено в настоящем описании, который связан через часть D-Lys(PYA)₄ со спейсерной молекулой (S₁A), где n обозначает 10 и где (S₁A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (B), как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY7839. Данные представлены на фиг.12, на которой продемонстрирована выраженная гибель опухолевых клеток в ответ на обработку BCY7839 в образце одного пациента с меланомой, но не другого (фиг.12A), и без значимых отличий между способами лечения в отношении количеств лимфоцитов (фиг.12B). Данные также представлены в настоящем описании на фиг.13, на которой продемонстрировано, что BCY7839 сохраняет активность клеток после вымывания, что указывает на молекулу, обладающую высокой авидностью к тримерному рецепторному комплексу CD137. Данные также представлены на фиг.14, на которой продемонстрировано, что Т-клетки секретируют провоспалительные цитокины в ответ на BCY7839. Данные также представлены на фиг.15, на которой продемонстрировано, что BCY7839 активирует CD137 на поверхности репортерных клеток Jurkat.

В одном варианте осуществления, который может быть упомянут, мультимерный связывающий комплекс представляет собой тример, выбранный из BCY7749, BCY7750, BCY7835 и BCY7839, такой как BCY7839.

Тетрамеры

В одном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тетрамерный связывающий комплекс, описанный в приведенной ниже таблице 2:

Таблица 2: Иллюстративные тетрамерные связывающие комплексы по изобретению

Номер мультиме	Соответствующий	Количество	Центральная шарнирная	Спейсерная молекула	Точка присоединения
----------------	-----------------	------------	-----------------------	---------------------	---------------------

рного соединени я	мономер	мономе ров	часть		я
BCY7751	BCY7741	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	C-концевой Dap(PYA)
BCY7752	BCY7741	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	C-концевой Dap(PYA)
BCY7829	BCY7740	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	N-концевой PYA
BCY7830	BCY7740	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	N-концевой PYA
BCY7833	BCY7742	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₂
BCY7834	BCY7742	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₂
BCY7837	BCY7743	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₃
BCY7838	BCY7743	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₃
BCY7841	BCY7744	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	D-Lys(PYA) ₄
BCY7842	BCY7744	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	D-Lys(PYA) ₄
BCY7845	BCY7745	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₅
BCY7846	BCY7745	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₅
BCY7849	BCY7746	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₇
BCY7850	BCY7746	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₇
BCY7853	BCY7747	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₁₀
BCY7854	BCY7747	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₁₀
BCY7857	BCY7748	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₁₂
BCY7858	BCY7748	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₁₂
BCY8104	BCY8096	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	D-Lys(BCN) ₄
BCY8105	BCY8096	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	D-Lys(BCN) ₄
BCY8108	BCY8097	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	Lys(BCN) ₁₂
BCY8109	BCY8097	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	Lys(BCN) ₁₂
BCY8100	BCY8095	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	Lys(BCN) ₂
BCY8101	BCY8095	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	Lys(BCN) ₂
BCY8147	BCY8144	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	Lys(BCN) ₇
BCY8148	BCY8144	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	Lys(BCN) ₇
BCY8149	BCY8141	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	N-концевой

					BCN
BCY8150	BCY8142	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	Lys(BCN) ₃
BCY8583	BCY8935	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	N-концевой PYA
BCY8584	BCY8935	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	N-концевой PYA
BCY8937	BCY8926	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₃
BCY8945	BCY8927	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	Lys(PYA) ₃
BCY8946	BCY8927	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₃
BCY8947	BCY8928	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	D-Lys(PYA) ₄
BCY8959	BCY7743	4	A (TET)	S ₁ B: n=5	Lys(PYA) ₃
BCY8960	BCY7743	4	A (TET)	S ₁ A: n=5	Lys(PYA) ₃
BCY8963	BCY7743	4	A (TET)	S ₁ C: n ₁ =5, n ₂ =5	Lys(PYA) ₃
BCY8964	BCY7743	4	A (TET)	S ₁ D: n ₁ =5, n ₂ =5	Lys(PYA) ₃
BCY8966	BCY7743	4	A (TET)	S ₁ B: n=10	Lys(PYA) ₃
BCY9113	BCY8926	4	A (TET)	S ₁ A: n=10	Lys(PYA) ₃
BCY9767	BCY7743	4	A (TET)	S ₁ H: n ₁ =10, n ₂ =10	Lys(PYA) ₃
BCY10388	BCY8928	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	D-Lys(PYA) ₄
BCY11451	BCY11506	4	A (TET)	S ₁ A: n=23	L-Lys(PYA) ₄

В настоящем описании приведены данные, которые демонстрируют, что определенные тетрамерные связывающие комплексы, приведенные в таблице 2, продемонстрировали улучшение EC₅₀ относительно лиганда CD137 (см. таблицу 4A).

В следующем варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тетрамер, содержащий четыре бициклических пептида, каждый из которых представляет собой BCY7741, как определено в настоящем описании, который связан через C-концевую DAP(PYA) часть со спейсерной молекулой (S₁A), где n обозначает 10 и где (S₁A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (A), как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY7751. Данные представлены на фиг.2, на которой показаны высокие уровни агонизма CD137 по сравнению с соответствующим мономером (BCY7741), который продемонстрировал отсутствие агонизма.

В следующем альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тетрамер, содержащий четыре бициклических пептида,

каждый из которых представляет собой BCY7741, как определено в настоящем описании, который связан через C-концевую часть DAP(PYA) со спейсерной молекулой (S_1A), где n обозначает 23 и где (S_1A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (A), как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY7752. Данные представлены на фиг.2, на которой показаны высокие уровни агонизма CD137 по сравнению с соответствующим мономером (BCY7741), который не продемонстрировал агонизма.

В следующем альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тетрамер, содержащий четыре бициклических пептида, каждый из которых представляет собой BCY7745, как определено в настоящем описании, который связан через аминокислотный остаток лизин 5 со спейсерной молекулой (S_1A), где n обозначает 10 и где (S_1A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (A), как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY7845. Данные представлены на фиг.3, на которой показаны высокие уровни агонизма CD137 по сравнению с соответствующим мономером (BCY7741), который продемонстрировал отсутствие агонизма. Данные также представлены на фиг.6, на которой показана стабильность BCY7845 в плазме мыши.

В следующем альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тетрамер, содержащий четыре бициклических пептида, каждый из которых представляет собой BCY7745, как определено в настоящем описании, который связан через аминокислотный остаток лизин 5 со спейсерной молекулой (S_1A), где n обозначает 23 и где (S_1A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (A), как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY7846. Данные представлены на фиг.3, на которой показаны высокие уровни агонизма CD137 по сравнению с соответствующим мономером (BCY7741), который продемонстрировал отсутствие агонизма.

В следующем альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тетрамер, содержащий четыре бициклических пептида, каждый из которых представляет собой BCY7740, как определено в настоящем описании, который связан через N-концевую часть PYA со спейсерной молекулой (S_1A), где n обозначает 10 и где (S_1A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (A), как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY7829. Данные представлены на фиг.1, на которой показаны высокие уровни агонизма CD137. Данные также представлены на фиг.4, на которой показана стабильность BCY7829 в плазме человека, яванского макака, крысы и мыши. Данные также представлены на фиг.5A, на которой продемонстрировано, что мультимерный бициклический конъюгат BCY7829 сохранял свойство быстрого системного выведения, характерное для мономерных бициклических

пептидов и конъюгатов бициклический пептид-лекарственное средство (BDC). Данные также представлены на фиг.6, на которой показана стабильность BCY7829 в плазме мыши. Данные также представлены на фиг.7, где можно видеть, что BCY7829 индуцирует диапазон противоопухолевой активности по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137, для которого ранее было показано, что оно индуцирует зависимую от CD137 противоопухолевую активность.

В следующем альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тетрамер, содержащий четыре бициклических пептида, каждый из которых представляет собой BCY7743, как определено в настоящем описании, который связан через часть $\text{Lys}(\text{PYA})_3$ со спейсерной молекулой (S_1A), где n обозначает 23 и где (S_1A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (A), как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY7838. Данные представлены на фиг.5B, на которой продемонстрировано, что мультимерный бициклический конъюгат BCY7838 сохранял свойство быстрого системного выведения, характерное для мономерных бициклических пептидов и конъюгатов бициклический пептид-лекарственное средство (BDC). Данные также представлены на фиг.6, на которой показана стабильность BCY7838 в плазме мыши. Данные также представлены на фиг.7, где можно видеть, что BCY7838 индуцирует диапазон противоопухолевой активности по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137, для которого ранее было показано, что оно индуцирует зависимую от CD137 противоопухолевую активность. Данные также представлены на фиг.12, на которой показана значительная гибель опухолевых клеток в ответ на обработку BCY7838 в образце одного пациента с меланомой, но не другого (фиг.12A) и без значимых отличий количеств лимфоцитов между обработками (фиг.12B). Данные также представлены в настоящем описании на фиг.13, на которой продемонстрировано, что BCY7838 сохраняет клеточную активность после вымывания, что указывает на молекулу, которая обладает высокой авидностью в отношении тримерного рецепторного комплекса CD137. Данные также представлены на фиг.14, на которой показано, что Т-клетки секретируют провоспалительные цитокины в ответ на BCY7838.

В следующем альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тетрамер, содержащий четыре бициклических пептида, каждый из которых представляет собой BCY7744, как определено в настоящем описании, который связан через часть $\text{D-Lys}(\text{PYA})_4$ со спейсерной молекулой (S_1A), где n обозначает 23 и где (S_1A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (A), как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY7842. Данные представлены на фиг.8, где можно видеть, что BCY7842 индуцирует противоопухолевую активность в моделях на сингенных мышях. Данные также представлены на фиг.9 и 10, где можно видеть, что BCY7842 индуцирует повышение процента Т-клеток и CD8+ Т-клеток, соответственно, в опухолевой ткани по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137. Данные

также представлены на фиг.11, где можно видеть, что BCY7842 индуцирует снижение процента Т-клеток в опухолевой ткани по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137, для которого ранее было показано, что оно индуцирует зависимую от CD137 противоопухолевую активность. Данные также представлены на фиг.12, на которой продемонстрирована выраженная гибель опухолевых клеток в ответ на обработку BCY7842 в образце одного пациента с меланомой, но не другого (фиг.12А) и без значимых отличий между обработками в отношении количеств лимфоцитов (фиг.12В). Данные также представлены на фиг.13, на которой продемонстрировано, что BCY7842 сохраняет активность клеток после вымывания, что указывает на молекулу, обладающую высокой авидностью в отношении тримерного рецепторного комплекса CD137. Данные также представлены на фиг.14, на которой показано, что Т-клетки секретируют провоспалительные цитокины в ответ на BCY7842. Данные также представлены на фиг.15, на которой показано, что BCY7842 активирует CD137 на поверхности репортерных клеток Jurkat.

В следующем альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тетрамер, содержащий четыре бициклических пептида, каждый из которых представляет собой BCY8927, как определено в настоящем описании, который связан через часть $\text{Lys}(\text{PYA})_3$ со спейсерной молекулой (S_1A), где n обозначает 23 и где (S_1A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (A), как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY8945. Данные представлены на фиг.8, где можно видеть, что BCY8945 индуцирует противоопухолевую активность в моделях на сингенных мышах. Данные также представлены на фиг.9 и 10, где можно видеть, что BCY8945 индуцирует повышение процента Т-клеток и CD8+ Т-клеток, соответственно, в опухолевой ткани по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137. Данные также представлены на фиг.11, где можно видеть, что BCY8945 индуцирует снижение процента Т-клеток в опухолевой ткани по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137, для которого ранее было показано, что оно индуцирует зависимую от CD137 противоопухолевую активность. Данные также представлены на фиг.13, на которой показано, что BCY8945 сохраняет активность клеток после вымывания, что указывает на молекулу, обладающую высокой авидностью в отношении тримерного рецепторного комплекса CD137. Данные также представлены на фиг.14, на которой также показано, что Т-клетки секретируют провоспалительные цитокины в ответ на BCY8945. Данные также представлены на фиг.15, на которой показано, что BCY8945 активирует CD137 на поверхности репортерных клеток Jurkat.

В следующем альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тетрамер, содержащий четыре бициклических пептида, каждый из которых представляет собой BCY8928, как определено в настоящем описании, который связан через часть $\text{D-Lys}(\text{PYA})_4$ со спейсерной молекулой (S_1A), где n обозначает 10 и где (S_1A) связан с центральной шарнирной частью, которая представляет собой (A),

как определено в настоящем описании. Этот мультимерный связывающий комплекс обозначают в настоящем описании как BCY8947. Данные представлены на фиг.8, где можно видеть, что BCY8947 индуцирует противоопухолевую активность в моделях на сингенных мышах. Данные также представлены на фиг.9 и 10, где можно видеть, что BCY8947 индуцирует повышение процента Т-клеток и CD8+ Т-клеток, соответственно, в опухолевой ткани по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137. Данные также представлены на фиг.11, где можно видеть, что BCY8947 индуцирует снижение процента Т-клеток в опухолевой ткани по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137, для которого ранее было показано, что оно индуцирует зависимую от CD137 противоопухолевую активность. Данные также представлены на фиг.13, на которой показано, что BCY8947 сохраняет активность клеток после вымывания, что указывает на молекулу, обладающую высокой авидностью в отношении тримерного рецепторного комплекса CD137. Данные также представлены на фиг.14, на которой показано, что Т-клетки секретируют провоспалительные цитокины в ответ на BCY8947. Данные также представлены на фиг.15, на которой показано, что BCY8947 активирует CD137 на поверхности репортерных клеток Jurkat.

В одном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс представляет собой тетрамер, выбранный из BCY7751, BCY7752, BCY7845, BCY7846, BCY7829, BCY7838, BCY7842, BCY8945 и BCY8947. В одном варианте осуществления, который может быть упомянут, мультимерный связывающий комплекс представляет собой тетрамер, выбранный из BCY7751, BCY7752, BCY7845, BCY7846, BCY7829, BCY7838 и BCY7842.

В следующем варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс представляет собой тетрамер, выбранный из BCY7842, BCY8945 и BCY8947.

Фармацевтически приемлемые соли

Будет понятно, что солевые формы входят в объем изобретения и указание на пептидные лиганды включает солевые формы указанных лигандов.

Соли по настоящему изобретению можно синтезировать из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную часть, общепринятыми химическими способами, такими как способы, описанные в *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002. Как правило, такие соли можно получать путем реакции форм свободной кислоты или основания этих соединения с соответствующим основанием или кислотой в воде или органическом растворителе, или в их смеси.

Кислотно-аддитивные соли (моно- или дисоли) могут быть образованы с широким диапазоном кислот, как неорганических, так и органических. Примеры кислотно-аддитивных солей включают моно- или дисоли, образованные с кислотой, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацетамидобензойной, бутановой, (+) камфорной, камфор-сульфоновой, (+)-

(1S)-камфор-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламовой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, fumarовой, галактаровой, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α -оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, галогенводородной (например, бромистоводородной, хлористоводородной, йодистоводородной), изотионовой, молочной (например, (+)-L-молочной, (\pm)-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, (\pm)-DL-миндальной, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, щавелевой, пальмитиновой, памовой, фосфорной, пропионовой, пировиноградной, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-аминосалициловой, себациновой, стеариновой, янтарной, серной, дигалловой, (+)-L-виннокаменной, тиоциановой, п-толуолсульфоновой, ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированных аминокислот и катионообменных смол.

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

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

Когда пептиды по изобретению содержат функциональную аминогруппу, они могут образовывать четвертичные соли аммония, например, путем реакции с алкилирующим агентом в соответствии со способами, известными специалисту в данной области. Такие четвертичные соединения аммония входят в объем пептидов по

изобретению.

Модифицированные производные

Будет понятно, что модифицированные производные пептидных лигандов, как определено в настоящем описании, входят в объем настоящего изобретения. Примеры таких подходящих модифицированных производных включают одну или несколько модификаций, выбранных из: N-концевых и/или C-концевых модификаций; замены одного или нескольких аминокислотных остатков одним или несколькими неприродными аминокислотными остатками (такой как замена одного или нескольких полярных аминокислотных остатков одной или несколькими изостерическими или изоэлектронными аминокислотами; замена одного или нескольких неполярных аминокислотных остатков другими неприродными изостерическими или изоэлектронными аминокислотами); присоединения спейсерной группы; замены одного или нескольких подверженных окислению аминокислотных остатков одним или несколькими устойчивыми к окислению аминокислотными остатками; замены одного или нескольких аминокислотных остатков аланином, замены одного или нескольких остатков L-аминокислот одним или несколькими остатками D-аминокислот; N-алкилирования одной или нескольких амидных связей в бициклическом пептидном лиганде; замены одной или нескольких пептидных связей суррогатной связью; модификации длины пептидного остова; замены водорода на альфа-углероде одного или нескольких аминокислотных остатков другой химической группой, модификации аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат/аспартат и тирозин, подходящим амином, тиолом, карбоновой кислотой и реагирующими с фенолом реагентами для функционализации указанных аминокислот, и внесения или замены на аминокислоты, которые вносят ортогональные реакционно-способные группы, которые пригодны для функционализации, например, содержащие азидные или алкиновые группы аминокислоты, которые позволяют функционализацию посредством содержащих алкин или азид частей, соответственно.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает N-концевую и/или C-концевую модификацию. В следующем варианте осуществления, где модифицированное производное включает N-концевую модификацию с использованием подходящей реагирующей с амино химической группы, и/или C-концевую модификацию с использованием подходящей реагирующей с карбокси химической группы. В следующем варианте осуществления указанная N-концевая или C-концевая модификация включает присоединение эффекторной группы, включая, но не ограничиваясь ими, цитотоксическое средство, радиохелатор или хромофор.

В следующем варианте осуществления модифицированное производное содержит N-концевую модификацию. В следующем варианте осуществления N-концевая модификация включает N-концевую ацетильную группу. В этом варианте осуществления N-концевая группа цистеина (группа, обозначаемая в настоящем описании как C_i) кэппируется уксусным ангидридом или другими подходящими реагентами в ходе

пептидного синтеза, что приводит к молекуле, которая является ацетилированной на N-конце. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциальной точки распознавания для аминопептидаз и устраняет возможность деградации бициклического пептида.

В альтернативном варианте осуществления N-концевая модификация включает присоединение молекулярной спейсерной группы, которая облегчает конъюгацию эффекторных групп и сохранение эффективности бициклического пептида в отношении его мишени.

В следующем варианте осуществления модифицированное производное содержит C-концевую модификацию. В следующем варианте осуществления C-концевая модификация включает амидную группу. В этом варианте осуществления C-концевую группу цистеина (группа, обозначаемая в настоящем описании как C_{iii}) синтезируют в качестве амида в ходе пептидного синтеза, что приводит к молекуле с C-концевым амидированием. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциальной точки распознавания карбоксипептидазой и снижает потенциал к протеолитической деградации бициклического пептида.

В одном варианте осуществления модифицированное производное содержит замену одного или нескольких аминокислотных остатков на один или несколько неприродных аминокислотных остатков. В этом варианте осуществления можно выбирать неприродные аминокислоты, имеющие изостерические/изоэлектронные боковые цепи, которые ни распознаются деградирующими протеазами, ни имеют какого-либо неблагоприятного эффекта в отношении целевой эффективности.

Альтернативно можно использовать неприродные аминокислоты, имеющие ограниченные боковые цепи аминокислот, так что происходит конформационное и пространственное препятствование протеолитическому гидролизу ближайшей пептидной связи. В частности, это касается аналогов пролина, объемных боковых цепей, C α -двухзамещенных производных (например, аминокислоты, Aib), и циклоаминокислот, причем простым производным является аминоклопропилкарбоновая кислота.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает присоединение спейсерной группы. В следующем варианте осуществления модифицированное производное включает присоединение спейсерной группы к N-концевому цистеину (C_i) и/или C-концевому цистеину (C_{iii}).

В одном варианте осуществления модифицированное производное содержит замену одного или нескольких подверженных окислению аминокислотных остатков на один или несколько устойчивых к окислению аминокислотных остатков. В следующем варианте осуществления модифицированное производное содержит замену остатка триптофана на остаток нафтлаланина или аланина. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество улучшения профиля фармацевтической стабильности полученного бициклического пептидного лиганда.

В одном варианте осуществления модифицированное производное содержит замену одного или нескольких заряженных аминокислотных остатков на один или несколько гидрофобных аминокислотных остатков. В альтернативном варианте осуществления модифицированное производное содержит замену одного или нескольких гидрофобных аминокислотных остатков на один или несколько заряженных аминокислотных остатков. Правильный баланс между заряженными и гидрофобными остатками является важной характеристикой бициклических пептидных лигандов. Например, гидрофобные аминокислотные остатки влияют на степень связывания белками плазмы, и, таким образом, на концентрацию свободной доступной фракции в плазме, в то время как заряженные аминокислотные остатки (в частности, аргинин) могут влиять на взаимодействие пептида с фосфолипидными мембранами на поверхностях клеток. Комбинация этих двух типов может влиять на время полужизни, объем распределения и экспозицию пептидного лекарственного средства, и может быть модифицирована в зависимости от клинического конечного результата. Кроме того, правильное комбинирование и количество заряженных против гидрофобных аминокислотных остатков может снижать раздражение в области инъекции (если пептидное лекарственное средство вводят подкожно).

В одном варианте осуществления модифицированное производное содержит замену одного или нескольких остатков L-аминокислот на один или несколько остатков D-аминокислот. Полагают, что этот вариант осуществления увеличит протеолитическую стабильность посредством пространственного препятствования и вследствие склонности D-аминокислот к стабилизации конформаций β -изгибов (Tugyi *et al* (2005) PNAS, 102(2), 413-418).

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает удаление каких-либо аминокислотных остатков и замену на аланин. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество устранения потенциального участка(ов) протеолитической атаки.

Следует отметить, что каждая из вышеупомянутых модификаций служит для намеренного повышения эффективности или стабильности пептида. Дальнейшее повышение эффективности на основе модификаций может быть достигнуто посредством следующих механизмов:

- Включение гидрофобных частей, которые имеют гидрофобный эффект и обеспечивают более низкие константы скорости диссоциации, так чтобы достигалась более высокая аффинность;
- Включение заряженных групп, которые осуществляют ионные взаимодействия дальнего действия, что приводит к более быстрым константам скорости ассоциации и к более высокой аффинности (см., например, Schreiber *et al*, *Rapid, electrostatically assisted association of proteins* (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31); и
- Включение дополнительного ограничения в пептид, например, посредством надлежащего ограничения боковых цепей аминокислот, так что снижение энтропии

является минимальным при связывании мишени, ограничения торсионных углов основной цепи, так что снижение энтропии является минимальным при связывании мишени, и внесения дополнительных циклизаций в молекулу по идентичным причинам.

(для обзора см. Gentilucci *et al*, *Curr. Pharmaceutical Design*, (2010), 16, 3185-203, и Nestor *et al*, *Curr. Medicinal Chem* (2009), 16, 4399-418).

Изотопные варианты

Настоящее изобретение относится ко всем фармацевтически приемлемым (радио)изотопно меченым пептидным лигандам по изобретению, где один или несколько атомов заменены атомами, имеющими то же атомное число, но атомную массу или массовое число, отличные от атомной массы или массового числа, встречающихся в природе, и к пептидным лигандам по изобретению, к которым присоединены металл-хелатирующие группы (называемые "эффекторными"), которые способны удерживать соответствующие (радио)изотопы, и к пептидным лигандам по изобретению, где определенные функциональные группы ковалентно заменены соответствующими (радио)изотопами или изотопно мечеными функциональными группами.

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

Определенные изотопно меченные пептидные лиганды по изобретению, например, пептидные лиганды, включающие радиоактивный изотоп, являются пригодными в исследованиях распределения лекарственных средств и/или субстратов в тканях и для клинической оценки наличия и/или отсутствия мишени CD137 на пораженных заболеванием тканях. Пептидные лиганды по изобретению, кроме того, могут иметь ценные диагностические свойства, поскольку их можно использовать для детекции или идентификации образования комплекса между меченым соединением и другими молекулами, пептидами, белками, ферментами или рецепторами. В способах детекции или идентификации могут использоваться соединения, которые мечены агентами для мечения, такими как радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества (например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин и люцифераза) и т.д. Особенно пригодными для этой цели являются радиоактивные изотопы тритий, т.е. ^3H (T), и углерода-14, т.е. ^{14}C , ввиду их простоты включения и доступных средств детекции.

Замена на более тяжелые изотопы, такие как дейтерий, т.е. ^2H (D), может обеспечить определенные терапевтические преимущества в результате большей метаболической стабильности, например, увеличенного времени полужизни *in vivo* или снижения требуемых дозировок, и, таким образом, она может быть предпочтительной в некоторых обстоятельствах.

Замена на позитронно-активные изотопы, такие как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , может быть полезной в исследованиях с использованием позитронно-эмиссионной томографии (PET) для изучения занятости мишени.

Изотопно меченные соединения пептидных лигандов по изобретению, главным образом, можно получать общепринятыми способами, известными специалистам в данной области, или посредством процессов, аналогичных процессам, описанным в прилагаемых примерах, с использованием подходящего изотопно меченного реагента вместо немеченого реагента, используемого ранее.

Молекулярный каркас

Молекулярные каркасы описаны, например, в WO 2009/098450 и ссылках, цитированных в ней, в частности, в WO 2004/077062 и WO 2006/078161.

Как отмечалось в вышеуказанных документах, молекулярный каркас может представлять собой низкомолекулярное соединение, такое как низкомолекулярное органическое соединение.

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

В одном варианте осуществления молекулярный каркас содержит реакционноспособные группы, которые способны реагировать с функциональной группой(ами) полипептида, образуя ковалентные связи.

Молекулярный каркас может содержать химические группы, которые образуют связь с пептидом, такие как амины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, нитрилы, карбоновые кислоты, сложные эфиры, алкены, алкины, азиды, ангидриды, сукцинимиды, малеинимиды, алкилгалогениды и ацилгалогениды.

В одном варианте осуществления молекулярный каркас может содержать или может состоять из гексагидро-1,3,5-триазина, особенно 1,3,5-триакрилоилгексагидро-1,3,5-триазина ("ТАТА"), или его производного.

В одном варианте осуществления молекулярный каркас представляет собой 2,4,6-трис(бромметил)мезитилен. Эта молекула является сходной с 1,3,5-трис(бромметил)бензолом (ТВМВ), но содержит три дополнительных метильных группы, связанных с бензольным кольцом. Это имеет преимущество, состоящее в том, что дополнительные метильные группы могут образовывать дополнительные контакты с полипептидом и, таким образом, добавляют дополнительное структурное ограничение.

Молекулярный каркас по изобретению содержит химические группы, которые позволяют функциональным группам полипептида кодируемой библиотеки по изобретению образовывать ковалентные связи с молекулярным каркасом. Указанные химические группы выбирают из широкого диапазона функциональных групп, включая амины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, нитрилы, карбоновые кислоты, сложные эфиры, алкены, алкины, ангидриды, сукцинимиды, малеинимиды, азиды, алкилгалогениды и ацилгалогениды.

Реакционноспособные группы каркаса, которые можно использовать на молекулярном каркасе для реакции с тиольными группами остатков цистеина, представляют собой алкилгалогениды (или также называемые галогеноалканами или галоалканами).

Примеры включают бромметилбензол или йодацетамид. Другие реакционноспособные группы каркаса, которые используют для селективного присоединения соединений к остаткам цистеина белков, представляют собой малеинимиды, $\alpha\beta$ -ненасыщенные карбонилсодержащие соединения и α -галометилкарбонилсодержащие соединения. Примеры малеинимидов, которые можно использовать в качестве молекулярных каркасов в рамках изобретения, включают: трис-(2-малеимидоэтил)амин, трис-(2-малеимидоэтил)бензол, трис-(малеимидо)бензол. Примером $\alpha\beta$ -ненасыщенного карбонилсодержащего соединения является 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) (Angewandte Chemie, International Edition (2014), 53(6), 1602-1606). Примером α -галометилкарбонилсодержащего соединения является N,N',N''-(бензол-1,3,5-триил)трис(2-бромацетамид). Селеноцистеин также является природной аминокислотой, которая обладает сходной реакционной способностью с цистеином и может быть использована для тех же реакций. Таким образом, когда упоминается цистеин, как правило, является приемлемой замена на селеноцистеин, если контекст не указывает на иное.

Эффекторные и функциональные группы

В соответствии со следующим аспектом изобретения предусматривается конъюгат лекарственного средства, содержащий пептидный лиганд, как определено в настоящем описании, конъюгированный с одной или несколькими эффекторными и/или функциональными группами.

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

Подходящие эффекторные группы включают антитела и их части или фрагменты. Например, эффекторная группа может включать константную область легкой цепи (CL) антитела, домен СН1 тяжелой цепи антитела, домен СН2 тяжелой цепи антитела, домен СН3 тяжелой цепи антитела или любую их комбинацию, в дополнение к одному или нескольким доменам константной области. Эффекторная группа также может содержать шарнирную область антитела (такую как область, обычно находящаяся между доменами СН1 и СН2 молекулы IgG).

В следующем варианте осуществления этого аспекта изобретения эффекторная группа в соответствии с настоящим изобретением представляет собой Fc-область молекулы IgG. Преимущественно, конструкция пептидный лиганд-эффекторная группа в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из слитой конструкции пептидный лиганд-Fc, имеющей время полужизни $t_{1/2}$, составляющее сутки или более, двое суток или более, 3 суток или более, 4 суток или более, 5 суток или более, 6 суток или

более или 7 суток или более. Наиболее преимущественно, пептидный лиганд в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из слитой конструкции пептидный лиганд-Fc, имеющей время полужизни, составляющее сутки или более.

Функциональные группы включают, главным образом, связывающие группы, лекарственные средства, реакционноспособные группы для присоединения других структур, функциональные группы, которые способствуют захвату макроциклических пептидов в клетки и т.п.

Способность пептидов проникать в клетки позволит пептидам против внутриклеточных мишеней быть эффективными. Мишени, доступные для пептидов, обладающих способностью проникать в клетки, включают факторы транскрипции, внутриклеточные сигнальные молекулы, такие как тирозинкиназы, и молекулы, вовлеченные в апоптотический путь. Функциональные группы, которые позволяют проникновение в клетки, включают пептиды или химические группы, которые могут быть присоединены либо к пептиду, либо к молекулярному каркасу. Пептиды, такие как пептиды, происходящие из VP22, Tat ВИЧ, белка гомеобокса *Drosophila* (*Antennapedia*), описаны, например, в Chen and Harrison, *Biochemical Society Transactions* (2007) Volume 35, part 4, p821; Gupta *et al.* in *Advanced Drug Discovery Reviews* (2004) Volume 57 9637. Примеры коротких пептидов, для которых показано, что они являются эффективными в отношении переноса через плазматические мембраны, включают пептид пенетратин из 16 аминокислот из белка *Drosophila Antennapedia* (Derossi *et al* (1994) *J Biol. Chem.* Volume 269 p10444), "модельный амфипатический пептид" из 18 аминокислот (Oehlke *et al* (1998) *Biochim Biophys Acts* Volume 1414 p127) и аргинин-богатые области белка TAT ВИЧ. Непептидные подходы включают применение низкомолекулярных миметиков или SMOC, которые могут быть без труда присоединены к биомолекулам (Okuyama *et al* (2007) *Nature Methods* Volume 4 p153). Другие химические стратегии для присоединения групп гуанидиния к молекулам также повышают проникновение в клетки (Elson-Scwab *et al* (2007) *J Biol Chem* Volume 282 p13585). Низкомолекулярные соединения, такие как стероиды, можно добавлять к молекулярному каркасу для повышения поглощения клетками.

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

В одном варианте осуществления структура пептидный лиганд-эффекторная группа по изобретению имеет время полужизни t_{β} , выбранное из группы, состоящей из: 12 часов или более, 24 часов или более, 2 суток или более, 3 суток или более, 4 суток или более, 5 суток или более, 6 суток или более, 7 суток или более, 8 суток или более, 9 суток или более, 10 суток или более, 11 суток или более, 12 суток или более, 13 суток или более, 14 суток или более, 15 суток или более или 20 суток или более. Преимущественно

структура пептидный лиганд-эффекторная группа или композиция по изобретению имеет время полужизни $t_{1/2}$ в диапазоне от 12 до 60 часов. В следующем варианте осуществления она имеет время полужизни $t_{1/2}$, составляющее сутки или более. В следующем варианте осуществления оно находится в диапазоне от 12 до 26 часов.

В одном конкретном варианте осуществления изобретения функциональная группа выбрана из хелатора металлов, который пригоден для образования комплекса с радиоизотопами металлов, имеющими медицинское значение.

Возможные эффекторные группы также включают ферменты, например, такие как карбоксипептидаза G2, для применения в терапии фермент/пролекарство, где пептидный лиганд заменяет антитела в ADEPT.

В одном варианте осуществления мультимерные связывающие комплексы по изобретению содержат расщепляемую связь, такую как дисульфидная связь или чувствительная к протеазам связь. Без связи с теорией полагают, что такая расщепляемая часть дезактивирует комплекс до тех пор, пока он не достигнет микроокружения опухоли. Преимущество этого варианта осуществления состоит в возможности уменьшения размера комплекса после связывания с мишенью. В следующем варианте осуществления группы, соседние с дисульфидной связью, модифицируют для контроля пространственного препятствования для дисульфидной связи, и посредством этого скорости расщепления и сопутствующего высвобождения связывающего агента.

В опубликованной работе показана возможность модификации чувствительности дисульфидной связи к восстановлению путем внесения пространственного препятствования с любой стороны дисульфидной связи (Kellogg *et al* (2011) *Bioconjugate Chemistry*, 22, 717). Более высокая степень пространственного препятствования снижает скорость восстановления посредством внутриклеточного глутатиона, а также внеклеточных (системных) восстановителей, вследствие чего происходит уменьшение простоты, с которой токсины высвобождается, как внутри, так и снаружи клетки. Таким образом, выбор оптимальной стабильности дисульфида в кровотоке (которая минимизирует нежелательные побочные эффекты токсина) против эффективного высвобождения во внутриклеточной среде (которое максимизирует терапевтический эффект) может быть достигнут путем тщательного выбора степени препятствования с каждой из сторон от дисульфидной связи.

Препятствование с каждой стороны дисульфидной связи модулируется посредством внесения одной или нескольких метильных групп в нацеливающую структуру (в данном случае, бициклический пептид).

Синтез

Пептиды по настоящему изобретению можно изготавливать синтетическим путем стандартными способами с последующей реакцией с молекулярным каркасом *in vitro*. Когда это осуществляют, можно использовать стандартную химию. Это позволяет быстрое крупномасштабное получение растворимого материала для дальнейших экспериментов или подтверждения. Такие способы можно проводить с использованием

общепринятой химии, такой как химия, описанная в Timmerman *et al* (*выше*).

Таким образом, изобретение также относится к производству полипептидов или конъюгатов, отобранных, как описано в настоящем описании, где производство включает необязательные дополнительные стадии, как объяснено ниже. В одном варианте осуществления эти стадии проводят для конечного полипептида/конъюгата, полученного посредством химического синтеза.

Необязательно аминокислотные остатки в представляющем интерес полипептиде можно замещать при получении конъюгата или комплекса.

Пептиды также можно удлинять, например, путем включения, например, другой петли и, таким образом, внесения множественной специфичности.

Для удлинения пептида его можно просто удлинять химически на его N-конце или C-конце или в петлях с использованием ортогонально выступающих остатков лизина (и аналогов) с помощью стандартной твердофазной химии или химии в фазе раствора. Стандартные способы (био)конъюгации можно использовать для обеспечения активированного или активируемого N- или C-конца. Альтернативно вставки можно вносить путем конденсации фрагментов или нативного химического лигирования, например, как описано в (Dawson *et al.* 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science* 266:776-779), или посредством ферментов, например с использованием субтилигазы, как описано в (Chang *et al* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 20; 91(26):12544-8 или в Hikari *et al* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003).

Альтернативно пептиды можно удлинять или модифицировать путем дальнейшей конъюгации через дисульфидные связи. Это имеет дополнительное преимущество, состоящее в позволении первому и второму пептидам диссоциировать друг от друга после того, как они оказываются в восстанавливающей среде в клетке. В этом случае, молекулярный каркас (например, ТАТА) можно присоединять в ходе химического синтеза первого пептида, чтобы он реагировал с тремя группами цистеина; затем можно присоединять дополнительный цистеин или тиол к N- или C-концу первого пептида, так чтобы этот цистеин или тиол реагировал только со свободным цистеином или тиолом второго пептида, образуя связанный дисульфидной связью конъюгат бициклический пептид-пептид.

Сходные способы в равной степени применимы для синтеза/присоединения двух бициклических и биспецифических макроциклов, потенциально создавая тетраспецифическую молекулу.

Более того, присоединения других функциональных групп или эффекторных групп можно проводить аналогичным образом с использованием соответствующей химии, осуществляя присоединение на N- или C-конце или посредством боковых цепей. В одном варианте осуществления присоединение проводят так, что не происходит блокирования активности любой из структур.

Фармацевтические композиции

В соответствии со следующим аспектом изобретения предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая мультимерный связывающий комплекс или конъюгат лекарственного средства, как определено в настоящем описании, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Главным образом, пептидные лиганды по настоящему изобретению могут использоваться в очищенной форме вместе с фармакологически приемлемыми эксципиентами или носителями. Как правило, эти эксципиенты или носители включают водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевой раствор и/или забуференные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, раствор декстрозы Рингера, раствор декстрозы и хлорид натрия и лактатный раствор Рингера. Подходящие физиологически-приемлемые адъюванты, если необходимо поддерживать полипептидный комплекс в суспензии, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Внутривенные носители включают жидкости и средства для восполнения питательных веществ и восполнения электролитов, такие как средства на основе раствора декстрозы Рингера. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition).

Пептидные лиганды по настоящему изобретению можно использовать в качестве вводимых по отдельности композиций или совместно с другими средствами. Они могут включать антитела, фрагменты антител и различные иммунотерапевтические лекарственные средства, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин, и иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать "коктейли" различных цитотоксических или других средств совместно с белковыми лигандами по настоящему изобретению, или даже комбинациями выбранных полипептидов в соответствии с настоящим изобретением, обладающими различной специфичностью, такими как полипептиды, отобранные с использованием различных лигандов-мишеней, и их могут объединять или не объединять перед введением.

Путь введения фармацевтических композиций по изобретению может представлять собой любой из путей, широко известных средним специалистам в данной области. Для терапии пептидные лиганды по изобретению можно вводить любому пациенту в соответствии со стандартными способами. Введение можно проводить посредством любого подходящего пути, в том числе парентерально, внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно, трансдермально, легочным путем или также в соответствующих случаях путем прямой инфузии с использованием катетера. Предпочтительно, фармацевтические композиции согласно изобретению можно вводить посредством ингаляции. Дозировка и частота введения зависят от возраста, пола и состояния пациента, сопутствующего введения других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые должен учитывать клиницист.

Пептидные лиганды по настоящему изобретению можно лиофилизировать для хранения и восстанавливать в подходящем носителе перед применением. Показано, что этот способ является эффективным, и можно использовать известные в данной области способы лиофилизации и восстановления. Специалистам в данной области будет понятно, что лиофилизация и восстановление могут приводить к различной степени потери активности, и что для компенсации этого уровни могут быть увеличены.

Композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их коктейль, можно вводить для профилактического и/или терапевтического лечения. В определенных терапевтических применениях достаточное количество для достижения по меньшей мере частичного ингибирования, подавления, модулирования, уничтожения или некоторого другого поддающегося определению параметра популяции выбранных клеток определяют как "терапевтически-эффективная доза". Количества, требуемые для достижения этой дозировки, зависят от тяжести заболевания и общего состояния собственной иммунной системы пациента, но, как правило, они находятся в диапазоне от 0,005 до 5,0 мг выбранного пептидного лиганда на килограмм массы тела, причем более часто используют дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/доза. Для профилактических применений композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их коктейли, также можно вводить в сходных или несколько более низких дозировках.

Композицию, содержащую пептидный лиганд в соответствии с настоящим изобретением, можно использовать в профилактических и терапевтических условиях для способствования изменению, инактивации, уничтожению или удалению выбранной популяции клеток-мишеней у млекопитающего. Кроме того, пептидные лиганды, описанные в настоящем описании, можно использовать экстракорпорально или *in vitro* для селективного уничтожения, истощения или иного эффективного удаления популяции клеток-мишеней из гетерогенной совокупности клеток. Кровь от млекопитающего можно комбинировать экстракорпорально с выбранными пептидными лигандами, и при этом нежелательные клетки убивают или иным образом извлекают из крови для возвращения млекопитающему в соответствии со стандартными способами.

Терапевтические применения

Бициклические пептиды по изобретению обладают конкретной применимостью в качестве связывающих CD137 средств.

CD137 является представителем семейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF). Его альтернативными наименованиями являются представитель 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF9), 4-1BB и белок, индуцируемый посредством активации лимфоцитов (ILA). CD137 может экспрессироваться активированными Т-клетками, но в большей степени на CD8+, чем на CD4+ Т-клетках. Кроме того, экспрессия CD137 встречается на дендритных клетках, фолликулярных дендритных клетках, натуральных киллерах, гранулоцитах и клетках стенок кровеносных сосудов в областях воспаления. Одним из охарактеризованных видов активности CD137 является костимулирующая активность для активированных Т-клеток. Связывание CD137

усиливает пролиферацию Т-клеток, секрецию ИЛ-2, выживаемость и цитолитическую активность. Кроме того, оно может усиливать иммунную активность в отношении устранения опухолей у мышей.

CD137 представляет собой костимулирующий рецептор Т-клеток, индуцируемый при активации TCR (Nam *et al.*, *Curr. Cancer Drug Targets*, 5:357-363 (2005); Waits *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 23:23-68 (2005)). В дополнение к его экспрессии на активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, CD137 также экспрессируется на CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клетках, натуральных киллерах (NK) и NK-Т-клетках, моноцитах, нейтрофилах и дендритных клетках. Его природный лиганд, CD137L, описан для антигенпредставляющих клеток, включающих В-клетки, моноциты/макрофаги и дендритные клетки (Watts *et al.* *Annu. Rev. Immunol.*, 23:23-68 (2005)). При взаимодействии с лигандом CD137 приводит к увеличению индуцированной TCR пролиферации Т-клеток, продукции цитокинов, функциональному созреванию и более длительному выживанию CD8⁺ Т-клеток (Nam *et al.*, *Curr. Cancer Drug Targets*, 5:357-363 (2005), Watts *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 23:23-68 (2005)).

Передача сигнала через CD137 либо посредством CD137L, либо посредством моноклональных антител-агонистов (mAb) против CD137 приводит к повышению индуцированной TCR пролиферации Т-клеток, продуцированию цитокинов и функциональному созреванию, и более длительной выживаемости CD8⁺ Т-клеток. Эти эффекты являются результатом: (1) активации каскадов передачи сигнала NF-κB, NH₂-концевой киназы c-Jun/стресс-активируемой протеинкиназы (JNK/SAPK), и митоген-активируемой протеинкиназы p38 (MAPK), и (2) контролю экспрессии антиапоптотических и связанных с клеточным циклом генов.

Эксперименты, проведенные на мышах с дефицитом как CD137, так и CD137L, кроме того, продемонстрировали важность костимуляции CD137 для достижения полностью компетентного Т-клеточного ответа.

Активированные посредством ИЛ-2 и ИЛ-15 NK-клетки экспрессируют CD137 и связывание CD137 посредством mAb-агонистов стимулирует пролиферацию NK-клеток и секрецию IFN-γ, но не их цитолитическую активность.

Более того, CD137-стимулированные NK-клетки стимулируют экспансию активированных Т-клеток *in vitro*.

В соответствии с их костимулирующей функцией, было показано, что mAb-агонисты CD137 способствуют отторжению аллотрансплантатов сердца и кожи, устраняют развернутые опухоли, расширяют первичные противовирусные ответы CD8⁺ Т-клеток и повышают цитолитический потенциал Т-клеток. Эти исследования служат в поддержку точки зрения, что передача сигнала CD137 стимулирует функцию Т-клеток, что может повышать иммунитет против опухолей и инфекции.

Полипептидные лиганды, выбранные в соответствии со способом по настоящему изобретению, можно использовать в терапевтических и профилактических применениях *in vivo*, диагностических применениях *in vitro* и *in vivo*, применениях для анализов и

реагентов *in vitro*, и т.п. Лиганды, имеющие определенные уровни специфичности, являются пригодными в применениях, которые вовлекают тестирование на не являющихся человеком животных, где является желательной перекрестная реактивность, или в диагностических применениях, где перекрестную реактивность в отношении гомологов или паралогов необходимо тщательно контролировать. В некоторых применениях, таких как применения в вакцинах, способность индуцировать иммунный ответ на заданные диапазоны антигенов можно использовать для адаптации вакцины к определенным заболеваниям и патогенам.

По существу чистые пептидные лиганды с гомогенностью по меньшей мере 90-95% являются предпочтительными для введения млекопитающему, и наиболее предпочтительной для фармацевтических применений является гомогенность 98-99% или более, особенно когда млекопитающим является человек. После очистки частично или до гомогенности при желании выбранные полипептиды можно использовать в диагностических или терапевтических целях (в том числе экстракорпорально) или для разработки и проведения процедур анализа, иммунофлуоресцентного окрашивания и т.п. (Lefkovite and Pernis, (1979 and 1981) *Immunological Methods*, Volumes I and II, Academic Press, NY).

В соответствии со следующим аспектом изобретения предусматривается мультимерный связывающий комплекс или конъюгат лекарственного средства, как определено в настоящем описании, для применения для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого CD137.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предусматривается способ предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого CD137, который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгата эффекторной группы и лекарственного средства мультимерного связывающего комплекса, как определено в настоящем описании.

В одном варианте осуществления CD137 представляет собой CD137 млекопитающего. В следующем варианте осуществления CD137 млекопитающего представляет собой CD137 человека (hCD137).

В одном варианте осуществления заболевание или нарушение, опосредуемое CD137, выбрано из злокачественной опухоли, инфекции и воспаления. В следующем варианте осуществления нарушение или заболевание, опосредуемое CD137, выбрано из злокачественной опухоли.

Примеры злокачественных опухолей (и их доброкачественных аналогов), которые можно лечить (или ингибировать), включают, но не ограничиваются ими, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциномы, плоскоклеточные карциномы, переходно-клеточные карциномы и другие карциномы), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевыводящих путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (включая пищевод, желудок (гастральная), тонкий кишечник, толстый кишечник, прямую кишку и анус), печени

(печеночно-клеточная карцинома), желчного пузыря и желчевыводящей системы, экзокринные карциномы поджелудочной железы, почки, легкого (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легкого, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), головы и шеи (например, злокачественные опухоли языка, ротовой полости, гортани, глотки, носоглотки, миндалевидных желез, слюнных желез, носовой полости и околоносовых пазух), яичника, фаллопиевых труб, брюшины, вагины, вульвы, полового члена, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярная карцинома щитовидной железы), надпочечников, предстательной железы, кожи и смежных органов (например, меланома, базально-клеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, кератоакантома, диспластический невус); гематологические злокачественные опухоли (т.е. лейкозы, лимфомы) и предзлокачественные гематологические нарушения и нарушения пограничной злокачественности, включая гематологические злокачественные опухоли и родственные состояния лимфоидного происхождения (например, острый лимфоцитарный лейкоз [ALL], хронический лимфоцитарный лейкоз [CLL], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лимфома из клеток мантийной зоны, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы из натуральных киллеров [NK], лимфома Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, моноклональная гаммапатия неуточненного значения, плазмацитома, множественная миелома и посттрансплантационные лимфопролиферативные нарушения), и гематологические злокачественные опухоли и родственные состояния миелоидного ростка (например, острый миелогенный лейкоз [AML], хронический миелогенный лейкоз [CML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелолиферативные нарушения, такие как истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелолиферативный синдром, миелодиспластический синдром и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимного происхождения, например, саркомы мягких тканей, костей или хрящей, такие как остеосаркомы, фибросаркомы, хондросаркомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, саркома Капоши, саркома Юинга, синовиальные саркомы, эпителиоидные саркомы, желудочно-кишечные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные гистиоцитомы, и возвышающаяся дерматофибросаркома; опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитомы, глиомы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, пиниальные опухоли и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островковых клеток, опухоли паращитовидной железы и медуллярная карцинома щитовидной железы); опухоли глаза и прилежащих тканей (например, ретинобластома); герминогенные и трофобластические опухоли (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы, хорионаденомы и хориокарциномы); и педиатрические и эмбриональные опухоли (например, медуллобластома, нейробластома, опухоль Вильмса и примитивные

нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, которые делают пациента предрасположенными к злокачественным опухолям (например, пигментная ксеродерма).

В следующем варианте осуществления злокачественная опухоль выбрана из гемопоэтической злокачественной опухоли, например, выбранной из: неходжскинской лимфомы (NHL), лимфомы Беркитта (BL), множественной миеломы (MM), хронического В-лимфоцитарного лейкоза (B-CLL), острого В- и Т-лимфоцитарного лейкоза (ALL), Т-клеточной лимфомы (TCL), острого миелоидного лейкоза (AML), волосатоклеточного лейкоза (HCL), лимфомы Ходжкина (HL) и хронического миелоидного лейкоза (CML).

Упоминание в настоящем описании термина "предупреждение" вовлекает введение защитной композиции до индукции заболевания. "Подавление" относится к введению композиции после индуцирующего события, но до клинического появления заболевания. "Лечение" вовлекает введение защитной композиции после проявления симптомов заболевания.

Модельные системы на животных, которые можно использовать для скрининга эффективности пептидных лигандов в отношении защиты от или лечения заболевания, являются доступными. Настоящее изобретение облегчает использование модельных систем на животных, что позволяет разработку полипептидных лигандов, которые могут перекрестно реагировать с мишенями из человека и животных, для обеспечения возможности применения моделей на животных.

Изобретение дополнительно описано ниже с помощью следующих примеров.

Примеры

Материалы и способы

Синтез пептидов

Синтез пептидов был основан на химии Fmoc с использованием устройства для синтеза пептидов Symphony, производимого Peptide Instruments, и устройства для синтеза Syro II от MultiSynTech. Использовали стандартные Fmoc-аминокислоты (Sigma, Merck) с подходящими защитными группами боковых цепей: когда это было применимо, в каждом случае использовали стандартные условия присоединения, за которыми следовало удаление защитных групп с использованием стандартной методологии. Пептиды очищали с использованием ВЭЖХ и после выделения их модифицировали посредством 1,3,5-триакрилоилгексагидро-1,3,5-триазина (TATA, Sigma). Для этого линейный пептид разбавляли 50:50 посредством MeCN:H₂O вплоть до ~35 мл, добавляли ~500 мкл 100 мМ TATA в ацетонитриле и реакцию начинали посредством 5 мл 1 М NH₄HCO₃ в H₂O. Реакции позволяли протекать в течение ~30-60 мин при к.т., и лиофилизировали после завершения реакции (на основе данных MALDI-MS). После завершения 1 мл к реакционной смеси добавляли 1 М моногидрат гидрохлорида L-цистеина (Sigma) в H₂O на ~60 мин при к.т. для гашения любого избытка TATA.

