

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290416 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.20(51) Int. Cl. A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)
A61K 38/12 (2006.01)
C07K 7/54 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2020.07.30

(54) ГЕТЕРОТАНДЕМНЫЕ БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

(31) 62/880,191; 62/910,088; 62/931,442;
63/022,667; 63/024,715(72) Изобретатель:
Макдоннелл Кевин, Упадхийа Пунит,
Лехденрента Джоанна, Мадд Джемма
(GB)(32) 2019.07.30; 2019.10.03; 2019.11.06;
2020.05.11; 2020.05.14

(33) US

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

(86) PCT/GB2020/051831

(87) WO 2021/019246 2021.02.04

(71) Заявитель:
БАЙСИКЛТЭКС ЛИМИТЕД (GB)

(57) Настоящее изобретение относится к гетеротандемным пептидным комплексам, которые включают первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на раковой клетке, конъюгированный через линкер с двумя или более вторыми пептидными лигандами, которые связываются с компонентом, присутствующим на иммунной клетке. Изобретение также относится к применению указанных гетеротандемным бициклических пептидных комплексов для предотвращения, подавления или лечения рака.



A1

202290416

202290416

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572793EA/042

ГЕТЕРОТАНДЕМНЫЕ БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к гетеротандемным пептидным комплексам, которые включают первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на раковой клетке, конъюгированный через линкер с двумя или более вторыми пептидными лигандами, которые связываются с компонентом, присутствующим на иммунной клетке. Изобретение также относится к применению указанных гетеротандемным бициклических пептидных комплексов для предотвращения, подавления или лечения рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Циклические пептиды обладают способностью связываться с высокой аффинностью и специфичностью с белками-мишенями и, вследствие этого, они представляют собой перспективный класс молекул для разработки терапевтических средств. В действительности, несколько циклических пептидов уже успешно используются в клинической практике, например антибактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессант циклоспорин или противораковый препарат октреотид (Driggers et al. (2008), *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 608-24). Высокая способность к связыванию обусловлена относительно большой поверхностью взаимодействия, образующейся между пептидом и мишенью, а также пониженной конформационной гибкостью циклических структур. Обычно макроциклы связываются с поверхностями площадью несколько сотен 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 αVβ3 (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 своей циклической конфигурации, пептидные макроциклы являются менее гибкими, чем линейные пептиды, что приводит к меньшей потере энтропии при связывании с мишенями и обуславливает более высокую аффинность связывания. Пониженная гибкость также приводит к блокированию мишень-специфичных конформаций, повышая специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Этот эффект был продемонстрирован на высокоактивном и селективном ингибиторе матричной металлопротеиназы-8 (ММР-8), который терял свою селективность относительно других ММР при раскрытии его кольца (Cherney et al. (1998), *J Med Chem* 41 (11), 1749-51). Достигаемая за счет макроциклизации высокая способность к связыванию еще более выражена у полициклических пептидов, имеющих более одного пептидного кольца, как, например, у ванкомицина, низина и актиномицина.

Ранее, различные группы исследователей проводили связывание полипептидов с остатками цистеина с синтетической молекулярной структурой (Kemp and McNamara

(1985), J. Org. Chem; Timmerman et al. (2005), ChemBioChem). Meloen с соавторами использовали трис(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной циклизации множества пептидных петель на синтетических каркасах для структурной имитации поверхности белков (Timmerman et al. (2005), ChemBioChem). Способы получения перспективных лекарственных соединений, в которых указанные соединения получают путем связывания цистеинсодержащих полипептидов с молекулярным каркасом, таким как, например, трис(бромметил)бензол, раскрыты в патентных документах WO 2004/077062 и WO 2006/078161.

Для создания и скрининга больших библиотек бициклических пептидов на связывание с представляющими интерес мишенями были разработаны комбинаторные подходы на основе фагового дисплея (Heinis et al. (2009), Nat Chem Biol 5 (7), 502-7 и патентный документ WO 2009/098450). Вкратце, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащих три остатка цистеина и две области из шести случайно выбранных аминокислот (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys), представляли на фаге и подвергали циклизации путем ковалентного связывания боковых цепей цистеина с малой молекулой (трис(бромметил)бензолом).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту изобретения, предлагается гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, включающий:

(а) первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на раковой клетке, конъюгированный через линкер с

(b) двумя или более вторыми пептидными лигандами, которые связываются с компонентом, присутствующим на иммунной клетке,

где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий, по меньшей мере, три реакционно-способных группы, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционно-способными группами полипептида, вследствие чего на молекулярном каркасе образуются, по меньшей мере, две полипептидных петли.

Согласно дополнительному аспекту изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, включающая указанный в изобретении гетеротандемный бициклический пептидный комплекс в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

Согласно дополнительному аспекту изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, включающая указанный в изобретении гетеротандемный бициклический пептидный комплекс для применения с целью предотвращения, подавления или лечения рака.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. (А) Анализ гетеротандемного бициклического пептидного комплекса нектин-4/CD137 путем проведения анализа репортерного гена люциферазы на CD137 фирмы Promega в присутствии клеток H292, экспрессирующих нектин-4. BCY11617

представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, который связывается с нектин-4 с той же аффинностью, что и ВСУ11863, но не связывается с CD137. (В) Данные по EC_{50} (нМ) для ВСУ11863, полученные анализом репортерного гена люциферазы на CD137 фирмы Promega в совместной культуре с другими клеточными линиями, которые экспрессируют эндогенно нектин-4 или которые сконструированы для сверхэкспрессирования нектин-4.

Фигура 2. Гетеротандемные бициклические пептидные комплексы нектин-4/CD137 индуцируют секрецию цитокинов IFN- γ (фигура 2А) и IL-2 (фигура 2В) в анализе совместной культуры РВМС-4Т1. Клетки 4Т1 конструировали для экспрессии нектин-4. ВСУ11617 представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, который связывается с нектин-4 с той же аффинностью, что и ВСУ11863, но не связывается с CD137. На фигуре 2С приведены данные по EC_{50} (нМ) для ВСУ11863, полученные анализом секреции цитокина мононуклеарными клетками периферической крови (РВМС) человека от многих доноров и линиями опухолевых клеток.

Фигура 3. Фармакокинетические данные, полученные при внутривенном введении гетеротандемного бициклического пептидного комплекса ВСУ11863 крысам линии SD и яванским макакам (супо) в дозе 2 мг/кг ($n=3$) и 1 мг/кг ($n=2$), соответственно.

Фигура 4. Противоопухолевая активность ВСУ11863 в отношении опухоли МС38#13 в модели сингенной нектин-4 сверхэкспрессирующей опухоли МС38 (МС38#13). Объемы опухолей в процессе лечения и после лечения с помощью ВСУ11863. Число мышей с полным ответом (CR) на день D69 указано в скобках. QD: ежедневное дозирование; Q3D: дозирование каждые три дня; ip: интраперитонеальное введение.

Фигура 5. Лечение с помощью ВСУ11863 приводит к появлению иммунологической памяти в модели нектин-4 сверхэкспрессирующей опухоли МС38. Объемы опухолей МС38#13 после инокуляции наивным мышам С57BL/6J-hCD137 или мышам, которые имели полные ответы (CR) на лечение с помощью ВСУ11863. Следует отметить, что ни у одной из мышей CR не появлялись опухоли к концу периода наблюдения (22 дня).

Фигура 6. ВСУ11863 демонстрирует противоопухолевую активность в модели сингенной нектин-4 сверхэкспрессирующей опухоли СТ26 (СТ26#7). Объемы опухолей СТ26#7 в процессе лечения с помощью ВСУ11863. Q3D: дозирование каждые три дня; ip: интраперитонеальное введение.

Фигура 7. Суммарное число Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток увеличивается в ткани опухоли СТ26#7 через 1 час после последнего (6-го) Q3D дозирования ВСУ11863. Анализ суммарного числа Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, регуляторных Т-клеток и отношения CD8⁺ Т-клетки/регуляторные Т-клетки в ткани опухоли СТ26#7 через 1 час после последнего Q3D дозирования ВСУ11863.

Фигура 8. Фармакокинетические профили ВСУ11863 в плазме и ткани животных, несущих сингенную опухоль СТ26#7, после однократного внутривенного (iv) введения 5 мг/кг ВСУ11863.

Фигура 9. Противоопухолевая активность BCY12491 в модели сингенной опухоли MC38. Объемы опухолей MC38 в процессе и после лечения с помощью BCY12491. Число мышей с полным ответом (CR) на день D73 указано в скобках. QD: ежедневное дозирование; Q3D: дозирование каждые три дня; ip: интраперитонеальное введение.

Фигура 10. EphA2/CD137 гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY12491 индуцирует секрецию цитокина IFN- γ при анализе совместной культуры MC38. BCY12762 представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, который связывается с EphA2 с той же аффинностью, что и BCY12491, но не связывается с CD137. (A) Донор 1=пациент 228769, EC₅₀=34 пМ. (B) Донор 2=пациент 228711, EC₅₀=85 пМ.

Фигура 11. Кривые зависимости концентрации BCY11863 и BCY12491 в плазме от времени при введении интраперитонеальной дозы 15 мг/кг мышам CD-1 (n =3) и конечные периоды полувыведения BCY11863 и BCY12491 из плазмы крови.

Фигура 12. Кривая зависимости концентрации в плазме от времени для гетеротандемного биспецифического комплекса BCY12491 через 15 мин после внутривенной инфузии 1 мг/кг ip яванским макакам (n=2).

Фигура 13. BCY11027 индуцирует зависимое от клеток-мишеней высвобождение цитокинов в полученных от пациента ex vivo культурах клеток первичных опухолей легких. (A) Полученные от пациента ex vivo опухолевые клетки образуют в культуре в течение 4 часов трехмерные сфероиды, изображение в оптическом микроскопе при 10-кратном увеличении. (B) Анализ методом проточной цитометрии экспрессии нектин-4 в образцах опухолей, полученных у пациента. В таблице указаны %CD137⁺ Т-клетки и клетки нектин-4⁺ в образцах 3 доноров. (C) %CD8⁺ki67⁺ Т-клетки в ответ на лечение с помощью BCY11027 (D) Высвобождение цитокина IL-2 (с вычитанием фона) в зависимости от концентрации BCY11027 (E) Тепловая карта, указывающая % изменения иммунных маркеров (нормализованного к среде приготовления) в ответ на лечение с помощью контрольных/испытуемых соединений.

Фигура 14. Полученные результаты для BCY12967, полученные при проведении анализа активности клеток OX40 Promega в совместной культуре с опухолевыми клетками при сравнении с OX40L и с несвязывающимся контрольным пептидом BCY12968.

Фигура 15. Полученные результаты для BCY12491 в моделях опухолей на мышах. Лечение с помощью BCY12491 и анти-CD137 увеличивает (A) количественный показатель цитотоксических клеток score, (B) количественный показатель Т-клеток и (C) количественный показатель макрофагов и инфильтрацию CD8⁺ Т-клеток (D) в сингенных опухолях MC38 на день D6 после начала лечения.

Фигура 16. Анализ EphA2/CD137 гетеротандемного бициклического пептидного комплекса BCY13272 путем проведения анализа репортерного гена люциферазы на CD137 фирмы Promega в присутствии клеток A549, PC-3 и HT29 (n=3), экспрессирующих EphA2. BCY13626 представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс,

аналогичный BCY13272, но не включающий D-аминокислоты и не связывающийся с EphA2 или CD137.

Фигура 17. Кривая зависимости концентрации BCY13272 в плазме от времени при внутривенном введении дозы 5,5 мг/кг мышам CD1 (n=3), при внутривенной инфузии дозы 3,6 мг/кг (15 мин) крысам SD (n=3) и при внутривенной инфузии дозы 8,9 мг/кг (15 мин) яванским макакам (n=2). Фармакокинетический профиль для BCY13272 характеризуется конечным периодом полувыведения 2,9 часа в случае мышей CD-1, 2,5 час в случае крыс SD и 8,9 часов в случае яванских макаков.

Фигура 18. Противоопухолевая активность BCY13272 в модели сингенной опухоли MC38. (А) Объемы опухолей MC38 в процессе лечения и после лечения с помощью BCY13272. Число мышей с полным ответом (CR) на день D28 (и сколько остается мышей с полным ответом на день D62) указано в скобках. ВІW: дозирование два раза в неделю; IV: внутривенное введение. (В) Кривые роста опухоли в случае животных с полным ответом на лечение с помощью BCY13272 и в случае наивных соответствующих возрастной группе контрольных животных после имплантации им клеток опухоли MC38. CR: животное с полным ответом.

Фигура 19. BCY13272 индуцирует секрецию цитокина IFN- γ при проведении анализа совместной культуры (А) РВМС/MC38 и (В) РВМС/HT29. BCY12762 представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, который связывается с EphA2, но не связывается с CD137. BCY13692 представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, который связывается с CD137, но не связывается с EphA2. (С) Графическая зависимость между величинами EC₅₀ (нМ) для BCY13272 и индуцированной секрецией IL-2 и IFN- γ при проведении анализа в совместной культуре РВМС с клеточной линией MC38 (мышь) в случае 5 доноров РВМС и с клеточной линией HT1080 (человек) в случае 4 доноров РВМС.

Фигура 20. Данные исследования методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) связывания BCY13272 с иммобилизованными (А) EphA2 и (В) CD137.

Фигура 21. Данные исследования методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) связывания BCY11863 с иммобилизованными (А) нектин-4 и (В) CD137. Исследования методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) двойного связывания путем иммобилизования (С) CD137 и (D) нектин-4 на сенсорном чипе SPR с последующим захватом BCY11863. Аффинность связанного BCY11863 к растворимому человеческому нектин-4 (С) или CD137 (D) измеряют путем полива растворимого рецептора на поверхность чипа при различных концентрациях. (Е) Связывание BCY13582 (биотинилированного BCY11863), иммобилизованного на покрытой стрептавидином поверхности SPR чипа, с растворимым человеческим CD137.

Фигура 22. Технология клеточных микрочипов фирмы Retrogenix, используемая для изучения неспецифических нецелевых взаимодействий BCY13582 (биотинилированного BCY11863). На фигуре приведены данные скрининга, которые показывают, что 1 мкМ BCY13582, добавленный на микрочип с микропрепаратами, экспрессирующими 11

различных белков, связывается только с CD137 и нектин-4 (что детектируется с использованием стрептавидина, меченного с помощью AlexaFluor647). Сигнал связывания пропадает при инкубировании с BCY11863.

Фигура 23. Кривые роста опухоли MC38#13 у мышей huCD137 C57Bl/6 демонстрируют противоопухолевую активность BCY11863 при различных дозах и различных интервалах между введением доз. Число животных с полным ответом (CR; отсутствие пальпируемой опухоли) на день 15 после начала лечения указано в скобках.

Фигура 24. Кривые роста опухоли (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения) MC38#13 (n=6/группа) в случае мышей huCD137 C57Bl/6 демонстрируют противоопухолевую активность BCY11863 при различных дозах и различных интервалах между введением доз. Число животных с полным ответом (CR; отсутствие пальпируемой опухоли) на день 52 после начала лечения указано в скобках. (А) Группы, в которых вводят плацебо (среду) или суммарную недельную дозу 3 мг/кг BCY11863. (В) Группы, в которых вводят плацебо (среду) или суммарную недельную дозу 10 мг/кг BCY11863. (С) Группы, в которых вводят плацебо (среду) или суммарную недельную дозу 30 мг/кг BCY11863.

Фигура 25. Фармакокинетические данные для гетеротандемного бициклического пептидного комплекса BCY11863 в случае крыс SD, внутривенно дозируемых 100 мг/кг (n=3), и результаты измерений концентрации BCY11863 и потенциальных метаболитов BCY15155 и BCY14602 в плазме.

Фигура 26. EphA2/CD137 гетеротандемные бициклические пептидные комплексы индуцируют секрецию цитокина IFN- γ при проведении анализа в совместной культуре РВМС-МС38 (А, В,С). BCY12762 и BCY12759 представляют собой 1:2 и 1:1 гетеротандемный комплекс, в котором бицикл CD137 заменен на D-аминокислоту во всех несвязывающихся контрольных комплексах.

Фигура 27. А) Кривые роста опухоли MC38 у мышей huCD137 C57Bl/6 (n=6/группа) до дня 27 демонстрируют противоопухолевую активность BCY12491 при различных дозах и различных интервалах между введением доз. В) Измерения роста индивидуальных опухолей MC38 до дня 73. Число животных с полным ответом (CR; отсутствие пальпируемой опухоли) указано в скобках. С) Кривые роста опухоли (n=5/группа) в случае животных с полным ответом или наивных контрольных животных с имплантированными клетками MC38. Скорость роста опухоли (% животных с пальпируемым ростом опухоли) указан в скобках.

Фигура 28. Активность BCY12491 зависит от CD8⁺ Т-клеток, но не от естественных клеток-киллеров (NK-клеток). (А) Несущие опухоль MC38#13 мыши с дефицитом CD8⁺ клеток и/или NK-клеток (D-5, D0 и D5) или подвергнутые лечению путем введения плацебо (среды) или изотипических контрольных антител, получали 4 дозы 15 мг/кг BCY12491 или плацебо (среду) один раз в две недели. (В) Данные по выживанию, соответствующие графику (А), где событие выживания соответствует объему опухоли, превышающему 2000 мм³. Среднее время выживания после начала лечения указано в скобках. Неопределенное

время выживания означает, что среднее время выживания не достигалось к дню 28 (к дню окончания исследования).

Фигура 29. Кривые роста индивидуальных опухолей MC38 у мышей huCD137 C57Bl/6 демонстрируют противоопухолевую активность BCY12491, BCY12730 и BCY12723 при режиме дозирования один раз каждые три дня в дозе 15 мг/кг. Число животных с полным ответом (CR; отсутствие пальпируемой опухоли) после 28 дней от начала лечения указано в скобках.

Фигура 30. Кривые роста опухоли MC38 у мышей huCD137 C57Bl/6 (n=6/группа) демонстрируют противоопухолевую активность BCY12491, BCY13048 и BCY13050 при режиме дозирования два раза в неделю в дозе 5 мг/кг. Число животных с полным ответом (CR; отсутствие пальпируемой опухоли) после 28 дней от начала лечения указано в скобках.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту изобретения, предлагается гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, включающий:

(a) первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на раковой клетке, конъюгированный через линкер с

(b) двумя или более вторыми пептидными лигандами, которые связываются с компонентом, присутствующим на иммунной клетке;

где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий, по меньшей мере, три реакционно-способных группы, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционно-способными группами полипептида, вследствие чего на молекулярном каркасе образуются, по меньшей мере, две полипептидных петли.

Согласно одному аспекту изобретения, который может быть упомянут, предлагается гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, включающий:

(a) первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на раковой клетке, конъюгированный через линкер с

(b) двумя или более вторыми пептидными лигандами, которые связываются с компонентом, присутствующим на иммунной клетке,

где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий, по меньшей мере, три остатка цистеина, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с цистеиновыми остатками полипептида, вследствие чего на молекулярном каркасе образуются, по меньшей мере, две полипептидных петли.

Первые пептидные лиганды

Используемый в изобретении термин "раковая клетка" включает любую клетку, по поводу которой известно, что она вовлечена в патологический процесс, связанный с раком. Раковые клетки возникают при повреждении генов, отвечающих за регуляцию деления клеток. Канцерогенез возникает в результате мутаций и эпимутаций генетического материала нормальных клеток, что нарушает нормальный баланс между пролиферацией и

гибелью клеток. Это приводит к неконтролируемому делению клеток и эволюции этих клеток путем естественного отбора в организме. Неконтролируемая и часто быстрая пролиферация клеток может приводить к возникновению доброкачественных или злокачественных опухолей (раку). Доброкачественные опухоли не распространяются в другие части организма и не прорастают в другие ткани. Злокачественные опухоли могут поражать другие органы, распространяться в отдаленные места (метастазы) и становиться опасными для жизни.

В одном варианте осуществления, раковую клетку выбирают из опухолевых клеток HT1080, A549, SC-OV-3, PC3, HT1376, NCI-H292, LnCap, MC38, MC38 #13, 4T1-D02, H322, HT29, T47D и RKO.

В одном варианте осуществления, компонент, присутствующий на раковой клетке, представляет собой нектин-4.

Нектин-4 является поверхностной молекулой, которая принадлежит к семейству белков нектинов, состоящему из 4 членов. Нектины являются молекулами клеточной адгезии, которые играют ключевую роль в различных биологических процессах, таких как полярность, пролиферация, дифференцировка и миграция, для эпителиальных, эндотелиальных, иммунных и нейрональных клеток в процессе развития и жизни взрослых особей. Они участвуют в ряде патологических процессов у человека. Они являются основными рецепторами для полиовируса, вируса простого герпеса и вируса кори. Мутации в генах, кодирующих нектин-1 (PVRL1) или нектин-4 (PVRL4), вызывают синдромы эктодермальной дисплазии, связанные с другими патологиями. Нектин-4 экспрессируется в процессе внутриутробного развития. В тканях взрослого человека, его экспрессия более ограничена, чем других представителей семейства. Нектин-4 представляет собой опухолеассоциированный антиген в 50%, 49% и 86% случаях карциномы молочной железы, яичников и легких, соответственно, в основном при опухолях с неблагоприятным прогнозом. Его экспрессия не обнаруживается в соответствующих нормальных тканях. В опухолях молочной железы, нектин-4 экспрессируется в основном в трижды негативных карциномах и карциномах ERBB2+. Обнаружение растворимых форм нектина-4 в сыворотке крови пациентов с этими видами рака связывают с неблагоприятным прогнозом. Уровни нектина-4 в сыворотке крови повышаются при прогрессировании метастазирования и снижаются после лечения. Эти результаты позволяют предположить, что нектин-4 может являться теоретически обоснованной мишенью при лечении рака. Соответственно, на предшествующем уровне техники уже были описаны несколько антител против нектина-4. В частности, энфортумаб-ведотин (ASG-22ME) представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), нацеленный на нектин-4, который в настоящее время проходит клинические испытания для лечения пациентов с солидными опухолями.

В одном варианте осуществления, первый пептидный лиганд включает нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд.

Подходящие примеры нектин-4 связывающих бициклических пептидных лигандов раскрыты в патентном документе WO 2019/243832, пептиды из которого включены в настоящее изобретение путем ссылки на него.

В одном варианте осуществления, нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из:

$C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 1; именуемой в изобретении как BCY8116);

$C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]D[dW]STP[HyP][dW]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 2);

$C_iP[1Nal][dK](Sar_{10}-(B-Ala))C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 3);

$C_iPFGC_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 4; именуемой в изобретении как BCY11414);

$C_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 14);

$[MerPro]_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 15; именуемой в изобретении как BCY12363);

$C_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]W[Cysam]_{iii}$ (SEQ ID NO: 16);

$[MerPro]_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]W[Cysam]_{iii}$ (SEQ ID NO: 17; именуемой в изобретении как BCY12365);

$C_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HAArg]HWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 18);

$C_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HAArg]EWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 19);

$C_iP[1Nal][dE]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 20; именуемой в изобретении как BCY12368);

$C_iP[1Nal][dA]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 21; именуемой в изобретении как BCY12369);

$C_iP[1Nal][dE]C_{ii}L[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 22; именуемой в изобретении как BCY12370); и

$C_iP[1Nal][dE]C_{ii}M[HAArg]EWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 23; именуемой в изобретении как BCY12384);

где $[MerPro]_i$, C_i , C_{ii} , C_{iii} и $[Cysam]_{iii}$ представляют первую (i), вторую (ii) и третью (iii) реакционно-способные группы, которые выбирают из цистеина, MerPro и Cysam, 1Nal представляет 1-нафтилаланин, HAArg представляет гомоаргинин, HyP представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, Sar_{10} представляет 10 звеньев саркозина, B-Ala представляет бета-аланин, MerPro представляет 3-меркаптопропионовую кислоту и Cysam представляет цистеамин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления, нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из:

$C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 1; именуемой в изобретении как BCY8116);

$C_iP[1Nal][dK](Sar_{10}-(B-Ala))C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 3); и

$C_iPFGC_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (SEQ ID NO: 4; именуемой в изобретении как BCY11414);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, 1Nal представляет 1-нафтилаланин, HArg представляет гомоаргинин, Hyp представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, Sar_{10} представляет 10 звеньев саркозина, B-Ala представляет бета-аланин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления, нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно включает N-концевые модификации и включает:

SEQ ID NO: 1 (именуемую в изобретении как BCY8116);
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]- (SEQ ID NO: 1) (именуемую в изобретении как BCY8846);
 [PYA]- (SEQ ID NO: 1) (именуемую в изобретении как BCY11015);
 [PYA]-[B-Ala]- (SEQ ID NO: 1) (именуемую в изобретении как BCY11016);
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]- (SEQ ID NO: 2) (именуемую в изобретении как BCY11942);
 Ac- (SEQ ID NO: 3) (именуемую в изобретении как BCY8831);
 SEQ ID NO: 4 (именуемую в изобретении как BCY11414);
 [PYA]-[B-Ala]- (SEQ ID NO: 14) (именуемую в изобретении как BCY11143);
 Palmitic-γGlu-γGlu- (SEQ ID NO: 14) (именуемую в изобретении как BCY12371);
 Ac- (SEQ ID NO: 14) (именуемую в изобретении как BCY12024);
 Ac- (SEQ ID NO: 16) (именуемую в изобретении как BCY12364);
 Ac- (SEQ ID NO: 18) (именуемую в изобретении как BCY12366); и
 Ac- (SEQ ID NO: 19) (именуемую в изобретении как BCY12367);

где PYA представляет 4-пентиновая кислота, B-Ala представляет бета-аланин, Sar₁₀ представляет 10 звеньев саркозина, или их фармацевтически приемлемую соль.

В еще одном варианте осуществления, нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно включает N-концевые модификации и включает:

SEQ ID NO: 1 (именуемую в изобретении как BCY8116);
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]- (SEQ ID NO: 1) (именуемую в изобретении как BCY8846);
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]- (SEQ ID NO: 2) (именуемую в изобретении как BCY11942);
 Ac- (SEQ ID NO: 3) (именуемую в изобретении как BCY8831); и
 SEQ ID NO: 4 (именуемую в изобретении как BCY11414);

где PYA представляет 4-пентиновую кислоту, B-Ala представляет бета-аланин, Sar₁₀ представляет 10 звеньев саркозина, или их фармацевтически приемлемую соль.

В еще одном варианте осуществления, нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд включает SEQ ID NO: 1 (именуемую в изобретении как BCY8116).

В альтернативном варианте осуществления, компонент, присутствующий на раковой клетке, представляет собой EphA2.

Eph-рецептор тирозинкиназ (Ephs) принадлежит к обширной группе рецепторных тирозинкиназ (RTK), которые фосфорилируют белки на остатках тирозина. Eph-рецепторы и связанные с их мембраной эфринные лиганды (эфрины) контролируют положение клеток и структурную организацию ткани (Poliakov et al. (2004) Dev Cell 7, 465-80). Функциональные и биохимические ответы Eph возникают при состояниях с более высокой степенью олигомеризации лигандов (Stein et al. (1998) Genes Dev 12, 667-678).

Было показано, что, наряду с другими функциями структурирования, различные Eph-рецепторы тирозинкиназ и эфрины играют определенную роль в развитии сосудов. Нокаут EphB4 и эфрина-B2 приводит к отсутствию способности ремоделировать капиллярные русла в кровеносные сосуды (Poliakov et al., supra) и к гибели эмбрионов. Персистирующую экспрессию некоторых Eph-рецепторов и эфринов также обнаруживали при образовании новых микрососудов у взрослых пациентов (Brantley-Sieders et al. (2004) *Curr Pharm Des* 10, 3431-42; Adams (2003) *J Anat* 202, 105-12).

Было также обнаружено, что разрегулированное повторное появление некоторых эфринов и их рецепторов у взрослых пациентов способствует инвазии опухоли, метастазированию и неоангиогенезу (Nakamoto et al. (2002) *Microsc Res Tech* 59, 58-67; Brantley-Sieders et al., supra). Кроме того, было обнаружено, что некоторые представители семейства Eph сверхэкспрессируются на опухолевых клетках из различных опухолей человека (Brantley-Sieders et al., supra); Marme (2002) *Ann Hematol* 81 Suppl 2, S66; Booth et al. (2002) *Nat Med* 8, 1360-1).

EPH-рецептор A2 (рецептор-2 эфрина A-типа) представляет собой белок, который у человека кодируется геном EPNA2.

EphA2 активируется при многих раковых заболеваниях у человека, часто коррелируя с прогрессированием заболевания, метастазами и неблагоприятным прогнозом, например: при раке молочной железы (Zelinski et al (2001) *Cancer Res.* 61, 2301-2306; Zhuang et al (2010) *Cancer Res.* 70, 299-308; Brantley-Sieders et al (2011) *PLoS One* 6, e24426), раке легких (Brannan et al (2009) *Cancer Prev Res (Phila)* 2, 1039-1049; Kinch et al (2003) *Clin Cancer Res.* 9, 613-618; Guo et al (2013) *J Thorac Oncol.* 8, 301-308), раке желудка (Nakamura et al (2005) *Cancer Sci.* 96, 42-47; Yuan et al (2009) *Dig Dis Sci* 54, 2410-2417), раке поджелудочной железы (Mudali et al (2006) *Clin Exp Metastasis* 23, 357-365), раке предстательной железы (Walker-Daniels et al (1999) *Prostate* 41, 275-280), раке печени (Yang et al (2009) *Hepatol Res.* 39, 1169-1177) и глиобластоме (Wykosky et al (2005) *Mol Cancer Res.* 3, 541-551; Li et al (2010) *Tumor Biol.* 31, 477-488).

Полностью роль EphA2 в прогрессировании рака до сих пор не установлена, хотя и существуют доказательства его взаимосвязи с многими стадиями прогрессирования рака, включая рост опухолевых клеток, выживаемость, инвазию и ангиогенез. Понижающая регуляция экспрессии EphA2 подавляет размножение раковых клеток опухоли ((Binda et al (2012) *Cancer Cell* 22, 765-780), в то время как блокада EphA2 ингибирует миграцию клеток, индуцированную VEGF (Hess et al (2001) *Cancer Res.* 61, 3250-3255), прорастание и ангиогенез (Cheng et al (2002) *Mol Cancer Res.* 1, 2-11; Lin et al (2007) *Cancer* 109, 332-40) и прогрессирование метастазирования (Brantley-Sieders et al (2005) *FASEB J.* 19, 1884-1886).

Было показано, что конъюгат антитела и лекарственного средства для EphA2 значительно снижает рост опухоли в ксенотрансплантатных моделях на крысах и мышях (Jackson et al (2008) *Cancer Research* 68, 9367-9374), и аналогичный подход был опробован на человеке, но лечение пришлось прекратить из-за связанных с лечением побочных эффектов (Annunziata et al (2013) *Invest New drugs* 31, 77-84).

В одном варианте осуществления, первый пептидный лиганд включает EphA2 связывающий бициклический пептидный лиганд.

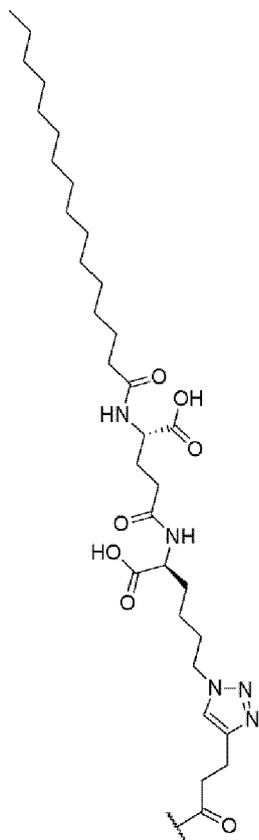
Подходящие примеры EphA2 связывающих бициклических пептидных лигандов раскрыты в патентных документах WO 2019/122860, WO 2019/122861 и WO 2019/122863, пептиды из которых включены в настоящее изобретение путем ссылки на них.

