

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193064 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.15

(51) Int. Cl. *A61K 47/64* (2017.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.05.11

(54) БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ОХ40

(31) 62/845,473

(32) 2019.05.09

(33) US

(86) PCT/GB2020/051144

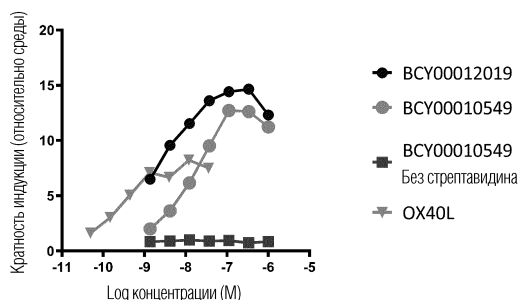
(87) WO 2020/225577 2020.11.12

(71) Заявитель:
БАЙСИКЛТЭКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Кин Николас, Макдоннелл Кевин,
Стефен Том Ли, Чэнь Люхун,
Харрисон Хелен, Парк Питер,
Скиннер Майкл, Чи Харви (GB)

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

(57) Изобретение относится к полипептидам, которые ковалентно связаны с молекулярными каркасами, так что две или более пептидных петли замыкаются между точками присоединения к каркасу. В частности, изобретение относится к пептидам, которые связывают ОХ40. Изобретение также относится к мультимерным связывающим комплексам полипептидов, ковалентно связанных с молекулярными каркасами, так что две или более пептидных петли замыкаются между точками присоединения к каркасу, которые являются функциональными агонистами ОХ40. Также изобретение относится к конъюгатам лекарственных средств, содержащим указанные пептиды и комплексы, 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, комплексов и конъюгатов лекарственных средств для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого ОХ40.



202193064 A1

202193064

A1

БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ОХ40**ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к полипептидам, которые ковалентно связаны с молекулярными каркасами, так что две или более пептидных петли замыкаются между точками присоединения к каркасу. В частности, изобретение относится к пептидам, которые связывают ОХ40. Изобретение также относится к мультимерным связывающим комплексам полипептидов, ковалентно связанных с молекулярными каркасами, так что две или более пептидных петли замыкаются между точками присоединения к каркасу, которые являются функциональными агонистами ОХ40. Также изобретение относится к конъюгатам лекарственных средств, содержащим указанные пептиды и комплексы, 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, комплексов и конъюгатов лекарственных средств для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого ОХ40.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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 циклоsporин 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 $\alpha V\beta 3$ (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).

Вследствие циклической конфигурации, пептидные макроциклы являются менее гибкими, чем линейные пептиды, что приводит к меньшей потере энтропии при связывании с мишенями и обеспечивает более высокую аффинность связывания. Уменьшенная гибкость также приводит к фиксации специфичных к мишени конформаций, повышая специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Этот эффект проиллюстрирован с помощью мощного и селективного ингибитора матричной металлопротеиназы 8 (ММР-8), который утрачивал его селективность относительно других

ММР, когда его кольцо раскрывали (Cherney *et al.* (1998), J Med Chem 41 (11), 1749-51). Благоприятные свойства связывания, которые достигались посредством макроциклизации, являются еще более выраженными в полициклических пептидах, имеющих более одного пептидного кольца, как например, в ванкомицине, низине и актиномицине.

Различные исследовательские команды ранее проводили связывание полипептидов с остатками цистеина с синтетической молекулярной структурой (Kemp and McNamara (1985), J. Org. Chem; Timmerman *et al.* (2005), ChemBioChem). Meloen и коллеги использовали трис(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной кристаллизации множества пептидных петель на синтетических каркасах для структурной имитации белковых поверхностей (Timmerman *et al.* (2005), ChemBioChem). Описаны способы получения лекарственных соединений-кандидатов, где указанные соединения получают путем связывания цистеинсодержащих полипептидов с молекулярным каркасом, например, таким как 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) (Heinis *et al.* (2014) Angewandte Chemie, International Edition 53(6) 1602-1606).

Были разработаны комбинаторные подходы на основе фагового дисплея для получения и скрининга крупных библиотек бициклических пептидов против представляющих интерес мишеней (Heinis *et al.* (2009), Nat Chem Biol 5 (7), 502-7 и WO 2009/098450). В кратком изложении, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержавших три остатка цистеина и две области из шести случайных аминокислот (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys), экспонировали на фage и подвергали циклизации посредством ковалентного связывания боковых цепей цистеина с низкомолекулярным каркасом.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту изобретения, предусматривается пептидный лиганд, специфичный к ОХ40, содержащий 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.

Согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается мультимерный связывающий комплекс, который содержит по меньшей мере два пептидных лиганда, где по меньшей мере один пептидный лиганд является специфичным к ОХ40, как определено в настоящем описании, и 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 цепи.

Согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается конъюгат лекарственного средства, содержащий пептидный лиганд и мультимерный связывающий

комплекс, как определено в настоящем описании, конъюгированный с одной или несколькими эффекторными и/или функциональными группами.

Согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая пептидный лиганд, мультимерный связывающий комплекс или конъюгат лекарственного средства, как определено в настоящем описании, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается пептидный лиганд, мультимерный связывающий комплекс, конъюгат лекарственного средства или фармацевтическая композиция, как определено в настоящем описании, для применения для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого ОХ40.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1: Результаты для ОХ40L, ВСУ10549 (биотинилированный мономер), ВСУ10549+стрептавидин и ВСУ12019 (тетрамер), протестированных в репортерном клеточном анализе ОХ40 Promega.

Фиг.2: Результаты для ВСУ12141, протестированного в анализе с сокультурой РВМС и опухолевых клеток.

Фиг.3: Результаты для ВСУ12141, ВСУ12721 и ВСУ12967 в клеточном анализе активности ОХ40 Promega в сокультуре с опухолевыми клетками по сравнению с ОХ40L и не связывающимся контрольным пептидом ВСУ12968.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пептидные лиганды

Согласно первому аспекту изобретения, предусматривается пептидный лиганд, специфичный к ОХ40, содержащий 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 цепи.

В одном варианте осуществления указанные реакционноспособные группы включают остатки цистеина.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 2 аминокислот и вторая из которых состоит из 7 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 3 аминокислот и вторая из которых состоит из 7 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 3 аминокислот и вторая из которых состоит из 8 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 4 аминокислот и вторая из которых состоит из 5 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 4 аминокислот и вторая из которых состоит из 6 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 4 аминокислот и вторая из которых состоит из 8 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, обе из которых состоят из 5 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 5 аминокислот и вторая из которых состоит из 7 аминокислот.

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.

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

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 8 аминокислот и вторая из которых состоит из 3 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 8 аминокислот и вторая из которых состоит из 4 аминокислот.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 2 аминокислоты и вторая из которых содержит 7 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:



где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте осуществления пептид по изобретению отличается от SEQ ID NO: 12.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 2 аминокислоты и вторая из которых содержит 7 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 12)-A (обозначается в настоящем описании как BCY10375).

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 3 аминокислоты и вторая из которых содержит 7 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

C_iRLWC_{ii}IPAPTDDC_{iii} (SEQ ID NO: 13);
 C_iTMWC_{ii}IPAKGDWC_{iii} (SEQ ID NO: 14);
 C_iMLWC_{ii}LPAPTDEC_{iii} (SEQ ID NO: 15);
 C_iILWC_{ii}LPEPPDEC_{iii} (SEQ ID NO: 16);
 C_iLLWC_{ii}IPNPDDNC_{iii} (SEQ ID NO: 17);
 C_iWLWC_{ii}VPNPDDTC_{iii} (SEQ ID NO: 18);
 C_iVLWC_{ii}TPYPGDDC_{iii} (SEQ ID NO: 19);
 C_iALWC_{ii}IPDPQDEC_{iii} (SEQ ID NO: 20);
 C_iTLWC_{ii}IPDASDSC_{iii} (SEQ ID NO: 21);
 C_iQLWC_{ii}IPDADDDC_{iii} (SEQ ID NO: 22);
 C_iQLWC_{ii}VPEPGDSC_{iii} (SEQ ID NO: 23);
 C_iALWC_{ii}IPEESDDC_{iii} (SEQ ID NO: 24);
 C_iVLWC_{ii}IPEPQDKC_{iii} (SEQ ID NO: 25);
 C_iTLWC_{ii}IPDPDDSC_{iii} (SEQ ID NO: 26);
 C_iRLWC_{ii}VPKAEDYC_{iii} (SEQ ID NO: 27);
 C_iTKPC_{ii}IAYYNQSC_{iii} (SEQ ID NO: 28);
 C_iMNPC_{ii}IAYYQQEC_{iii} (SEQ ID NO: 29);
 C_iTNAC_{ii}VAYYHQAC_{iii} (SEQ ID NO: 30); и
 C_iSDPC_{ii}ISYYNQAC_{iii} (SEQ ID NO: 31);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} соответствуют первому, второму и третьему остаткам цистеина, соответственно, или их модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте осуществления пептид по изобретению отличается от одного, или нескольких, или всех из SEQ ID NO: 13-31.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 3 аминокислоты и вторая из которых содержит 7 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 13)-A (далее обозначается как BCY10364);

A-(SEQ ID NO: 14)-A (далее обозначается как BCY10365);

A-(SEQ ID NO: 15)-A (далее обозначается как BCY10366);

A-(SEQ ID NO: 16)-A (далее обозначается как BCY10367);
 A-(SEQ ID NO: 17)-A (далее обозначается как BCY10368);
 A-(SEQ ID NO: 18)-A (далее обозначается как BCY10369);
 A-(SEQ ID NO: 19)-A (далее обозначается как BCY10374);
 A-(SEQ ID NO: 20)-A (далее обозначается как BCY10376);
 A-(SEQ ID NO: 21)-A (далее обозначается как BCY10737);
 A-(SEQ ID NO: 22)-A (далее обозначается как BCY10738);
 A-(SEQ ID NO: 23)-A (далее обозначается как BCY10739);
 A-(SEQ ID NO: 24)-A (далее обозначается как BCY10740);
 A-(SEQ ID NO: 25)-A (далее обозначается как BCY10741);
 A-(SEQ ID NO: 26)-A (далее обозначается как BCY10742);
 A-(SEQ ID NO: 27)-A (далее обозначается как BCY10380);
 A-(SEQ ID NO: 28)-A (далее обозначается как BCY10370);
 A-(SEQ ID NO: 29)-A (далее обозначается как BCY10372);
 A-(SEQ ID NO: 30)-A (далее обозначается как BCY10373); и
 A-(SEQ ID NO: 31)-A (далее обозначается как BCY10379).

В альтернативном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 3 аминокислоты и вторая из которых содержит 7 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_i ILWC_{ii} LPEPHDEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 1),

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

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 3 аминокислоты и вторая из которых содержит 7 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 1)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10551); и

A-(SEQ ID NO: 1)-A (далее обозначается как BCY10371), такую как:

A-(SEQ ID NO: 1)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10551).

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 3 аминокислоты и вторая из которых содержит 8 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_i DPPC_{ii} DPFWYAFYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 32); и

$C_i PDDC_{ii} DPFWYNFYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 33);

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

В одном варианте осуществления пептид по изобретению отличается от одного или обоих из SEQ ID NO: 32-33.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 3 аминокислоты и вторая из которых содержит 8 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 32)-A (далее обозначается как BCY10377); и

A-(SEQ ID NO: 33)-A (далее обозначается как BCY10744).

В альтернативном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 3 аминокислоты и вторая из которых содержит 8 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iA^{K/S^N/E}C_{ii}DPFWYQFYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 2),

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

В следующем варианте осуществления пептидный лиганд $C_iA^{K/S^N/E}C_{ii}DPFWYQFYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 2) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

$C_iAKNC_{ii}DPFWYQFYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 3) и

$C_iASEC_{ii}DPFWYQFYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 4);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначает первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или ее модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 3 аминокислоты и вторая из которых содержит 8 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 3)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10552);

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 3)-A (далее обозначается как BCY10479);

A-(SEQ ID NO: 3)-A (далее обозначается как BCY10378);

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 4)-A (далее обозначается как BCY11371); и

A-(SEQ ID NO: 4)-A (далее обозначается как BCY10743), such as:

A-(SEQ ID NO: 3)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10552);

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 3)-A (далее обозначается как BCY10479); и

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 4)-A (далее обозначается как BCY11371).

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 4 аминокислоты и вторая из которых содержит 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iRYSPC_{ii}YHPHNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 34);

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

В одном варианте осуществления пептид по изобретению отличается от SEQ ID NO: 34.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 4 аминокислоты и вторая из которых содержит 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 34)-A (далее обозначается как BCY10343).

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 4 аминокислоты и вторая из которых содержит 6 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iLYSPC_{ii}NHPLNSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 35);

$C_iEDNYC_{ii}FMWTPYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 36);

$C_iLDSPC_{ii}WHPLNDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 37);

$C_iRFSPC_{ii}SHPLNQC_{iii}$ (SEQ ID NO: 38);

$C_iKYSPC_{ii}WHPLNLC_{iii}$ (SEQ ID NO: 39); и

$C_iRYSPC_{ii}WHPLNNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 40);

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

В одном варианте осуществления пептид по изобретению отличается от одного или нескольких, или всех из SEQ ID NO: 35-40.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 4 аминокислоты и вторая из которых содержит 6 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 35)-A (далее обозначается как BCY10350);

A-(SEQ ID NO: 36)-A (далее обозначается как BCY10352);

A-(SEQ ID NO: 37)-A (далее обозначается как BCY10353);

A-(SEQ ID NO: 38)-A (далее обозначается как BCY10354);

A-(SEQ ID NO: 39)-A (далее обозначается как BCY10730); и

A-(SEQ ID NO: 40)-A (далее обозначается как BCY10731).

В альтернативном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 4 аминокислоты и вторая из которых содержит 6 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_i^L/NYSPC_{ii}WHPLN^D/KC_{iii}$ (SEQ ID NO: 5),

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

В следующем варианте осуществления пептидный лиганд $C_i^L/NYSPC_{ii}WHPLN^D/KC_{iii}$ (SEQ ID NO: 5) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

$C_iLYSPC_{ii}WHPLNDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 6); и

$C_iNYSPC_{ii}WHPLNKC_{iii}$ (SEQ ID NO: 7);

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

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 4 аминокислоты и вторая из которых содержит 6 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 6)-A (далее обозначается как BCY10482);

A-(SEQ ID NO: 6)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10549);

A-(SEQ ID NO: 6)-A-K(Pya) (далее обозначается как BCY11607);

Ac-A-(SEQ ID NO: 6)-A-K(Pya) (далее обозначается как BCY12708);

A-(SEQ ID NO: 6)-A (далее обозначается как BCY10351);

A-(SEQ ID NO: 7)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY11501); и

A-(SEQ ID NO: 7)-A (далее обозначается как BCY10729), такую как:

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 6)-A (далее обозначается как BCY10482);

A-(SEQ ID NO: 6)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10549);

A-(SEQ ID NO: 6)-A-K(Pya) (далее обозначается как BCY11607); и

A-(SEQ ID NO: 7)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY11501),

где Pya обозначает 4-пентиноильную часть.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 4 аминокислоты и вторая из которых содержит 6 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 6)-A-K(Pya) (далее обозначается как BCY11607); и

Ac-A-(SEQ ID NO: 6)-A-K(Pya) (далее обозначается как BCY12708);

где Pya обозначает 4-пентиноильную часть.

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 4 аминокислоты и вторая из которых содержит 8 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iEWISC_{ii}PGEPHRWWC_{iii}$ (SEQ ID NO: 41);

$C_iVWEAC_{ii}PENPDQWWC_{iii}$ (SEQ ID NO: 42);

C_i STWHC $_{ii}$ FWNLQEGKC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 43);
 C_i EWKAC $_{ii}$ EHDRERWWC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 44);
 C_i RTWQC $_{ii}$ FYEWQNGHC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 45);
 C_i KTWDC $_{ii}$ FWASQVSEC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 46);
 C_i STWQC $_{ii}$ FYDLQEGHC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 47);
 C_i TTWEC $_{ii}$ FYDLQEGHC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 48);
 C_i ETWEC $_{ii}$ FWRLQAGEC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 49);
 C_i RTWQC $_{ii}$ FWDLQEGLC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 50);
 C_i STWQC $_{ii}$ FWDSQLGAC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 51);
 C_i ETWEC $_{ii}$ FEWQVGSC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 52);
 C_i TTWEC $_{ii}$ FWDLQEGLC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 53);
 C_i HTWDC $_{ii}$ FYQWQDGHHC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 54); и
 C_i TTWEC $_{ii}$ FYSLQDGHHC $_{iii}$ (SEQ ID NO: 55);

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

В одном варианте осуществления пептид по изобретению отличается от одного, или нескольких, или всех из SEQ ID NO: 41-55.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 4 аминокислоты и вторая из которых содержит 8 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 41)-A (далее обозначается как BCY10339);
 A-(SEQ ID NO: 42)-A (далее обозначается как BCY10340);
 A-(SEQ ID NO: 43)-A (далее обозначается как BCY10342);
 A-(SEQ ID NO: 44)-A (далее обозначается как BCY10345);
 A-(SEQ ID NO: 45)-A (далее обозначается как BCY10347);
 A-(SEQ ID NO: 46)-A (далее обозначается как BCY10348);
 A-(SEQ ID NO: 47)-A (далее обозначается как BCY10720);
 A-(SEQ ID NO: 48)-A (далее обозначается как BCY10721);
 A-(SEQ ID NO: 49)-A (далее обозначается как BCY10722);
 A-(SEQ ID NO: 50)-A (далее обозначается как BCY10723);
 A-(SEQ ID NO: 51)-A (далее обозначается как BCY10724);
 A-(SEQ ID NO: 52)-A (далее обозначается как BCY10725);
 A-(SEQ ID NO: 53)-A (далее обозначается как BCY10726);
 A-(SEQ ID NO: 54)-A (далее обозначается как BCY10727); и
 A-(SEQ ID NO: 55)-A (далее обозначается как BCY10728).