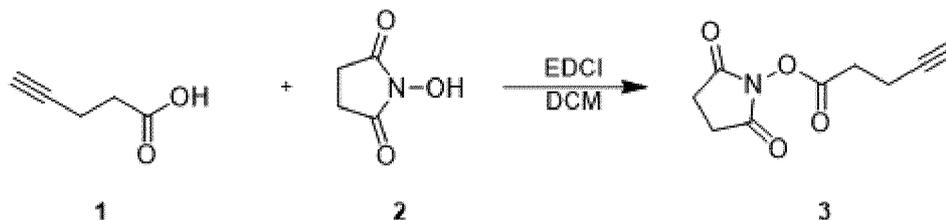
После лиофилизации модифицированный пептид очищали, как описано выше, заменяя Luna C8 на колонку Gemini C18 (Phenomenex), и заменяя кислоту на 0,1%

трифторуксусную кислоту. Очищенные фракции, содержавшие правильный ТАТА-модифицированный материал, объединяли, лиофилизировали и держали при -20°C для хранения.

Все аминокислоты, если нет иных указаний, использовали в L-конфигурациях.

Синтез мультимеров

Общая методика получения соединения 3

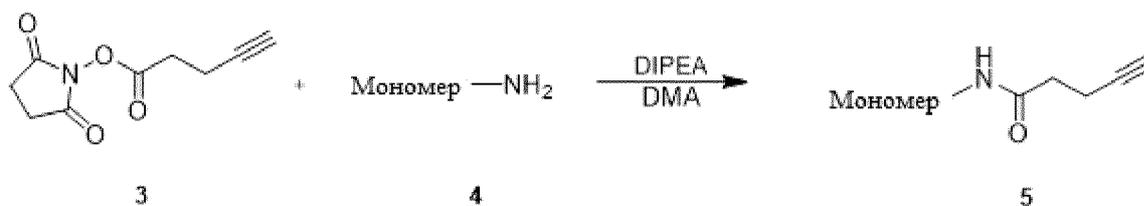


К раствору соединения **1** (500 мг, 5,10 ммоль, 1,0 экв.) в DCM (25 мл) добавляли соединение **2** (645,2 мг, 5,61 ммоль, 1,1 экв.) и EDCI (1,95 г, 10,19 ммоль, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. TLC (PE: DCM=0:1, $R_f=0,43$, реагент для развития окраски: бромкрезоловый зеленый) показала, что соединение **1** израсходовалось полностью и образовывалось одно новое пятно. Реакционная смесь была чистой согласно TLC. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , петролейный эфир/этилацетат=от 2/1 до 1:1) с получением соединения **3** (620 мг, 3,18 ммоль, выход 62,33%) в виде белого твердого вещества.

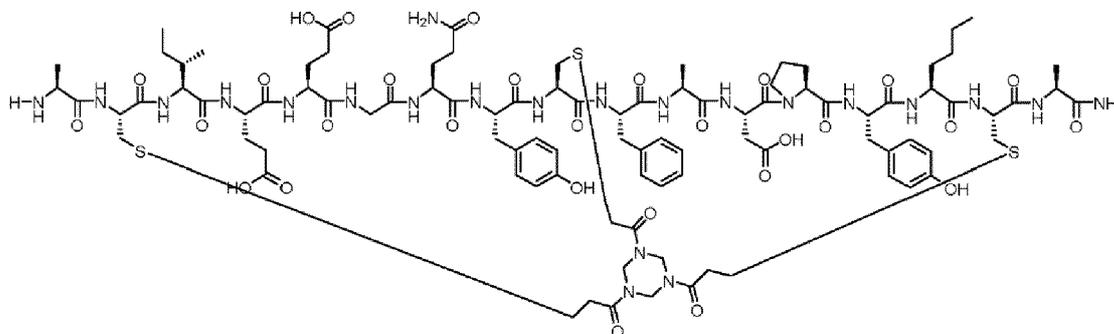
$^1\text{H-NMR}$: 400 МГц CDCl_3

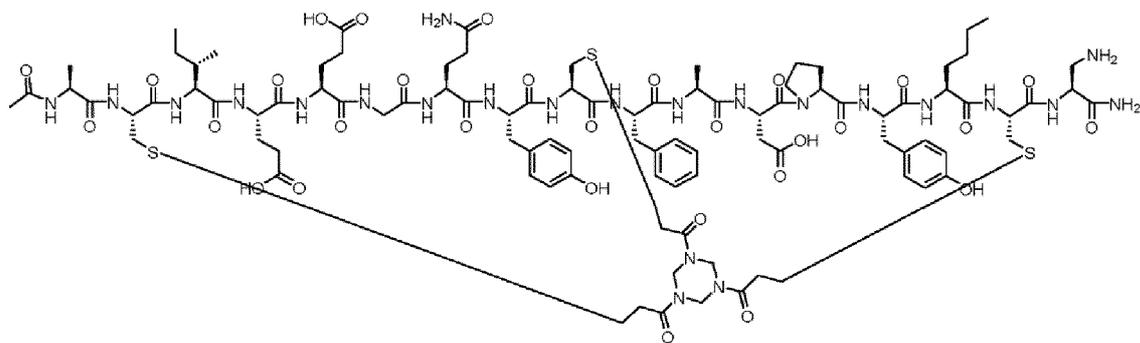
δ 2,80~2,95 (м, 6H), 2,55~2,70 (м, 2H), 2,05~2,10 (т, 1H)

Общая методика получения соединения 5

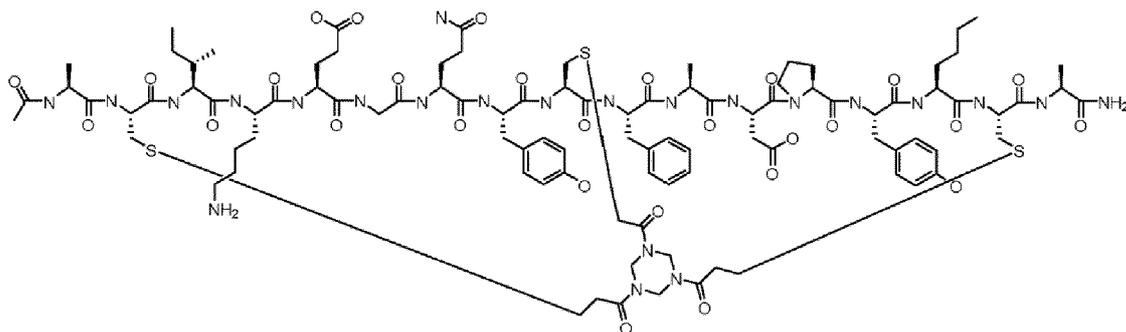


Мономер- NH_2 :

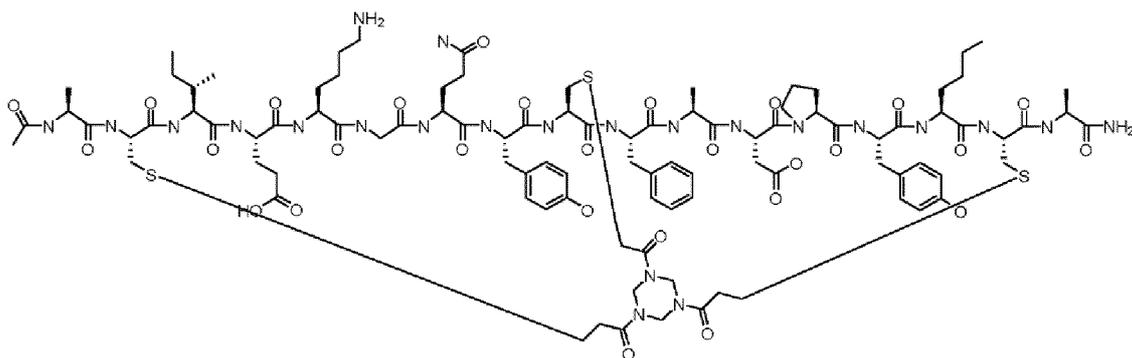




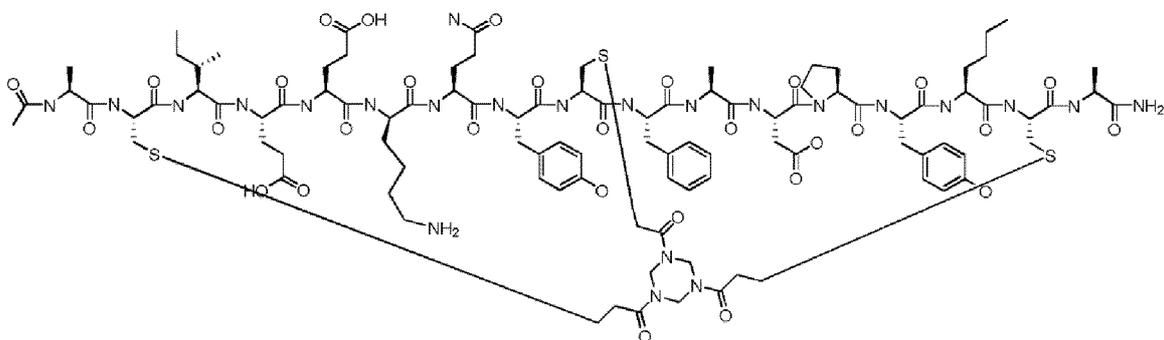
Мономер 2



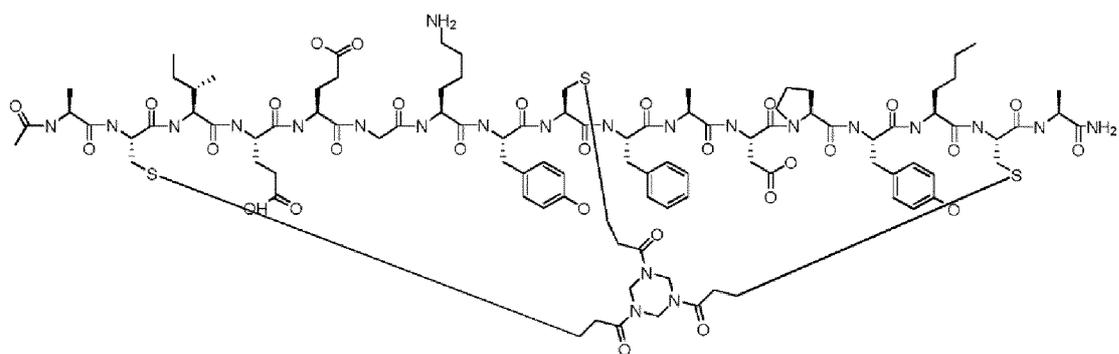
Мономер 3



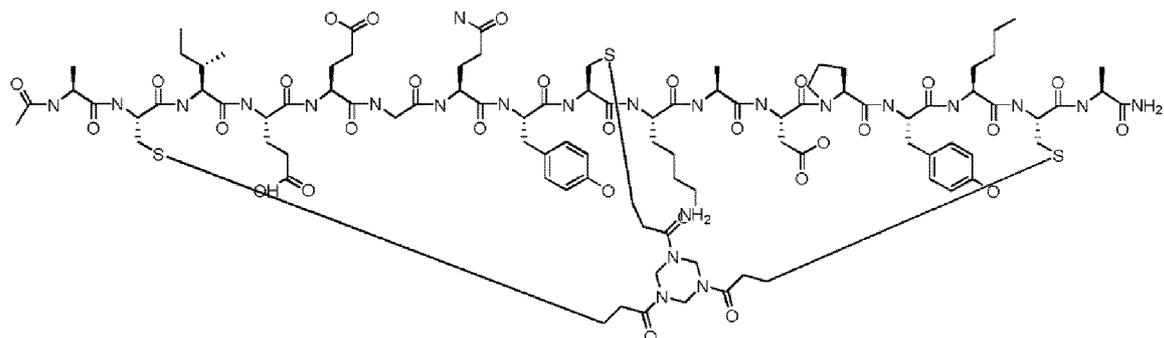
Мономер 4



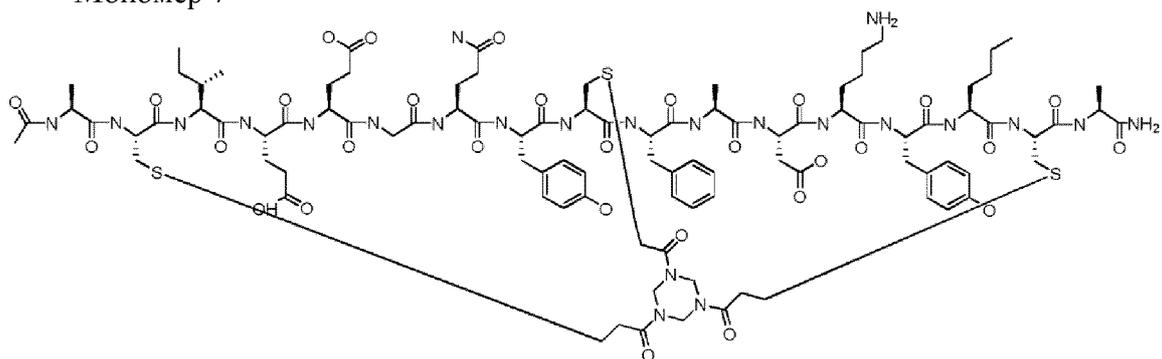
Мономер 5



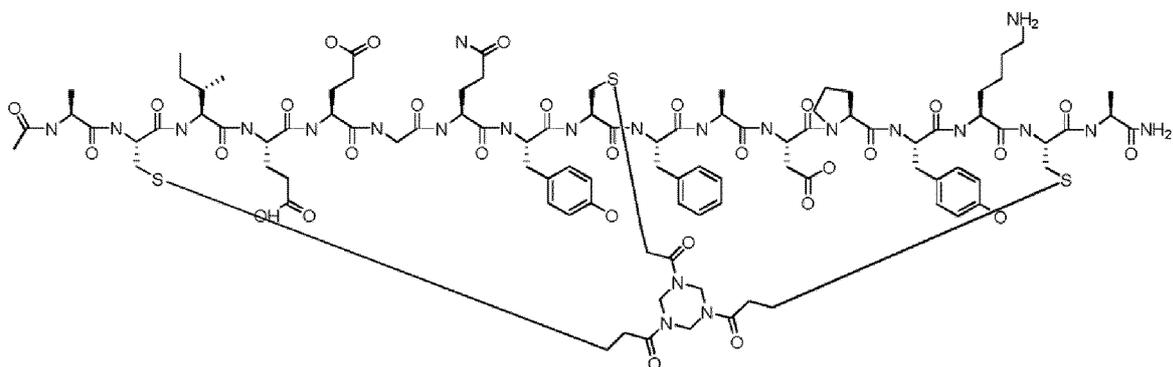
Мономер 6



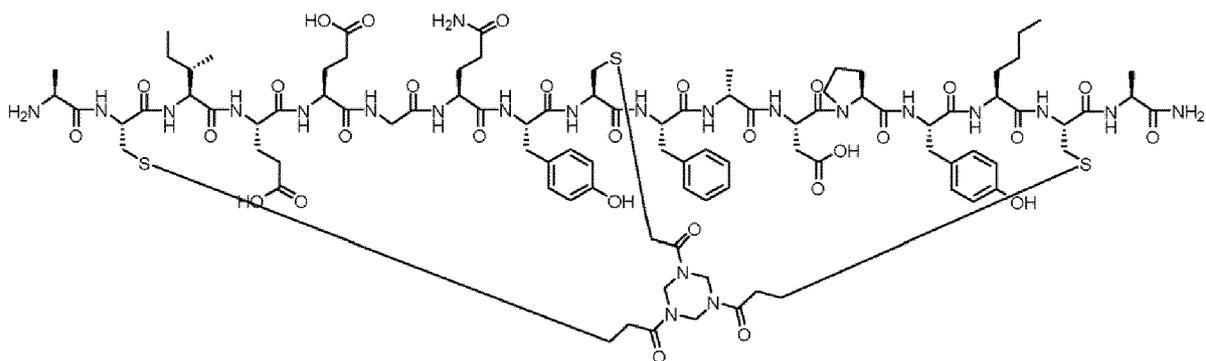
Мономер 7



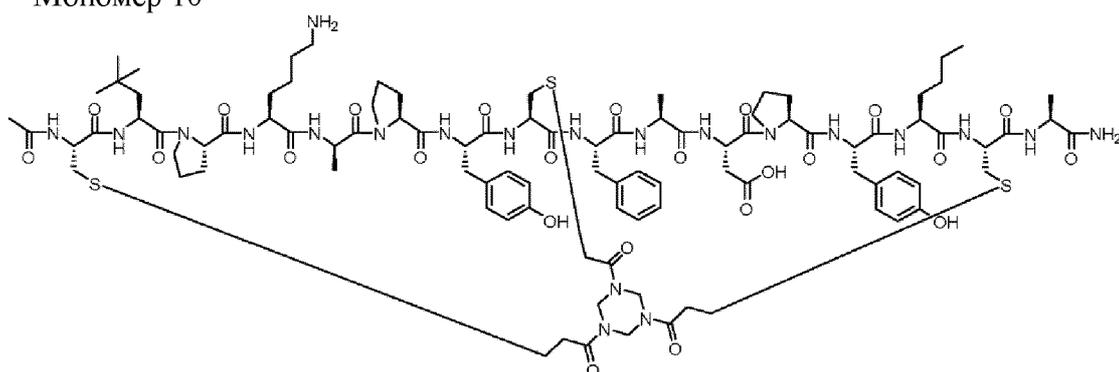
Мономер 8



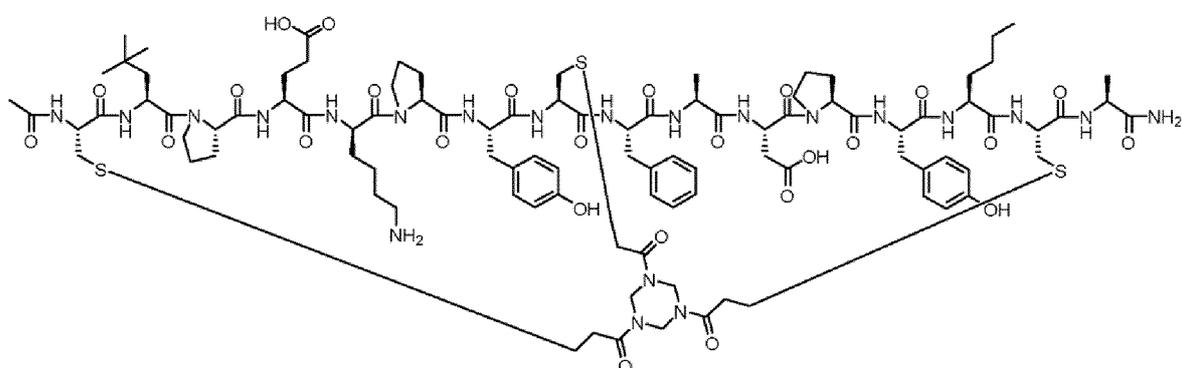
Мономер 9



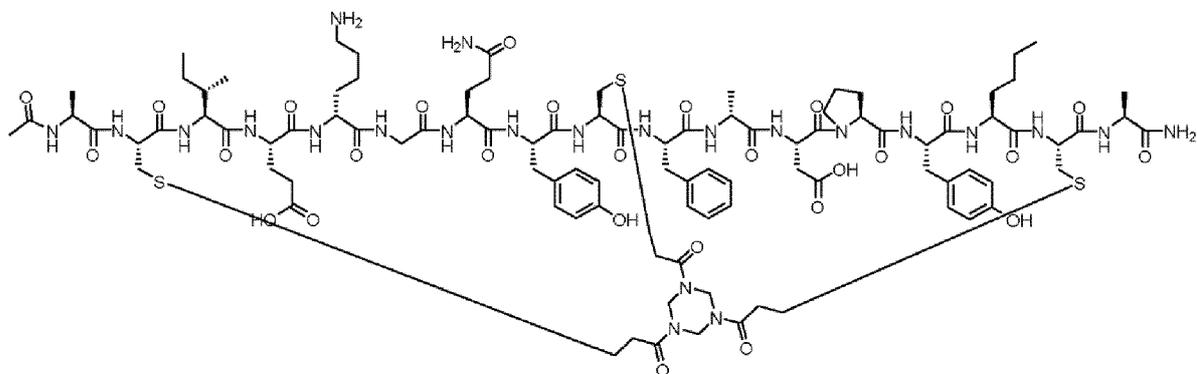
Мономер 10



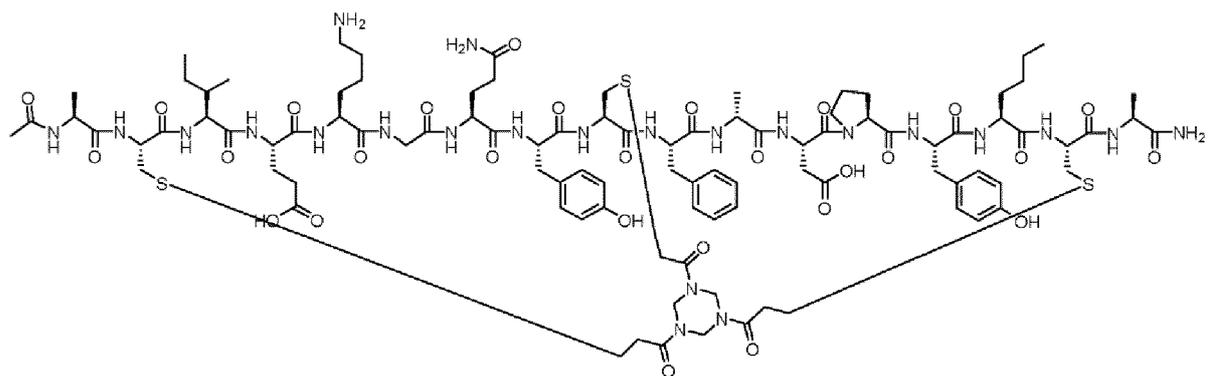
Мономер 11



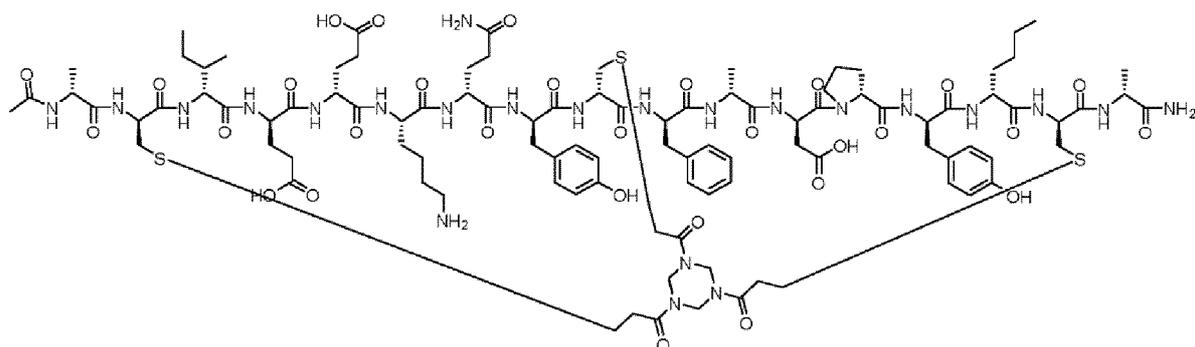
Мономер 12



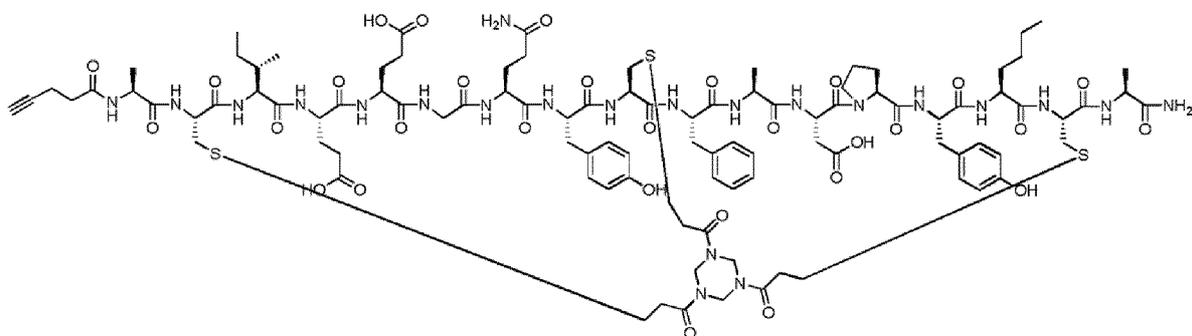
Мономер 13



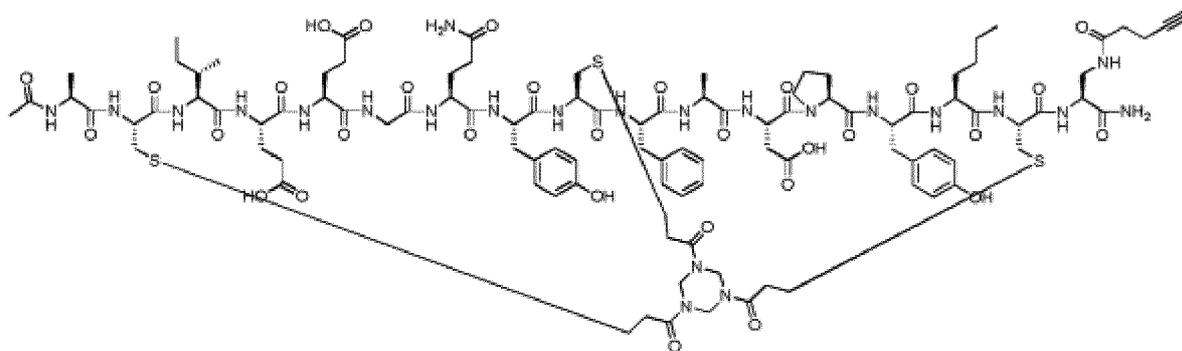
Мономер 14



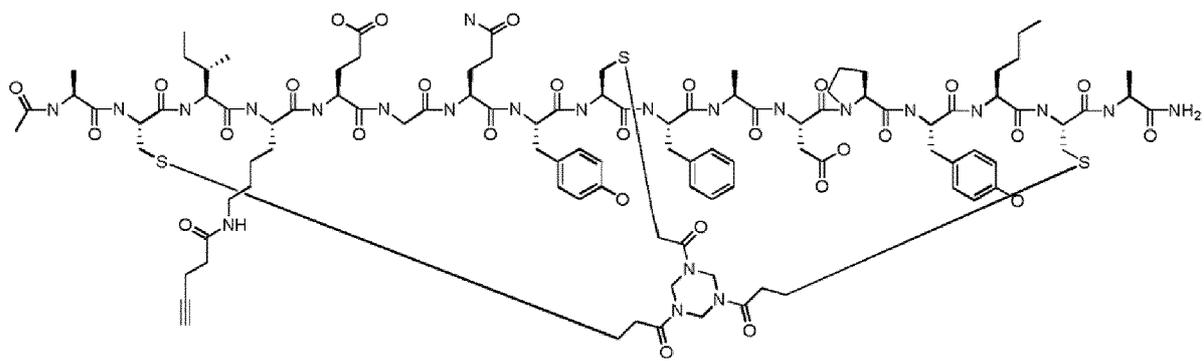
Мономер 15

Соединение 5:

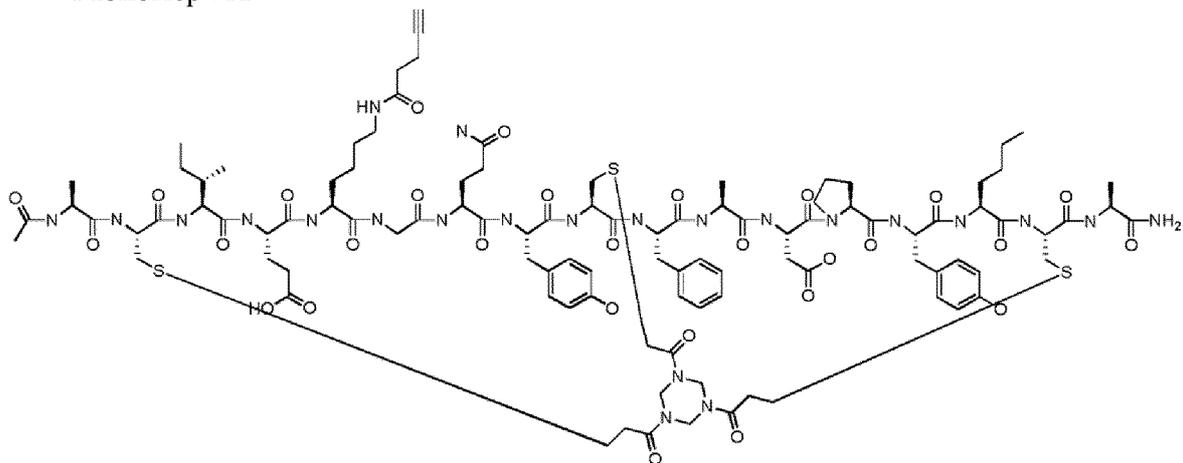
Мономер 1A



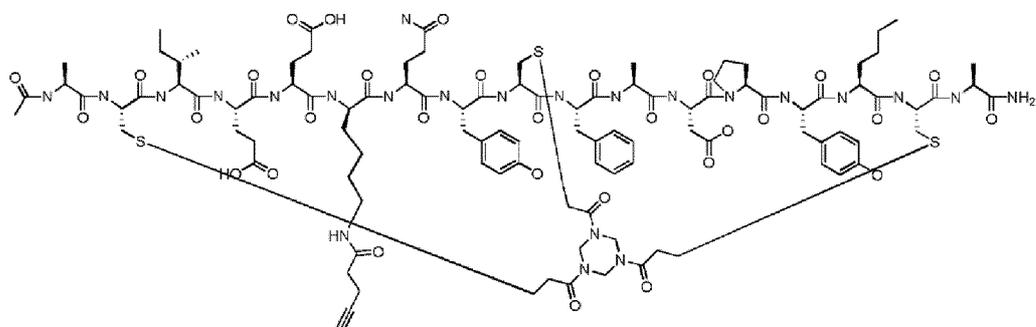
Мономер 2A



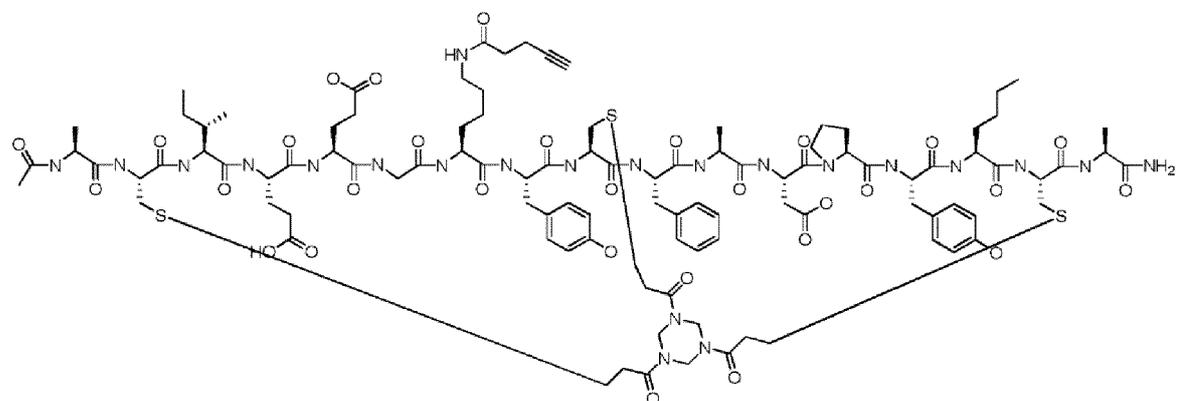
Мономер 3A



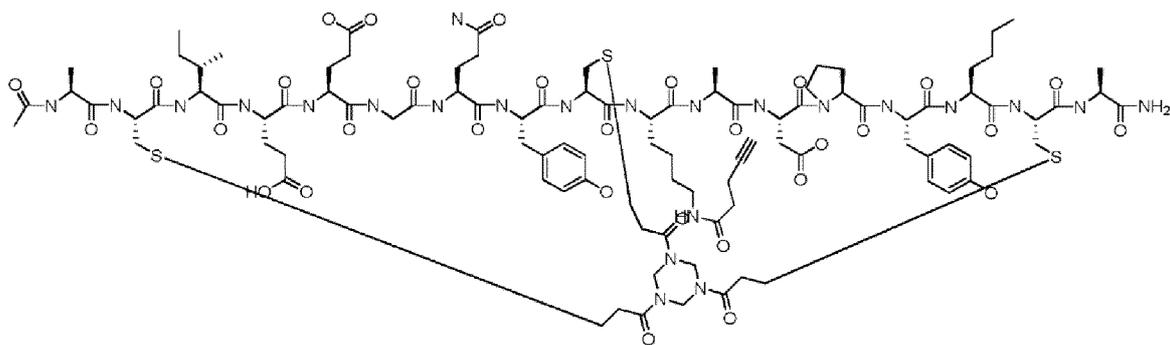
Мономер 4A



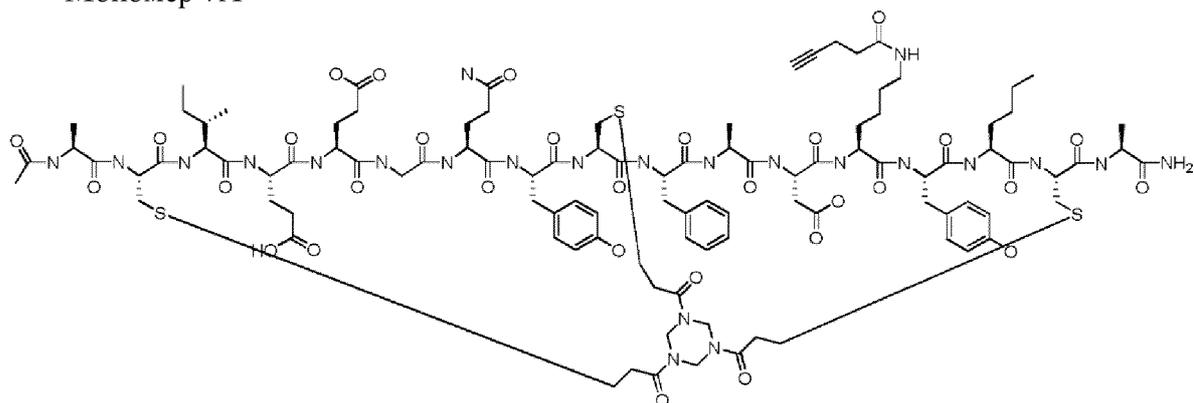
Мономер 5A



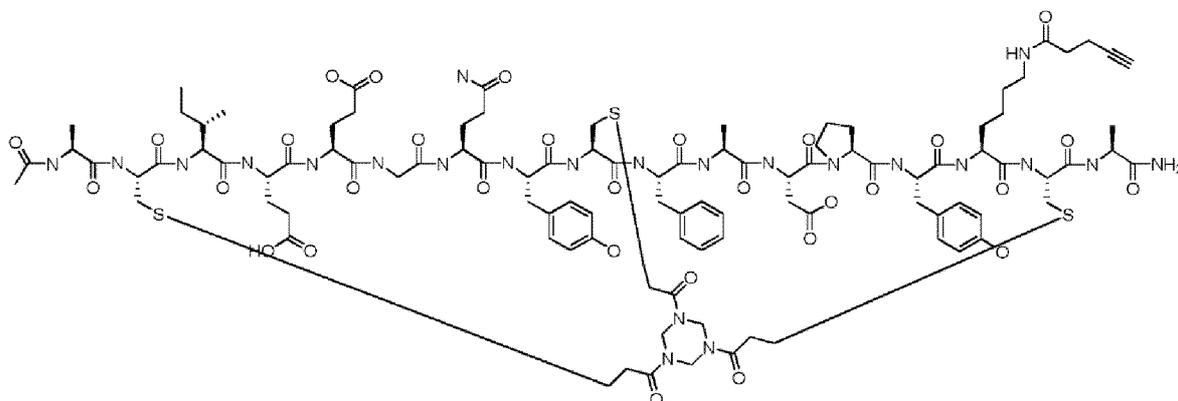
Мономер 6A



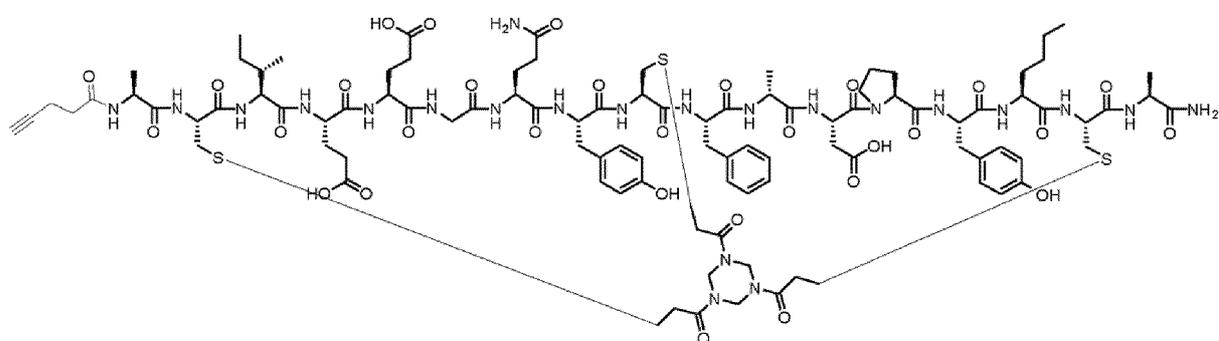
Мономер 7A



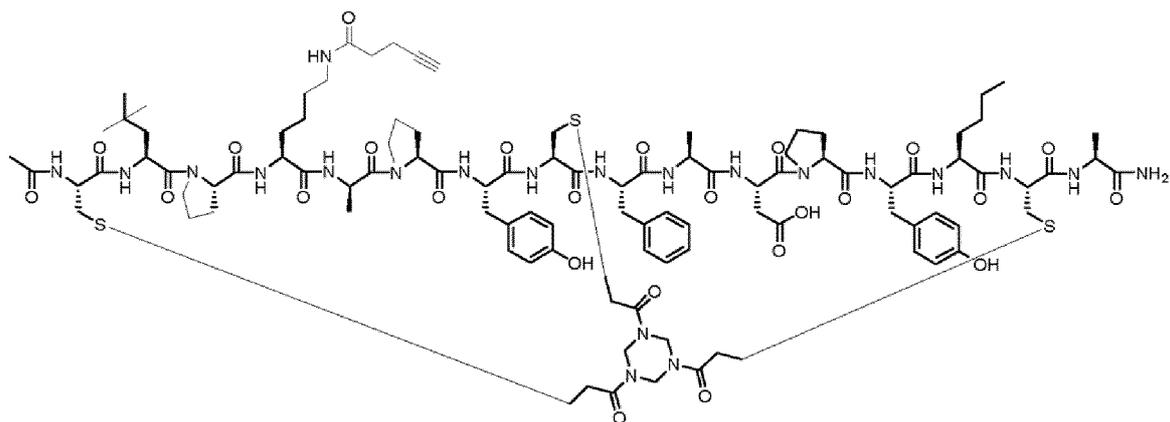
Мономер 8A



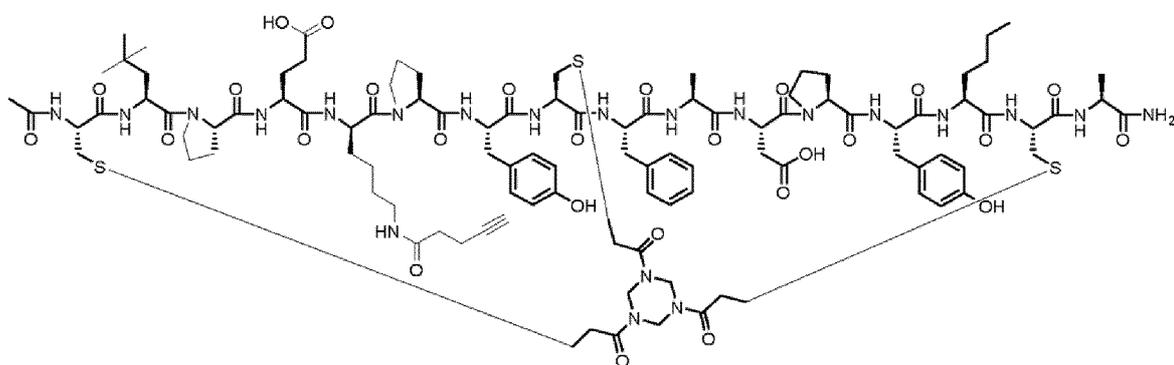
Мономер 9A



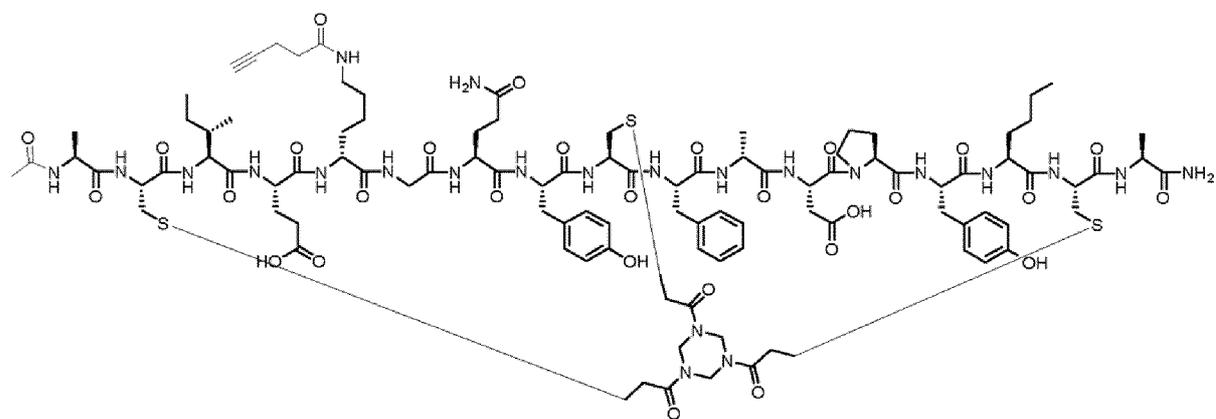
Мономер 10A



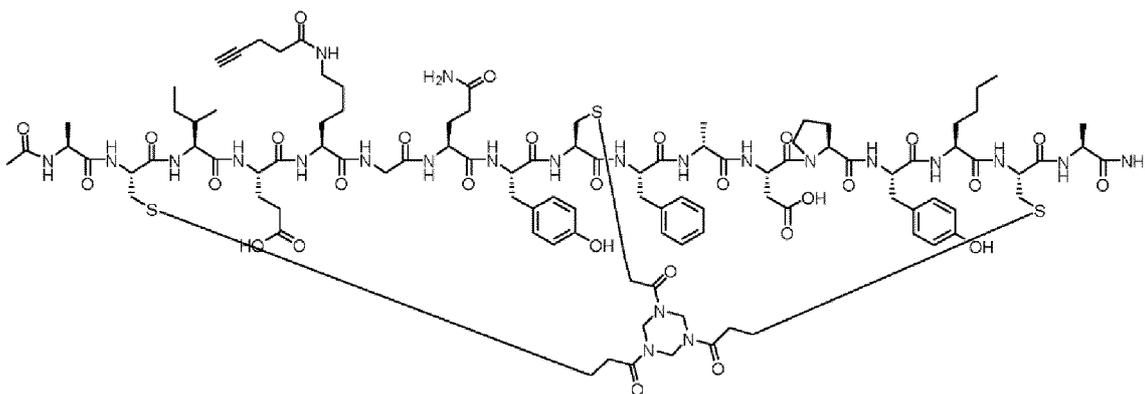
Мономер 11А



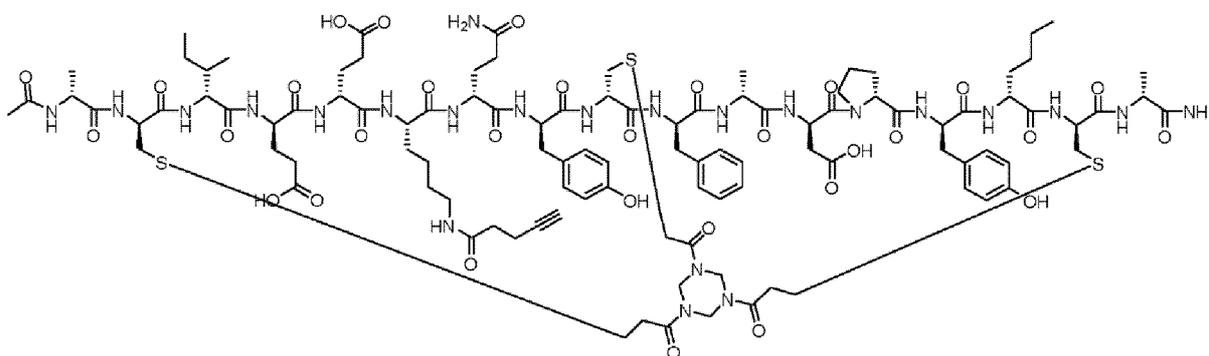
Мономер 12А



Мономер 13А



Мономер 14А



Мономер 15А

Мономер 1А:

К раствору мономера 1 (350,0 мг, 163,22 мкмоль, 1,0 экв.) и соединения 3 (63,71 мг, 326,43 мкмоль, 2,0 экв.) в DMA (10 мл) добавляли DIPEA (105,47 мг, 816,08 мкмоль, 142,15 мкл, 5,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч. LC-MS продемонстрировала, что мономер 1 израсходовался полностью, и обнаруживался один пик с желаемой MS. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением мономера 1А (254 мг, выход 69,96%) в виде белого твердого вещества.

Мономер 2А:

К раствору мономера 2 (350 мг, 158,99 мкмоль, 1 экв.) и соединения 3 (62,0 мг, 317,97 мкмоль, 2 экв.) в DMA (3 мл) добавляли DIPEA (103,0 мг, 794,93 мкмоль, 138,46 мкл, 5 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч. LC-MS продемонстрировала, что мономер 2 израсходовался полностью, и обнаруживался один пик с желаемой MS. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением мономера 2А (304 мг, 130,58 мкмоль, выход 82,13%, чистота 98%) в виде белого твердого вещества.

Мономер 3А:

К раствору мономера 3 (0,3 г, 137,27 мкмоль, 1,0 экв.) и соединения 3 (54 мг, 276,68 мкмоль, 2,0 экв.) в DMA (3 мл) добавляли DIPEA (89 мг, 688,63 мкмоль, 119,95 мкл, 5,0 экв.). Смесь перемешивали при 25~30°C в течение 2 ч. LC-MS и ВЭЖХ

продемонстрировали, что мономер 3 израсходовался полностью, и обнаруживался один пик с желаемой MS. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением мономера 3А (272 мг, 110,21 мкмоль, выход 80,29%, чистота 91,8%) в виде белого твердого вещества.

Мономер 4А:

К раствору мономера 4 (0,3 г, 137,27 мкмоль, 1 экв.) и соединения 3 (54 мг, 276,68 мкмоль, 2,02 экв.) в DMA (3 мл) добавляли DIPEA (89 мг, 688,63 мкмоль, 119,95 мкл, 5,02 экв.). Смесь перемешивали при 25~30°C в течение 2 ч. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что мономер 4 израсходовался полностью, и обнаруживался один пик с желаемой MS. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением мономера 4А (204 мг, 85,36 мкмоль, выход 62,19%, чистота 94,8%) в виде белого твердого вещества.

Мономер 5А:

К раствору мономера 5 (0,3 г, 132,89 мкмоль, 1 экв.) и соединения 3 (52,0 мг, 266,43 мкмоль, 2,0 экв.) в DMA (3 мл) добавляли DIPEA (86,0 мг, 665,41 мкмоль, 115,90 мкл, 5,0 экв.). Смесь перемешивали при 25~30°C в течение 2 ч. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что мономер 5 израсходовался полностью, и обнаруживался один пик с желаемой MS. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением мономера 5А (194 мг, 74,69 мкмоль, выход 56,21%, чистота 90,0%) в виде белого твердого вещества.

Мономер 6А:

К раствору мономера 6 (0,3 г, 137,21 мкмоль, 1,0 экв.) и соединения 3 (54 мг, 276,68 мкмоль, 2,0 экв.) в DMA (3 мл) добавляли DIPEA (89 мг, 688,63 мкмоль, 119,95 мкл, 5,02 экв.). Смесь перемешивали при 25~30°C в течение 2 ч. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что мономер 6 израсходовался полностью, и обнаруживался один пик с желаемой MS. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением мономера 6А (204 мг, 83,25 мкмоль, выход 60,68%, чистота 92,5%) в виде белого твердого вещества.

Мономер 7А:

К раствору мономера 7 (0,3 г, 138,41 мкмоль, 1,0 экв.) и соединения 3 (54,00 мг, 276,82 мкмоль, 2,0 экв.) в DMA (3 мл) добавляли DIPEA (89 мг, 688,63 мкмоль, 119,95 мкл, 5,0 экв.). Смесь перемешивали при 25~30°C в течение 2 ч. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что мономер 7 израсходовался полностью, и обнаруживался один пик с желаемой MS. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением мономера 7А (183 мг, 73,69 мкмоль, выход 53,24%, чистота 90,5%) в виде белого твердого вещества.

Мономер 8А:

Смесь мономера 8 (400 мг, 180,38 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 3 (70,41 мг, 360,77 мкмоль, 2,0 экв.) и DIPEA (118,72 мг, 918,58 мкмоль, 160,00 мкл, 5,0 экв.) в DMSO (5 мл) дегазировали и продували N₂ 3 раза. Затем смесь перемешивали при 30°C в течение 2 ч в

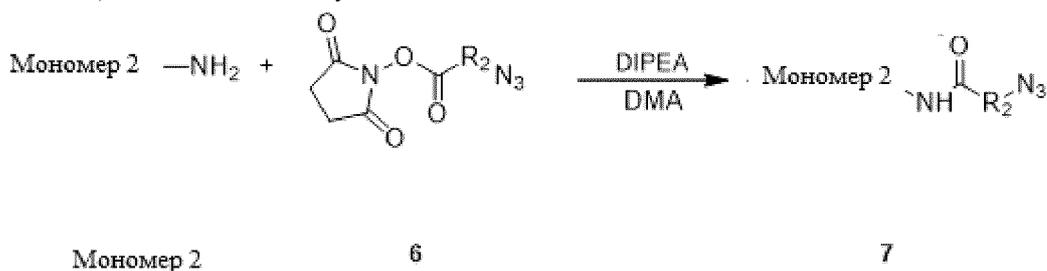
атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что мономер 8 израсходовался полностью, и обнаруживался один пик с желаемой MS. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением мономера 8А (300 мг, 118,82 мкмоль, выход 65,87%, чистота 91,74%) в виде белого твердого вещества.