В одном варианте осуществления, EphA2 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из:

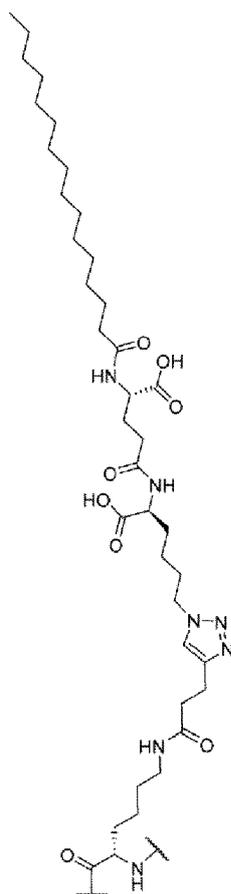
- C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 24);
 C_iLWDPTPC_{ii}ANLHL[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 25);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[K(PYA)]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 26);
 C_i[HyP][K(PYA)]VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 27);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}[K(PYA)]HP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 28);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LKP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 29);
 C_i[HyP]KVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 30);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}KHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 31);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dE]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 32);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 33);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 34);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 35);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[dA]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 36);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 37; именуемой в изобретении как BCY12860);
 C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 38);
 C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}LEP[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 39);
 C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 40);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 41);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[d1Nal]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 42);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[1Nal]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 43);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[d1Nal]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 44);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[1Nal]P[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 45; именуемой в изобретении как BCY13119);
 C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}LEP[dA]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 46);
 C_i[HyP][hGlu]VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 47);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}[hGlu]HP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 48);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[hGlu]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 49);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dNle]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 50);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[Nle]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 51);
 [MerPro]_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 154);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg][Cysam]_{iii} (SEQ ID NO: 155);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[His3Me]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 156);

$C_i[\text{HyP}]LVNPLC_{ii}L[\text{His1Me}]P[\text{dD}]W[\text{HArg}]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 157);
 $C_i[\text{HyP}]LVNPLC_{ii}L[4\text{ThiAz}]P[\text{dD}]W[\text{HArg}]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 158);
 $C_i[\text{HyP}]LVNPLC_{ii}LFP[\text{dD}]W[\text{HArg}]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 159);
 $C_i[\text{HyP}]LVNPLC_{ii}L[\text{Thi}]P[\text{dD}]W[\text{HArg}]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 160);
 $C_i[\text{HyP}]LVNPLC_{ii}L[3\text{Thi}]P[\text{dD}]W[\text{HArg}]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 161);
 $C_i[\text{HyP}]LVNPLC_{ii}LNP[\text{dD}]W[\text{HArg}]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 162);
 $C_i[\text{HyP}]LVNPLC_{ii}LQP[\text{dD}]W[\text{HArg}]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 163); and
 $C_i[\text{HyP}]LVNPLC_{ii}L[\text{K}(\text{PYA}-(\text{Пальмитоил-Glu-LysN}_3))]P[\text{dD}]W[\text{HArg}]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 164);

где $[\text{MerPro}]_i$, C_i , C_{ii} , C_{iii} и $[\text{Cysam}]_{iii}$ представляют первую (i), вторую (ii) и третью (iii) реакционно-способные группы, которые выбирают из цистеина, MerPro и Cysam, HyP представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, HArg представляет гомоаргинин, PYA представляет 4-пентиноую кислоту, 3,3-DPA представляет 3,3-дифенилаланин, Cba представляет β -циклобутилаланин, 1Nal представляет 1-нафтилаланин, hGlu представляет гомоглутаминовую кислоту, Thi представляет 2-тиенилаланин, 4ThiAz представляет бета-(4-тиазолил)-аланин, His1Me представляет N1-метил-L-гистидин, His3Me представляет N3-метил-L-гистидин, 3Thi представляет 3-тиенилаланин, пальмитоил-Glu-LysN₃[PYA] представляет:



пальмитоил-Glu-LysN₃[PYA],



[K(PYA-(Palmitoyl-Glu-LysN₃))]

[K(PYA-(пальмитоил-Glu-LysN₃))] представляет Nle представляет норлейцин, MerPro представляет 3-меркаптопропионовую кислоту и Cysam представляет цистеамин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В одном конкретном варианте осуществления, EphA2 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, которая представляет собой:



где C_i, C_{ii}, и C_{iii} представляют первую (i), вторую (ii) и третью (iii) цистеиновые группы, HyP представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, HArg представляет гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В альтернативном конкретном варианте осуществления, EphA2 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, которая представляет собой:



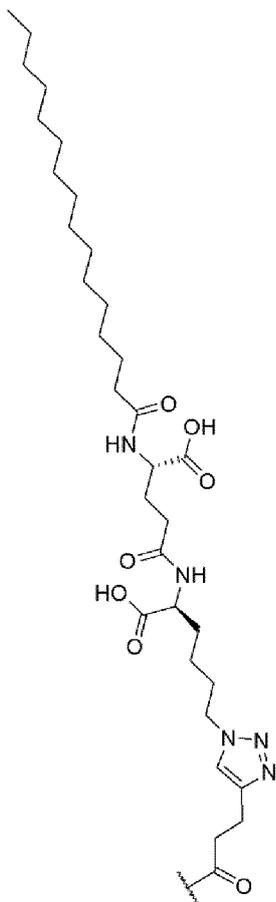
где C_i, C_{ii}, and C_{iii} представляют первую (i), вторую (ii) и третью (iii) цистеиновые группы, HyP представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, 1Nal представляет 1-нафтилаланин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления, EphA2 связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно включает N-концевые и/или C-концевые модификации и включает:

- A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 24) (именуемую в изобретении как BCY9594);
- [B-Ala]-[Sar₁₀]-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 24) (именуемую в изобретении как BCY6099);
- [PYA]-A-[HArg]-D-(SEQ NO: 24) (именуемую в изобретении как BCY11813);
- Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 24)-[K(PYA)] (именуемую в изобретении как BCY11814);
- Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 24)-K (именуемую в изобретении как BCY12734);
- [NMeAla]-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 24) (именуемую в изобретении как BCY13121);
- [Ac]-(SEQ ID NO: 24)-L[dH]G[dK] (именуемую в изобретении как BCY13125);
- [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-VGP-(SEQ ID NO: 25) (именуемую в изобретении как BCY8941);
- Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 26) (именуемую в изобретении как BCY11815);
- Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 27) (именуемую в изобретении как BCY11816);
- Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 28) (именуемую в изобретении как BCY11817);
- Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 29) (именуемую в изобретении как BCY12735);
- (Пальмитоил-Glu-LysN₃)[PYA]A[HArg]D-(SEQ ID NO: 29) (именуемую в изобретении как BCY14327);
- Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 30) (именуемую в изобретении как BCY12736);
- Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 31) (именуемую в изобретении как BCY12737);
- A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 32) (именуемую в изобретении как BCY12738);
- A-[HArg]-E-(SEQ ID NO: 32) (именуемую в изобретении как BCY12739);
- A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 33) (именуемую в изобретении как BCY12854);
- A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 34) (именуемую в изобретении как BCY12855);
- A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 35) (именуемую в изобретении как BCY12856);
- A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 35)-[dA] (именуемую в изобретении как BCY12857);
- (SEQ ID NO: 35)-[dA] (именуемую в изобретении как BCY12861);
- [NMeAla]-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 35) (именуемую в изобретении как BCY13122);
- [dA]-ED-(SEQ ID NO: 35) (именуемую в изобретении как BCY13126);
- [dA]-[dA]-D-(SEQ ID NO: 35) (именуемую в изобретении как BCY13127);
- AD-(SEQ ID NO: 35) (именуемую в изобретении как BCY13128);
- A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 36) (именуемую в изобретении как BCY12858);
- A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 37) (именуемую в изобретении как BCY12859);
- Ac-(SEQ ID NO: 37)-[dK] (именуемую в изобретении как BCY13120);
- A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 38) (именуемую в изобретении как BCY12862);
- A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 39) (именуемую в изобретении как BCY12863);
- [dA]-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 39)-[dA] (именуемую в изобретении как BCY12864);
- (SEQ ID NO: 40)-[dA] (именуемую в изобретении как BCY12865);

A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 41) (именуемую в изобретении как BCY12866);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 42) (именуемую в изобретении как BCY13116);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 43) (именуемую в изобретении как BCY13117);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 44) (именуемую в изобретении как BCY13118);
 [dA]-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 46)-[dA] (именуемую в изобретении как BCY13123);
 [d1Nal]-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 46)-[dA] (именуемую в изобретении как BCY13124);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 47) (именуемую в изобретении как BCY13130);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 48) (именуемую в изобретении как BCY13131);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 49) (именуемую в изобретении как BCY13132);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 50) (именуемую в изобретении как BCY13134);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 51) (именуемую в изобретении как BCY13135);
 (SEQ ID NO: 154)-[dK] (именуемую в изобретении как BCY13129);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 155) (именуемую в изобретении как BCY13133);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 156) (именуемую в изобретении как BCY13917);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 157) (именуемую в изобретении как BCY13918);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 158) (именуемую в изобретении как BCY13919);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 159) (именуемую в изобретении как BCY13920);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 160) (именуемую в изобретении как BCY13922);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 161) (именуемую в изобретении как BCY13923);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 162) (именуемую в изобретении как BCY14047);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 163) (именуемую в изобретении как BCY14048); and
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 164) (именуемую в изобретении как BCY14313);

где PYA представляет 4-пентиновую кислоту, B-Ala представляет бета-аланин, Sar₁₀ представляет 10 звеньев саркозина, HArg представляет гомоаргинин, NMeAla представляет N-метил-аланин, 1Nal представляет 1-нафтилаланин, пальмитоил-Glu-LysN₃[PYA] представляет:



пальмитоил-Glu-LysN3[PYA],

или их фармацевтически приемлемую соль.

В одном конкретном варианте осуществления, EphA2 связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно включает N-концевые и/или C-концевые модификации и включает:

A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 24) (именуемую в изобретении как BCY9594);

где HArg представляет гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В альтернативном конкретном варианте осуществления, EphA2 связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно включает N-концевые и/или C-концевые модификации и включает:

A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 44) (именуемую в изобретении как BCY13118);

где HArg представляет гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В альтернативном варианте осуществления, компонент, присутствующий на раковой клетке, представляет собой PD-L1.

Лиганд 1 белка запрограммированной гибели клеток 1 (PD-L1) представляет собой состоящий из 290 аминокислот трансмембранный белок I типа, кодируемый геном CD274 на хромосоме 19 мыши и хромосоме 9 человека. Экспрессия PD-L1 вовлечена в процесс уклонения от иммунных ответов, связанных с хронической инфекцией, например, с хронической вирусной инфекцией (включая, помимо прочих, HIV, HBV, HCV и HTLV), с

хронической бактериальной инфекцией (включая, например, помимо прочих, *Helicobacter pylori*) и с хронической паразитарной инфекцией (включая, например, *Schistosoma mansoni*). Экспрессия PD-L1 была обнаружена в ряде тканей и типов клеток, в том числе в Т-клетках, В-клетках, макрофагах, дендритных клетках и негемопоэтических клетках, включающих эндотелиальные клетки, гепатоциты, мышечные клетки и клетки плаценты.

Экспрессия PD-L1 также вовлечена в подавление противоопухолевой иммунной активности. Опухоли экспрессируют антигены, которые могут распознаваться Т-клетками организма-хозяина, но иммунный клиренс опухолей происходит редко. Частично этот сбой обусловлен подавлением иммунного ответа микросредой опухоли. Экспрессия PD-L1 на многих опухолях является компонентом этой подавляющей среды и действует совместно с другими подавляющими иммунитет сигналами. Экспрессия PD-L1 была выявлена *in situ* на самых разнообразных солидных опухолях, включая опухоли молочной железы, легких, толстой кишки, яичников, меланому, опухоли мочевого пузыря, печени, слюнной железы, желудка, глиомы, опухоли щитовидной железы, эпителия тимуса, головы и шеи (Brown JA et al. 2003 *Immunol.* 170:1257-66; Dong H et al. 2002 *Nat. Med.* 8:793-800; Hatanishi J, et al. 2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:3360-65; Strome SE et al. 2003 *Cancer Res.* 63:6501-5; Inman BA et al. 2007 *Cancer* 109:1499-505; Konishi J et al. 2004 *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100; Nakanishi J et al. 2007 *Cancer Immunol. Immunother.* 56:1173-82; Nomi T et al. 2007 *Clin. Cancer Res.* 13:2151-57; Thompson RH et al. 2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 17174-79; Wu C et al. 2006 *Acta Histochem.* 108:19-24). Кроме того, экспрессия рецептора для PD-L1, белка 1 запрограммированной гибели клеток (называемого также PD-1 и CD279) активируется на противоопухолевых эффекторных лимфоцитах, и это также способствует подавлению противоопухолевого иммунного ответа (Blank C et al. 2003 *Immunol.* 171:4574-81). И очень важно отметить, что исследования по выявлению взаимосвязи между экспрессией PD-L1 на опухолях и исходом заболевания показывают, что экспрессия PD-L1 сильно коррелирует с неблагоприятным прогнозом при раке почек, яичников, мочевого пузыря, молочных желез, желудка и поджелудочной железы (Hatanishi J et al. 2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:3360-65; Inman BA et al. 2007 *Cancer* 109:1499-505; Konishi J et al. 2004 *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100; Nakanishi J et al. 2007 *Cancer Immunol. Immunother.* 56:1173-82; Nomi T et al. 2007 *Clin. Cancer Res.* 13:2151-57; Thompson RH et al. 2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17174-79; Wu C et al. 2006 *Acta Histochem.* 108:19-24). Кроме того, эти исследования дают основание предположить, что более высокие уровни экспрессии PD-L1 на опухолях могут способствовать стадии развития опухоли и ее инвазии в более глубокие тканевые структуры.

Сигнальный путь PD-1 также может играть определенную роль при гематологических злокачественных опухолях. PD-L1 экспрессируется на клетках множественной миеломы, но не на нормальных плазматических клетках (Liu J et al. 2007 *Blood* 110:296-304). PD-L1 экспрессируется при некоторых первичных Т-клеточных лимфомах, в частности, при анапластических крупноклеточных Т-лимфомах (Brown JA et al, 2003 *Immunol.* 170:1257-66). PD-1 экспрессируется в высокой степени на Т-клетках

ангиоиммунобластных лимфом, а PD-L1 экспрессируется на ассоциированной сети фолликулярных дендритных клеток (Dorfman DM et al. 2006 Am. J. Surg. Pathol. 30:802-10). При нодулярной лимфоме Ходжкина с лимфоцитарным преобладанием, Т-клетки, ассоциированные с лимфоцитарными или гистиоцитарными (L&H) клетками, экспрессируют PD-1. Результаты микроматричного анализа с использованием считывания генов, индуцированных лигированием PD-1, позволяют предположить, что ассоциированные с опухолью Т-клетки отвечают на сигналы PD-1 *in situ* при лимфоме Ходжкина (Chemnitz JM et al. 2007 Blood 110:3226-33). PD-1 и PD-L1 экспрессируются на CD4 Т-клетках при Т-клеточном лейкозе и лимфоме, опосредованных онкогенным вирусом HTLV-1 (Shimauchi T et al. 2007 Int. J. Cancer 121: 2585-90). Эти опухолевые клетки имеют пониженный ответ на сигналы рецептора Т-клетки (TCR).

Исследования на животных моделях показывают, что PD-L1 на опухолях ингибирует активацию Т-клеток и лизис опухолевых клеток и, в некоторых случаях, приводит к повышению опухолеспецифической гибели Т-клеток (Dong H et al. 2002 Nat. Med. 8:793-800; Hirano F et al. 2005 Cancer Res. 65:1089-96). Ассоциированные с опухолью антигенпредставляющие клетки (APC) также могут использовать путь PD-1:PD-L1 для регулирования противоопухолевых Т-клеточных ответов. Экспрессия PD-L1 в популяции ассоциированных с опухолью миелоидных дендритных клеток (DC) активируется факторами среды, окружающей опухоль (Curiel TJ et al. 2003 Nat. Med. 9:562-67). Плазмацитоидные дендритные клетки (DCs) в дренирующей опухоли лимфатическом узле при меланоме B16 экспрессируют индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO), которая в высокой степени активирует супрессорную активность регуляторных Т-клеток. Супрессорная активность регуляторных Т-клеток, обусловленная воздействием IDO, требовала контакта клеток с IDO-экспрессирующими дендритными клетками (DC) (Sharma MD et al. 2007 Clin. Invest. 117:2570-82).

В одном варианте осуществления, первый пептидный лиганд включает PD-L1 связывающий бициклический пептидный лиганд.

Подходящие примеры PD-L1 связывающих бициклических пептидных лигандов раскрыты в патентных документах WO 2020/128526 и WO 2020/128527, пептиды из которых включены в настоящее изобретение путем ссылки на них.

В одном варианте осуществления, PD-L1 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из:

- C_iSAGWLTMC_{ii}QKLHLC_{iii} (SEQ ID NO: 52);
- C_iSAGWLTMC_{ii}Q[K(PYA)]LHLC_{iii} (SEQ ID NO: 53);
- C_iSKGWLTMC_{ii}Q[K(Ac)]LHLC_{iii} (SEQ ID NO: 54);
- C_iSAGWLTMC_{ii}Q[K(Ac)]LHLC_{iii} (SEQ ID NO: 55);
- C_iSAGWLTMC_{ii}K[K(Ac)]LHLC_{iii} (SEQ ID NO: 56);
- C_iSAGWLTMC_{ii}Q[K(Ac)]LKLC_{iii} (SEQ ID NO: 57);
- C_iSAGWLTMC_{ii}Q[HArg]LHLC_{iii} (SEQ ID NO: 58); и
- C_iSAGWLTMC_{ii}[HArg]QLNLC_{iii} (SEQ ID NO: 59);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, PYA представляет 4-пентиноую кислоту и HArg представляет гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления, PD-L1 связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно включает N-концевые и/или C-концевые модификации и включает:

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-SDK-(SEQ ID NO: 52) (именуемую в изобретении как BСУ10043);

Ac-D-[HArg]-(SEQ ID NO: 52)-PSH (именуемую в изобретении как BСУ11865);

Ac-SDK-(SEQ ID NO: 53) (именуемую в изобретении как BСУ11013);

Ac-SDK-(SEQ ID NO: 53)-PSH (именуемую в изобретении как BСУ10861);

Ac-D-[HArg]-(SEQ ID NO: 54)-PSH (именуемую в изобретении как BСУ11866);

Ac-D-[HArg]-(SEQ ID NO: 55)-PSH (именуемую в изобретении как BСУ11867);

Ac-D-[HArg]-(SEQ ID NO: 56)-PSH (именуемую в изобретении как BСУ11868);

Ac-D-[HArg]-(SEQ ID NO: 57)-PSH (именуемую в изобретении как BСУ11869);

Ac-SD-[HArg]-(SEQ ID NO: 58)-PSHK (именуемую в изобретении как BСУ12479); и

Ac-SD-[HArg]-(SEQ ID NO: 59)-PSHK (именуемую в изобретении как BСУ12477);

где PYA представляет 4-пентиноую кислоту, B-Ala представляет бета-аланин, Sar₁₀ представляет 10 звеньев саркозина, и HArg представляет гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В альтернативном варианте осуществления, компонент, присутствующий на раковой клетке, представляет собой простатоспецифический мембранный антиген (PSMA).

Простатоспецифический мембранный антиген (PSMA) (также известный как глутаматкарбоксипептидаза II (GCP II), N-ацетил-L-аспартил-L-глутаматпептидаза I (NAALADase I) и NAAG пептидаза) представляет собой фермент, который у человека кодируется геном FOLH1 (фолатгидролазой 1). GCP II человека содержит 750 аминокислот и имеет молекулярную массу приблизительно 84 кДа.

PSMA человека экспрессируется на высоком уровне в предстательной железе, примерно на уровне в сто раз выше, чем в большинстве других тканей. При некоторых формах рака предстательной железы, PSMA является вторым по повышению уровня экспрессии генным продуктом с превышением в 8-12 раз по сравнению с уровнем в доброкачественных клетках предстательной железы. В связи с такой высокой экспрессией, в настоящее время проводятся исследования по возможности применения PSMA в качестве потенциального биомаркера при терапии и визуализации некоторых видов рака. При раке простаты человека, более высокая экспрессия PSMA в опухоли ассоциируется с более быстрым прогрессированием и большим процентом пациентов, страдающих рецидивами.

В одном варианте осуществления, первый пептидный лиганд включает PSMA связывающий бициклический пептидный лиганд.

Подходящие примеры PSMA связывающих бициклических пептидных лигандов раскрыты в патентных документах WO 2019/243455 и WO 2020/120980, пептиды из которых включены в настоящее изобретение путем ссылки на них

Вторые пептидные лиганды

Используемый в изобретении термин "иммунная клетка" включают любую клетку в иммунной системе. Подходящие примеры включают лейкоциты, такие как лимфоциты (например, Т-лимфоциты или Т-клетки, В-клетки или естественные клетки-киллеры). В одном варианте осуществления, Т-клетка представляет собой CD8 или CD4. В дополнительном варианте осуществления, Т-клетка представляет собой CD8. Другие примеры иммунных клеток включают дендритные клетки, фолликулярные дендритные клетки и гранулоциты.

В одном варианте осуществления, компонент, присутствующий на иммунной клетке, представляет собой CD137.

CD137 является представителем семейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNF). Могут использоваться его альтернативные названия, например, представитель 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFRSF9), 4-1BB и рецептор, индуцированный активацией лимфоцитов (ILA). CD137 может экспрессироваться активированными Т-клетками, но в большей степени на CD8+ Т-клетках, чем на CD4+ Т-клетках. Кроме того, экспрессия CD137 обнаруживается на дендритных клетках, фолликулярных дендритных клетках, естественных клетках-киллерах, гранулоцитах и клетках стенок кровеносных сосудов в местах воспаления. Одной из характеристик активности CD137 является его костимулирующая активность в отношении активированных Т-клеток. Сшивание CD137 усиливает пролиферацию Т-клеток, секрецию IL-2, выживаемость и цитолитическую активность. Кроме того, рецептор может повышать иммунную активность для удаления опухолей у мышей.

CD137 представляет собой костимулирующий рецептор Т-клеток, индуцируемый при активации рецепторов Т-клеток (TCR) (Nam et al., *Curr. Cancer Drug Targets*, 5:357-363 (2005); Waits et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 23:23-68 (2005)). Помимо его экспрессии на активированных CD4+ и CD8+ Т-клетках, CD137 также экспрессируется на CD4+ CD25+ регуляторных Т-клетках, естественных клетках-киллерах (NK) и NK-Т-клетках, моноцитах, нейтрофилах и дендритных клетках. Его природный лиганд, CD137L, был описан на антигенпрезентирующих клетках, включая В-клетки, моноциты/макрофаги и дендритные клетки (Watts et al. *Annu. Rev. Immunol*, 23:23-68 (2005)). При взаимодействии со своим лигандом, CD137 вызывает повышение TCR-индуцированной пролиферации Т-клеток, продукции цитокинов, функционального созревания и увеличение выживаемости CD8+ Т-клеток (Nam et al, *Curr. Cancer Drug Targets*, 5:357-363 (2005), Watts et al., *Annu. Rev. Immunol*, 23:23-68 (2005)).

Передача сигналов через CD137 при воздействии или CD137L, или агонистических моноклональных антител (mAb) против CD137, приводит к повышению TCR-индуцированной пролиферации Т-клеток, продукции цитокинов и функционального

созревания, и к пролонгированной выживаемости CD8⁺ Т клеток. Эти эффекты являются результатом: (1) активации сигнальных путей NF-κB, c-Jun NH2-концевой киназы/стресс-активируемой протеинкиназы (JNK/SAPK) и митоген-активируемой протеинкиназы p38 (MAPK), и (2) регуляции антиапоптотической экспрессии и экспрессии генов, связанных с клеточным циклом.

Эксперименты, проведенные на мышах с дефицитом обоих рецепторов CD137 и CD137L, дополнительно продемонстрировали важность костимуляции CD137 для формирования полностью компетентного Т-клеточного ответа.

НК-клетки, активируемые IL-2 и IL-15, экспрессируют CD137, и лигирование CD137 агонистическими mAb стимулирует пролиферацию НК-клеток и секрецию IFN-γ, но не их цитолитическую активность.

Кроме того, НК-клетки, стимулированные с помощью CD137, способствуют размножению активированных Т-клеток *in vitro*.

Было показано, что агонистические mAb против CD137, в соответствии с их костимулирующей функцией, способствуют отторжению сердечных и кожных аллотрансплантатов, уничтожают сформировавшиеся опухоли, расширяют первичные противовирусные ответы CD8⁺ Т-клеток и повышают цитолитический потенциал Т-клеток. Эти исследования подтверждают мнение о том, что сигнальный путь CD137 способствует функционированию Т-клеток, что может повышать иммунитет против опухолей и инфекции.

В одном варианте осуществления, два или более вторых пептидных лигандов включают CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд.

Подходящие примеры CD137 связывающих бициклических пептидных лигандов раскрыты в патентном документе WO 2019/025811, пептиды из которого включены в настоящее изобретение путем ссылки на него.

В одном варианте осуществления, CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность:

C_iIEEGQYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 5);

C_i[tBuAla]PE[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 6);

C_iIEEGQYC_{ii}F[D-Ala]DPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 7);

C_i[tBuAla]PK[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 8);

C_i[tBuAla]PE[D-Lys]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 9);

C_i[tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 10);

C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 11);

C_iIEE[D-Lys(PYA)]QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 12);

[dC_i][dI][dE][dE][K(PYA)][dQ][dY][dC_{ii}][dF][dA][dD][dP][dY][dNle][dC_{iii}] (SEQ ID NO: 13);

C_i[tBuAla]PE[dK]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 60);

C_iIEE[dK(PYA)]QYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 61);

C_i[tBuAla]EE(dK)PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 62);

$C_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 63);
 $C_i[tBuAla]EE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 64);
 $C_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FANPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 65);
 $C_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FAEPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 66);
 $C_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FA[Aad]PY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 67);
 $C_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FAQPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 68);
 $C_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle][Cysam]_{iii}$ (SEQ ID NO: 69);
 $[MerPro]_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 70; именуемую в изобретении как BCY12353);

$[MerPro]_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle][Cysam]_{iii}$ (SEQ ID NO: 71; именуемую в изобретении как BCY12354);

$C_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 72);
 $C_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 73);
 $C_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 74; именуемую в изобретении как BCY12372);

$C_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FAD[NMeAla]Y[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 75);
 $C_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FAD[NMeDAla]Y[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 76);
 $C_i[tBuAla]P[K(PYA)][dA]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 77);
 $C_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 78);
 $C_i[tBuAla]PE[dK(Me, PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 79);
 $C_i[tBuAla]PE[dK(Me, PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 80); и
 $[MerPro]_i[tBuAla]EE[dK]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 81; именуемую в изобретении как BCY13137);

где $[MerPro]_i$, C_i , C_{ii} , C_{iii} и $[Cysam]_{iii}$ представляют первую (i), вторую (ii) и третью (iii) реакционно-способные группы, которые выбирают из цистеина, MerPro и Cysam, Nle представляет норлейцин, tBuAla представляет третбутил-аланин, PYA представляет 4-пентиноую кислоту, Aad представляет альфа-L-аминоадипиновую кислоту, MerPro представляет 3-меркаптопропионовую кислоту и Cysam представляет цистеамин, NMeAla представляет N-метил-аланин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления, CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность:

$C_iIEEGQYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 5);
 $C_i[tBuAla]PE[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 6);
 $C_iIEEGQYC_{ii}F[D-Ala]DPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 7);
 $C_i[tBuAla]PK[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 8);
 $C_i[tBuAla]PE[D-Lys]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 9);
 $C_i[tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 10);
 $C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (SEQ ID NO: 11);
 $C_iIEE[D-Lys(PYA)]QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}$ (SEQ ID NO: 12); and

[dC_i][dI][dE][dE][K(PYA)][dQ][dY][dC_{ii}][dF][dA][dD][dP][dY][dNle][dC_{iii}] (SEQ ID NO: 13);

где C_i, C_{ii} and C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, Nle представляет норлейцин, tBuAla представляет третбутил-аланин, PYA представляет 4-пентиноевую кислоту, или их фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте осуществления, бициклический пептидный лиганд не является аминокислотной последовательностью [dC_i][dI][dE][dE][K(PYA)][dQ][dY][dC_{ii}][dF][dA][dD][dP][dY][dNle][dC_{iii}] (SEQ ID NO: 13), которая не продемонстрировала связывание с CD137.

В одном конкретном варианте осуществления, который следует упомянуть, CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность:

C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 11);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, tBuAla представляет третбутил-аланин, PYA представляет 4-пентиноевую кислоту, Nle представляет норлейцин, или их фармацевтически приемлемую соль.

В дополнительном варианте осуществления, CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд включает N- и C-концевые модификации и включает:

Ac-A-(SEQ ID NO: 5)-Dар (именуемую в изобретении как BCY7732);

Ac-A-(SEQ ID NO: 5)-Dар(PYA) (именуемую в изобретении как BCY7741);

Ac-(SEQ ID NO: 6)-Dар (именуемой в изобретении как BCY9172);

Ac-(SEQ ID NO: 6)-Dар(PYA) (именуемую в изобретении как BCY11014);

Ac-A-(SEQ ID NO: 7)-Dар (именуемую в изобретении как BCY8045);

Ac-(SEQ ID NO: 8)-A (именуемую в изобретении как BCY8919);

Ac-(SEQ ID NO: 9)-A (именуемую в изобретении как BCY8920);

Ac-(SEQ ID NO: 10)-A (именуемую в изобретении как BCY8927);

Ac-(SEQ ID NO: 11)-A (именуемую в изобретении как BCY8928);

(SEQ ID NO: 11)-A (именуемую в изобретении как BCY14601);

Ac-A-(SEQ ID NO: 12)-A (именуемую в изобретении как BCY7744);

Ac-[dA]-(SEQ ID NO: 13)-[dA]-NH₂ (именуемую в изобретении как BCY11506);

Ac-(SEQ ID NO: 60)-Dар(PYA) (именуемую в изобретении как BCY11144);

Ac-A-(SEQ ID NO: 61)-K (именуемую в изобретении как BCY11613);

Ac-(SEQ ID NO: 62)-Dар(PYA) (именуемую в изобретении как BCY12023);

Ac-(SEQ ID NO: 63) (именуемую в изобретении как BCY12149);

Ac-(SEQ ID NO: 64) (именуемую в изобретении как BCY12143);

Ac-(SEQ ID NO: 65) (именуемую в изобретении как BCY12147);

Ac-(SEQ ID NO: 66) (именуемую в изобретении как BCY12145);

Ac-(SEQ ID NO: 67) (именуемую в изобретении как BCY12146);

Ac-(SEQ ID NO: 68) (именуемую в изобретении как BCY12150);

Ac-(SEQ ID NO: 69) (именуемую в изобретении как BCY12352);

Ac-(SEQ ID NO: 72)-[1,2-диаминоэтан] (именуемую в изобретении как BCY12358); [Palmitic Acid]-[yGlu]-[yGlu]-(SEQ ID NO: 73) (именуемую в изобретении как BCY12360);

Ac-(SEQ ID NO: 75) (именуемую в изобретении как BCY12381);

Ac-(SEQ ID NO: 76) (именуемую в изобретении как BCY12382);

Ac-(SEQ ID NO: 77)-К (именуемую в изобретении как BCY12357);

Ac-(SEQ ID NO: 78)-[dA] (именуемую в изобретении как BCY13095);

[Ac]-(SEQ ID NO: 78)-К (именуемую в изобретении как BCY13389);

Ac-(SEQ ID NO: 79)-[dA] (именуемую в изобретении как BCY13096); and

Ac-(SEQ ID NO: 80) (именуемую в изобретении как BCY13097); где Ac представляет ацетильную группу, Дар представляет диаминопропионовую кислоту и РYA представляет 4-пентиноевую кислоту, или их фармацевтически приемлемую соль.