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, обе из которых содержат 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_i\text{NEDMYC}_{ii}\text{FMWMEC}_{iii}$ (SEQ ID NO: 56);
 $C_i\text{LYEYDC}_{ii}\text{YTWRR}_{iii}$ (SEQ ID NO: 57);
 $C_i\text{RYEYDC}_{ii}\text{HTWQRC}_{iii}$ (SEQ ID NO: 58);
 $C_i\text{WYEYDC}_{ii}\text{TTWERC}_{iii}$ (SEQ ID NO: 59);
 $C_i\text{WYEYDC}_{ii}\text{RTWTRC}_{iii}$ (SEQ ID NO: 60);
 $C_i\text{LYEYDC}_{ii}\text{HTWTRC}_{iii}$ (SEQ ID NO: 61); и
 $C_i\text{WYEYDC}_{ii}\text{RTWTFC}_{iii}$ (SEQ ID NO: 62);

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

В одном варианте осуществления пептид по изобретению отличается от одного, или нескольких, или всех из SEQ ID NO: 56-62.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, обе из которых содержат 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 56)-A (далее обозначается как BCY10360);
 A-(SEQ ID NO: 57)-A (далее обозначается как BCY10363);
 A-(SEQ ID NO: 58)-A (далее обозначается как BCY10732);
 A-(SEQ ID NO: 59)-A (далее обозначается как BCY10733);
 A-(SEQ ID NO: 60)-A (далее обозначается как BCY10734);
 A-(SEQ ID NO: 61)-A (далее обозначается как BCY10735); и
 A-(SEQ ID NO: 62)-A (далее обозначается как BCY10736).

В альтернативном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, обе из которых содержат 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_i\text{WYEYDC}_{ii}\text{NNWERC}_{iii}$ (SEQ ID NO: 8),

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

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, обе из которых содержат 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 8)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10550); и
 A-(SEQ ID NO: 8)-A (далее обозначается как BCY10361), такую как:
 A-(SEQ ID NO: 8)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10550).

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 5 аминокислот и вторая из которых содержит 7 аминокислот, и аминокислотная

последовательность содержит:

$C_iHGGVWC_{ii}IPNINDSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 63);

$C_iDSPVRC_{ii}YWNTQKGC_{iii}$ (SEQ ID NO: 64); и

$C_iGSPVPC_{ii}YWNTRKGC_{iii}$ (SEQ ID NO: 65);

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

В одном варианте осуществления пептид по изобретению отличается от одного, или нескольких, или всех из SEQ ID NO: 63-65.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 5 аминокислот и вторая из которых содержит 7 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 63)-A (далее обозначается как BCY10336);

A-(SEQ ID NO: 64)-A (далее обозначается как BCY10337); и

A-(SEQ ID NO: 65)-A (далее обозначается как BCY10338).

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 6 аминокислот и вторая из которых содержит 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iAPFEFNC_{ii}YTWRPC_{iii}$ (SEQ ID NO: 66);

$C_iRVLYSPC_{ii}YHWLNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 67);

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

В одном варианте осуществления пептид по изобретению отличается от любого или обоих из SEQ ID NO: 66-67.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 6 аминокислот и вторая из которых содержит 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 66)-A (далее обозначается как BCY10346); и

A-(SEQ ID NO: 67)-A (далее обозначается как BCY10357).

В альтернативном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 6 аминокислот и вторая из которых содержит 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iVIRYSPC_{ii}SHYLNLC_{iii}$ (SEQ ID NO: 9),

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или ее модифицированное производное или фармацевтически приемлемую

соль.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 6 аминокислот и вторая из которых содержит 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 9)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10794); и

A-(SEQ ID NO: 9)-A (далее обозначается как BCY10349), такую как:

A-(SEQ ID NO: 9)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10794).

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, обе из которых содержат 6 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

C_iSIMYSPC_{ii}ENPHNHC_{iii} (SEQ ID NO: 68);

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

В одном варианте осуществления пептид по изобретению отличается от SEQ ID NO: 68.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, обе из которых содержат 6 аминокислот, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 68)-A (далее обозначается как BCY10362).

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 8 аминокислот и вторая из которых содержит 3 аминокислоты, и аминокислотная последовательность содержит:

C_iDKWEPDHL C_{ii}YWWC_{iii} (SEQ ID NO: 69);

C_iDAWPETHVC_{ii}YWWC_{iii} (SEQ ID NO: 70); и

C_iDEYTPENHL C_{ii}YWWC_{iii} (SEQ ID NO: 71);

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

В одном варианте осуществления пептид по изобретению отличается от одного, или нескольких, или всех из SEQ ID NO: 69-71.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 8 аминокислот и вторая из которых содержит 3 аминокислоты, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 69)-A (далее обозначается как BCY10332);

A-(SEQ ID NO: 70)-A (далее обозначается как BCY10717); и

A-(SEQ ID NO: 71)-A (далее обозначается как BCY10718).

В альтернативном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 8 аминокислот и вторая из которых содержит 3 аминокислоты, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iDYSPWWHPC_{ii}NHIC_{iii}$ (SEQ ID NO: 10),

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

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 8 аминокислот и вторая из которых содержит 3 аминокислоты, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 10)-A (далее обозначается как BCY11369); и

A-(SEQ ID NO: 10)-A (далее обозначается как BCY10331), такую как:

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 10)-A (далее обозначается как BCY11369).

В одном варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 8 аминокислот и вторая из которых содержит 4 аминокислоты, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iWYNYSISPC_{ii}YVGEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 72); и

$C_iRYEYPEHLC_{ii}YTWQC_{iii}$ (SEQ ID NO: 73);

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

В одном варианте осуществления пептид по изобретению отличается от любого или обоих из SEQ ID NO: 72-73.

В следующем варианте осуществления указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 8 аминокислот и вторая из которых содержит 4 аминокислоты, и аминокислотная последовательность имеет N- и/или C-концевые модификации и содержит:

A-(SEQ ID NO: 72)-A (далее обозначается как BCY10334); и

A-(SEQ ID NO: 73)-A (далее обозначается как BCY10719).

В следующем варианте осуществления аминокислотная последовательность выбрана из BCY10551, BCY10552, BCY10479, BCY11371, BCY10482, BCY10549, BCY11501, BCY10550, BCY10794 и BCY11369. Пептиды согласно этому варианту осуществления тестировали в клеточном анализе OX40, и они продемонстрировали хороший агонизм OX40 (см. таблицу 2).

В следующем варианте осуществления аминокислотная последовательность выбрана из BCY10551, BCY11371 и BCY10549. Такие пептиды продемонстрировали

величины EC_{50} менее 100 нМ в клеточном анализе ОХ40, показав особенно высокие уровни агонизма (см. таблицу 2).

В следующем варианте осуществления аминокислотная последовательность представляет собой BCY10549. Этот пептид, когда он связан со стрептавидином в тетрамерном формате, продемонстрировал величины EC_{50} менее 20 нМ в клеточном анализе ОХ40 и продемонстрировал высокие уровни агонизма ОХ40 (см. фиг.1 и таблицу 2).

В альтернативном варианте осуществления аминокислотная последовательность представляет собой BCY11607.

В альтернативном варианте осуществления аминокислотная последовательность представляет собой BCY12708.

В следующем варианте осуществления фармацевтически приемлемая соль выбрана из свободной кислоты или соли натрия, калия, кальция или аммония.

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:

$-C_i-I_1-L_2-W_3-C_{ii}-N_4-P_5-E_6-P_7-H_8-D_9-E_{10}-C_{iii}-$ (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-триазиан-1,3,5-тритил)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 биотин-G-Sar₅ обозначается следующим образом:

[Biot]-G-[Sar5]-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 С-концом и наоборот) и их стереохимия аналогично также переворачивается (т.е. D-аминокислоты становятся L-аминокислотами и наоборот).

Определение пептидного лиганда

Пептидный лиганд, как указано в настоящем описании, относится к пептиду, пептидному соединению или пептидомиметику, ковалентно связанному с молекулярным каркасом. Как правило, такие пептиды, пептидные соединения или пептидомиметики включают пептид, имеющий природные или неприродные аминокислоты, 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, пептидное соединение или пептидомиметик связаны с каркасом. В данном случае, пептиды, пептидные соединения или пептидомиметики 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.

Преимущества пептидных лигандов

Определенные бициклические пептиды по настоящему изобретению имеют ряд преимущественных свойств, которые позволяют рассматривать их в качестве подходящих подобных лекарственному средству молекул для инъекционного, ингаляционного, глазного, перорального или местного введения. Такие преимущественные свойства включают:

- Видовая перекрестная реактивность. Это является типичным требованием для доклинической фармакодинамики и фармакокинетической оценки;

- Устойчивость к действию протеаз. Бициклические пептидные лиганды в большинстве случаев должны демонстрировать устойчивость к протеазам плазмы, эпителиальным ("заякоренным на мембране") протеазам, желудочным и кишечным протеазам, поверхностным протеазам легких, внутриклеточным протеазам и т.п. Стабильность к протеазам должна сохраняться между различными видами, чтобы основные бициклические пептидные кандидаты можно было разработать в моделях на животных, а также с уверенностью вводить человеку;

- Желаемый профиль растворимости. Он является функцией соотношения заряженных и гидрофильных против гидрофобных остатков и внутри/межмолекулярного образования H-связей, которое является важным для целей составления и всасывания; и

- Оптимальное плазменное время полужизни в кровотоке. В зависимости от клинического показания и режима лечения, может быть необходимой разработка бициклического пептида с коротким или пролонгированным временем экспозиции *in vivo* для управления течением либо хронических, либо острых заболеваний. Оптимальное время экспозиции определяется необходимостью длительной экспозиции (для максимальной терапевтической эффективности) против необходимости короткого времени экспозиции

для минимизации токсикологических эффектов вследствие длительного воздействия средства.

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 соединений 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, фумаровой, 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, фумаровой, 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, $-\text{COOH}$ может представлять собой $-\text{COO}^-$), 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 одним или несколькими заместительными аминокислотами, такими как аланин, 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-концевой остаток 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-концевой остаток 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.

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, аминокислотная кислота, Aib), и циклоаминокислот, причем простым производным является аминокислота циклопропилкарбоновая

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 нафтилаланина 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, такой как D-аланин. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество идентификации ключевых связывающих остатков и 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 лютетия, 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 DLL3 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 (Т), 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

В одном варианте осуществления молекулярный каркас включает неароматический молекулярный каркас. Упоминание в настоящем описании "неароматического молекулярного каркаса" относится к любому молекулярному каркасу, как определено в настоящем описании, который не содержит ароматическую (т.е. ненасыщенную) карбоциклическую или гетероциклическую кольцевую систему.

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

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 одном 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.

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

Мультимерные связывающие комплексы

Согласно одному аспекту изобретения, предусматривается мультимерный связывающий комплекс, который содержит по меньшей мере два пептидных лиганда, где по меньшей мере один пептидный лиганд является специфичным к ОХ40, как определено в настоящем описании, и 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 цепи.

Настоящее изобретение относится к серии мультимеризованных бициклических пептидов с различными химическими линкерами и шарнирными областями различной длины и жесткости с использованием различных участков присоединения в указанном бициклическом пептиде, которые связывают и активируют мишени (такие как ОХ40) с широким диапазоном силы действия и эффективности.

Специалисту в данной области будет понятно, что идея изобретения состоит в признании, что несколько организованных (мультимерных) бициклических пептидов обеспечивает синергическую пользу посредством суммарных 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 функциональной активности (как определяют в настоящем описании посредством величин EC_{50}), чем их мономерные аналоги. Более того, мультимерные связывающие комплексы по изобретению конструируют так, чтобы они были достаточно малыми, чтобы выводиться почками.

Комплексы по настоящему изобретению особенно применимы для лечения злокачественной опухоли. Таким образом, в одном варианте осуществления по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов является специфичным в отношении эпитопа, находящегося на Т-клетке или злокачественной клетке. В следующем варианте осуществления каждый из указанных пептидных лигандов является специфичным к эпитопу, находящемуся на Т-клетке или злокачественной клетке.

В конкретном варианте осуществления по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов является специфичным к ОХ40, и по меньшей мере один из указанных других пептидных лигандов связывается с дополнительным компонентом на иммунной клетке. В следующем варианте осуществления указанный дополнительный компонент на иммунной клетке представляет собой CD137. Таким образом, в следующем варианте осуществления по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов содержит лиганд

CD137-связывающего пептида.

В следующих вариантах осуществления по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов является специфичным к ОХ40, и по меньшей мере один из указанных дополнительных пептидных лигандов связывается с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке. Таким образом, в определенных вариантах осуществления мультимеризованные пептиды по изобретению включают по меньшей мере один пептидный лиганд, специфичный к ОХ40, по меньшей мере один пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке, и необязательно по меньшей мере один пептидный лиганд, который связывается с компонентом на иммунной клетке. В следующих вариантах осуществления мультимеризованные пептиды по изобретению включают по меньшей мере один пептидный лиганд, специфичный к ОХ40, по меньшей мере один пептидный лиганд, который связывается с дополнительным компонентом на иммунной клетке, и необязательно по меньшей мере один пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке.

В следующих вариантах осуществления иммунная клетка выбрана из: лейкоцитов; лимфоцитов (например, Т-лимфоциты или Т-клетки, В-клетки или натуральные киллеры); CD8 или CD4; дендритных клеток, фолликулярных дендритных клеток и гранулоцитов. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов специфичен к ОХ40, и иммунная клетка представляет собой CD4 Т-клетку. В следующих вариантах осуществления иммунная клетка выбрана из CD4 Т-клетки и CD8-клетки. В других вариантах осуществления иммунная клетка выбрана из CD4 Т-клетки и другой иммунной клетки.

Без связи с теорией, полагают, что мультимеризованные пептиды способны активировать рецепторы посредством гомогенного сшивания более одного рецептора одного типа. Таким образом, в одном варианте осуществления указанные пептидные лиганды являются специфичными к одной и той же мишени. В следующем варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит по меньшей мере два идентичных пептидных лиганда. Под "идентичными" подразумевают пептид, имеющие одинаковую аминокислотную последовательность, наиболее важно, одинаковая аминокислотная последовательность относится к связывающей части указанного пептида (например, последовательность может варьироваться в положении присоединения). В этом варианте осуществления каждый из пептидов в мультимерном связывающем комплексе связывает в точности один и тот же эпитоп на одной и той же мишени - таким образом, образовавшийся связанный с мишенью комплекс формирует гомодимер (если мультимерный комплекс содержит два идентичных пептида), гомотример (если мультимерный комплекс содержит три идентичных пептида) или гомотетрамер (если мультимерный комплекс содержит четыре идентичных пептида) и т.д.

В альтернативном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс содержит по меньшей мере два различных пептидных лиганда. Под "различными"

подразумевают пептиды, имеющие различную аминокислотную последовательность. В этом варианте осуществления различные пептидные лиганды в мультимерном связывающем комплексе связываются с различными эпитопами на одной и той же мишени - таким образом, конечный связанный с мишенью комплекс связывается с различными эпитопами на одной и той же мишени - следовательно, полученный связанный с мишенью комплекс является бипаратопным (если мультимерный комплекс содержит два различных пептида), трипаратопным (если мультимерный комплекс содержит три различных пептида) или тетрапаратопным (если мультимерный комплекс содержит четыре различных пептида) и т.д.

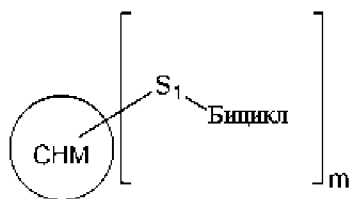
Без связи с теорией полагают, что мультимеризованные пептиды способны активировать рецепторы посредством гетерогенного сшивания различных мишеней, таких как различные рецепторы-мишени. Таким образом, в одном варианте осуществления указанные пептидные лиганды являются специфичными к различным мишеням.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

Будет понятно, что мультимерные связывающие комплексы по изобретению могут быть сконструированы так, чтобы быть способными 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 Ig-доменом (иммунная точка контроля) и т.д. Будет понятно, что для би-, три- и тетраспецифических мультимерных связывающих комплексы, упоминаемых в настоящем описании выше, пептиды могут связываться с мишенями по меньшей мере на двух различных клетках (таких как Т, NK или другие иммунные клетки).

Пептиды в мультимерных связывающих комплексах по изобретению могут быть собраны рядом различных способов. Например, может присутствовать центральная шарнирная часть или ветвящаяся часть со спейсерными или плечевыми элементами, исходящими из указанной шарнирной части или точки ветвления, каждый из которых содержит пептид. Альтернативно может предусматриваться, что кольцевой опорный член может удерживать ряд выступающих внутрь или наружу пептидов.