Мономер 9А:

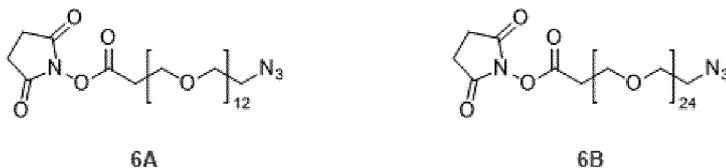
К раствору мономера 9 (0,3 г, 136,27 мкмоль, 1,0 экв.) и соединения 3 (53,0 мг, 272,55 мкмоль, 2,0 экв.) в DMA (3 мл) добавляли DIPEA (88,0 мг, 681,37 мкмоль, 118,68 мкл, 5,0 экв.). Смесь перемешивали при 25~30°C в течение 2 ч. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что мономер 9 израсходовался полностью, и обнаруживался один пик с желаемой MS. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия) с получением мономера 9А (249 мг, 100,41 мкмоль, выход 73,68%, чистота 92,0%) в виде белого твердого вещества.

Мономер 10А (260 мг, чистота 90%), мономер 11А (123 мг, 97, чистота 10%), мономер 12А (131 мг, чистота 97,5%), мономер 13А (780 мг, чистота 98,0%), мономер 14А (710 мг, чистота 92,40%) и мономер 15А (820 мг, чистота 96,9%) синтезировали, как описано выше, и очищали с использованием препаративной ВЭЖХ с получением белого твердого вещества.

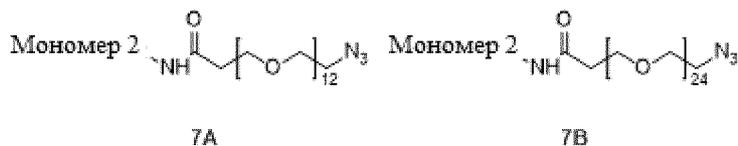
Общая методика получения соединения 7



Соединение 6:



Соединение 7:



Соединение 7А:

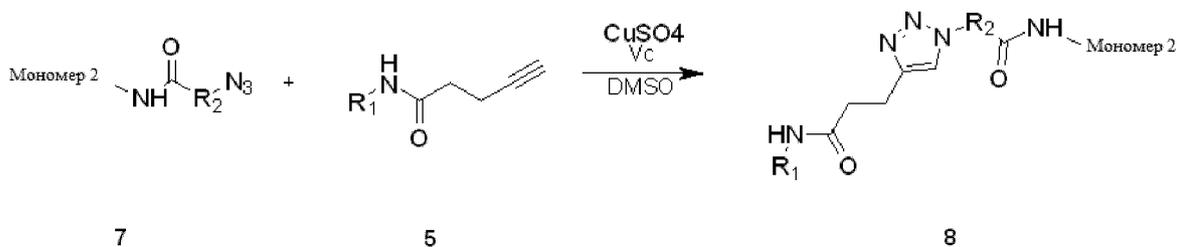
К раствору мономера 2 (120 мг, 54,51 мкмоль, 1,0 экв.) в DMA (4 мл) добавляли соединение 6А (40,38 мг, 54,51 мкмоль, 1,0 экв.) и DIPEA (35,22 мг, 272,55 мкмоль, 47,47

мкл, 5 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч. LC-MS продемонстрировала, что не осталось мономера 2. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаружилось ~80% желаемого соединения. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) с получением соединения 7A (89 мг, 31,48 мкмоль, выход 57,75%) в виде белого твердого вещества.

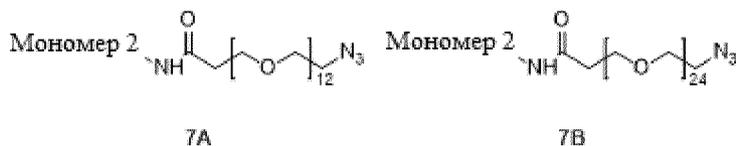
Соединение 7B:

К раствору мономера 2 (75,0 мг, 34,07 мкмоль, 1,0 экв.) в DMA (3 мл) добавляли соединение 6B (43,25 мг, 34,07 мкмоль, 1,0 экв.) и DIPEA (22,02 мг, 170,34 мкмоль, 29,67 мкл, 5,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч. LC-MS продемонстрировала, что не осталось мономера 2. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаружилось ~80% желаемого соединения. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA) с получением соединения 7B (73 мг, 21,75 мкмоль, выход 63,85%) в виде белого твердого вещества.

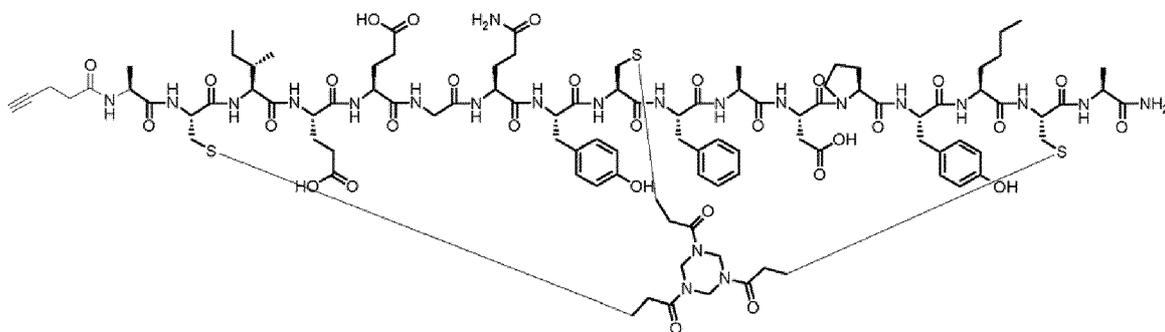
Общая методика получения димерных бициклических конъюгатов:



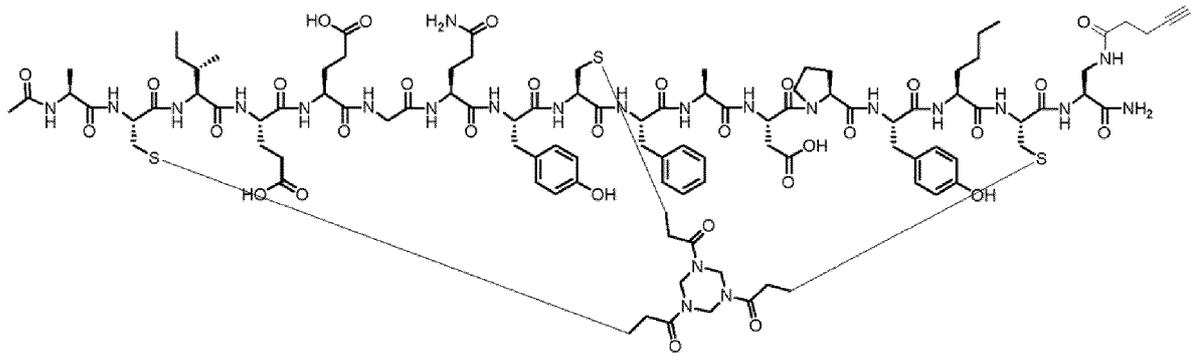
Соединение 7:



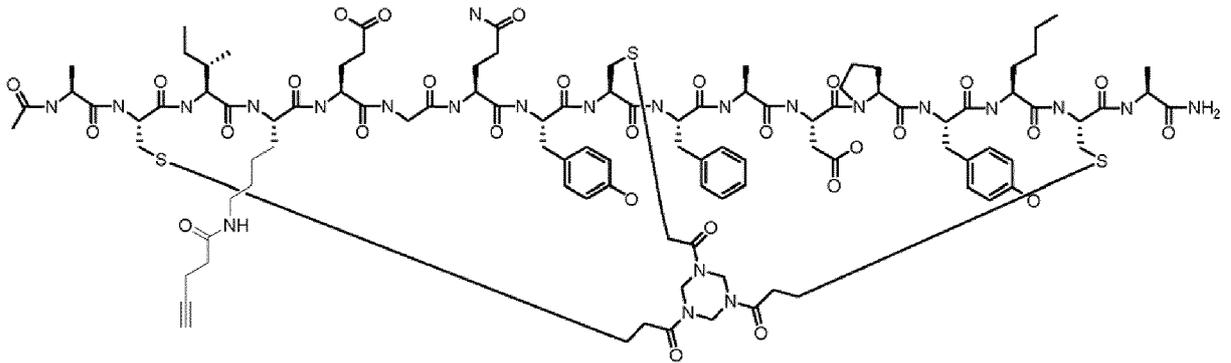
Соединение 5:



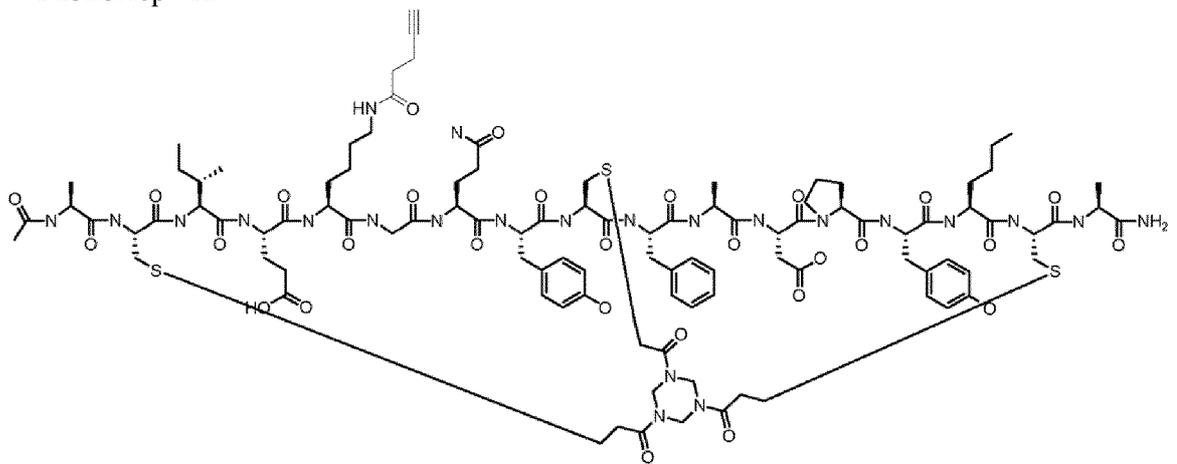
Мономер 1A



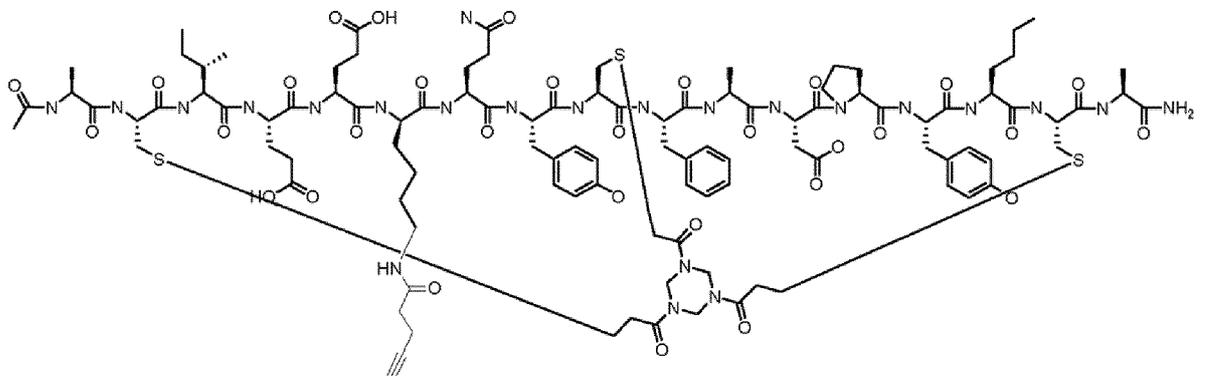
Мономер 2А



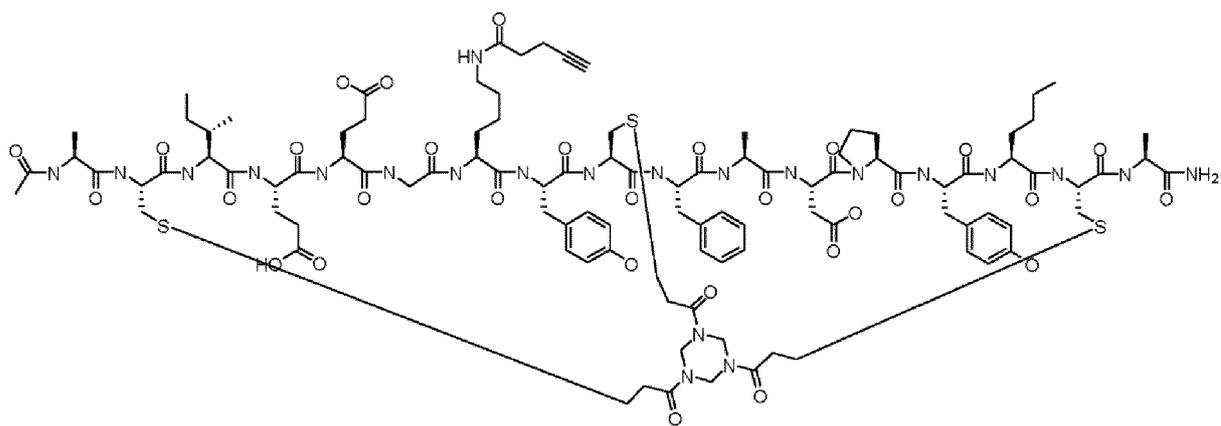
Мономер 3А



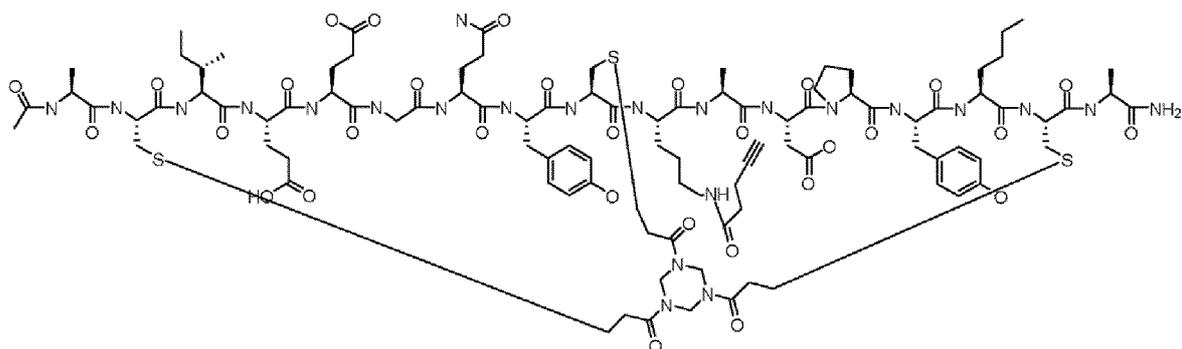
Мономер 4А



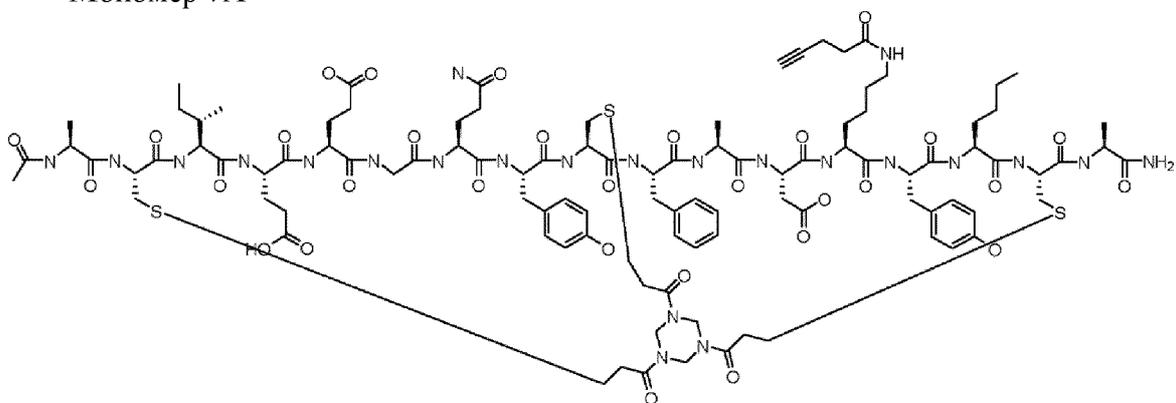
Мономер 5А



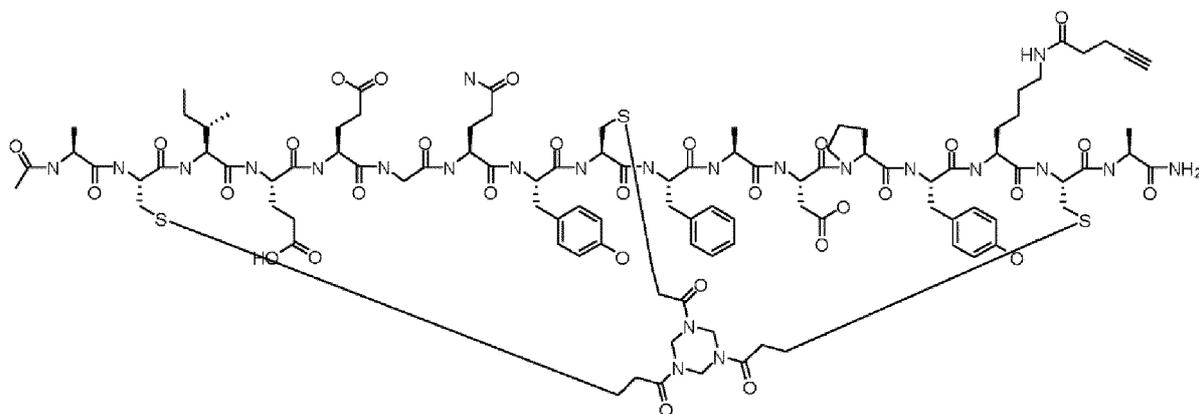
Мономер 6A



Мономер 7A

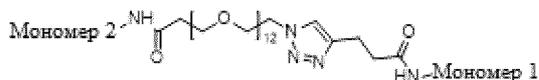


Мономер 8A

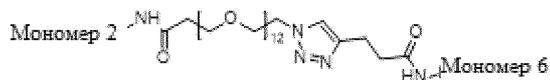


Мономер 9А

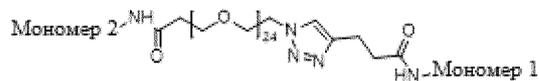
Соединение 8:



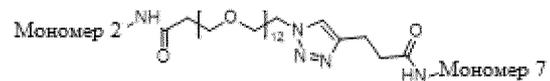
8A



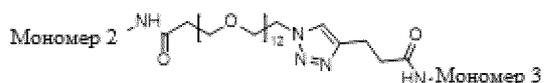
8F



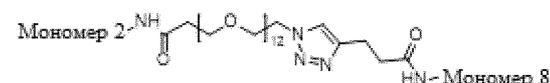
8B



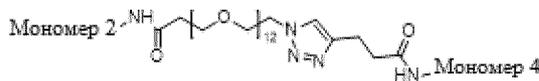
8G



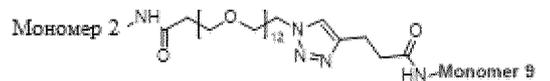
8C



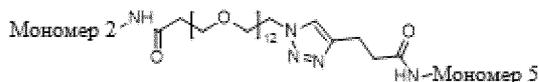
8H



8D



8I



8E

Соединение 8А:

К раствору соединения 7А (12 мг, 4,24 мкмоль, 1 экв.) и мономера 1А (9,44 мг, 4,24 мкмоль, 1 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuSO₄·5H₂O (0,4 М, 31,83 мкл, 3 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,4 М, 106,11 мкл, 10 экв.) в атмосфере азота. Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что не оставалось соединения 7А. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаруживалось ~80% желаемого соединения. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением соединения 8А (8,1 мг, 1,49 мкмоль, выход 35,11%, чистота 92,94%) в виде белого твердого вещества.

Соединение 8В:

К раствору соединения 7В (14 мг, 4,17 мкмоль, 1 экв.) и мономера 1А (9,28 мг, 4,17 мкмоль, 1 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuSO₄·5H₂O (0,4 М, 31,29 мкл, 3 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,4 М, 104,30 мкл, 10 экв.) в атмосфере азота. Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что не оставалось соединения 7В. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаруживалось ~80% желаемого соединения. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с

TFA) с получением соединения 8B (5,2 мг, 0,86 мкмоль, выход 20,62%, чистота 92,31%) в виде белого твердого вещества.

Соединение 8C:

К раствору соединения 7A (10 мг, 3,54 мкмоль, 1 экв.) и мономера 3A (12,02 мг, 5,31 мкмоль, 1,5 экв.) в DMF (1 мл) добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,4 М, 26,53 мкл, 3 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,4 М, 88,43 мкл, 10 экв.) в атмосфере азота. Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что не оставалось соединения 7A. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаруживалось ~40% желаемого соединения. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением соединения 8C (2,8 мг, 5,04e-1 мкмоль, выход 14,24%, чистота 91,6%) в виде белого твердого вещества.

Соединение 8D:

К раствору соединения 7A (10 мг, 3,54 мкмоль, 1 экв.) и мономера 4A (12,02 мг, 5,31 мкмоль, 1,5 экв.) в DMF (1 мл) добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,4 М, 26,53 мкл, 3 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,4 М, 88,43 мкл, 10 экв.) в атмосфере азота. Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что не оставалось соединения 7A. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаруживалось ~40% желаемого соединения. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением соединения 8D (2,1 мг, 3,76e-1 мкмоль, выход 10,62%, чистота 91,1%) в виде белого твердого вещества.

Соединение 8E:

К раствору соединения 7A (10 мг, 3,54 мкмоль, 1 экв.) и мономера 5A (12,40 мг, 5,31 мкмоль, 1,5 экв.) в DMF (1 мл) добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,4 М, 26,53 мкл, 3 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,4 М, 88,43 мкл, 10 экв.) в атмосфере азота. Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что не оставалось соединения 7A. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаруживалось ~20% желаемого соединения. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением соединения 8E (1,2 мг, 2,01e-1 мкмоль, выход 5,69%, чистота 86,6%) в виде белого твердого вещества.

Соединение 8F:

К раствору соединения 7A (10 мг, 3,54 мкмоль, 1 экв.) и мономера 6A (12,03 мг, 5,31 мкмоль, 1,5 экв.) в DMF (1 мл) добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,4 М, 26,53 мкл, 3 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,4 М, 88,43 мкл, 10 экв.) в атмосфере азота. Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что не оставалось соединения 7A. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаруживалось ~40% желаемого соединения. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением соединения 8F (3,4 мг, 3,93e-1 мкмоль, выход 11,12%, чистота 58,9%) в виде белого твердого вещества.

Соединение 8G:

К раствору соединения 7A (10 мг, 3,54 мкмоль, 1 экв.) и мономера 7A (11,92 мг,

5,31 мкмоль, 1,5 экв.) в DMSO (1 мл) добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,4 М, 26,53 мкл, 3 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,4 М, 88,43 мкл, 10 экв.) в атмосфере азота. Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что не оставалось соединения 7А. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаруживалось ~40% желаемого соединения. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением соединения 8G (7,2 мг, 1,33 ммоль, выход 37,78%, чистота 94,2%) в виде белого твердого вещества.

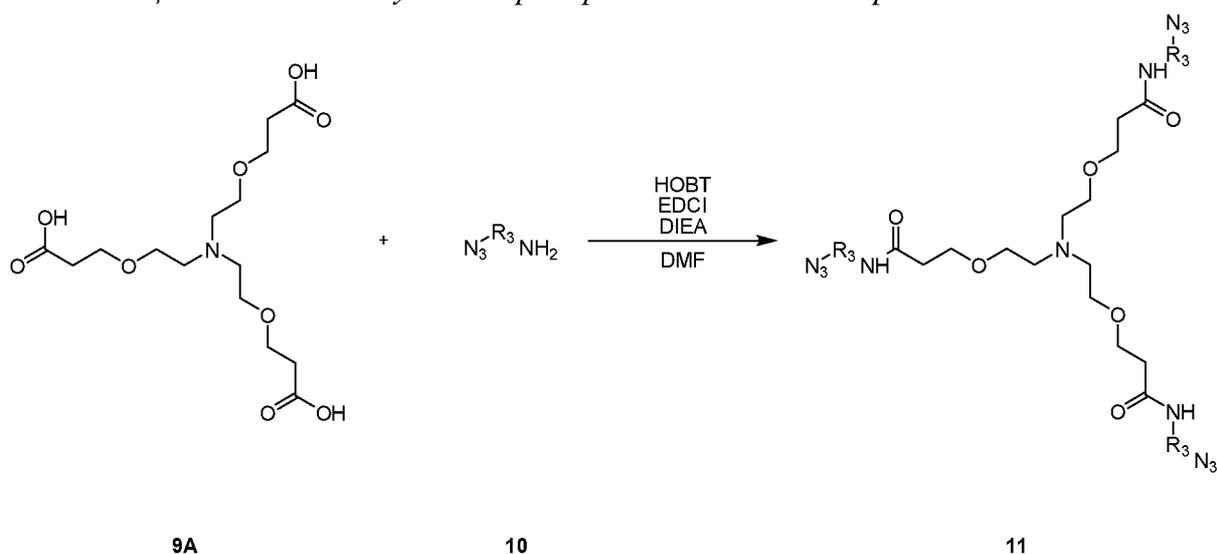
Соединение 8H:

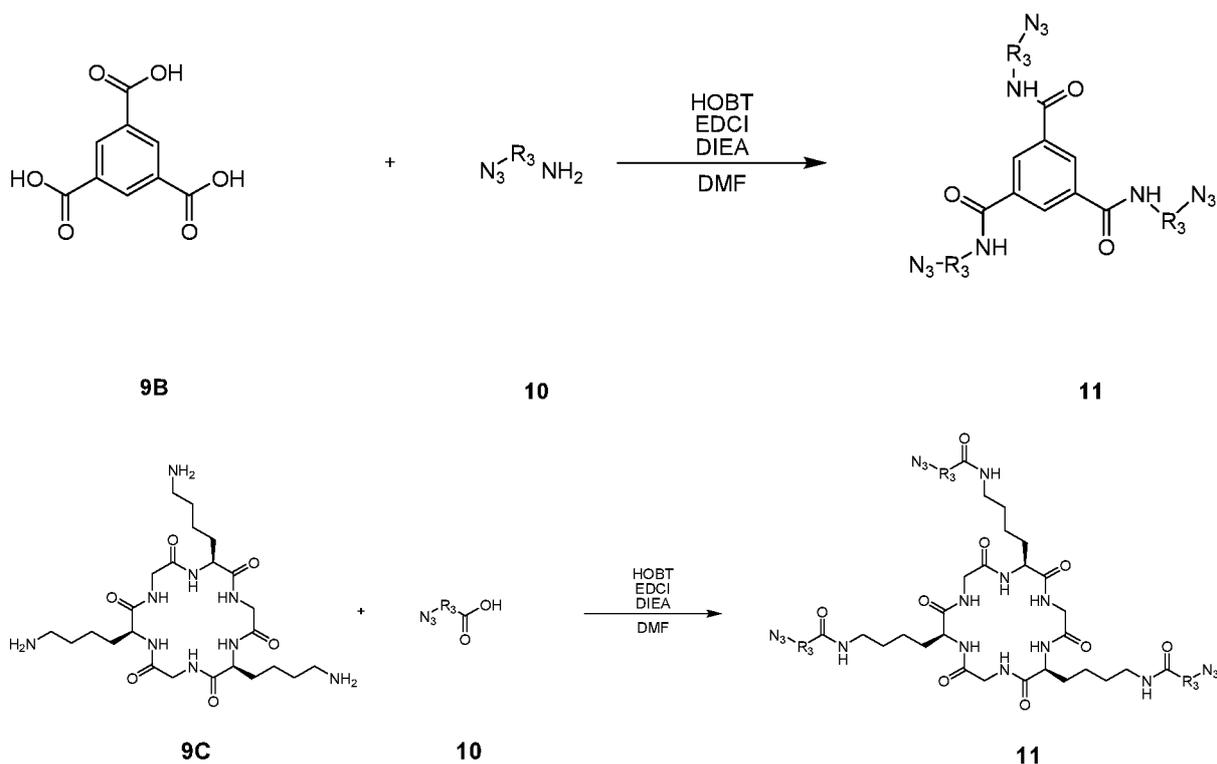
К раствору соединения 7А (10 мг, 3,54 мкмоль, 1 экв.) и мономера 8А (11,19 мг, 5,31 мкмоль, 1,5 экв.) в DMSO (1 мл) добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,4 М, 26,53 мкл, 3 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,4 М, 88,43 мкл, 10 экв.) в атмосфере азота. Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что не оставалось соединения 7А. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаруживалось ~40% желаемого соединения. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением соединения 8H (9,0 мг, 1,73 ммоль, выход 49,15%, чистота 99,0%) в виде белого твердого вещества.

Соединение 8I:

К раствору соединения 7А (10 мг, 3,54 мкмоль, 1 экв.) и мономера 9А (12,11 мг, 5,31 мкмоль, 1,5 экв.) в DMF (1 мл) добавляли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,4 М, 26,53 мкл, 3 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,4 М, 88,43 мкл, 10 экв.) в атмосфере азота. Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что не оставалось соединения 7А. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаруживалось ~40% желаемого соединения. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением соединения 8I (3,8 мг, 6,81e-1 мкмоль, выход 19,24%, чистота 91,5%) в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения тримерного азидного линкера

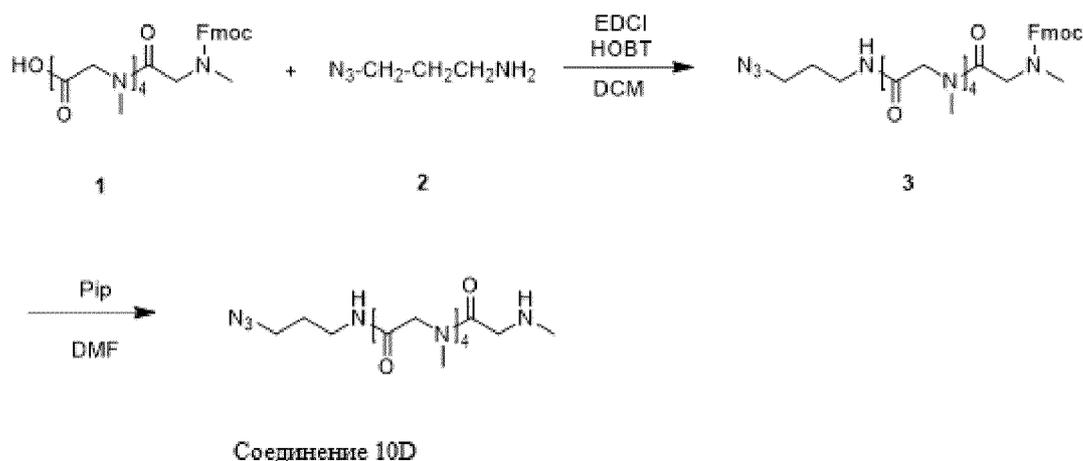




Соединение 9C: с(KGKGKG) (циклический (SEQ ID NO: 57))

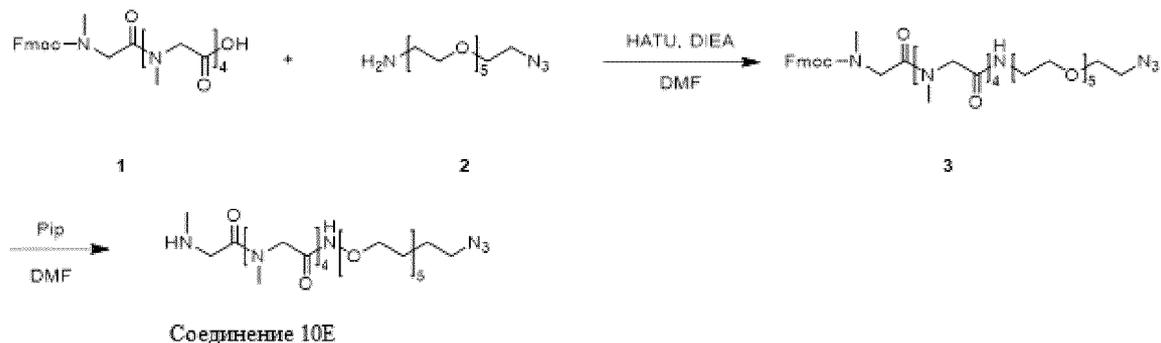
Линейный пептид $\text{NH}_2\text{-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-COOH}$ (NH_2 -(SEQ ID NO: 57)-COOH) синтезировали на смоле 2-Cl-Trt хлорид (смола CTC) с использованием стандартной химии Fmoc. Затем пептид расщепляли посредством обработки 20% HFIP в DCM (30 мин \times 2), и раствор объединяли, упаривали в вакууме и лиофилизовали до сухого состояния с получением линейного неочищенного продукта. Затем неочищенный пептид растворяли в DMF, а затем добавляли реагенты для присоединения (DIC и HOAt, 1 экв. и 1 экв., соответственно). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч до тех пор, пока LCMS не показывала, что не оставалось линейного пептида. Затем циклизованный неочищенный материал сушили в вакууме и очищали флэш-хроматографией на C18. Затем очищенный циклический пептид лиофилизовали и все защитные группы удаляли посредством обработки HCl/диоксаном (4 М, 1 час, комнатная температура). Преципитаты собирали, промывали метил трет-бутиловым эфиром, и сушили в вакууме с получением конечного продукта в виде белого твердого вещества (соль HCl).

Соединение 10:



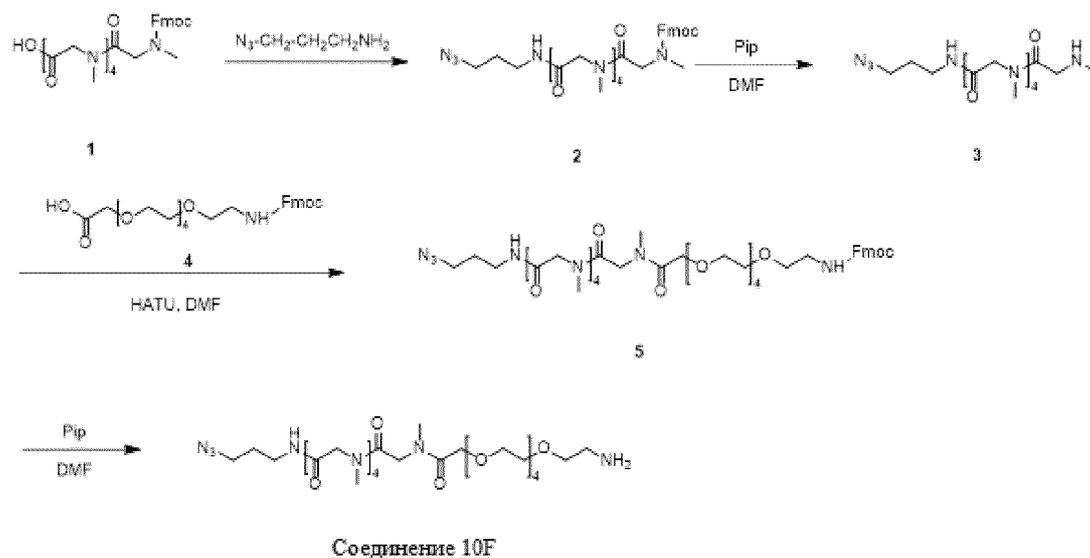
Смесь соединения 1 (700,0 мг, 1,18 ммоль, 1,0 экв.) (полученного посредством твердофазного синтеза пептидов), 3-азидпропан-1-амина (соединение 2, 117,7 мг, 1,18 ммоль, 1,0 экв.), HOBT (190,6 мг, 1,41 ммоль, 1,2 экв.), EDCI (270,4 мг, 1,41 ммоль, 1,2 экв.) растворяли в DCM (20 мл, предварительно дегазированный и продутый N_2 3 раза), затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . LC-MS продемонстрировала, что соединение 1 израсходовался полностью, и обнаруживался один пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 677,75, наблюдаемое m/z : 678,2 ($[M+H]^+$)). Реакционную смесь обрабатывали несколькими каплями 1 М HCl и органический слой собирали и упаривали для удаления растворителя. Соединение 3 (600,0 мг, неочищенный материал) получали в виде белого твердого вещества. Соединение 3 (600,0 мг, 885,3 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF (3 мл, дегазированный и продутый N_2 3 раза), а затем добавляли пиперидин (1,29 г, 15,19 ммоль, 1,50 мл, 17,2 экв.) и смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . LC-MS продемонстрировала, что соединение 3 израсходовалось полностью, и обнаруживался один пик с желаемым m/z (ММ: 455,51 наблюдаемое m/z : 456,3 ($[M+H]^+$)). Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). Соединение 10D (400,0 мг, 879,1 мкмоль) получали в виде бесцветного масла.

Соединение 10E:



Смесь соединения 1 (1 г, 1,68 ммоль, 1,0 экв.), соединения 2 (411,5 мг, 1,34 ммоль, 0,8 экв.) и DIEA (217,0 мг, 1,68 ммоль, 292,4 мкл, 1,0 экв.) растворяли в DMF (2 мл), а затем добавляли HATU (638,4 мг, 1,68 ммоль, 1,0 экв.) одной порцией при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин. TLC (DCM: CH₃OH=10:1, R_f=0,18) продемонстрировала, что соединение 1 израсходовалось полностью и образовывалось одно новое пятно. Растворитель выпаривали с получением соединения 3 (1 г, 1,13 ммоль, выход 67,38%) в виде белого твердого вещества, которое использовали непосредственно на следующей стадии без дальнейшей очистки. Соединение 3 (1 г, 1,13 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF (8 мл), а затем добавляли пиперидин (2 мл). Смесь перемешивали в течение 15 мин при 25°C. LC-MS продемонстрировала, что соединение 3 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым *m/z* (вычисленная ММ: 661,75, наблюдаемое *m/z*: 663,1 ([M+H]⁺)). Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). Соединение 10E (800 мг, 1,09 ммоль, выход 96,18%) получали в виде бесцветного масла.

Соединение 10F:



Смесь соединения 1 (700,0 мг, 1,18 ммоль, 1,0 экв.), 3-азидопропан-1-амин (117,7

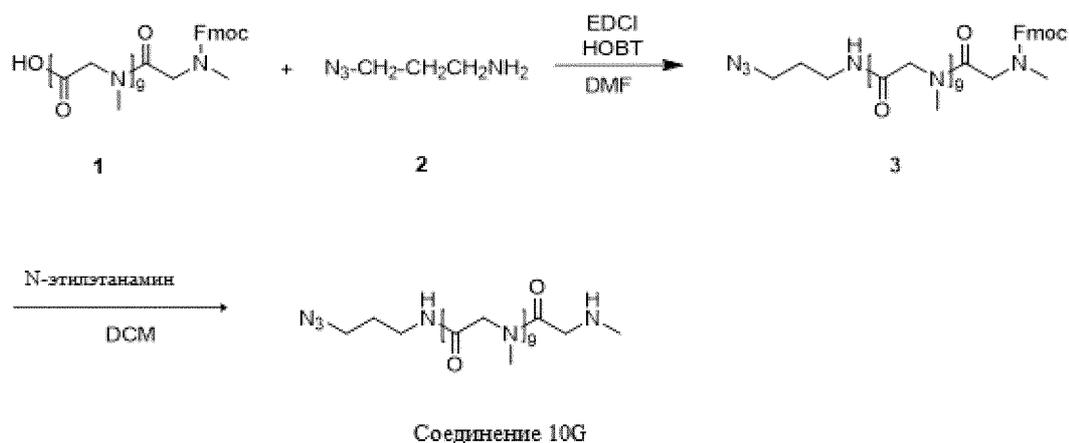
мг, 1,18 ммоль, 1,0 экв.), HOBt (190,6 мг, 1,41 ммоль, 1,2 экв.), EDCI (270,4 мг, 1,41 ммоль, 1,2 экв.) растворяли в DCM (20 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что соединение 1 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым *m/z* (вычисленная ММ: 677,75, наблюдаемое *m/z*: 678,2 ([M+H]⁺)). Реакционную смесь обрабатывали несколькими каплями 1 М HCl, и органический слой собирали и упаривали при пониженном давлении. Соединение 2 (600,0 мг, неочищенный материал) получали в виде белого твердого вещества.

Соединение 2 (600,0 мг, 885,2 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF (3 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли пиперидин (1,29 г, 15,19 ммоль, 1,50 мл, 17,2 экв.) и смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что соединение 2 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым *m/z* (вычисленная ММ: 455,51, наблюдаемое *m/z*: 456,3 ([M+H]⁺)). Реакционную смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA), и соединение 3 (400,0 мг, 879,1 мкмоль) получали в виде бесцветного масла.

Смесь соединения 3 (250,0 мг, 548,83 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (284,1 мг, 548,83 мкмоль, 1 экв.), HATU (229,6 мг, 603,72 мкмоль, 1,1 экв.), DIEA (141,9 мг, 1,10 ммоль, 191,19 мкл, 2,0 экв.) в DCM (20 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что соединение 3 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым *m/z* (вычисленная ММ: 955,06, наблюдаемое *m/z*: 955,6 ([M+H]⁺)). Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). Соединение 5 (400,0 мг, 419,1 мкмоль) получали в виде белого твердого вещества.

Смесь соединения 5 (400,0 мг, 418,82 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF (4 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли пиперидин (862,2 мг, 10,13 ммоль, 1 мл, 24,2 экв.) и смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что соединение 5 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым *m/z* (ММ: 732,83, наблюдаемое *m/z*: 733,3 ([M+H]⁺)). Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). Соединение 10F (200 мг, 272,9 мкмоль) получали в виде бесцветного масла.

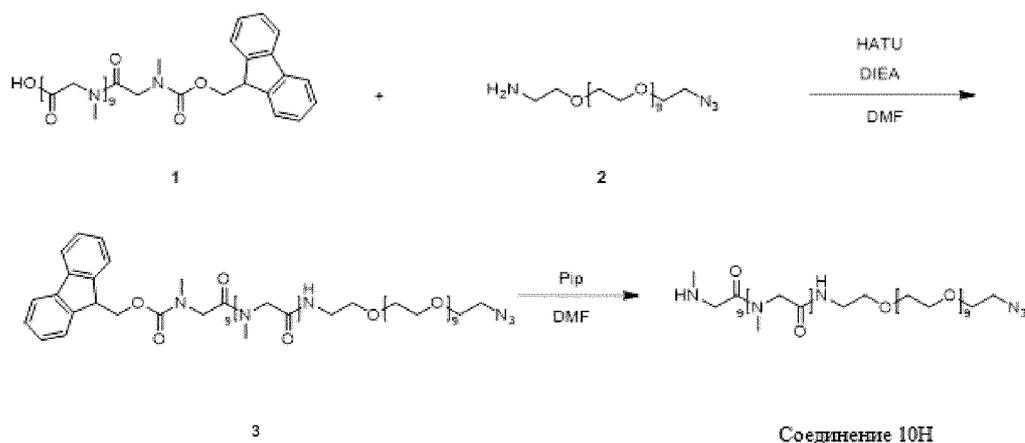
Соединение 10G:



Смесь соединения 1 (700,0 мг, 736,04 мкмоль, 1,0 экв.) (полученного посредством твердофазного пептидного синтеза), 3-азидопропан-1-амин (73,7 мг, 736,04 мкмоль, 1,0 экв.), EDCI (282,2 мг, 1,47 ммоль, 2,0 экв.), HOBT (119,4 мг, 883,25 мкмоль, 1,2 экв.) растворяли в DCM (5 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . LC-MS продемонстрировала, что соединение 1 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым (вычисленная ММ: 1033,14, наблюдаемое m/z : 1033,2 ($[M+H]^+$)). Реакционную смесь обрабатывали несколькими каплями 1 М HCl, и органический слой собирали и упаривали при пониженном давлении для удаления растворителя. Соединение 3 (700,0 мг, неочищенный материал) получали в виде белого твердого вещества.

Смесь соединения 3 (700,0 мг, 677,6 мкмоль, 1,0 экв.), N-этилэтанамина (2,48 г, 33,88 ммоль, 3,49 мл, 50,0 экв.) растворяли в DCM (5 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . LC-MS продемонстрировала, что соединение 3 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 810,90, наблюдаемое m/z : 811,1 ($[M+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Соединение 10G (400,0 мг, неочищенный материал) получали в виде белого твердого вещества.

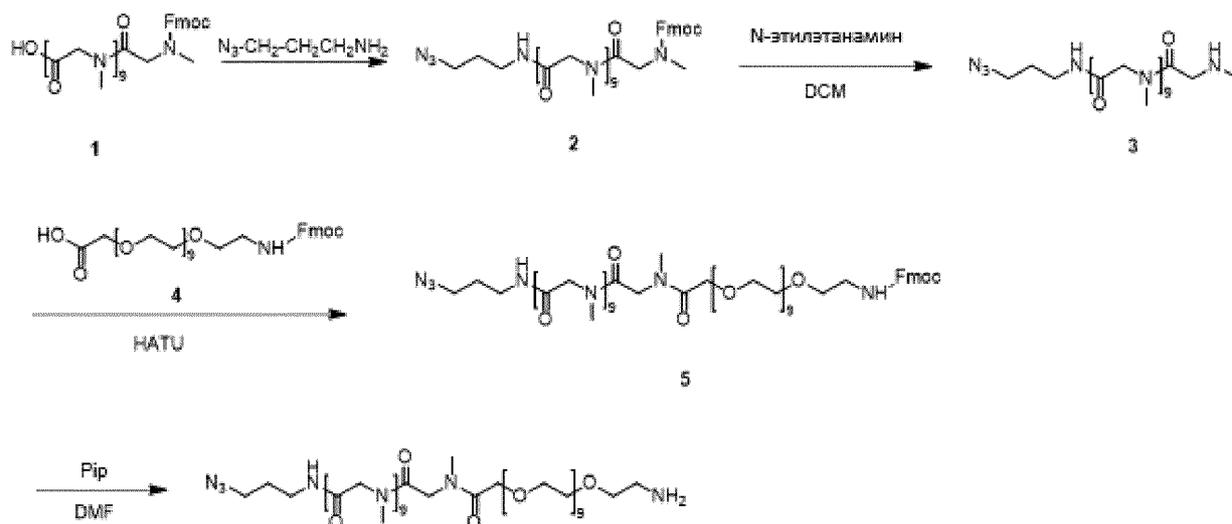
Соединение 10H:



Смесь соединения 1 (1 г, 1,05 ммоль, 1,0 экв.) (полученного посредством твердофазного пептидного синтеза), соединения 2 (553,7 мг, 1,05 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF (2 мл), а затем добавляли HATU (399,8 мг, 1,05 ммоль, 1,0 экв.) и DIEA (135,9 мг, 1,05 ммоль, 183,2 мкл, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. TLC (дихлорметан:метанол=10:1, R_f=0,28) продемонстрировала, что соединение 1 израсходовалось полностью. Затем неочищенный продукт использовали непосредственно на следующей стадии без очистки.

К раствору соединения 3 (1 г, 685,11 мкмоль, 1 экв.) в DMF (8 мл) добавляли пиперидин (2 мл, 714,05 мкмоль, 24 экв.) одной порцией при 25°C. Смесь перемешивали в течение 15 мин при 25°C. LC-MS продемонстрировала, что соединение 3 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (вычисленная MM: 1237,4, наблюдаемое m/z: 1238,4 ([M+H]⁺)). Реакционную смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). Соединение 10H (757 мг, 611,77 мкмоль, выход 89,30%) получали в виде белого твердого вещества.

Соединение 10I:



Соединение 10I

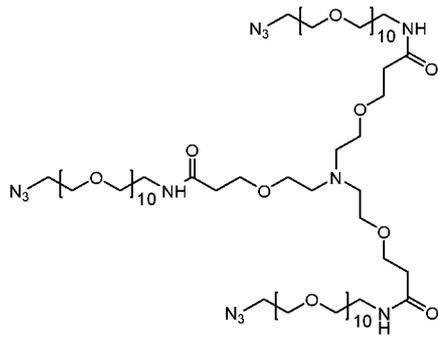
Смесь соединения 1 (1,4 г, 1,47 ммоль, 1,0 экв.), 3-азидопропан-1-амина (162,1 мг, 1,62 ммоль, 1,1 экв.), EDCI (338,6 мг, 1,77 ммоль, 1,2 экв.), HOBT (238,7 мг, 1,77 ммоль, 1,2 экв.) растворяли в DCM (5 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), затем смесь перемешивали при 20-25°C в течение 1 ч в атмосфере N_2 . LC-MS продемонстрировала, что соединение 1 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 1033,14, наблюдаемое m/z : 1033,2 ($[M+H]^+$)). Реакционную смесь обрабатывали несколькими каплями 1 М HCl, органический слой выпаривали при пониженном давлении для удаления растворителя. Соединение 2 (1,1 г, неочищенный материал) получали в виде желтого масла.

Смесь соединения 2 (1,1 г, 1,06 ммоль, 1 экв.), N-этилэтанамин (3,89 г, 53,24 ммоль, 5,48 мл, 50 экв.) растворяли в DCM (5 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), затем смесь перемешивали при 20-25°C в течение 1 ч в атмосфере N_2 . LC-MS продемонстрировала, что соединение 2 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 810,90, наблюдаемое m/z : 810,9 ($[M+H]^+$)). Реакционную смесь выпаривали при пониженном давлении и соединение 3 (810 мг, неочищенный материал) получали в виде белого твердого вещества.

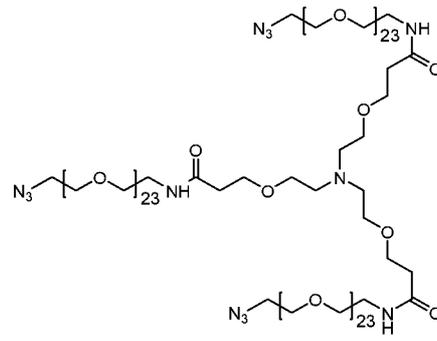
Смесь соединения 3 (810,0 мг, 998,9 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (810,7 мг, 1,10 ммоль, 1,1 экв.), HATU (455,8 мг, 1,20 ммоль, 1,2 экв.), DIEA (258,2 мг, 2,00 ммоль, 348,0 мкл, 2,0 экв.) растворяли в DMF (2 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . LC-MS продемонстрировала, что соединение 3 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 1530,72, наблюдаемое m/z : 765,5 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь обрабатывали несколькими каплями 1 М HCl, и органический слой собирали и упаривали при пониженном давлении для удаления растворителя. Соединение 5 (1,1 г, неочищенный материал) получали в виде желтого

твердого вещества.