В еще одном варианте осуществления, CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд включает N- и C-концевые модификации и включает:

Ac-A-(SEQ ID NO: 5)-Дар (именуемую в изобретении как BCY7732);

Ac-A-(SEQ ID NO: 5)-Дар(PYA) (именуемую в изобретении как BCY7741);

Ac-(SEQ ID NO: 6)-Дар (именуемую в изобретении как BCY9172);

Ac-(SEQ ID NO: 6)-Дар(PYA) (именуемую в изобретении как BCY11014);

Ac-A-(SEQ ID NO: 7)-Дар (именуемую в изобретении как BCY8045);

Ac-(SEQ ID NO: 8)-A (именуемую в изобретении как BCY8919);

Ac-(SEQ ID NO: 9)-A (именуемую в изобретении как BCY8920);

Ac-(SEQ ID NO: 10)-A (именуемую в изобретении как BCY8927);

Ac-(SEQ ID NO: 11)-A (именуемую в изобретении как BCY8928);

Ac-A-(SEQ ID NO: 12)-A (именуемую в изобретении как BCY7744); и

Ac-[dA]-(SEQ ID NO: 13)-[dA]-NH₂ (именуемую в изобретении как BCY11506);

где Ac представляет ацетильную группу, Дар представляет диаминопропионовую кислоту и РYA представляет 4-пентиноевую кислоту, или их фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте осуществления, бициклический пептидный лиганд не является BCY11506, который не продемонстрировал связывание с CD137.

В дополнительном варианте осуществления, который следует упомянуть, CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд включает N- и C-концевые модификации и включает:

Ac-(SEQ ID NO: 11)-A (именуемую в изобретении как BCY8928);

где Ac представляет ацетильную группу, или их фармацевтически приемлемую соль.

В альтернативном варианте осуществления, компонент, присутствующий на иммунной клетке, представляет собой OX40.

Рецептор OX40 (также известный как представитель 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF4), а также известный как рецептор CD134), является представителем TNFR- суперсемейства рецепторов, который не экспрессируется

конститутивно на дремлющих наивных Т-клетках, в отличие от CD28. OX40 представляет собой вторичную ко-стимулирующую молекулу иммунной контрольной точки, экспрессируемую через период времени от 24 до 72 часов после активации; его лиганд, OX40L, также не экспрессируется на дремлющих антиген представляющих клетках, но экспрессируется после их активации. Экспрессия OX40 зависит от полной активации Т-клеток; в отсутствие CD28, экспрессия OX40 замедляется со снижением уровней в четыре раза.

OX40 не оказывает влияния на пролиферативные способности CD4⁺ клеток в течение первых трех дней, однако, по истечении этого времени, пролиферация начинает замедляться, и клетки погибают с огромной скоростью вследствие их неспособности поддерживать высокий уровень активности протеинкиназы В (PKB) и экспрессии Bcl-2, Bcl-XL и сурвивина. OX40L связывается с рецепторами OX40 на Т-клетках, предотвращая их гибель и последовательно увеличивая продукцию цитокина. OX40 играет особую важную роль в поддержании иммунного ответа по истечении первых нескольких дней и в дальнейшем вторичного иммунного ответа вследствие его способности повышать способность к выживанию. OX40 также играет решающую роль в протекании как Th1-опосредованных, так и Th2-опосредованных реакций *in vivo*.

OX40 связывает TRAF2, TRAF3 и TRAF5, а также PI3K, по неизвестному механизму. TRAF2 необходим для выживания через сигнальный путь NF-κB и генерации клеток памяти, тогда как TRAF5, по-видимому, играет более негативную или модулирующую роль, так как генные нокауты имеют более высокие уровни цитокинов и являются более восприимчивыми к Th2-опосредованному воспалению. TRAF3 может играть существенную роль в OX40-опосредованной сигнальной трансдукции. CTLA-4 подавляется после взаимодействия с OX40 *in vivo*, и OX40-специфичный TRAF3 DN дефект частично устранялся путем блокады CTLA-4 *in vivo*. TRAF3 может быть связан с OX40-опосредованной экспансией и выживанием Т-клеток памяти и может указывать на понижающую регуляцию CTLA-4 как на возможный элемент регулирования с целью усиления экспансии предшественников Т-клеток по сигнальному пути OX40.

В одном варианте осуществления, OX40 представляет собой OX40 млекопитающего. В дополнительном варианте осуществления, OX40 млекопитающего представляет собой OX40 человека (hOX40).

Пептиды OX40 будут в основном (но не исключительно) использоваться для агонистической активации OX40, и, следовательно, иммунных клеток с целью предотвращения, подавления или лечения рака, такого как злокачественные новообразования у человека на ранней или поздней стадиях, которые включают солидные опухоли, такие как немелкоклеточные карциномы легких (NSCLC), виды рака молочной железы, включая виды трижды негативного рака молочной железы (TNBC), виды рака яичников, виды рака предстательной железы, виды рака мочевого пузыря, уротелиальные карциномы, виды колоректального рака, раковые образования головы и шеи, плоскоклеточный рак области головы и шеи (SCCHN), меланомы, виды рака

поджелудочной железы и другие солидные опухоли на поздней стадии, когда подавление иммунного ответа блокирует противоопухолевый иммунитет. Другие солидные и несоллидные злокачественные новообразования, в случае которых будут использоваться пептиды OX40 в качестве терапевтического средства, включают, но этим не ограничивая, В-клеточную лимфому, в том числе низкодифференцированную/фолликулярную неходжкинскую лимфому и острый миелолейкоз (AML).

В одном варианте осуществления, два или более вторых пептидных лиганда включают OX40 связывающий бициклический пептидный лиганд.

Подходящие примеры OX40 связывающих бициклических пептидных лигандов раскрыты в патентном документе International Patent Application No. PCT/GB2020/051144, пептиды из которого включены в настоящее изобретение путем ссылки на него.

В одном варианте осуществления, OX40 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из:

- C_iILWC_{ii}LPEPHDEC_{iii} (SEQ ID NO: 82);
- C_iA^{K/S}^{N/E}C_{ii}DPFWYQFYC_{iii} (SEQ ID NO: 83);
- C_iAKNC_{ii}DPFWYQFYC_{iii} (SEQ ID NO: 84);
- C_iASEC_{ii}DPFWYQFYC_{iii} (SEQ ID NO: 85);
- C_i^{L/N}YSPC_{ii}WHPLN^{D/K}C_{iii} (SEQ ID NO: 86);
- C_iLYSPC_{ii}WHPLNDC_{iii} (SEQ ID NO: 87);
- C_iNYSPC_{ii}WHPLNKC_{iii} (SEQ ID NO: 88);
- C_iWYEYDC_{ii}NNWERC_{iii} (SEQ ID NO: 89);
- C_iVIRYSPC_{ii}SHYLNC_{iii} (SEQ ID NO: 90);
- C_iDYSPWWHPC_{ii}NHIC_{iii} (SEQ ID NO: 91);
- C_iDAC_{ii}LYPDYYVC_{iii} (SEQ ID NO: 92);
- C_iRLWC_{ii}IPAPTDDC_{iii} (SEQ ID NO: 93);
- C_iTMWC_{ii}IPAKGDWC_{iii} (SEQ ID NO: 94);
- C_iMLWC_{ii}LPAPTDEC_{iii} (SEQ ID NO: 95);
- C_iILWC_{ii}LPEPPDEC_{iii} (SEQ ID NO: 96);
- C_iLLWC_{ii}IPNPDDNC_{iii} (SEQ ID NO: 97);
- C_iWLWC_{ii}VPNPDDTC_{iii} (SEQ ID NO: 98);
- C_iVLWC_{ii}TPYPGDDC_{iii} (SEQ ID NO: 99);
- C_iALWC_{ii}IPDPQDEC_{iii} (SEQ ID NO: 100);
- C_iTLWC_{ii}IPDASDSC_{iii} (SEQ ID NO: 101);
- C_iQLWC_{ii}IPDADDDC_{iii} (SEQ ID NO: 102);
- C_iQLWC_{ii}VPEPGDSC_{iii} (SEQ ID NO: 103);
- C_iALWC_{ii}IPEESDDC_{iii} (SEQ ID NO: 104);
- C_iVLWC_{ii}IPEPQDKC_{iii} (SEQ ID NO: 105);
- C_iTLWC_{ii}IPDPDDSC_{iii} (SEQ ID NO: 106);
- C_iRLWC_{ii}VPKAEDYC_{iii} (SEQ ID NO: 107);
- C_iTKPC_{ii}IAYYNQSC_{iii} (SEQ ID NO: 108);

C_iMNPC_{ii}IAYYQQEC_{iii} (SEQ ID NO: 109);
 C_iTNAC_{ii}VAYYHQAC_{iii} (SEQ ID NO: 110);
 C_iSDPC_{ii}ISYYNQAC_{iii} (SEQ ID NO: 111);
 C_iDPPC_{ii}DPFWYAFYC_{iii} (SEQ ID NO: 112);
 C_iPDDC_{ii}DPFWYNFYC_{iii} (SEQ ID NO: 113);
 C_iRYSPC_{ii}YHPHNC_{iii} (SEQ ID NO: 114);
 C_iLYSPC_{ii}NHPLNSC_{iii} (SEQ ID NO: 115);
 C_iEDNYC_{ii}FMWTPYC_{iii} (SEQ ID NO: 116);
 C_iLDSPC_{ii}WHPLNDC_{iii} (SEQ ID NO: 117);
 C_iRFSPC_{ii}SHPLNQC_{iii} (SEQ ID NO: 118);
 C_iKYSPC_{ii}WHPLNLC_{iii} (SEQ ID NO: 119);
 C_iRYSPC_{ii}WHPLNNC_{iii} (SEQ ID NO: 120);
 C_iEWISC_{ii}PGEPHRWWC_{iii} (SEQ ID NO: 121);
 C_iVWEAC_{ii}PEHPDQWWC_{iii} (SEQ ID NO: 122);
 C_iSTWHC_{ii}FWNLQEGKC_{iii} (SEQ ID NO: 123);
 C_iEWKAC_{ii}EHDRERWWC_{iii} (SEQ ID NO: 124);
 C_iRTWQC_{ii}FYEWQNGHC_{iii} (SEQ ID NO: 125);
 C_iKTWDC_{ii}FWASQVSEC_{iii} (SEQ ID NO: 126);
 C_iSTWQC_{ii}FYDLQEGHC_{iii} (SEQ ID NO: 127);
 C_iTTWEC_{ii}FYDLQEGHC_{iii} (SEQ ID NO: 128);
 C_iETWEC_{ii}FWRLQAGEC_{iii} (SEQ ID NO: 129);
 C_iRTWQC_{ii}FWDLQEGLC_{iii} (SEQ ID NO: 130);
 C_iSTWQC_{ii}FWDSQLGAC_{iii} (SEQ ID NO: 131);
 C_iETWEC_{ii}FWEWQVGSC_{iii} (SEQ ID NO: 132);
 C_iTTWEC_{ii}FWDLQEGLC_{iii} (SEQ ID NO: 133);
 C_iHTWDC_{ii}FYQWQDGHC_{iii} (SEQ ID NO: 134);
 C_iTTWEC_{ii}FYSLQDGHC_{iii} (SEQ ID NO: 135);
 C_iNEDMYC_{ii}FMWMEC_{iii} (SEQ ID NO: 136);
 C_iLYEYDC_{ii}YTWRRRC_{iii} (SEQ ID NO: 137);
 C_iRYEYDC_{ii}HTWQRC_{iii} (SEQ ID NO: 138);
 C_iWYEYDC_{ii}TTWERC_{iii} (SEQ ID NO: 139);
 C_iWYEYDC_{ii}RTWTRC_{iii} (SEQ ID NO: 140);
 C_iLYEYDC_{ii}HTWTRC_{iii} (SEQ ID NO: 141);
 C_iWYEYDC_{ii}RTWTFC_{iii} (SEQ ID NO: 142);
 C_iHGGVWC_{ii}IPNINDSC_{iii} (SEQ ID NO: 143);
 C_iDSPVRC_{ii}YWNTQKGC_{iii} (SEQ ID NO: 144);
 C_iGSPVPC_{ii}YWNTRKGC_{iii} (SEQ ID NO: 145);
 C_iAPFEFNC_{ii}YTWRPC_{iii} (SEQ ID NO: 146);
 C_iRVL YSPC_{ii}YHWLNC_{iii} (SEQ ID NO: 147);
 C_iSIMYSPC_{ii}EHPHNHC_{iii} (SEQ ID NO: 148);

C_iDKWEPDHL C_{ii}YWWC_{iii} (SEQ ID NO: 149);
 C_iDAWPETHVC_{ii}YWWC_{iii} (SEQ ID NO: 150);
 C_iDEYTPHLC_{ii}YWWC_{iii} (SEQ ID NO: 151);
 C_iWINYSISPC_{ii}YVGEC_{iii} (SEQ ID NO: 152); и
 C_iRYEYPEHLC_{ii}YTWQC_{iii} (SEQ ID NO: 153);

такой как:

C_iLYSPC_{ii}WHPLNDC_{iii} (SEQ ID NO: 87);

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

В дополнительном варианте осуществления, OX40 связывающий бициклический пептидный лиганд дополнительно включает N- и/или C-концевые модификации и включает аминокислотную последовательность, выбранную из:

A-(SEQ ID NO: 82)-A-[Sar6]-[KBiot] (именуемой в изобретении как BCY10551);
 A-(SEQ ID NO: 82)-A (именуемой в изобретении как BCY10371);
 A-(SEQ ID NO: 84)-A-[Sar6]-[KBiot] (именуемой в изобретении как BCY10552);
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 84)-A (именуемой в изобретении как BCY10479);
 A-(SEQ ID NO: 84)-A (именуемой в изобретении как BCY10378);
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 85)-A (именуемой в изобретении как BCY11371);
 A-(SEQ ID NO: 85)-A (именуемой в изобретении как BCY10743);
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 87)-A (именуемой в изобретении как BCY10482);
 A-(SEQ ID NO: 87)-A-[Sar6]-[KBiot] (именуемой в изобретении как BCY10549);
 A-(SEQ ID NO: 87)-A-K(Pya) (именуемой в изобретении как BCY11607);
 Ac-A-(SEQ ID NO: 87)-A-K(Pya) (именуемой в изобретении как BCY12708);
 A-(SEQ ID NO: 87)-A (именуемой в изобретении как BCY10351);
 A-(SEQ ID NO: 88)-A-[Sar6]-[KBiot] (именуемой в изобретении как BCY11501);
 A-(SEQ ID NO: 88)-A (именуемой в изобретении как BCY10729);
 A-(SEQ ID NO: 89)-A-[Sar6]-[KBiot] (именуемой в изобретении как BCY10550);
 A-(SEQ ID NO: 89)-A (именуемой в изобретении как BCY10361);
 A-(SEQ ID NO: 90)-A-[Sar6]-[KBiot] (именуемой в изобретении как BCY10794);
 A-(SEQ ID NO: 90)-A (именуемой в изобретении как BCY10349);
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 91)-A (именуемой в изобретении как BCY11369);
 A-(SEQ ID NO: 91)-A (именуемой в изобретении как BCY10331);
 A-(SEQ ID NO: 92)-A (именуемой в изобретении как BCY10375);
 A-(SEQ ID NO: 93)-A (именуемой в изобретении как BCY10364);
 A-(SEQ ID NO: 94)-A (именуемой в изобретении как BCY10365);
 A-(SEQ ID NO: 95)-A (именуемой в изобретении как BCY10366);
 A-(SEQ ID NO: 96)-A (именуемой в изобретении как BCY10367);
 A-(SEQ ID NO: 97)-A (именуемой в изобретении как BCY10368);
 A-(SEQ ID NO: 98)-A (именуемой в изобретении как BCY10369);

A-(SEQ ID NO: 139)-A (именуемой в изобретении как BCY10733);
A-(SEQ ID NO: 140)-A (именуемой в изобретении как BCY10734);
A-(SEQ ID NO: 141)-A (именуемой в изобретении как BCY10735);
A-(SEQ ID NO: 142)-A (именуемой в изобретении как BCY10736);
A-(SEQ ID NO: 143)-A (именуемой в изобретении как BCY10336);
A-(SEQ ID NO: 144)-A (именуемой в изобретении как BCY10337);
A-(SEQ ID NO: 145)-A (именуемой в изобретении как BCY10338);
A-(SEQ ID NO: 146)-A (именуемой в изобретении как BCY10346);
A-(SEQ ID NO: 147)-A (именуемой в изобретении как BCY10357);
A-(SEQ ID NO: 148)-A (именуемой в изобретении как BCY10362);
A-(SEQ ID NO: 149)-A (именуемой в изобретении как BCY10332);
A-(SEQ ID NO: 150)-A (именуемой в изобретении как BCY10717);
A-(SEQ ID NO: 151)-A (именуемой в изобретении как BCY10718);
A-(SEQ ID NO: 152)-A (именуемой в изобретении как BCY10334); и
A-(SEQ ID NO: 153)-A (именуемой в изобретении как BCY10719);
такой:

A-(SEQ ID NO: 87)-A-K(P_{ua}) (именуемой в изобретении как BCY11607);
где P_{ua} представляет 4-пептиноильный фрагмент.

В одном варианте осуществления, два или более вторых пептида обладают специфичностью к одной и той же иммунной клетке. В дополнительном варианте осуществления, каждый из указанных двух или более вторых пептидов обладают специфичностью к одному и тому же сайту связывания или к одной и той же мишени на одной и той же иммунной клетке. В альтернативном варианте осуществления, каждый из указанных двух или более вторых пептидов обладают специфичностью к разным сайтам связывания или к разным мишеням на одной и той же иммунной клетке. В альтернативном варианте осуществления, два или более вторых пептидов обладают специфичностью к двум различным иммунным клеткам (то есть CD137 и OX40). В дополнительном варианте осуществления, каждый из указанных двух или более вторых пептидов обладают специфичностью к одному и тому же сайту связывания или к одной и той же мишени на двух различающихся иммунных клетках. В альтернативном варианте осуществления, каждый из указанных двух или более вторых пептидов обладают специфичностью к разным сайтам связывания или к разным мишеням на двух различающихся иммунных клетках.

В одном варианте осуществления, каждый из указанных двух или более вторых пептидов имеют одну и ту же пептидную последовательность.

В одном варианте осуществления, указанный гетеротандемный бициклический пептидный комплекс включает два вторых пептидных лиганды. Соответственно, согласно дополнительному аспекту изобретения, предлагается гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, включающий:

(a) первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на раковой клетке, конъюгированный через линкер с

(b) двумя вторыми пептидными лигандами, которые связываются с компонентом, присутствующим на иммунной клетке;

где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий, по меньшей мере, три реакционно-способных группы, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционно-способными группами полипептида, вследствие чего на молекулярном каркасе образуются, по меньшей мере, две полипептидных петли.

Согласно дополнительному аспекту изобретения, который следует упомянуть, предлагается гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, включающий:

(a) первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на раковой клетке, конъюгированный через линкер с

(b) двумя вторыми пептидными лигандами, которые связываются с компонентом, присутствующим на иммунной клетке;

где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий, по меньшей мере, три остатка цистеина, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с цистеиновыми остатками полипептида вследствие чего на молекулярном каркасе образуются, по меньшей мере, две полипептидных петли.

В альтернативном варианте осуществления, указанный гетеротандемный бициклический пептидный комплекс включает три вторых пептидных лиганда. Соответственно, согласно дополнительному аспекту изобретения, предлагается гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, включающий:

(a) первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на раковой клетке, конъюгированный через линкер с

(b) тремя вторыми пептидными лигандами, которые связываются с компонентом, присутствующим на иммунной клетке;

где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий, по меньшей мере, три реакционно-способных группы, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционно-способными группами полипептида, вследствие чего на молекулярном каркасе образуются, по меньшей мере, две полипептидных петли.

Согласно дополнительному аспекту изобретения, который следует упомянуть, предлагается гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, включающий:

(a) первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на раковой клетке, конъюгированный через линкер с

(b) тремя вторыми пептидными лигандами, которые связываются с компонентом, присутствующим на иммунной клетке;

где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий, по меньшей мере, три остатка цистеина, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с цистеиновыми остатками полипептида вследствие чего на молекулярном каркасе образуются, по меньшей мере, две полипептидных петли.

В дополнительном варианте осуществления, каждый из указанных двух или более вторых пептидов имеет одну и ту же пептидную последовательность, и указанная пептидная последовательность включает Ас-(SEQ ID NO: 11)-А (именуемую в изобретении как ВСУ8928), где Ас представляет ацетильную группу, или их фармацевтически приемлемую соль.

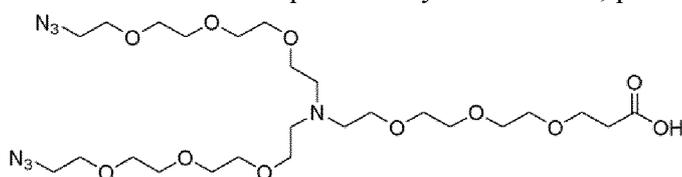
В еще одном варианте осуществления, указанный гетеротандемный бициклический пептидный комплекс включает два вторых пептидных лиганда, и оба из указанных двух вторых пептидов имеют одну и ту же пептидную последовательность, которая включает Ас-(SEQ ID NO: 11)-А (именуемую в изобретении как ВСУ8928), где Ас представляет ацетильную группу, или их фармацевтически приемлемую соль.

Линкеры

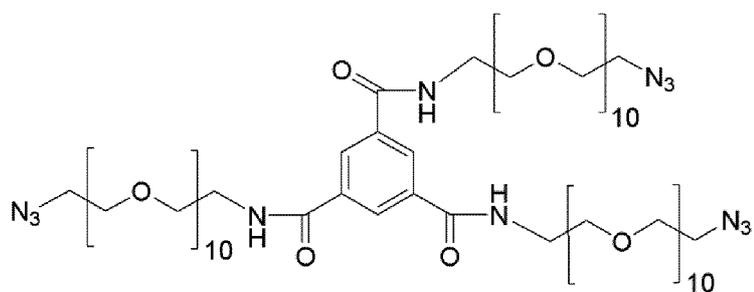
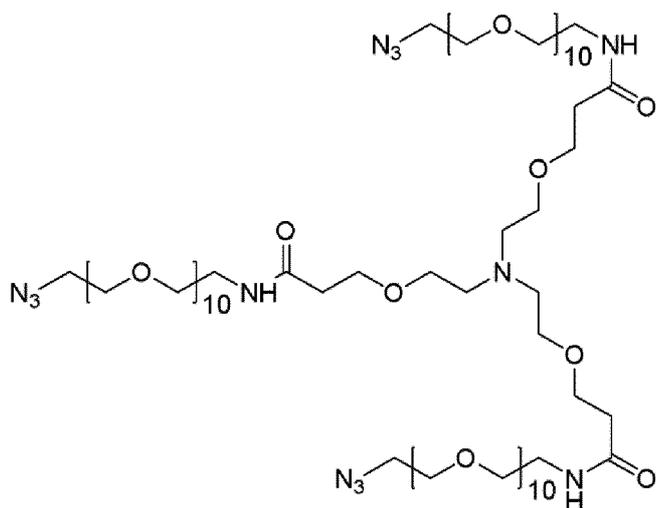
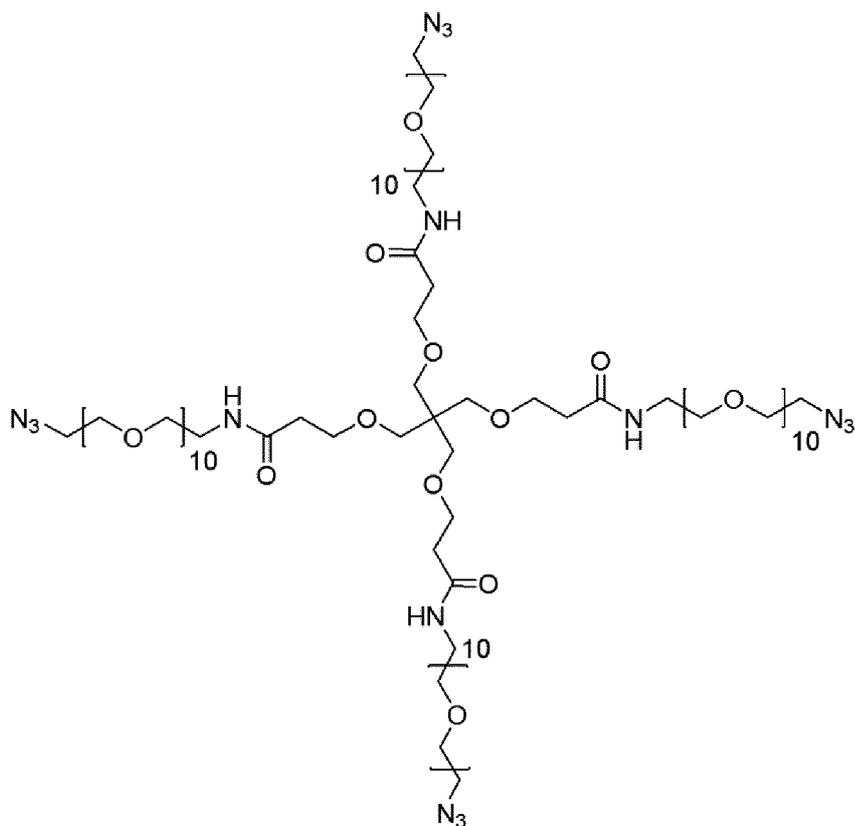
Следует иметь в виду, что первый пептидный лиганд может быть конъюгирован с двумя или более вторыми пептидными лигандами через любой подходящий линкер. Как правило, дизайн указанного линкера должен быть таким, чтобы три бициклических пептида присутствовали таким образом, что они могли бы беспрепятственно связываться со своими соответствующими мишенями или по отдельности, или одновременно связываться с обоими рецепторами-мишенями. Кроме того, линкер должен обеспечивать связывание с обоими мишенями одновременно, сохраняя при этом соответствующее расстояние между клетками-мишенями, которое приводило бы к требуемому функциональному результату. Для оптимизации желаемого функционального результата, свойства линкера могут быть изменены путем увеличения его длины, жесткости или растворимости. Линкер может быть также сконструирован таким образом, чтобы его конструкция позволяла присоединение более чем одного бицикла к одной и той же мишени. Повышение валентности любого связывающего пептида может быть использовано для увеличения аффинности гетеротандема к клеткам-мишеням или может способствовать индуцированию олигомеризации одного или обоих рецепторов-мишеней.

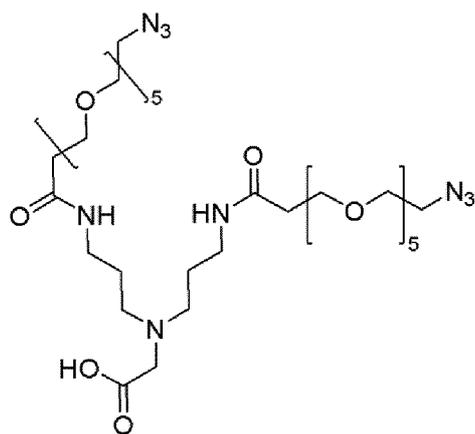
В одном варианте осуществления, линкер представляет собой разветвленный линкер, что позволяет ему присоединять один первый пептид на одном конце и два или более вторых пептидов на другом концен.

В дополнительном варианте осуществления, разветвленный линкер выбирают из:

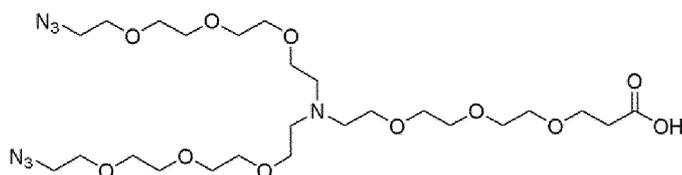


N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид);

Тримезиновый-[Peg₁₀]₃;ТСА-[Peg₁₀]₃;Tet-[Peg₁₀]₄; и

BAPG-(Peg₅)₂.BAPG-(Peg₅)₂.

В конкретном варианте осуществления, разветвленный линкер представляет собой:

N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид).Гетеротандемные комплексы

В одном конкретном варианте осуществления, первый пептидный лиганд включает нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, два или более вторых пептидных лигандов включают два CD137 связывающих бициклических пептидных лиганда, присоединенных к каркасу ТАТА, и указанный гетеротандемный комплекс выбирают из комплексов, приведенных в таблице А.

Таблица А (нектин-4 : CD137; 1:2)

№ комплекса	№ BCY для нектин-4	Точка присоединения	Линкер	№ BCY для CD137	Точка присоединения
BCY11863	BCY8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY12484	BCY8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY12143	dLys(PYA)4

BCY10918	BCY11015	N-концевая PYA	Trimesic- [Peg ₁₀] ₃	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY10919	BCY11015	N-концевая PYA	Trimesic- [Peg ₁₀] ₃	BCY11014	C-концевая Dap(PYA)
BCY11027	BCY11015	N-концевая PYA	TCA-[Peg ₁₀] ₃	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY11385	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY11014	C-концевая Dap(PYA)
BCY11864	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY7744	dLys(PYA)4
BCY12485	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY12149	dLys(PYA)4
BCY12486	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY12147	dLys(PYA)4
BCY12586	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY12352	dLys(PYA)4
BCY12487	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY12145	dLys(PYA)4
BCY12490	BCY12024	dLys3	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4

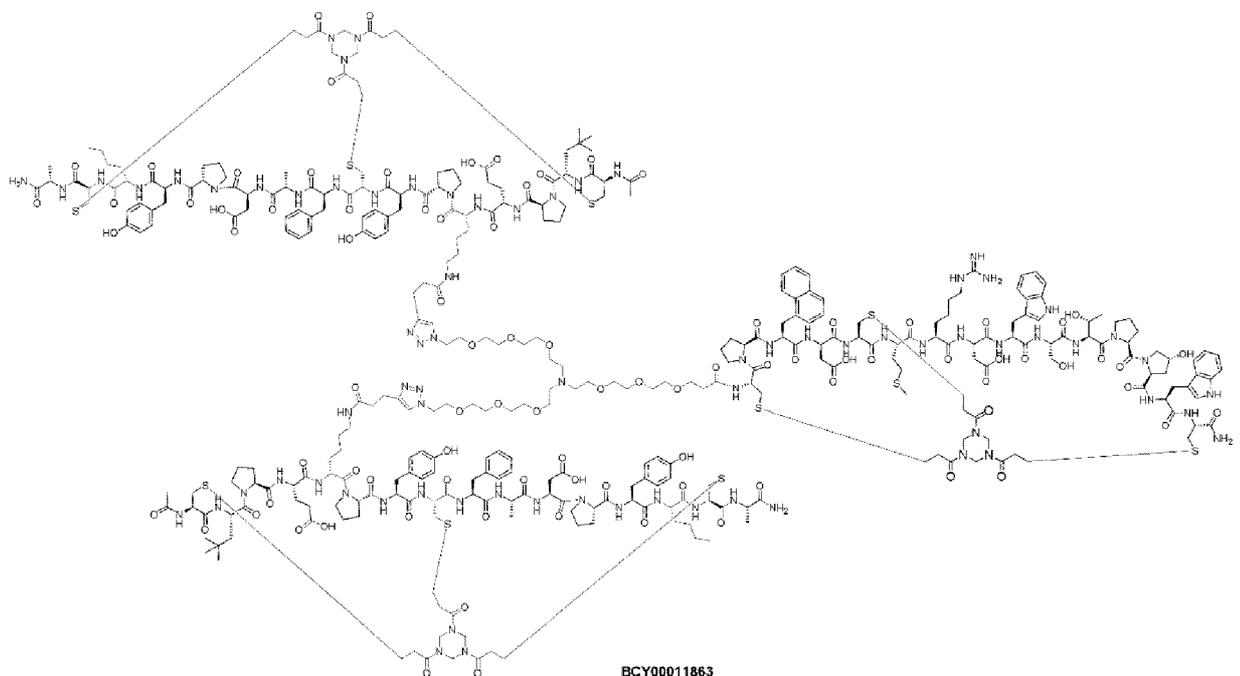
BCY12587	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY12353	dLys(PYA)4
BCY12588	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY12354	dLys(PYA)4
BCY12589	BCY12371	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY12590	BCY12384	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY12760	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY12381	dLys(PYA)4
BCY12761	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY12382	dLys(PYA)4
BCY13390	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4
BCY14602	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY14601	dLys(PYA)4
BCY15155	BCY8116	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N-	BCY14601 BCY8928	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4

			бис(PEG ₃ -азид)		
--	--	--	-----------------------------	--	--

В одном варианте осуществления, гетеротандемный бициклический пептидный комплекс выбирают из: ВСУ11027, ВСУ11863 и ВСУ11864. В дополнительном варианте осуществления,

гетеротандемный бициклический пептидный комплекс выбирают из: ВСУ11863 и ВСУ11864.