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

Будет понятно, что спейсерная группа может быть линейной и может соединять единственный пептид с центральной шарнирной частью. Таким образом, в одном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает соединение формулы (I):



(I)

где СНМ обозначает центральную шарнирную часть;

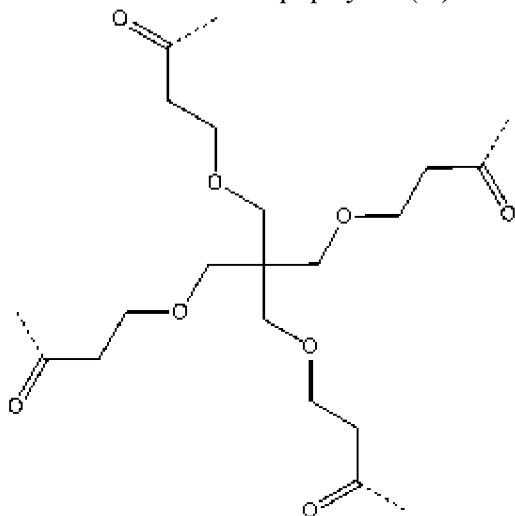
S₁ обозначает спейсерную группу;

Бицикл означает пептидный лиганд, как определено в настоящем описании; и

m обозначает целое число, выбранное из 2-10.

В одном варианте осуществления m обозначает целое число, выбранное из 3-10. В следующем варианте осуществления m обозначает целое число, выбранное из 3 или 4.

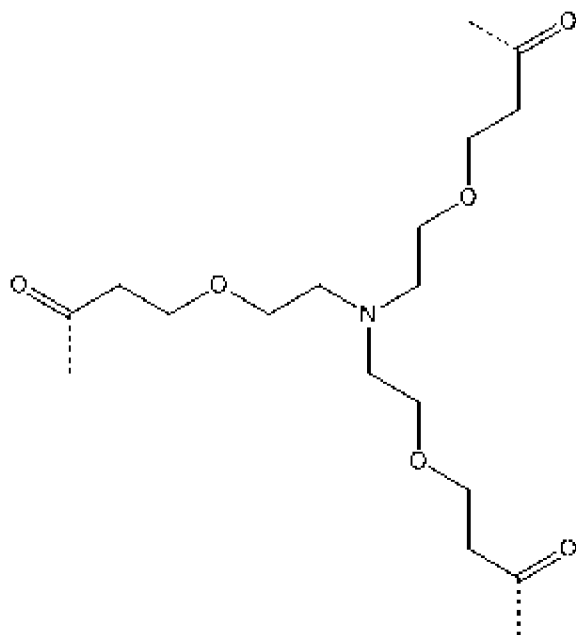
Понятно, что, когда m равен 4, центральная шарнирная часть требует 4 точек присоединения. Таким образом, в одном варианте осуществления m равен 4 и СНМ представляет собой мотив формулы (A):



(A)

где "-----" обозначает точку присоединения к каждой группе S₁.

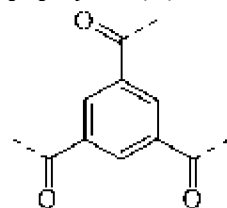
Когда m равен 3, будет понятно, что центральная шарнирная часть требует 3 точек присоединения. Таким образом, в одном варианте осуществления m равен 3 и СНМ представляет собой мотив формулы (B):



(B)

где "-----" обозначает точку присоединения к каждой группе S_1 .

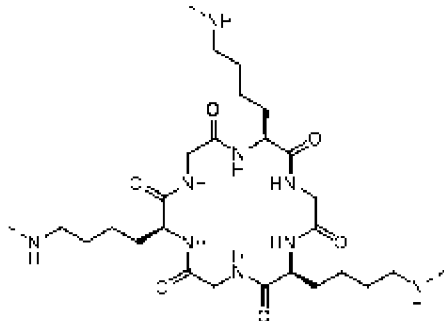
В альтернативном варианте осуществления m равен 3 и СНМ представляет собой мотив формулы (C):



(C)

где "-----" обозначает точку присоединения к каждой группе S_1 .

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



(D)

где "-----" обозначает точку присоединения к каждой группе S_1 .

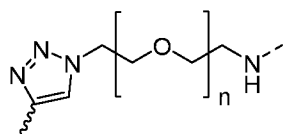
Специалисту в данной области будет понятно, как можно конструировать альтернативные центральные шарнирные части в зависимости от величины m .

Будет понятно, что спейсер (S_1) может представлять собой любую подходящую конструкцию для связывания центральной шарнирной части для пептидов с пептидом. В

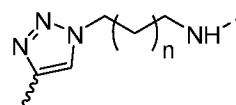
одном варианте осуществления спейсер (S_1) включает триазиольную часть. Преимущество этого варианта осуществления состоит в том, что триазиольная часть может быть включена в синтез с использованием широкодоступной "клик"-химии. Примеры подходящих спейсерных (S_1) групп включают одну или несколько частей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

В следующем варианте осуществления спейсер (S_1) содержит одну или несколько частей ПЭГ. Указание в настоящем описании на "ПЭГ" относится к линейному полимеру с регулярным повторяющимся элементом общей структуры: $(CH_2CH_2O)_n$ - (где n обозначает любое число, такое как от 1 до 30).

Таким образом, в следующем варианте осуществления 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 :

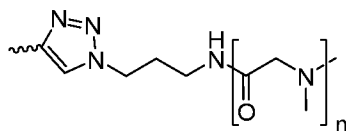


S_1A
 $n = 5, 10 \text{ и } 23$

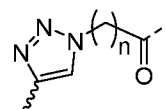


S_1E

$n = 1$

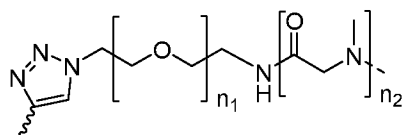


S_1B
 $n = 5, 10$

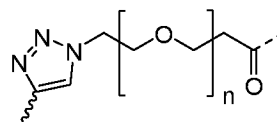


S_1F

$n = 1$

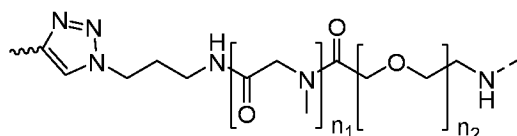


S_1C
 $n_1 = 5, n_2 = 5$
 $n_1 = 10, n_2 = 10$

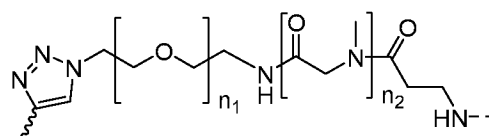


S_1G

$n = 5 \text{ и } 10$



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 CHM; и
" ~~~~ " обозначает точку присоединения к группе бицикла.

В следующем варианте осуществления спейсер (S_1) представляет собой S_1A .

Тетрамеры

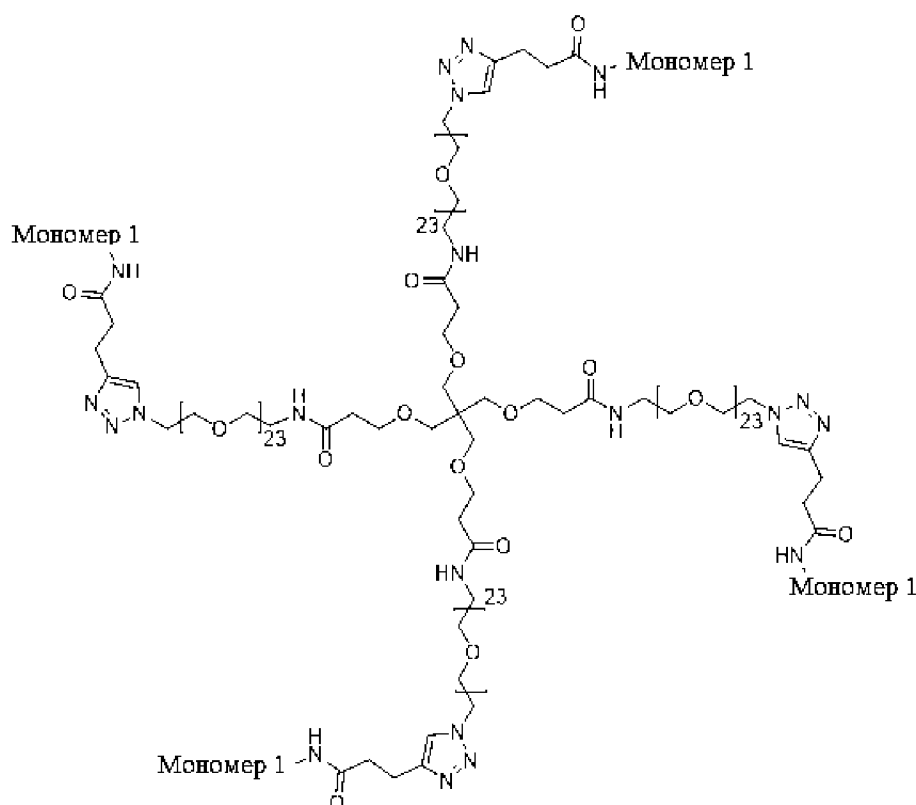
В одном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тетрамерный связывающий комплекс, описанный в приведенной ниже таблице 1:

Таблица 1: Иллюстративные тетрамерные связывающие комплексы по изобретению

Номер мультимерного соединения	Соответствующий мономер	Количество мономеров	Центральная шарнирная часть	Спейсерная молекула	Точка присоединения
BCY12019	BCY11607	4	A (TET)	S_1A : $n=23$	С-концевой Lys(PYA)

В настоящем описании представлены данные, которые демонстрируют, что тетрамерный связывающий комплекс, представленный в таблице 1, демонстрировал улучшение EC_{50} относительно мономерного лиганда OX40 (см. таблицу 2).

В следующем варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс включает тетрамер, содержащий четыре бициклических пептида, каждый из которых представляет собой BCY11607, как определено в настоящем описании, который связан через С-концевую часть Lys(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 обозначают в настоящем описании как BCY12019:

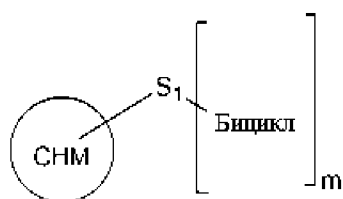


BCY12019,

где мономер 1 обозначает BCY11607.

В настоящем описании приведены данные в таблице 2, которые демонстрируют практически в 10 раз более высокий агонизм по сравнению с соответствующим биотинилированным мономером (BCY10549).

В альтернативной организации спейсерная группа может быть разветвлена и, таким образом, одна спейсерная группа может соединять множество 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;

S_1 обозначает спейсерную группу;

Бицикл означает пептидный лиганд, как определено в настоящем описании; и

m обозначает целое число, выбранное из 2-10.

Будет понятно, что пептидный лиганд может быть связан со спейсером рядом способов. В одном варианте осуществления пептидный лиганд конъюгирован с одной

половиной связывающей пары, и указанная другая половина указанной связывающей пары связывает каждый из пептидов со спейсером.

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

Гетеротандемы

В одном варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, содержащий:

(a) один или несколько связывающих OX40 пептидных лигандов, как определено в настоящем описании; конъюгированных через линкер

(b) по меньшей мере один второй пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке;

где каждый из указанных пептидных лигандов содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три остатка цистеина, разделенных по меньшей мере двумя последовательностями петель, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с остатками цистеина полипептида, так что на молекулярном каркасе образуется по меньшей мере две полипептидных цепи.

В следующем варианте осуществления мультимерный связывающий комплекс представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, содержащий:

(a) OX40-связывающий пептидный лиганд, как определено в настоящем описании; конъюгированный через линкер с

(b) вторым пептидным лигандом, который связывается с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке;

где каждый из указанных пептидных лигандов содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три остатка цистеина, разделенных по меньшей мере двумя последовательностями петель, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с остатками цистеина полипептида, так что на молекулярном каркасе образуется по меньшей мере две полипептидных цепи.

Указание в настоящем описании на термин "злокачественная клетка" включает любую клетку, о которой известно, что она вовлечена в злокачественную опухоль. Злокачественные клетки образуются, когда повреждаются гены, ответственные за регуляцию деления клеток. Канцерогенез вызывается мутацией и эпимутацией генетического материала нормальных клеток, которые нарушают нормальное равновесие между пролиферацией и клеточной смертью. Это приводит к неконтролируемому делению клеток и эволюции этих клеток посредством естественной селекции в организме. Неконтролируемая и часто быстрая пролиферация клеток может приводить к доброкачественным или злокачественным опухолям (рак). Доброкачественные опухоли не распространяются в другие части организма или не вторгаются в другие ткани. Злокачественные опухоли могут вторгаться в другие органы, распределяться в отдаленные положения (метастазы) и становиться угрожающими жизни.

В одном варианте осуществления злокачественная клетка выбрана из опухолевой клетки HT1080, SC-OV-3, PC3, H1376, NCI-H292, LnCap, MC38, 4T1-D02 и RKO.

В одном варианте осуществления компонент, присутствующий на злокачественной клетке, представляет собой EphA2. В следующем варианте осуществления второй пептидный лиганд включает EphA2-связывающий бициклический пептидный лиганд.

В альтернативном варианте осуществления компонент, присутствующий на злокачественной клетке, представляет собой PD-L1. В следующем варианте осуществления второй пептидный лиганд включает PD-L1-связывающий бициклический пептидный лиганд.

В альтернативном варианте осуществления компонент, присутствующий на злокачественной клетке, представляет собой нектин-4. В следующем варианте осуществления второй пептидный лиганд включает нектин-4-связывающий бициклический пептидный лиганд. В следующем варианте осуществления нектин-4-связывающий бициклический пептидный лиганд содержит последовательность аминокислот:

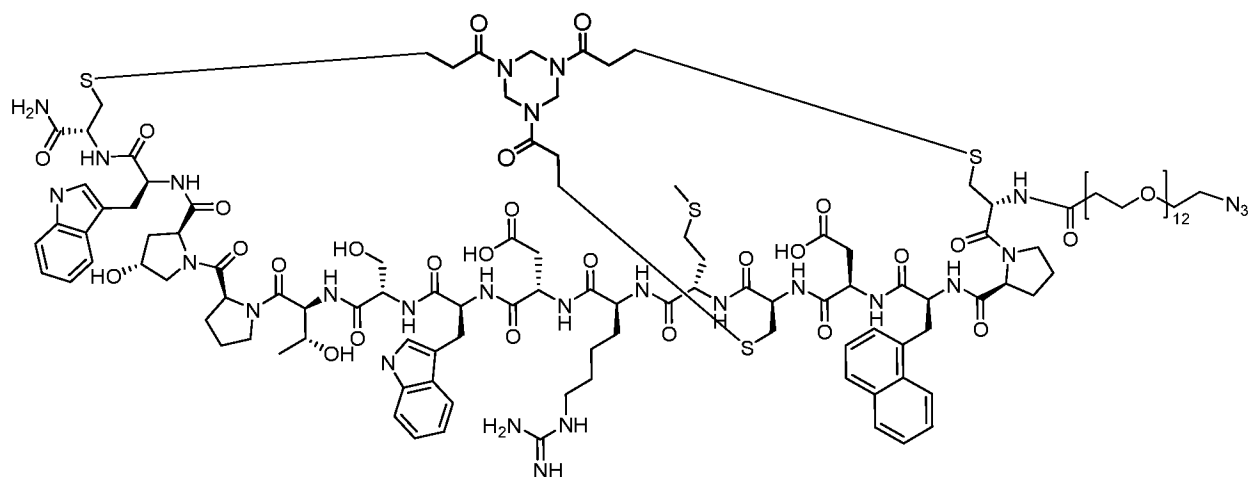
CP[1Nal][dD]CM[HArg]DWSTP[HyP]WC (SEQ ID NO: 11; далее обозначается как BCY8116),

где 1Nal обозначает 1-нафтилаланин, HArg обозначает гомоаргинин и HyP обозначает гидроксипролин.

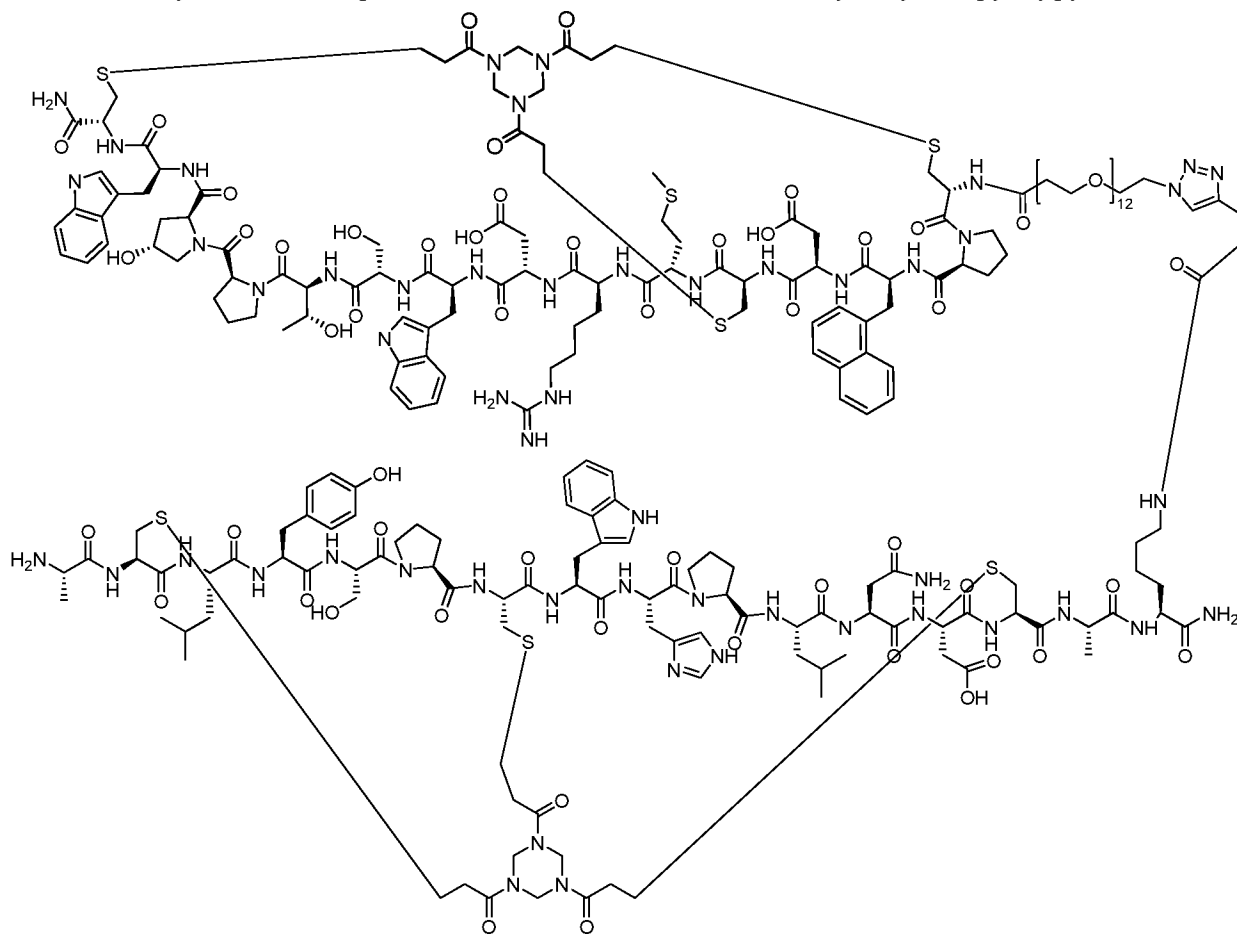
В следующем варианте осуществления нектин-4-связывающий бициклический пептидный лиганд выбран из производного PEG12 BCY8116, производного PEG5 BCY8116 и трифункционального производного PEG3 BCY8116.