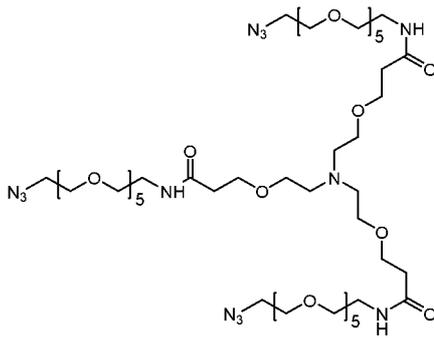
Соединение 5 (1 г, 653,29 мкмоль, 1 экв.) растворяли в DCM (10 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли пиперидин (2,39 г, 32,66 ммоль, 3,36 мл, 50 экв.), затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что соединение 5 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 1308,47, наблюдаемое m/z : 1308,4 ([M+H]⁺)). Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). Соединение 10I (700 мг, 463,72 мкмоль, выход 70,98%) получали в виде желтого твердого вещества.



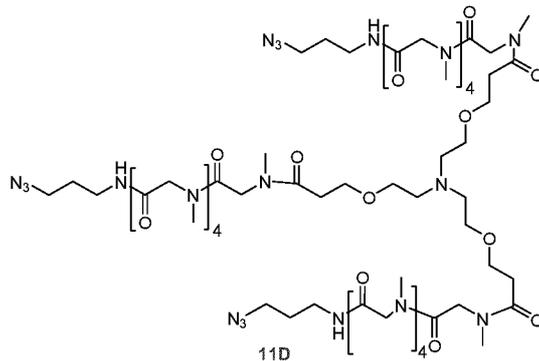
11A



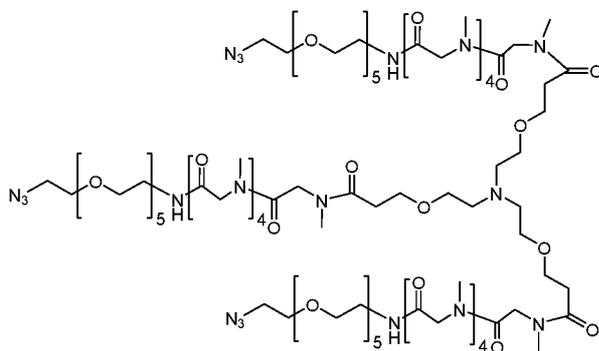
11B



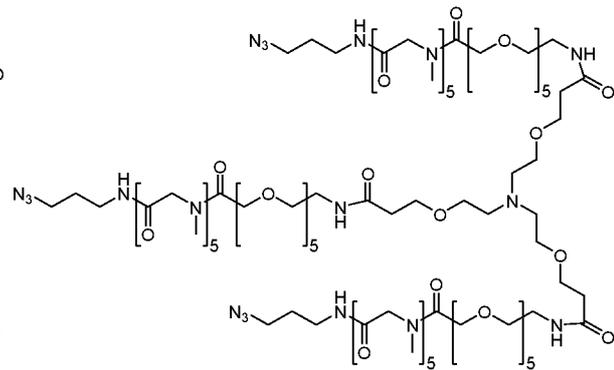
11C



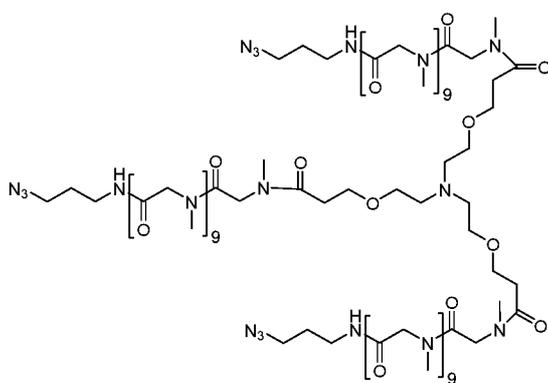
11D



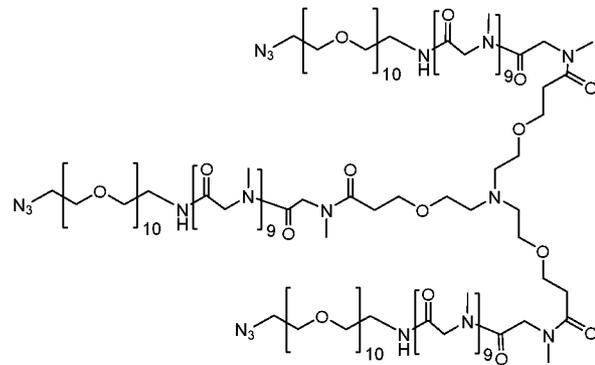
11E



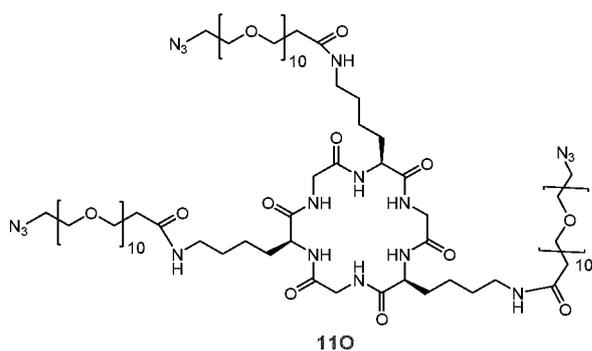
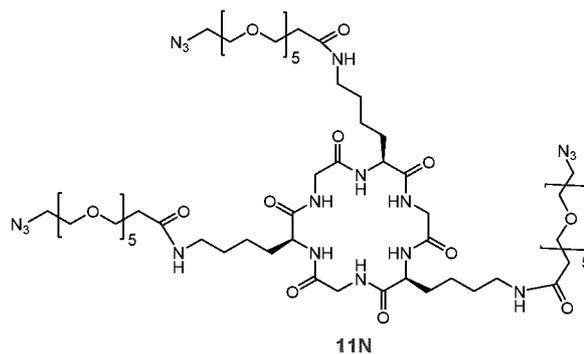
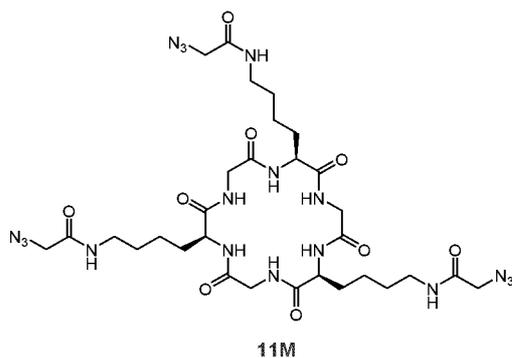
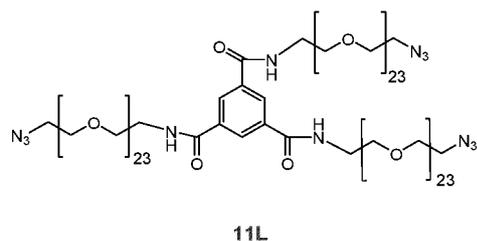
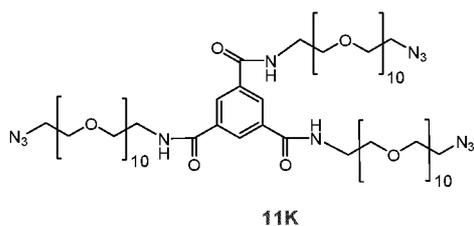
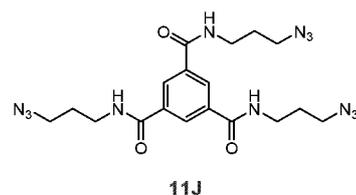
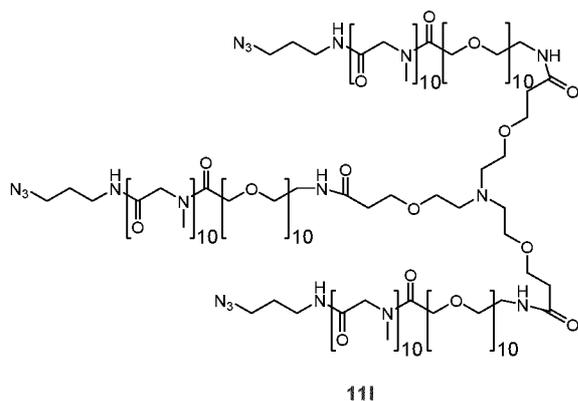
11F



11G



11H



Соединение 11A:

К раствору соединения 9A (100 мг, 248,86 мкмоль, 1 экв., HCl) в DMF (1 мл) добавляли EDCI (160 мг, 834,63 мкмоль, 3,35 экв.) и HOBT (110 мг, 814,07 мкмоль, 3,27 экв.) и DIPEA (192,98 мг, 1,49 ммоль, 260,08 мкл, 6,0 экв.), затем капельно добавляли соединение 10A (400 мг, 759,56 мкмоль, 3,05 экв.) в DMF (1 мл). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 ч. LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью, и обнаружился один основной пик с желаемым m/z . Реакционную смесь

очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением соединения 11А (128 мг, 64,30 мкмоль, выход 25,84%, чистота 95%) в виде бесцветного масла.

Соединение 11В:

К раствору соединения 9А (50 мг, 124,43 мкмоль, 1,0 экв., HCl) в DMF (1 мл) добавляли НОВt (56 мг, 414,44 мкмоль, 3,33 экв.), EDCI (80 мг, 417,31 мкмоль, 3,35 экв.) и DIPEA (96,49 мг, 746,57 мкмоль, 130,04 мкл, 6,0 экв.), затем капельно добавляли соединение 10В (420 мг, 382,06 мкмоль, 3,07 экв.) в DMF (1 мл). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 ч. LC-MS продемонстрировала, что реактант 1 израсходовался полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z . Реакционную смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением соединения 11В (257 мг, 67,65 мкмоль, выход 54,37%, чистота 95,0%) в виде бесцветного масла.

Соединения 11С, 11D, 11Е, 11F, 11G, 11H и 11I синтезировали способом, аналогичным способу, описанному выше для соединения 11В, с использованием соединения 9А и одного из соединений 10С, 10D, 10Е, 10F, 10G, 10H и 10I в качестве исходных материалов, EDCI в качестве реагента для присоединения и DIPEA в качестве основания.

Соединение 11К:

К раствору соединения 9В (20,0 мг, 95,2 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 10А (320,0 мг, 291,1 мкмоль, 3,06 экв.) в DMF (5 мл) добавляли EDCI (60,0 мг, 313,0 мкмоль, 3,29 экв.), НОВt (40,0 мг, 296,0 мкмоль, 3,11 экв.), DMAP (10,0 мг, 81,8 мкмоль, 0,86 экв.) и DIEA (44,5 мг, 344,5 мкмоль, 60 мкл, 3,62 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 12 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 9В израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 3454,01, наблюдаемое m/z : 1168,4000([M/3+H₂O]⁺)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). Соединение 11К (200,0 мг, 57,9 мкмоль, выход 60,84%, чистота 100%) получали в виде белого твердого вещества.

Соединение 11J синтезировали аналогично тому, как описано выше для соединения 11К, с использованием соединения 9В и соединения 10J в качестве исходных материалов, EDCI в качестве реагента для присоединения и DIPEA в качестве основания.

Соединение 11L:

К раствору соединения 9В (20,0 мг, 95,2 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 10В (152,0 мг, 288,6 мкмоль, 3,03 экв.) в DMF (5 мл) добавляли EDCI (60,0 мг, 313,0 мкмоль, 3,29 экв.), НОВt (40,0 мг, 296,0 мкмоль, 3,11 экв.), DMAP (12,0 мг, 98,2 мкмоль, 1,03 экв.) и DIEA (41,6 мг, 321,5 мкмоль, 56 мкл, 3,38 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 12 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 9В израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 1735,96, наблюдаемое m/z : 867,87 ([M/2+H]⁺)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). Соединение 11L (140,0 мг,

79,8 мкмоль, выход 83,86%, чистота 98,97%) получали в виде бесцветного масла.

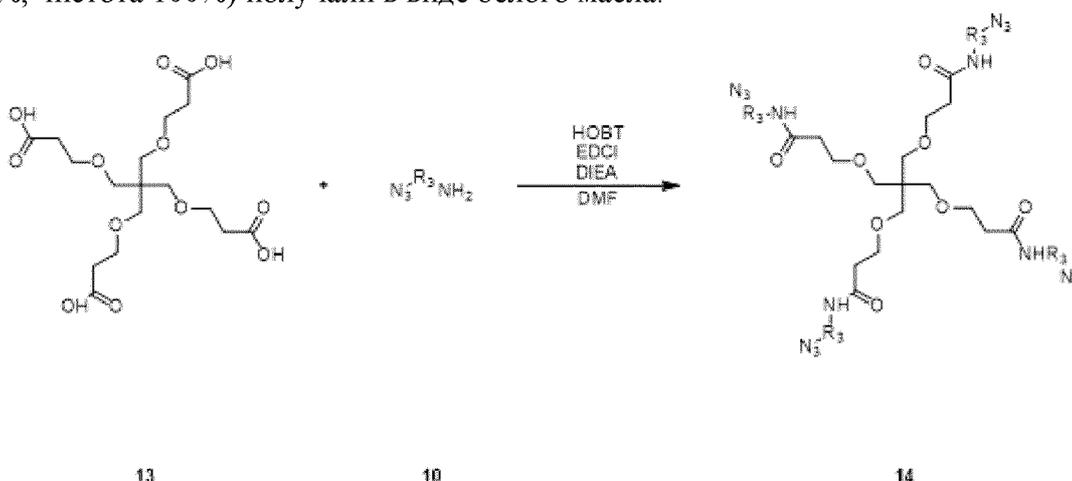
Соединение 11M синтезировали аналогично тому, как описано ниже для соединения 11N с использованием соединения 9C и соединения 10M в качестве исходных материалов, EDCI в качестве реагента для присоединения и DIEA в качестве основания.

Соединение 11N:

К раствору соединения 9C (20,0 мг, 36,0 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 10M (40,0 мг, 119,3 мкмоль, 3,3 экв.) в DMF (2 мл) добавляли EDCI (26,0 мг, 135,6 мкмоль, 3,8 экв.), HOBT (18,0 мг, 133,2 мкмоль, 3,7 экв.), DMAP (4,4 мг, 36,0 мкмоль, 1,0 экв.) и DIEA (23,7 мг, 183,7 мкмоль, 32 мкл, 5,1 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 12 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 9C израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 1507,68, наблюдаемое m/z : 753,77($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). Соединение 11N (40,0 мг, 26,5 мкмоль, выход 73,71%, чистота 100%) получали в виде бесцветного масла.

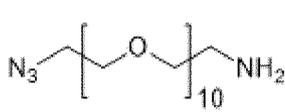
Соединение 11O:

К раствору соединения 9C (10,0 мг, 18,0 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 10L (30,0 мг, 54,0 мкмоль, 3,0 экв.) в DMF (2 мл) добавляли EDCI (28,0 мг, 144,0 мкмоль, 8,0 экв.), HOBT (13,0 мг, 90,0 мкмоль, 5,0 экв.), DMAP (5,0 мг, 36,0 мкмоль, 2,0 экв.) и DIEA (19 мг, 144,0 мкмоль, 25 мкл, 8,0 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 12 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 9C израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 2168,47, наблюдаемое m/z : 1183,88 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). Соединение 11O (17,8 мг, 8,2 мкмоль, выход 45,61%, чистота 100%) получали в виде белого масла.

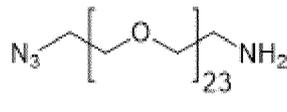


Общая методика получения тетрамерного азидного линкера

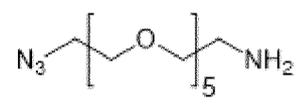
Соединение 10:



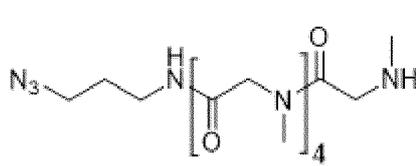
10A



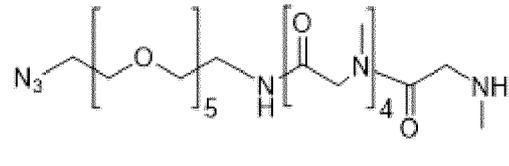
10B



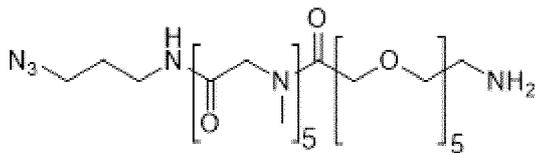
10C



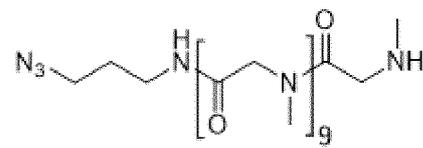
10D



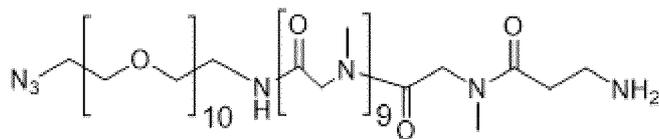
10E



10F

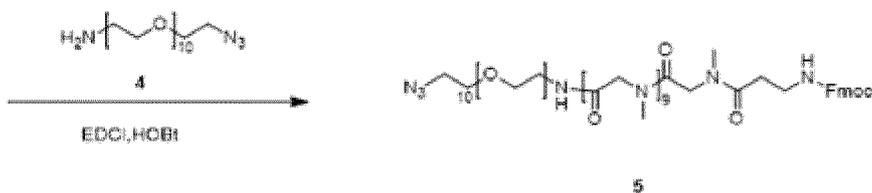


10G



10N

Соединение 10 N:



Соединение 10N

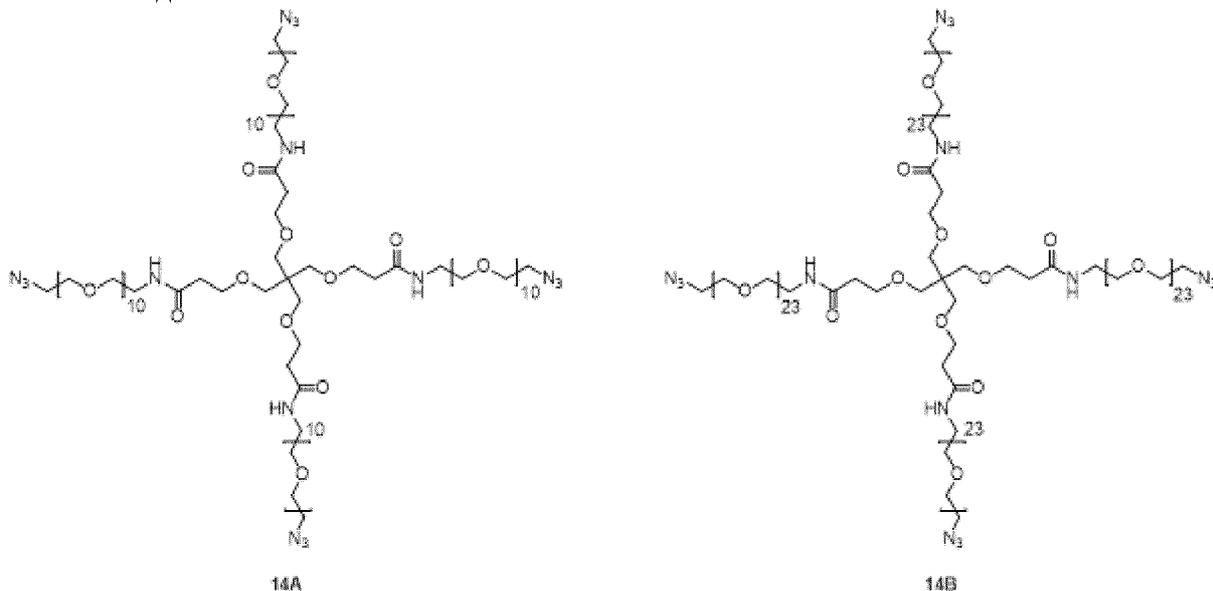
Смесь соединения 1 (900 мг, 1,23 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 2 (1,0 г, 3,21 ммоль,

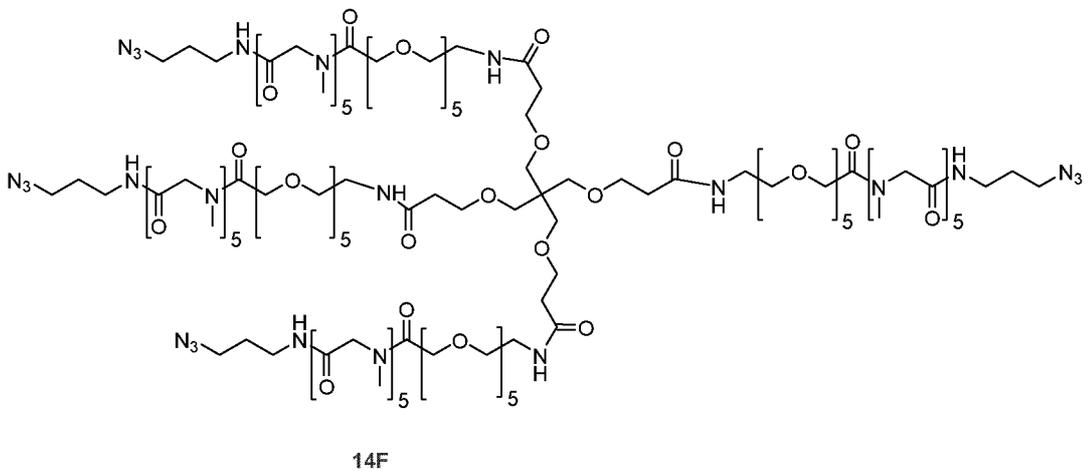
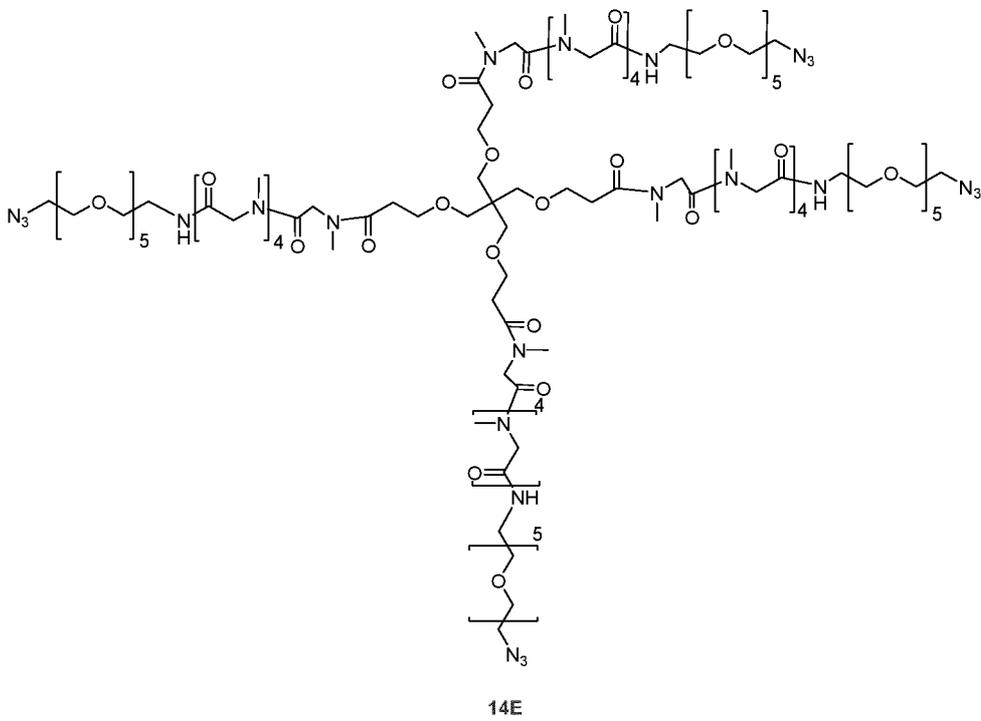
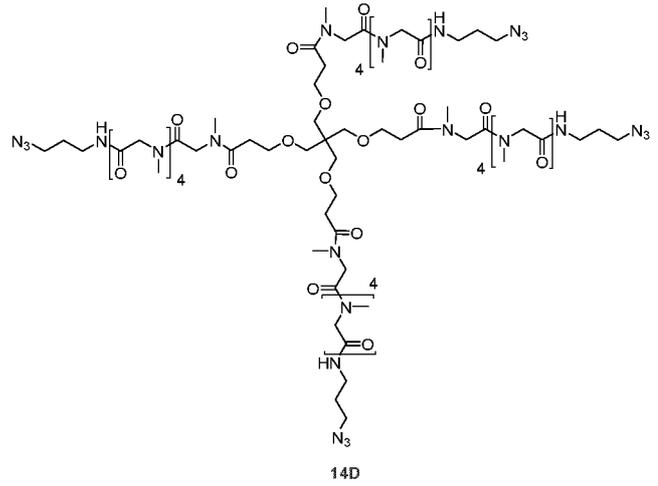
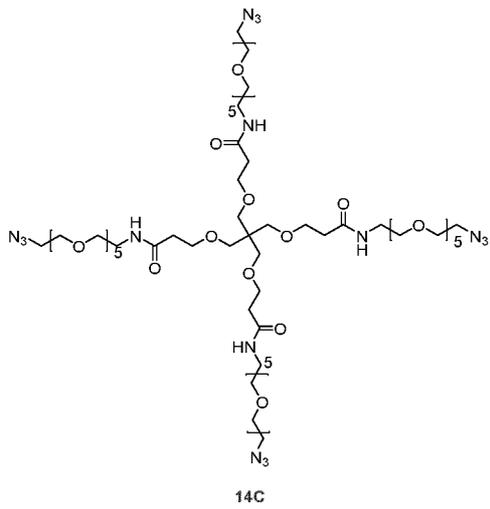
2,6 экв.) растворяли в DCM (20 мл), после чего проводили добавление (284,0 мг, 1,48 ммоль, 1,2 экв.), НОВt (200,2 мг, 1,48 ммоль, 1,2 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 1 израсходовалось полностью, и обнаруживался один пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 1021,49, наблюдаемое m/z : 1022,2 ($[M+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). Соединение 3 (0,900 г, 880,53 мкмоль, выход 71,30%) получали в виде белого твердого вещества.

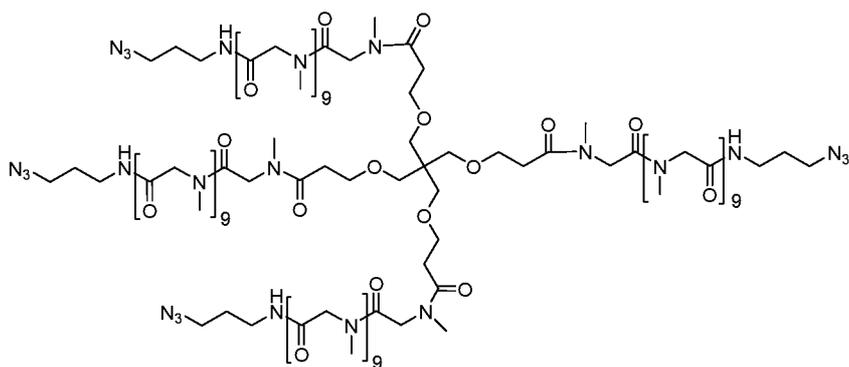
Смесь соединения 3 (500,0 мг, 489,19 мкмоль, 1,0 экв.), соединения 4 (257,6 мг, 489,19 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DCM (5 мл), а затем проводили добавление НОВt (132,2 мг, 978,37 мкмоль, 2,0 экв.), EDCI (187,6 мг, 978,37 мкмоль, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 3 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (ММ: 1529,80 наблюдаемое m/z : 765,9 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия). Соединение 3 (420 мг, 246,94 мкмоль, выход 50,48%) получали в виде бесцветного масла.

Соединение 5 (420 мг, 274,38 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в DMF (4 мл), а затем добавляли пиперидин (865,2 мг, 10,16 ммоль, 1 мл, 37 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 5 израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 1308,48, наблюдаемое m/z : 654,8($[M/2+H]^+$)). Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). Соединение 10N (386 мг, 265,50 мкмоль, выход 96,76%) получали в виде бесцветного масла.

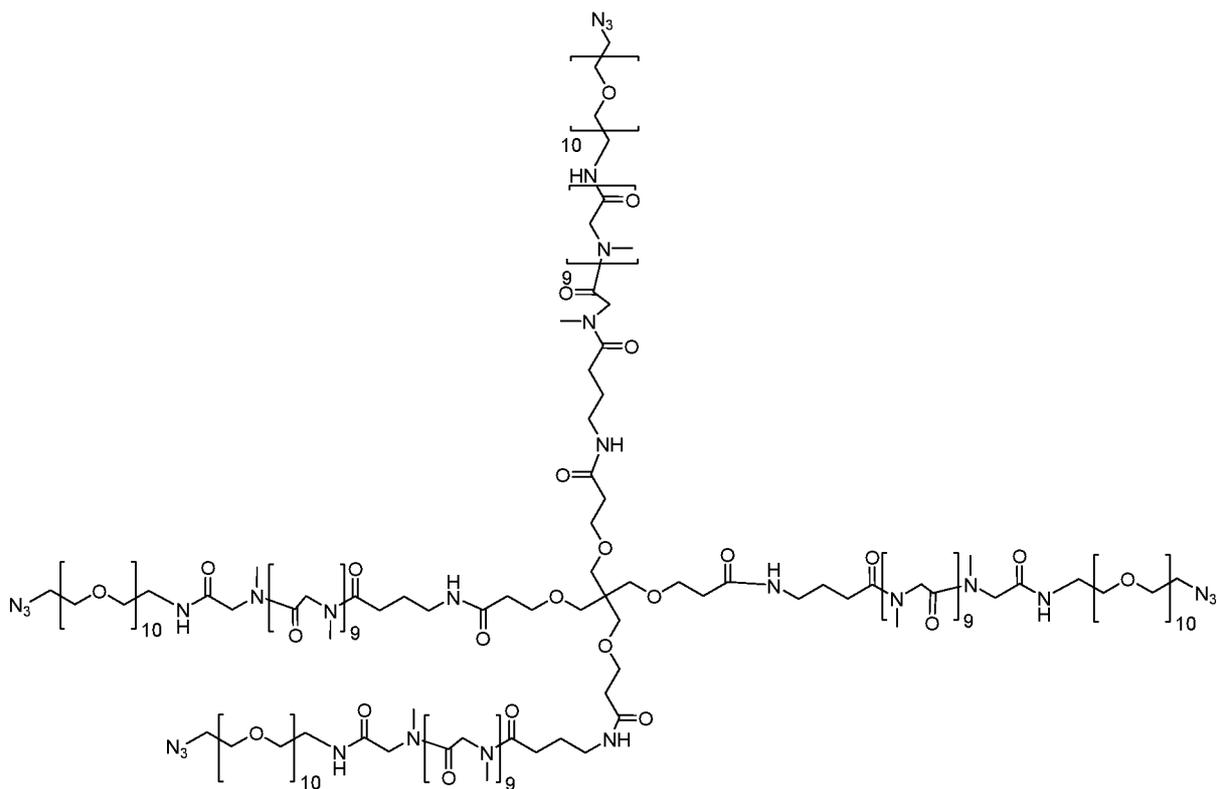
Соединение 14:







14G



14H

Соединение 14A:

К раствору соединения 13 (100 мг, 235,63 мкмоль, 1 экв.) в DMF (1 мл) добавляли EDCI (200 мг, 1,04 ммоль, 4,43 экв.) и HOBT (140 мг, 1,04 ммоль, 4,4 экв.) и DIPEA (185,50 мг, 1,44 ммоль, 0,25 мл, 6,09 экв.), а затем капельно добавляли соединение 10A (500 мг, 949,45 мкмоль, 4,03 экв.) в DMF (1 мл). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 ч. LC-MS продемонстрировала, что не оставалось реагента 1. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаруживалось ~50% желаемого соединения. Реакционную смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением соединения 14A (385 мг, 148,75 мкмоль, выход 63,13%, чистота 95%) в виде светло-желтого масла.

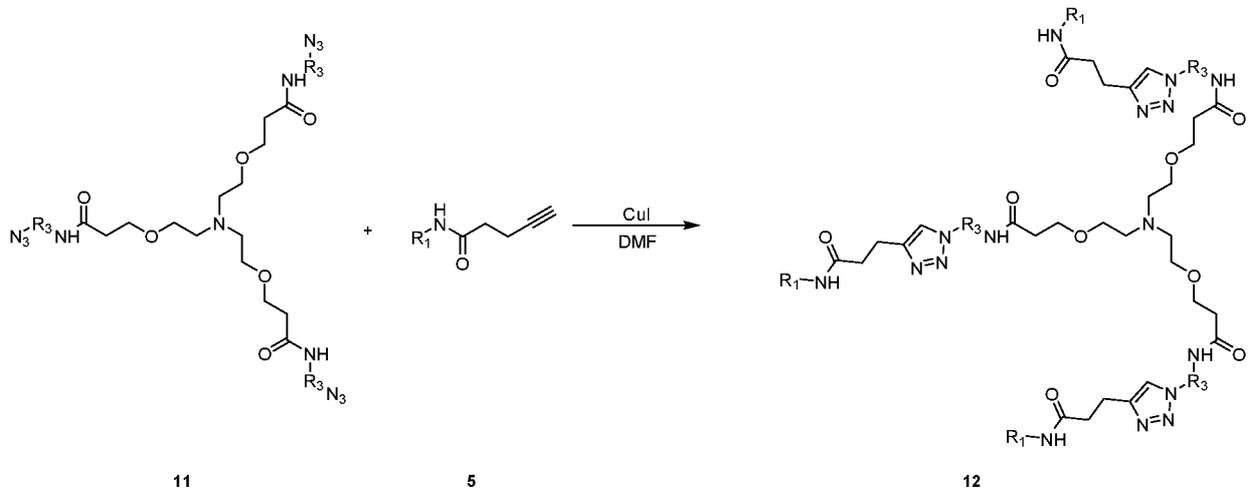
Соединение 14B:

К раствору соединения 13 в DMF (1 мл) добавляли HOBT (56 мг, 414,45 мкмоль, 4,40 экв.) и EDCI (80 мг, 417,32 мкмоль, 4,43 экв.) и DIEA (73,09 мг, 565,51 мкмоль, 98,50

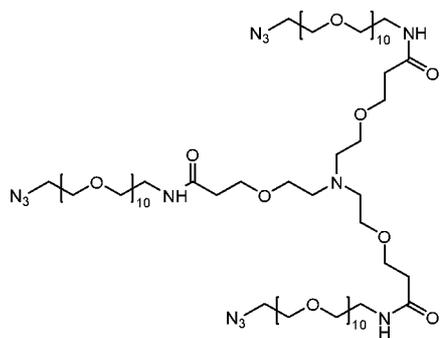
мкл, 6,0 экв.), а затем капельно добавляли соединение 10В (420 мг, 382,06 мкмоль, 4,05 экв.) в DMF (1 мл). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч. LC-MS продемонстрировала, что не оставалось соединения 13. Было показано несколько пиков на LC-MS и обнаруживалось 50% желаемого соединения. Смесь очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением соединения 14В (225 мг, 47,37 мкмоль, выход 50,26%, чистота 100%) в виде белого твердого вещества.

Соединения 14С, 14D, 14Е, 14F, 14G и 14Н синтезировали аналогично тому, как описано выше для соединения 14В с использованием соединения 13, и одного из соединений 10А, 10В, 10С, 10D, 10Е, 10F, 10G и 10N в качестве исходных материалов, EDCI в качестве реагента для присоединения и DIPEA в качестве основания.

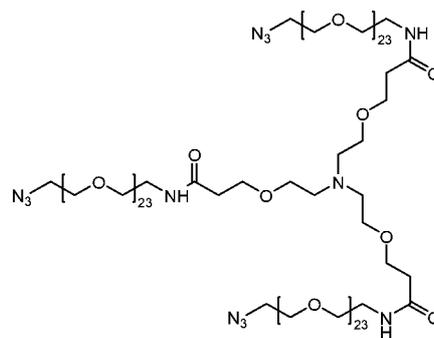
Общая методика получения тримерных бициклических конъюгатов соединения



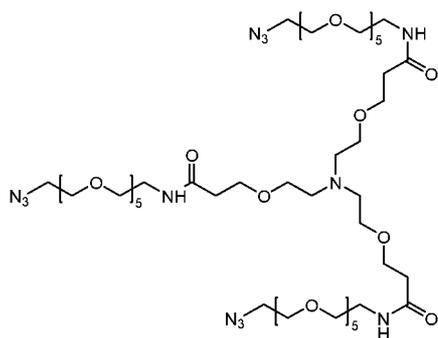
Соединение 11:



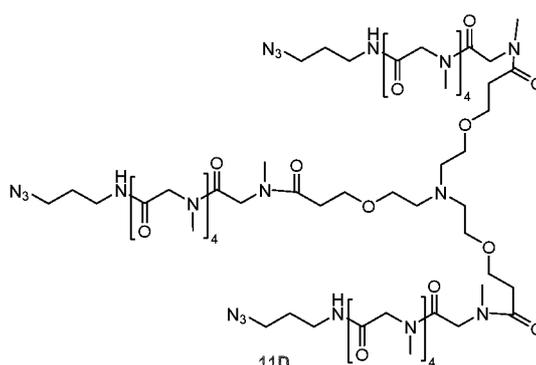
11A



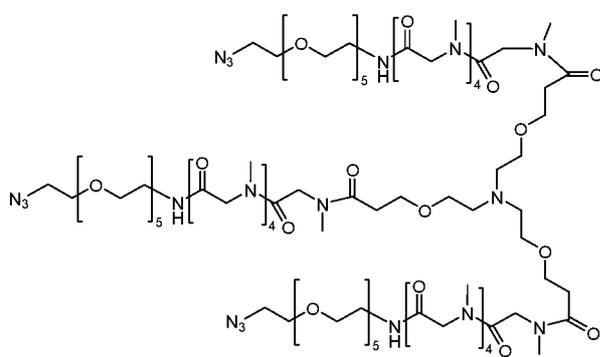
11B



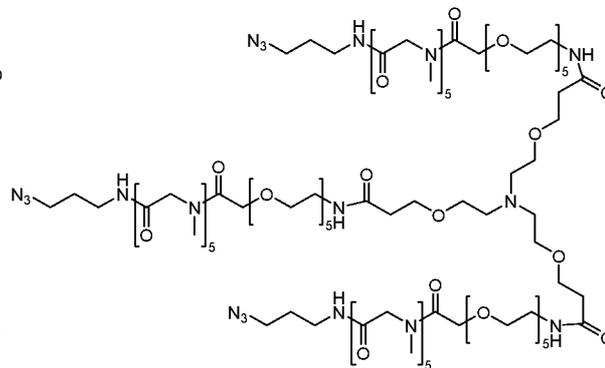
11C



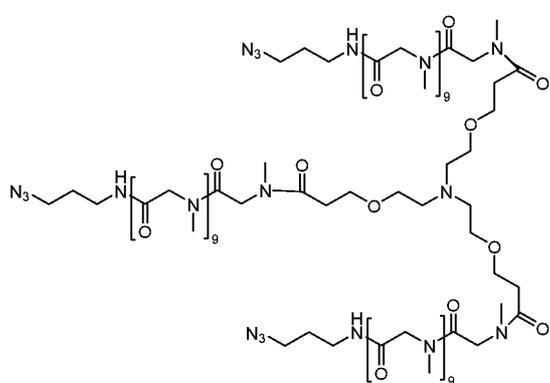
11D



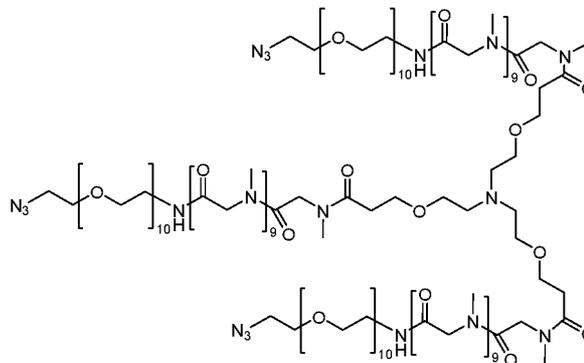
11E



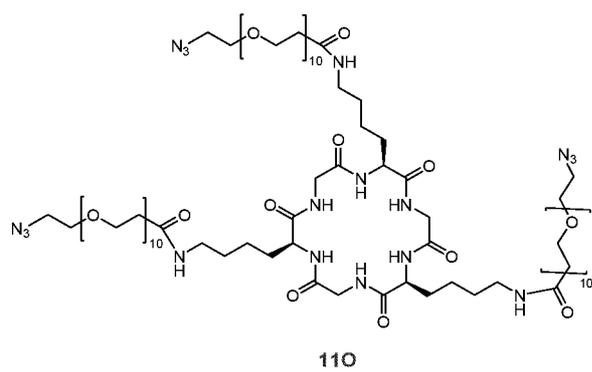
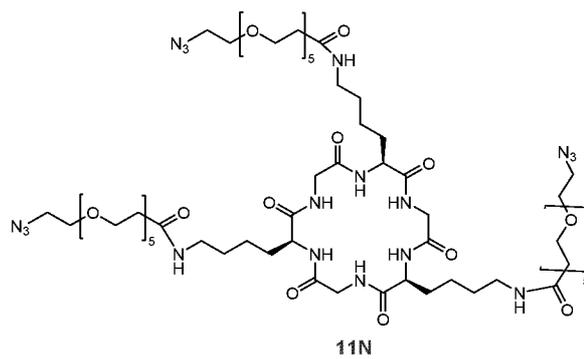
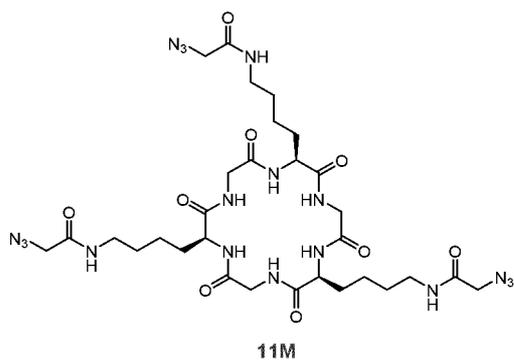
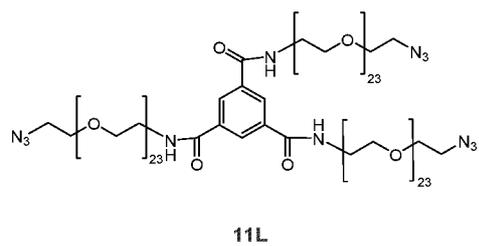
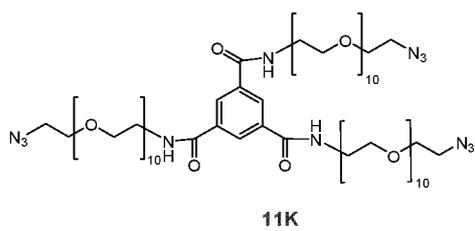
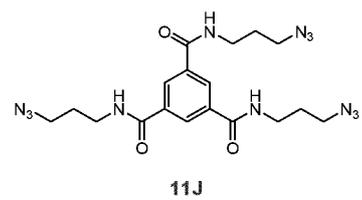
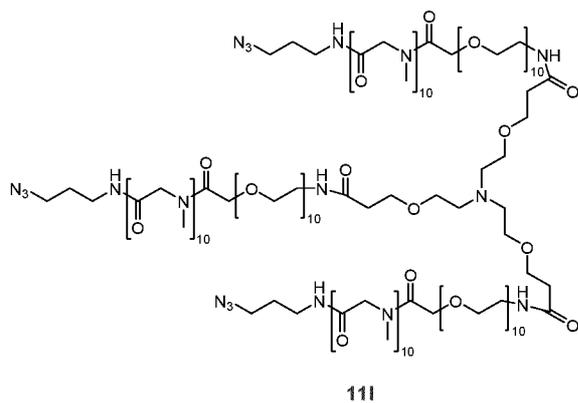
11F



11G

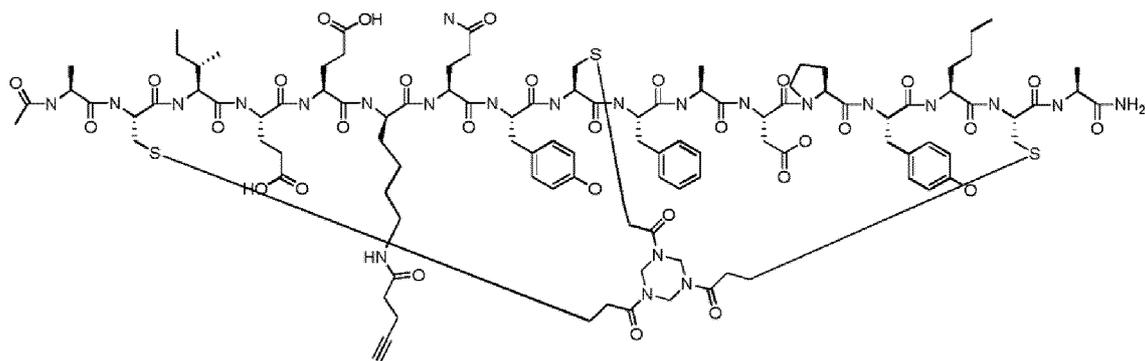


11H

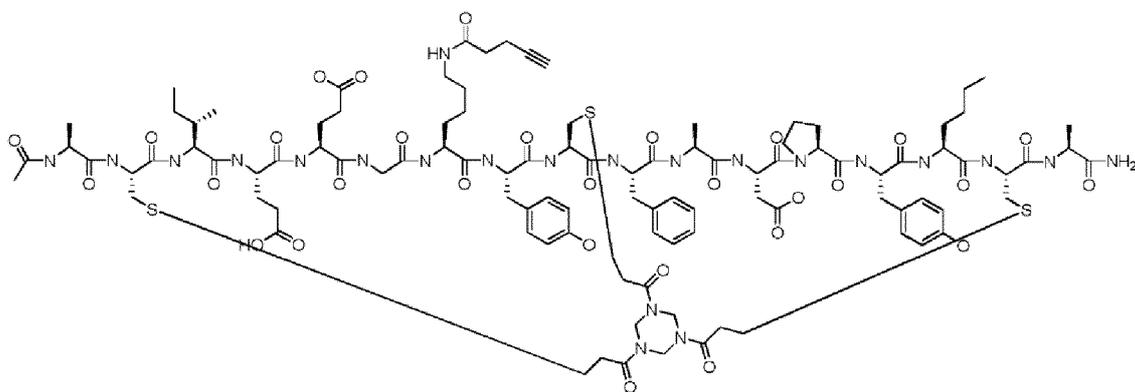


Соединение 5:

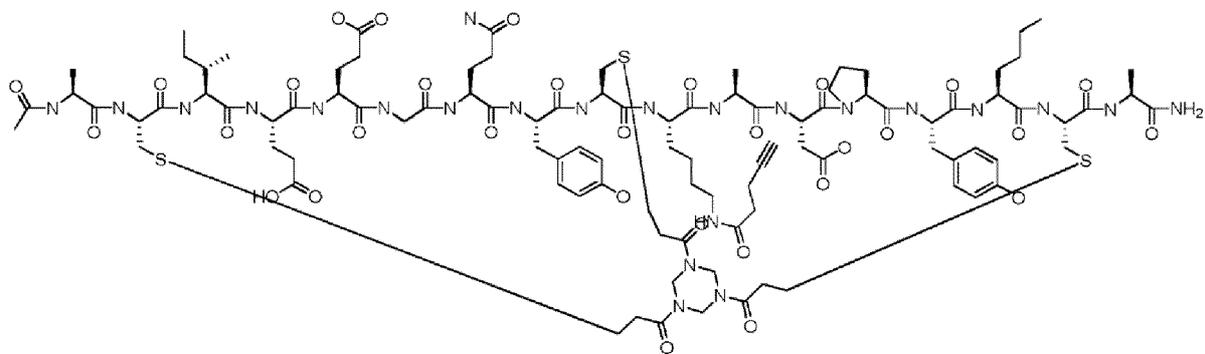
Мономер 4A



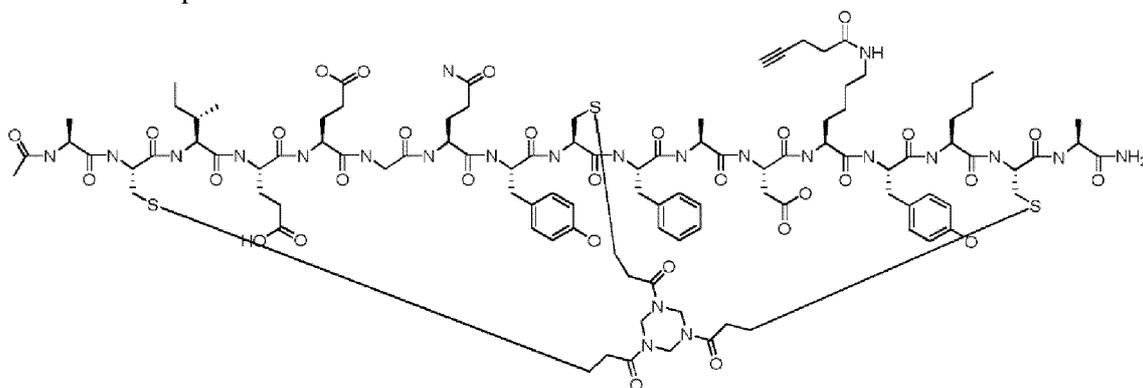
Мономер 5A



Мономер 6A

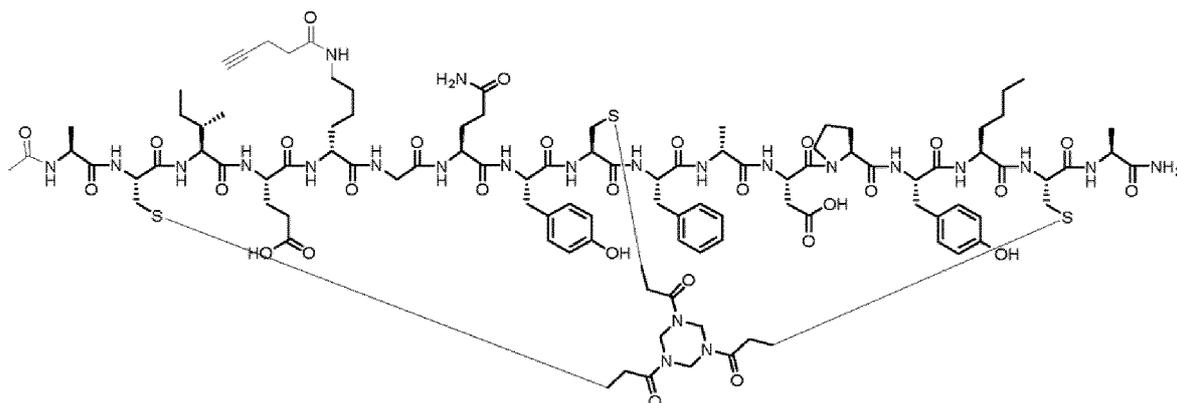


Мономер 7A

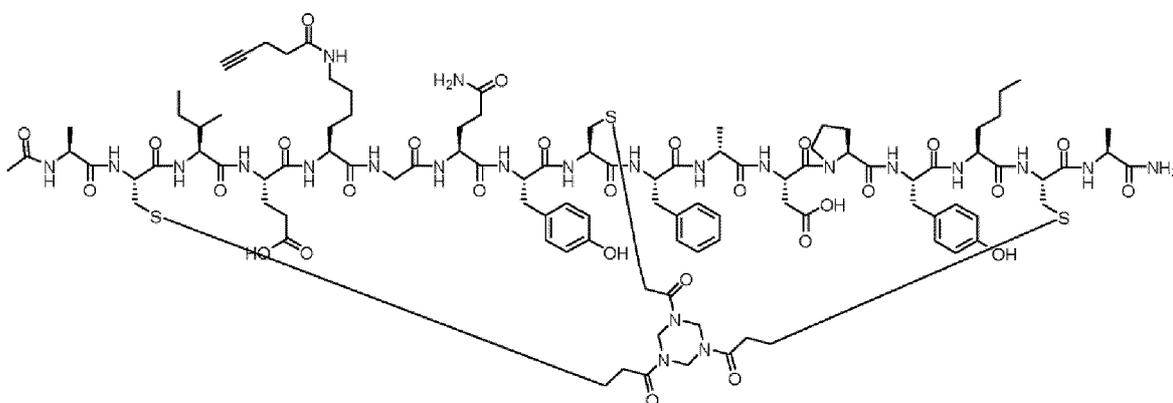


Мономер 8A

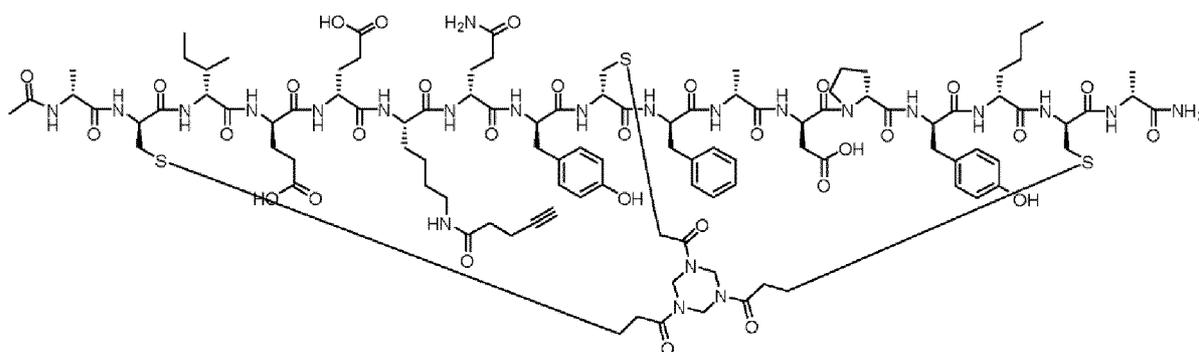
Мономер 12A



Мономер 13A

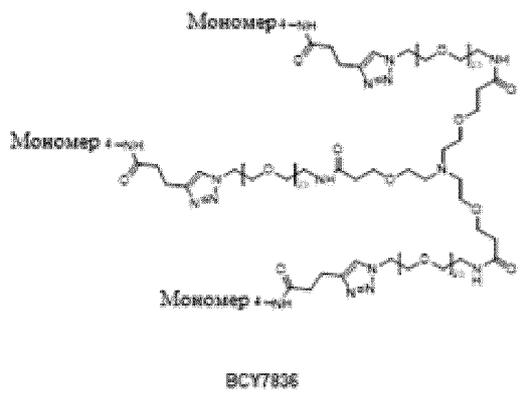
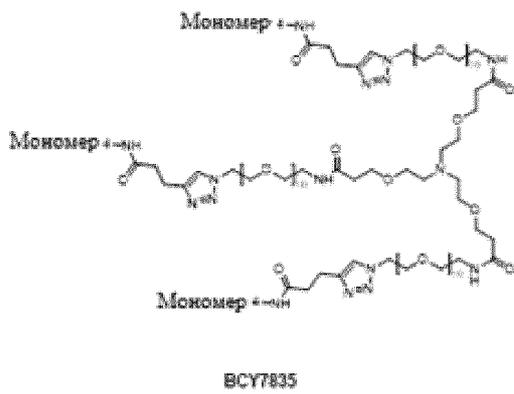
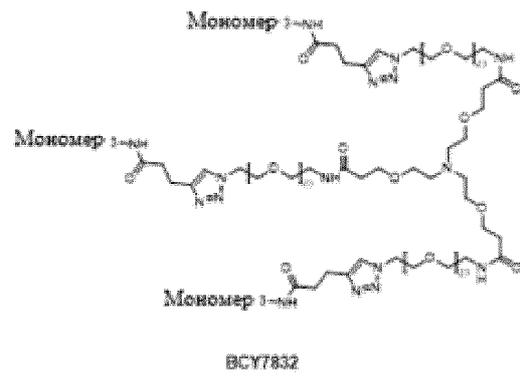
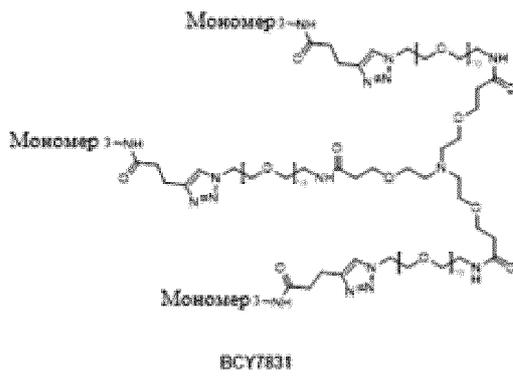
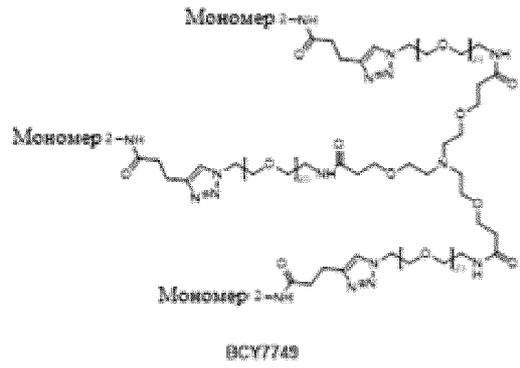
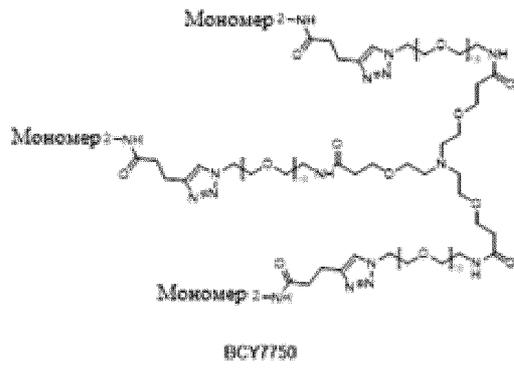
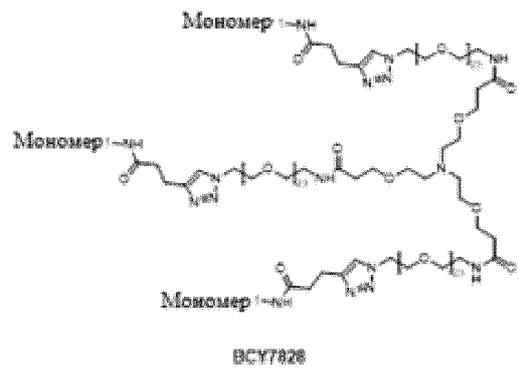
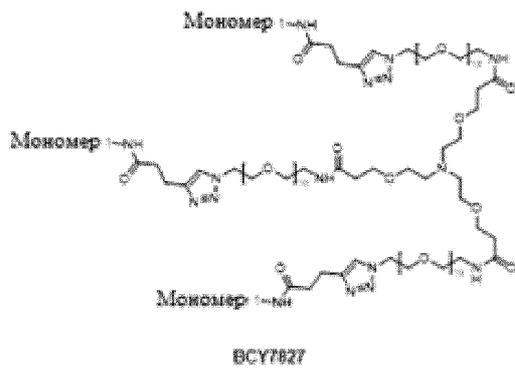


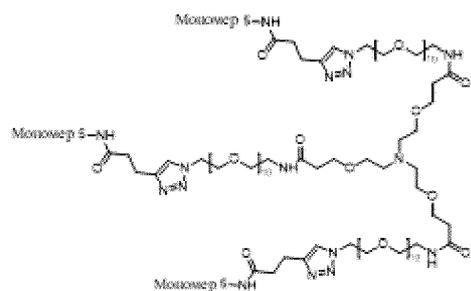
Мономер 14A



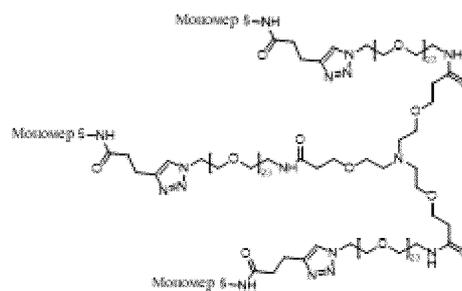
Мономер 15A

Соединение 12:

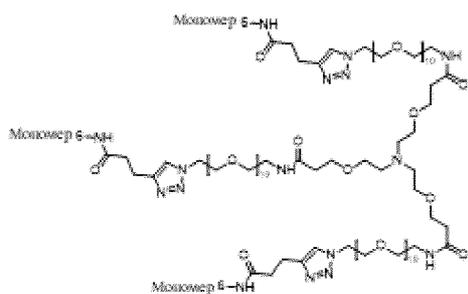




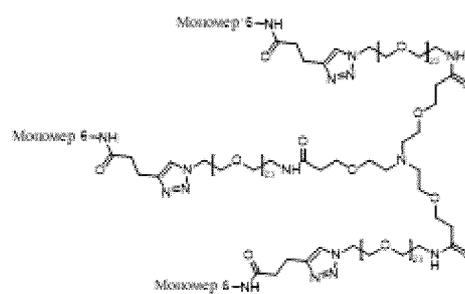
BSY7839



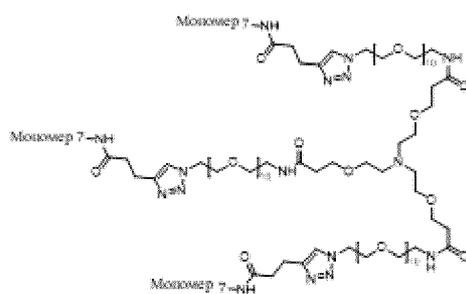
BSY7840



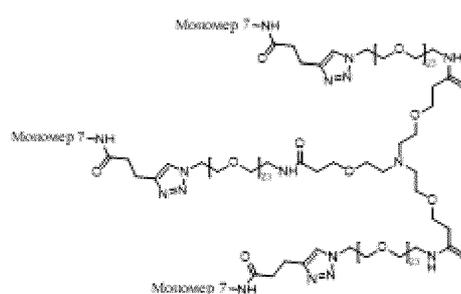
BSY7743



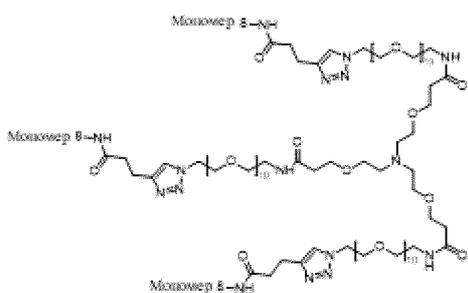
BSY7744



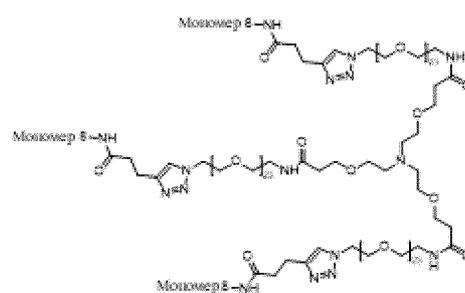
BSY7847



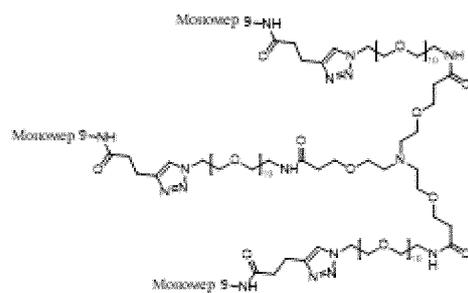
BSY7848



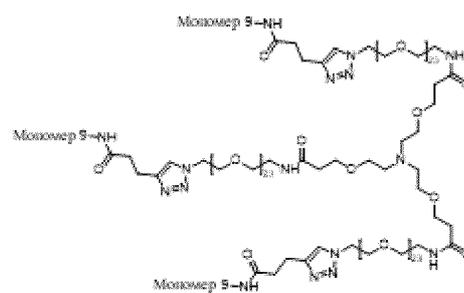
BSY7851



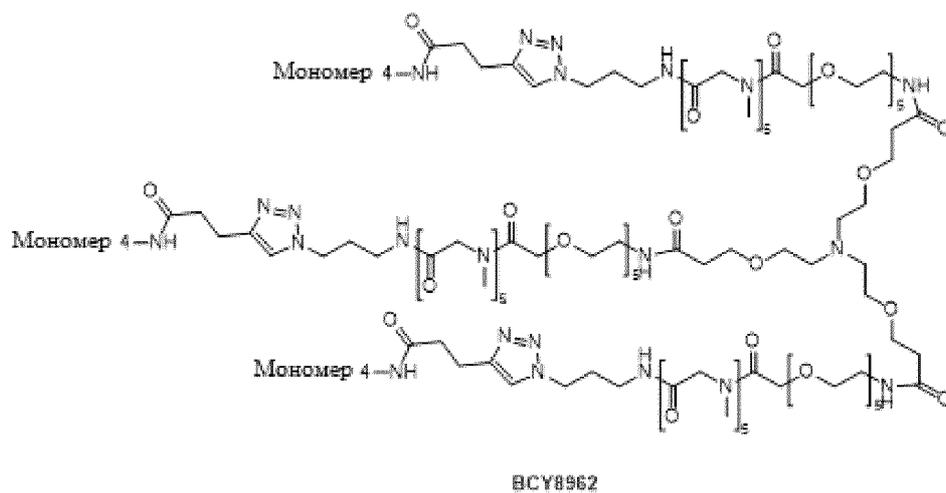
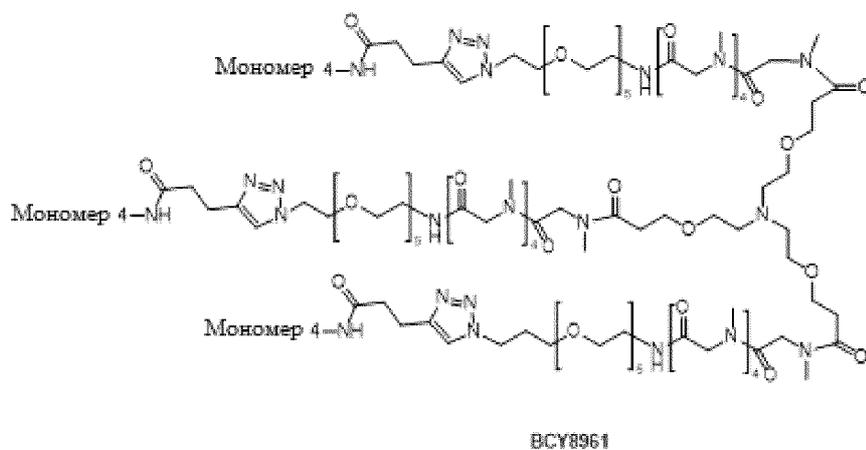
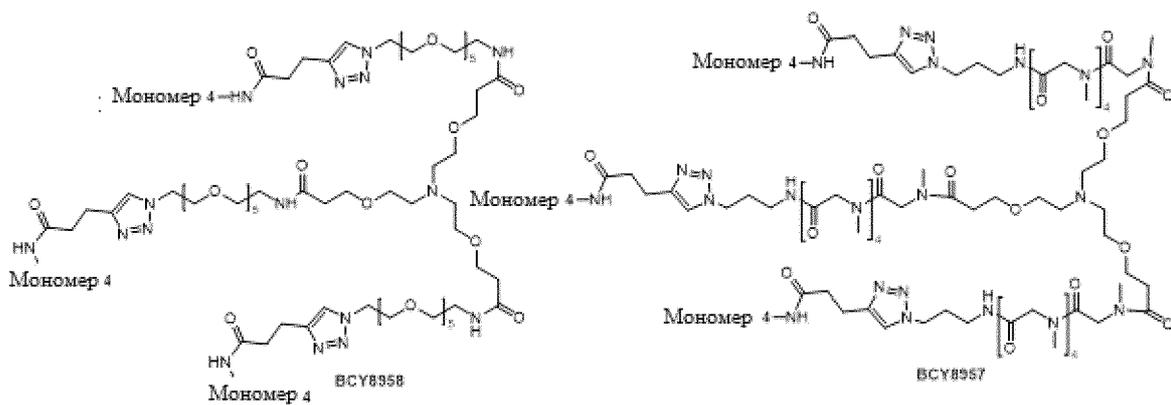
BSY7852

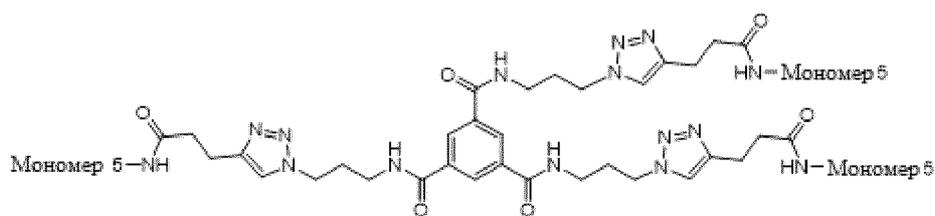


BSY7855

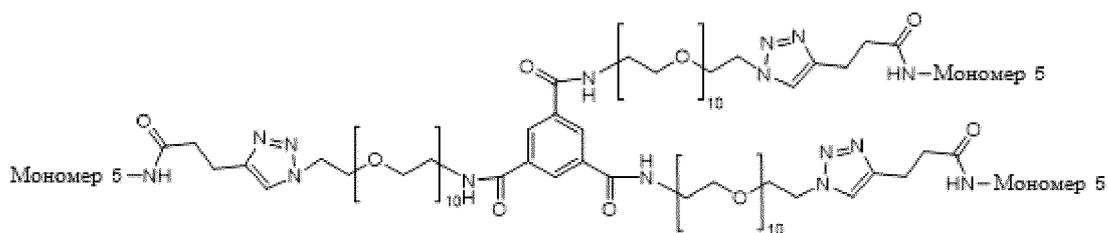


BSY7856

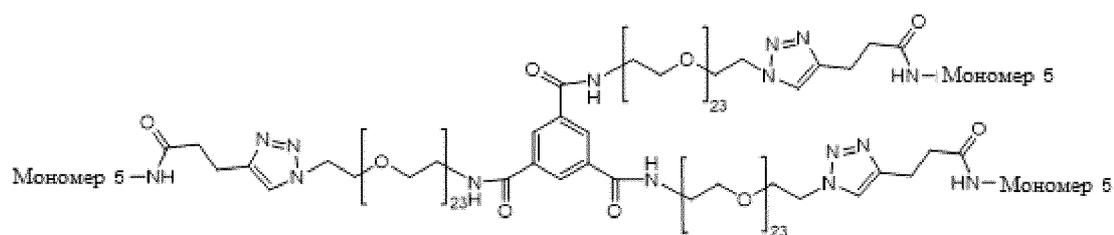




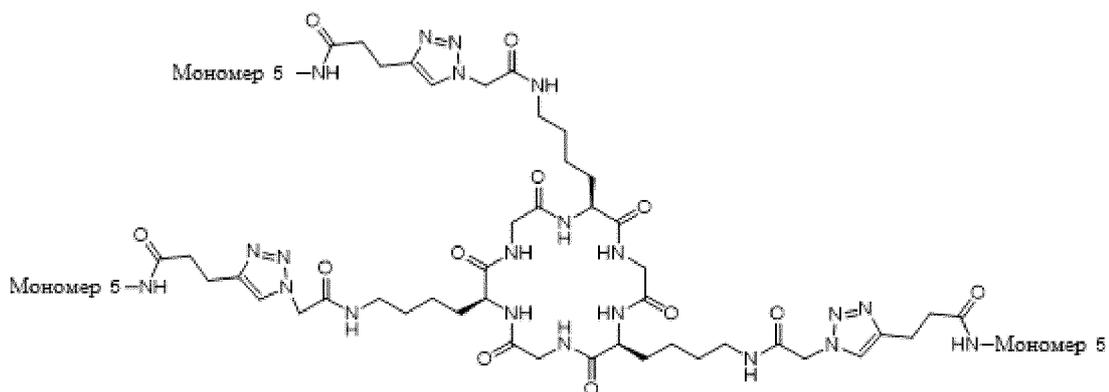
BCY11382



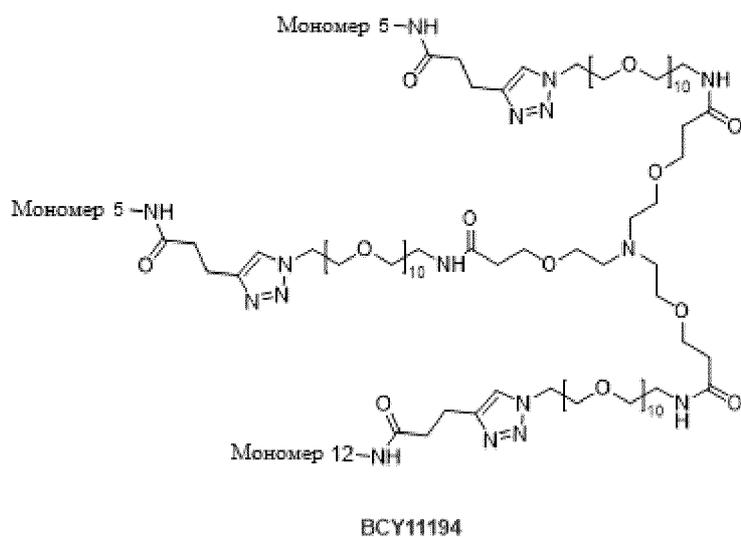
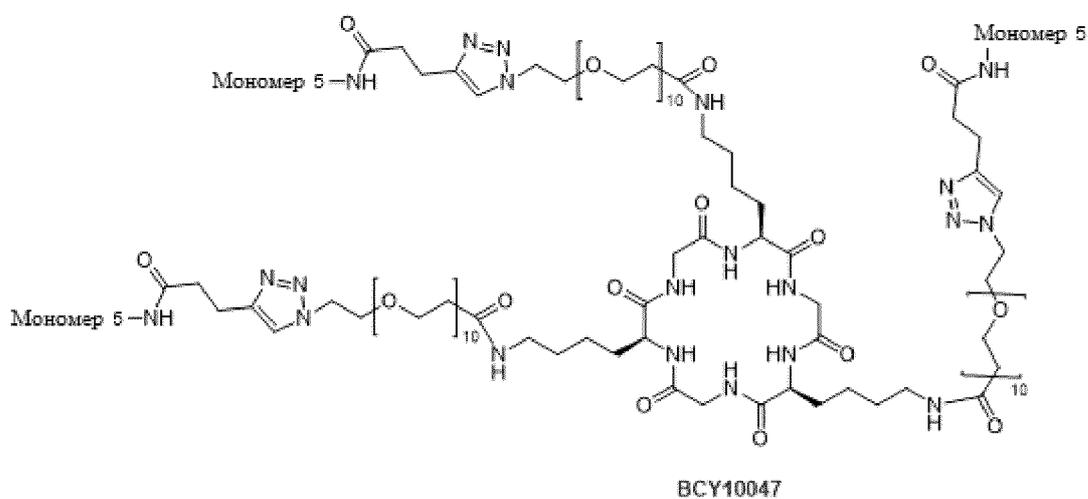
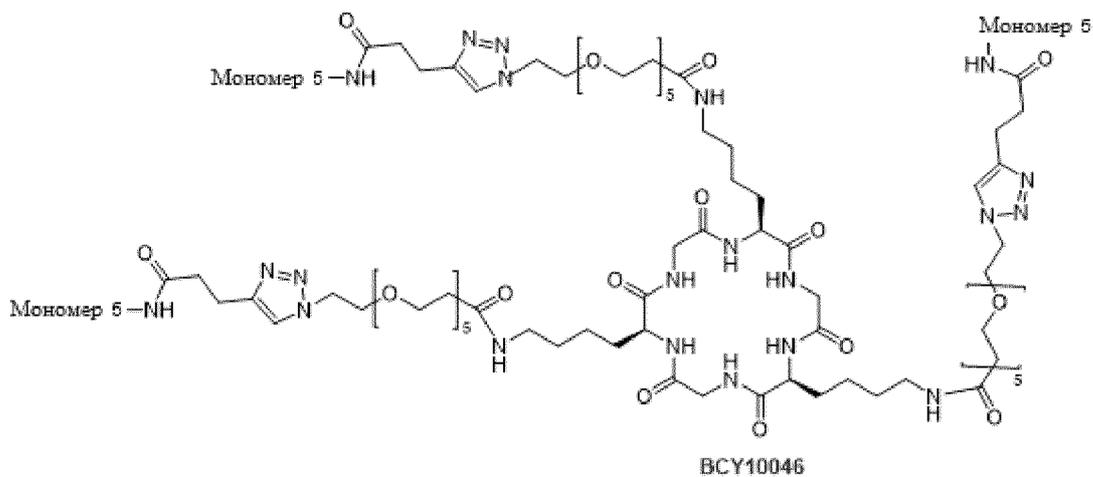
BCY9775



BCY9776



BCY11383



BCY7827:

К раствору соединения 11A (4 мг, 2,12 мкмоль, 1 экв.) и мономера 1A (28,2 мг, 12,69 мкмоль, 6,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли раствор CuSO_4 (0,8 М, 23,79 мкл, 9,0 экв.) и (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (0,8 М, 158,63 мкл, 60

экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7827 (9,1 мг, 0,96 мкмоль, выход 45,37%, чистота 90,3%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7828:

К раствору соединения 11В (4 мг, 1,11 мкмоль, 1 экв.) и мономера 1А (15 мг, 6,74 мкмоль, 6,08 экв.) в DMF (1 мл) добавляли раствор CuSO₄ (0,8 М, 12,47 мкл, 9,0 экв.) и (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (0,8 М, 83,12 мкл, 60 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7828 (5,7 мг, 5,05e-1 мкмоль, выход 45,60%, чистота 91,17%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7750:

К раствору соединения 11А (4 мг, 2,12 мкмоль, 1 экв.) и мономера 2А (30 мг, 13,15 мкмоль, 6,22 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuI (6,00 мг, 31,73 мкмоль, 15 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7750 (7,3 мг, 6,85e-1 мкмоль, выход 32,41%, чистота 82,02%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7749:

К раствору соединения 11В (48 мг, 13,30 мкмоль, 1 экв.) и мономера 2А (136,54 мг, 59,85 мкмоль, 4,5 экв.) в DMF (6 мл) добавляли CuI (38,0 мг, 199,49 мкмоль, 15 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7749 (22,4 мг, 1,39 мкмоль, выход 10,43%, чистота 64,72%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7831:

К раствору соединения 11А (4 мг, 2,12 мкмоль, 1 экв.) и мономера 3А (21,56 мг, 9,52 мкмоль, 4,5 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuI (6,00 мг, 31,73 мкмоль, 15 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали

посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7831 (1,4 мг, 1,48e-1 мкмоль, выход 6,98%, чистота 91,6%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7832:

К раствору соединения 11В (4 мг, 1,11 мкмоль, 1 экв.) и мономера 3А (11,30 мг, 4,99 мкмоль, 4,5 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuI (3,17 мг, 16,62 мкмоль, 15 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7832 (1,5 мг, 9,40e-2 мкмоль, выход 8,49%, чистота 65,24%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7835:

К раствору соединения 11А (32 мг, 16,92 мкмоль, 1 экв.) и мономера 4А (172,51 мг, 76,14 мкмоль, 4,5 экв.) в DMF (4 мл) добавляли CuI (48,34 мг, 253,81 мкмоль, 15 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7835 (19,8 мг, 2,08 мкмоль, выход 12,28%, чистота 91,16%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7836:

К раствору соединения 11В (4 мг, 1,11 мкмоль, 1 экв.) и мономера 4А (15,07 мг, 6,65 мкмоль, 6,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли раствор CuSO₄ (0,8 М, 12,47 мкл, 9,0 экв.) и (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (0,8 М, 83,12 мкл, 60 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7836 (2 мг, 1,15e-1 мкмоль, выход 10,40%, чистота 59,97%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7839:

Смесь соединения 11А (0,2 г, 105,75 мкмоль, 1 экв.), мономера 5А (750 мг, 320,8 мкмоль, 3,03 экв.) и ТНРТА (0,4 М, 264,4 мкл, 1 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 12 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 265 мкл, 1 экв.) и VcNa (0,4 М, 529 мкл, 2 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 посредством капельного добавления 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 трет-БуОН/Н₂О), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что соединение 11А израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z [MM: 8904,11, наблюдаемое m/z: 1271,92 ([M/7+H⁺]), 1113,07 ([M/8+H⁺]), и 989,65 ([M/9+H⁺])].

Реакционную смесь сразу очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). ВСУ7839 (283,7 мг, 30,40 мкмоль, выход 28,74%, чистота 95,40%) получали в виде белого твердого вещества.

ВСУ7840:

К раствору соединения 11В (4 мг, 1,11 мкмоль, 1 экв.) и мономера 5А (11,66 мг, 4,99 мкмоль, 4,5 экв.) в DMF (0,5 мл) добавляли CuI (3,17 мг, 16,62 мкмоль, 15 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7840 (2,9 мг, 2,54e-1 мкмоль, выход 22,91%, чистота 93,00%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7743:

К раствору соединения 11А (4 мг, 2,12 мкмоль, 1 экв.) и мономера 6А (19,18 мг, 8,46 мкмоль, 4,5 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuI (6,04 мг, 31,73 мкмоль, 15 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7743 (4 мг, 3,85e-1 мкмоль, выход 18,19%, чистота 83,56%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7744:

К раствору соединения 11В (4 мг, 1,11 мкмоль, 1 экв.) и мономера 6А (11,30 мг, 4,99 мкмоль, 4,5 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuI (3,17 мг, 16,62 мкмоль, 15 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7744 (4,2 мг, 1,79e-1 мкмоль, выход 16,17%, чистота 44,40%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7847:

К раствору соединения 11А (4 мг, 2,12 мкмоль, 1 экв.) и мономера 7А (28,52 мг, 12,69 мкмоль, 6 экв.) в DMF (1 мл) добавляли раствор CuSO₄ (0,8 М, 23,79 мкл, 9,0 экв.) и (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (0,8 М, 158,63 мкл, 60 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7847 (1,3 мг, 5,63e-2 мкмоль, выход 2,66%, чистота 37,4%) в виде белого твердого вещества.

BCY7848:

К раствору соединения 11B (4 мг, 1,11 мкмоль, 1 экв.) и мономера 7A (14,95 мг, 6,65 мкмоль, 6,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли раствор CuSO₄ (0,8 М, 12,47 мкл, 9,0 экв.) и (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (0,8 М, 83,12 мкл, 60 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7848 (2,7 мг, 2,46e-1 мкмоль, выход 22,23%, чистота 94,47%) в виде белого твердого вещества.

BCY7851:

К раствору соединения 11A (4 мг, 2,12 мкмоль, 1 экв.) и мономера 8A (21,87 мг, 9,52 мкмоль, 4,5 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuI (6,0 мг, 31,73 мкмоль, 15 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7851 (2,5 мг, 8,64e-2 мкмоль, выход 4,08%, чистота 30,35%) в виде белого твердого вещества.

BCY7852:

К раствору соединения 11B (4 мг, 1,11 мкмоль, 1 экв.) и мономера 8A (15,28 мг, 6,65 мкмоль, 6,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли раствор CuSO₄ (0,8 М, 12,47 мкл, 9,0 экв.) и (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (0,8 М, 83,12 мкл, 60 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7852 (1,2 мг, 9,85e-2 мкмоль, выход 8,89%, чистота 86,2%) в виде белого твердого вещества.

BCY7855:

К раствору соединения 11A (4 мг, 2,12 мкмоль, 1 экв.) и мономера 9A (21,72 мг, 9,52 мкмоль, 4,5 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuI (6,04 мг, 31,73 мкмоль, 15 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7855 (3,8 мг, 0,28 мкмоль, выход 13,25%, чистота 64,45%) в виде белого твердого вещества.

BCY7856:

К раствору соединения 11B (4 мг, 1,11 мкмоль, 1 экв.) и мономера 9A (15,17 мг,

6,65 мкмоль, 6,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли раствор CuSO_4 (0,8 М, 12,47 мкл, 9,0 экв.) и (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (0,8 М, 83,12 мкл, 60 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N_2 . LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7856 (5,7 мг, 5,05e-1 мкмоль, выход 45,60%, чистота 91,17%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ8958 (15,8 мг, чистота 93,9%, выход 22,7%), ВСУ8957 (15,1 мг, чистота 90,4%, выход 18%), ВСУ8961 (3,1 мг, чистота 93,3%, выход 5,4%), ВСУ8962 (12,8 мг, чистота 89,6%, выход 20,6%), ВСУ8965 (17,8 мг, чистота 92,9%, выход 41,4%), ВСУ9573 (6,2 мг, чистота 92,50%, выход 5,50%), ВСУ9595 (5,4 мг, чистота 95,50%, выход 6,60%), ВСУ11382 (81 мг, чистота 89,04%, выход 26,1%), ВСУ9775 (55,1 мг, чистота 95,01%, выход 51,93%), ВСУ9776 (11,5 мг, чистота 99,70%, выход 18,92%), ВСУ11383 (5,1 мг, чистота 85,46%, выход 8,97%), ВСУ10046 (12,6 мг, чистота 95,10%, выход 10,59%), ВСУ10047 (19,5 мг, чистота 94,69%, выход 25,65%) в каждом случае синтезировали аналогично тому, как описано выше для ВСУ7839, с использованием одного из соединений 11А, 11В, 11С, 11D, 11Е, 11F, 11G, 11H, 11I, 11J, 11K, 11L, 11M, 11N и 11O; и одного из мономера 4А, мономера 5А; и CuSO_4 , (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он и ТНРТА.

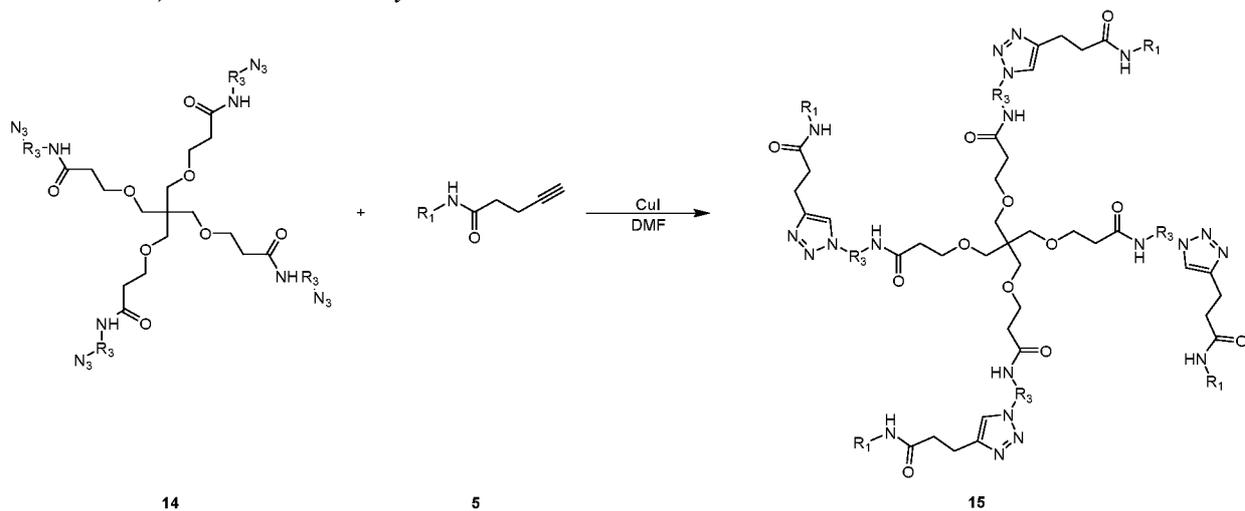
ВСУ11194:

Смесь соединения 11А (30 мг, 15,86 мкмоль, 1 экв.), мономера 12А (31,6 мг, 14,28 мкмоль, 0,9 экв.), и ТНРТА (8,0 мг, 1 экв.) растворяли в t-BuOH/ H_2O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), а затем добавляли CuSO_4 (0,4 М, 40,0 мкл, 1 экв.) и VcNa (0,4 М, 80,0 мкл, 2 экв.) в атмосфере N_2 . pH этого раствора довели до 8 капельным добавлением 0,2 М NH_4HCO_3 (в 1:1 t-BuOH/ H_2O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 4 ч в атмосфере N_2 . LC-MS продемонстрировала, что мономер 12А израсходовался полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (MS: 4108,77, наблюдаемое m/z: 1369,8 ($[\text{M}/3+\text{H}]^+$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA), и желаемые фракции объединяли и лиофилизировали с получением промежуточного соединения 1 (9,2 мг, 2,16 мкмоль, выход 13,63%, чистота 96,56%) в виде белого твердого вещества.

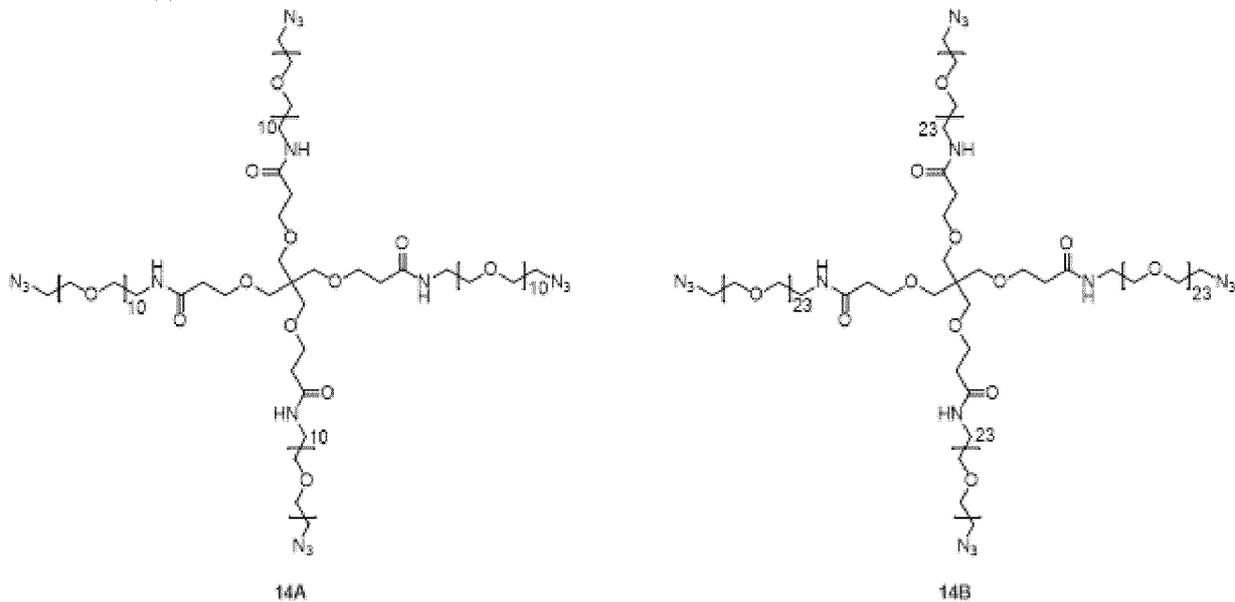
Смесь промежуточного соединения 1 (5 мг, 1,22 мкмоль, 1 экв.), мономера 5А (5,7 мг, 2,43 мкмоль, 2 экв.) и ТНРТА (1,1 мг, 2 экв.) растворяли в t-BuOH/ H_2O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), а затем добавляли CuSO_4 (0,4 М, 6,1 мкл, 2 экв.) и VcNa (0,4 М, 12,2 мкл, 4 экв.) в атмосфере N_2 . pH этого раствора довели до 8 капельным добавлением 0,2 М NH_4HCO_3 (в 1:1 t-BuOH/ H_2O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 4 ч в

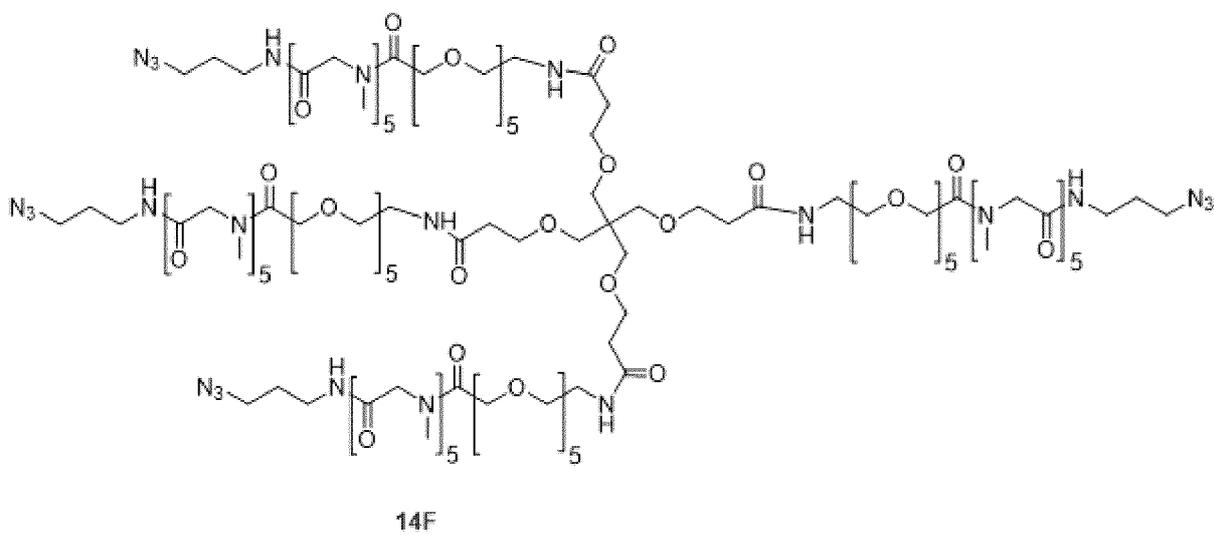
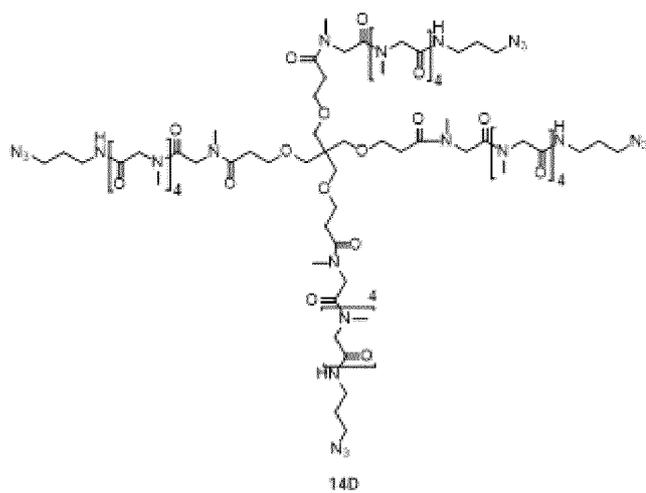
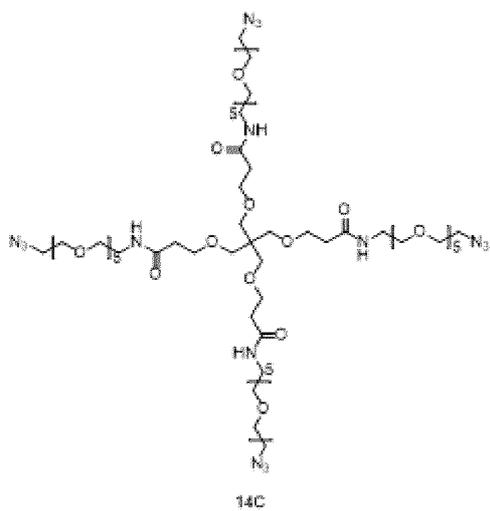
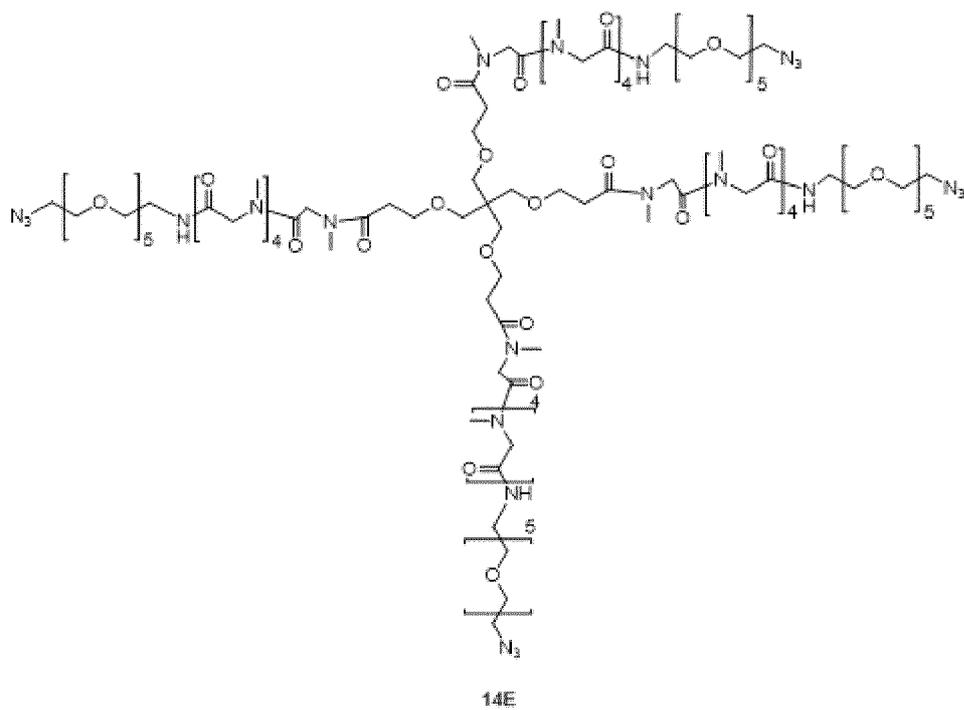
атмосфере N_2 . LC-MS продемонстрировала, что мономер 5А израсходовался полностью, и обнаружился один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 8784,05, наблюдаемое m/z : 1236,5($[M/7-H_2O+H^+]$), 1077,8($[M/8-H_2O+H^+]$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). ВСУ11194 (3,4 мг, выход 29,01%, чистота 91,2%) получали в виде белого твердого вещества.