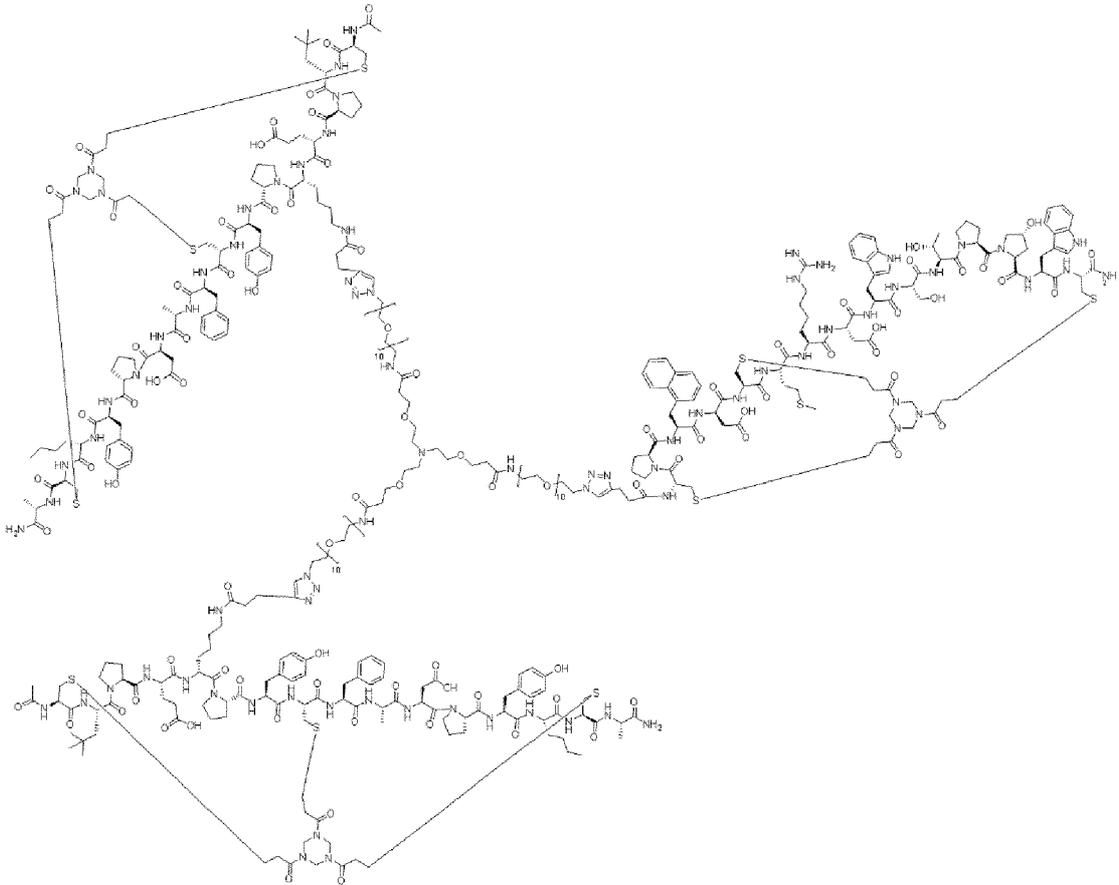
Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс ВСУ11863 состоит из нектин-4 специфичного пептида ВСУ8116, связанного с двумя CD137 специфичными пептидами (оба из которых представляют собой ВСУ8928) через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), графически изображенный как:



CD137 представляет собой гомотримерный белок, а природный лиганд CD137L существует в форме гомотримера, либо экспрессируемого на иммунных клетках, либо секретируемого. При индуцировании активности CD137 в иммунных клетках, биологическая активность CD137 зависит в высокой степени от мультимеризации. Одним из способов генерирования мультимеризации CD137 является клеточное перекрестное сшивание специфичного агониста CD137 в результате взаимодействия со специфичным рецептором, присутствующим на другой клетке. Преимущество гетеротандемных комплексов по настоящему изобретению заключается в том, что присутствие двух или более пептидных лигандов, специфичных для компонента иммунной клетки, такого как CD137, обеспечивает более эффективное образование кластеров CD137. Например, на фигуре 1 и в таблице 1 представлены данные, которые показывают, что ВСУ11863 демонстрирует высокую степень активации CD137 в репортерном анализе CD137. Кроме того, на фигуре 2 и в таблице 5 представлены данные, которые показывают, что ВСУ11863

индуцирует устойчивую секрецию цитокинов IL-2 и IFN- γ в анализе в совместной культуре с РВМС-4Т1. Кроме того, на фигуре 3 и в таблице 7 представлены данные, которые показывают, что ВСУ11863 демонстрировал очень хороший фармакокинетический профиль с конечным периодом полувыведения 4,1 часа в случае крыс SD и 5,3 часа в случае яванских макаков.

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс ВСУ11027 состоит из нектин-4 специфичного пептида ВСУ11015, связанного с двумя CD137 специфичными пептидами (оба из которых представляют собой ВСУ8928) через TCA-[Peg₁₀]₃ линкер, графически изображенный как:



Приведенные на фигуре 13 данные демонстрирует, что нектин-4/CD137 гетеротандем ВСУ11027 индуцирует зависимое от мишени высвобождение цитокинов в *ex vivo* культурах первичных опухолей легких, полученных от пациентов. Лечение с помощью ВСУ11027 индуцировало нектин-4 зависимое изменение нескольких иммунных маркеров (нормализованное к плацебо (среде)) и %CD8 +ki67+ T-клеток в полученных от пациентов образцах, которое коррелировало с уровнем экспрессии нектин-4.

В альтернативном конкретном варианте осуществления, первый пептидный лиганд включает нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, два или более вторых пептидных лигандов включают три CD137 связывающих бициклических пептидных лигандов, присоединенных к каркасу ТАТА, и указанный гетеротандемный комплекс выбирают из комплексов, приведенных в таблице В.

Таблица В (нектин-4 : CD137; 1:3)

№ комплекса	№ ВСУ для нектин-4	Точка присоединения	Линкер	№ ВСУ для CD137	Точка присоединения
ВСУ11021	ВСУ11016	N-концевая РУА	Тет-[Peg ₁₀] ₄	ВСУ7744	dLys(PYA)4
ВСУ11022	ВСУ11016	N-концевая РУА	Тет-[Peg ₁₀] ₄	ВСУ8928	dLys(PYA)4

В одном конкретном варианте осуществления, первый пептидный лиганд включает EphA2 связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, два или более вторых пептидных лигандов включают два CD137 связывающих бициклических пептидных лиганда, присоединенных к каркасу ТАТА, и указанный гетеротандемный комплекс выбирают из комплексов, приведенных в таблице С.

Таблица С (EphA2 : CD137; 1:2)

№ комплекса	№ ВСУ для EphA2	Точка присоединения	Линкер	№ ВСУ для CD137	Точка присоединения
ВСУ12491	ВСУ9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	ВСУ8928	dLys(PYA)4
ВСУ12723	ВСУ9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	ВСУ12143	dLys(PYA)4
ВСУ12724	ВСУ9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	ВСУ12149	dLys(PYA)4
ВСУ12725	ВСУ9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	ВСУ12147	dLys(PYA)4
ВСУ12726	ВСУ9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-	ВСУ12145	dLys(PYA)4

			бис(PEG ₃ -азид)		
BCY12728	BCY9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY12150	dLys(PYA)4
BCY12729	BCY9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY12352	dLys(PYA)4
BCY12730	BCY9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY12353	dLys(PYA)4
BCY12731	BCY9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY12354	dLys(PYA)4
BCY12732	BCY9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY12360	dLys (PYA)4
BCY12973	BCY12734	С-концевой Lys	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY12974	BCY12735	Lys8	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY12975	BCY12736	Lys2	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4

BCY12976	BCY12737	Lys7	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY12977	BCY12738	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY12978	BCY12739	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY12979	BCY9594	N-конец	ВАРG-(Peg ₅) ₂	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13042	BCY12854	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13043	BCY12855	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13044	BCY12856	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13045	BCY12857	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13046	BCY12858	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4

BCY13047	BCY12859	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13048	BCY12860	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13049	BCY12861	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13050	BCY12862	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13051	BCY12863	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13052	BCY12864	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13053	BCY12865	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13054	BCY12866	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13138	BCY12856	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N-	BCY12353	dLys(PYA)4

			бис(PEG ₃ -азид)		
BCY13139	BCY9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY13137	dLys(PYA)4
BCY13140	BCY12856	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY13137	dLys(PYA)4
BCY13270	BCY13116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13271	BCY13117	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13272	BCY13118	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13273	BCY13119	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13274	BCY13120	C-концевая dLys	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13275	BCY13121	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4

BCY13276	BCY13122	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13277	BCY13123	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13278	BCY13124	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13280	BCY13126	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13281	BCY13127	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13282	BCY13128	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13284	BCY13130	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13285	BCY13131	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N- бис(PEG ₃ - азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13286	BCY13132	N-конец	N-(кислота- PEG ₃)-N-	BCY8928	dLys(PYA)4

			бис(PEG ₃ -азид)		
BCY13288	BCY13134	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13289	BCY13135	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13341	BCY12865	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY12353	dLys(PYA)4
BCY13343	BCY12860	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY12353	dLys(PYA)4
BCY13279	BCY13125	C-концевая dLys	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13283	BCY13129	C-концевая dLys	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY13287	BCY13133	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY14049	BCY13917	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928	dLys(PYA)4

BCY14050	BCY13918	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY14051	BCY13919	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY14052	BCY13920	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY14053	BCY13922	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY14054	BCY13923	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY14055	BCY14047	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY14056	BCY14048	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY14334	BCY14313	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY14335	BCY14327	Lys 8	N-(кислота-PEG3)-N-	BCY8928	dLys(PYA)4

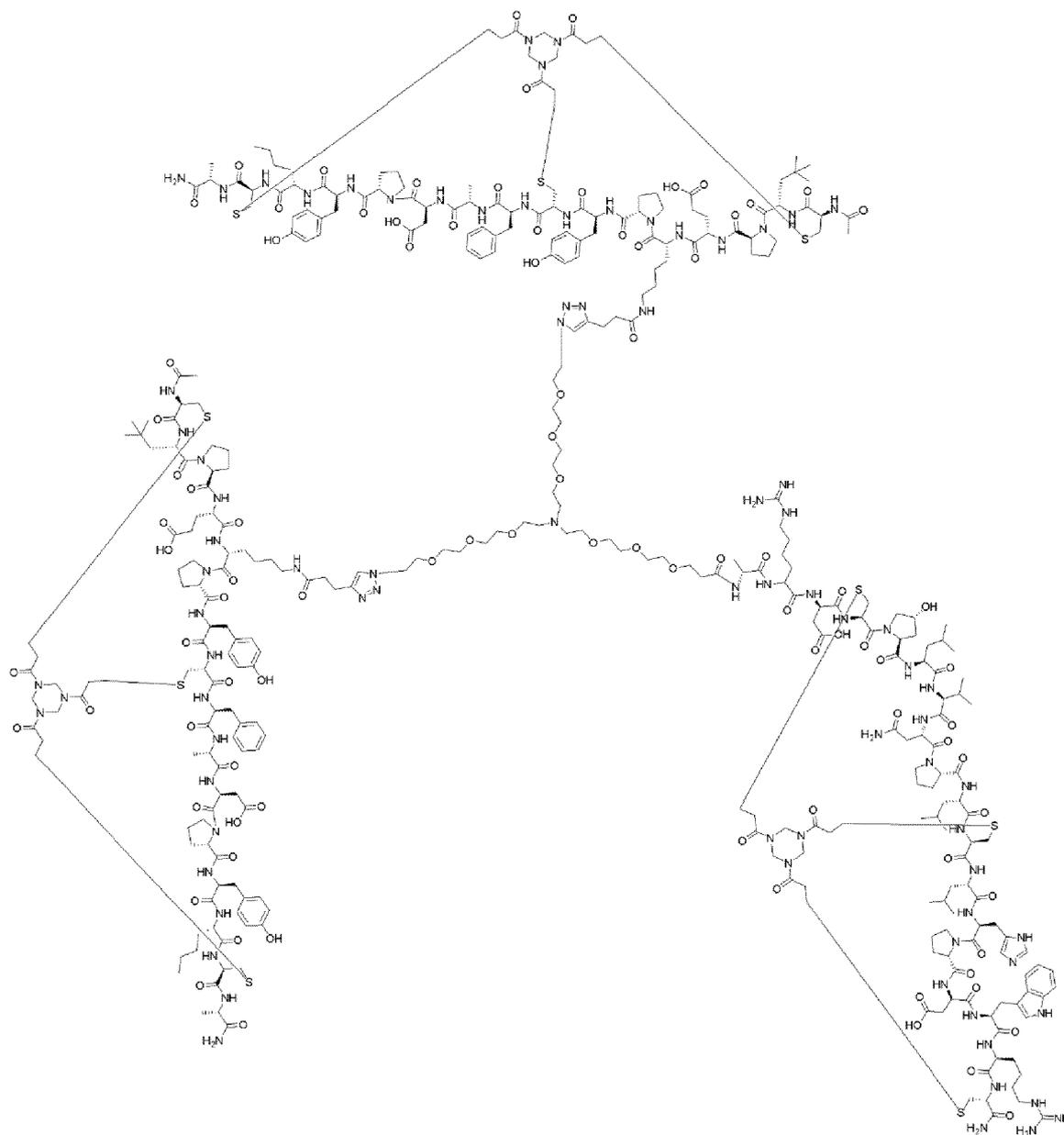
			бис(PEG3-азид)		
BCY14413	BCY9594	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4
BCY14414	BCY13118	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4
BCY15217	BCY13118	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY14601 BCY14601	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4
BCY15218	BCY13118	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY8928 BCY14601	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4

В одном варианте осуществления, гетеротандемный бициклический пептидный комплекс выбирают из: BCY12491, BCY12730, BCY13048, BCY13050, BCY13053 и BCY13272.

В одном варианте осуществления, гетеротандемный бициклический пептидный комплекс выбирают из: BCY12491, BCY12730, BCY13048, BCY13050 и BCY13053.

В дополнительном варианте осуществления, гетеротандемный бициклический пептидный комплекс представляет собой BCY12491.

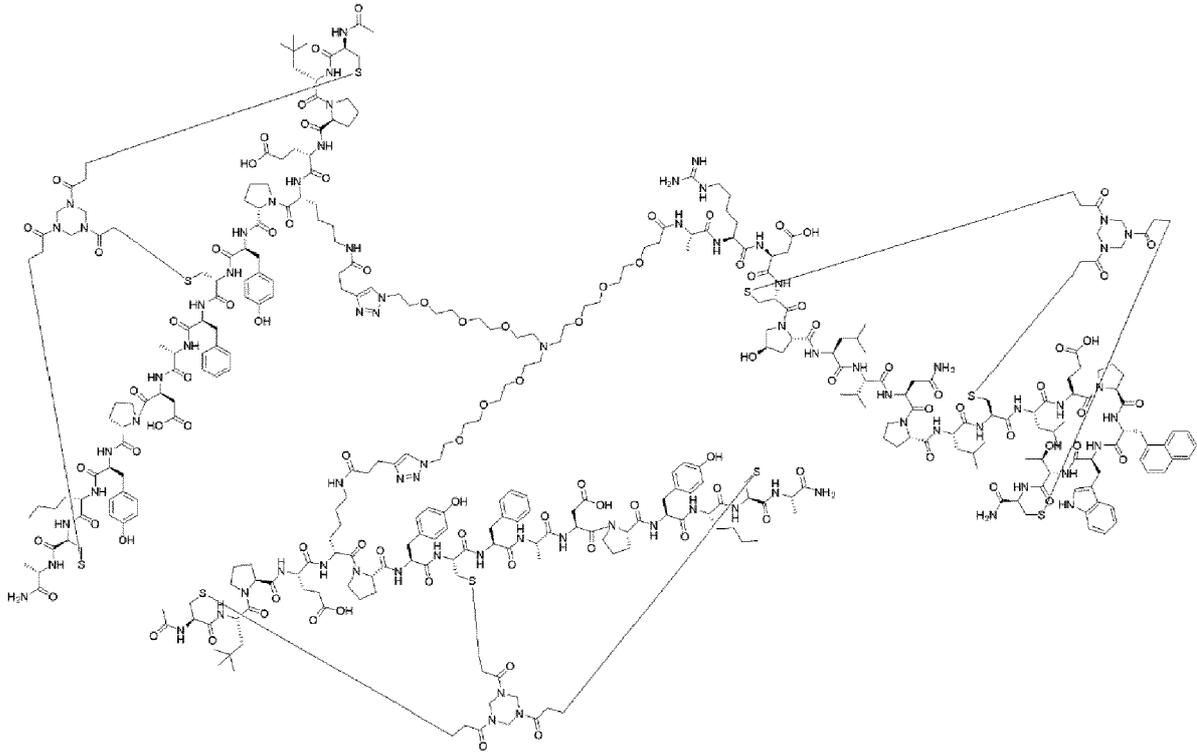
Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY12491 состоит из EphA2 специфичного пептида BCY9594, связанного с двумя CD137 специфичными пептидами (оба из которых представляют собой BCY8928), через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), графически изображенный как:

**BCY12491**

На фигуре 9 и на фигуре 15 представлены данные, которые показывают, что BCY12491 вызывает выраженный противоопухолевый ответ и модулирование (увеличение) противоопухолевых эффекторных иммунных клеток и иммунного ответа.

В альтернативном варианте осуществления, гетеротандемный бициклический пептидный комплекс представляет собой BCY13272.

Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY13272 состоит из EphA2 специфичного пептида BCY13118, связанного с двумя CD137 специфичными пептидами (оба из которых представляют собой BCY8928), через линкер N-(кислота-PEG₃)-N-бис(PEG₃-азид), графически изображенный как:



BCU13272

На фигуре 18 представлены данные, которые демонстрируют, что BCU13272 вызывает значительный противоопухолевый эффект в модели опухоли MC38 на мышах.

В одном конкретном варианте осуществления, первый пептидный лиганд включает PD-L1 связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу TATA, два или более вторых пептидных лигандов включают два CD137 связывающих бициклических пептидных лиганда, присоединенных к каркасу TATA, и указанный гетеротандемный комплекс выбирают из комплексов, приведенных в таблице D.

Таблица D (PD-L1 : CD137; 1:2)

№ комплекса	№ BCU для PD-L1	Точка присоединения	Линкер	№ BCU для CD137	Точка присоединения
BCU11780	BCU10861	Lys(PYA)9	TCA-[Peg ₁₀] ₃	BCU8928	dLys4
BCU12662	BCU12479	С-концевая Lys	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCU8928	dLys(PYA)4
BCU12722	BCU12477	С-концевая Lys	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCU8928	dLys(PYA)4

В одном конкретном варианте осуществления, первый пептидный лиганд включает нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу

ТАТА, два или более вторых пептидных лигандов включают два ОХ40 связывающих бициклических пептидных лиганда, присоединенный к каркасу ТАТА, и указанный гетеротандемный комплекс представляет собой комплекс, приведенный в таблице Е.

Таблица Е (Нектин-4 : ОХ40; 1:2)

№ комплекса	№ ВСУ для нектин-4	Точка присоединения	Линкер	№ ВСУ для ОХ40	Точка присоединения
BCY12967	BCY8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BC11607	C-концевая Lys(PYA)

В одном конкретном варианте осуществления, первый пептидный лиганд включает нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, один из двух или более вторых пептидных лигандов включает ОХ40 связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, и другой из двух или более вторых пептидных лигандов включает CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд, присоединенный к каркасу ТАТА, и указанный гетеротандемный комплекс представляет собой комплекс, приведенный в таблице F.

Таблица F (Нектин-4 : ОХ40 : CD137; 1:1:1)

№ комплекса	№ ВСУ для нектин-4	Точка присоединения	Линкер	№ ВСУ для ОХ40	Точка присоединения	№ ВСУ для CD137	Точка присоединения
BCY12733	BCY8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY12708	C-концевая dLys	BCY7744	dLys (PYA) ₄

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют те же значения, которые являются общепринятыми для специалистов в данной области, например в области химии пептидов, культуры клеток и фагового дисплея, химии нуклеиновых кислот и биохимии. Используются стандартные методы молекулярной биологии, генетических и биохимических исследований (смотрите монографии 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.), содержание которых включены в настоящее изобретение путем ссылки на них.

Номенклатура

Нумерация

При указании положений аминокислотного остатка в соединениях по изобретению, для остатков цистеина (C_i, C_{ii} и C_{iii}) нумерация не приводится, поскольку они являются

инвариантными, поэтому нумерация аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 1 является такой, как показано ниже:

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

Применительно к настоящему изобретению, предполагается, что все бициклические пептиды циклизованы с помощью ТВМВ (1,3,5-трис(бромметил)бензола) или 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА) с образованием тризамещенной структуры. Циклизация с помощью ТВМВ и ТАТА происходит по C_i, C_{ii} и C_{iii}.

Молекулярный формат

N- или C-концевые удлинения для коровой последовательности бицикла добавляются к левой или правой стороне последовательности и отделяются дефисом. Например, N-концевой βAla-Sar10-Ala хвост будет обозначаться как:

βAla-Sar10-A-(SEQ ID NO: X).

Обратные пептидные последовательности

В свете публикации Nair et al (2003) J Immunol 170(3), 1362-1373, предполагается, что раскрытые в изобретении пептидные последовательности могут также найти применение в их ретро-инверсной форме. Например, порядок последовательности изменяют на обратный (то есть N-конец становится C-концом и наоборот), и ее стереохимия таким же образом становится обратной (то есть D-аминокислоты становятся L-аминокислотами и наоборот). Во избежание неправильного толкования, предполагается, что при указании аминокислот, либо в виде их полного названия, либо в виде их буквенного кода из одной или трех букв, в изобретении они представляются как L-аминокислоты, если не заявлено иное. Если предполагается, что такая аминокислота должна быть представлена в изобретении как D-аминокислота, то, в этом случае, перед обозначением аминокислоты будет стоять строчная буква d и все обозначение будет взято в квадратные скобки, например, [dA], [dD], [dE], [dK], [d1Nal], [dNle], и так далее.

Преимущества пептидных лигандов

Конкретные гетеротандемные бициклические пептидные комплексы по настоящему изобретению имеют ряд предпочтительных свойств, благодаря которым они могут рассматриваться в качестве подходящих молекул, подобных лекарственным средствам, для инъекционного, ингаляционного, назального, глазного, перорального или местного введения. Такие предпочтительные свойства включают:

- межвидовую перекрестную реактивность. Она является обычным требованием для проведения преclinical фармакодинамических и фармакокинетических исследований;
- устойчивость к воздействию протеаз. Гетеротандемные бициклические пептидные комплексы должны, в идеальном варианте, проявлять устойчивость к воздействию протеаз плазмы, эпителиальных ("заякоренных в мембране") протеаз, желудочных и кишечных протеаз, протеаз на поверхности легких, внутриклеточных протеаз и других подобных протеаз. Устойчивость к воздействию протеаз должна сохраняться между различными видами, благодаря чему на животных моделях может быть разработан перспективный гетеротандемный бициклический пептид, который затем с высокой степенью

достоверности может применяться на людях;

- требуемый профиль растворимости. Он зависит от отношения заряженных и гидрофильных остатков к гидрофобным остаткам и от внешних/внутренних молекулярных водородных связей, что является важным с точки зрения приготовления и абсорбции лекарственного препарата;

- селективность. Конкретные гетеротандемные бициклические пептидные комплексы по изобретению проявляют высокую селективность в присутствии других мишеней;

- оптимальный период полувыведения из плазмы в кровотоке. В зависимости от клинических показаний и схемы лечения, может потребоваться разработка гетеротандемного бициклического пептидного комплекса с кратковременным воздействием в случае лечения острого заболевания, или разработка гетеротандемного бициклического пептидного комплекса с повышенным временем нахождения в кровотоке, что, вследствие этого, является оптимальным при лечении хронического течения заболеваний. Другими факторами, определяющими требуемый период полувыведения из плазмы, являются требования при пролонгированном воздействии достижения максимальной терапевтической эффективности с учетом сопровождающего токсического действия, обусловленного пролонгированным воздействием лекарственного средства.

Важно отметить, что в изобретении представлены данные, согласно которым выбранные гетеротандемные бициклические пептидные комплексы демонстрируют противоопухолевую активность при их дозировании с частотой, при которой не поддерживаются концентрации соединения в плазме выше его величины EC_{50} *in vitro*. Это отличается от методов применения более крупных по размеру биологических препаратов (то есть на основе антител) для агонизма CD137 или биспецифического агонизма CD137 (Segal et al., *Clin Cancer Res.*, 23(8):1929-1936 (2017), Claus et al., *Sci Trans Med.*, 11(496): eaav5989, 1-12 (2019), Hinner et al., *Clin Cancer Res.*, 25(19):5878-5889 (2019)). Не приводя в качестве обоснования какую-либо теорию, тем не менее, можно предположить, что наблюдаемое явление обусловлено тем, что гетеротандемные бициклические комплексы имеют относительно низкую молекулярную массу (как правило <15 кДа), они являются полностью синтетическими продуктами и они представляют собой нацеленные на опухоль агонисты CD137. В качестве таковых, они характеризуются относительно короткими периодами полувыведения из плазмы, но высокой проницаемостью в опухоль и продолжительным временем нахождения в опухоли. В изобретении приведены данные, которые полностью поддерживают наличие этих преимуществ. Например, противоопухолевая активность в моделях сингенной опухоли на мышах с гуманизированным CD137 проявляется либо ежедневно, либо на каждый третий день. Кроме того, фармакокинетические данные, полученные в случае интраперитонеального введения, показывают, что период полувыведения из плазмы составляет <3 часов, что позволяет предположить стабильное падение циркулирующей концентрации комплекса ниже величины *in vitro* EC_{50} в промежутках времени между введениями доз. Кроме того,

фармакокинетические данные для опухоли показывают, что уровни гетеротандемного бициклического комплекса в опухолевой ткани могут быть более высокими и более устойчивыми по сравнению с уровнями в плазме.

Следует отметить, что этот вывод образует важный дополнительный аспект изобретения. Так, согласно дополнительному аспекту изобретения, в изобретении предлагается способ лечения рака, который включает введение описанного в изобретении гетеротандемного бициклического пептидного комплекса при частоте введения доз, при которой не поддерживаются концентрации указанного комплекса в плазме выше величины *in vitro* EC₅₀ для указанного комплекса.

- Иммунологическую память. Сочетание связывающегося с раковой клеткой бициклического пептидного лиганда со связывающимся с иммунной клеткой бициклическим пептидным лигандом обеспечивает синергетический положительный эффект для иммунологической памяти. В изобретении представлены данные, которые показывают, что выбранные гетеротандемные бициклические пептидные комплексы по изобретению позволяют не только уничтожать опухоли, но при повторном введении вызывающего образование опухоли средства, ни у одной из инокулированных мышей с полным ответом не развивались опухоли (смотрите фигуру 5). Это указывает на то, что лечение с помощью выбранных гетеротандемных бициклических пептидных комплексов по изобретению вызывало иммунологическую память у мышей с полным ответом. Это является значительным клиническим преимуществом с точки зрения предотвращения повторного возникновения указанной опухоли, после того как она первоначально была подвергнута противоопухолевой терапии и уничтожена.

Пептидные лиганды

Упомянутый в изобретении пептидный лиганд относится к пептиду, ковалентно связанному с молекулярным каркасом. Как правило, такие пептиды включают две или более реакционно-способных групп (то есть остатки цистеина), которые способны образовывать ковалентные связи с каркасом, и последовательность, находящуюся между указанными реакционно-способными группами, которую называют петлевой последовательностью, так как она образует петлю при связывании пептида с каркасом. В данном случае, пептиды включают, по меньшей мере, три реакционно-способные группы, выбранные из цистеина, 3-меркаптопропионовой кислоты и/или цистеина, и образуют, по меньшей мере, две петли на каркасе.

Реакционно-способные группы

Молекулярный каркас по изобретению может быть связан с полипептидом через функциональные или реакционно-способные группы на полипептиде. Они обычно образуются из боковых цепей конкретных аминокислот, находящихся в полипептидном полимере. Такие реакционно-способные группы могут представлять собой боковую цепь цистеина, боковую цепь лизина или N-концевую аминогруппу или любую другую подходящую реакционно-способную группу, такую как пеницилламин. Подробную

информацию по поводу подходящих реакционно-способных групп можно найти в патентном документе WO 2009/098450.

Примерами реакционно-способных групп природных аминокислот являются тиольная группа цистеина, аминогруппа лизина, карбоксильная группа аспартата или глутамата, гуанидиниевая группа аргинина, фенольная группа тирозина или гидроксильная группа серина. Неприродные аминокислоты могут обеспечивать широкий спектр реакционно-способных групп, включая азидную, кето-карбонильную, алкиновую, винильную или арилгалогенидную группу. Аминогруппа и карбоксильная группа на конце полипептида могут также служить в качестве реакционно-способных групп для образования ковалентных связей с молекулярным каркасом/молекулярным остовом.

Полипептиды по изобретению содержат, по меньшей мере, три реакционно-способные группы. Указанные полипептиды могут также содержать четыре или более реакционно-способных групп. Чем больше используют реакционно-способных групп, тем больше может образоваться петель в молекулярном каркасе.

В предпочтительном варианте осуществления, синтезируют полипептиды с тремя реакционно-способными группами. Реакция указанных полипептидов с молекулярным каркасом/молекулярным остовом, имеющим тройную симметрию относительно оси вращения, дает единственный изомер продукта. Получение единственного изомера продукта является благоприятным по нескольким причинам. Нуклеиновые кислоты библиотек соединений кодируют только первичные последовательности полипептида, но не изомерное состояние молекул, которые образуются в результате реакции полипептида с молекулярным остовом. Если может образовываться только один изомер продукта, предназначение нуклеиновой кислоты для изомера продукта четко определено. Если образуются множество изомеров продукта, нуклеиновая кислота не может давать информацию по поводу природы изомера продукта, который был выделен в процессе скрининга или селекции. Образование единственного изомера продукта также является благоприятным, если синтезируют конкретный член библиотеки по изобретению. В этом случае, химическая реакция полипептида с молекулярным каркасом дает единственный изомер продукта, а не смесь изомеров.

В другом варианте осуществления, синтезируют полипептиды с четырьмя реакционно-способными группами. Реакция указанных полипептидов с молекулярным каркасом/молекулярным остовом, имеющим четверную симметрию относительно оси вращения, дает два изомера продукта. Если даже два различных изомера продукта кодируются одной и той же нуклеиновой кислотой, изомерная природа выделенного изомера может быть определена путем химического синтеза обоих изомеров, разделения двух изомеров и испытания обоих изомеров на связывание с лигандом-мишенью.

В одном варианте осуществления изобретения, по меньшей мере, одна из реакционно-способных групп полипептидов является ортогональной к остальным реакционно-способным группам. Использование ортогональных реакционно-способных групп позволяет направлять указанные ортогональные реакционно-способные группы на

специфические сайты молекулярного остова. Стратегии связывания с использованием ортогональных реакционно-способных групп могут быть применены для ограничения числа образующихся изомеров продукта. Другими словами, путем выбора определенных или различных реакционно-способных групп для одной или более из, по меньшей мере трех связей, для групп, выбранных для оставшихся из, по меньшей мере трех связей, могут быть успешно достигнуты определенный порядок связывания или направления конкретных реакционно-способных групп полипептида к конкретным позициям на молекулярном каркасе.