В одном варианте осуществления гетеротандем содержит один OX40-связывающий пептид и один второй пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке. В альтернативном варианте осуществления гетеротандем содержит два OX40-связывающих пептида и один второй пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке. Будет понятно, что, когда гетеротандем содержит более одного OX40-связывающего пептида, OX40-связывающие пептиды могут иметь либо одинаковую последовательность, либо различающуюся последовательность. В одном варианте осуществления, когда гетеротандем содержит более одного OX40-связывающего пептида, все OX40-связывающие пептиды содержат одинаковую последовательность.

В следующем варианте осуществления OX40-связывающий пептидный лиганд представляет собой BCY11607 и нектин-4-связывающий бициклический пептидный лиганд представляет собой производное PEG12 BCY8116, которое имеет следующую структуру:



и полученный гетеротандемный комплекс имеет следующую структуру:

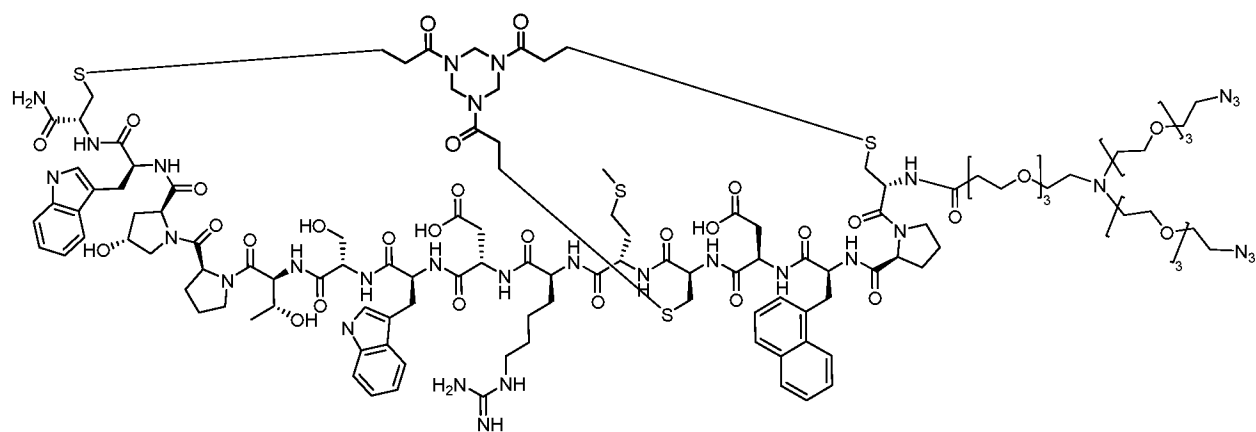


BSY12141.

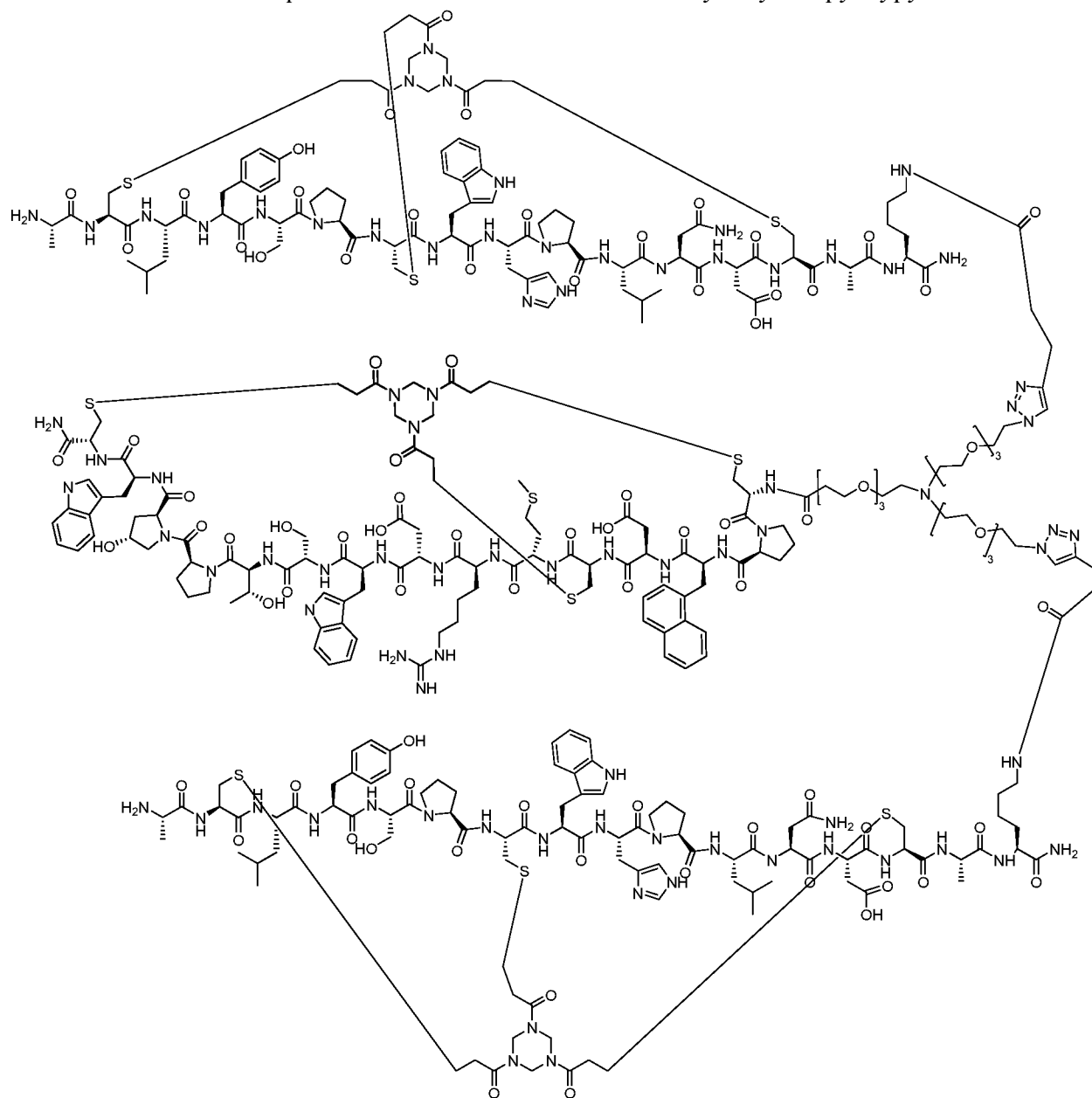
В альтернативном варианте осуществления OX40-связывающий пептидный лиганд представляет собой BSY12708 и нектин-4-связывающий бициклический пептидный лиганд представляет собой производное PEG5 BSY8116, которое имеет следующую структуру:

[illegible]

В следующем варианте осуществления ОХ40-связывающий пептидный лиганд представляет собой BCY11607 и нектин-4-связывающий бициклический пептидный лиганд представляет собой трифункциональное производное PEG3 BCY8116, которое имеет следующую структуру:



и конечный гетеротандемный комплекс имеет следующую структуру:



BSY12697.

В одном варианте осуществления гетеротандемный бициклический пептидный комплекс выбран из BSY12141, BSY12721 и BSY12967. Данные представлены в

настоящем описании в таблице 3 и на фиг.3, где эти соединения нектин-4:OX40 продемонстрировали мощный агонизм OX40 в сокультуре с нектин-4-положительными клетками 4T1-D02 по сравнению с OX40L и не связывающим контрольным пептидом BCY12968.

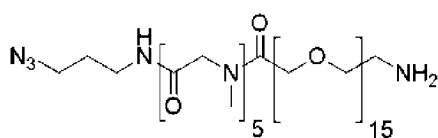
В альтернативном варианте осуществления компонент, присутствующий на злокачественной клетке, представляет собой простат-специфический мембранный антиген (PSMA). В следующем варианте осуществления второй пептидный лиганд содержит PSMA-связывающий бициклический пептидный лиганд.

Линкеры

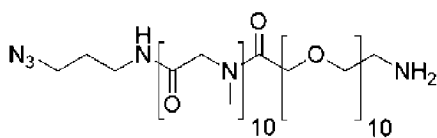
Будет понятно, что пептидный лиганд OX40 может быть конъюгирован со вторым пептидным лигандом через любой подходящий линкер. Главным образом, конструкция указанного линкера является такой, чтобы два бициклических пептида презентировались таким образом, чтобы они могли беспрепятственно связываться с их соответствующими мишенями либо отдельно, либо при одновременном связывании с обоими рецепторами-мишенями. Кроме того, линкер должен позволять связывание с обоими мишенями одновременно при сохранении соответствующего расстояния между клетками-мишенями, что может приводить к желаемому функциональному результату. Свойства линкера можно модулировать для повышения длины, жесткости или растворимости в целях оптимизации желаемого функционального результата. Линкер также может быть сконструирован так, чтобы позволить связывание более чем одного бицикла с одной и той же мишенью. Повышение валентности любого из связывающих пептидов может служить для повышения аффинности гетеротандема в отношении клеток-мишеней или может помочь индуцировать олигомеризацию одного или обоих из рецепторов-мишеней.

В одном варианте осуществления линкер выбран из следующих последовательностей: $-\text{CH}_2-$, $-\text{PEG}_5-$, $-\text{PEG}_{10}-$, $-\text{PEG}_{12}-$, $-\text{PEG}_{23}-$, $-\text{PEG}_{24}-$, $-\text{PEG}_{15}-\text{Sar}_5-$, $-\text{PEG}_{10}-\text{Sar}_{10}-$, $-\text{PEG}_5-\text{Sar}_{15}-$, $-\text{PEG}_5-\text{Sar}_5-$, $-\text{B-Ala-Sar}_{20}-$, $-\text{B-Ala-Sar}_{10}-\text{PEG}_{10}-$, $-\text{B-Ala-Sar}_5-\text{PEG}_{15}-$ и $-\text{B-Ala-Sar}_5-\text{PEG}_5-$.

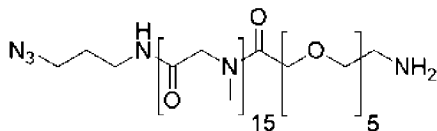
Структурное представление подходящих линкеров подробно описано ниже:



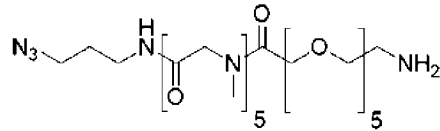
H2N-PEG15-SAR5-N3
COM00000128



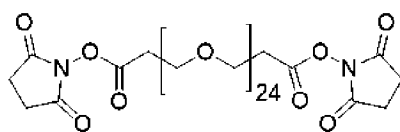
H2N-PEG10-SAR10-N3
COM00000129



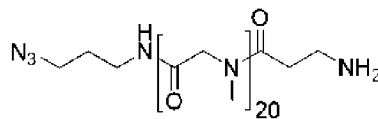
H2N-PEG5-SAR15-N3
COM00000130



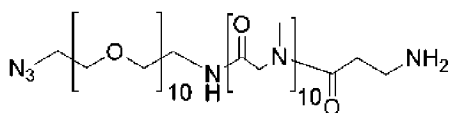
H2N-PEG5-SAR5-N3
COM00000131



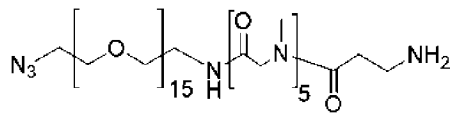
NHS-PEG24-NHS
COM00000469



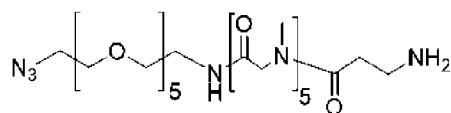
H2N-(B-Ala)-SAR20-N3
COM00000470



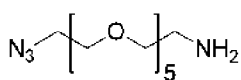
H2N-(B-Ala)-SAR10-PEG10-N3
COM00000471



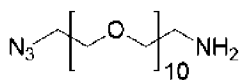
H2N-(B-Ala)-SAR5-PEG15-N3
COM00000472



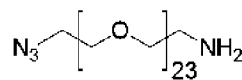
H2N-(B-Ala)-SAR5-PEG5-N3
COM00000473



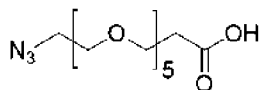
H2N-Peg5-N3
COM00000132



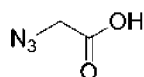
H2N-Peg10-N3
COM00000134



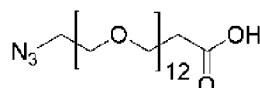
H2N-Peg23-N3
COM00000135



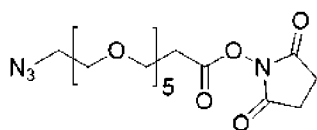
N3-PEG5-COOH
COM00000467



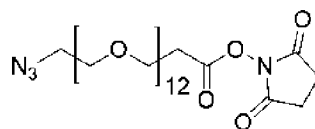
N3-CH2-COOH
COM00000468



N3-PEG12-COOH
COM00000466



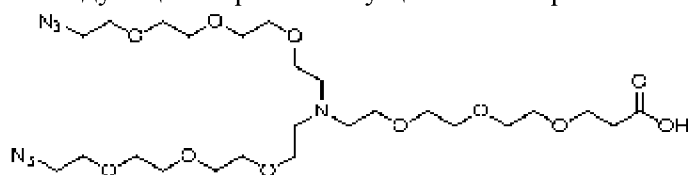
NHS-PEG5-N3



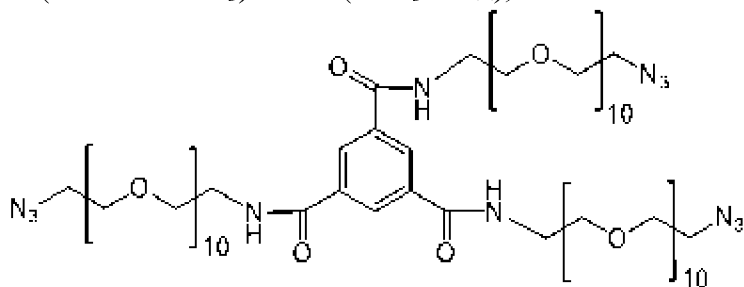
NHS-PEG12-N3

В одном варианте осуществления линкер представляет собой разветвленный линкер, допускающий один первый пептид на одном конце и два или более вторых пептидов на другом конце.