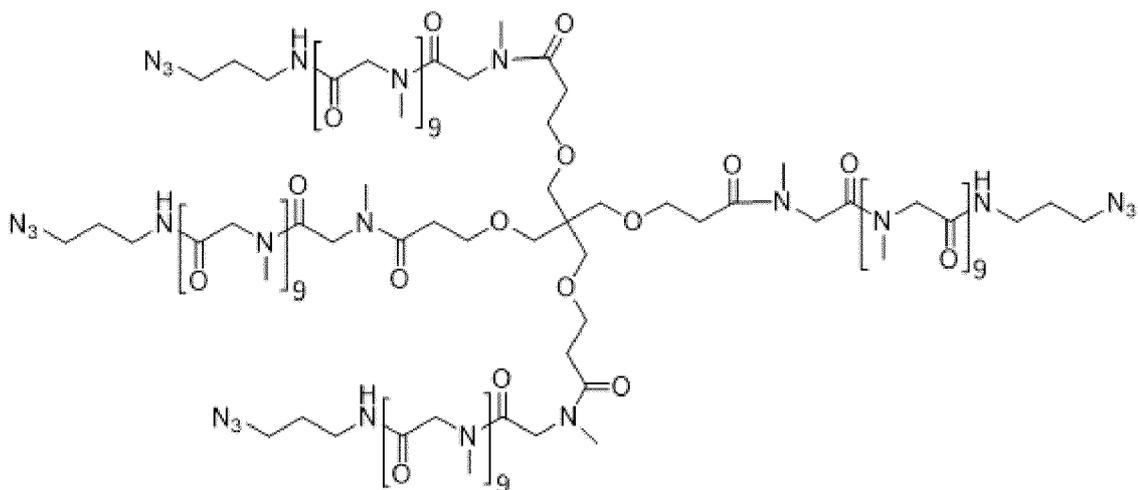
Общая методика получения соединения 15



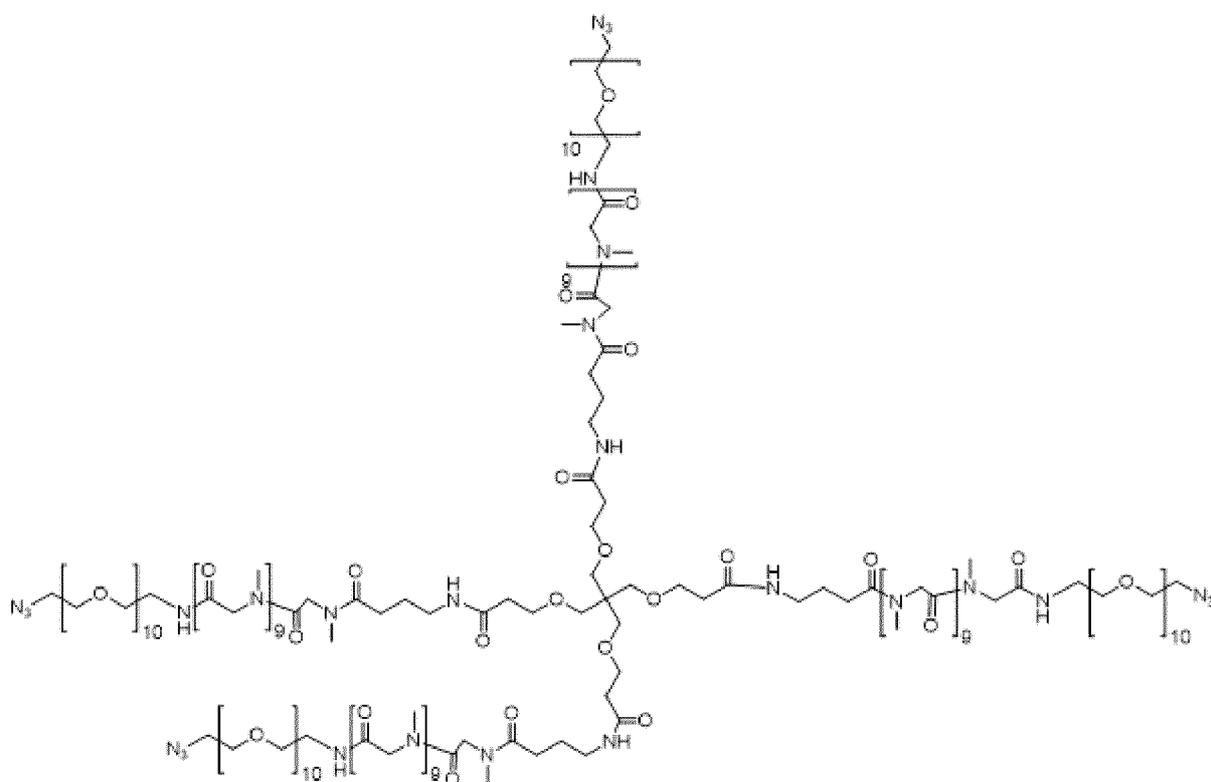
Соединение 14:





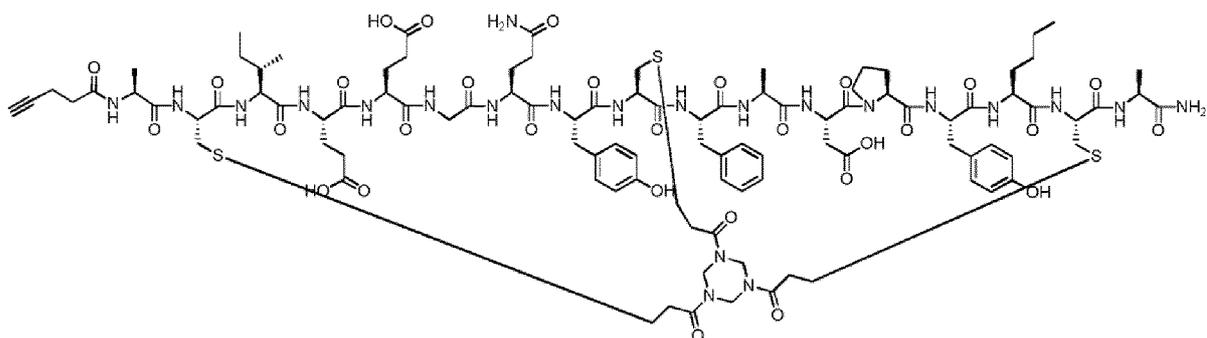


14G

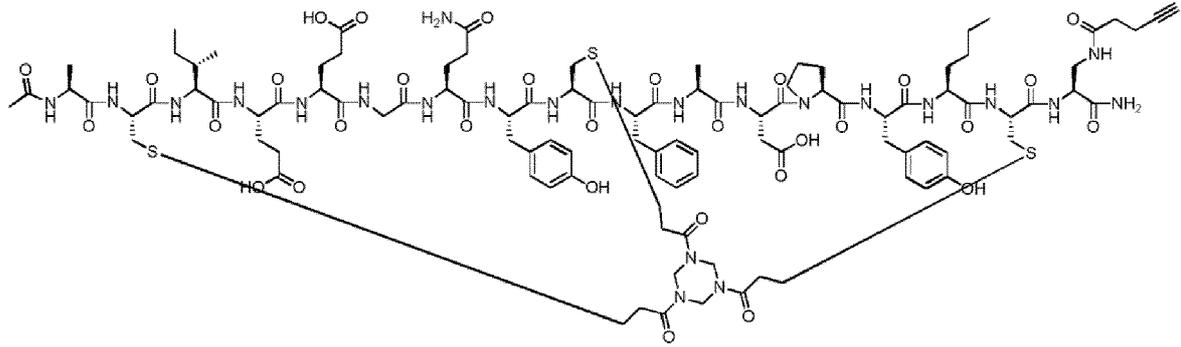


14H

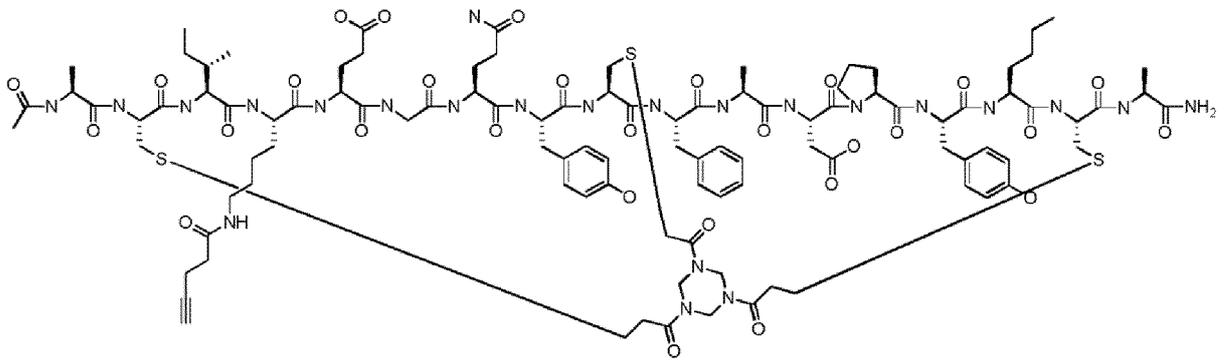
Соединение 5:



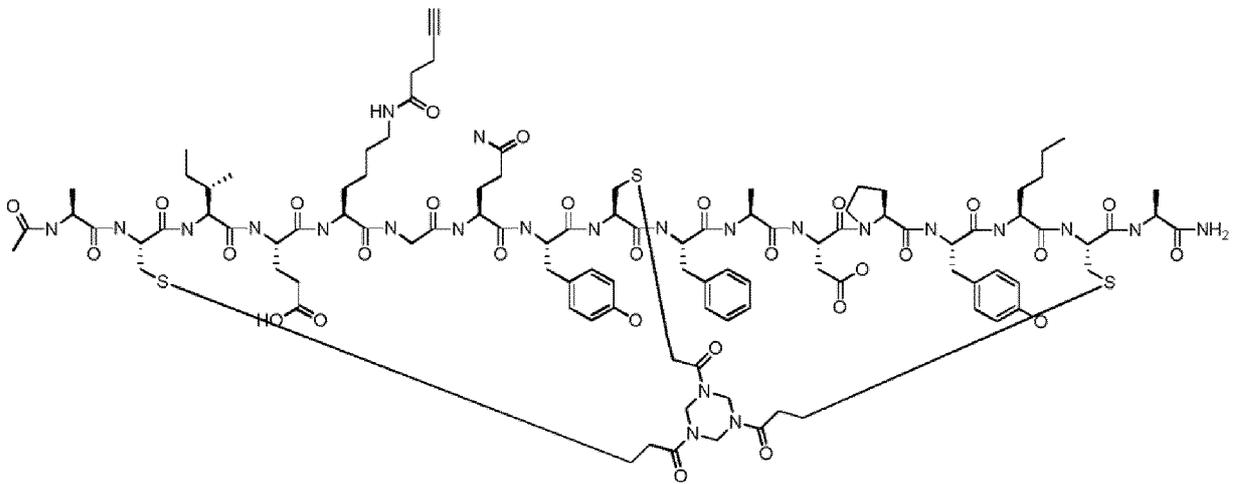
Мономер 1А



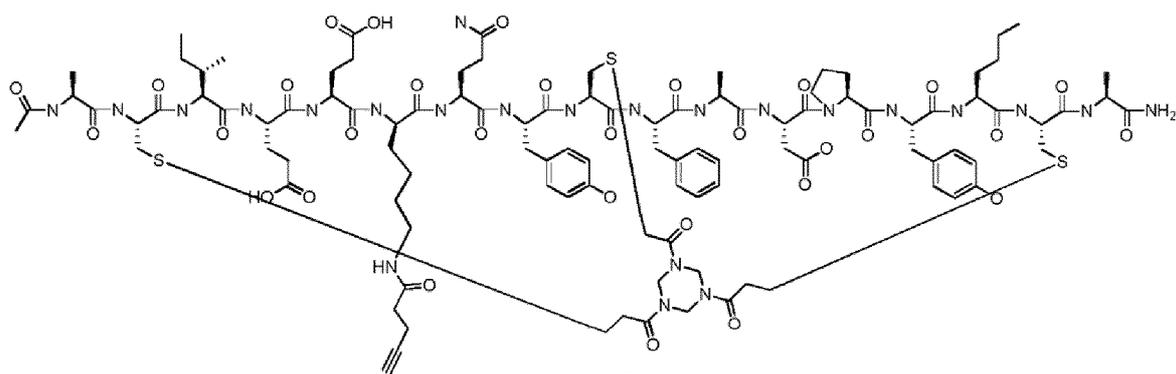
Мономер 2А



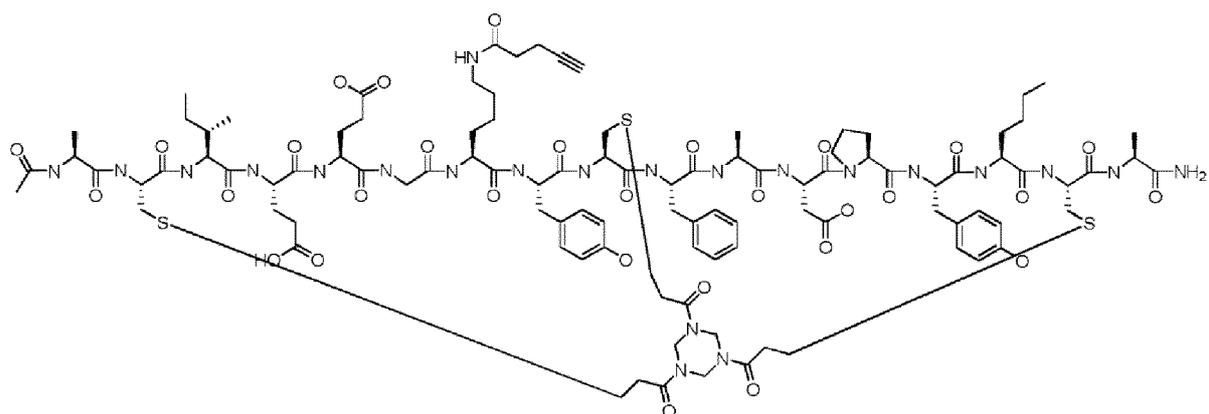
Мономер 3А



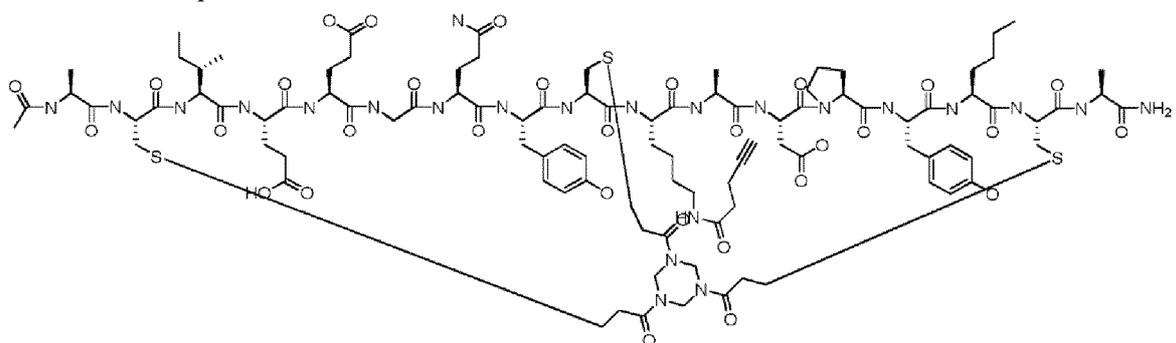
Мономер 4А



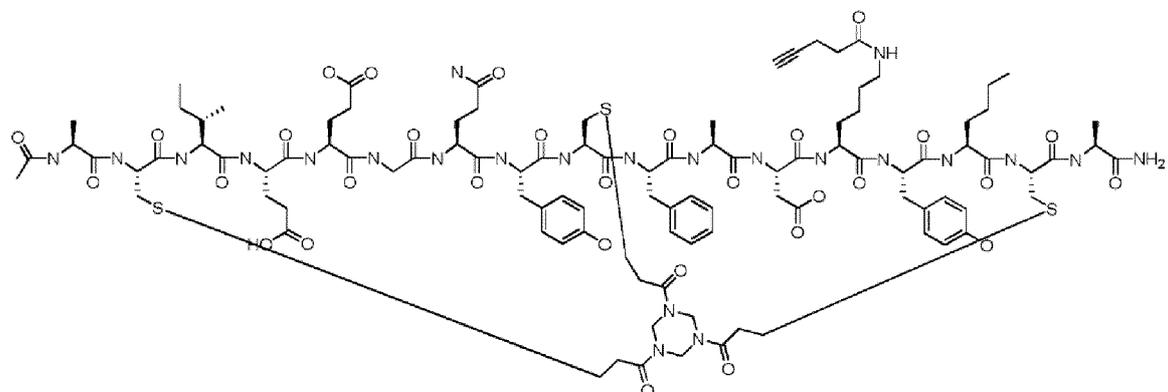
Мономер 5A



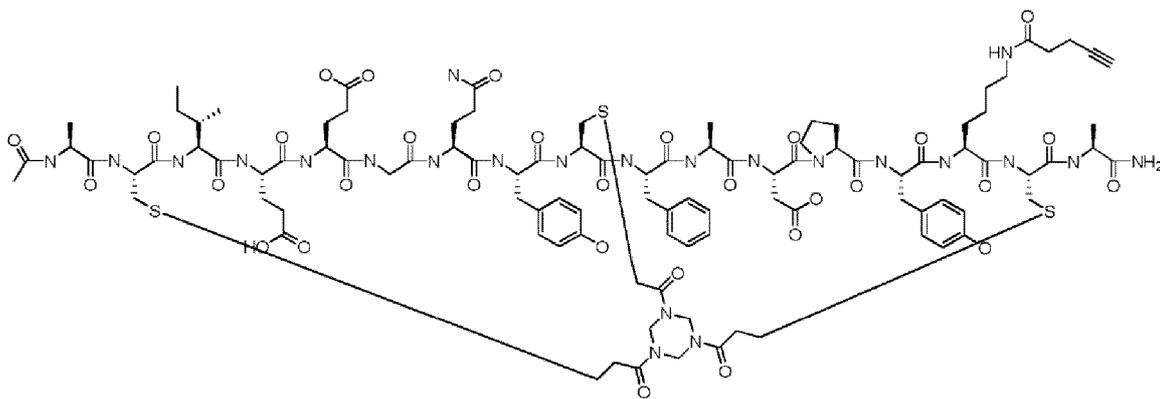
Мономер 6A



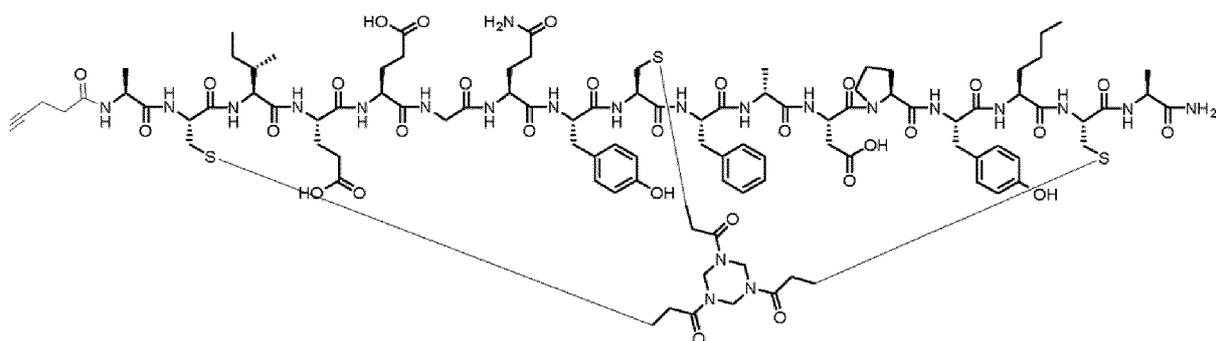
Мономер 7A



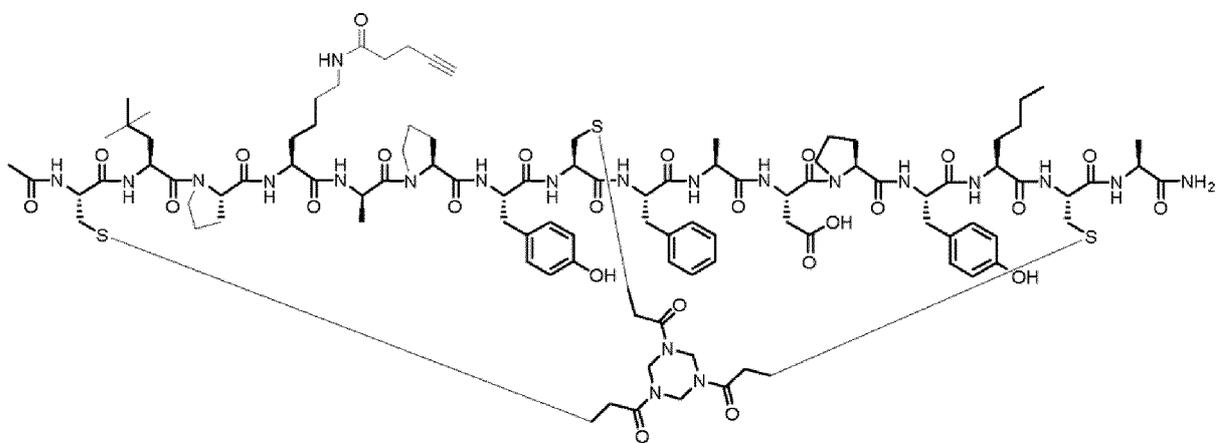
Мономер 8A



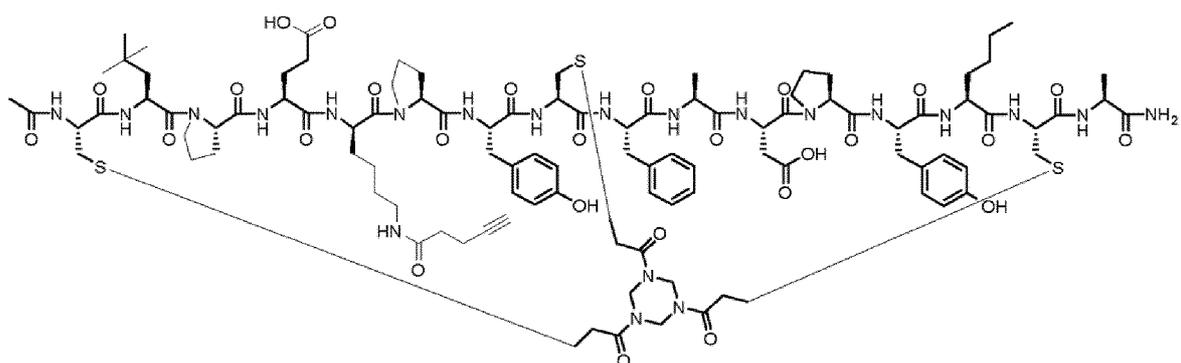
Мономер 9А



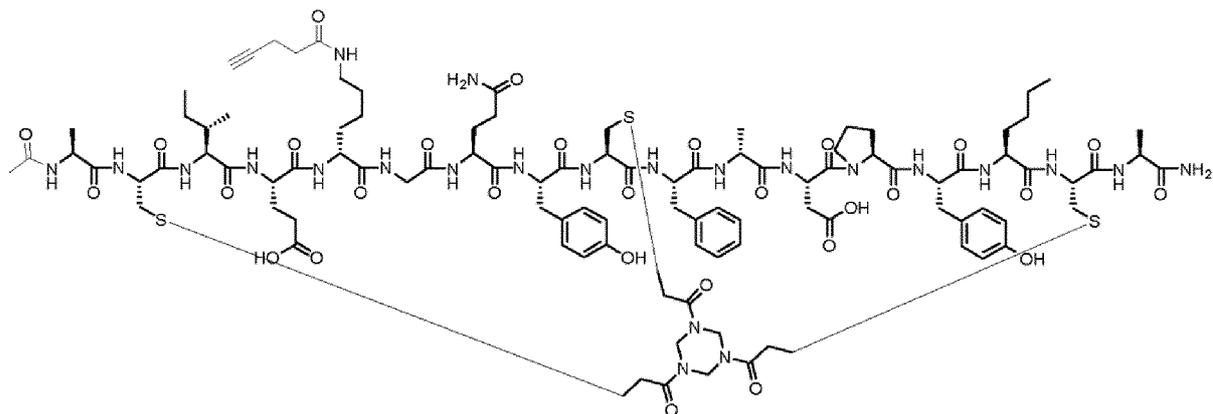
Мономер 10А



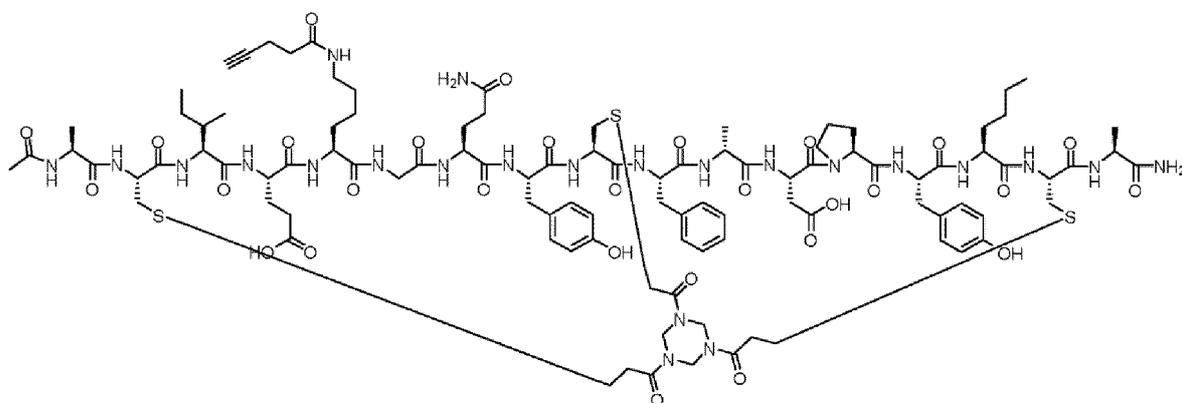
Мономер 11А



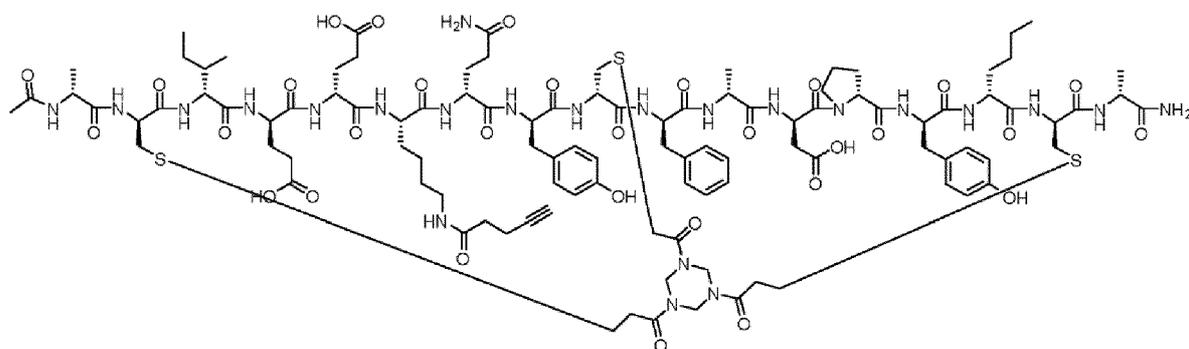
Мономер 12A



Мономер 13A

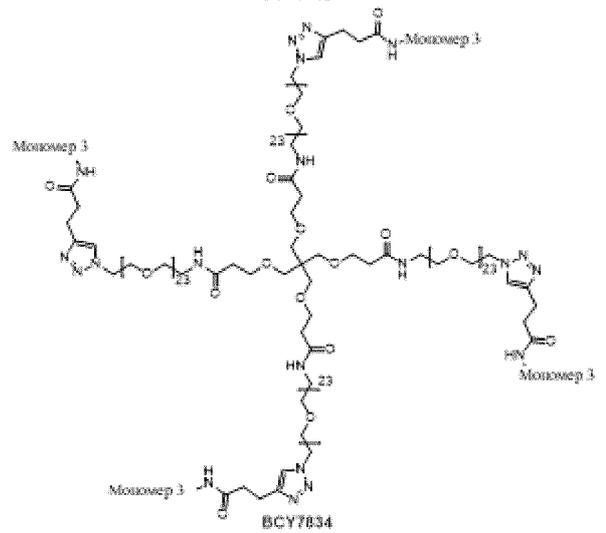
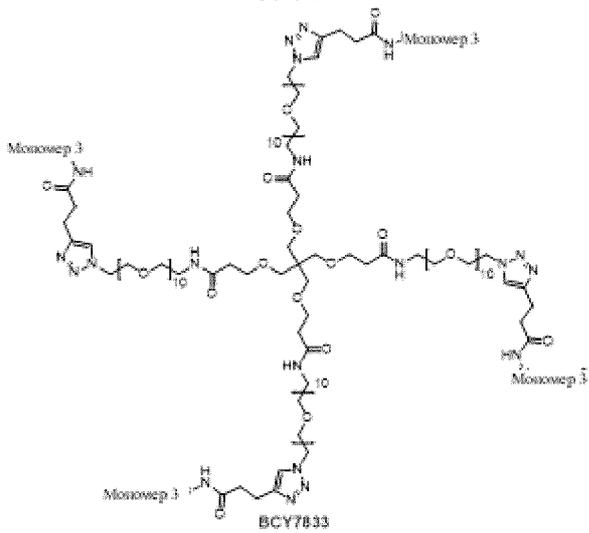
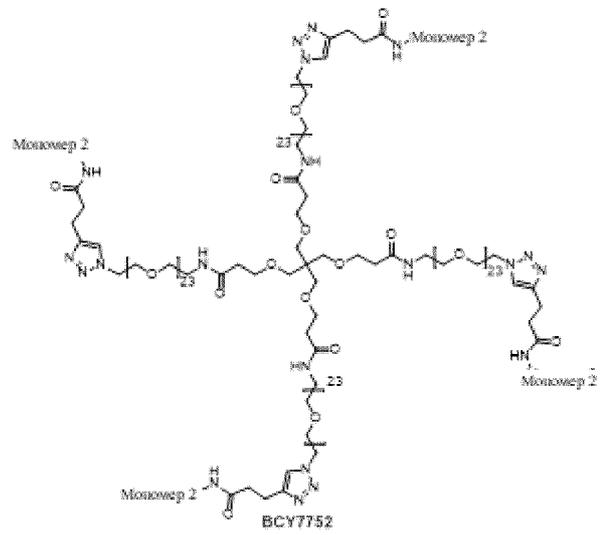
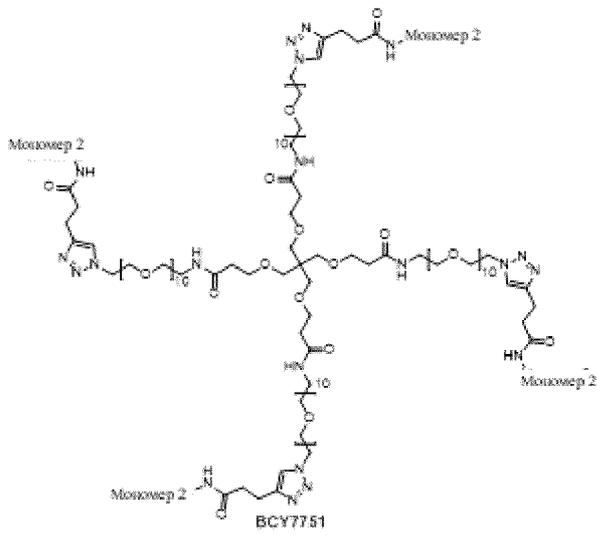
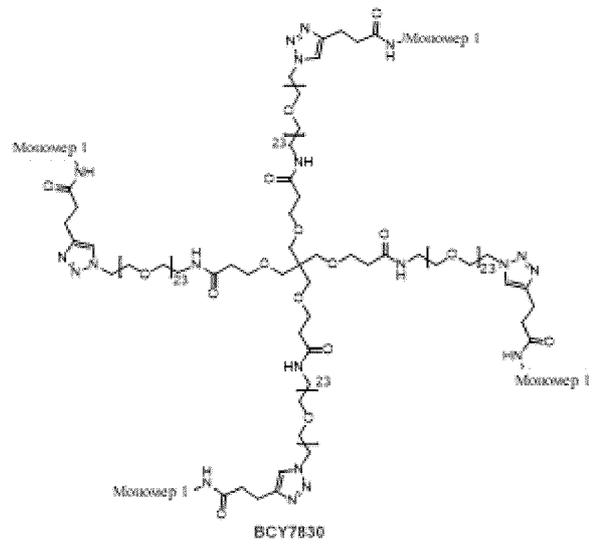
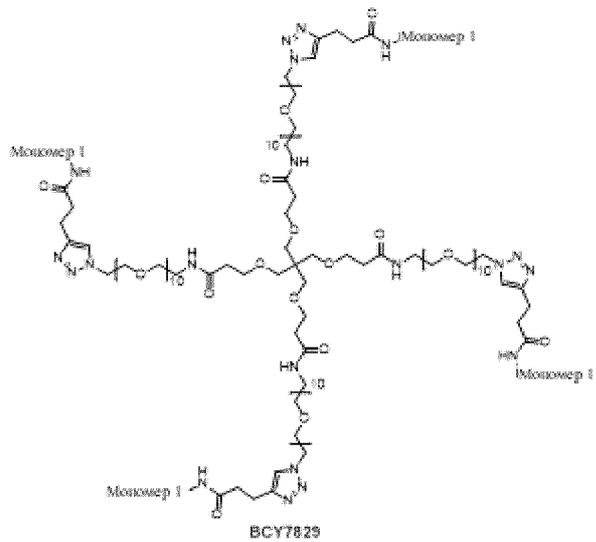


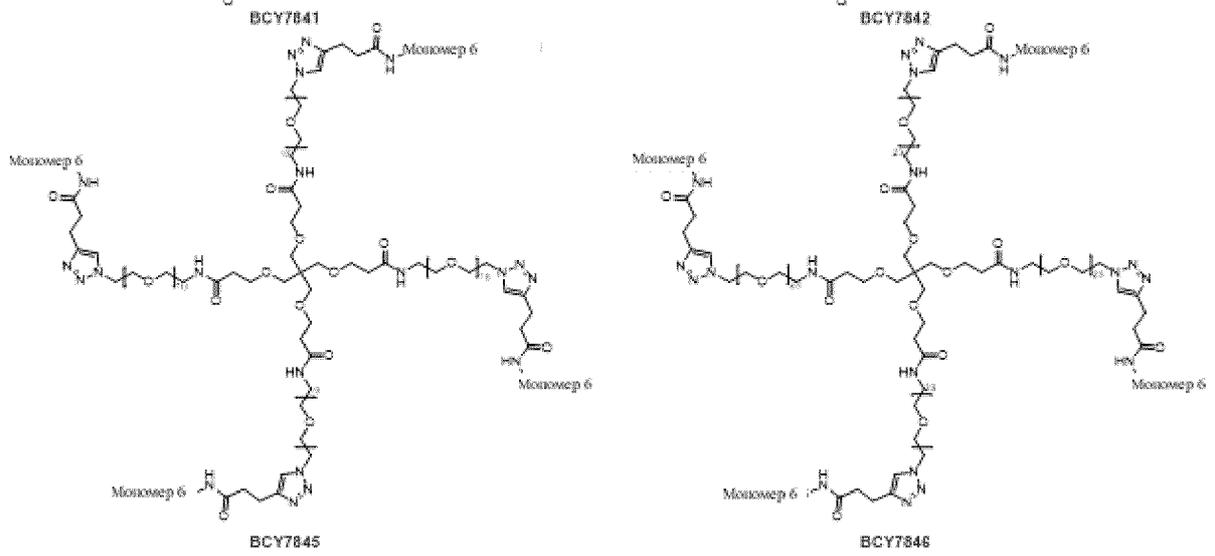
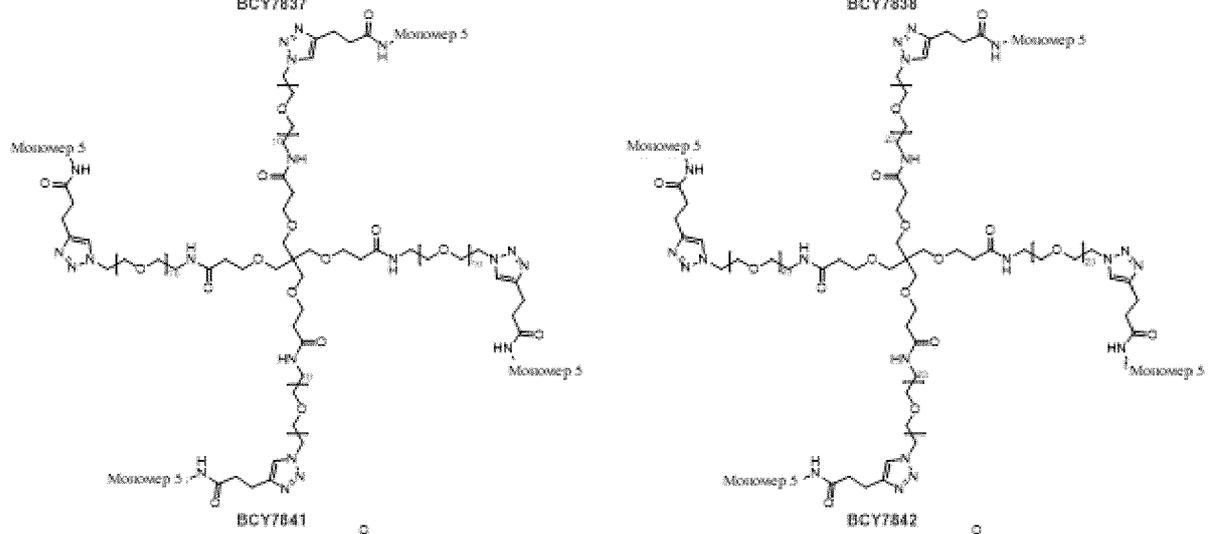
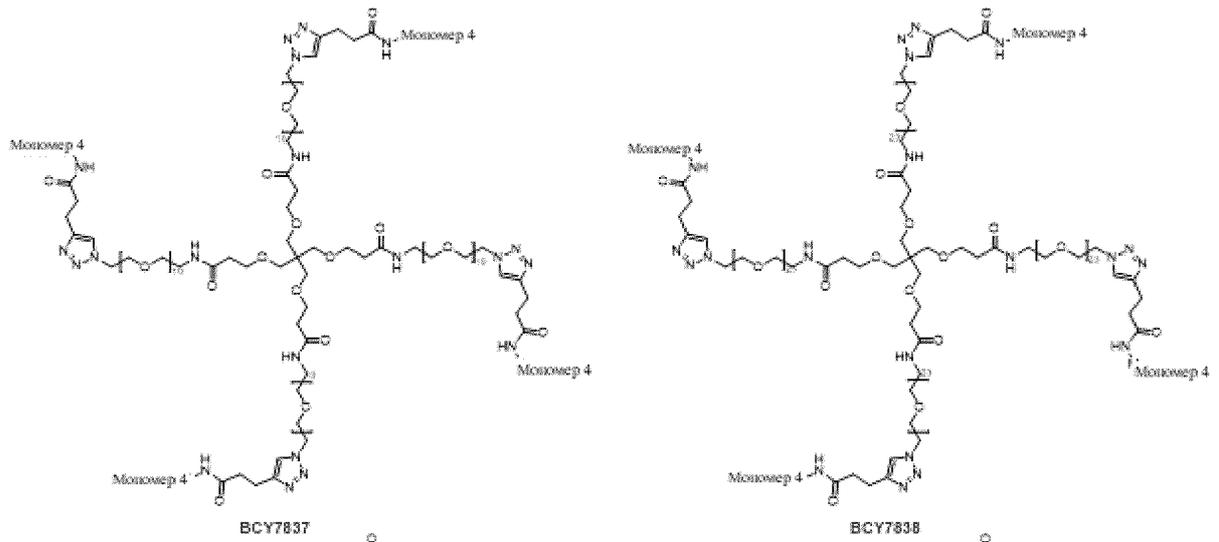
Мономер 14A

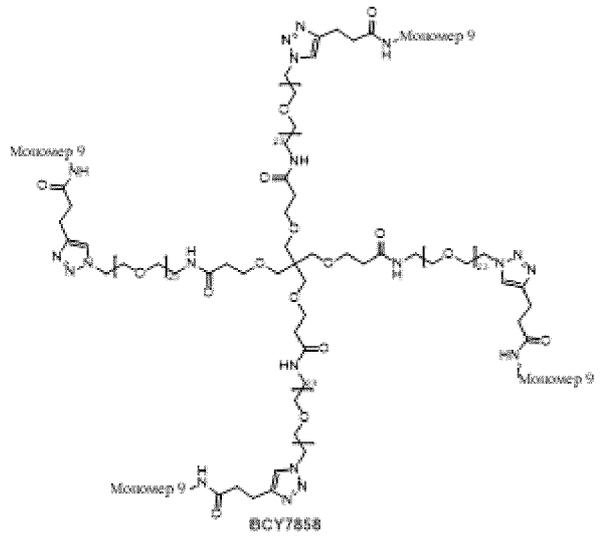
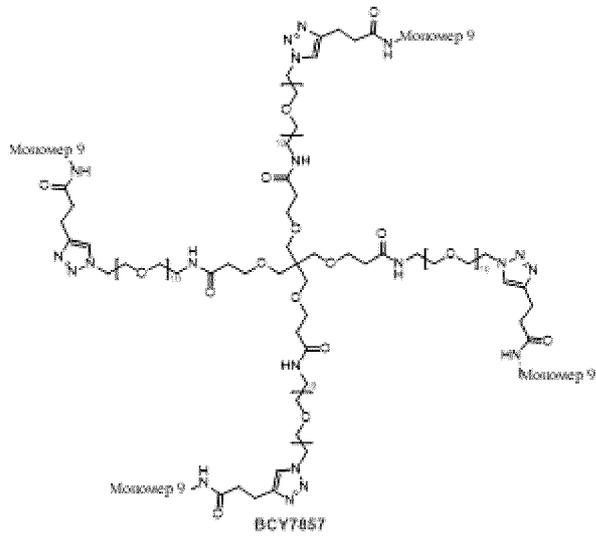
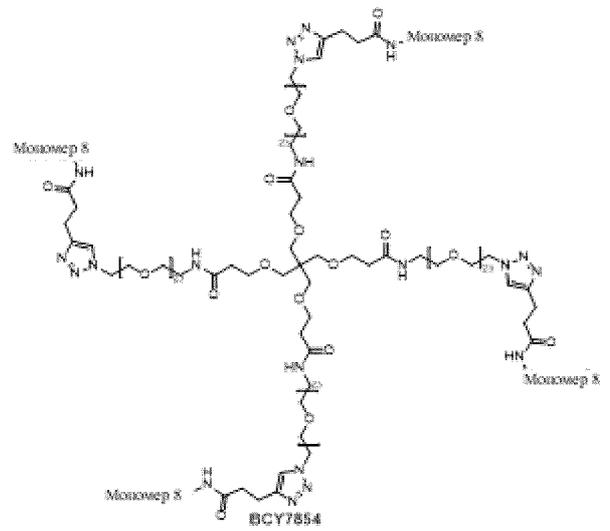
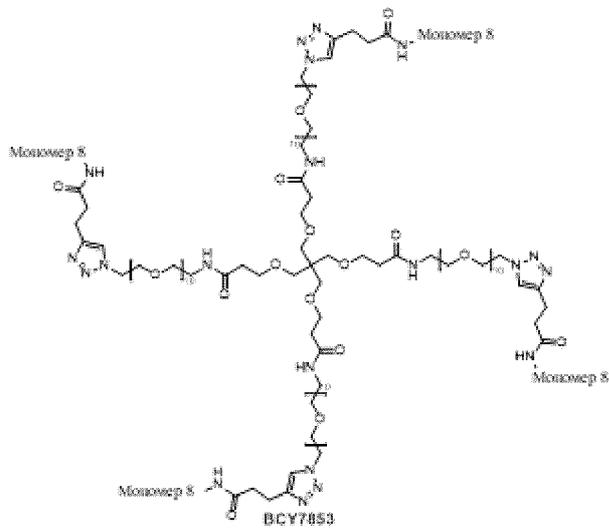
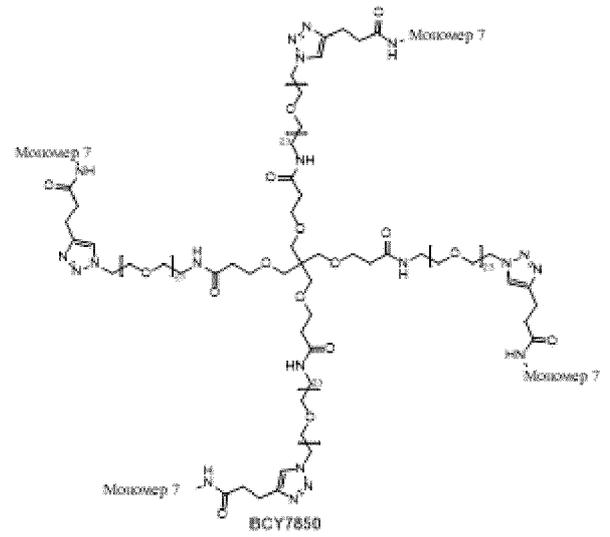
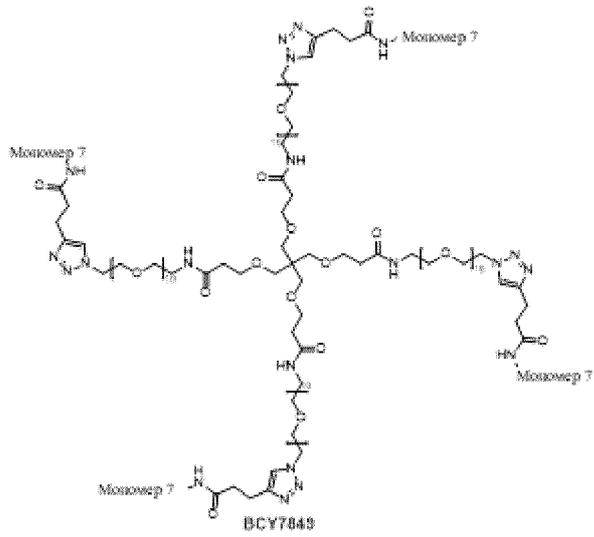


Мономер 15A

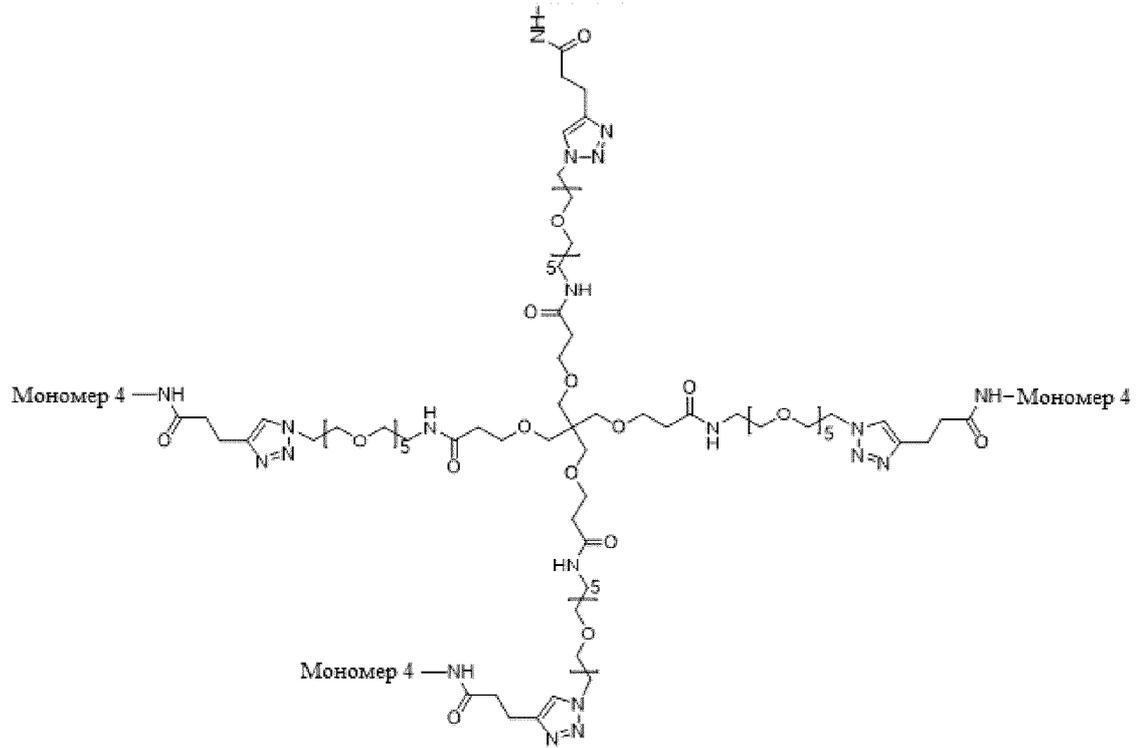
Соединение 15:



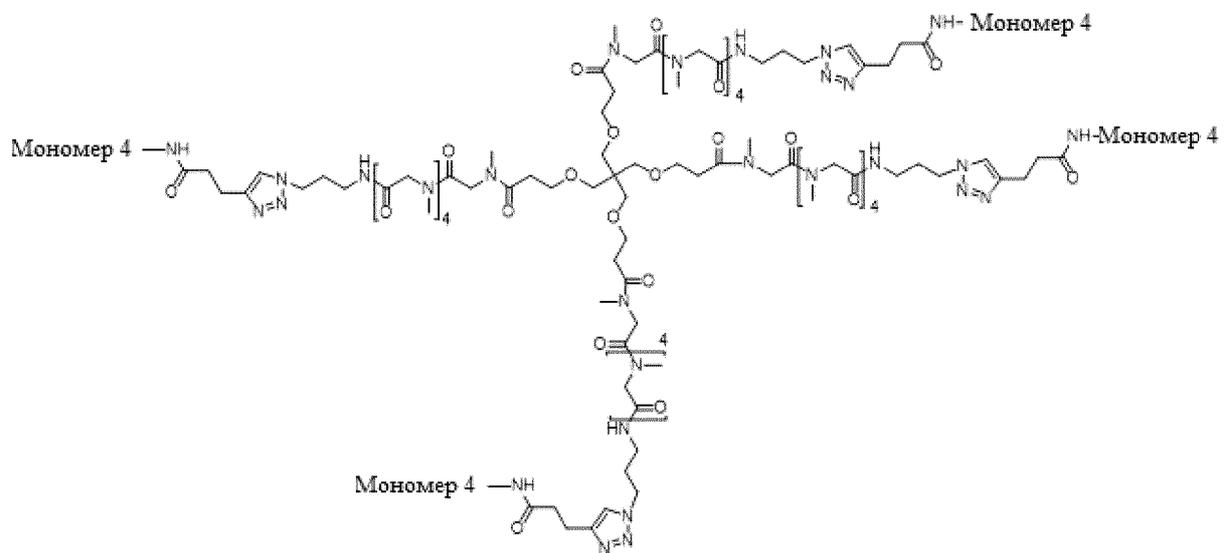




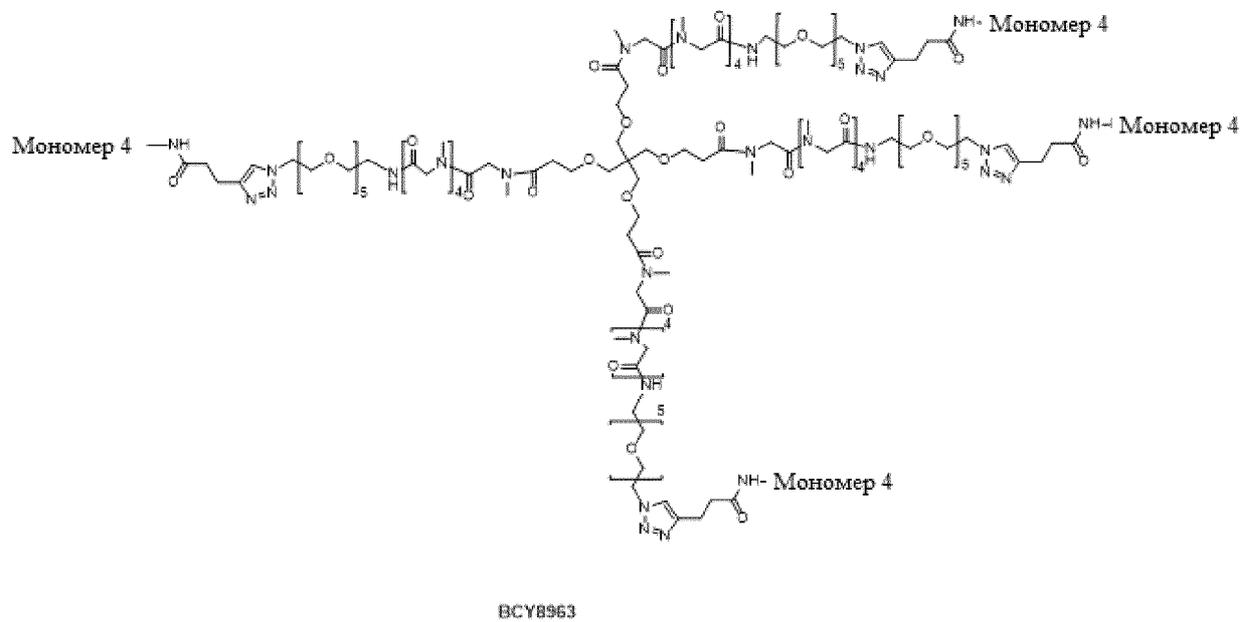
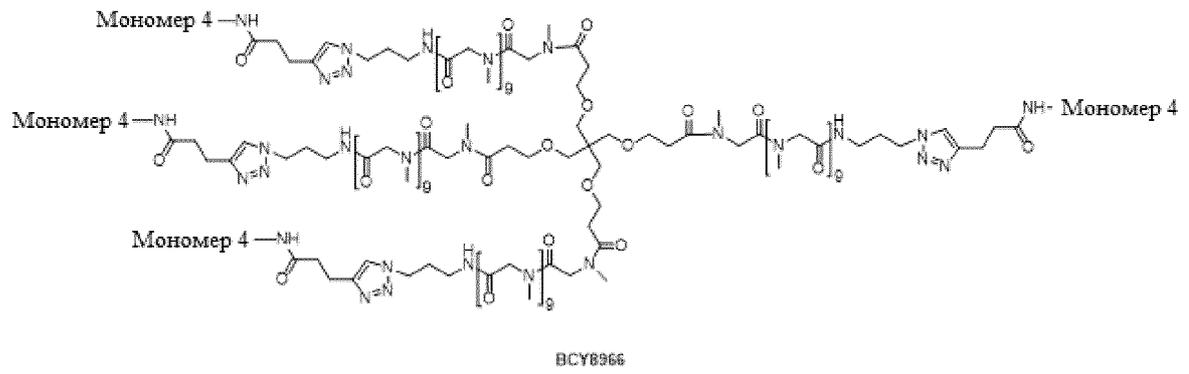
Мономер 4

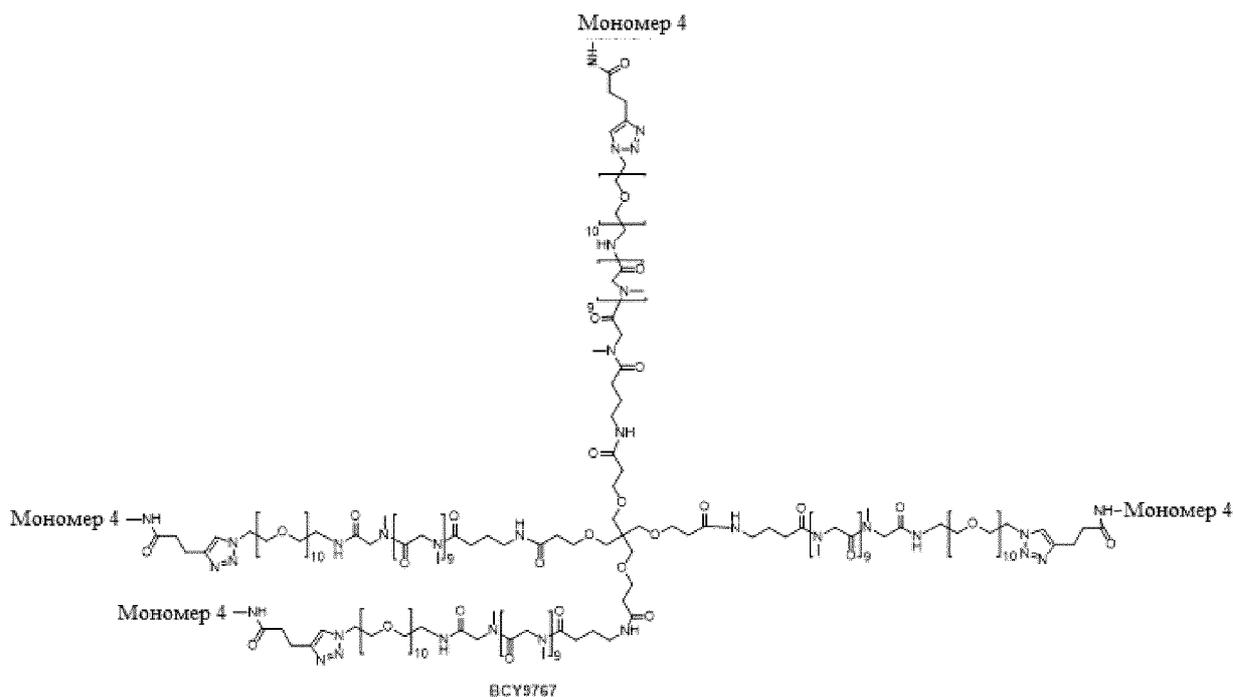
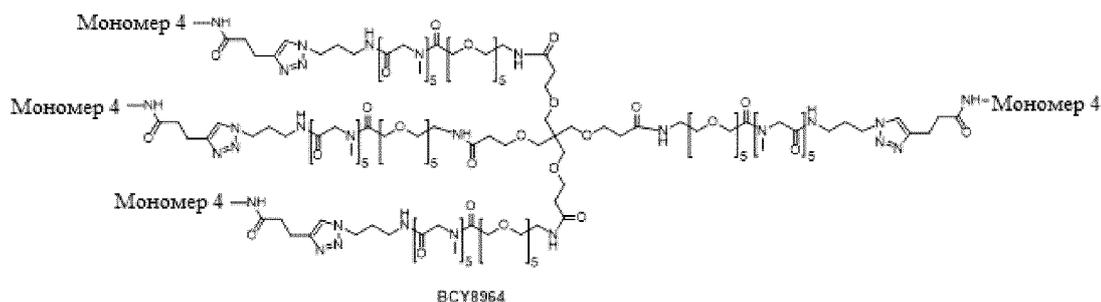


BCY8960



BCY8959





BCY7829:

Смесь соединения 14A (24 мг, 9,76 мкмоль, 1 экв.), мономера 1A (130,28 мг, 58,56 мкмоль, 6 экв.), CuI (37,18 мг, 195,22 мкмоль, 20 экв.) в DMF (3 мл) дегазировали и продували N₂ 3 раза, затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7829 (39,4 мг, 3,19 мкмоль, выход 32,64%, чистота 91,83%) в виде белого твердого вещества.