В другом варианте осуществления, реакционно-способные группы полипептида по изобретению реагируют с молекулярными линкерами, где указанные линкеры способны реагировать с молекулярным каркасом, вследствие чего в конечном связанном состоянии линкер будет находиться между молекулярным каркасом и полипептидом.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислоты членов библиотек или наборов полипептидов могут быть заменены любой природной или неприродной аминокислотой. Исключением из этих заменяемых аминокислот являются аминокислоты, содержащие функциональные группы для перекрестного связывания полипептидов с молекулярным остовом, вследствие чего заменяемыми являются взятые отдельно петлевые последовательности. Заменяемые полипептидные последовательности имеют либо случайные последовательности, постоянные последовательности, либо последовательности со случайными и постоянными аминокислотами. Аминокислоты с реакционно-способными группами размещены в определенных положениях внутри полипептида, так как положение этих аминокислот определяют размер петли.

В одном варианте осуществления, полипептид с тремя реакционно-способными группами имеет последовательность $(X)_l Y(X)_m Y(X)_n Y(X)_o$, где Y представляет аминокислоту с реакционно-способной группой, X представляет случайную аминокислоту, m и n представляют собой числа от 3 до 6, определяющие длину промежуточных полипептидных сегментов, которая может быть одинаковой или различной, и l и o представляют собой числа от 0 до 20, определяющие длину фланкирующих полипептидных сегментов.

Для присоединения молекулярного каркаса к пептиду путем ковалентных взаимодействий могут быть использованы альтернативы тиол-опосредованным конъюгациям. В качестве варианта, эти методы могут быть использованы при модификации или присоединении дополнительных фрагментов (таких как представляющие интерес малые молекулы, которые отличаются от молекулярного каркаса) к полипептиду после того как они были выбраны или выделены в соответствии с настоящим изобретением - в этом варианте осуществления, в случае, когда очевидно, что не требуется ковалентное присоединение и может быть использовано нековалентное присоединение. Эти методы могут применяться вместо (или в комбинации) тиол-опосредованных методов путем продуцирования фага, который воспроизводит белки и пептиды, содержащие неприродные аминокислоты с требуемыми химическими реакционно-способными группами, в

комбинации с малыми молекулами, которые содержат дополнительную реакционно-способную группу, или путем введения неприродных аминокислот в химически или рекомбинантно синтезированный полипептид, когда молекула получают после фазы селекции/выделения. Более подробную информацию можно найти в патентном документе WO 2009/098450 или в публикации Heinis et al., *Nat Chem Biol* 2009, 5 (7), 502-7.

В одном варианте осуществления, реакционно-способные группы выбирают из остатков цистеина, 3-меркаптопропионовой кислоты и/или цистеамина.

Фармацевтически приемлемые соли

Следует иметь в виду, что в объем настоящего изобретения входят солевые формы, и упоминания пептидных лигандов включают и солевые формы указанных лигандов.

Соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит фрагмент с основными или кислотными свойствами, обычными химическими методами, такими как методы, описанные в монографии *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 получить реакцией этих соединений в форме свободной кислоты или свободного основания с подходящим основанием или кислотой в воде или в органическом растворителе, или в их смеси.

Соли присоединения кислот (моно- или дисоли) могут быть образованы с широким спектром кислот, как неорганических, так и органических. Примеры 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, камфорносульфоновой, (+)-(1S)-камфора-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламовой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, фумаровой, слизевой, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α -оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, гидрогалогеновых кислот (например, бромистоводородной, хлористоводородной, йодистоводородной), изетионовой, 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-амино-салициловой, себациновой, стеариновой, янтарной, серной, дубильной, (+)-L-винной, тиоциановой, п-толуолсульфоновой, ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированных аминокислот и катионообменных смол.

Одна конкретная группа солей состоит из солей, образованных из уксусной, хлористоводородной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной,

молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изетионовой, фумаровой, бензолсульфоновой, толуолсульфоновой, серной, метансульфоновой (мезилат), этансульфоновой, нафталинсульфоновой, валериановой, пропановой, бутановой, малоновой, глюкуроновой и лактобионовой кислот. 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 находиться в форме аниона $-\text{COO}^-$), то соль может быть образована с органическим или неорганическим основанием, генерирующим подходящий катион. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но этим не ограничивая, ионы щелочных металлов, такие как Li^+ , Na^+ и K^+ , катионы щелочно-земельных металлов, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} , и другие катионы, такие как Al^{3+} или Zn^{2+} . Примеры подходящих органических катионов включают, но этим не ограничивая, ион аммония (то есть, NH_4^+) и ионы замещенного аммония (например, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются ионы, которые образованы из метиламина, этиламина, диэтиламина, пропиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером типичного иона четвертичного аммония является $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Когда соединения по изобретению содержат аминную функциональность, они могут образовывать четвертичные аммониевые соли, например, путем реакции с алкилирующим агентом в соответствии с методами, хорошо известными специалисту в данной области. Такие соединения четвертичного аммония входят в объем изобретения.

Модифицированные производные

Следует иметь в виду, что описанные в изобретении модифицированные производные пептидных лигандов входят в объем настоящего изобретения. Примеры таких подходящих модифицированных производных включают одну или более модификаций, выбранных из N-концевых и/или C-концевых модификаций; замены одного или более аминокислотных остатков одним или более неприродными аминокислотными остатками (например, замены одного или более полярных аминокислотных остатков одной или более изостерическими или изоэлектронными аминокислотами; замены одного или более неполярных аминокислотных остатков другими неприродными изостерическими или изоэлектронными аминокислотами); добавления спейсерной группы; замены одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или более устойчивыми к окислению аминокислотными остатками; замены одного или более аминокислотных остатков на аланин, замены одного или более L- аминокислотных остатков одним или более D-аминокислотными остатками; N-алкилирования одной или более амидных связей внутри бициклического пептидного лиганда; замены одной или более пептидных связей суррогатной связью; модификации длины главной цепи пептида; замены водорода на альфа-углероде одного или нескольких аминокислотных остатков

другой химической группой, модификации аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат/аспартат и тирозин, подходящими аминами, тиолами, карбоновой кислотой и реагентами, взаимодействующими с фенолом, для функционализации указанных аминокислот, и введения или замены на аминокислоты, которые вводят ортогональные реакционноспособные группы, которые подходят для функционализации, например, аминокислоты, несущие азидные или алкиновые группы, которые позволяют функционализировать с помощью алкиновых или несущих азид фрагментов, соответственно.

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает N-концевую и/или C-концевую модификацию. В дополнительном варианте осуществления, в котором модифицированное производное включает N-концевую модификацию с использованием подходящих химических реакций с аминогруппой, и/или C-концевую модификацию с использованием подходящих химических реакций с карбоксильной группой. В дополнительном варианте осуществления, указанная N-концевая или C-концевая модификация включает введение эффекторной группы, включая, но этим не ограничивая, цитотоксическое средство, радиоактивное хелатирующее вещество или хромофор.

В дополнительном варианте осуществления, модифицированное производное включает N-концевую модификацию. В дополнительном варианте осуществления, N-концевая модификация включает N-концевую ацетильную группу. В этом варианте осуществления, N-концевую цистеиновую группу (группу, обозначаемую в изобретении как C_i) блокируют с помощью уксусного ангидрида или других подходящих реагентов в процессе синтеза пептида, что приводит к образованию молекулы с ацетилированным N-концом. В этом варианте осуществления обеспечивается преимущество, связанное с удалением потенциальной точки распознавания аминокпептидаз и предотвращением возможной деградации бициклического пептида.

В альтернативном варианте осуществления, N-концевая модификация включает введение молекулярной спейсерной группы, которая облегчает конъюгацию эффекторных групп и способствует сохранению активности бициклического пептида в отношении его мишени.

В дополнительном варианте осуществления, модифицированное производное включает C-концевую модификацию. В дополнительном варианте осуществления, C-концевая модификация включает амидную группу. В этом варианте осуществления, C-концевую цистеиновую группу (обозначаемая в изобретении как C_{iii}) синтезирую в форме амида в процессе синтеза пептида, что приводит к образованию молекулы с амидированным C-концом. В этом варианте осуществления обеспечивается преимущество, связанное с удалением потенциальной точки распознавания карбоксипептидазы и снижением вероятности протеолитической деградации бициклического пептида.

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более аминокислотных остатков одним или более остатками неприродных

аминокислот. В этом варианте осуществления, могут быть выбраны неприродные аминокислоты, имеющие изостерические/изоэлектронные боковые цепи, которые не распознаются деградирующими протеазами и не оказывают никакого неблагоприятного воздействия на эффективность в отношении мишени.

В качестве варианта, могут быть использованы неприродные аминокислоты, имеющие стерически затрудненные аминокислотные боковые цепи, в результате чего конформационно и стерически затруднен протеолитический гидролиз соседней пептидной связи. В частности, они относятся к аналогам пролина, объемным боковым цепям, α -дизамещенным производным (например, аминоизомаляевой кислоте, Aib) и циклическим аминокислотам, простым производным которых является аминоклопропилкарбоновая кислота.

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

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков одним или более устойчивыми к окислению аминокислотными остатками. В другом варианте осуществления, модифицированное производное включает замену остатка триптофана остатком нафтилаланина или аланина. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество, связанное с улучшением профиля фармацевтической стабильности полученного бициклического пептидного лиганда.

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более заряженных аминокислотных остатков одним или более гидрофобными аминокислотными остатками. В альтернативном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более гидрофобных аминокислотных остатков одним или более заряженными аминокислотными остатками. Благоприятный баланс между заряженными и гидрофобными аминокислотными остатками является важной характеристикой бициклических пептидных лигандов. Например, гидрофобные аминокислотные остатки влияют на степень связывания с белками плазмы и, таким образом, на концентрацию доступной свободной фракции в плазме, в то время как заряженные аминокислотные остатки (в частности, аргинин) могут влиять на взаимодействие пептида с фосфолипидными мембранами на поверхности клеток. Эти два типа остатков в комбинации могут влиять на период полувыведения, объем распределения и воздействие пептидного лекарственного средства, и могут быть подобраны в соответствии с требуемым клиническим результатом. Кроме того, благоприятная комбинация и число заряженных аминокислотных остатков относительно гидрофобных аминокислотных остатков могут снижать раздражение в месте инъекции (при подкожном введении пептидного лекарственного средства).

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену

одного или более остатков L-аминокислоты одним или более остатками D-аминокислоты. В этом варианте осуществления предполагается, что такая замена позволяет повысить протеолитическую устойчивость за счет стерических затруднений и за счет способности D-аминокислоты стабилизировать конформационную изомерию (Tugyi et al (2005) PNAS, 102(2), 413-418).

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает удаление любых аминокислотных остатков и замену их аланинами. В этом варианте осуществления обеспечивается преимущество, связанное с удалением потенциального места (мест) протеолитической атаки.

Следует отметить, что каждая из упомянутых выше модификаций предназначена для планируемого повышения активности или стабильности пептида. Дополнительное повышение активности путем модификаций может быть достигнуто на основе следующих механизмов:

- введение гидрофобных фрагментов, которые обеспечивают гидрофобный эффект и приводят к более низким скоростям диссоциации, в результате чего достигаются более высокие степени аффинности;

- введение заряженных групп, которые обеспечивают ионные взаимодействия дальнего порядка, что приводит к более высоким скоростям ассоциации и к более высоким степеням аффинности (смотрите, например, Schreiber et al, Rapid, electrostatically assisted association of proteins (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31); и

- введение в пептид дополнительных ограничений степеней свободы путем, например, правильного выбора ограничения степеней свободы боковых цепей аминокислоты, благодаря чему минимизируется потеря энтропии при связывании с мишенью, ограничения степеней свободы торсионных углов основной цепи, благодаря чему минимизируется потеря энтропии при связывании с мишенью, и путем введения дополнительных циклов в молекулу по тем же самым причинам (обзорную информацию можно найти в публикациях Gentilucci et al, Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203, и Nestor et al, Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418).

Примеры модифицированных гетеротандемных бициклических пептидных комплексов по изобретению включают комплексы, приведенные в таблицах G и H ниже.

Таблица G. (EphA2: CD137; 1:2)

№ комплекса	№ BCY для EphA2	Точка присоединения	Линкер	№ BCY для CD137	Точка присоединения	Модификатор
BCY14415	BCY9594	N-конец	N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид)	BCY8928 BCY1338 9	dLys (PYA)4 dLys (PYA)4	Peg12-биотин

BCY14416	BCY9594	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928 BCY1338 9	dLys(PYA) ₄ dLys(PYA) ₄	Alexa Fluor® 488
BCY14417	BCY1311 8	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928 BCY1338 9	dLys(PYA) ₄ dLys(PYA) ₄	Peg12-биотин
BCY14418	BCY1311 8	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928 BCY1338 9	dLys(PYA) ₄ dLys(PYA) ₄	Alexa Fluor® 488

Таблица Н. (Нектин-4:CD137; 1:2)

№ комплекса	№ BCY для нектин-4	Точка присоединения	Линкер	№ BCY для CD137	Точка присоединения	Модификатор
BCY13582	BCY8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928, BCY13389	dLys(PYA) ₄ dLys(PYA) ₄	Биотин- Peg12
BCY13583	BCY8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928, BCY13389	dLys(PYA) ₄ dLys(PYA) ₄	Alexa Fluor 488
BCY13628	BCY8116	N-конец	N-(кислота-PEG ₃)-N-бис(PEG ₃ -азид)	BCY8928, BCY13389	dLys(PYA) ₄ dLys(PYA) ₄	Цианин 5

Изотопные варианты

Настоящее изобретение включает все фармацевтически приемлемые (радиоактивно)изотопно-меченые пептидные лиганды по изобретению, в которых один или более атомов заменены атомами, имеющими тот же атомный номер, но атомную массу или

массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе, и пептидные лиганды по изобретению, к которым присоединены хелатирующие металлы группы (называемые "эффektorными"), которые способны удерживать соответствующие (радиоактивные)изотопы, и пептидные лиганды по изобретению, в которых некоторые функциональные группы ковалентно заменены соответствующими (радиоактивными)изотопами или изотопно-мечеными функциональными группами.

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

Конкретные изотопно-меченые пептидные лиганды по изобретению, например, те, в которые введен радиоактивный изотоп, могут применяться в исследованиях распределения лекарственных соединений и/или субстратов в тканях, а также для клинической оценки присутствия и/или отсутствия мишени нектин-4 в пораженных тканях. Пептидные лиганды по изобретению могут дополнительно обладать ценными диагностическими свойствами, в силу чего они могут применяться для детекции или идентификации образования комплекса между меченым соединением и другими молекулами, пептидами, белками, ферментами или рецепторами. В методах детекции или идентификации могут использоваться соединения, которые мечены с помощью наносящих метку средств, таких как радиоизотопы, ферменты, флуоресцирующие вещества, люминесцирующие вещества (например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин и люцифераза), и так далее. В частности, с этой целью могут применяться радиоактивные изотопы тритий, то есть ^3H (T), и углерод-14, то есть ^{14}C , в виду простоты их введения и доступности средств для их детекции.

Замещение с помощью более тяжелых изотопов, таких как дейтерий, то есть ^2H (D), может давать определенные терапевтические преимущества, обусловленные более высокой метаболической стабильностью, например, повышение *in vivo* периода полувыведения или снижение величины необходимой дозы, и, следовательно, может быть предпочтительным при некоторых обстоятельствах.

Замещение с помощью позитрон-активных изотопов, таких как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , может применяться при проведении исследований методом позитронно-эмиссионная томография (PET) с целью определения степени занятости мишени.

Меченые изотопами соединения пептидных лигандов по изобретению, могут быть получены, как правило, обычными методами, известными специалистам в данной области, или методами, аналогичными методам, которые описаны в приводимых в изобретении примерах, путем использования соответствующего меченого изотопом реагента вместо применяемого ранее немеченого реагента.

Молекулярный каркас

Молекулярные каркасы описаны, например, в патентном документе WO 2009/098450 в цитируемых в нем, в частности, патентных документах WO 2004/077062 и WO 2006/078161.

Как отмечено в упомянутых выше документах, молекулярный каркас может представлять собой малую молекулу, такую как малая органическая молекула.

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

В одном варианте осуществления, молекулярный каркас включает реакционно-способные группы, которые способны реагировать с функциональной группой (группами) полипептида с образованием ковалентных связей.

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

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

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

Реакционноспособные группы каркаса, которые могут быть использованы на молекулярном каркасе для реакции с тиоловыми группами цистеинов, представляют собой алкилгалогениды (или также называемые галогеналканами).

Примеры включают бромметилбензол (реакционно-способная группа каркаса, примером которой является ТВМВ) или йодацетоамид. Другие реакционно-способные группы каркаса, которые используются для селективного связывания соединений с цистеинами в белках, представляют собой малеимиды, α -ненасыщенные карбонилсодержащие соединения и α -галогенметилкарбонилсодержащие соединения. Примеры малеимидов, которые могут быть использованы в изобретении в качестве молекулярных каркасов, включают трис-(2-малеимидо-этил)амин, трис-(2-малеимидоэтил)бензол, трис-(малеимидо)бензол. Примером $\alpha\beta$ -ненасыщенного карбонилсодержащего соединения является 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) (Angewandte Chemie, International Edition (2014), 53(6), 1602-1606). Примером α -галогенметилкарбонилсодержащего соединения является N, N',N''-(бензол-1,3,5-триил)трис(2-бромацетамид). Природной аминокислотой также является

селеноцистеин, который имеет реакционную способность, такую же как у цистеина, и может быть использован для тех же самых реакций. Поэтому, во всех случаях упоминания цистеина, допустима его замена на селеноцистеин, если из контекста не следует иное.

Синтез

Пептиды по настоящему изобретению могут быть получены синтетическим путем стандартными методами с последующей реакцией с молекулярным каркасом *in vitro*. После завершения этого процесса, могут быть использованы стандартные методы химии. Это позволяет быстро получать в большом количестве растворимый материал для проведения последующих экспериментов или валидации. Такие методы могут быть осуществлены с использованием традиционных химических методик, таких как описанные в упомянутой выше публикации Timmerman et al.

Поэтому, изобретение также относится к получению полипептидов или конъюгатов, выбранных как указано в изобретении, где получение включает необязательные дополнительные стадии, разъясняемые ниже. В одном варианте осуществления, эти стадии проводят на конечном продукте полипептид/конъюгат, полученном химическим синтезом.

Аминокислотные остатки в представляющем интерес полипептиде могут быть необязательно замещены при получении конъюгата или комплекса.

Пептиды могут быть также удлинены, например, для того чтобы ввести еще одну петлю и, следовательно, для достижения множественной специфичности.

Чтобы удлинить пептид, его можно просто удлинить химическими методами по его N-концу или C-концу или внутри петель с использованием ортогонально защищенных лизинов (и их аналогов) с использованием стандартных методов твердофазного синтеза или методов синтеза в растворе. Для введения активированного или активируемого N- или C-конца могут быть использованы стандартные методики (био)конъюгации. В качестве варианта, добавления могут быть осуществлены фрагментарной конденсацией или нативным химическим лигированием, например, как описано в публикации Dawson et al. 1994. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science* 266:776-779, или с помощью ферментов, например, используя субтилигазу, как это описано в публикациях Chang et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 20; 91(26):12544-8 или Hikari et al *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003.

В качестве варианта, пептиды могут быть удлинены или модифицированы путем дальнейшей конъюгации за счет использования дисульфидных связей. Этот подход имеет дополнительное преимущество, обусловленное тем, что он позволяет разъединение друг от друга первого и второго пептидов сразу после попадания в восстановительную среду клетки. В этом случае, молекулярный каркас (например, ТАТА) может быть добавлен в процессе химического синтеза первого пептида, для того чтобы прореагировать с тремя цистеиновыми группами; затем к N- или C-концу первого пептида может быть присоединен дополнительный цистеин или тиол, вследствие чего этот цистеин или тиол реагирует только со свободным цистеином или тиолом вторых пептидов, образуя связанный дисульфидной связью бициклический конъюгат пептид-пептид.

Аналогичные методы в равной степени применимы к синтезу/связыванию двух бициклических и биспецифичных макроциклов, что позволяет создавать тетраспецифичные молекулы.

Кроме того, аналогичным образом может быть осуществлено добавление других функциональных групп или эффекторных групп, путем использования соответствующих химических реакций, присоединения на N- или C-концах или через боковые цепи. В одном варианте осуществления, присоединение осуществляют таким образом, что оно не блокирует активность ни одного объекта.

Фармацевтические композиции

Согласно дополнительному аспекту изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, включающая определенный в изобретении пептидный лиганд в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

Как правило, пептидные лиганды по настоящему изобретению должны использоваться в очищенной форме вместе с фармакологически приемлемыми вспомогательными веществами или носителями. Обычно, эти вспомогательные вещества или носители включают водный или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физиологический раствор и/или забуференные среды. Среда для парентерального введения включает раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, раствор декстрозы и хлорида натрия и раствор Рингера с лактатом. Подходящие физиологически приемлемые вспомогательные вещества, если необходимо поддерживать полипептидный комплекс в форме суспензии, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Среда для внутривенного введения включает жидкость и средства для восполнения питательных веществ и средства для восстановления содержания электролитов, такие как растворы Рингера с декстрозой. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition).

Пептидные лиганды по настоящему изобретению могут быть использованы в форме отдельно вводимых композиций или в сочетании с другими лекарственными средствами. Они могут включать антитела, фрагменты антител и различные иммунотерапевтические препараты, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин, а также иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать "коктейли" из различных цитотоксических или других лекарственных средств в сочетании с белковыми лигандами по настоящему изобретению или даже в комбинации с выбранными полипептидами по настоящему изобретению, обладающими различной специфичностью, такими как полипептиды, выбранные с использованием различных целевых лиганд, независимо от того, объединят ли их или не объединяют перед введением.

Способ введения фармацевтических композиций по изобретению может представлять собой любой из способов, хорошо известных специалистам в данной области. С целью проведения терапии, пептидные лиганды по изобретению могут быть введены

любому пациенту стандартными способами. Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, включая парентеральный, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, трансдермальный способы введения, путем ингаляции или, в случае необходимости, путем прямой инфузии через катетер. Предпочтительно вводить фармацевтические композиции по изобретению путем ингаляции. Доза и частота введения будут зависеть от возраста, пола и состояния пациента, одновременного введения других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые должны учитываться лечащим врачом.

Пептидные лиганды по настоящему изобретению могут быть лиофилизированы для хранения и затем диспергированы в подходящей среде перед использованием. Было показано, что этот подход является эффективным, и могут быть использованы известные в данной области методы лиофилизации и диспергирования. Для специалистов в данной области является очевидным, что лиофилизация и диспергирование могут приводить к потере в различной степени активности, и что может потребоваться корректировка уровней в сторону увеличения для компенсации этих потерь.

Композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их коктейль, могут быть введены с целью профилактического и/или терапевтического лечения. В некоторых вариантах терапевтического применения, количество, достаточное для достижения, по меньшей мере, частичного ингибирования, подавления, модуляции, уничтожения или какого-либо другого измеримого параметра популяции выбранных клеток, определяется как "терапевтически эффективная доза". Количества, необходимые для достижения этой дозы, будут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния собственной иммунной системы пациента, и они обычно изменяются в диапазоне от 0,005 до 5,0 мг выбранного пептидного лиганда на килограмм массы тела, причем чаще всего используют дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/доза. Для профилактических целей, композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их смеси, могут быть также введены в аналогичных или чуть более низких дозах.

Композиция, содержащая пептидный лиганд по настоящему изобретению, может быть использована в профилактических и терапевтических целях для содействия изменению, инактивации, уничтожению или удалению выбранной популяции клеток-мишеней у млекопитающего. Кроме того, описанные в изобретении пептидные лиганды могут быть использованы экстракорпорально или селективно *in vitro* для уничтожения, истощения или иного эффективного удаления популяции клеток-мишеней из гетерогенного набора клеток. Кровь млекопитающего может быть экстракорпорально объединена с выбранными пептидными лигандами, в результате чего нежелательные клетки уничтожаются или иным образом удаляются из крови, которую затем возвращают млекопитающему, используя стандартные методы.

Терапевтическое применение

Согласно дополнительному аспекту изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, включающая указанный в изобретении гетеротандемный бициклический

пептидный комплекс для применения с целью предотвращения, подавления или лечения рака.

Примеры видов рака (и их доброкачественных аналогов), которые могут быть подвергнуты лечению (или подавлены) включают, но этим не ограничивая, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциномы, плоскоклеточный рак, переходные клеточные карциномы и другие карциномы), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевых путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (включая карциномы пищевода, желудка (желудочные), тонкой кишки, толстой кишки, прямой кишки и заднего прохода), печени (гепатоцеллюлярную карциному), желчного пузыря и желчевыводительной системы, экзокринной части поджелудочной железы, почек, легких (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легких, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), карциномы головы и шеи (например, рак языка, ротовой полости, гортани, глотки, носоглотки, миндалин, слюнных желез, полости носа и околоносовых пазух), яичников, маточных труб, брюшной полости, влагалища, вульвы, пениса, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярную карциному щитовидной железы), надпочечников, предстательной железы, кожи и прилежащих органов (например, меланому, базальноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, кератоакантому, диспластический невус); гематологические злокачественные опухоли (например, лейкозы, лимфомы) и предраковые гематологические нарушения и нарушения с пограничной злокачественностью, включая гематологические злокачественные заболевания и связанные с ними состояния клеток лимфоидного ряда (например, острый лимфолейкоз [ALL], хронический лимфолейкоз [CLL], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лимфома клеток мантийной зоны, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы натуральных клеток-киллеров [NK], лимфомы Ходжкина, лейкоз ворсистых клеток, моноклональную гаммапатию неясного генеза, плазмцитому, множественную миелому и лимфопролиферативные нарушения после трансплантации), а также гематологические злокачественные и родственные состояния клеток миелоидного ряда (например, острый миелолейкоз [AML], хронический миелолейкоз [CML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелопролиферативные расстройства, такие как полицитемия вера, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелопролиферативный синдром, синдром миелодисплазии и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимального происхождения, например, саркомы мягких тканей, кости или хряща, такие как остеосаркомы, фибросаркомы, хондросаркомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, саркому Капоши, саркому Юинга, синовиальную саркому, эпителиоидные саркомы, желудочно-кишечные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные гистоцитомы и дерматофибросаркому протуберанс; опухоли центральной или периферической нервной системы (например,

астроцитомы, глиомы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, опухоли эпифиза и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островковых клеток, опухоли паращитовидных желез, карциноидные опухоли и медуллярную карциному щитовидной железы); опухоли глаз и их придатков (например, ретинобластому); опухоли зародышевых клеток и трофобласта (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы, пузырный занос и хориокарциному); и педиатрические и эмбриональные опухоли (например, медуллобластомы, нейробластомы, опухоль Вильмса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, которые делают больного восприимчивым к возникновению злокачественного новообразования (например, пигментной ксеродермы).

В дополнительном варианте осуществления, рак выбирают из злокачественных гематологических заболеваний, таких как неходжкинская лимфома (NHL), лимфома Беркитта (BL), множественная миелома (MM), В-клеточный хронический лимфолейкоз (B-CLL), В- и Т-клеточный острый лимфолейкоз (ALL), Т-клеточная лимфома (TCL), острый миелолейкоз (AML), лейкоз ворсистых клеток (HCL), лимфома Ходжкина (HL) и хронический миелолейкоз (CML).

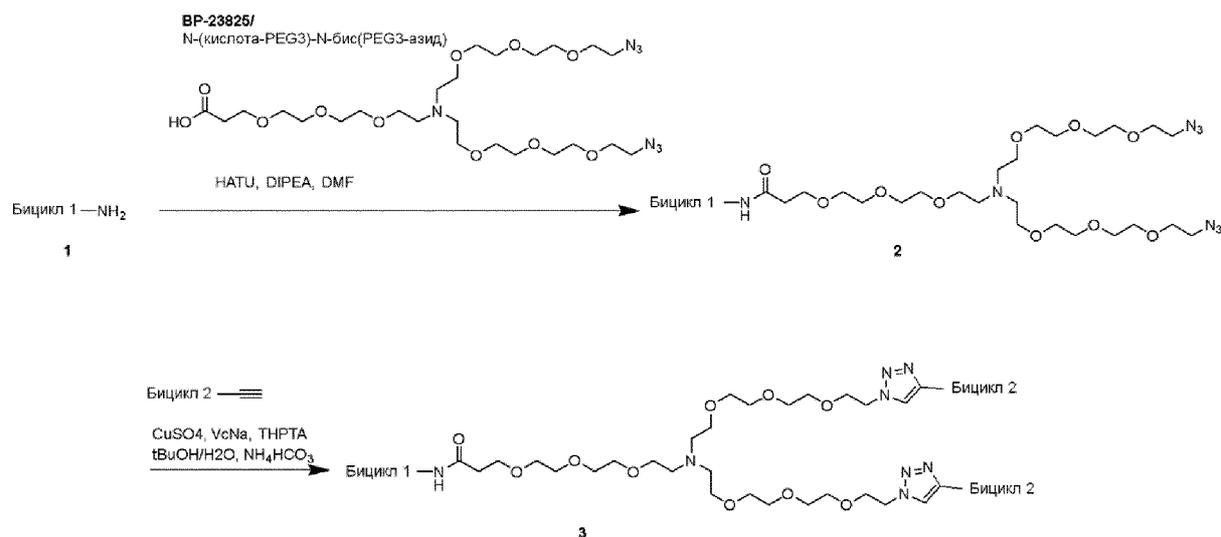
Используемый в изобретении термин "предотвращение" включает введение защищающей композиции до возникновения заболевания. "Подавление" относится к введению композиции после события, приводящего к возникновению заболевания, но до клинического проявления заболевания. "Лечение" включает введение защищающей композиции после проявления симптомов заболевания.

Известны и доступны системы экспериментальных моделей на животных, которые могут быть использованы для скрининга эффективности пептидных лигандов для предотвращения или лечения заболевания. Настоящее изобретение позволяет облегчить использование систем моделей на животных, что дает возможность разрабатывать полипептидные лиганды, которые могут перекрестно реагировать с мишенями у человека и животных, что и позволяет использовать модели на животных.

Далее изобретение дополнительно описано с помощью представленных ниже примеров.

ПРИМЕРЫ

В большинстве случаев, некоторые из гетеротандемным бициклических пептидных комплексов по изобретению могут быть получены следующим общим методом:



Все растворители дегазируют и продувают с помощью N₂ 3 раза. Раствор BP-23825 (1,0 экв), HATU (1,2 экв) и DIEA (2,0 экв) в DMF смешивают в течение 5 минут, затем добавляют Бицикл 1 (1,2 экв). Реакционную смесь перемешивают при 40°C в течение 16 часов. Реакционную смесь затем концентрируют при пониженном давлении с удалением растворителя и очищают препаративной HPLC с получением промежуточного соединения 2.

Смесь промежуточного соединения 2 (1,0 экв) и бицикла 2 (2,0 экв) растворяют в t-BuOH/H₂O (1:1), и затем добавляют CuSO₄ (1,0 экв), VcNa (4,0 экв) и THPTA (2,0 экв). И наконец, добавляют 0,2 М NH₄HCO₃ для доведения величины pH до 8. Реакционную смесь перемешивают при 40°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. Реакционную смесь непосредственно очищают препаративной HPLC.

Гетеротандемные бициклические пептидные комплексы, которые были получены этим методом, приведены ниже.