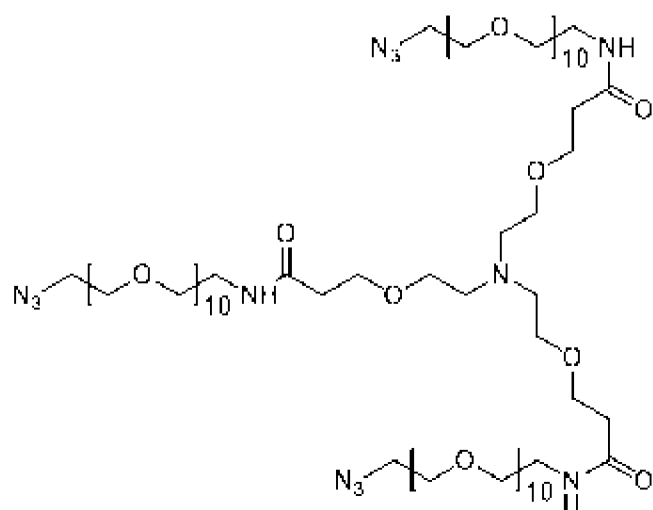
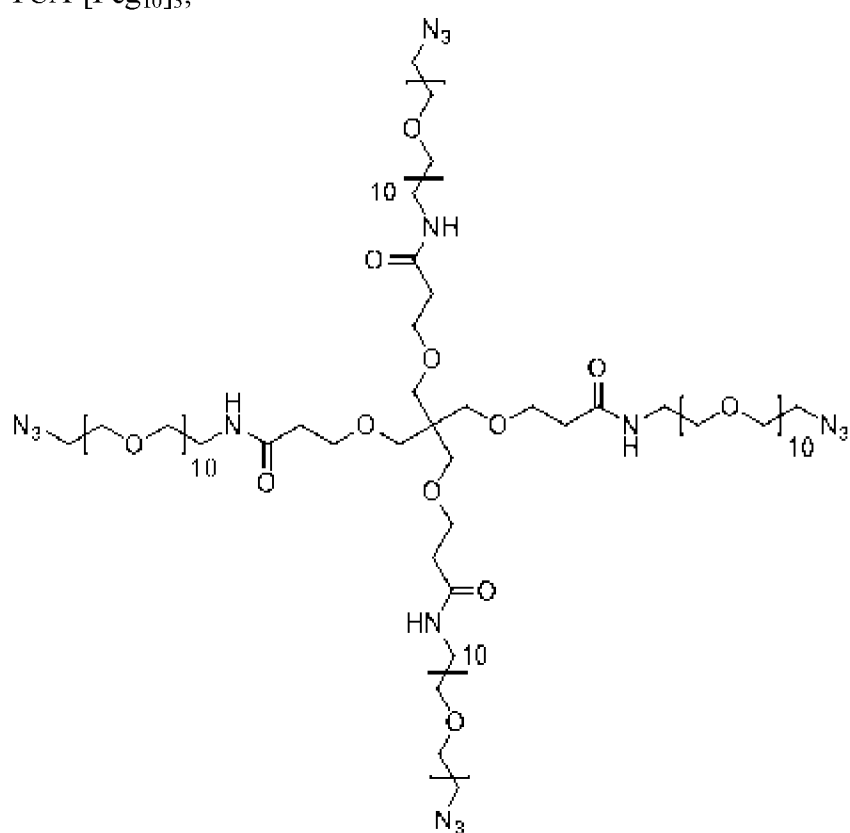
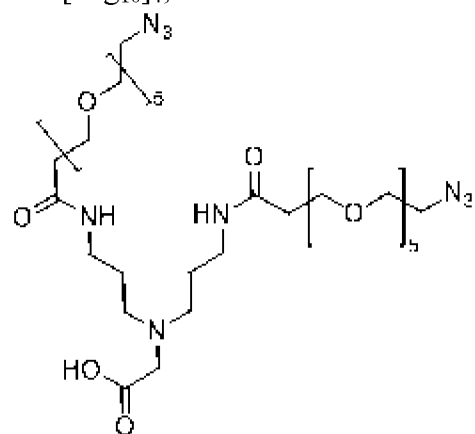
В следующем варианте осуществления разветвленный линкер выбран из:



N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид);



Тримезиновая кислота-[Peg₁₀]₃;

TCA-[Peg₁₀]₃;Tet-[Peg₁₀]₄; и

BAFG-(Peg₅)₂.

В следующем варианте осуществления линкер выбран из N₃-PEG₅-COOH, N₃-PEG₁₂-COOH и N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид).

Синтез

Пептиды по настоящему изобретению можно получать 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 заменять 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 с потенциальным образованием тетраспецифической молекулы.

Более того, присоединение 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.

Конъюгаты лекарственного средства

В соответствии со следующим аспектом изобретения предусматривается конъюгат лекарственного средства, содержащий пептидный лиганд или мультимерный связывающий комплекс, 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 CH1 тяжелой цепи антитела, домен CH2 тяжелой цепи антитела, домен CH3 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 CH1 и CH2 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 ТАТ ВИЧ. Непептидные подходы включают применение низкомолекулярных миметиков или SMOС, 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). К молекулярному каркасу можно добавлять низкомолекулярные соединения, такие как стероиды, 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_{β} в диапазоне от 12 до 60 часов. В следующем варианте осуществления она имеет время полужизни t_{β} , 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 действию протеаз связь. Без связи с теорией полагают, что такая расщепляемая часть инактивирует комплекс до тех пор, пока он не достигнет микроокружения опухоли. Преимущество этого вариант осуществления состоит в обеспечении уменьшения размера комплекса после связывания с мишенью. В следующем варианте осуществления группы, соседние с дисульфидной связью, модифицируют для контроля препятствования дисульфидной связи и посредством этого скорости расщепления и сопутствующего высвобождения связывающего средства.

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 высвобождаются, 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 любой из сторон дисульфидной связи модулируют посредством внесения одной или нескольких метильных групп на нацеливающей структуре (в данном случае, бициклическом пептиде).

Фармацевтические композиции

В соответствии со следующим аспектом изобретения предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая пептидный лиганд, 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 (Mask (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, внутривнутрибрюшинно, 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 являются особенно пригодными в качестве связывающих OX40 соединений. В соответствии со следующим аспектом изобретения предусматривается пептидный лиганд, мультимерный связывающий комплекс, конъюгат лекарственного средства или фармацевтическая композиция, как определено в настоящем описании, для применения для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого OX40.

Рецептор OX40 (также известный как представитель 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF4) и также известный как рецептор CD134) является представителем суперсемейства рецепторов TNFR, который не экспрессируется конститутивно на покоящихся наивных Т-клетках, в отличие от CD28. OX40 представляет собой вторичную костимулирующую молекулу иммунной точки контроля, экспрессируемую через 24-72 часа после активации; его лиганд OX40L, также не экспрессируется на покоящихся антигенпредставляющих клетках, а экспрессируется после их активации. Экспрессия OX40 зависит от полной активации Т-клетки; без экспрессии CD28 экспрессия OX40 замедляется и ее уровни являются в четыре раза более низкими.

OX40 не имеет эффекта на пролиферативные способности CD4⁺ клеток в течение первых трех суток, однако после этого пролиферация начинает замедляться и клетки погибают в большей степени вследствие неспособности поддерживать высокий уровень активности PKB и экспрессии Bcl-2, Bcl-XL и сурвивина. OX40L связывается с рецепторами OX40 на Т-клетках, препятствуя их гибели, а затем повышая продуцирование цитокинов. OX40 имеет ключевую роль в поддержании иммунного ответа после первых нескольких суток и далее до ответа памяти вследствие его способности повышать выживаемость. OX40 также играет ключевую роль в опосредуемых как Th1, так и Th2 реакциях *in vivo*.

OX40 связывает TRAF2, 3 и 5, а также PI3K, посредством неизвестного механизма. TRAF2 требуется для выживания посредством образования NF-κB и клеток памяти, в то время как TRAF5, по-видимому, имеет более негативную или модулирующую роль,

поскольку при нокауте уровни цитокинов являются более высокими и повышается подверженность Th2-опосредуемому воспалению. TRAF3 может играть ключевую роль в OX40-опосредуемой передаче сигнала. CTLA-4 подавляется после связывания OX40 *in vivo* и OX40-специфический дефект TRAF3 DN частично преодолевался посредством блокады CTLA-4 *in vivo*. TRAF3 может быть связан с OX40-опосредуемой экспансией Т-клеток памяти и выживаемостью, и предполагает подавление CTLA-4 в качестве возможного элемента контроля для повышения ранней экспансии Т-клеток через передачу сигнала OX40.

В одном варианте осуществления OX40 представляет собой OX40 млекопитающих. В следующем варианте осуществления OX40 млекопитающих представляет собой OX40 человека (hOX40).

Пептиды OX40 в основном (но не исключительно) используются для агонистической активации OX40, и, следовательно, иммунных клеток, для предупреждения, подавления или лечения злокачественной опухоли, такой как злокачественные опухоли человека ранней или поздней стадии, которые включают солидные опухоли, такие как немелкоклеточная карцинома легких (NSCLC), рак молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак яичника, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, уротелиальные карциномы, рак ободочной и прямой кишки, рак головы и шеи, плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN), меланомы, рак поджелудочной железы и другие развернутые солидные опухоли, где иммунное подавление блокирует противоопухолевый иммунитет. Другие солидные и несолидные злокачественные опухоли, где пептиды OX40 используются в качестве терапевтического средства, включают, но не ограничиваясь ими, В-клеточную лимфому, включая низкодифференцированную/фолликулярную неходжскинскую лимфому и острый миелоидный лейкоз (AML).

Указание в настоящем описании на солидную опухоль в этом варианте осуществления определяют как аномальный рост тканей без значительного количества жидкости в ней, в то время как несолидные опухоли, как правило, представляют собой рассредоточенные злокачественные опухоли без какой-либо или значительной опухолевой массы. Примерами солидных опухолей являются карциномы, саркомы и лимфомы. Несолидными опухолями являются злокачественные опухоли крови (лейкозы), такие как острый миелоидный лейкоз (AML), острый лимфоцитарный (или лимфобластный) лейкоз (ALL). Пептиды OX40 могут использоваться в качестве средства монотерапии при вышеупомянутых злокачественных заболеваниях для усиления опосредуемого CD4, CD8 Т-клетками и NK-клетками противоопухолевого иммунитета и опосредуемого иммунными клетками уничтожения опухолевых клеток. Кроме того, для применения в качестве средства монотерапии при злокачественной опухоли пептиды OX40 и его конъюгаты, такие как нацеленные на опухоль гетеротандемы, могут использоваться в другими средствами иммунотерапии, включая, но не ограничиваясь ими, средства против PD-1 и против CTLA4. Дополнительные терапевтические применения пептидов OX40 включают, но не

ограничиваются ими, моноиммунотерапию или комбинированную иммунотерапию с лучевой терапией злокачественной опухолью и вакцинами против злокачественной опухоли. Незлокачественные терапевтические применения пептидов OX40 либо в качестве монотерапии, либо в комбинации с другими иммуномодулирующими лекарственными средствами, такими как средства против PD-1, включают, но не ограничиваются ими, вирусные инфекции, такие как ВИЧ и HPV.

Будет понятно, что мультимерный связывающий комплекс, определенный в настоящем описании, который содержит по меньшей мере один пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на злокачественной опухоли, может использоваться для лечения злокачественной опухоли.

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 мономерных пептидов

Синтез мономерных 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 mM TATA в ацетонитриле и реакцию начинали посредством 5 мл 1 M 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 M моногидрат гидрохлорида L-цистеина (Sigma) в H₂O на ~60 мин при к.т. для гашения любого избытка TATA.

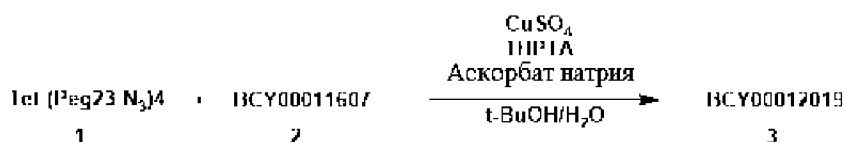
После лиофилизации модифицированный пептид очищали, как описано выше, заменяя Luna C8 на колонку Gemini C18 (Phenomenex), и заменяя кислоту на 0,1% трифторуксусную кислоту. Очищенные фракции, содержавшие правильный ТАТА-модифицированный материал, объединяли, лиофилизировали и держали при -20°C для хранения.

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

Синтез мультимерного связывающего комплекса

Мультимерные связывающие комплексы, описанные в настоящем описании, можно получать аналогично тому, как описано в международной патентной заявке номер РСТ/GB2019/050485 (WO 2019/162682).

Получение BCY12019



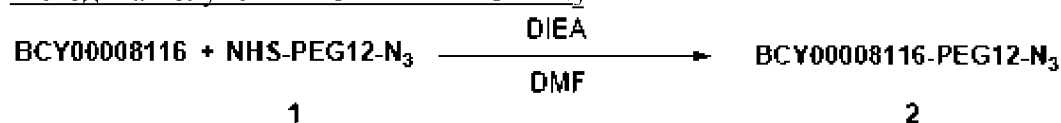
Смесь соединения **1** (описанного в РСТ/GB2019/050485 (WO 2019/162682); 10 мг, 2,11 мкмоль, 1,0 экв.), **BCY11607** (18,5 мг, 8,63 мкмоль, 4,1 экв.) и THPTA (3,7 мг, 8,42 мкмоль, 4,0 экв.) растворяли в t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазировали и продували N₂ 3 раза). Добавляли CuSO₄ (21,0 мкл, 0,4 М, 4,0 экв.) и аскорбат натрия (42,0 мкл, 0,4 М, 8,0 экв.) в атмосфере N₂. pH этого раствора доводили до 8 капельным добавлением 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O). Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 4 ч, когда LC-MS демонстрировала, что соединение **1** полностью расходовалось и выявлялся один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 13347,41, наблюдаемое m/z: 1213,83([M/11+H]⁺). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя и очищали препаративной ВЭЖХ (условия TFA) с получением **BCY12019** (8,2 мг, 0,54 мкмоль, выход 25,9%, чистота 88,8%) в виде белого твердого вещества.

Синтез гетеротандемных связывающих комплексов

Гетеротандемные связывающие комплексы, описанные в настоящем описании, можно получать аналогично тому, как описано в международной патентной заявке номер РСТ/GB2019/050951 (WO2019/193328).

Получение BCY12141

Методика получения BCY8116-PEG12-N₃

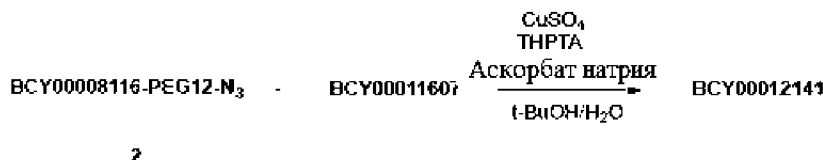


BCY8116 (20,0 мг, 9,21 мкмоль, 1,0 экв.) и соединение **1** (11,0 мг, 14,85 мкмоль, 1,6

экв.) растворяли в DMF (1 мл) и добавляли DIEA (2,97 мг, 22,96 мкмоль, 4,0 мкл, 2,5 экв.), и смесь перемешивали при к.т. в течение 2 ч. LC-MS продемонстрировала, что **BCY8116** израсходовался полностью, и был выявлен один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 2798,19, наблюдаемая m/z : 1399,1($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) и получали соединение **2** (18,0 мг, 6,09 мкмоль, выход 66,13%, чистота 94,64%) в виде белого твердого вещества.

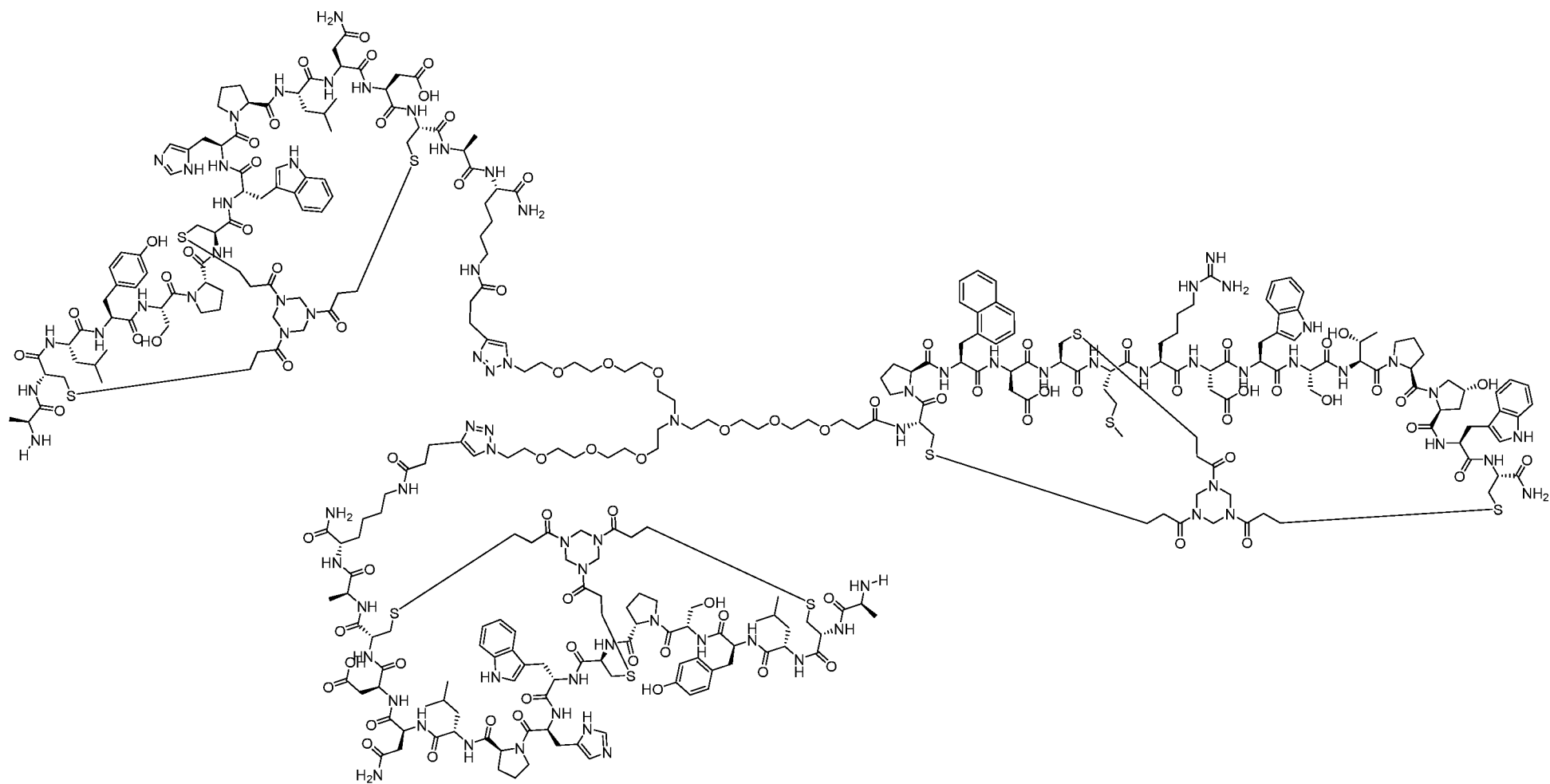
Спектры:

Методика получения BCY12141

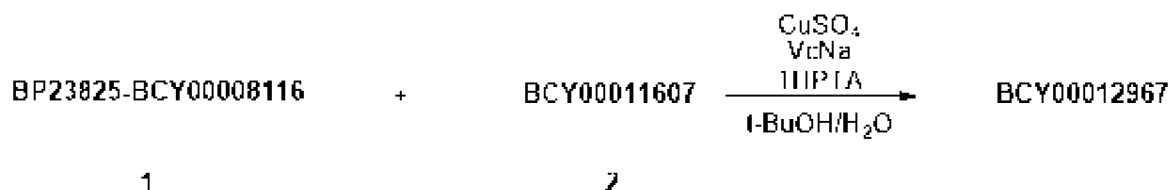


Соединение **2** (10,0 мг, 3,57 мкмоль, 1,0 экв.) и **BCY11607** (8,0 мг, 3,72 мкмоль, 1,0 экв.) растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), и добавляли CuSO₄ (0,4 М, 9,0 мкл, 1,0 экв.), аскорбат натрия (1,0 мг, 5,04 мкмоль, 1,4 экв.) и THPTA (1,4 мг, 3,22 мкмоль, 1,0 экв.), и добавляли 1 М NH₄HCO₃ для доведения pH до 8. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 4947,65, наблюдаемое m/z : 1237,78 ($[M/4+H]^+$)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) и получали **BCY12141** (8,8 мг, 1,65 мкмоль, выход 46,18%, чистота 92,78%) в виде белого твердого вещества.