BCY7830:

К раствору соединения 14B (4 мг, 8,42e-1 мкмоль, 1 экв.) и мономера 1A (14,99 мг, 6,74 мкмоль, 8 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuSO₄·5H₂O (0,8 М, 12,63 мкл, 12 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,8 М, 84,22 мкл, 80 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 30°C в течение 1 ч. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7830 (6 мг, 3,69e-1 мкмоль,

выход 36,79%, чистота 70,48%) в виде белого твердого вещества.

BCY7751:

К смеси соединения 14A (4 мг, 1,63 мкмоль, 1 экв.), мономера 2A (29,67 мг, 13,00 мкмоль, 7,99 экв.) в DMF (0,5 мл) добавляли CuI (6,2 мг, 32,6 мкмоль, 20 экв.) и смесь дегазировали и продували N₂ 3 раза, затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7751 (5 мг, 1,74e-1 мкмоль, выход 22,85%, чистота 86,1%) в виде белого твердого вещества.

BCY7752:

Смесь соединения 14B (24 мг, 5,05 мкмоль, 1 экв.), мономера 2A (69,17 мг, 30,32 мкмоль, 6 экв.), CuI (11,55 мг, 60,64 мкмоль, 12 экв.) в DMF (3 мл) дегазировали и продували N₂ 3 раза, затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7752 (21,7 мг, 1,41 мкмоль, выход 27,97%, чистота 90,38%) в виде белого твердого вещества.

BCY7833:

К смеси соединения 14A (4 мг, 1,63 мкмоль, 1 экв.), мономера 3A (44,23 мг, 19,52 мкмоль, 12,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли раствор CuSO₄ (0,4 М, 48,80 мкл, 12,0 экв.) и (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (0,4 М, 162,68 мкл, 40,0 экв.) и смесь дегазировали и продували N₂ 3 раза, затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7833 (4,2 мг, 1,86e-1 мкмоль, выход 11,43%, чистота 51,00%) в виде белого твердого вещества.

BCY7834:

К смеси соединения 14B (4 мг, 8,42e-1 мкмоль, 1 экв.), мономера 3A (22,90 мг, 10,11 мкмоль, 12,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли раствор CuSO₄·5H₂O (0,4 М, 18,95 мкл, 9,0 экв.) и (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-она (0,4 М, 84,22 мкл, 40 экв.) в H₂O (0,11 мл) и смесь дегазировали и продували N₂ 3 раза, затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7834 (2,3 мг, 1,40e-1 мкмоль, выход 16,64%, чистота 84,14%) в виде белого твердого вещества.

BCY7837:

К смеси соединения 14А (4 мг, 1,63 мкмоль, 1 экв.), мономера 4А (22,11 мг, 9,76 мкмоль, 6 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuI (6,20 мг, 32,54 мкмоль, 20 экв.) и смесь дегазировали и продували N₂ 3 раза, затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7837 (11,4 мг, 6,16e-1 мкмоль, выход 37,86%, чистота 62,25%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7838:

Смесь соединения 14В (40 мг, 8,42 мкмоль, 1 экв.), мономера 4А (114,48 мг, 50,53 мкмоль, 6 экв.), CuI (32,08 мг, 168,44 мкмоль, 20 экв.) в DMF (5 мл) дегазировали и продували N₂ 3 раза, затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7838 (51 мг, 3,33 мкмоль, выход 39,49%, чистота 90,08%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7841:

Смесь соединения 14А (4 мг, 1,63 мкмоль, 1 экв.), мономера 5А (23 мг, 9,84 мкмоль, 6,05 экв.), CuI (309,82 мкг, 1,63 мкмоль, 1 экв.) в DMF (0,5 мл) дегазировали и продували N₂ 3 раза, затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением ВСУ7841 (8,3 мг, 4,47e-1 мкмоль, выход 27,45%, чистота 63,54%) в виде белого твердого вещества.

ВСУ7842:

Клик-реакцию проводили в 3 контейнерах параллельно. В каждом реакционном контейнере смесь соединения 14В (170,0 мг, 35,8 мкмоль, 1,0 экв.), мономера 5А (340,0 мг, 145,4 мкмоль, 4,06 экв.) и ТНРТА (0,4 М, 89,5 мкл, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 6 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 89,5 мкл, 1,0 экв.) и VcNa (0,4 М, 179,0 мкл, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 капельным добавлением 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что соединение 14В израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (MM: 14100,11, наблюдаемое m/z: 1007,5400([M/14+H⁺])). Реакционную смесь комбинировали, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Затем неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA), с получением ВСУ7842 (1,03 г, 69,25 мкмоль, выход 64,49%, чистота 94,34%) в виде белого

твердого вещества.

BCY7845:

Смесь соединения 14A (40 мг, 16,27 мкмоль, 1 экв.), мономера 6A (221,23 мг, 97,61 мкмоль, 6 экв.), CuI (62 мг, 325,36 мкмоль, 20 экв.) в DMF (4 мл) дегазировали и продували N₂ 3 раза, затем смесь перемешивали при 25-30°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7845 (49 мг, 3,02 мкмоль, выход 18,57%, чистота 71,06%) в виде белого твердого вещества.

BCY7846:

К раствору соединения 14B (4 мг, 8,42e-1 мкмоль, 1 экв.) и мономера 6A (15,27 мг, 6,74 мкмоль, 8,0 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuSO₄·5H₂O (0,8 М, 12,63 мкл, 12 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,8 М, 84,22 мкл, 80 экв.). Смесь дегазировали и продували N₂ 3 раза, затем смесь перемешивали при 30°C в течение 1 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7846 (4,8 мг, 1,52e-1 мкмоль, выход 18,03%, чистота 43,7%) в виде белого твердого вещества.

BCY7849:

К раствору соединения 14A (4 мг, 1,63 мкмоль, 1 экв.) и мономера 7A (29,25 мг, 13,01 мкмоль, 8 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuSO₄ (0,8 М, 24,40 мкл, 12 экв.) и (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (0,8 М, 81,34 мкл, 40 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7849 (8,5 мг, 4,72e-1 мкмоль, выход 29,03%, чистота 63,6%) в виде белого твердого вещества.

BCY7850:

К раствору соединения 14B (4 мг, 8,42e-1 мкмоль, 1 экв.) и мономера 7A (15,14 мг, 6,74 мкмоль, 8 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuSO₄·5H₂O (0,8 М, 12,63 мкл, 12 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,8 М, 84,22 мкл, 80 экв.) в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 30°C в течение 1 ч. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7850 (2,5 мг, 0,18 мкмоль, выход 21,41%, чистота 99,09%) в виде белого твердого вещества.

BCY7853:

К раствору соединения 14A (4 мг, 1,63 мкмоль, 1 экв.) и мономера 8A (29,90 мг,

13,01 мкмоль, 8 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuSO_4 (0,8 М, 24,40 мкл, 12 экв.) и (2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-он (0,8 М, 81,34 мкл, 40 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 1 ч в атмосфере N_2 . LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7853 (0,7 мг, 4,20e-2 мкмоль, выход 2,58%, чистота 69,882%) в виде белого твердого вещества.

BCY7854:

К раствору соединения 14B (4 мг, 8,42e-1 мкмоль, 1 экв.) и мономера 8A (15,48 мг, 6,74 мкмоль, 8 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuSO_4 (0,8 М, 12,63 мкл, 12 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,8 М, 84,22 мкл, 80 экв.). Смесь перемешивали при 30°C в течение 1 ч в атмосфере N_2 . LC-MS продемонстрировала, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7854 (0,6 мг, 3,02e-2 мкмоль, выход 3,59%, чистота 70,227%) в виде белого твердого вещества.

BCY7857:

К раствору соединения 14A (4 мг, 1,63 мкмоль, 1 экв.) и мономера 9A (22,27 мг, 9,76 мкмоль, 6 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuI (6,20 мг, 32,54 мкмоль, 20 экв.). Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч в атмосфере N_2 . LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7857 (1,3 мг, 8,28e-2 мкмоль, выход 5,09%, чистота 73,80%) в виде белого твердого вещества.

BCY7858:

К раствору соединения 14B (4 мг, 8,42e-1 мкмоль, 1 экв.) и мономера 9A (15,37 мг, 6,74 мкмоль, 8 экв.) в DMF (1 мл) добавляли CuSO_4 (0,8 М, 12,63 мкл, 12 экв.) и аскорбиновую кислоту (0,8 М, 84,22 мкл, 80 экв.) в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 30°C в течение 1 ч. LC-MS и ВЭЖХ продемонстрировали, что реагент 1 израсходовался полностью. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) с получением BCY7858 (2,0 мг, 1,19e-1 мкмоль, выход 14,13%, чистота 82,55%) в виде белого твердого вещества.

BCY8945:

Смесь соединения 14B (105 мг, 22,11 мкмоль, 1 экв.), мономера 11A (200 мг, 92,61 мкмоль, 4,2 экв.) и ТНРТА (9,6 мг, 1 экв.) растворяли в t-BuOH/ H_2O (1:1, 6 мл, предварительно дегазированном и продутом N_2 3 раза), а затем добавляли CuSO_4 (0,4 М, 55 мкл, 1 экв.) и VcNa (0,4 М, 110 мкл, 2 экв.) в атмосфере N_2 . pH этого раствора доводили до 8 капельным добавлением 0,2 М NH_4HCO_3 (в 1:1 t-BuOH/ H_2O), и раствор становился

светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что соединение 14B израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (MS: 13378,66, наблюдаемое m/z: 1030,6([M/13+H⁺]), 956,9([M/14+H⁺])). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA). BCY8945 (120 мг, 8,37 мкмоль, выход 37,86%, чистота 91,11%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY8947:

Смесь соединения 14A (150,0 мг, 61,0 мкмоль, 1,0 экв.), мономера 12A (543,8 мг, 245,2 мкмоль, 4,02 экв.) и ТНРТА (26,5 мг, 61,0 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 6 мл, предварительно дегазированном и продутом N₂ 3 раза), а затем добавляли CuSO₄ (9,8 мг, 61,0 мкмоль, 1,0 экв.) и VcNa (24,2 мг, 122,0 мкмоль, 2,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 капельным добавлением 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор становился светло-желтым. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что соединение 14A израсходовалось полностью, и обнаруживался один основной пик с желаемым m/z (вычисленная MM: 11329,12, наблюдаемое m/z: 1133,6([M/10+H⁺]), 1029,2([M/11+H⁺]), m/z= 1109 соответствует дополнительному соединению 4). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия с TFA), с получением BCY8947 (230 мг, 18,28 мкмоль, выход 29,96%, чистота 95,82%) в виде белого твердого вещества. Более того, 200 мг подвергали обмену с солью натрия и получали 150,3 мг (чистота 97,16%).

BCY8960 (122,1 мг, чистота 91,90%, 16,80%), BCY8959 (21,3 мг, чистота 91,49%, 25,14%), BCY8966 (20,5 мг, чистота 90,04%, 45,90%), BCY8963 (17,1 мг, чистота 96,70%, 9,4%), BCY8964 (27,8 мг, чистота 90,41%, 11,5%) и BCY9767 (6,1 мг, чистота 89,40%, 6,12%) синтезировали аналогично тому, как описано выше для BCY8945, с использованием одного из соединений 14C, 14D, 14E, 14F, 14G или 14H; мономера 4A; и CuSO₄,(2R)-2-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-2H-фуран-5-она и ТНРТА.

Получение моноклонального антитела-агониста CD137:

Последовательность моноклонального антитела-агониста CD137, использованная для сравнения с мультимерами CD137 в экспериментах, описанных в настоящем описании, описана в патенте США номер US 7288638. Изотипическое IgG4-антитело экспрессировали с использованием системы ExpiCHO Expression System (Thermo Fisher Scientific), а затем проводили временную трансфекцию экспрессирующей конструкции ДНК. Антитело очищали аффинной хроматографией с белком А и составляли в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,2. Анализ чистоты с использованием ВЭЖХ-SEC (колонка GF-250, Agilent) показал, что уровень мономера моноклонального антитела против CD137 составил приблизительно 95%. Активность связывания показала, что моноклональное антитело против CD137 в концентрации выше 1 мкг/мл может связываться с клетками

СНО, экспрессирующими CD137. Анализ эндотоксинов с использованием набора ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (Genscript) показал, что препарат моноклонального антитела против CD137 содержал <7 МЕ/мг эндотоксина.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

1. Описание эксперимента Biacore для CD137

Эксперименты Biacore проводили для определения величин k_a ($M^{-1}s^{-1}$), k_d (s^{-1}), K_D (нМ) для мономерных пептидов, связывающихся с беком CD137 человека. Рекомбинантный CD137 человека (R&D systems) ресуспендировали в PBS и биотинилировали с использованием реагента сульфо-NHS-LC-LC-биотина EZ-Link™ (Thermo Fisher) в соответствии с предложенным изготовителем протоколом. Белок обессоливали для удаления несвязанного биотина с использованием центрифужных колонок в PBS.

Для анализа связывания пептидов использовали устройство Biacore T200 или Biacore 3000 с чипом XanTec CMD500D. Стрептавидин иммобилизовывали на чипе с использованием стандартной химии присоединения аминов при 25°C с HBS-N (10 мМ HEPES, 0,15 М NaCl, pH 7,4) в качестве подвижного буфера. В кратком изложении, поверхность из карбоксиметилдекстрана активировали инжектированием в течение 7 0,4 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлорида (EDC)/0,1 М *N*-гидроксисукцинимид (NHS) в соотношении 1:1 при скорости потока 10 мкл/мин. Для улавливания стрептавидаина белок разбавляли до 0,2 мг/мл в 10 мМ ацетате натрия (pH 4,5) и улавливали путем инжектирования 120 мкл на активированную поверхность чипа. Остаточные активированные группы блокировали посредством инжектирования в течение 7 мин 1 М этаноламина (pH 8,5) и биотинилированный CD137 улавливали до уровня 270-1500 RU. Буфер заменяли на PBS/0,05% Tween 20 и получали серию разведений пептидов в этом буфере с конечной концентрацией DMSO 0,5%. Максимальная концентрация пептида составляла 500 нМ с 6 дополнительными 2-кратными или 3-кратными разведениями. Анализ SPR проводили при 25°C при скорости потока 90 мкл/мин с ассоциацией в течение 60 секунд и диссоциацией в течение 900 секунд. После каждого цикла стадии использовали стадию регенерации (10 мкл 10 мМ глицина, pH 2). В данные при необходимости вносили поправку на эффекты исключения объема DMSO. Все данные дважды сравнивали с контролем в виде пустых инжектирований и эталонной поверхности с использованием стандартных методики обработки, и обработку данных и кинетическую аппроксимацию проводили с использованием программного обеспечения Scrubber, версия 2.0c (BioLogic Software). Данные аппроксимировали с использованием простой модели связывания 1:1, позволяющей эффекты переноса массы, когда это целесообразно.

В этом анализе тестировали определенные мономерные пептиды и результаты представлены в таблице 3:

Таблица 3: Данные анализа Biacore для CD137 с мономерными пептидами

<i>Номер мономера</i>	<i>Kd (нМ)</i>
BCY3814	33,3

BCY7740	88
BCY7741	122
BCY7742	855
BCY7743	101
BCY7744	92
BCY7745	63,1
BCY7746	260
BCY7747	361
BCY7748	264
BCY8935	NB
BCY8927	12,3
BCY8928	11,4
BCY8925	NB
BCY8926	NB
BCY8141	57,8
BCY8095	0,685
BCY8142	321
BCY8096	26
BCY8143	112
BCY8144	66,7
BCY8097	99,4

NB: Отсутствует связывание вплоть до 5 мкМ

2. Описание эксперимента для анализа Promega для CD137

Связывающие CD137 мультимеры оценивали в отношении CD137 с использованием репортерного анализа активности клеток, в котором используется люминесценция люциферазы NF-κB в качестве данных об активации CD137 в клетках Jurkat. Среду получали путем размораживания FBS и добавления 1% FBS к RPMI-1640 (набор Promega CS196005). Образцы разбавляли до ожидаемой концентрации для получения максимальной кратной индукции, а затем титровали в серии разведений 1/3 или в серии разведений 1/10 в стерильном 96-луночном планшете. Клетки CD137 Jurkat размораживали на водяной бане, а затем 500 мкл клеток добавляли к 9,5 мл предварительно нагретой 1% среды FBS RPMI-1640. В белые планшеты для культивирования клеток добавляли 50 мкл клеток на лунку. Добавляли 25 мкл образцов в качестве дублированных образцов или 1% FBS RPMI-1640 отдельно в качестве фонового контроля.

Клетки совместно инкубировали с агонистами в течение 6 ч при 37°C, 5% CO₂.

Через 6 ч Bio-Glo™ размораживали и проводили проявку в анализе при комнатной температуре. Добавляли 75 мкл Bio-Glo™ на лунку и инкубировали в течение 5-10 мин. Сигнал люциферазы получали на устройстве для считывания планшетов Pherastar с использованием программы MARS. Данные анализировали путем преобразования данных к $x = \log(X)$, а затем нанесения на график \log (агонист) против переменного наклона отклика (4 параметра) для вычисления величин EC_{50} .

Данные представлены на фиг.1-3, на которых показано, что поливалентные бициклические пептиды против CD137 демонстрируют ряд свойств при сравнении с природным лигандом (CD137L) в отношении активации CD137. На фиг.1 сравнены конъюгированные с N и C-концами тримеры и тетрамеры. Включен мономерный связывающий CD137 бициклический пептид (ACIEEGQYCFADPYMCA (SEQ ID NO: 56); BCY592), и он не имеет поддающейся обнаружению активности в этом анализе. На фиг.2 приведено сравнение активности для мультимеров с различной длиной цепи ПЭГ. Исследовали различные точки присоединения для мультимеров, и на фиг.3 показаны данные активации для конъюгированных с Lys5 тетрамеров по сравнению с CD137L. DMSO-контроль включен для демонстрации того, что включение DMSO в исходных образцах не оказывает влияния на наблюдаемую активность. В таблице 4 детализирована средняя кратная индукция и кратное повышение EC_{50} для каждого мультимера относительно CD137L.

Таблица 4А: Данные анализа Promega для CD137 с мультимерными связывающими пептидами

<i>Номер мультимера</i>	<i>Средняя кратность повышения EC_{50} относительно CD137L*</i>	<i>Средняя относительная кратность индукции относительно CD137L**</i>
BCY7750	16,13	0,90
BCY7749	2,08	0,88
BCY7827	10,86	0,76
BCY7828	9,72	0,65
BCY7831	0,56	1,01
BCY7832	0,15	0,68
BCY7835	0,50	1,04
BCY7836	3,18	0,32
BCY7839	188,19	0,56
BCY7840	1,58	0,55
BCY7843	47,73	0,68
BCY7844	43,07	0,57
BCY7847	2,91	0,59

BCY7848	6,60	0,55
BCY7851	1,43	0,64
BCY7852	1,36	0,58
BCY7855	0,66	1,12
BCY7856	1,07	0,67
BCY8102	41,27	0,91
BCY8103	188,34	0,91
BCY8106	1,26	0,94
BCY8107	64,33	0,64
BCY8145	5,93	0,95
BCY8146	5,11	0,83
BCY8151	213,05	0,49
BCY7751	120,52	1,32
BCY7752	177,8	1,18
BCY7829	186,8	1,12
BCY7830	31,31	1,48
BCY7833	0,07	1,03
BCY7837	28,99	0,97
BCY7838	0,73	2,19
BCY7841	306,76	1,14
BCY7842	237,56	1,22
BCY7845	17,78	1,54
BCY7846	3,39	1,92
BCY7849	4,91	1,50
BCY7850	6,35	1,21
BCY7853	3,46	1,02
BCY7854	2,35	1,16
BCY7857	6,66	0,86
BCY7858	0,60	0,91
BCY8104	103,27	1,65
BCY8105	296,56	1,09
BCY8108	34,03	0,79
BCY8147	50,58	1,04
BCY8148	18,71	1,20

BCY8149	140,06	0,93
BCY8150	4,14	0,77
BCY8581	-	Индукция <2 раз относительно фонового уровня при концентрации вплоть до 1 мкМ
BCY8582	-	Индукция <2 раз относительно фонового уровня при концентрации вплоть до 1 мкМ
BCY8583	0,031	3,14
BCY8584	-	Индукция <2 раз относительно фонового уровня при концентрации вплоть до 1 мкМ
BCY8937	-	Индукция <2 раз относительно фонового уровня при концентрации вплоть до 1 мкМ

*Средняя EC50 для CD137L=14,2 нМ

** Средняя кратность индукции для CD137L=4,0

Таблица 4В: Данные анализа Promega для CD137 с мультимерными связывающими пептидами

Номер мультимера	<i>Средняя кратность повышения EC50 относительно BCY7845*</i>	<i>Средняя относительная кратность индукции относительно BCY7845**</i>
BCY8948	-	Индукция <2 раз относительно фонового уровня при концентрации вплоть до 100 нМ
BCY8957	-	Индукция <2 раз относительно фонового уровня при концентрации вплоть до 100 нМ
BCY8958	0,96	0,39

BCY8961	-	Индукция <2 раз относительно фонового уровня при концентрации вплоть до 100 нМ
BCY8962	-	Индукция <2 раз относительно фонового уровня при концентрации вплоть до 100 нМ
BCY8965	-	Индукция <2 раз относительно фонового уровня при концентрации вплоть до 100 нМ
BCY9573	0,01	0,57
BCY9595	0,03	0,52
BCY9775	0,89	0,45
BCY9776	0,13	0,87
BCY10046	0,41	0,63
BCY10047	0,52	0,53
BCY8945	0,13	1,23
BCY8946	5,22	0,41
BCY8947	1,33	0,62
BCY8959	-	Индукция <2 раз относительно фонового уровня при концентрации вплоть до 100 нМ
BCY8960	0,41	0,68
BCY8963	1,61	0,84
BCY8964	2,37	1,13
BCY8966	5,88	0,56
BCY9113	-	Индукция <2 раз относительно фонового уровня при концентрации вплоть до 100 нМ
BCY9767	0,02	0,74

*Средняя EC50 для BCY7845=0,57 нМ

** Средняя кратность индукции для BCY7845=6,3

ND: не определено

3. Анализ стабильности в плазме

Стабильность мультимера в плазме оценивали в плазме человека, яванского макака, крысы и мыши следующим образом.

Источники плазмы

Таблица 5

Вид/ Матрикс	Минимальное № индивидуумов	Используй мый антикоагу лянт	Поставщик	Каталожный номер#	Партия
Плазма мышей CD-1	20 самцов	EDTA-K2	Bioreclamation IVT	MSEPLEDTA2 -M	MSE2612 21
Плазма крыс SD	10 самцов	EDTA-K2	Bioreclamation IVT	RATPLEDTA2 -M	RAT32620 7
Плазма яванского макака	10 самцов	EDTA-K2	Suzhou Research	ЯВАНСКАЯ МАКАКА PLASMA	SZ201703 17
Плазма человека	3 мужчины и 3 женщины	EDTA-K2	Bioreclamation IVT	HMPLEDTA2	BRH1412 539

В качестве эталонного соединения в этом анализе использовали пропентелина бромид.

Экспериментальная часть

Объединенную замороженную плазму размораживали на водяной бане при 37°C перед экспериментом. Плазму центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин и сгустки удаляли при их наличии. рН при необходимости доводили до 7,4±0,1. Получали 1 мМ промежуточные растворы тестируемых соединений с DMSO. Для положительного контроля пропентелина: 1 мМ промежуточный раствор получали путем разбавления 5 мкл исходного раствора 45 мкл сверхчистой воды. 100 мкМ раствор для дозирования получали путем разбавления 20 мкл промежуточного раствора (1 мМ) посредством 180 мкл DMSO. Для положительного контроля пропентелина: 100 мкМ промежуточный раствор получали путем разбавления 20 мкл исходного раствора посредством 180 мкл 45%MeOH/H₂O. К 196 мкл пустой плазмы добавляли 4 мкл дозирующего раствора (100 мкМ) для достижения конечной концентрации 2 мкМ в двух экземплярах и образцы инкубировали при 37°C на водяной бане. В каждый момент времени (0,1,2,4,6 и 24 ч), добавляли 800 мкл стоп-раствора (100 нг/мл толбутамида, лабеталола, дексаметазона, пропранолола, диклофенака, целекоксиба в 100% MeOH) для осаждения белка и тщательно перемешивали. Планшеты для образца центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин. Аликвоту супернатанта (200 мкл) переносили из каждой лунки перед проведением анализа LC-MS/MS.

Анализ данных:

% оставшегося тестируемого соединения после инкубации в плазме вычисляли с использованием следующего уравнения:

$\% \text{ оставшегося} = 100 \times (\text{PAR в указанный момент инкубации} / \text{PAR в момент времени } T_0)$

где PAR представляет собой соотношение площадей пиков анализируемого соединения против внутреннего стандарта (IS)

Указанные моменты времени инкубации представляют собой T_0 (0 ч), T_n ($n=0, 1, 2, 4, 6, 24$ ч)

На фиг.4 представлена стабильность BCY7829 в плазме человека, яванского макака, крысы и мыши.

На фиг.6 представлена стабильность нескольких мультимеров и мономера 1A (BCY 7741) в плазме мыши.

4. Тест эффективности *in vivo* бициклических мультимеров, нацеленных на CD137, при лечении сингенных опухолей MC38 у гуманизированных мышей C57BL/6J B-h4-1BV

Экспериментальные способы и методики

Клеточную линию карциномы толстого кишечника мыши MC38 приобретают от Shunran Shanghai Biological Technology Co., Ltd. Клетки поддерживают *in vitro* в качестве монослойной культуры в модифицированной способом Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, 100 Е/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивируют два раза в неделю посредством обработки трипсином-EDTA. Выращенные клетки в экспоненциальной фазе роста собирают и подсчитывают в отношении инокуляции опухоли.

Самкам гуманизированных мышей C57BL/6J B-h4-1BV в возрасте 6-8 недель подкожно инъецировали (в бок) клетки опухоли MC38 (5×10^5) с 0,1 мл PBS для развития опухоли. Имеющих опухоли животных случайно включали в шесть исследуемых групп, когда средний размер опухоли достигал приблизительно 113 мм³ (испытание 1) или 107 мм³ (испытание 2). Тестируемый образец и положительный контроль вводили имеющим опухоль мышам в соответствии с заданными режимами, как показано ниже.

Тестируемые изделия составляли в водном носителе (25 мМ гистидин, 10% сахара рН=7) и вводили внутривенно или внутривентриально. Моноклональное антитело-CD137 вводили посредством внутривентриальной инъекции в 0,9% солевом растворе.

Объем опухоли определяли три раза в неделю в двух измерениях с использованием толщиномера, и объем выражали в мм³ с использованием формулы: $V=0,5 a \times b^2$, где a и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Результаты представлены посредством среднего значения и стандартного отклонения (среднее значение \pm SD).

В испытании 2 мышей умерщвляли через 21 сутки после начала лечения и опухоли извлекали для анализа Т-клеток посредством проточной цитометрии. Опухоль нарезали на мелкие фрагменты и фильтровали через 70-мкм фильтр. Лимфоциты выделяли с использованием Histopaque 1083 и ресуспендировали в RPMI 1640, дополненной 10%

эмбриональной телячьей сывороткой. Лимфоциты окрашивали красителем для определения жизнеспособности клеток (Zombie NIR, Biolegend, #423106) и панелью антител, включая антитело против CD45 мыши (Biolegend, #103138), антитело против CD3 мыши (Biolegend, #100328), антитело против CD4 мыши (Biolegend, #100438), антитело против CD8 мыши (Biolegend, #100759). Окрашенные клетки анализировали посредством проточного цитометра Attune NxT Flow Cytometer. Результаты для Т-клеток выражали в качестве % CD3+ клеток среди CD45+ клеток. Результаты для CD8+ Т-клеток выражали в качестве % CD8+ клеток среди CD45+CD3+ клеток. Результаты для CD4+ Т-клеток выражали в качестве % CD4+ клеток среди CD45+CD3+ клеток. Результаты представлены посредством среднего значения и стандартного отклонения (среднее значение \pm SD) и индивидуальных величин.

Статистический анализ: данные анализировали с использованием 2-стороннего ANOVA или обычного одностороннего ANOVA с критерием Даннета для множественных сравнений, и $P < 0,05$ считали статистически значимым. Учитывали как статистический анализ, так и биологическое наблюдение. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Схема эксперимента

Таблица 6

Режим дозирования

Испытание	№ животных	Лечение	Дозировки (мг/кг)	Путь дозирования	Схема
1	5	BCY7829	20	в/в	QAD \times 6
1	5	BCY7835	20	в/в	QAD \times 6
1	5	BCY7838	30	в/в	QAD \times 6
1	5	mAb-агонист CD137	3	в/б	BIW \times 4
1	5	Носитель	-	в/в	QAD \times 6
2	5	Носитель	-	в/в	QD \times 20
2	5	mAb-агонист CD137	3	в/б	BIW \times 6
2	5	BCY8945	30	в/б	QD \times 20
2	5	BCY8945	30	п/к	QD \times 20
2	5	BCY8947	30	в/б	QD \times 20
2	5	BCY7842	30	в/б	QD \times 20

Примечания: объем дозирования корректировали на основе массы тела (10 мг/г).

QAD относится к разу в двое суток, BIW относится к двум разам в неделю, QD относится к одному разу в сутки. в/в относится к внутривенной инъекции. в/б относится к внутрибрюшинной инъекции, п/к относится к подкожной инъекции.

Результаты испытания 1 представлены на фиг.7 где можно видеть, что мультимерные бициклические пептиды индуцируют противоопухолевую активность в некотором диапазоне по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137. Результаты испытания 2 представлены на фиг.8, где можно видеть, что мультимерные бициклические пептиды индуцируют противоопухолевую активность в некотором диапазоне по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137. Результаты анализа Т-клеток опухоли из испытания 2 представлены на фиг.9, где можно видеть, что мультимерные бициклические пептиды индуцируют повышение процента Т-клеток в некотором диапазоне в опухолевой ткани по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137. Результаты анализа CD8⁺ опухолевых Т-клеток в испытании 2 представлены на фиг.10 где можно видеть, что мультимерные бициклические пептиды индуцируют повышение в некотором диапазоне процента CD8⁺ Т-клеток в опухолевой ткани по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137. Результаты анализа CD4⁺ опухолевых Т-клеток из испытания 2 представлены на фиг.11, где можно видеть, что мультимерные бициклические пептиды индуцируют снижение в некотором диапазоне процента Т-клеток в опухолевой ткани по сравнению с моноклональным антителом-агонистом CD137, для которого ранее было показано, что оно индуцирует зависимую от CD137 противоопухолевую активность.

5. Фармакокинетика бициклических мультимеров у мышей CD-1

Самцам мышей CD-1 вводили 5 мг/кг каждого бициклического мультимера, составленного в 25 мМ гистидине HCl, 10% сахарозе, pH 7, посредством инъекции через хвостовую вену. Проводили серийное взятие крови (приблизительно 80 мкл крови/момент времени) через поднижнечелюстную или подкожную вену в каждый момент времени. Все образцы крови сразу переносили в предварительно охлажденные микроцентрифужные пробирки, содержавшие 2 мкл K2-EDTA (0,5 M) в качестве антикоагулянта и помещали на жидкий лед. Образцы крови сразу обрабатывали для получения плазмы посредством центрифугирования при приблизительно 4°C, 3000g. В плазму сразу добавляли осадитель, включающий внутренний стандарт, хорошо перемешивали и центрифугировали при 12000 об/мин, 4°C в течение 10 минут. Супернатант переносили в предварительно подписанные пропиленовые микроцентрифужные пробирки, а затем быстро замораживали над сухим льдом. Образцы при необходимости хранили при 70°C или ниже до анализа. 7,5 мкл образцов супернатанта прямо инжесктировали для анализа LC-MS/MS с использованием Orbitrap Q Exactive в режиме положительных ионов для определения концентраций бициклического мультимера. Данные концентрации в плазме против времени анализировали посредством некомпартментных подходов с использованием программного обеспечения Phoenix WinNonlin 6.3. C_0 , Cl, Vd_{ss} , $T_{1/2}$, $AUC_{(0-last)}$, $AUC_{(0-inf)}$, $MRT_{(0-last)}$, $MRT_{(0-inf)}$, и строили графики концентрации в плазме против времени.

Результаты анализа концентрации в плазме у самцов мышей CD-1 представлены на фиг.5A и 5B, где можно видеть, что фармакокинетические данные демонстрируют, что мультимерные бициклические конъюгаты (в частности, BCY7829, BCY7835 и BCY7838)

сохраняют свойство быстрого системного выведения, характерного для мономерных бициклических пептидов и конъюгатов бициклический пептид-лекарственное средство (BDC).

6. Анализ уничтожения опухолевых клеток человека *Ex Vivo*

Два замороженных диссоциированных образца опухоли пациента с меланомой приобретали от Folio Conversant. Клетки быстро размораживали при 37°C и распределяли пипеткой в 10 мл промывочной среды [DMEM/F12+1X пенициллин/стрептомицин+50 мкг/мл гентамицина+100 мкг/мл G418+100 мкг/мл гигромицин +1X инсулин-трансферрин-селен (ITS) + 10 мМ HEPES] с добавлением свежей ДНК-азы I в концентрации 1 мг/мл. Подсчет клеток проводили с использованием гемоцитометра и 0,04% трипанового синего в разведении 1:2. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в среде для роста [EmbryoMax DMEM +10% инактивированная нагреванием FBS+1X пенициллин/стрептомицин+50 мкг/мл гентамицина+1X GlutaMAX+1 мМ пируват натрия+1X ITS+0,4% BSA+4,5 г/л глюкозы+2,3 г/л бикарбоната натрия+10 мМ HEPES+10 нг/мл основного фибробластного фактора роста (bFGF) + 20 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF)] в количестве 5×10^5 клеток/мл. Клетки намагничивали, как описано в протоколе изготовителя N3D Biosciences. В кратком изложении, NanoShuttle (NS) добавляют в количестве 1 мкл к 1×10^4 клеток и перемешивают пипетированием. Клетки и NS осаждают центрифугированием при $100 \times g$ в течение 5 минут, перемешивают пипетированием и вновь осаждают до тех пор, пока клеточный осадок не приобретет равномерное коричневое окрашивание - приблизительно 3-5 циклов центрифугирования и перемешивания. Затем клетки добавляют в отталкивающий клетки 96-луночный планшет в концентрации 50000 клеток/луночка в 100 мкл среды для роста - одну аликвоту в количестве 50000 клеток сохраняли для проточно-цитометрической панели на 0 сутки. Мультимеры CD137 (BCY7838, BCY7839 и BCY7842) и контрольные соединения добавляли к посеянным клеткам в 100 мкл в конечной концентрации 2X также в среде для роста. Затем отталкивающий клетки планшет помещали на магнитную сфероидную плиту и инкубировали при 37°C в течение 48 часов. В конце 48 часов клетки собирали, окрашивали подходящими антителами для проточной цитометрии и вымываемым красителем для определения жизнеспособности (BD), и фиксировали в 2% параформальдегиде, а затем анализировали на FACS Celesta. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения FlowJo, Microsoft Excel и GraphPad Prism. Проточно-цитометрические панели, использованные в этом эксперименте, анализировали количество лимфоцитов и опухолевых клеток, присутствующих на 0 и 2 сутки. Уничтожение опухолевых клеток определяли по уменьшению количества CD45-негативных клеток в обработанных лунках против необработанного контроля (фиг.12) - значимость вычисляли с использованием 2-стороннего ANOVA.

Данные, представленные на фиг.12, демонстрируют выраженную гибель опухолевых клеток в ответ на обработку мультимером CD137 (BCY7838, BCY7839 и

BCY7842) у одного пациента с меланомой, но не у другого (фиг.12А). Хотя количества клеток изменялись с суток 0 по сутки 2 (данные не представлены), не было значимых отличий между обработками в отношении количеств лимфоцитов (фиг.12В).

7. Анализ вымывания активности CD137 с репортерными клетками

Клетки Jurkat, модифицированные способами инженерии для сверхэкспрессии CD137 и экспрессии гена люциферазы под действием промотора NF-κB приобретали от Promega. Репортерные клетки инкубировали с 10 нМ агонистами CD137 в указанные моменты времени при 37°C в среде RPMI1640 с 1% FBS. Через 30, 60 или 120 минут клетки промывали в избытке культуральной среды и ресуспендировали в 75 мкл свежей среды. Также включали условия без вымывания. Все условия с вымыванием выполняли в двух экземплярах. Затем клетки продолжали инкубировать в течение всего 6 часов (дополнительные 5,5, 5 или 4 часов относительно времени воздействия). После инкубации в каждую лунку добавляли 75 мкл реагента Bio-Glo (Promega) и позволяли ему уравниваться в течение 10 минут при комнатной температуре. Данные люминесценции считывали на устройстве для считывания планшетов Clariostar (BMG LabTech). Кратность индукции вычисляли путем деления люминесцентного сигнала на сигнал фоновых лунок (репортерные клетки без добавления агониста). Процент максимальной кратности индукции вычисляли путем деления кратности индукции с временем вымывания на кратность индукции без условий вымывания и умножения на 100. Данные на носили на график Prism и представляли в качестве столбиковой диаграммы средних значений или реплик с планками погрешности для стандартного отклонения.

Данные, представленные на фиг.13, демонстрируют, что мультимеры CD137 (BCY7838, BCY7839 и BCY7842) сохраняют активность клеток после вымывания, что согласуется с высокой авидностью в отношении тримерного рецепторного комплекса CD137.

8. Анализ высвобождения цитокинов Т-клетками

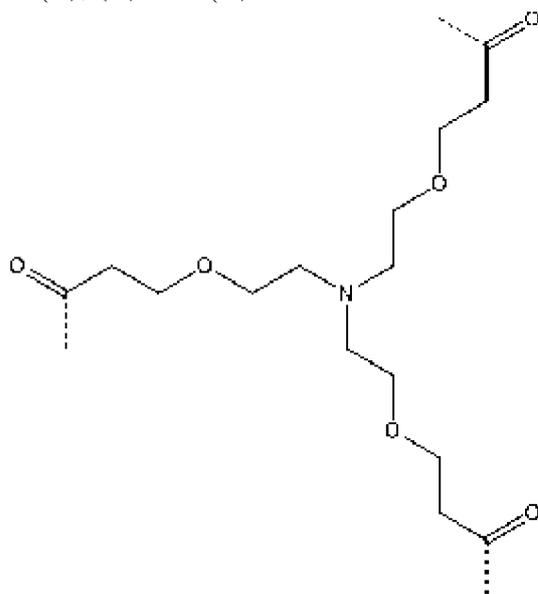
Лейкоцитарную пленку из крови здорового человека приобретали от Sylvan N. Goldman Oklahoma Blood Institute и транспортировали свежей. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли посредством центрифугирования в градиенте плотности Ficoll. Эритроциты лизировали посредством лизирующего буфера АСК (аммоний-хлорид-калий). Затем из тотальных PBMC выделяли общие Т-клетки w с использованием негативной селекции с помощью магнитных гранул (набор для выделения общих Т-клеток человека Miltenyi MACS). Затем общие Т-клетки высевали на 96-луночные планшеты, покрытые антителом против CD3 (0,5 мкг/мл) в культуральной среде (RPMI1640 с 10% FBS) с соединениями или без них. Супернатант культур собирали через 24 и 48 часов. Высвобождение цитокинов [т.е. интерлейкин-2 (IL-2), интерферон-гамма (IFN γ)] в супернатант определяли посредством анализа HTRF (CisBio) в соответствии с инструкциями к набору. Считывание с планшетов для анализа HTRF проводили на устройстве для считывания планшетов Clariostar (BMG Labtech) при 665 нм и 620 нм. Данные анализировали и экстраполировали к стандартной кривой в

соответствии с инструкциями к набору HTRF в Prism и Excel. Кратность изменений высвобождения цитокинов вычисляли путем деления пг/мл обнаруженных цитокинов на фоновое высвобождение цитокинов (стимуляция посредством только CD3). Данные представляли графически в Prism в качестве среднего значения для реплик с планками погрешности для стандартного отклонения.

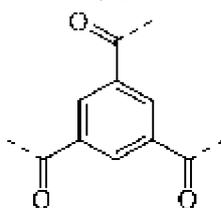
Данные, приведенные на фиг.14, демонстрируют, что Т-клетки секретируют провоспалительные цитокины в ответ на мультимеры CD137 BCY7838, BCY8945, BCY7841, BCY8947, BCY7839, BCY7842, BCY8960, BCY8964 и BCY8958, но не на мономерный контроль BCY0592.

где "-----" обозначает точку присоединения каждой группы S_1 .

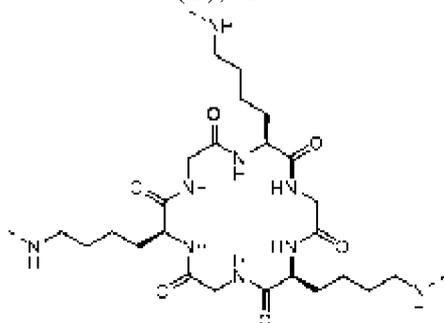
5. Мультимерный связывающий комплекс по п.3, где m обозначает 3 и СНМ выбран из мотива формулы (B), (C) или (D):



(B);



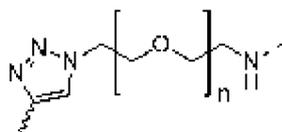
(C); или



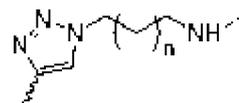
(D);

где "-----" обозначает точку присоединения каждой группы S_1 .

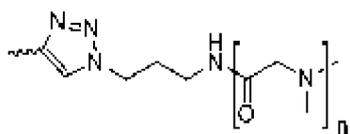
6. Мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.3-5, где спейсер (S_1) выбран из любого из спейсеров S_1A , S_1B , S_1C , S_1D , S_1E , S_1F , S_1G и S_1H :



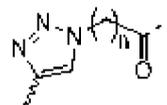
S₁A
n = 5, 10 и 23



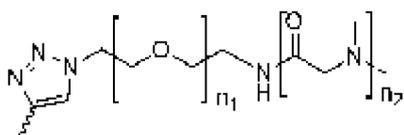
S₁E
n = 1



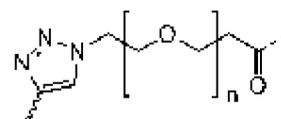
S₁B
n = 5, 10



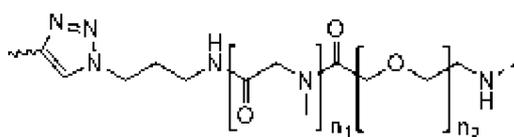
S₁I
n = 1



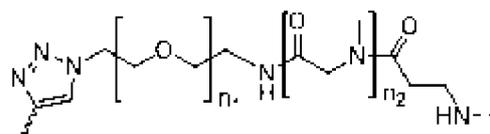
S₁C
n₁ = 5, n₂ = 5
n₁ = 10, n₂ = 10



S₁G
n = 5 и 10



S₁D
n₁ = 5, n₂ = 5
n₁ = 10, n₂ = 10



S₁H
n₁ = 5, n₂ = 5
n₁ = 10, n₂ = 10

где "-----" обозначает точку присоединения к группе СНМ; и
" ~~~~ " обозначает точку присоединения к бициклической группе.

7. Мультимерный связывающий комплекс по п.6, где спейсер (S₁) представляет собой S₁A.

8. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-7, где каждый из указанных пептидных лигандов является специфичным к эпитопу, присутствующему на Т-клетке или злокачественной клетке.

9. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-8, где указанные бициклические пептидные лиганды являются специфичными к одной и той же мишени.

10. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-9, где мультимерный связывающий комплекс содержит по меньшей мере два идентичных бициклических пептидных лиганда.

11. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-10, где мультимерный связывающий комплекс содержит по меньшей мере два различных

бициклических пептидных лиганда.

12. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-8, где указанные бициклические пептидные лиганды являются специфичными к различным мишеням.

13. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-12, где бициклический пептидный лиганд конъюгирован с одной половиной связывающей пары и указанная другая половина указывающей пары связывает каждый из бициклических пептидов со спейсером.

14. Мультимерный связывающий комплекс по п.13, где указанная связывающая пара содержит биотин и стрептавидин.

15. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-14, где по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов является специфичным к CD137, например, каждый из указанных пептидных лигандов является специфичным к CD137.

16. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-15, где указанные последовательности петель содержат 5 или 6 аминокислотных остатков, например, обе состоят из 6 аминокислот.

17. Мультимерный связывающий комплекс по п.15 или п.16, где указанный пептидный лиганд содержит центральную аминокислотную последовательность, выбранную из:

C_i IIEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 23);
 C_i IKEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 24);
 C_i IEKGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 25);
 C_i IIE(D-K)QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 26);
 C_i IIEGKYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 27);
 C_i IIEGQYC_{ii}KADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 28);
 C_i IIEGQYC_{ii}FADKY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 29); и
 C_i IIEGQYC_{ii}FADPYKC_{iii} (SEQ ID NO: 30);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно и Nle обозначает норлейцин, или их фармацевтически приемлемую соль.