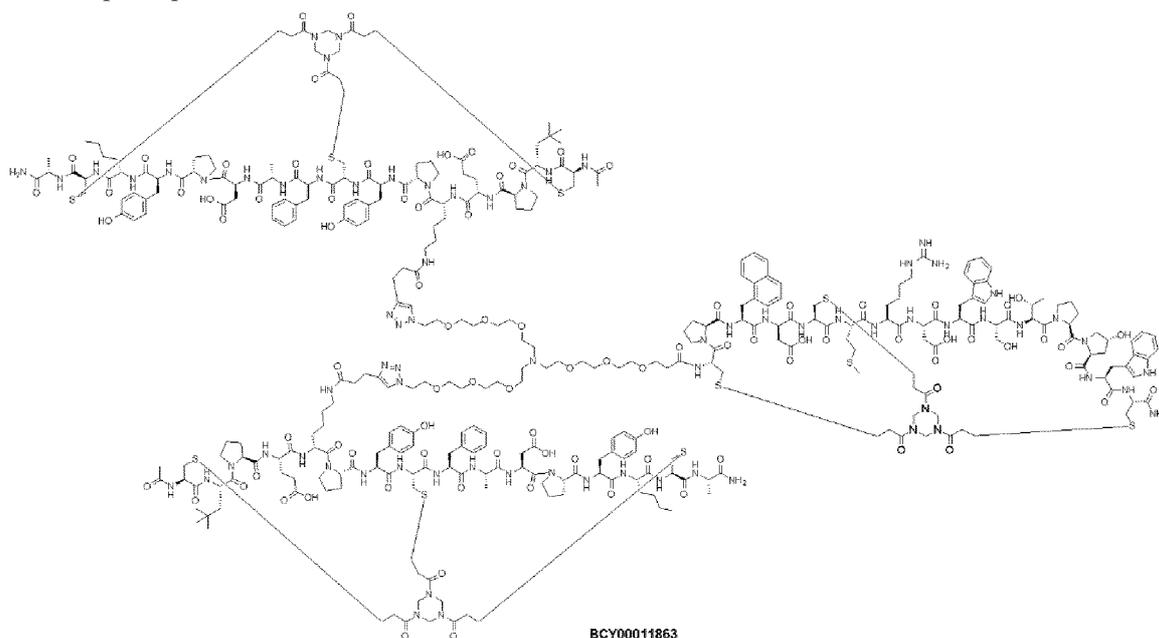
EphA2/CD137	Нектин/CD137	PDL1/CD137
BCY12491	BCY11385	BCY12662
BCY12723	BCY11864	BCY12722
BCY12724	BCY11863	
BCY12725	BCY12484	OX40
BCY12726	BCY12485	BCY12967
BCY12728	BCY12486	
BCY12729	BCY12487	
BCY12730	BCY12490	
BCY12731	BCY12586	
BCY12732	BCY12587	
BCY12973	BCY12589	
BCY12974	BCY12590	

BCY12975	BCY12588	
BCY12976	BCY12760	
BCY12977	BCY12761	
BCY12978	BCY14602	
BCY13042		
BCY13043		
BCY13044		
BCY13045		
BCY13046		
BCY13047		
BCY13048		
BCY13049		
BCY13050		
BCY13051		
BCY13052		
BCY13053		
BCY13054		
BCY13138		
BCY13139		
BCY13140		
BCY13270		
BCY13271		
BCY13272		
BCY13273		
BCY13274		
BCY13275		
BCY13276		
BCY13277		
BCY13278		
BCY13279		
BCY13280		
BCY13281		
BCY13282		
BCY13283		

BCY13284		
BCY13285		
BCY13286		
BCY13287		
BCY13288		
BCY13289		
BCY13341		
BCY13343		
BCY14049		
BCY14050		
BCY14051		
BCY14052		
BCY14053		
BCY14054		
BCY14055		
BCY14056		
BCY14334		
BCY14335		
BCY15217		

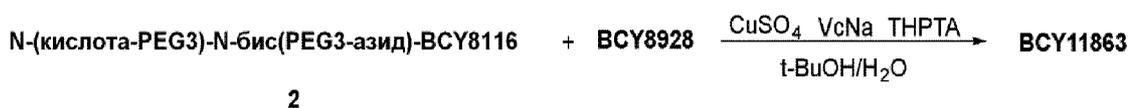
Более подробные описания экспериментов по получению выбранных гетеротандемных бициклических пептидных комплексов по изобретению приведены ниже.

Пример 1. Синтез BCY11863



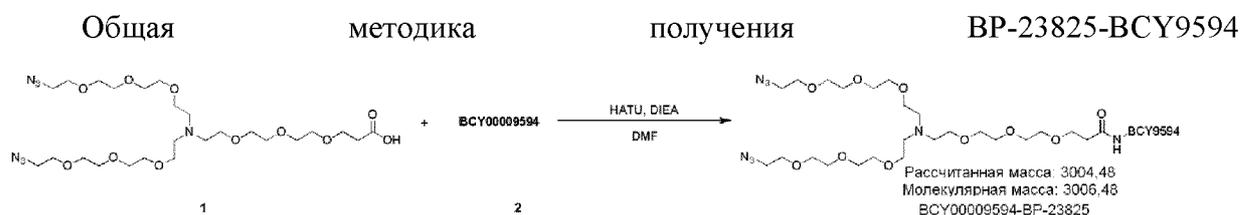
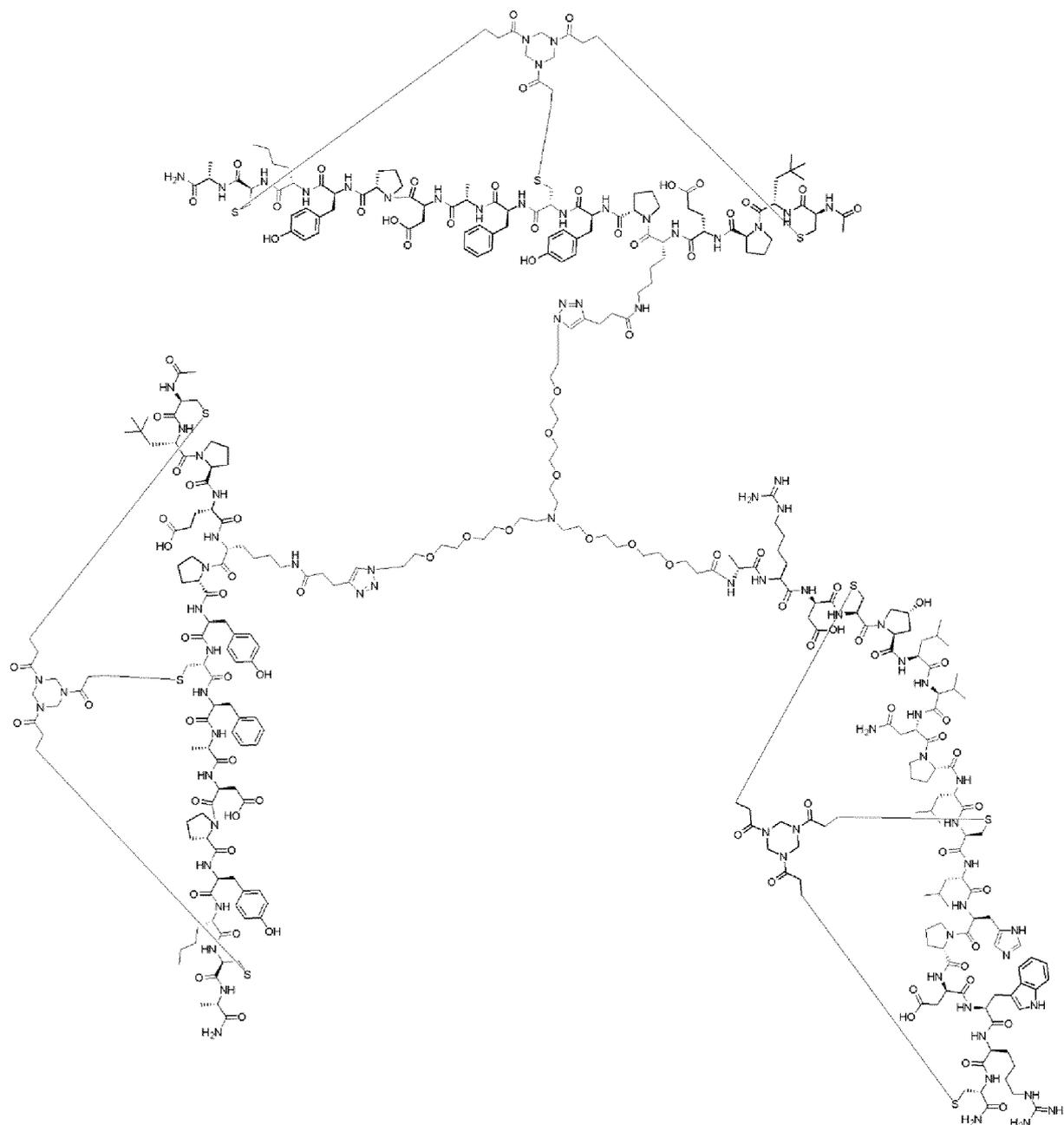
Получение соединения 2

Смесь N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид) (70,0 мг, 112,2 мкмоль, 1,0 экв), HATU (51,2 мг, 134,7 мкмоль, 1,2 экв) и DIEA (29,0 мг, 224,4 мкмоль, 40 мкл, 2,0 экв) растворяли в DMF (2 мл) и смешивали в течение 5 минут. Затем добавляли BCY8116 (294,0 мг, 135,3 мкмоль, 1,2 экв). Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что оставалась непрореагировавшим небольшое количество соединения 2 (MW: 2172,49, наблюдаемое значение m/z: 1087,1) и был обнаружен основной пик с требуемой величиной m/z (MW: 2778,17, наблюдаемые значения m/z: 1389,3 ([M/2+H⁺]), 926,7 ([M/3+H⁺])). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получали остаток. Остаток затем очищали препаративной HPLC (нейтральные условия). Соединение 2 (194,5 мг, 66,02 мкмоль, 29,41% выход, 94,3% чистота) получали в виде белого твердого вещества.

Получение BCY11863

Смесь соединения 2 (100,0 мг, 36,0 мкмоль, 1,0 экв), BCY8928 (160,0 мг, 72,0 мкмоль, 2,0 экв) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 180 мкл, 1,0 экв) и VcNa (28,5 мг, 143,8 мкмоль, 4,0 экв), THPTA (31,2 мг, 71,8 мкмоль, 2,0 экв). И наконец, добавляли 0,2 М NH₄HCO₃ для доведения величины pH до 8. Все растворители дегазировали и продували с помощью N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что оставался BCY8928 и также обнаруживали требуемую величину m/z (рассчитанная MW: 7213,32, обнаруженная величина m/z: 1444,0 ([M/5+H⁺])). Реакционную смесь непосредственно очищали препаративной HPLC. Первая очистка давала BCY11863 (117,7 мг, 15,22 мкмоль, 42,29% выход, 93,29% чистота) в виде TFA соли, в то время как менее чистые фракции очищали снова препаративной HPLC (TFA условие), получая BCY11863 (33,2 мг, 4,3 мкмоль, 11,92% выход, 95,55% чистота) в виде TFA соли.

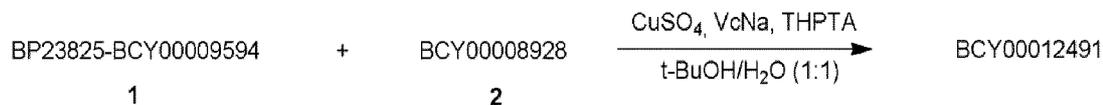
Пример 2. Синтез BCY12491



К смеси соединения 1 (ВР-23825, 60,0 мг, 96,2 мкмоль, 1,0 экв) в DMF (3 мл) добавляли DIEA (12,4 мг, 96,2 мкмоль, 16,8 мкл, 1,0 экв) и HATU (38,4 мг, 101 мкмоль, 1,05 экв), и смесь перемешивали в течение 5 минут. Затем к смеси добавляли ВСУ9594 (243 мг, 101 мкмоль, 1,05 экв) и продували с помощью N₂ 3 раза, затем перемешивали при 40°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной

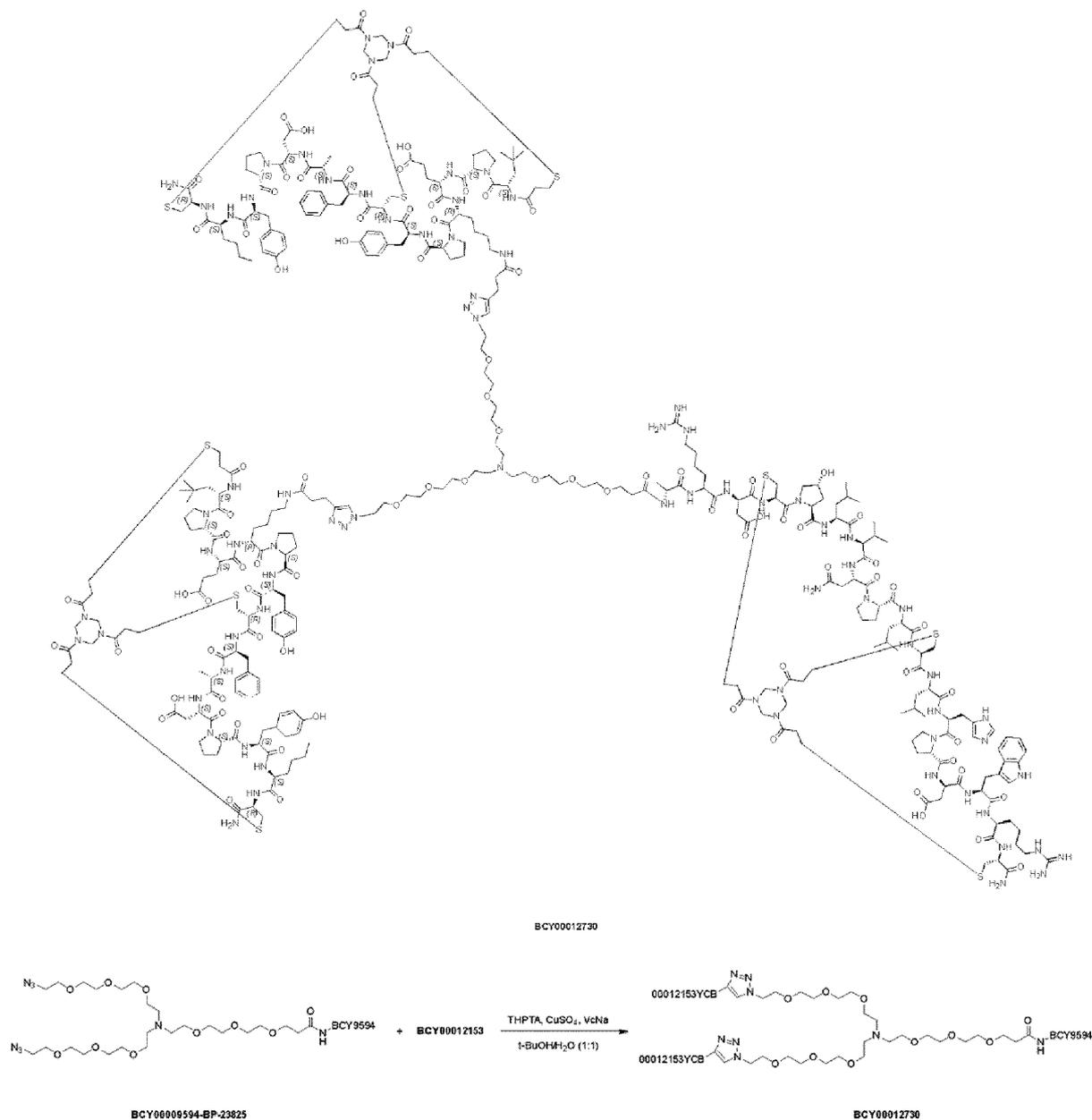
m/z. Реакционную смесь очищали препаративной HPLC с получением (BP-23825)-BCY9594 (154 мг, 48,1 мкмоль, 50,0% выход, 94,0% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 3006,48, наблюдаемые величины m/z: 1002,8 [M/3+H]⁺, 1504,4 [M/2+H]⁺

Общая методика получения соединения BCY12491



Смесь соединения 1 (56,0 мг, 18,6 мкмоль, 1,0 экв), BCY8928 (83,0 мг, 37,2 мкмоль, 2,0 экв) и THPTA (17,0 мг, 39,1 мкмоль, 2,1 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂ 3 раза), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 94,0 мкл, 2,0 экв) и VcNa (15,0 мг, 74,5 мкмоль, 4,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М раствора NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал светло-желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 3 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 3 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC (TFA условие) и получали BCY12491 (59,2 мг, 7,79 мкмоль, 41,81% выход, 97,9% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7441,63, наблюдаемые величины m/z: 1861,1 ([M/4+H]⁺), 1489,0 ([M/5+H]⁺).

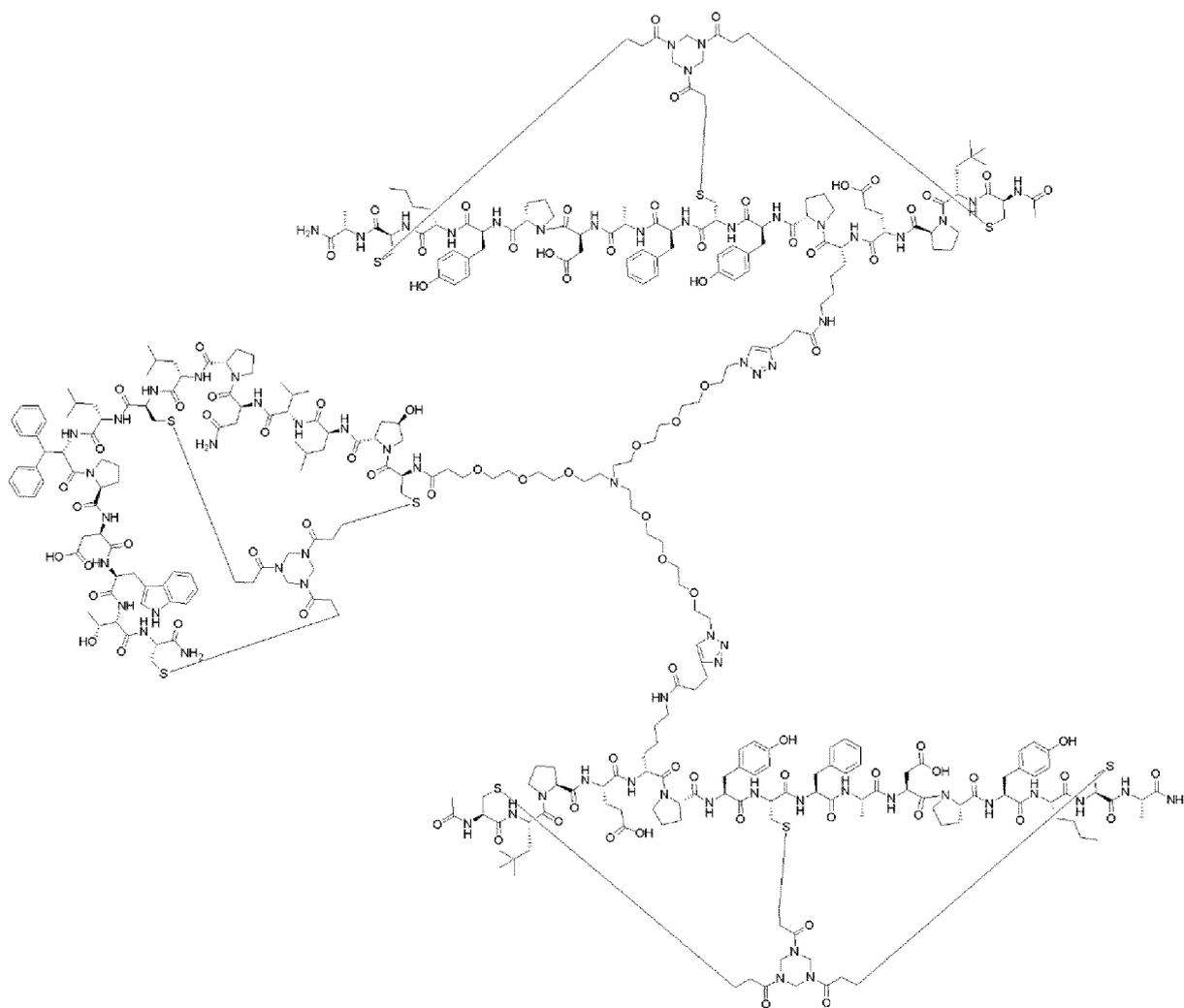
Пример 3. Синтез BCY12730



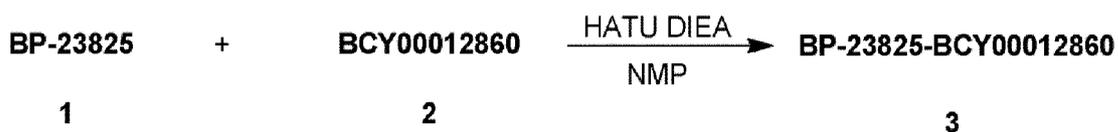
Общая методика получения соединения BCY12730

Смесь (BP-23825)-BCY9594 (20,0 мг, 6,65 мкмоль, 1,0 экв), BCY12153 (27,8 мг, 13,3 мкмоль, 2,0 экв) и THPTA (5,8 мг, 13,3 мкмоль, 2,0 экв) растворяли в *t*-BuOH (0,5 мл) и H₂O (0,5 мл) (все растворители предварительно дегазировали и продували с помощью N₂ 3 раза), и затем к смеси добавляли CuSO₄ (0,4 М, 33,3 мкл, 13,3 мкмоль, 2,0 экв), VcNa (0,4 М, 66,5 мкл, 26,6 мкмоль, 4,0 экв) в атмосфере N₂. Затем к смеси добавляли NH₄HCO₃ для доведения величины pH до 8. Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что был обнаружен один основной пик с требуемой величиной *m/z*. Реакционную смесь очищали два раза препаративной HPLC с получением соединения BCY12730 (7,50 мг, 0,84 мкмоль, 12,7% выход, 96,3% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7185,39, наблюдаемые величины *m/z*: 1197,5 [M/6+H]⁺, 1438,4 [M/5+H]⁺.

Пример 4. Синтез BCY13048

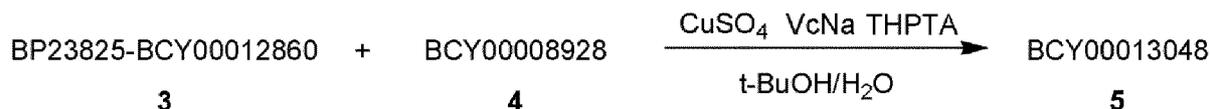


Методика получения BP-23825-BCY12860

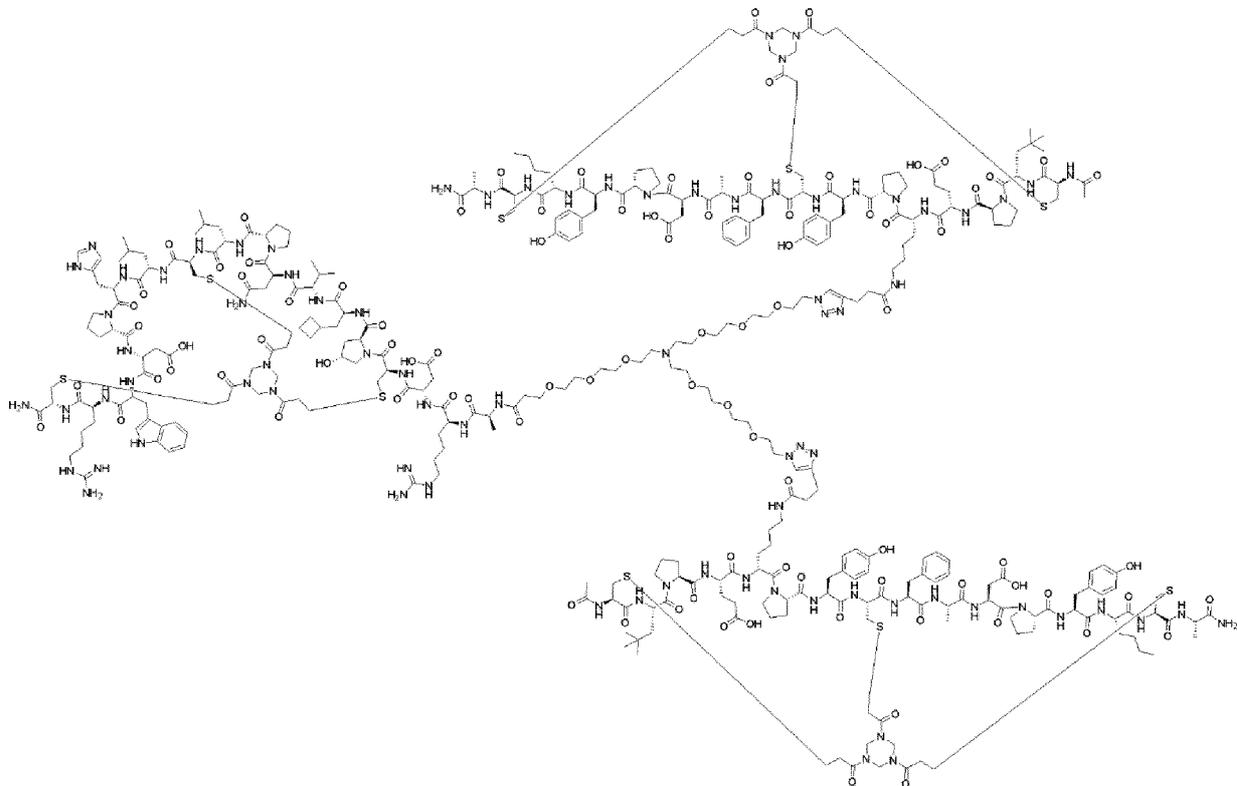


Смесь BP-23825 (12,0 мг, 19,24 мкмоль, 1,2 экв) и HATU (7,32 мг, 19,24 мкмоль, 1,2 экв) растворяли в NMP (0,3 мл), затем величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA (5,12 мг, 40,26 мкмоль, 7 мкл, 2,4 экв), и затем раствор активировали при 40°C в течение 5 минут. Соединение 2 (33,0 мг, 16,03 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в NMP (0,5 мл), и затем добавляли по каплям к активированному раствору, величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 0,5 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что BCY12860 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z (MW: 2667,12, наблюдаемые величины m/z: 1334,2 ([M/2+H⁺]), 889,8 ([M/3+H⁺])). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получали остаток. Остаток затем очищали препаративной HPLC (нейтральные условия). BP-23825-BCY12860 (26,5 мг, 7,88 мкмоль, 49,12% выход, 79,26% чистота) получали в виде белого твердого вещества.

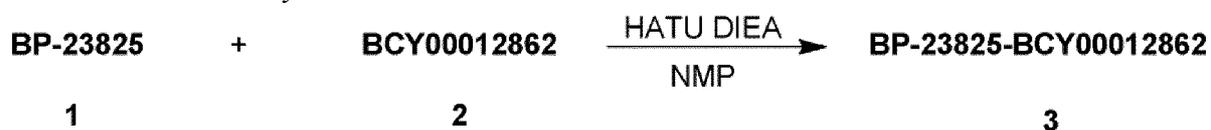
Методика получения ВСУ13048



Смесь соединения 3 (26,5 мг, 9,94 мкмоль, 1,0 экв), соединения 4 (47,0 мг, 20,87 мкмоль, 2,1 экв) и THPTA (0,4 М, 58 мкл, 2,3 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂ 3 раза), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 58 мкл, 2,3 экв) и VcNa (0,4 М, 115 мкл, 4,6 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал светло-желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что оставалось соединение 4, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z (рассчитанная величина MW: 7102,28, наблюдаемые величины m/z: 1776,4([M/4+H]⁺), 1421,3([M/3+H]⁺)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC (TFA условие), и получали ВСУ13048 (14,1 мг, 1,91 мкмоль, 19,00% выход, 96,2% чистота) в виде белого твердого вещества.

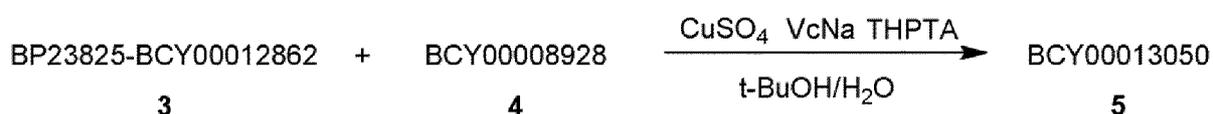
Пример 5. Синтез ВСУ13050

Методика получения ВР-23825-ВСУ12862



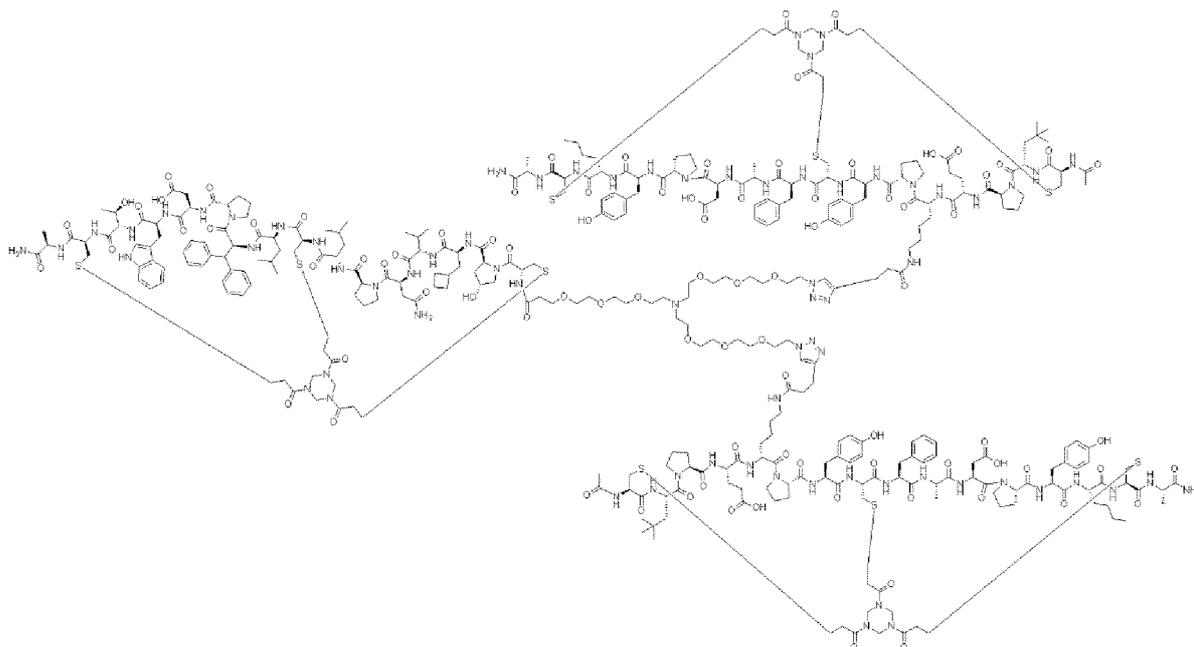
Смесь ВР-23825 (10,0 мг, 16,03 мкмоль, 1,2 экв) и НАТУ (6,10 мг, 16,03 мкмоль, 1,2 экв) растворяли в NMP (0,3 мл), затем величину рН этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA (4,45 мг, 34,37 мкмоль, 6 мкл, 2,6 экв), и затем раствор перемешивали при 25°C в течение 6 минут. Соединение 2 (33,0 мг, 13,36 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в NMP (0,5 мл) и затем добавляли по каплям в активированный раствор. Величину рН этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 0,5 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что ВСУ12862 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z (MW: 3018,49, наблюдаемая величина m/z: 1007,0 ($[(M/3+H)^+]$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получали остаток. Остаток затем очищали препаративной HPLC (нейтральные условия). Получали ВР-23825-ВСУ12862 (20,9 мг, 6,92 мкмоль, 51,82% выход, 94,9% чистота) в виде белого твердого вещества.