Получение BCY12967



BCY00012967



Соединение **1** (трифункциональное производное PEG3 BCY8116; 20,0 мг, 7,20 мкмоль, 1,0 экв.) и **BCY11607** (32,0 мг, 14,9 мкмоль, 2,1 экв.) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), а затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 36,0 мкл, 2,0 экв.), VcNa (6,0 мг, 30,3 мкмоль, 4,2 экв.) и THPTA (6,4 мг, 14,7 мкмоль, 2,0 экв.). Наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃ для доведения pH до 8. Все растворители дегазировали и продували N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 ч в атмосфере N₂. LC-MS продемонстрировала, что соединение **2** полностью израсходовалось и был выявлен один основной пик с желаемым m/z (вычисленная ММ: 7077,7 наблюдаемое m/z: 1416,3 ([M/5+H]⁺), 1180,4 ([M/6+H]⁺), 1011,9 ([M/7+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (условия с TFA) и получали **BCY12967** (20,6 мг, 2,82 мкмоль, выход 39,17%, чистота 96,82%) в виде белого твердого вещества.

Получение BCY12721

BCY12721 может быть получен в соответствии с методиками, аналогичными методикам, описанным в настоящем описании для BCY12141, BCY12967 и BCY12968.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Клеточный анализ активности OX40 Promega

Promega разработан клеточный анализ активности OX40, в котором используется люциферазная люминесценция NF-κB в качестве показателя активации OX40 в клетках Jurkat (Promega CS197704). В день эксперимента получали среду путем размораживания FBS и добавления 5% FBS к RPMI-1640. Клетки OX40 Jurkat размораживали на водяной бане, а затем 500 мкл клеток добавляли в 11,5 мл предварительно нагретой среды RPMI-1640 с 5% FBS. В белые планшеты для культивирования добавляли 60 мкл клеток/лунка. Агонисты разбавляли до концентрации, обеспечивающей максимальную кратную индукцию, а затем титровали до данной величины в стерильном 96-луночном планшете. Предполагаемые начальные концентрации для связанных со стрептавидином тетрамеров составляют 4x 1 мкМ (1 мкМ биотин-пептид: 0,25 мкМ стрептавидин) или 4x 100 нМ для сильных агонистов, таких как синтетические мультимеры. Получали достаточно реагента для дублированных образцов, а затем выполняли серии разведений 1/3 или серии разведений 1/10. Включали положительный контрольный тример OX40L (R&D systems # 1054-OX-010) и отрицательный контрольный мономерный пептид. Добавляли 20 мкл агониста в качестве дублированных образцов или RPMI-1640 с 5% FBS отдельно в качестве контроля фонового уровня.

Клетки совместно инкубировали с агонистами в течение 5 часов при 37°C с 5% CO₂.

Через 5 часов размораживали Bio-Glo™ и анализируемую смесь проявляли при комнатной температуре. Добавляли 80 мкл Bio-Glo™ на лунку и инкубировали 5-10 мин. Проводили считывание сигнала люциферазы на устройстве для считывания планшетов CLARIOStar с использованием программы MARS и кратность индукции приводили к фоновому уровню (среда отдельно). Данные анализировали путем преобразования данных $x = \log(X)$, а затем построения графика $\log$ (агонист) против наклона переменной ответа (4 параметра) для вычисления величин EC_{50} .

Результаты этого анализа представлены в таблице 2, где можно видеть, что все протестированные соединения продемонстрировали высокий агонизм в отношении OX40, в частности, BSY10551, BSY11371 и BSY10549 продемонстрировали особенно высокие уровни агонизма, когда они были связаны со стрептавидином в тетрамерном формате. Более того, синтетическое мультимерное четырехвалентное соединение BSY12019 продемонстрировало практически в 10 раз более высокий агонизм, чем соответствующий мономер, связанный со стрептавидином в тетрамерном формате (BSY10549).

Таблица 2: Величины EC_{50} из анализа клеточной активности OX40 Promega

<i>Номер пептида</i>	<i>EC_{50} (нМ), 2 независимых эксперимента</i>
BSY10551	59, 19
BSY10552	350, 21
BSY10479	226, 1300
BSY11371	24, 37
BSY10482	160, 237
BSY10549	17, 19
BSY11501	120, 325
BSY10550	389, 74
BSY10794	186, 102
BSY11369	206, 130
BSY12019	2,6

На фиг.1 также представлены данные репортерного клеточного анализа OX40 от Promega. BSY10549 в этом анализе представляет собой биотинилированный мономер, который собран в четырехвалентный агонист посредством связывания со стрептавидином. OX40L используют в качестве положительного контроля для активности агониста OX40. Синтетический тетрамер OX40 BSY12019 продемонстрировал мощный агонизм OX40 с EC_{50} в низком наномолярном диапазоне в репортерном клеточном анализе Promega. Сшивание биотинилированного пептида BSY10549 стрептавидином обеспечивало биологически активный комплекс, в то время как мономерный пептид, не связанный со стрептавидином, был неактивным.

Клеточный анализ активности OX40 Promega в сокультуре с опухолевыми клетками

Promega разработан клеточный анализ активности OX40, в котором используется люциферазная люминесценция NF-κB в качестве показателя активации OX40 в клетках Jurkat (Promega CS197704). В день эксперимента получали среду путем размораживания FBS и добавления 5% FBS к RPMI-1640. Клетки OX40 Jurkat размораживали на водяной бане, а затем 500 мкл клеток добавляли в 11,5 мл предварительно нагретой среды RPMI-1640 с 5% FBS. В белые планшеты для культивирования добавляли 55 мкл клеток/лунка. Опухолевые клетки собирали из культуры. 4T1 представляет собой негативную по нектину-4 эпителиальную клетку рака молочной железы мыши, и ее генетически модифицировали для экспрессии нектин-4 мыши на клеточной поверхности (положительные по нектину-4 4T1; клон 4T1-D02). Опухолевые клетки культивировали до смыкания монослоя 80% *in vitro* в среде RPMI1640, дополненной 10% инактивированной нагреванием FBS, 1x пенициллином/стрептомицином, 1x L-глутамином, 20 mM HEPES и 1x NEAA (рабочая среда RPMI). Опухолевые клетки трипсинизировали и промывали два раза при 1500 об/мин в течение 5 минут в рабочей среде RPMI1640, предварительно нагретой до 37°C. Клетки подсчитывали и ресуспендировали до 2000000 клеток/мл в среде R5 (для 10000 клеток/лунка). Добавляли 5 мкл опухолевых клеток на лунку.

Агонисты разбавляли до концентрации, обеспечивающей максимальную кратную индукцию, а затем титровали до данной величины в стерильном 96-луночном планшете. Получали достаточно реагента для дублированных образцов, а затем выполняли серии разведений 1/3 или серии разведений 1/10. Включали положительный контрольный тример OX40L (AcroBiosystems, R&D systems) и отрицательные контрольные мономерные или несвязывающие пептиды. Добавляли 20 мкл агониста в качестве дублированных образцов или RPMI-1640 с 5% FBS отдельно в качестве контроля фонового уровня.

Клетки совместно инкубировали с агонистами в течение 6 часов при 37°C с 5% CO₂. Через 6 часов размораживали Bio-Glo™ и анализируемую смесь проявляли при комнатной температуре. Добавляли 80 мкл Bio-Glo™ на лунку и инкубировали 5-10 мин. Проводили считывание сигнала люциферазы на устройстве для считывания планшетов CLARIOStar с использованием программы MARS и кратность индукции приводили к фоновому уровню (среда отдельно). Данные анализировали путем преобразования данных $x = \log(X)$, а затем построения графика $\log(\text{агонист})$ против наклона переменной ответа (4 параметра) для вычисления величин EC₅₀.

Результаты этого анализа представлены в таблице 3 и на фиг.3, где можно видеть, что соединения нектин-4:OX40 BCY12141, BCY12721 и BCY12967 продемонстрировали мощный агонизм OX40 в сокультуре с положительными по нектину-4 клетками 4T1-D02 по сравнению с OX40L и несвязывающим контрольным пептидом BCY12968.

Таблица 3: Величины EC₅₀ из анализа клеточной активности OX40 Promega в сокультуре с опухолевыми клетками

Номер пептида	EC ₅₀ (нМ)
BCY12141	0,59

BCY12967	0,83
BCY12721	0,94

Анализ сокультуры PBMC человека-опухолевых клеток для тестирования гетеротандемов нектин-4-OX40 *in vitro*

4T1, негативные в отношении нектина-4 эпителиальные клетки рака молочной железы мыши (4T1 нектин-4-; 4T1-родительские), и их генно-модифицированную версию, экспрессирующую нектин-4 мыши на клеточной поверхности (4T1 нектин-4+; клон 4T1-D02) культивировали до смыкания монослоя 80% *in vitro* в среде RPMI1640, дополненной 10% инактивированной нагреванием FBS, 1х пенициллином/стрептомицином, 1х L-глутамином, 20 mM HEPES и 1х NEAA (рабочая среда RPMI). Опухолевые клетки трипсинизировали и промывали два раза 1500 об/мин в течение 5 минут в рабочей среде RPMI1640, предварительно нагретой до 37°C. Четыре тысячи опухолевых клеток в 25 мкл высевали на лунку в стерильный 384-луночный планшет для культивирования клеток. Замороженные PBMC человека размораживали и промывали один раз при 1250 об/мин в течение 5 минут в предварительно нагретой рабочей среде RPMI1640. 20000 жизнеспособных PBMC в 50 мкл рабочей среды RPMI1640, дополненной 250 нг/мл (2х концентрация) антитела человека против CD3 (клон OKT3) и 500 нг/мл (2х концентрация) антитела человека против CD28 (клон CD28.2) добавляли в соответствующие лунки, содержавшие опухолевые клетки в 25 мкл среды, с получением соотношения опухолевых клеток и PBMC 1:10. Тестируемые соединения в DMSO разбавляли в рабочей среде RPMI1640. К контролям анализа добавляли эквивалентное количество DMSO. Тестируемые соединения добавляли к клеткам в 75 мкл с 125 нг/мл антитела против CD3, 250 нг/мл антитела против CD28, 4000 опухолевых клеток и 20000 PBMC до конечного объема 100 мкл. Наружные лунки планшета для анализа исключали из исследования и заполняли рабочей средой RPMI1640. Контроли анализа включали клетки, обработанные только антителом против CD3 и антителом против CD28, или нектин-4- опухолевые клетки, сокультивированные с тестируемыми соединениями и PBMC человека. Планшеты для анализа инкубировали внутри камер с увлажнением в течение вплоть до 72 часов. Культуральный супернатант собирали через 48 часов после обработки и концентрации IL-2 измеряли с использованием анализа HTRF (CIS Bio). Данные анализировали с использованием GraphPad Prism.

Результаты анализа сокультуры PBMC-опухолевых клеток представлены на фиг.2. Опухолевые клетки 4T1 мыши, не экспрессирующие или стабильно экспрессирующие нектин-4 мыши, сокультивировали с PBMC человека и стимуляцией антителом против CD3 и антителом против CD28 с BCY12141 или без него в течение 48 часов. Затем анализировали концентрации цитокина IL-2 с использованием HTRF. Биспецифическое гетеротандемное соединение OX40-нектин-4 BCY12141 индуцировало продуцирование цитокина IL-2 посредством PBMC человека в присутствии экспрессирующих нектин-4 клеток 4T1. В отсутствии экспрессии нектина-4 на клетках 4T1 уровни IL-2 были сравнимыми с контрольной стимуляцией CD3+CD28 на исходном уровне. Это

демонстрирует, что биспецифическая молекула ОХ40-нектин-4 ВСУ12141 способна индуцировать иммунологический ответ в РВМС человека только в присутствии клетки, экспрессирующей нектин-4.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептидный лиганд, специфичный к ОХ40, содержащий 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 цепи.

2. Пептидный лиганд по п.1, где указанные реакционноспособные группы включают остатки цистеина.

3. Пептидный лиганд по п.1 или п.2, где указанные последовательности петель содержат 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот.

4. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 2 аминокислоты и вторая из которых содержит 7 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iDAC_{ii}LYPDYYVC_{iii}$ (SEQ ID NO: 12);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или ее модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль, такой как:

A-(SEQ ID NO: 12)-A (далее обозначается как BCY10375).

5. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 3 аминокислоты и вторая из которых содержит 7 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iILWC_{ii}LPERHDEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 1); или

$C_iRLWC_{ii}IPAPTDDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 13);

$C_iTMWC_{ii}IPAKGDWC_{iii}$ (SEQ ID NO: 14);

$C_iMLWC_{ii}LPAPTDEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 15);

$C_iILWC_{ii}LPEPPDEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 16);

$C_iLLWC_{ii}IPNPDDNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 17);

$C_iWLWC_{ii}VPNPDDTC_{iii}$ (SEQ ID NO: 18);

$C_iVLWC_{ii}TPYPGDDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 19);

$C_iALWC_{ii}IPDPQDEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 20);

$C_iTLWC_{ii}IPDASDSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 21);

$C_iQLWC_{ii}IPDADDDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 22);

$C_iQLWC_{ii}VPEPGDSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 23);

$C_iALWC_{ii}IPEESDDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 24);

$C_iVLWC_{ii}IPEPQDKC_{iii}$ (SEQ ID NO: 25);

$C_iTLWC_{ii}IPDPDDSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 26);

$C_iRLWC_{ii}VPKAEDYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 27);

$C_iTKPC_{ii}IAYYNQSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 28);

C_i MNPC_{ii}IAYYQQEC_{iii} (SEQ ID NO: 29);
 C_i TNAC_{ii}VAYYHQAC_{iii} (SEQ ID NO: 30); и
 C_i SDPC_{ii}ISYYNQAC_{iii} (SEQ ID NO: 31);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или их модифицированное производное или ее фармацевтически приемлемую соль, такой как:

A-(SEQ ID NO: 1)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10551);
 A-(SEQ ID NO: 1)-A (далее обозначается как BCY10371);
 A-(SEQ ID NO: 13)-A (далее обозначается как BCY10364);
 A-(SEQ ID NO: 14)-A (далее обозначается как BCY10365);
 A-(SEQ ID NO: 15)-A (далее обозначается как BCY10366);
 A-(SEQ ID NO: 16)-A (далее обозначается как BCY10367);
 A-(SEQ ID NO: 17)-A (далее обозначается как BCY10368);
 A-(SEQ ID NO: 18)-A (далее обозначается как BCY10369);
 A-(SEQ ID NO: 19)-A (далее обозначается как BCY10374);
 A-(SEQ ID NO: 20)-A (далее обозначается как BCY10376);
 A-(SEQ ID NO: 21)-A (далее обозначается как BCY10737);
 A-(SEQ ID NO: 22)-A (далее обозначается как BCY10738);
 A-(SEQ ID NO: 23)-A (далее обозначается как BCY10739);
 A-(SEQ ID NO: 24)-A (далее обозначается как BCY10740);
 A-(SEQ ID NO: 25)-A (далее обозначается как BCY10741);
 A-(SEQ ID NO: 26)-A (далее обозначается как BCY10742);
 A-(SEQ ID NO: 27)-A (далее обозначается как BCY10380);
 A-(SEQ ID NO: 28)-A (далее обозначается как BCY10370);
 A-(SEQ ID NO: 29)-A (далее обозначается как BCY10372);
 A-(SEQ ID NO: 30)-A (далее обозначается как BCY10373); и
 A-(SEQ ID NO: 31)-A (далее обозначается как BCY10379);

такой как:

A-(SEQ ID NO: 1)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10551).

6. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 3 аминокислоты и вторая из которых содержит 8 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iA^{K/S^N/E}C_{ii}$ DPFWYQFYC_{iii} (SEQ ID NO: 2), такую как
 C_i AKNC_{ii}DPFWYQFYC_{iii} (SEQ ID NO: 3) и C_i ASEC_{ii}DPFWYQFYC_{iii} (SEQ ID NO: 4);

C_i DPPC_{ii}DPFWYAFYC_{iii} (SEQ ID NO: 32); и
 C_i PDDC_{ii}DPFWYNFYC_{iii} (SEQ ID NO: 33);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или их модифицированное производное или фармацевтически

приемлемую соль, такой как:

A-(SEQ ID NO: 3)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10552);
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 3)-A (далее обозначается как BCY10479);
 A-(SEQ ID NO: 3)-A (далее обозначается как BCY10378);
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 4)-A (далее обозначается как BCY11371);
 A-(SEQ ID NO: 4)-A (далее обозначается как BCY10743),
 A-(SEQ ID NO: 32)-A (далее обозначается как BCY10377); и
 A-(SEQ ID NO: 33)-A (далее обозначается как BCY10744), в частности:
 A-(SEQ ID NO: 3)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10552);
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 3)-A (далее обозначается как BCY10479); и
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 4)-A (далее обозначается как BCY11371).

7. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 4 аминокислоты и вторая из которых содержит 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iRYSPC_{ii}YHPHNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 34);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или ее модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль, такой как:

A-(SEQ ID NO: 34)-A (далее обозначается как BCY10343).

8. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 4 аминокислоты и вторая из которых содержит 6 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_i^L/NYSPC_{ii}WHPLN^D/KC_{iii}$ (SEQ ID NO: 5), такую как

$C_iLYSPC_{ii}WHPLNDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 6) и $C_iNYSPC_{ii}WHPLNKC_{iii}$ (SEQ ID NO: 7);

$C_iLYSPC_{ii}NHPLNSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 35);

$C_iEDNYC_{ii}FMWTPYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 36);

$C_iLDSPC_{ii}WHPLNDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 37);

$C_iRFSPC_{ii}SHPLNQC_{iii}$ (SEQ ID NO: 38);

$C_iKYSPC_{ii}WHPLNLC_{iii}$ (SEQ ID NO: 39); и

$C_iRYSPC_{ii}WHPLNNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 40);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или их модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль, такой как:

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 6)-A (далее обозначается как BCY10482);

A-(SEQ ID NO: 6)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10549);

A-(SEQ ID NO: 6)-A-K(Pya) (далее обозначается как BCY11607);

Ac-A-(SEQ ID NO: 6)-A-K(Pya) (далее обозначается как BCY12708);

A-(SEQ ID NO: 6)-A (далее обозначается как BCY10351);

A-(SEQ ID NO: 7)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY11501); и
 A-(SEQ ID NO: 7)-A (далее обозначается как BCY10729), такой как:
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 6)-A (далее обозначается как BCY10482);
 A-(SEQ ID NO: 6)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10549);
 A-(SEQ ID NO: 6)-A-K(Pya) (далее обозначается как BCY11607);
 A-(SEQ ID NO: 7)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY11501);
 A-(SEQ ID NO: 35)-A (далее обозначается как BCY10350);
 A-(SEQ ID NO: 36)-A (далее обозначается как BCY10352);
 A-(SEQ ID NO: 37)-A (далее обозначается как BCY10353);
 A-(SEQ ID NO: 38)-A (далее обозначается как BCY10354);
 A-(SEQ ID NO: 39)-A (далее обозначается как BCY10730); и
 A-(SEQ ID NO: 40)-A (далее обозначается как BCY10731);
 где Pya обозначает 4-пентиноильную часть, в частности:
 A-(SEQ ID NO: 6)-A-K(Pya) (далее обозначается как BCY11607); и
 Ac-A-(SEQ ID NO: 6)-A-K(Pya) (далее обозначается как BCY12708);
 где Pya обозначает 4-пентиноильную часть.

9. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 4 аминокислоты и вторая из которых содержит 8 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

C_iEWISC_{ii}PGEPHRWWC_{iii} (SEQ ID NO: 41);
 C_iVWEAC_{ii}PEHPDQWWC_{iii} (SEQ ID NO: 42);
 C_iSTWHC_{ii}FWNLQEGKC_{iii} (SEQ ID NO: 43);
 C_iEWKAC_{ii}EHDRERWWC_{iii} (SEQ ID NO: 44);
 C_iRTWQC_{ii}FYEWQNGHC_{iii} (SEQ ID NO: 45);
 C_iKTWDC_{ii}FWASQVSEC_{iii} (SEQ ID NO: 46);
 C_iSTWQC_{ii}FYDLQEGHC_{iii} (SEQ ID NO: 47);
 C_iTTWEC_{ii}FYDLQEGHC_{iii} (SEQ ID NO: 48);
 C_iETWEC_{ii}FWRLQAGEC_{iii} (SEQ ID NO: 49);
 C_iRTWQC_{ii}FWDLQEGLC_{iii} (SEQ ID NO: 50);
 C_iSTWQC_{ii}FWDSQLGAC_{iii} (SEQ ID NO: 51);
 C_iETWEC_{ii}FEWQVGSC_{iii} (SEQ ID NO: 52);
 C_iTTWEC_{ii}FWDLQEGLC_{iii} (SEQ ID NO: 53);
 C_iHTWDC_{ii}FYQWQDGHC_{iii} (SEQ ID NO: 54); и
 C_iTTWEC_{ii}FYSLQDGHC_{iii} (SEQ ID NO: 55);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или их модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль, такой как:

A-(SEQ ID NO: 41)-A (далее обозначается как BCY10339);
 A-(SEQ ID NO: 42)-A (далее обозначается как BCY10340);

A-(SEQ ID NO: 43)-A (далее обозначается как BCY10342);
 A-(SEQ ID NO: 44)-A (далее обозначается как BCY10345);
 A-(SEQ ID NO: 45)-A (далее обозначается как BCY10347);
 A-(SEQ ID NO: 46)-A (далее обозначается как BCY10348);
 A-(SEQ ID NO: 47)-A (далее обозначается как BCY10720);
 A-(SEQ ID NO: 48)-A (далее обозначается как BCY10721);
 A-(SEQ ID NO: 49)-A (далее обозначается как BCY10722);
 A-(SEQ ID NO: 50)-A (далее обозначается как BCY10723);
 A-(SEQ ID NO: 51)-A (далее обозначается как BCY10724);
 A-(SEQ ID NO: 52)-A (далее обозначается как BCY10725);
 A-(SEQ ID NO: 53)-A (далее обозначается как BCY10726);
 A-(SEQ ID NO: 54)-A (далее обозначается как BCY10727); и
 A-(SEQ ID NO: 55)-A (далее обозначается как BCY10728).

10. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, обе из которых содержат 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_i WY EYDC_{ii} NNWERC_{iii}$ (SEQ ID NO: 8),
 $C_i NEDMYC_{ii} FMWMEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 56);
 $C_i LY EYDC_{ii} YTWRR C_{iii}$ (SEQ ID NO: 57);
 $C_i RY EYDC_{ii} HTWQRC_{iii}$ (SEQ ID NO: 58);
 $C_i WY EYDC_{ii} TTWERC_{iii}$ (SEQ ID NO: 59);
 $C_i WY EYDC_{ii} RTWT RC_{iii}$ (SEQ ID NO: 60);
 $C_i LY EYDC_{ii} HTWT RC_{iii}$ (SEQ ID NO: 61); и
 $C_i WY EYDC_{ii} RTWT FC_{iii}$ (SEQ ID NO: 62);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или их модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль, такой как:

A-(SEQ ID NO: 8)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10550);
 A-(SEQ ID NO: 8)-A (далее обозначается как BCY10361);
 A-(SEQ ID NO: 56)-A (далее обозначается как BCY10360);
 A-(SEQ ID NO: 57)-A (далее обозначается как BCY10363);
 A-(SEQ ID NO: 58)-A (далее обозначается как BCY10732);
 A-(SEQ ID NO: 59)-A (далее обозначается как BCY10733);
 A-(SEQ ID NO: 60)-A (далее обозначается как BCY10734);
 A-(SEQ ID NO: 61)-A (далее обозначается как BCY10735); и
 A-(SEQ ID NO: 62)-A (далее обозначается как BCY10736), такой как:
 A-(SEQ ID NO: 8)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10550).

11. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 5 аминокислот и вторая из которых содержит 7 аминокислот,

и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iHGGVWC_{ii}IPNINDSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 63);

$C_iDSPVRC_{ii}YWNTQKGC_{iii}$ (SEQ ID NO: 64); и

$C_iGSPVPC_{ii}YWNTRKGC_{iii}$ (SEQ ID NO: 65);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или их модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль, такой как:

A-(SEQ ID NO: 63)-A (далее обозначается как BCY10336);

A-(SEQ ID NO: 64)-A (далее обозначается как BCY10337); и

A-(SEQ ID NO: 65)-A (далее обозначается как BCY10338).

12. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 6 аминокислот и вторая из которых содержит 5 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iVIRYSPC_{ii}SHYLNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 9);

$C_iAPFEFNC_{ii}YTWRPC_{iii}$ (SEQ ID NO: 66); и

$C_iRVLYSPC_{ii}YHWLNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 67);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или их модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль, такой как:

A-(SEQ ID NO: 9)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10794);

A-(SEQ ID NO: 9)-A (далее обозначается как BCY10349);

A-(SEQ ID NO: 66)-A (далее обозначается как BCY10346); и

A-(SEQ ID NO: 67)-A (далее обозначается как BCY10357), такой как:

A-(SEQ ID NO: 9)-A-[Sar6]-[KBiot] (далее обозначается как BCY10794).

13. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, обе из которых содержат 6 аминокислот, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iSIMYSPC_{ii}ENPHNHC_{iii}$ (SEQ ID NO: 68);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или ее модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль, такой как:

A-(SEQ ID NO: 68)-A (далее обозначается как BCY10362).

14. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 8 аминокислот и вторая из которых содержит 3 аминокислоты, и аминокислотная последовательность содержит:

$C_iDYSPWWHPC_{ii}NHIC_{iii}$ (SEQ ID NO: 10);

$C_iDKWEPDHLHC_{ii}YWWC_{iii}$ (SEQ ID NO: 69);

$C_iDAWPETHVC_{ii}YWWC_{iii}$ (SEQ ID NO: 70); и

C_i DEYTPENHC_{ii}YWWC_{iii} (SEQ ID NO: 71);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или их модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль, такой как:

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 10)-A (далее обозначается как BCY11369);

A-(SEQ ID NO: 10)-A (далее обозначается как BCY10331);

A-(SEQ ID NO: 69)-A (далее обозначается как BCY10332);

A-(SEQ ID NO: 70)-A (далее обозначается как BCY10717); и

A-(SEQ ID NO: 71)-A (далее обозначается как BCY10718), такой как:

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 10)-A (далее обозначается как BCY11369).

15. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанные последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенных двумя последовательностями петель, первая из которых содержит 8 аминокислот и вторая из которых содержит 4 аминокислоты, и аминокислотная последовательность содержит:

C_i WINYSISPC_{ii}YVGEC_{iii} (SEQ ID NO: 72); и

C_i RYEYPEHLC_{ii}YTWQC_{iii} (SEQ ID NO: 73);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или их модифицированное производное или фармацевтически приемлемую соль, такой как:

A-(SEQ ID NO: 72)-A (далее обозначается как BCY10334); и

A-(SEQ ID NO: 73)-A (далее обозначается как BCY10719).

16. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, где указанный пептидный лиганд выбран из BCY10551, BCY10552, BCY10479, BCY11371, BCY10482, BCY10549, BCY11501, BCY10550, BCY10794 и BCY11369, таких как BCY10551, BCY11371 и BCY10549, в частности, BCY10549.

17. Пептидный лиганд по любому из пп.1-16, где молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА).

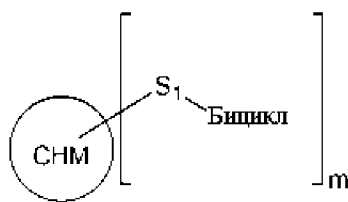
18. Пептидный лиганд по любому из пп.1-17, где фармацевтически приемлемая соль выбрана из свободной кислоты или соли натрия, калия, кальция или аммония.

19. Мультимерный связывающий комплекс, который содержит по меньшей мере два пептидных лиганда, где по меньшей мере один пептидный лиганд является специфичным к OX40 по любому из пп.1-18 и 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 цепи.

20. Мультимерный связывающий комплекс по п.19, где каждый пептидный лиганд соединен с центральной шарнирной частью спейсерной группой.

21. Мультимерный связывающий комплекс по п.19 или п.20, который содержит

соединение формулы (I):



(I)

где СНМ обозначает центральную шарнирную часть;

S₁ обозначает спейсерную группу;

бицикл означает пептидный лиганд по любому из пп.1-18; и

m обозначает целое число, выбранное из 2-10.

22. Мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.19-21, где указанные пептидные лиганды являются специфичными к одной и той же мишени.

23. Мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.19-22, где мультимерный связывающий комплекс содержит по меньшей мере два идентичных пептидных лиганда.

24. Мультимерный связывающий комплекс по п.23, где мультимерный связывающий комплекс содержит четыре идентичных пептидных лиганда, таких как четыре пептидных лиганда ВСУ10549, и содержит тетрамерный комплекс ВСУ12019.

25. Мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.19-22, где мультимерный связывающий комплекс содержит по меньшей мере два различных пептидных лиганда.

26. Мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.19-21, где указанные пептидные лиганды являются специфичными к различным мишеням.

27. Мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.19-26, где по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов является специфичным к ОХ40 и по меньшей мере один из указанных дополнительных пептидных лигандов связывается с дополнительным компонентом на иммунной клетке.

28. Мультимерный связывающий комплекс по п.27, где дополнительный компонент на иммунной клетке представляет собой CD137.

29. Мультимерный связывающий комплекс по п.27 или п.28, где по меньшей мере один дополнительный пептидный лиганд, который связывается с дополнительным компонентом на иммунной клетке, включает связывающий CD137 пептидный лиганд.

30. Мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.19-29, где по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов является специфичным к ОХ40 и по меньшей мере один из указанных дополнительных пептидных лигандов связывается с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке, и необязательно где по меньшей мере один из указанных пептидных лигандов связывается с дополнительным компонентом на иммунной клетке.

31. Мультимерный связывающий комплекс по п.19, который представляет собой гетеротандемный пептидный комплекс, содержащий:

(а) один или несколько связывающих ОХ40 пептидных лигандов по любому из пп.1-18; конъюгированных через линкер с

(b) по меньшей мере одним вторым пептидным лигандом, который связывается с компонентом, присутствующим на злокачественной клетке;

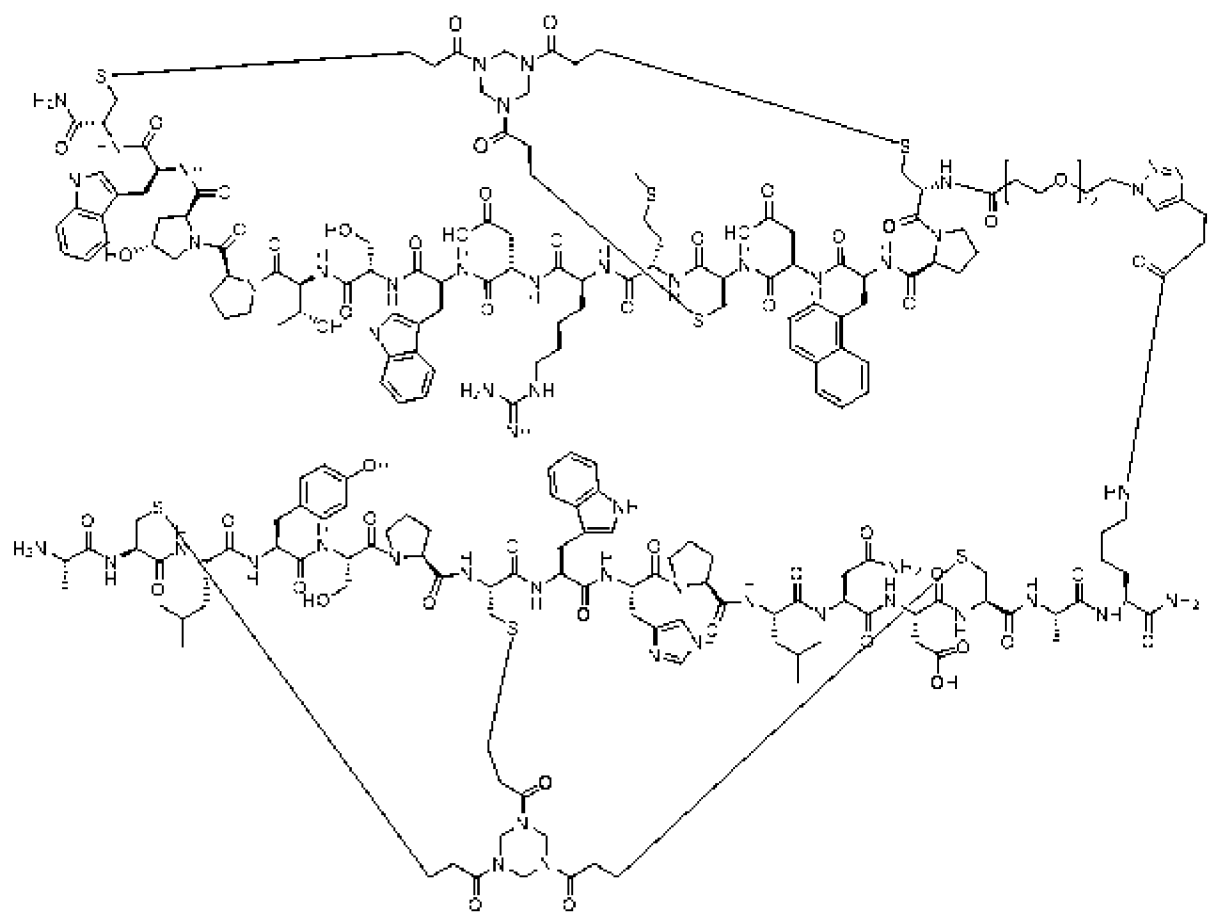
где каждый из указанных пептидных лигандов содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три остатка цистеина, разделенных по меньшей мере двумя последовательностями петель, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с остатками цистеина полипептида, так что на молекулярном каркасе образуется по меньшей мере две полипептидных цепи.