18. Мультимерный связывающий комплекс по п.17, где указанный пептидный лиганд содержит N- и C-концевые модификации и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

A- C_i IIEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 31; обозначаемая в настоящем описании как мономер 1 и BCY3814);

Ac-A- C_i IIEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-Dap (SEQ ID NO: 32; обозначаемая в настоящем описании как мономер 2 и BCY7732);

Ac-A- C_i IKEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 33; обозначаемая в настоящем описании как мономер 3 и BCY7733);

Ac-A- C_i IEKGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 34; обозначаемая в настоящем описании как мономер 4 и BCY7734);

Ac-A- C_i IIE(D-K)QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 35; обозначаемая в

настоящем описании как мономер 5 и BCY7735);

Ac-A-C_iIEEGKYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 36; обозначаемая в настоящем описании как мономер 6 и BCY7736);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}KADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 37; обозначаемая в настоящем описании как мономер 7 и BCY7737);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADKY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 38; обозначаемая в настоящем описании как мономер 8 и BCY7738);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPYKC_{iii}-A (SEQ ID NO: 39; обозначаемая в настоящем описании как мономер 9 и BCY7739);

A-C_iIEEGQYC_{ii}F[D-A]DPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 58; обозначаемая в настоящем описании как мономер 10 и BCY8217);

Ac-C_i[tBuAla]PK[D-A]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 59; обозначаемая в настоящем описании как мономер 11 и BCY8919);

Ac-C_i[tBuAla]PE[D-K]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 60; обозначаемая в настоящем описании как мономер 12 и BCY8920);

Ac-A-C_iIE[D-K]GQYC_{ii}F[D-A]DPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 61; обозначаемая в настоящем описании как мономер 13 и BCY8914);

Ac-A-C_iIE[D-K]GQYC_{ii}F[D-A]DPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 62; обозначаемая в настоящем описании как мономер 14 и BCY8915); и

[Ac]-[D-A]-[D-C_i][D-I][D-E][D-E]K[D-Q][D-Y][D-C_{ii}][D-F][D-A][D-D][D-P][D-Y][D-Nle][D-C_{iii}]-[D-A] (SEQ ID NO: 63; обозначаемая в настоящем описании как мономер 15 и BCY11072);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, Ac обозначает N-концевую ацетильную группу, Dap обозначает диаминопропионовую кислоту, tBuAla обозначает t-бутил-аланин и Nle обозначает норлейцин, или их фармацевтически приемлемую соль.

19. Мультимерный связывающий комплекс по п.17 или п.18, где указанный пептидный лиганд включает присоединение части PYA к N-концу, C-концу или остаткам лизина в указанной последовательности и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

(PYA)-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 40; обозначаемая в настоящем описании как мономер 1A и BCY7740);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-Dap(PYA) (SEQ ID NO: 41; обозначаемая в настоящем описании как мономер 2A и BCY7741);

Ac-A-C_iIK(PYA)EGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 42; обозначаемая в настоящем описании как мономер 3A и BCY7742);

Ac-A-C_iIEK(PYA)GQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 43; обозначаемая в настоящем описании как мономер 4A и BCY7743);

Ac-A-C_iIEE(D-K)(PYA)QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 44; обозначаемая в настоящем описании как мономер 5A и BCY7744);

Ac-A-C_iIEEGK(PYA)YC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 45; обозначаемая в настоящем описании как мономер 6A и BCY7745);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}K(PYA)ADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 46; обозначаемая в настоящем описании как мономер 7A и BCY7746);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADK(PYA)Y(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 47; обозначаемая в настоящем описании как мономер 8A и BCY7747);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPYK(PYA)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 48; обозначаемая в настоящем описании как мономер 9A и BCY7748);

(PYA)-A-C_iIEEGQYC_{ii}F[D-A]DPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 64; обозначаемая в настоящем описании как мономер 10A и BCY8935);

Ac-C_i[tBuAla]PK(PYA)[D-A]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 65; обозначаемая в настоящем описании как мономер 11A и BCY8927);

Ac-C_i[tBuAla]PE[D-K(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 66; обозначаемая в настоящем описании как мономер 12A и BCY8929);

Ac-A-C_iIE[D-K(PYA)]GQYC_{ii}F[D-A]DPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 67; обозначаемая в настоящем описании как мономер 13A и BCY8925);

Ac-A-C_iIE[K(PYA)]GQYC_{ii}F[D-A]DPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO: 68; обозначаемая в настоящем описании как мономер 14A и BCY8926); и

[Ac]-[D-A]-[D-C_i][D-I][D-E][D-E][K(PYA)][D-Q][D-Y][D-C_{ii}][D-F][D-A][D-D][D-P][D-Y][D-Nle][D-C_{iii}]-[D-A] (SEQ ID NO: 69; обозначаемая в настоящем описании как мономер 15A и BCY11506);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, Ac обозначает N-концевую ацетильную группу, Dar обозначает диаминопропионовую кислоту, PYA обозначает пропаргил-кислоту, tBuAla обозначает трет-бутилаланин и Nle обозначает норлейцин, или их фармацевтически приемлемую соль.

20. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.17-19, где указанный пептидный лиганд включает присоединение части BCN у N-концу или остаткам лизина в указанной последовательности и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

(BCN)-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 49; обозначаемая в настоящем описании как мономер 1-BCN и BCY8141);

Ac-A-C_iIK(BCN)EGQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 50; обозначаемая в настоящем описании как мономер 3-BCN и BCY8095);

Ac-A-C_iIEK(BCN)GQYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 51; обозначаемая в настоящем описании как мономер 4-BCN и BCY8142);

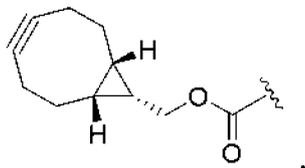
Ac-A-C_iIEE[(D-K)(BCN)]QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 52; обозначаемая в настоящем описании как мономер 5-BCN и BCY8096);

Ac-A-C_iIEEGK(BCN)YC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 53; обозначаемая в настоящем описании как мономер 6-BCN и BCY8143);

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}K(BCN)ADPY(Nle)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 54; обозначаемая в настоящем описании как мономер 7-BCN и BCY8144); и

Ac-A-C_iIEEGQYC_{ii}FADPYK(BCN)C_{iii}-A (SEQ ID NO: 55; обозначаемая в настоящем описании как мономер 9-BCN и BCY8097);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, Ac обозначает N-концевую ацетильную группу, Nle обозначает норлейцин и BCN обозначает:



или их фармацевтически приемлемую соль.

21. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-20, где указанные реакционноспособные группы включают цистеин.

22. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-21, где указанный молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА).

23. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-3, который представляет собой тример, приведенный в таблице 1, или тетрамер, приведенный в таблице 2.

24. Мультимерный связывающий комплекс по п.23, который представляет собой тример, выбранный из BCY7749, BCY7750, BCY7835 и BCY7839, или тетрамер, выбранный из BCY7751, BCY7752, BCY7845, BCY7846, BCY7829, BCY7838, BCY7842, BCY8945 и BCY8947, такой как тример, который представляет собой BCY7839, или тетрамер, выбранный из BCY7842, BCY8945 и BCY8947.

25. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.17-20, где фармацевтически приемлемая соль выбрана из свободной кислоты или соли натрия, калия, кальция, аммония.

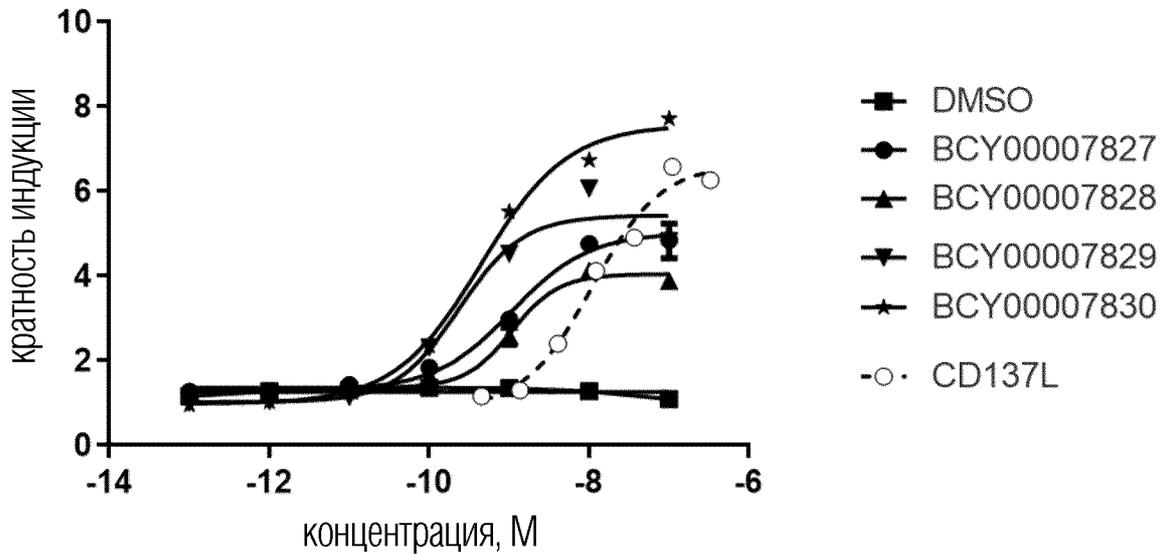
26. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.15-24, где CD137 представляет собой CD137 человека.

27. Конъюгат лекарственного средства, содержащий мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-26, конъюгированный с одной или несколькими эффекторными и/или функциональными группами.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-26 или конъюгат лекарственного средства по п.27, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

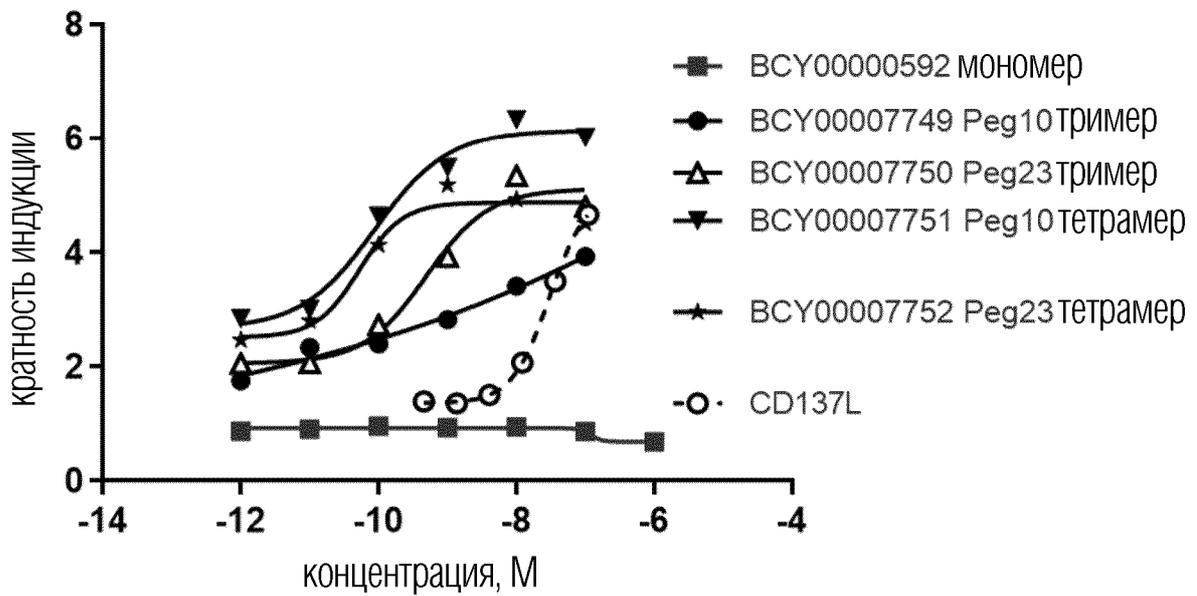
29. Мультимерный связывающий комплекс по любому из п.п.1-26 или конъюгат лекарственного средства по п.27 для применения для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого CD137.

По доверенности



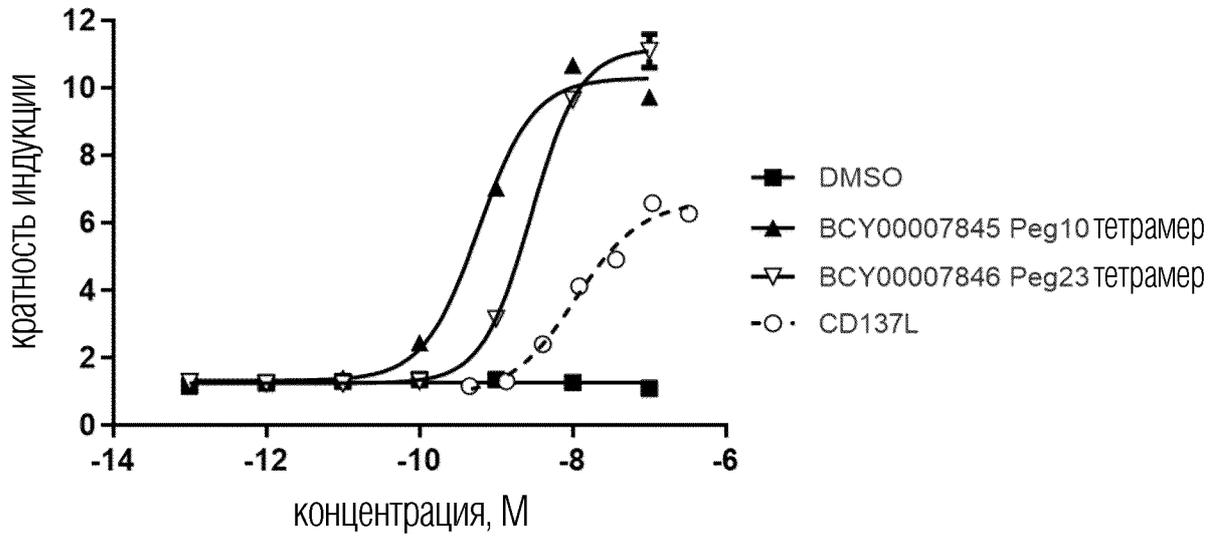
ФИГ. 1

С-концевые мультимеры

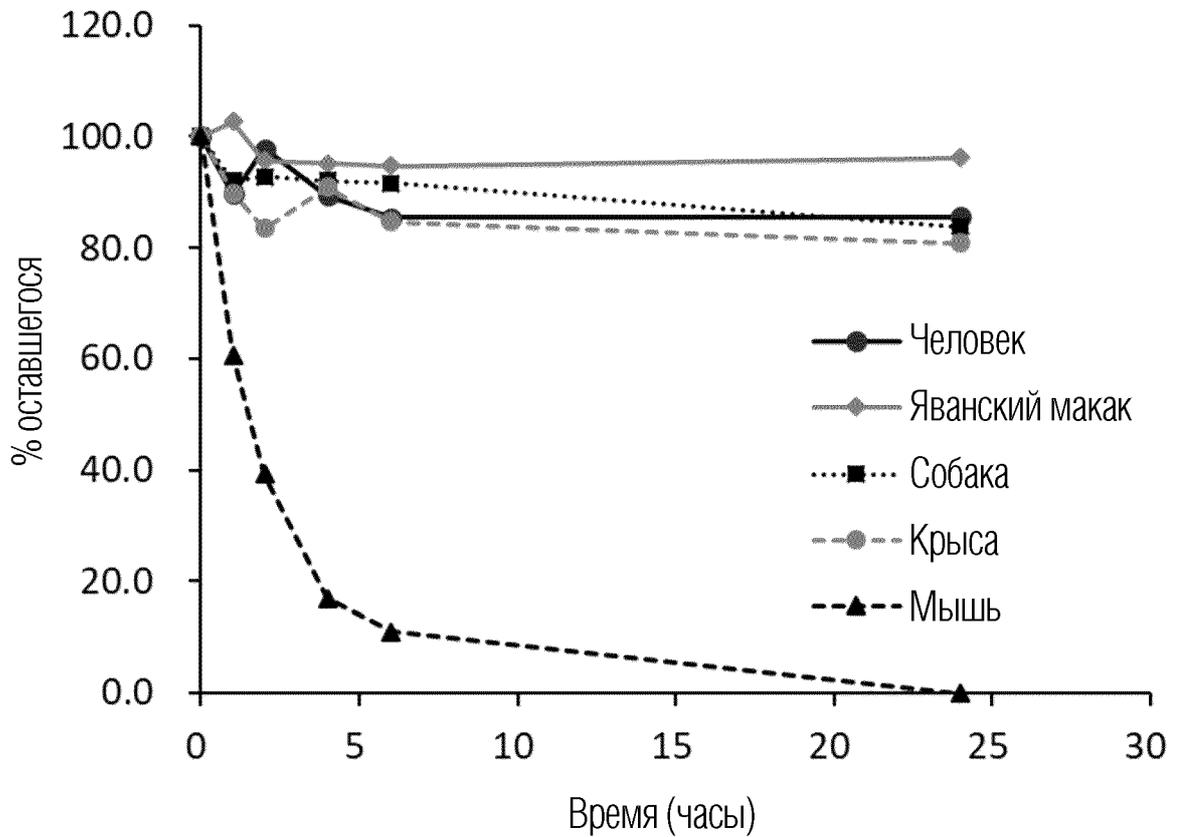


ФИГ. 2

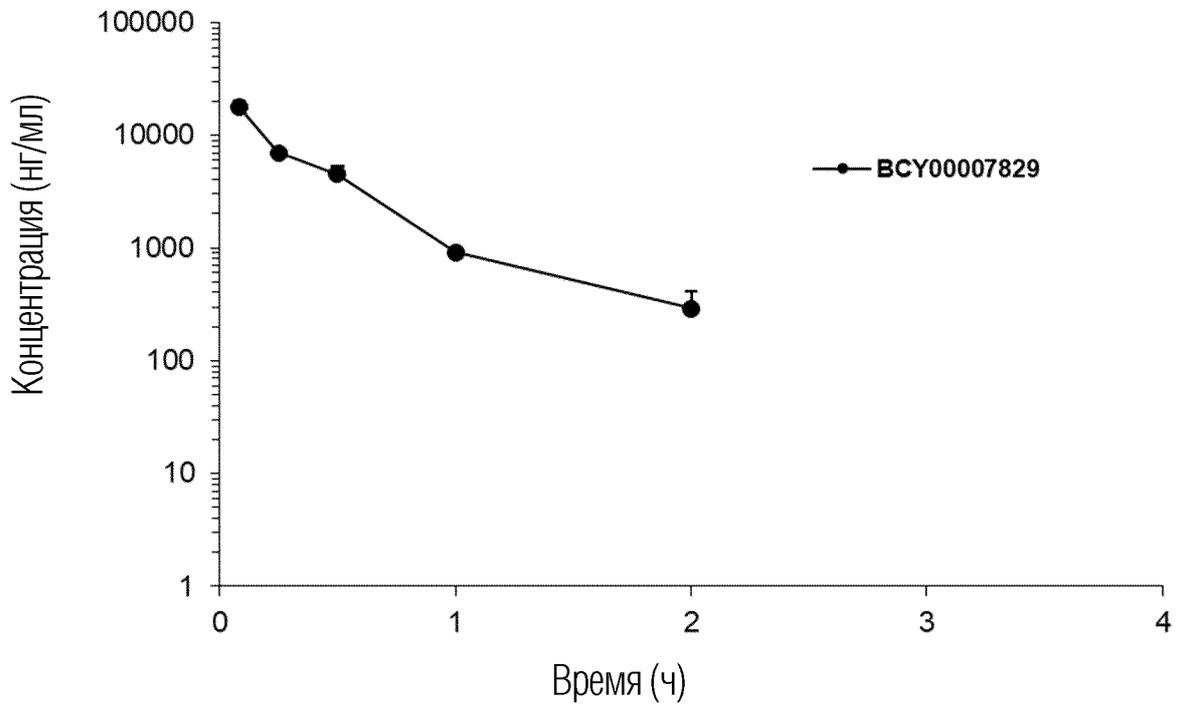
Тетрамеры с боковой цепью с Lys5



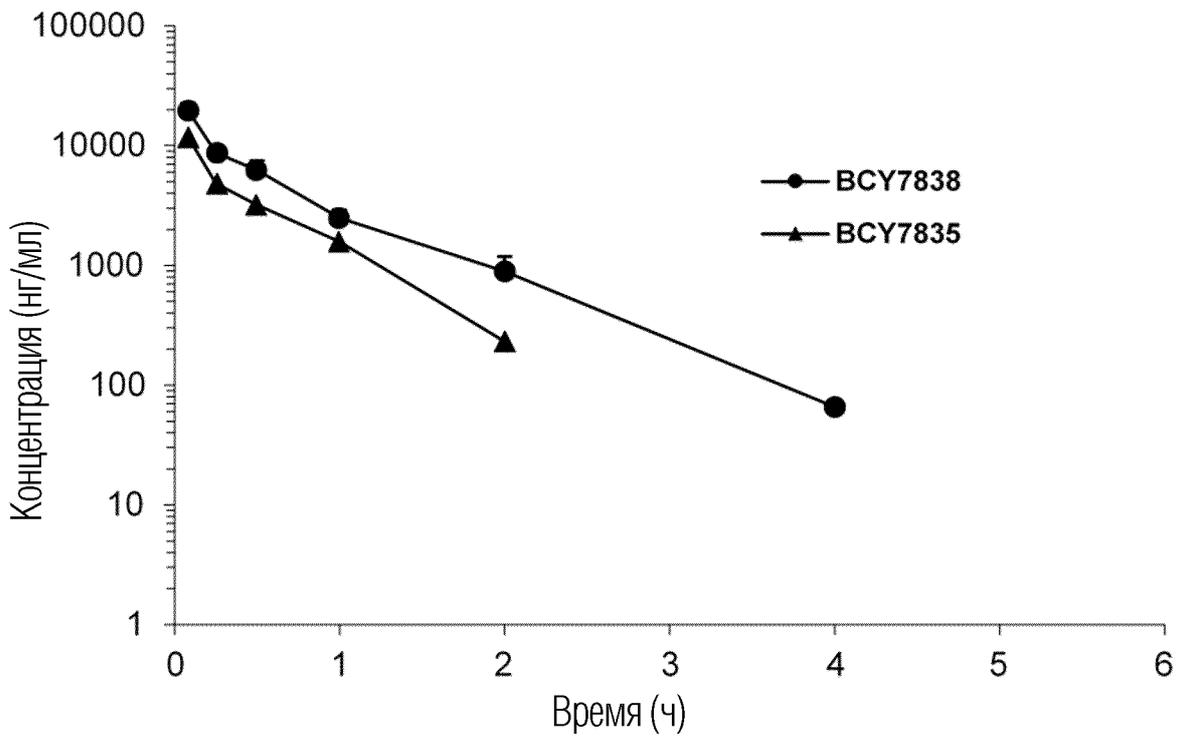
ФИГ. 3



ФИГ. 4

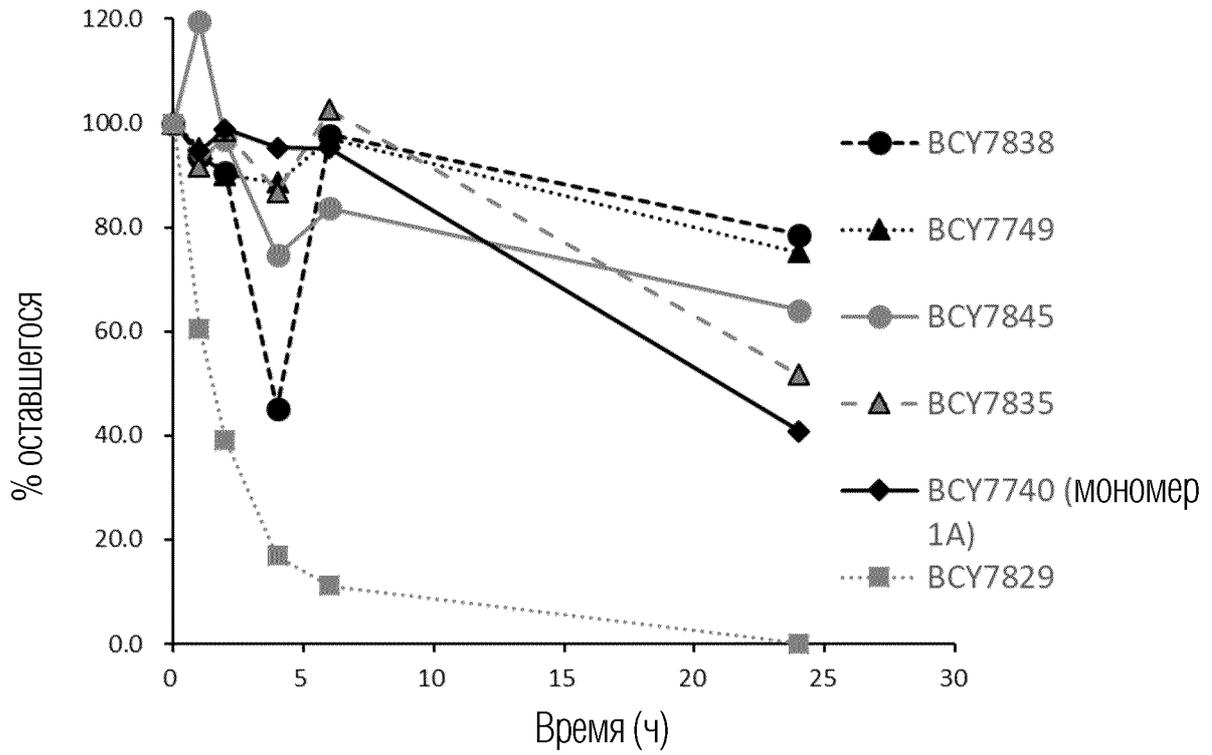


ФИГ. 5А

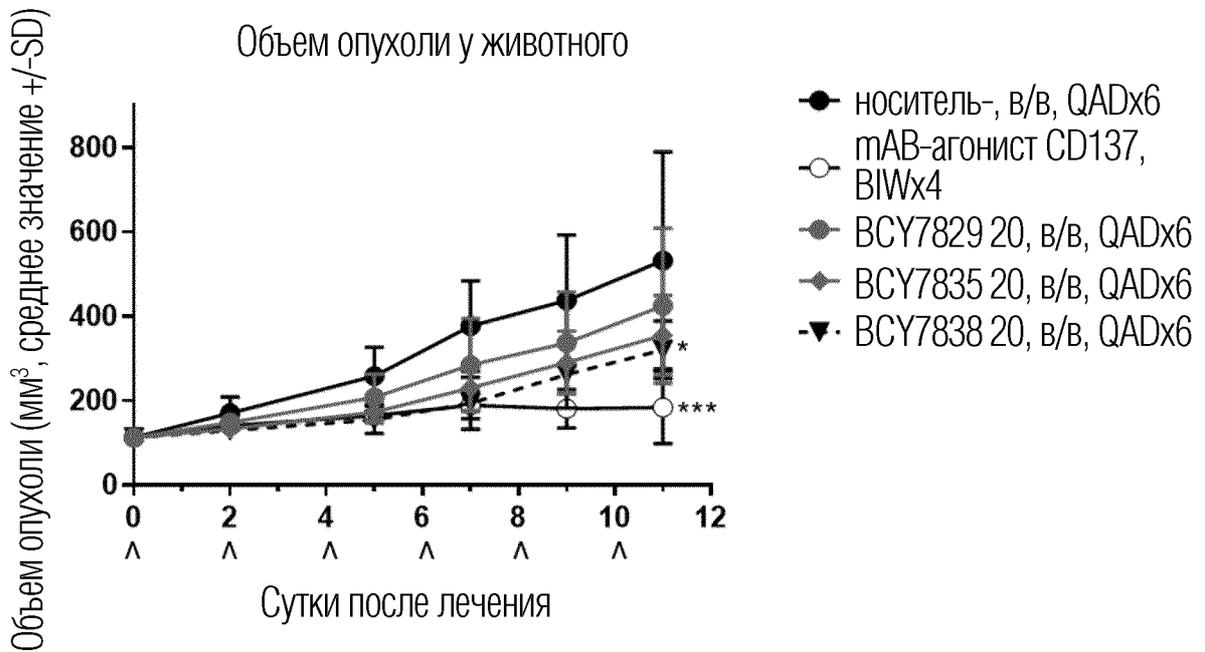


ФИГ. 5В

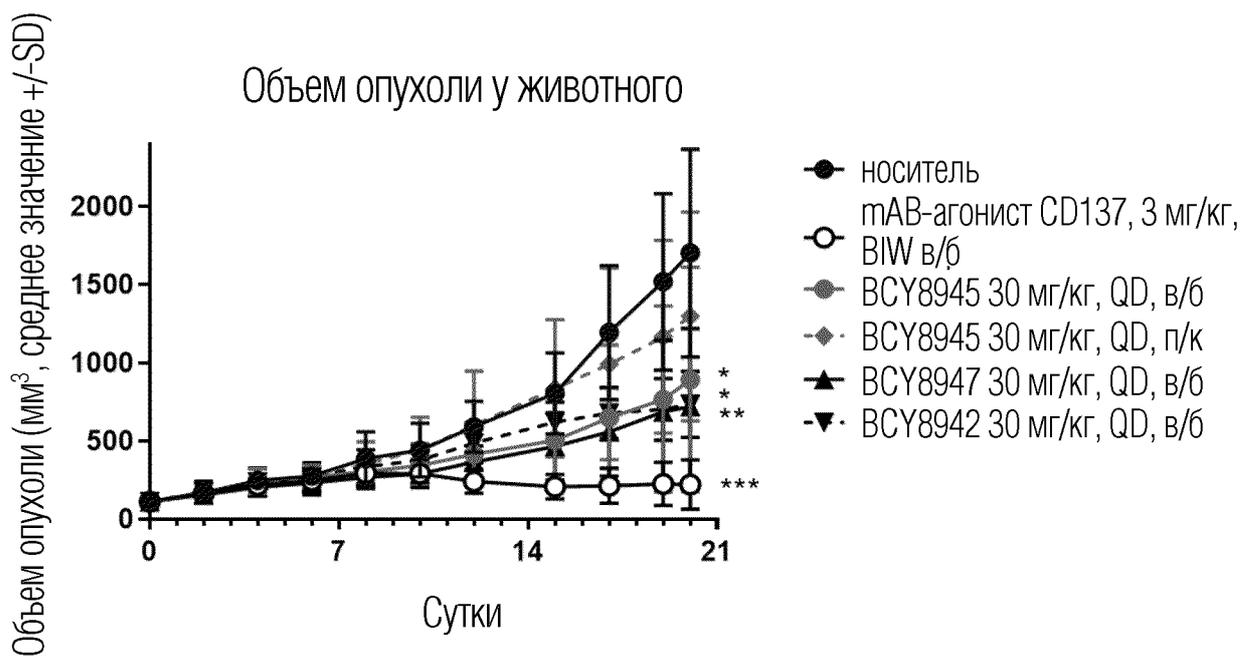
4/11



ФИГ. 6

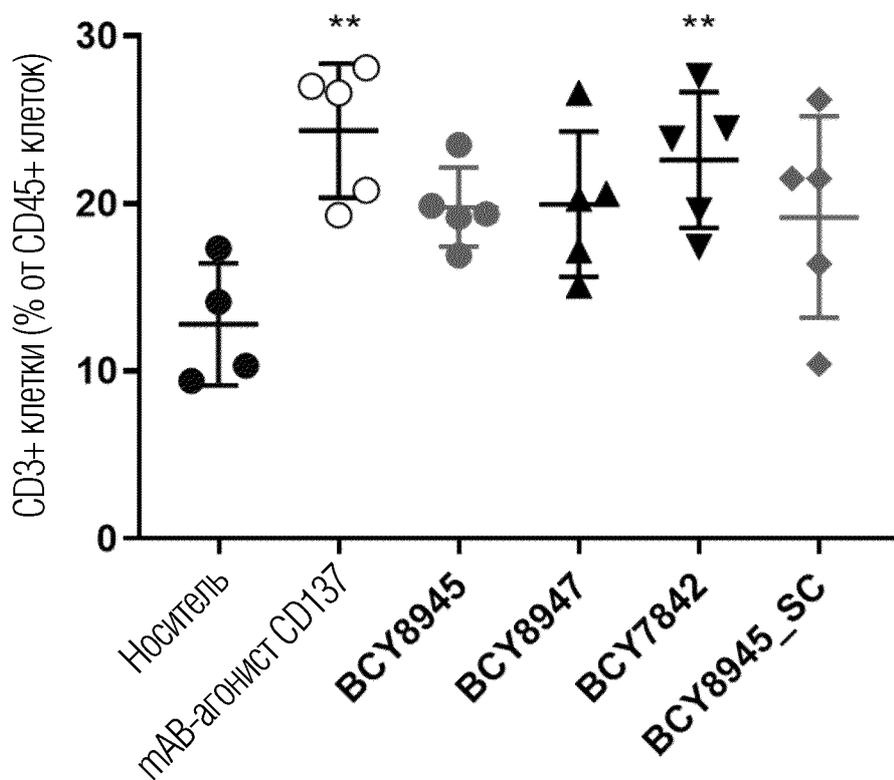


ФИГ. 7

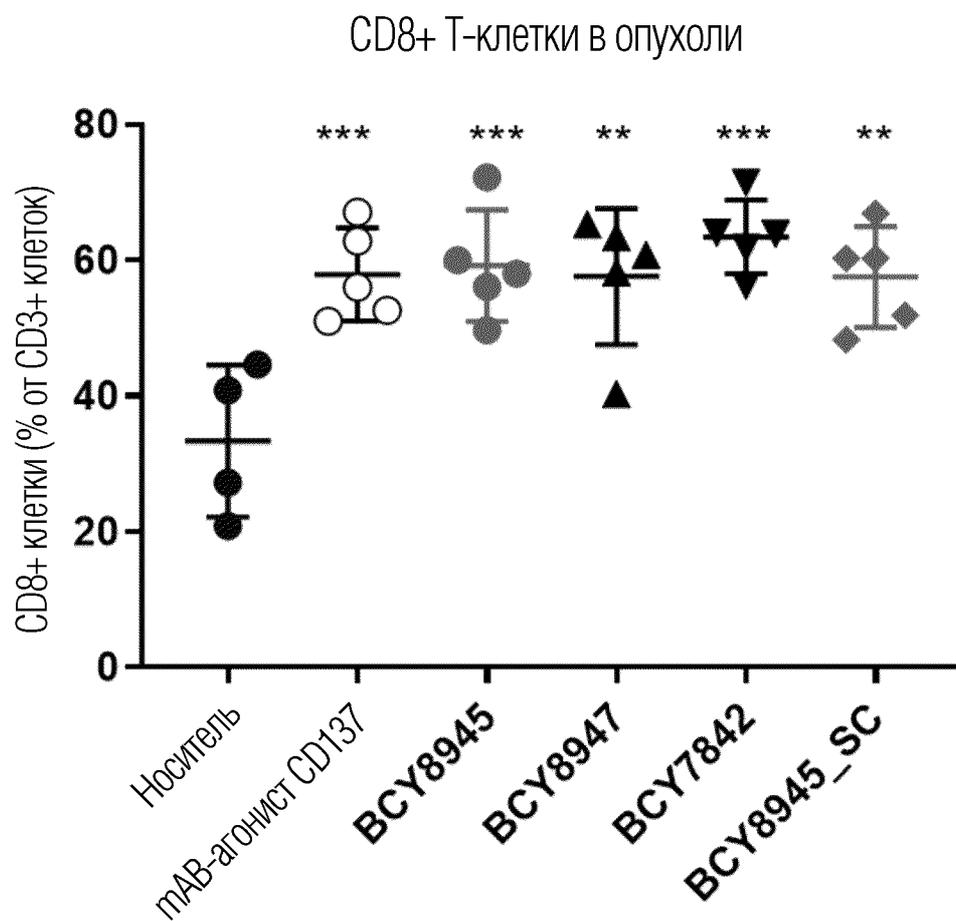


ФИГ. 8

Т-клетки в опухоли

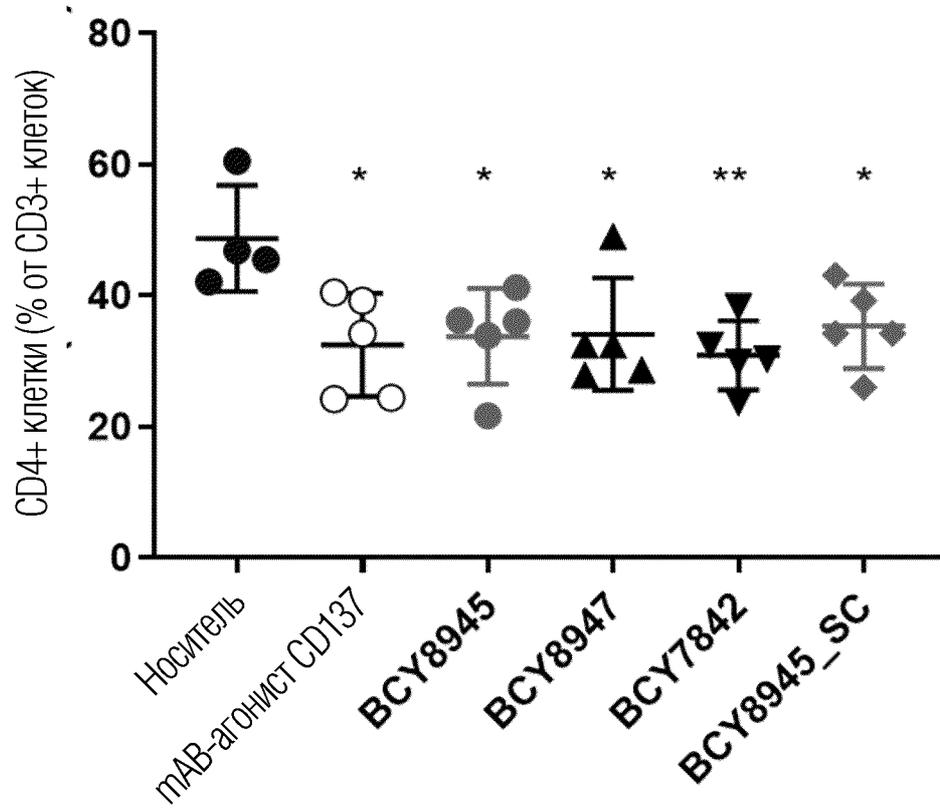


ФИГ. 9



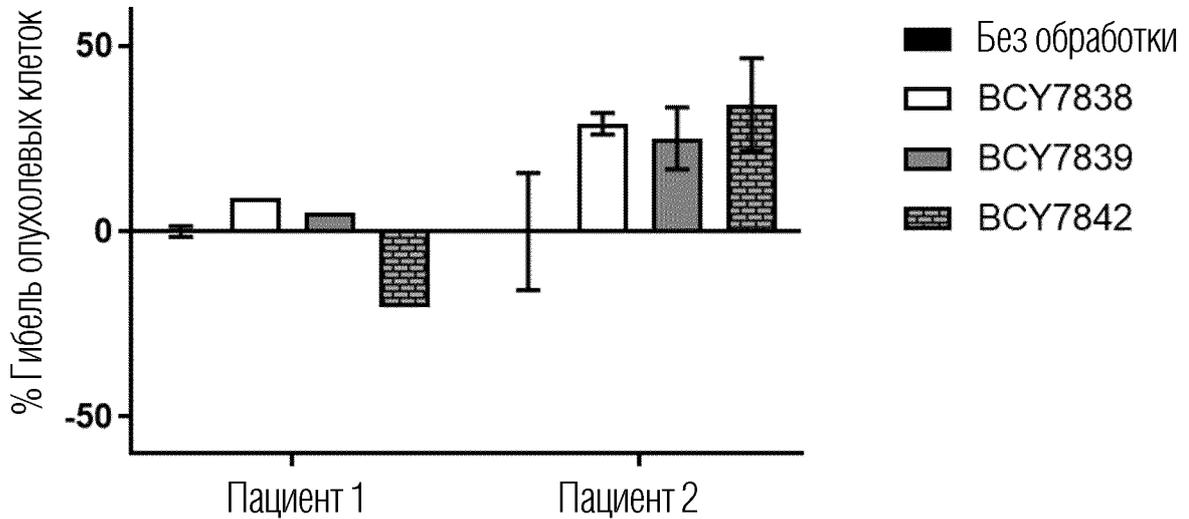
ФИГ. 10

CD4+ Т-клетки в опухоли



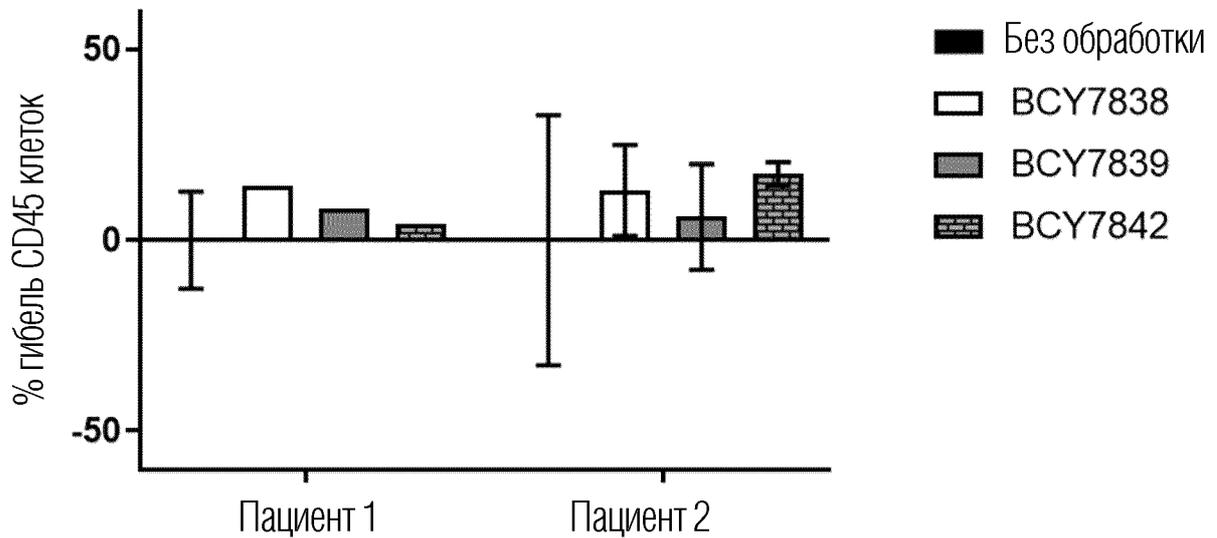
ФИГ. 11

Гибель опухолевых клеток в зависимости от обработки

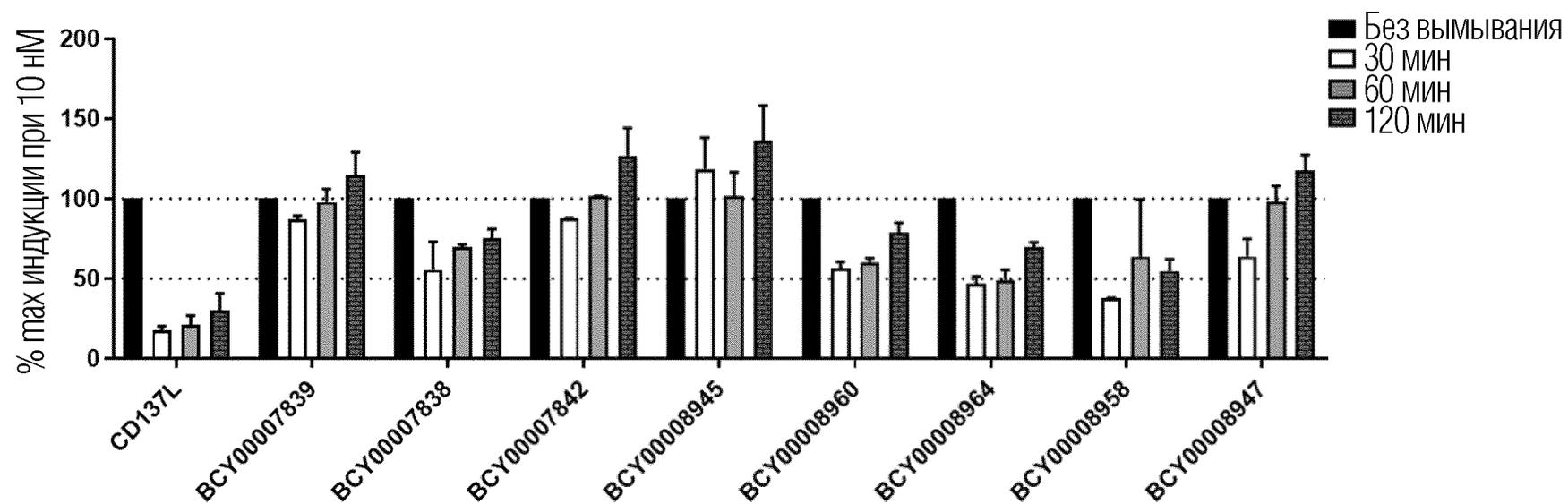


ФИГ. 12А

Гибель лимфоцитов в зависимости от обработки

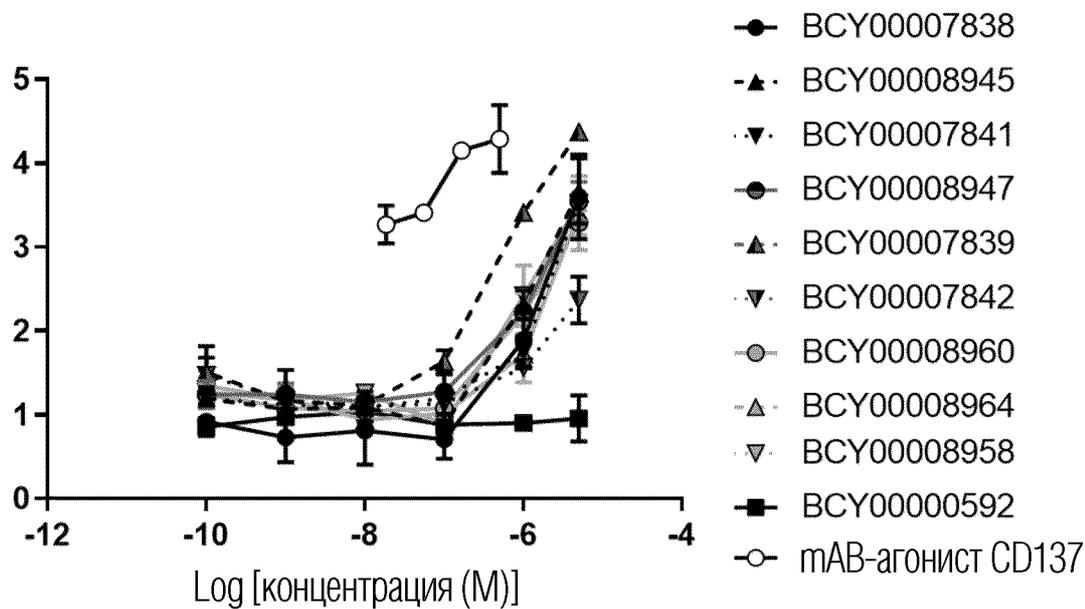


ФИГ. 12В



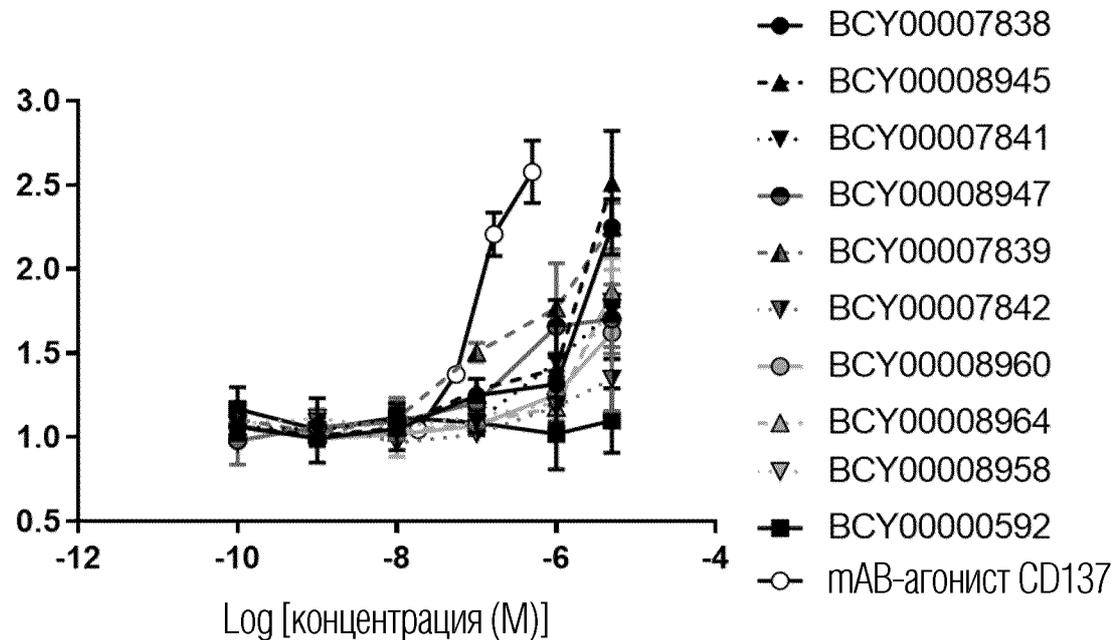
ФИГ. 13

Кратность изменения высвобождения IL-2 (нормализованная к стимуляции посредством CD3 отдельно)

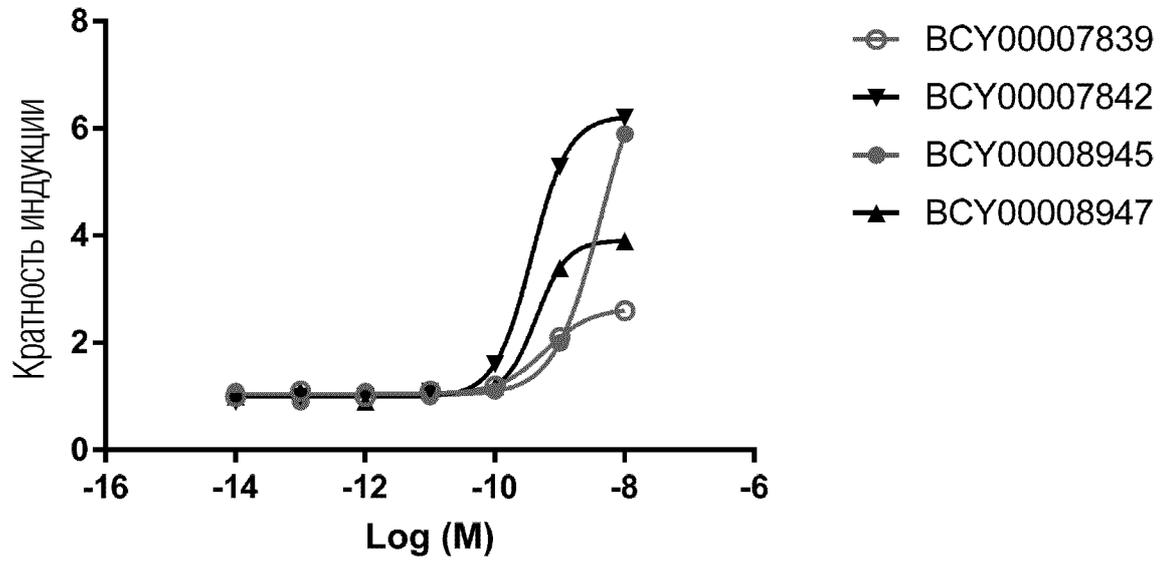


ФИГ. 14А

Кратность изменения высвобождения IFN γ (нормализованная к стимуляции посредством CD3 отдельно)



ФИГ. 14В

BCY7839, BCY7842, BCY8945 и BCY8947

ФИГ. 15