Методика получения ВСУ13050



Смесь соединения 3 (20,9 мг, 6,92 мкмоль, 1,0 экв), соединения 4 (32,2 мг, 14,54 мкмоль, 2,1 экв) и THPTA (7,0 мг, 15,93 мкмоль, 2,3 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂ 3 раза), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 39 мкл, 2,3 экв) и VcNa (6,3 мг, 31,85 мкмоль, 4,6 экв) в атмосфере N₂. Величину рН этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал светло-желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что оставалось соединение 4, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z (рассчитанная величина MW: 7453,66, наблюдаемая величина m/z: 1864,2($[(M/4+H)^+]$)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC (TFA условие), и получали ВСУ13050 (6,0 мг, 0,77 мкмоль, 11,24% выход, 96,7% чистота) в виде белого твердого вещества.

Пример 6. Синтез ВСУ13053



Методика получения ВСУ12865-ВР23825



ВР-23825 (14,0 мг, 22,45 мкмоль, 1,2 экв) и HATU (8,5 мг, 22,35 мкмоль, 1,2 экв) сначала растворяли в 0,5 мл NMP, затем добавляли DIEA (7,8 мкл, 44,77 мкмоль, 2,4 экв), смесь перемешивали при 25°C в течение 6 минут, и затем добавляли ВСУ12865 (40,0 мг, 18,65 мкмоль, 1,0 экв). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Анализ методом LC-MS показывал наличие одного пика с требуемой величиной m/z (рассчитанная величина MW: 2750,21, наблюдаемая величина m/z : 1375,5 ($[M/2+H]^+$)). Реакционную смесь очищали препаративной HPLC (TFA условие) и получали соединение 1 (15,9 мг, 5,78 мкмоль, 31,0% выход, 96,69% чистота) в виде белого твердого вещества.

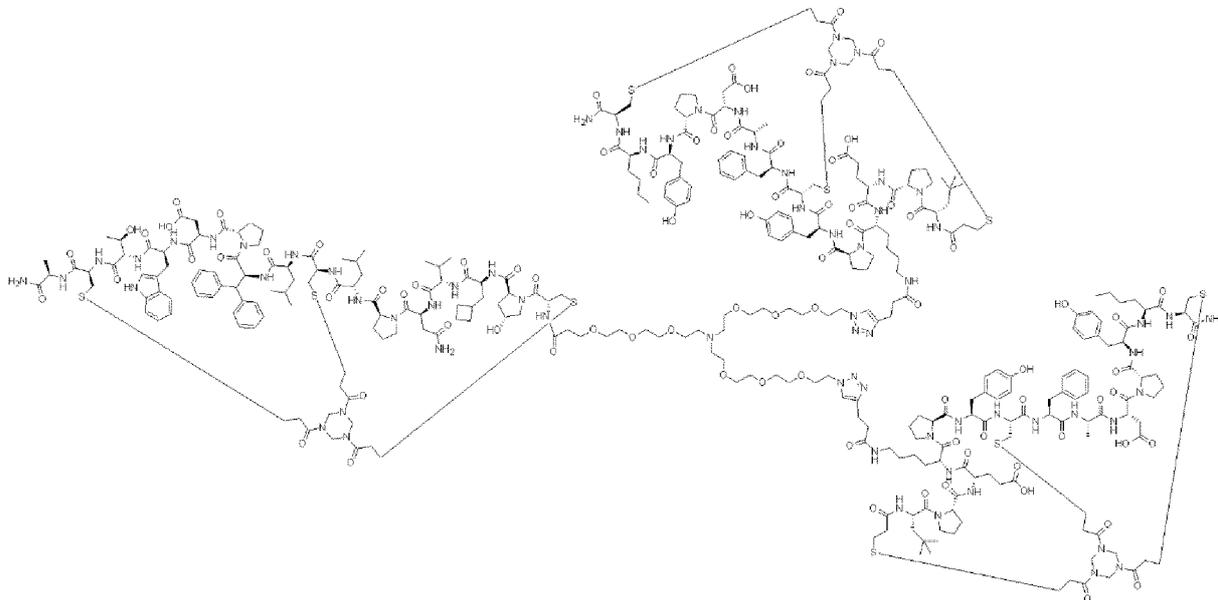
Методика получения ВСУ13053



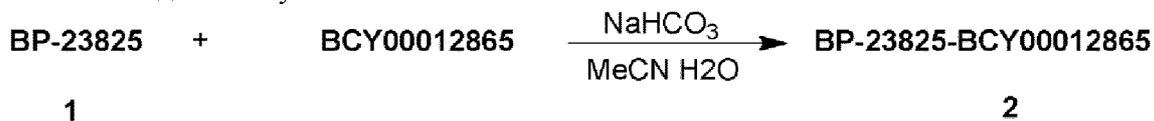
Соединение 1 (15,9 мг, 5,78 мкмоль, 1,0 экв) и ВСУ8928 (26,0 мг, 11,72 мкмоль, 2,1 экв) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 29,0 мкл, 2,0 экв), VcNa (4,6 мг, 23,2 мкмоль, 4,0 экв) и THPTA (5,1 мг, 11,7 мкмоль, 2,0 экв). И наконец, добавляли 0,2 М NH₄HCO₃ для доведения величины pH до 8. Все растворители дегазировали и продували с помощью N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение

1 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z (рассчитанная величина MW: 7185,38, наблюдаемая величина m/z : 1796,7 ($[M/4+H]^+$)). Реакционную смесь очищали препаративной HPLC (TFA условие) и получали BCY13053 (21,8 мг, 3,03 мкмоль, 52,84% выход, 98,01% чистота) в виде белого твердого вещества.

Пример 7. Синтез BCY13341

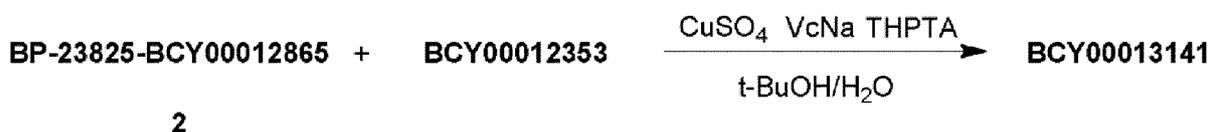


Методика получения BP-23825-BCY12865



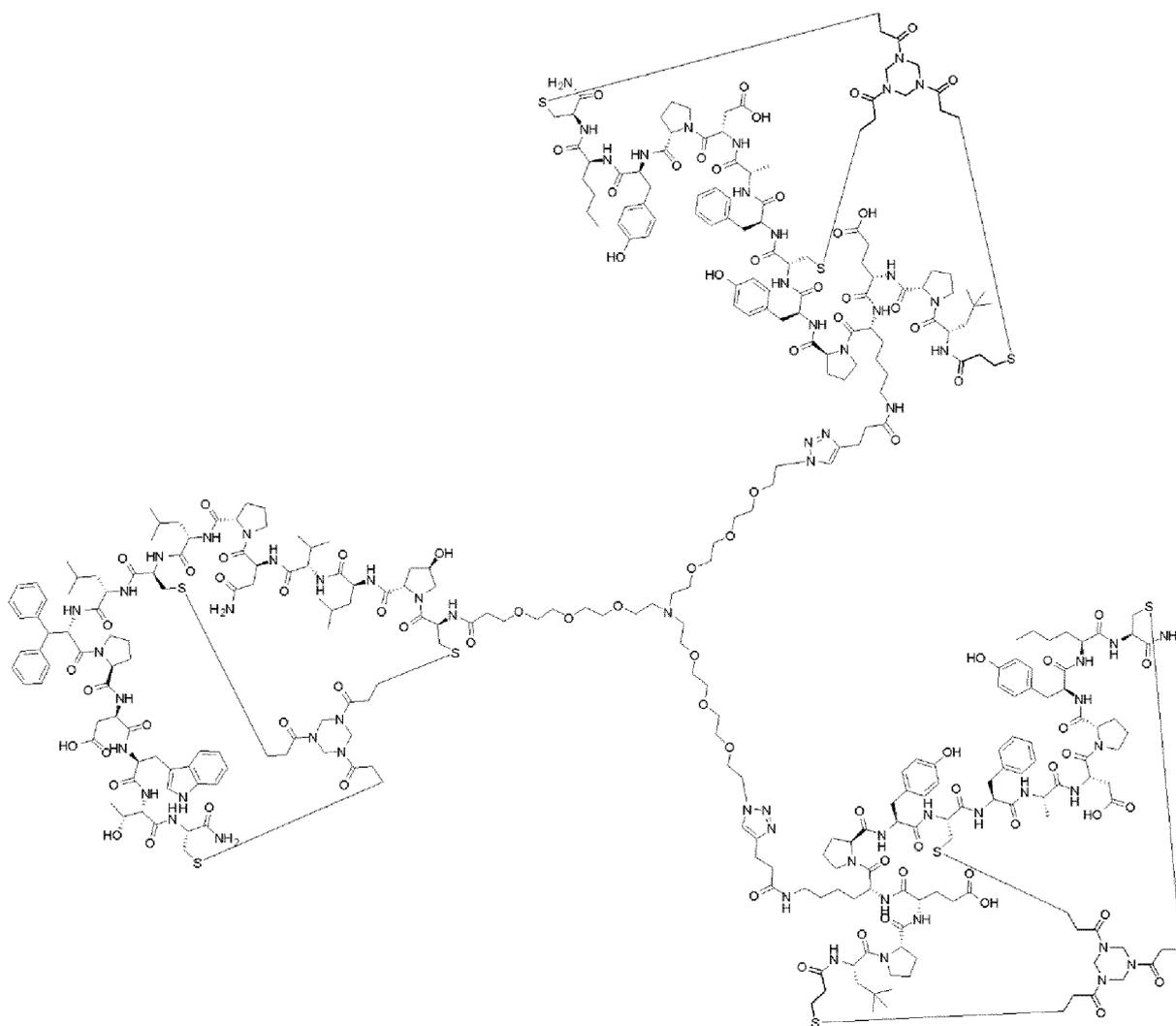
Смесь соединения 1 (14,0 мг, 22,45 мкмоль, 1,20 экв) и НАТУ (8,5 мг, 22,37 мкмоль, 1,20 экв) растворяли в NMP (0,3 мл), затем величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA (5,8 мг, 44,86 мкмоль, 7,8 мкл, 2,40 экв), и затем раствор активировали при 25°C в течение 6 минут. BCY12865 (40,0 мг, 18,65 мкмоль, 1,00 экв) растворяли в NMP (0,2 мл), и затем добавляли по каплям к активируемому раствору. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что BCY12865 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z (MW: 2750,21, наблюдаемые величины m/z : 1375,5 ($[(M/2+H)^+]$) and 917,3 ($[(M/3+H)^+]$)). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получали остаток. Остаток затем очищали препаративной HPLC (нейтральные условия). Получали соединение 2 (20,6 мг, 7,24 мкмоль, 38,83% выход, 95,51% чистота) в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY13341

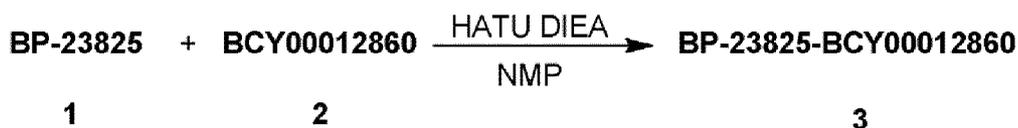


Смесь соединения 2 (20,6 мг, 7,49 мкмоль, 1,00 экв), ВСУ12353 (31,5 мг, 15,08 мкмоль, 2,01 экв) и ТНРТА (7,0 мг, 16,11 мкмоль, 2,15 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂ 3 раза), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 37,5 мкл, 2,00 экв) и VcNa (6,0 мг, 30,29 мкмоль, 4,04 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал светло-желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал наличие одного основного пика с требуемой величиной m/z (рассчитанная величина MW: 6929,13, наблюдаемые величины m/z: 1386,5([M/5+H]⁺) и 1155,8([M/6+H]⁺)). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC (первый цикл при TFA условия и второй цикл при AcOH условия), и получали ВСУ13341 (10,3 мг, 1,49 мкмоль, 19,85% выход, 93,48% чистота) в виде белого твердого вещества.

Пример 8. Синтез ВСУ13343

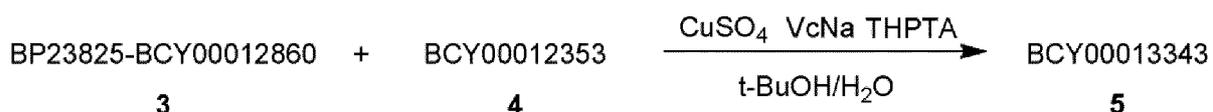


Методика получения ВР-23825-ВСУ12860



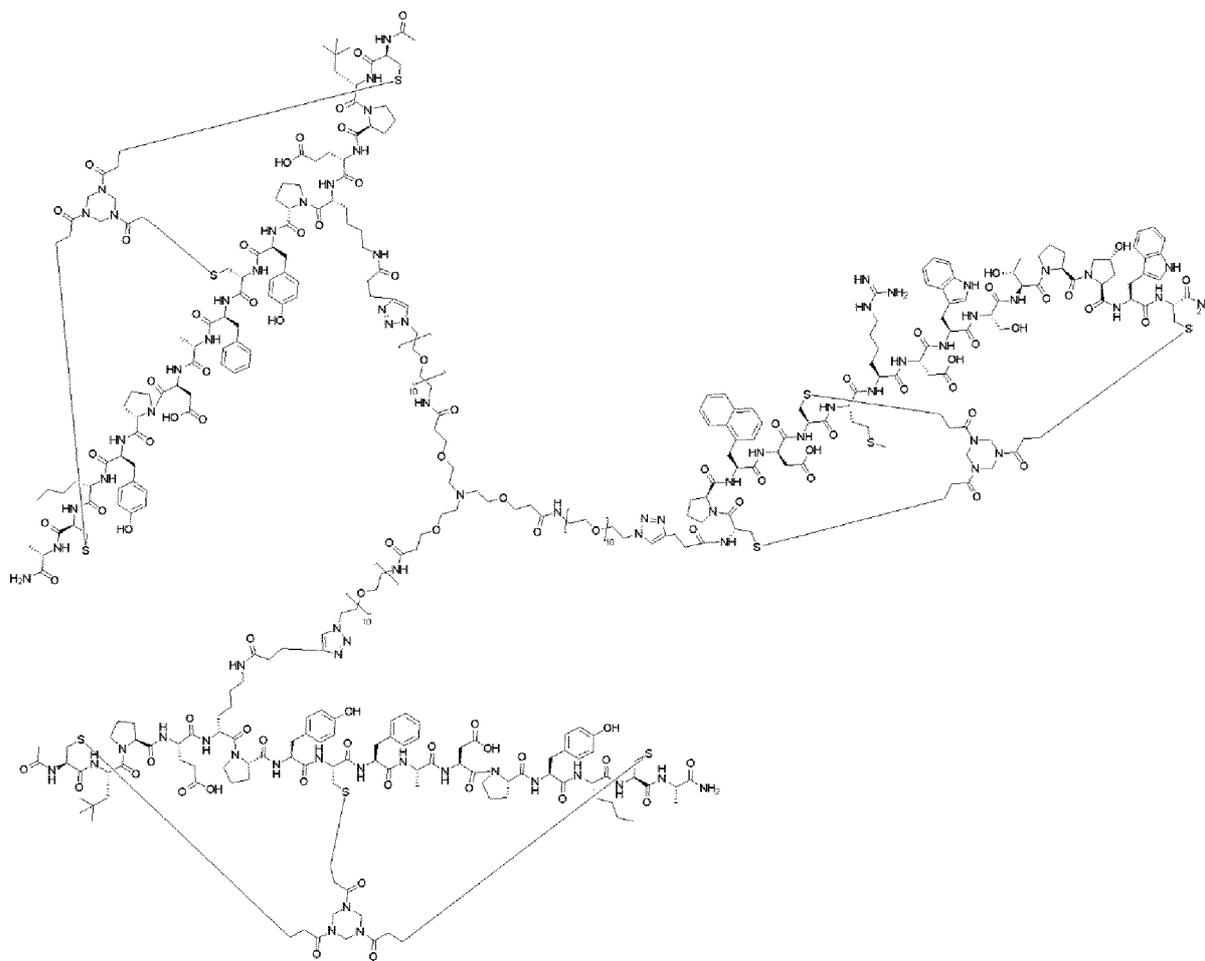
Смесь BP-23825 (13,0 мг, 20,84 мкмоль, 1,2 экв), и HATU (8,0 мг, 20,84 мкмоль, 1,2 экв) растворяли в NMP (0,3 мл), затем величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA (5,4 мг, 41,69 мкмоль, 7,3 мкл, 2,4 экв), и затем раствор активировали при 25°C в течение 5 минут. Соединение 2 (35,8 мг, 17,37 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в NMP (0,5 мл) и затем добавляли по каплям к активированному раствору, величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что BCY12860 полностью прореагировало, и наличие одного основного пика с требуемой величиной m/z (MW: 2667,12, наблюдаемая величина m/z: 1334,4 ([M/2+H⁺])). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получали остаток. Остаток затем очищали препаративной HPLC (нейтральные условия). Получали BP-23825-BCY12860 (25,2 мг, 9,16 мкмоль, 52,76% выход, 97,0% чистота) в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY13343

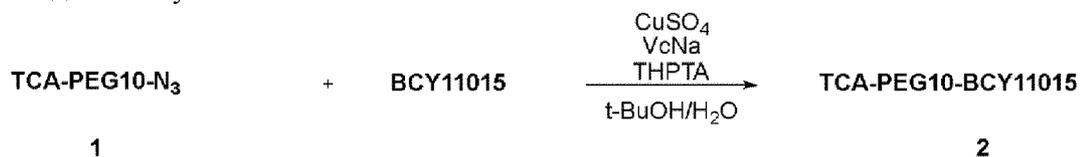


Смесь соединения 3 (25,2 мг, 9,45 мкмоль, 1,0 экв), соединения 4 (40,4 мг, 19,37 мкмоль, 2,05 экв) и THPTA (9,5 мг, 21,73 мкмоль, 2,3 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂ 3 раза), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 54,3 мкл, 2,3 экв) и VcNa (8,7 мг, 43,51 мкмоль, 2,5 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 3 также полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z (рассчитанная величина MW: 6846,04, наблюдаемая величина m/z: 1370,3 ([M/5+H⁺])). Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC (TFA условие), и получали BCY13343 (28,2 мг, 3,61 мкмоль, 38,23% выход, 87,7% чистота) в виде белого твердого вещества.

Пример 9. Синтез BCY11027



Методика получения TCA-PEG10-BCY11015



TCA-PEG10-N₃ (22,0 мг, 10,58 мкмоль, 1,0 экв) и BCY11015 (26,0 мг, 34,72 мкмоль, 1,1 экв) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 26,4 мкл, 1,0 экв), VcNa (4,2 мг, 21,2 мкмоль, 2,0 экв) и THPTA (4,6 мг, 10,58 мкмоль, 1,0 экв). И наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃ для доведения величины pH до 8. Все растворители дегазировали и продували с помощью N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что обнаруживается один основной пик с требуемой величиной m/z (рассчитанная величина MW: 4143,75, наблюдаемые величины m/z: 1040,50 ([M+18]/4+H⁺), и 1381,27([M/3+H⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной HPLC (TFA условие) и получали TCA-PEG10-BCY11015 (11,0 мг, 2,50 мкмоль, 23,66% выход, 94,26% чистота) в виде белого твердого вещества.

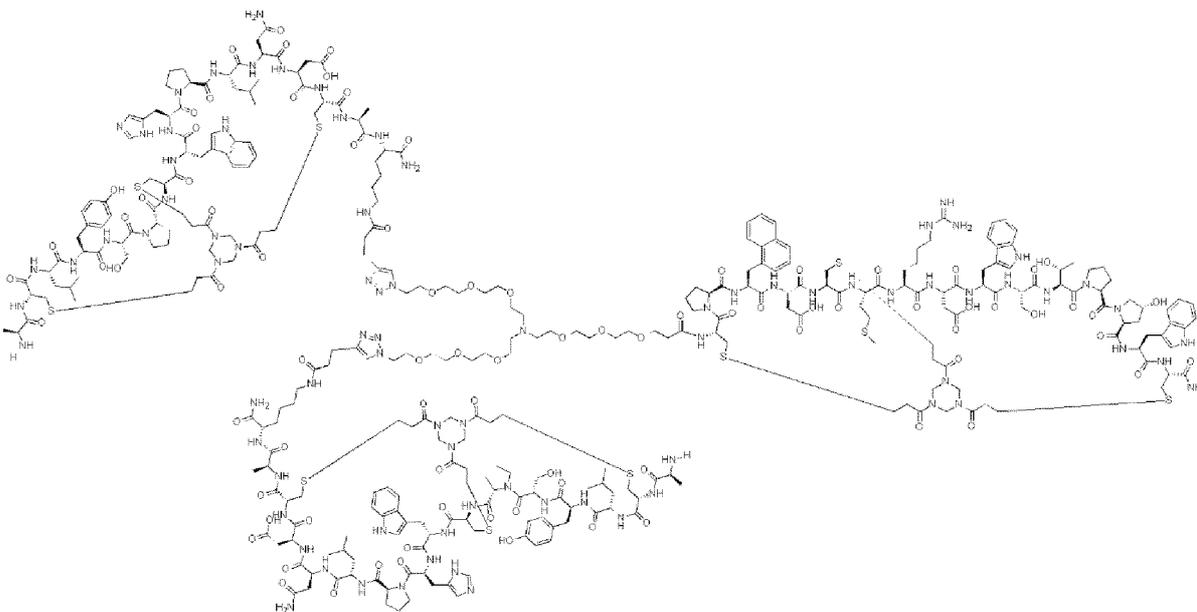
Методика получения BCY11027



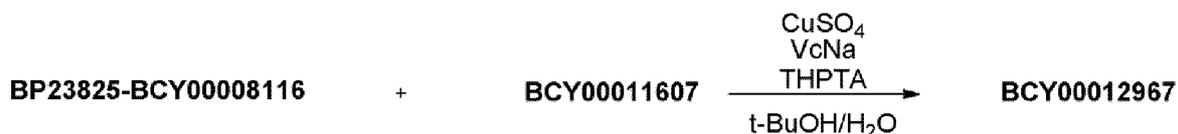
2

Соединение 2 (5,5 мг, 1,33 мкмоль, 1,0 экв) и BCY8928 (5,9 мг, 2,66 мкмоль, 2,0 экв) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 10,0 мкл, 3,0 экв), VcNa (1,0 мг, 5,05 мкмоль, 3,8 экв) и THPTA (1,0 мг, 2,30 мкмоль, 1,7 экв). И наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃ для доведения величины рН до 8. Все растворители дегазировали и продували с помощью N₂ 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при 35°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 2 полностью прореагировало, и обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z (рассчитанная величина MW: 8578,91, наблюдаемая величина m/z: 1430,6([M/6+H]⁺)). Реакционную смесь очищали препаративной HPLC (TFA условие) и получали BCY11027 (2,8 мг, 0,32 мкмоль, 24,5% выход, 91,71% чистота) в виде белого твердого вещества.

Пример 10. Синтез BCY12967



BCY00012967



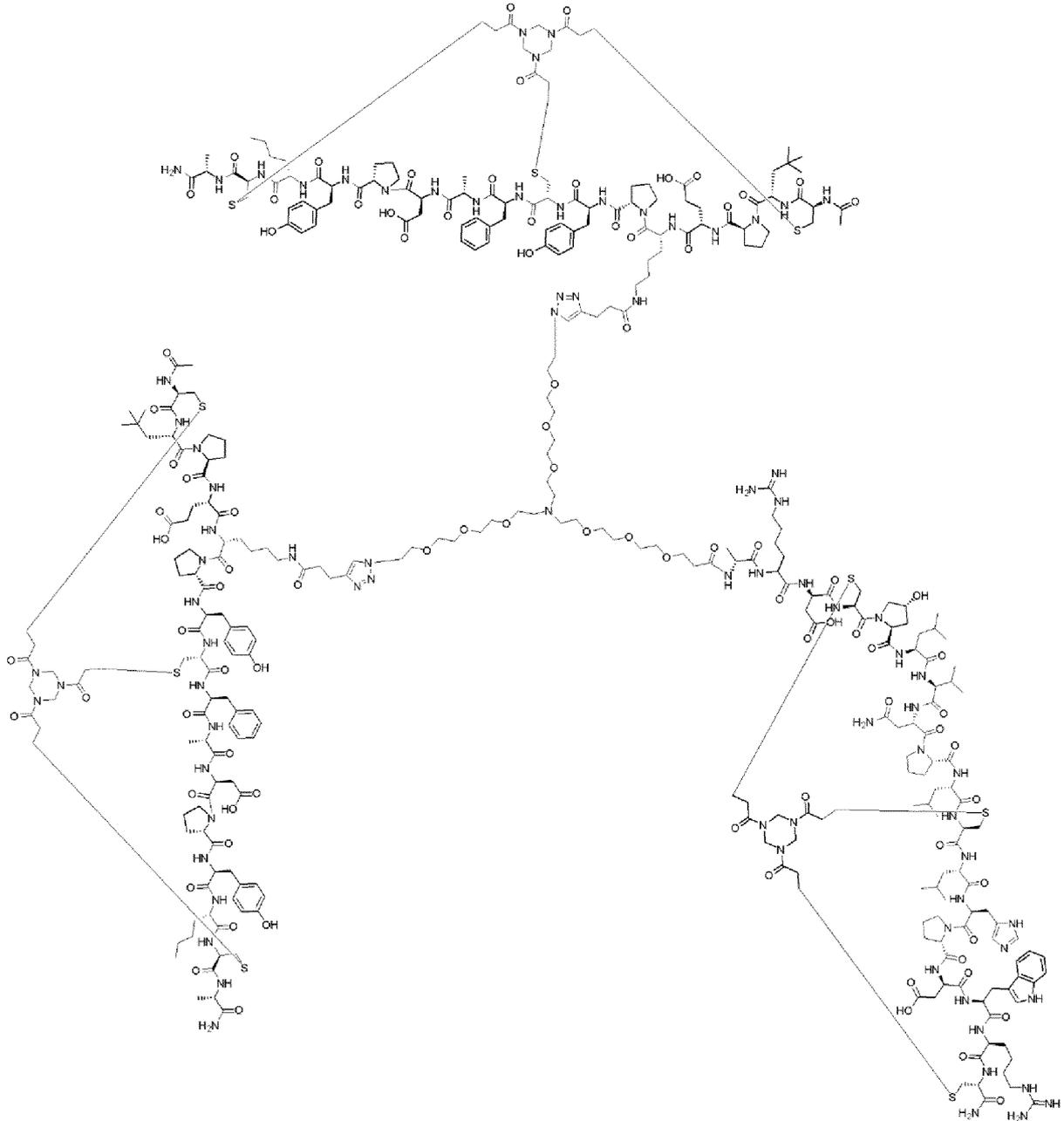
1

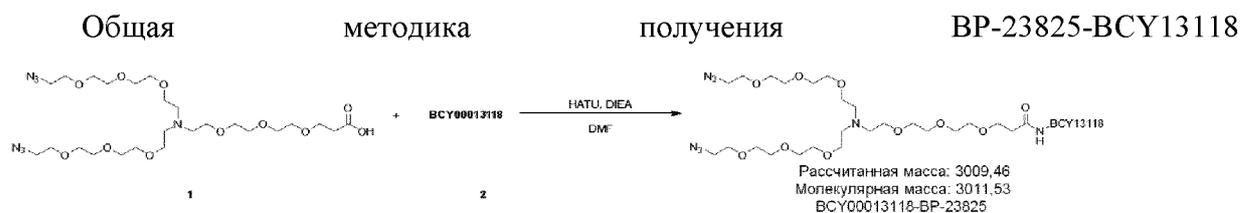
2

Соединение 1 (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), и 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). И наконец, добавляли 1 М NH₄HCO₃ для доведения величины рН до 8. Все растворители

дегазировали и продували с помощью N_2 3 раза. Реакционную смесь перемешивали при $40^\circ C$ в течение 16 часов в атмосфере N_2 . Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 2 полностью прореагировало, и наблюдается один основной пик с требуемой величиной m/z (рассчитанная величина MW: 7077,7 наблюдаемые величины m/z : 1416,3 ($[M/5+H]^+$), 1180,4 ($[M/6+H]^+$), 1011,9 ($[M/7+H]^+$)). Реакционную смесь очищали препаративной HPLC (TFA условие) и получали ВСУ12967 (20,6 мг, 2,82 мкмоль, 39,17% выход, 96,82% чистота) в виде белого твердого вещества.

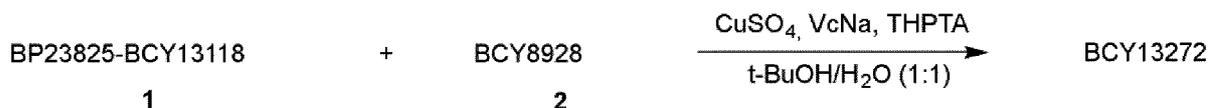
Пример 11. Синтез ВСУ13272





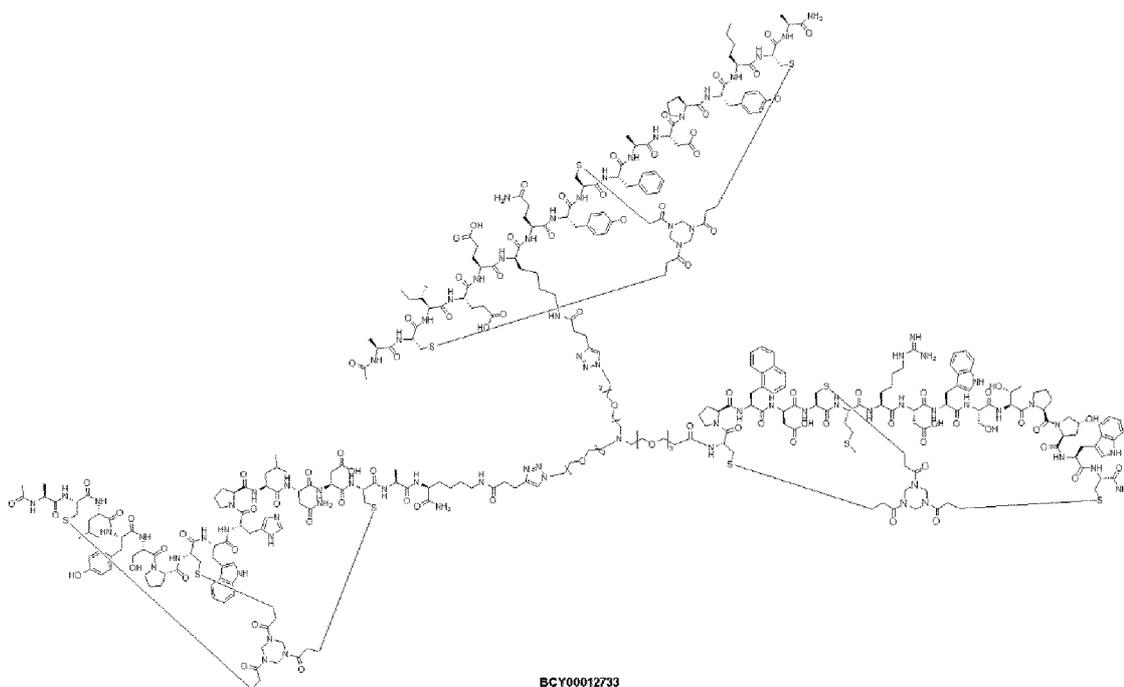
Смесь соединения 1 (ВР-23825, 155,5 мг, 249,40 мкмоль, 1,2 экв) и HATU (95,0 мг, 249,92 мкмоль, 1,2 экв) растворяли в NMP (1,0 мл), затем величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA (64,6 мг, 499,83 мкмоль, 87,0 мкл, 2,4 экв), и затем раствор перемешивали при 25°C в течение 5 минут. Соединение 2 (ВСУ13118, 500,0 мг, 207,83 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в NMP (5,0 мл) и затем добавляли к реакционному раствору, величину pH полученного раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 45 минут. Анализ методом LC-MS показывал, что ВСУ13118 полностью прореагировало и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получали остаток. Остаток затем очищали препаративной HPLC с получением ВР-23825-ВСУ13118 (1,35 г, 403,46 мкмоль, 64,71% выход, 90% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 3011,53, наблюдаемые величины m/z: 1506,8 ([M/2+H]⁺), 1005,0 ([M/3+H]⁺).