32. Мультимерный связывающий комплекс по п.31, где второй пептидный лиганд включает связывающий EphA2, PD-L1, нектин-4 или PSMA бициклический пептидный лиганд, такой как связывающий нектин-4 бициклический пептидный лиганд, который содержит аминокислотную последовательность:

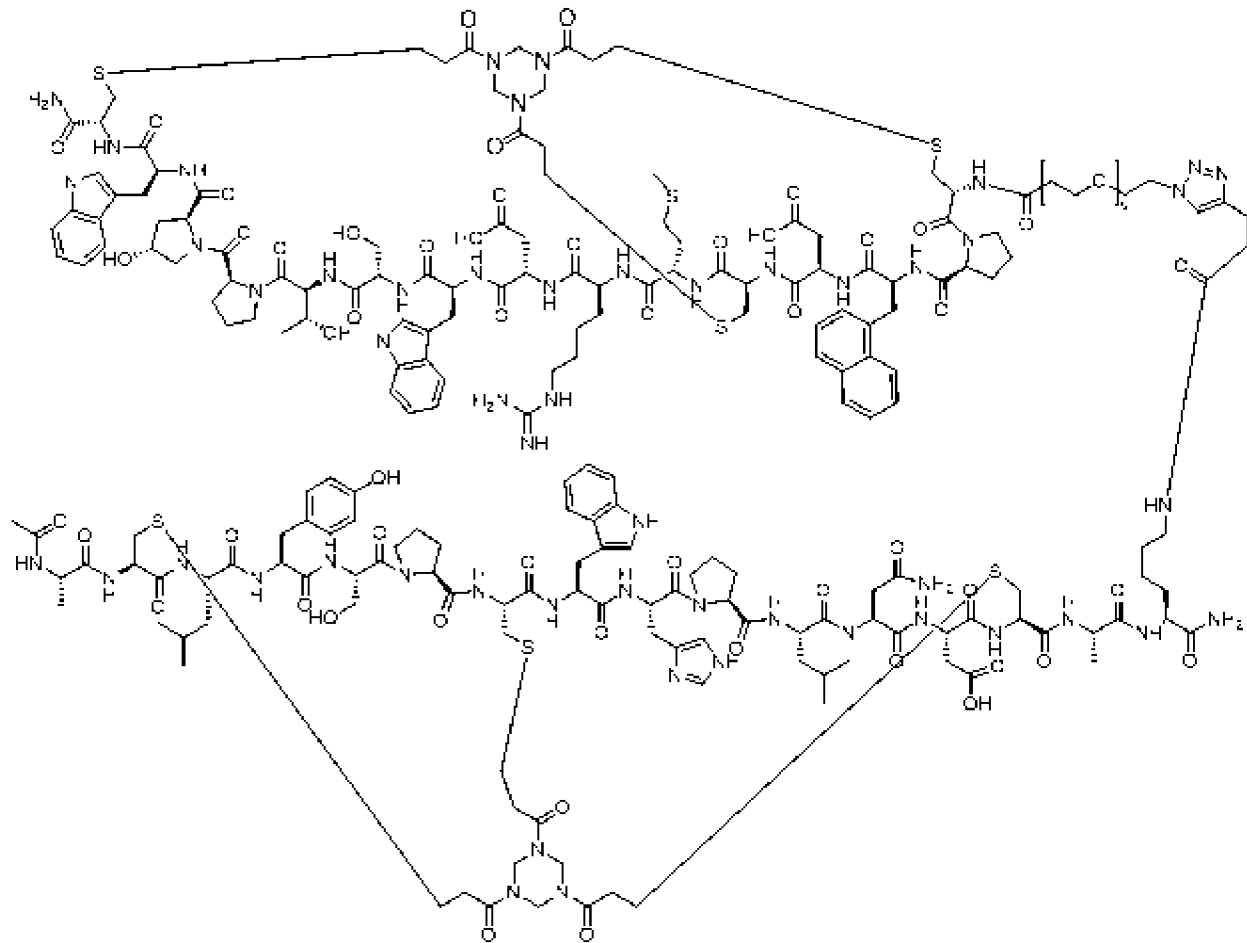
CP[1Nal][dD]CM[HArg]DWSTP[HyP]WC (SEQ ID NO: 11; далее обозначается как BCY8116),

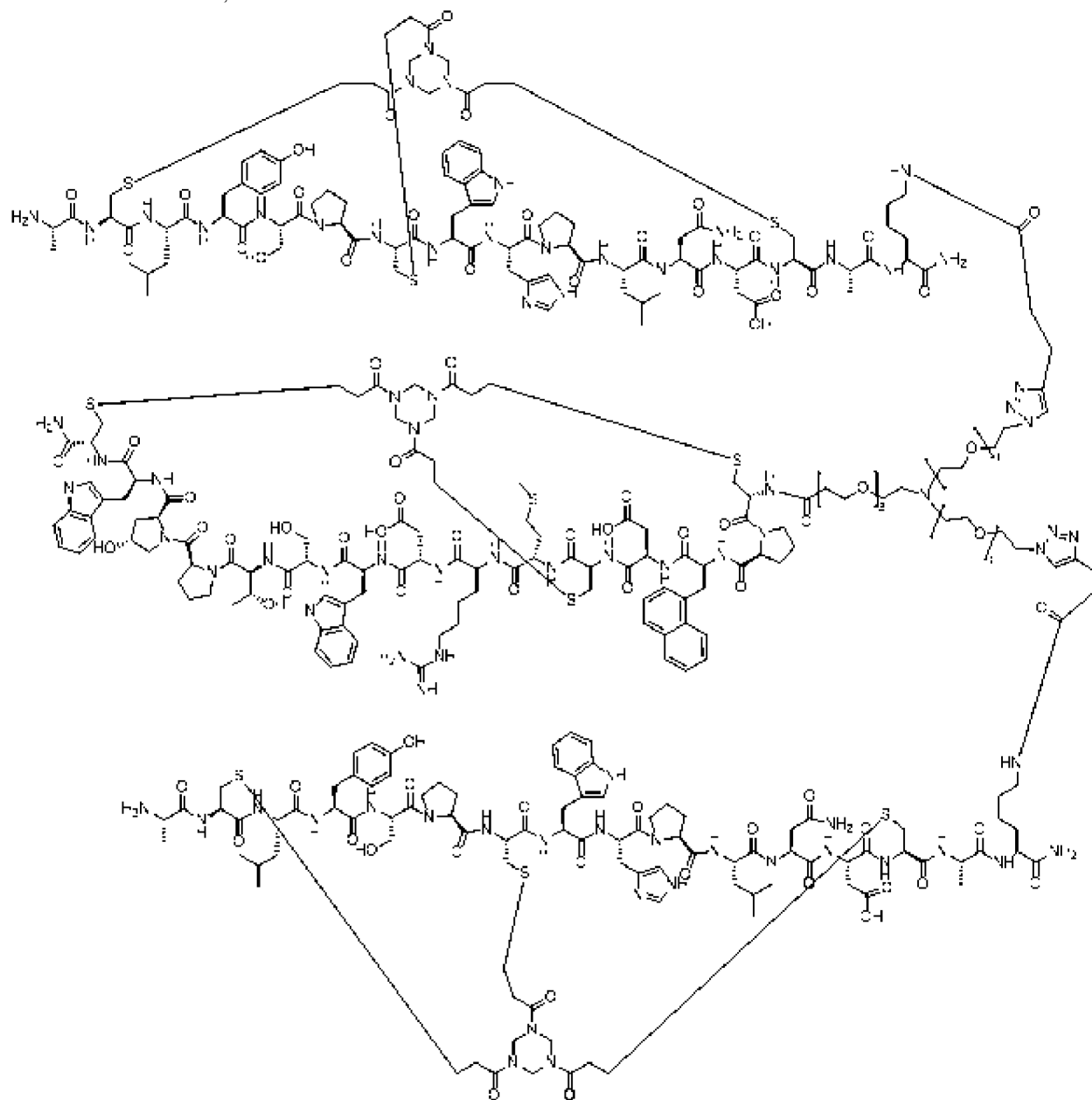
где 1Nal обозначает 1-нафтилаланин, HArg обозначает гомоаргинин и HyP обозначает гидроксипролин, такой как производное PEG12 BCY8116, производное PEG5 BCY8116 и трифункциональное производное PEG3 BCY8116.

33. Мультимерный связывающий комплекс по п.31 или п.32, который выбран из BCY12141, BCY12721 и BCY12697:



BCY12141;



BCY12721; и**BCY12697.**

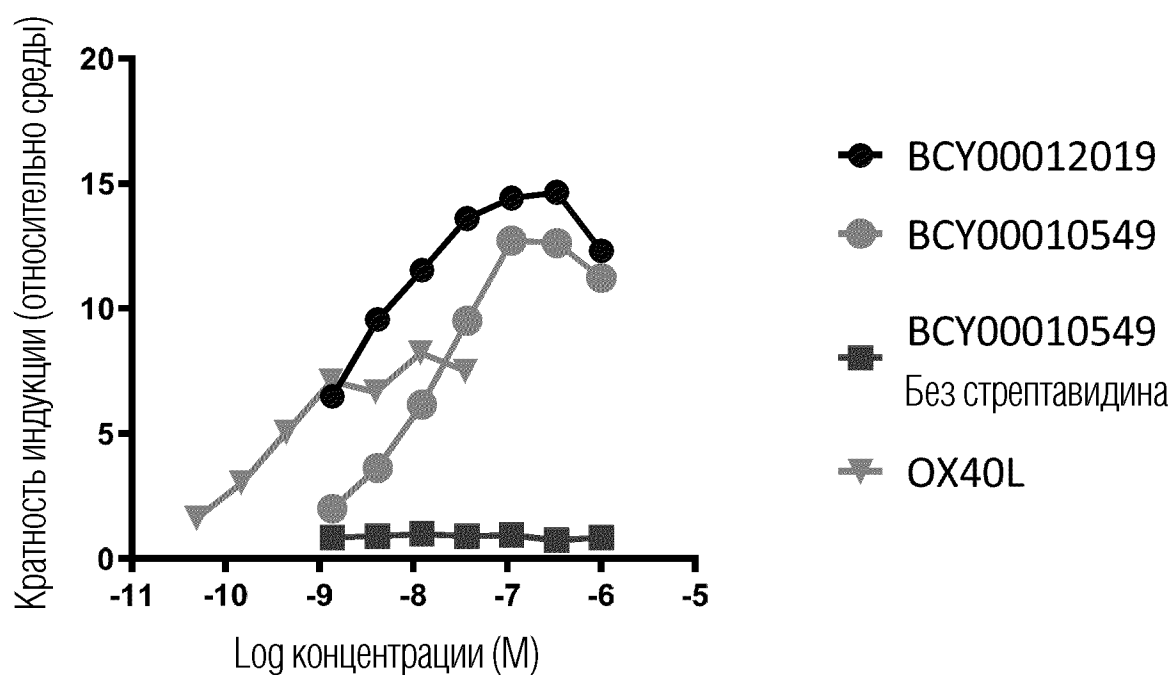
34. Конъюгат лекарственного средства, содержащий пептидный лиганд по любому из пп.1-18 или мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.19-33, конъюгированный с одной или несколькими эффекторными и/или функциональными группами.

35. Фармацевтическая композиция, которая содержит пептидный лиганд по любому из пп.1-18, мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.19-33 или конъюгат лекарственного средства по п.34, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

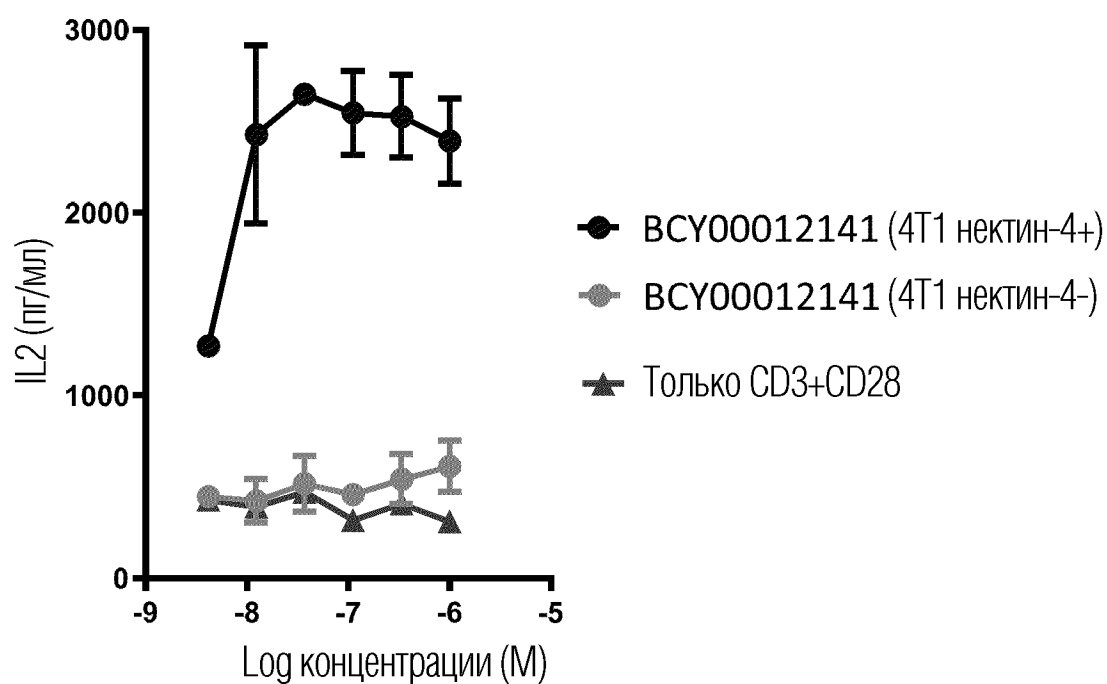
36. Пептидный лиганд по любому из пп.1-18, мультимерный связывающий комплекс по любому из пп.19-33 или конъюгат лекарственного средства по п.34 для применения для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения,

опосредуемого OX40.

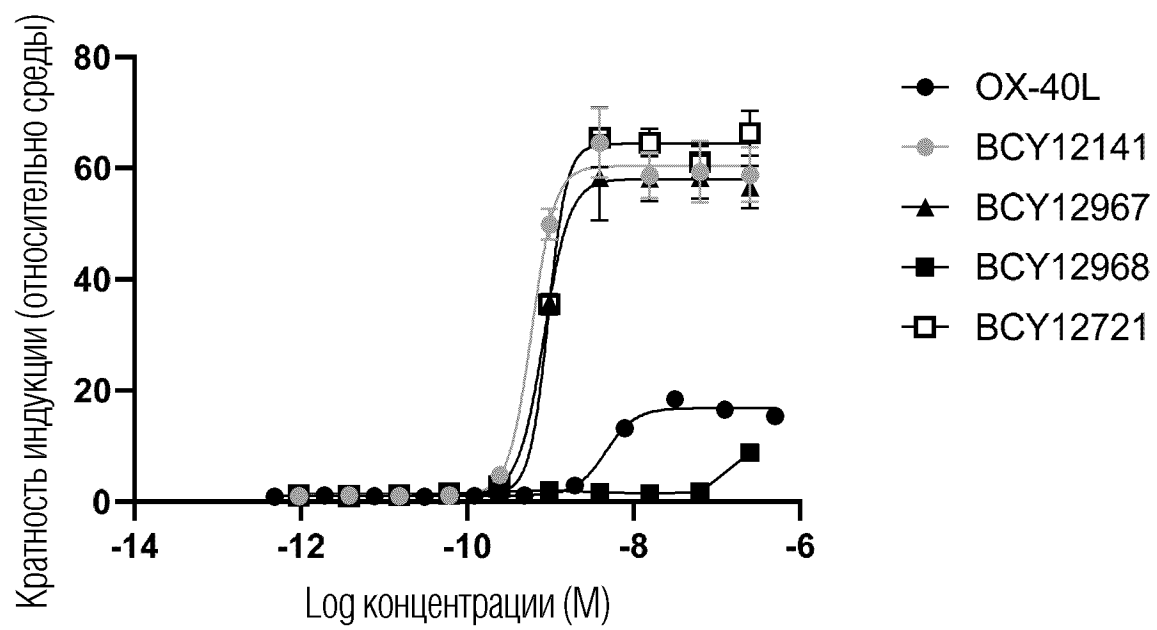
1/2



ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3