Общая методика получения соединения ВСУ13272

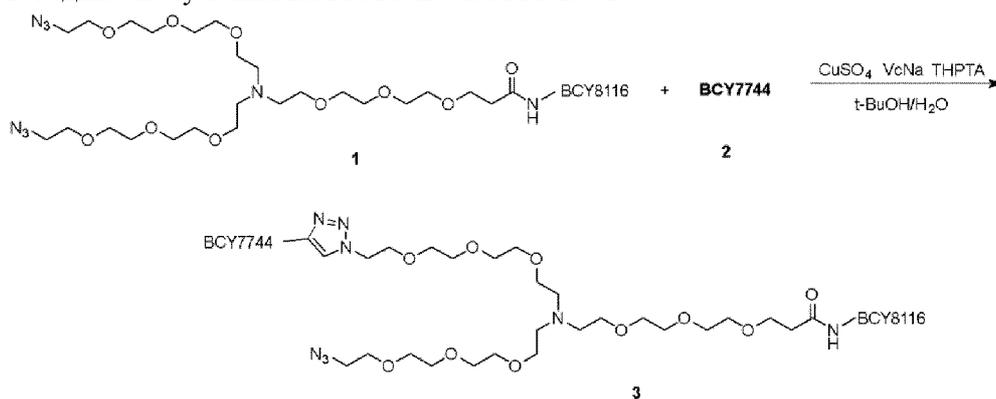


Смесь ВСУ8928 (644,0 мг, 290,55 мкмоль, 2,5 экв), THPTA (50,5 мг, 116,22 мкмоль, 1,0 экв), CuSO₄ (0,4 M, 145,0 в t-BuOH/0,2 M NH₄HCO₃ (1:1, 6,0 мл). Величину pH этого раствора доводили до 7,5 путем добавления по каплям 0,2 M NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/0,2 M NH₄HCO₃), и затем раствор перемешивали при 25°C в течение 3 минут. ВР-23825-ВСУ13118 (350,0 мг, 116,22 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в t-BuOH/0,2 M NH₄HCO₃ (1:1, 11,0 мл), и затем по каплям добавляли в перемешиваемый раствор. Все растворители предварительно дегазировали и продували с помощью N₂ 3 раза. Величину pH этого раствора доводили до 7,5 путем добавления по каплям 0,2 M NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/0,2 M NH₄HCO₃), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 6 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что был обнаружен один основной пик продукта с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC (TFA условие), и получали ВСУ13272 (1,75 г, 235,01 мкмоль, 67,40% выход, 94% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7446,64, наблюдаемые величины m/z: 1242,0 ([M/6+H]⁺), 1491,0 ([M/5+H]⁺).

Пример 12. Синтез ВСУ12733

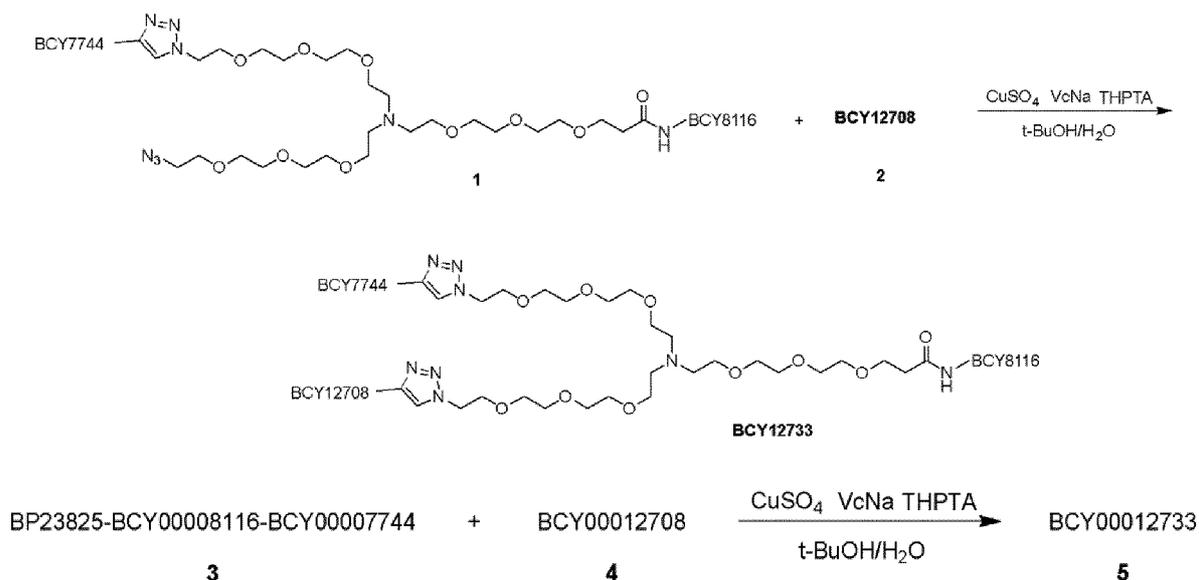


Методика получения VP23825-BCY8116-BCY7744



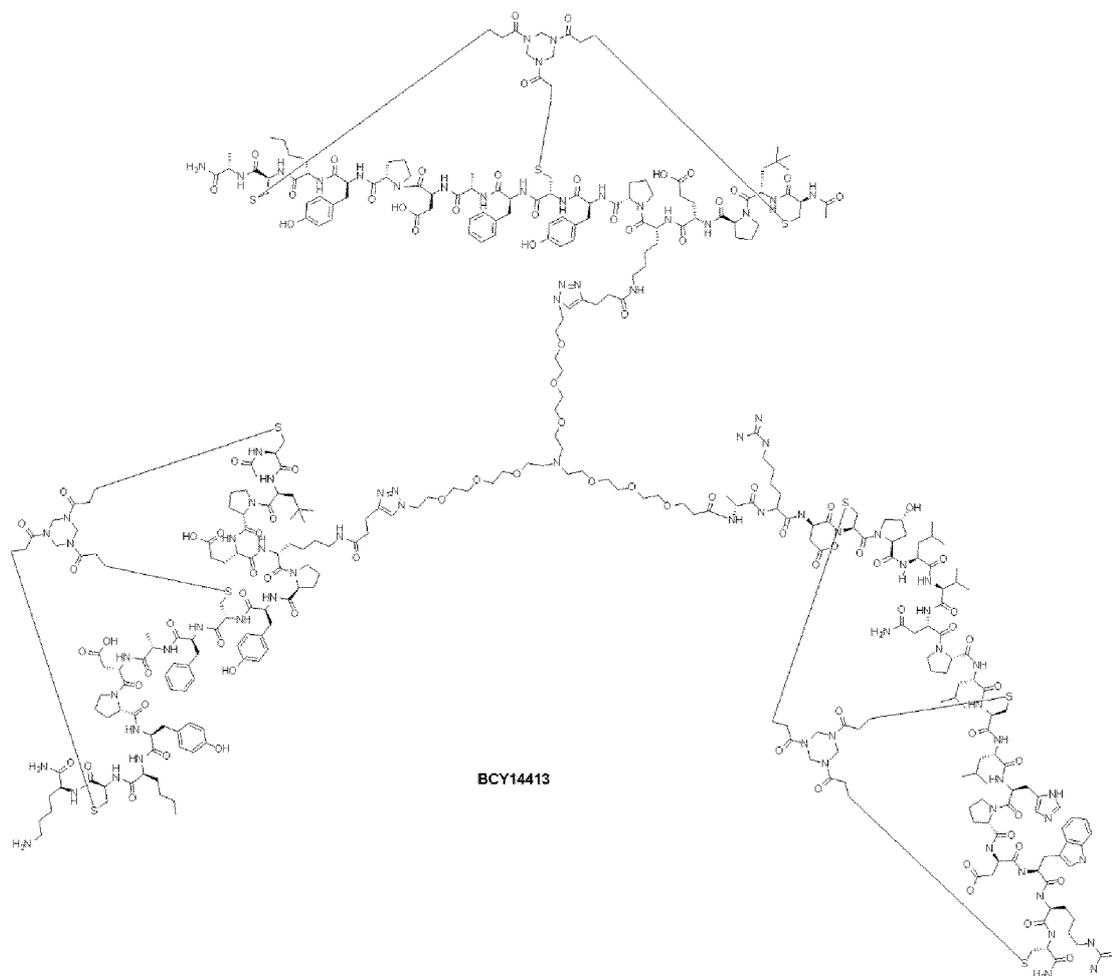
Смесь соединения 1 (10,0 мг, 3,60 мкмоль, 1,0 экв), соединения 2 (6,73 мг, 2,88 мкмоль, 0,8 экв), и THPTA (3,0 мг, 6,90 мкмоль, 2,0 экв) растворяли в смеси *t*-BuOH/H₂O (1:1, 0,5 мл, дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 9 мкл, 1,0 экв) и VcNa (2,0 мг, 10,10 мкмоль, 2,8 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 *t*-BuOH/H₂O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 2 полностью прореагировало и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной *m/z*. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали соединение 3 (5,0 мг, 0,93 мкмоль, 25,88% выход, 95,33% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 5115,80, наблюдаемая величина *m/z*: 1278,95 ([M+4H]⁴⁺).

Методика получения BCY12733

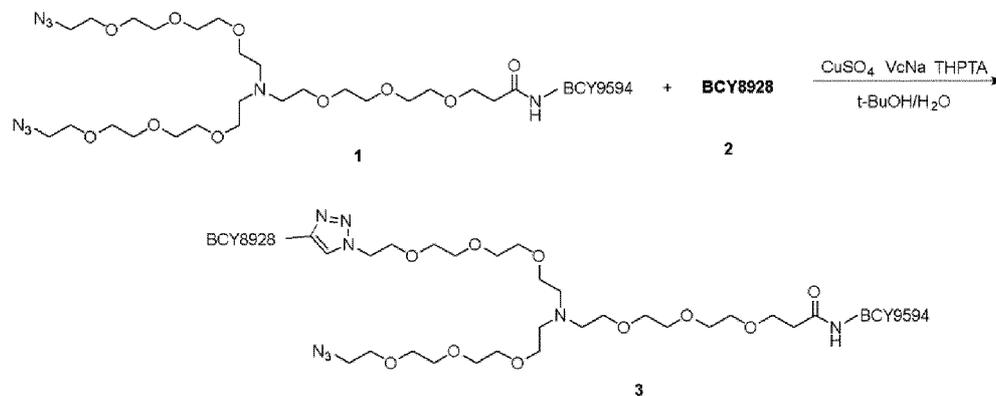


Смесь соединения 1 (5,0 мг, 9,77 мкмоль, 1,0 экв), соединения 2 (2,4 мг, 1,08 мкмоль, 1,1 экв) и THPTA (0,4 М, 3 мкл, 1,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 0,5 мл, дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли водный раствор CuSO₄ (0,4 М, 3 мкл, 1,0 экв) и VcNa (0,4 М, 3 мкл, 1,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 1 часа в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что оставались соединения 3 и 4, и был обнаружен требуемая величина m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY12733 (3,3 мг, 0,41 мкмоль, 42,42% выход, 94,60% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7307,33, наблюдаемые величины m/z: 1827,1 ([M+4H]⁴⁺), 1462,1 ([M+5H]⁵⁺).

Пример 13. Синтез BCY14413



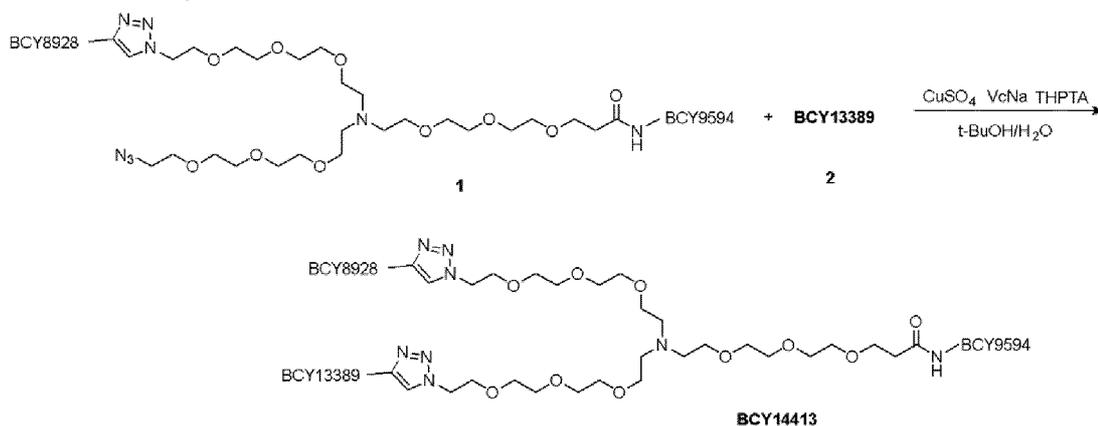
Методика получения BCY9594-ВР-23825-BCY8928



Смесь соединения 1 (50,0 мг, 16,6 мкмоль, 1,0 экв), соединения 2 (29,5 мг, 13,3 мкмоль, 0,8 экв) и THPTA (36,1 мг, 83,1 мкмоль, 5,0 экв) растворяли в смеси *t*-BuOH/ H_2O (1:1, 8 мл, дегазированной и продутой с помощью N_2), и затем добавляли водный раствор CuSO_4 (0,4 М, 20,8 мкл, 0,5 экв) и VcNa (65,9 мг, 332,6 мкмоль, 20,0 экв) в атмосфере N_2 . Величину pH этого раствора доводили до 7,5 путем добавления по каплям 0,5 мл 0,2 М NH_4HCO_3 (в 1:1 *t*-BuOH/ H_2O), и раствор приобретал желтый цвет. Затем реакцию перемешивали при 25°C в течение 24 часов в атмосфере N_2 . Реакцию проводили с двумя параллельными загрузками. Анализ методом LC-MS показывал, что оставалось

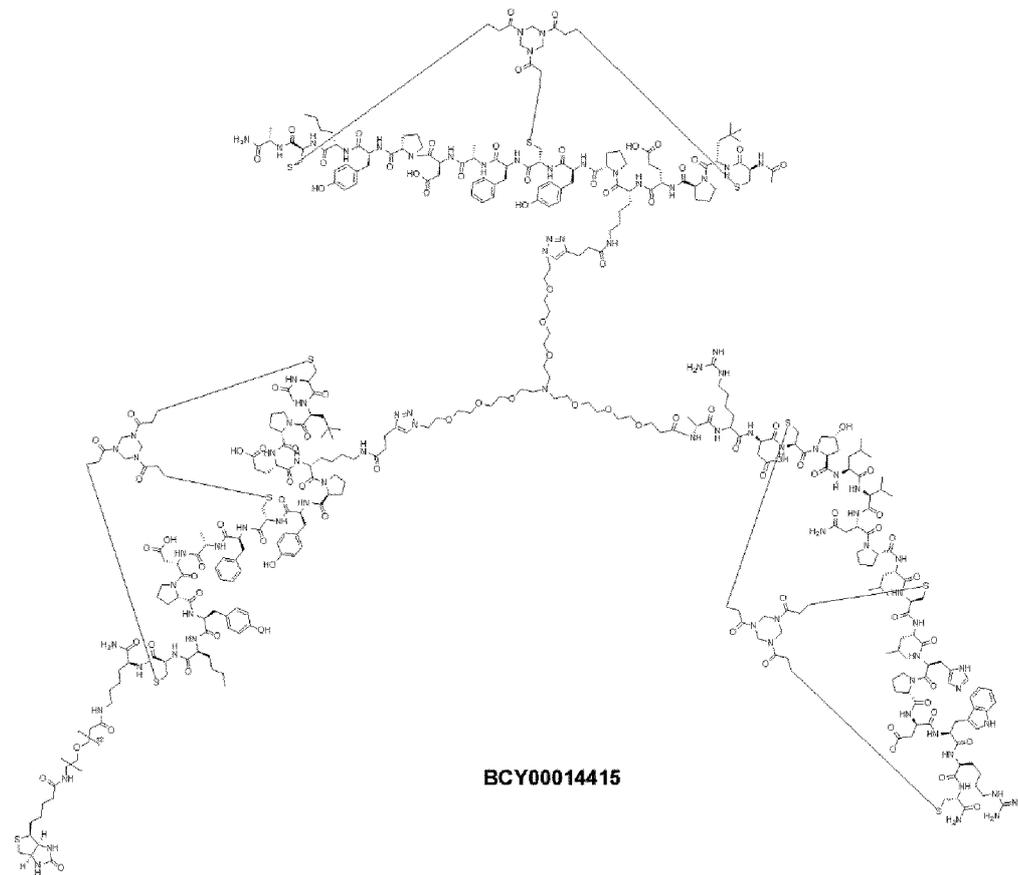
соединение 1 и небольшое количество соединения 2, и была обнаружена требуемая величина m/z . Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали соединение 3 (31,5 мг, 5,44 мкмоль, 16,36% выход, 90,22% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 5224,07, наблюдаемые величины m/z : 1306,9 ($[M+4H]^{4+}$), 871,6 ($[M+6H]^{6+}$).

Методика получения BCY14413

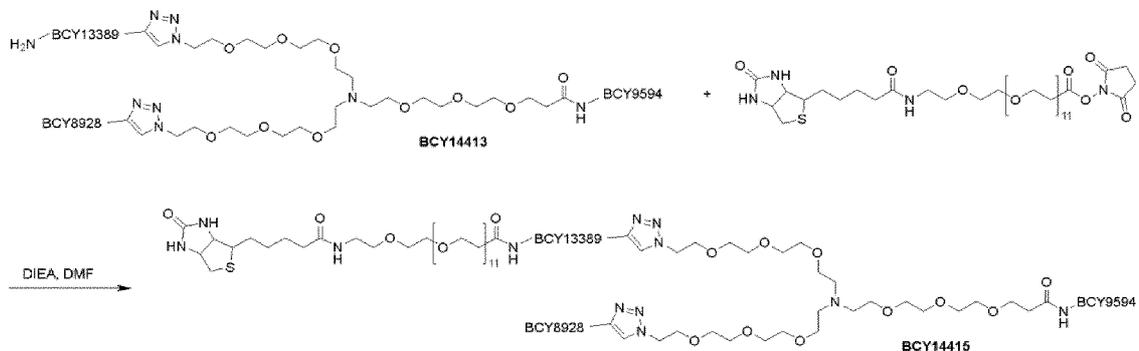


Смесь соединения 1 (31,5 мг, 6,03 мкмоль, 1,0 экв), соединения 2 (14,4 мг, 6,33 мкмоль, 1,05 экв) и THPTA (2,62 мг, 6,03 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в смеси t -BuOH/ H_2O (1:1, 1,0 мл, дегазированной и продутой с помощью N_2), и затем добавляли водный раствор $CuSO_4$ (0,4 М, 15,07 мкл, 1,0 экв) и VcNa (4,78 мг, 24,12 мкмоль, 4,0 экв) в атмосфере N_2 . Величину pH этого раствора доводили до 7,5 путем добавления по каплям 0,5 мл 0,2 М NH_4HCO_3 (в 1:1 t -BuOH/ H_2O), и раствор приобретал желтый цвет. Затем реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 3 часов в атмосфере N_2 . Анализ методом LC-MS показывал, что оставалось небольшое количество соединения 2, а соединение 1 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z . Реакционную смесь фильтровали для удаления нерастворимого осадка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY14413 (22,5 мг, 3,00 мкмоль, 43,10% выход, 86,63% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7498,75, наблюдаемые величины m/z : 938,3 ($[M+8H]^{8+}$), 1072,2 ($[M+7H]^{7+}$), 1250,9 ($[M+6H]^{6+}$), 1500,8 ($[M+5H]^{5+}$).

Пример 14. Синтез BCY14415

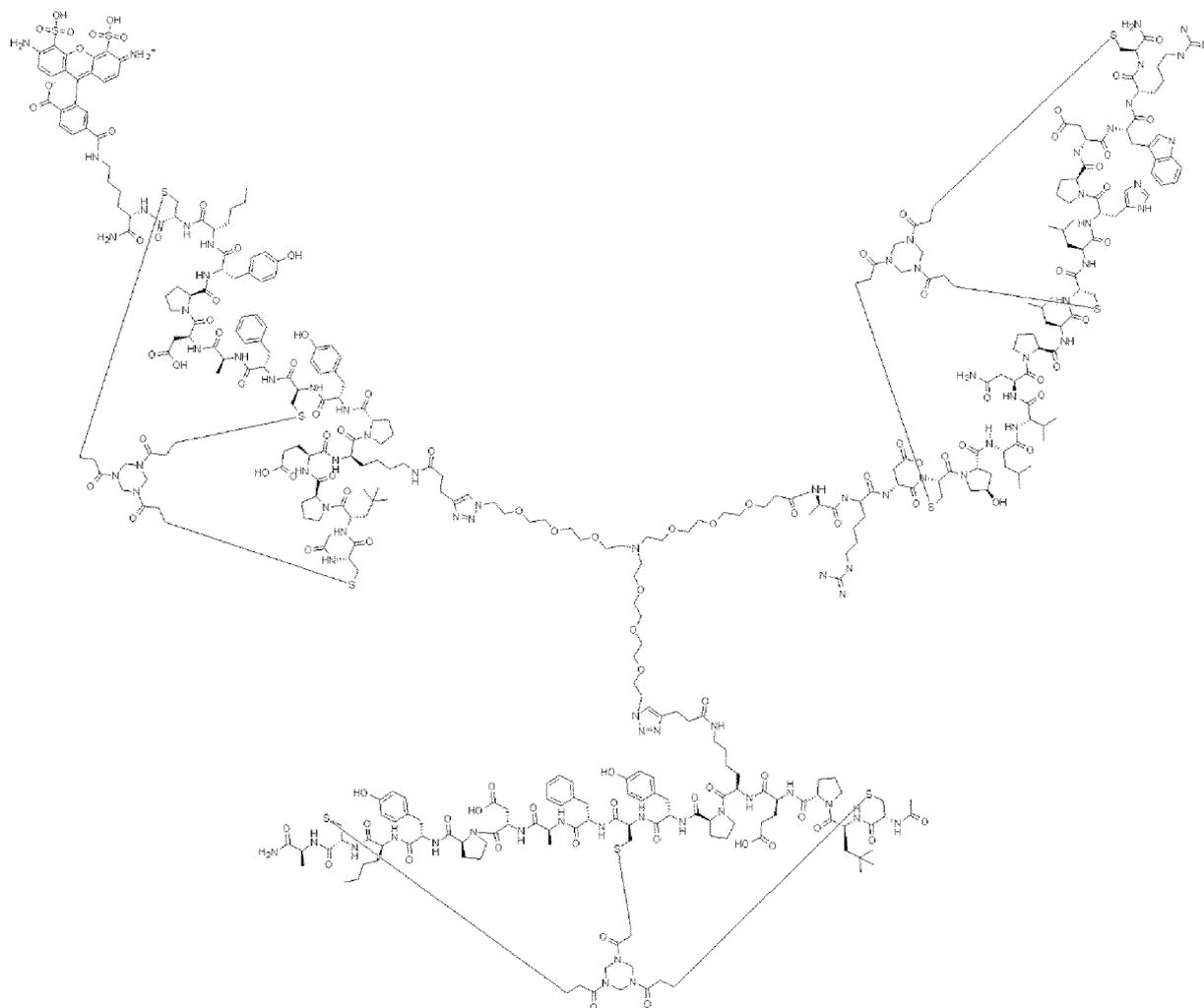


Методика получения BCY14415



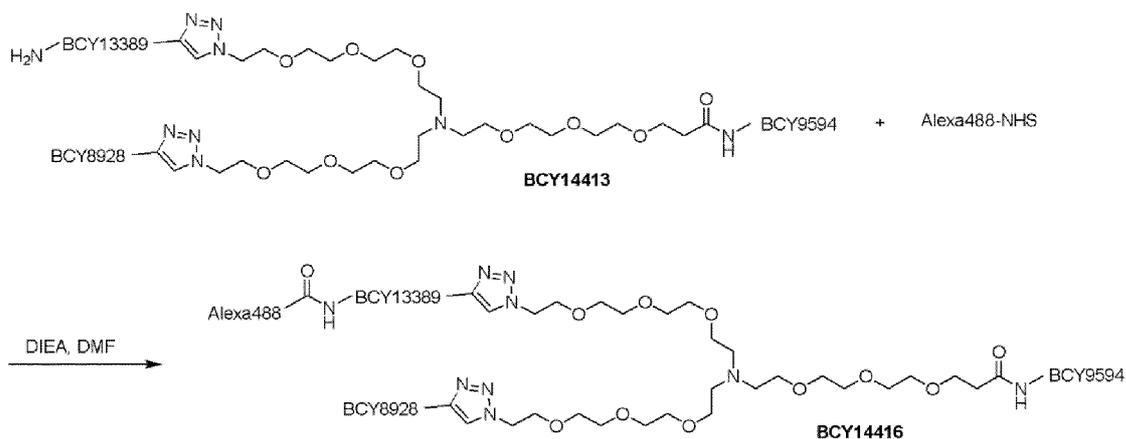
Смесь BCY14413 (10,0 мг, 1,33 мкмоль, 1,0 экв) и биотин-Peg12-NHS (2,6 мг, 2,80 мкмоль, 2,6 экв) растворяли в DMF (0,3 мл). Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что BCY14413 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY14415 (10 мг, 1,07 мкмоль, 80,49% выход, 90,2% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 8324,73, наблюдаемые величины m/z: 1388,4 ([M+6H]⁶⁺), 1190,2 ([M+7H]⁷⁺), 1041,5 ([M+8H]⁸⁺), 926,0 ([M+9H]⁹⁺)

Пример 15. Синтез BCY14416



BSY14416

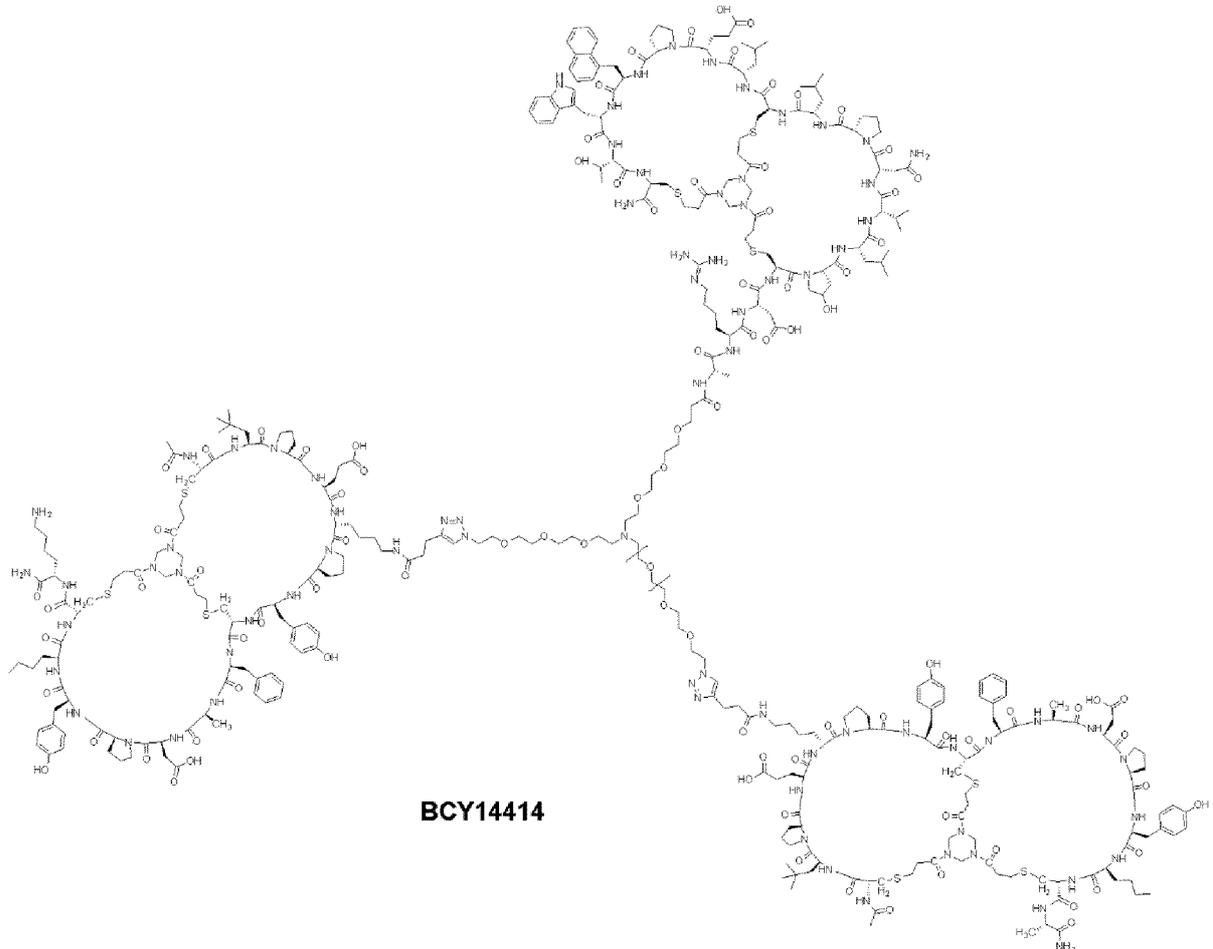
Методика получения BSY14416



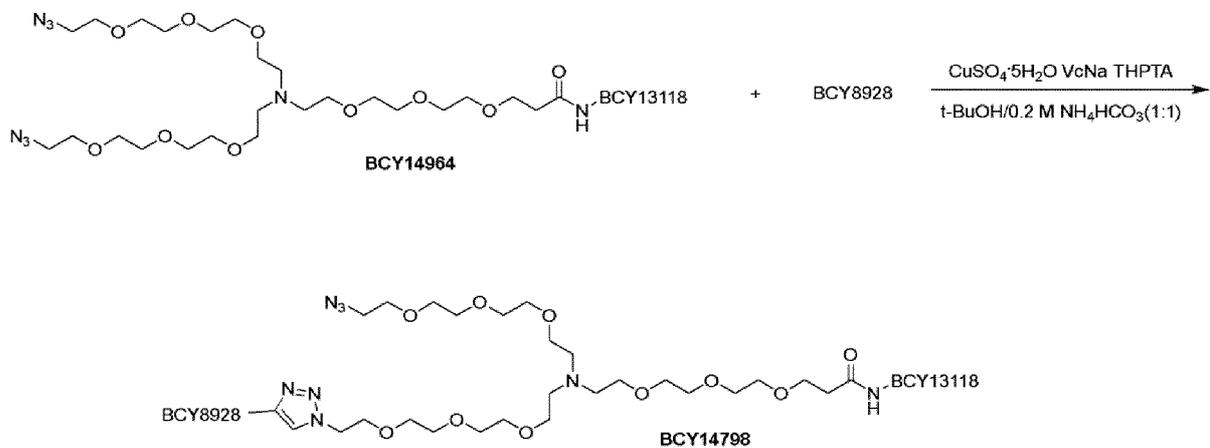
Смесь соединения BSY14413 (5,1 мг, 0,68 мкмоль, 1,0 экв) и Alexa Fluor 488 NHS эфира (0,5 мг, 8,16e-1 мкмоль, 1,2 экв) растворяли в DMF (0,3 мл). Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что оставалось некоторое количество BSY14413, и был обнаружен один основной пик с

требуемой величиной m/z . Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и собирали основной пик в виде двух фракций с различной чистотой, и получали BCY14416 (0,7 мг, 0,065 мкмоль, 9,84% выход, 96,4% чистота) и (0,5 мг, 0,047 мкмоль, 7,03% выход, 91,2% чистота) в виде красного твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 8015, наблюдаемая величина m/z : 1336,5 ($[M+7H]^{7+}$).

Пример 16. Синтез BCY14414

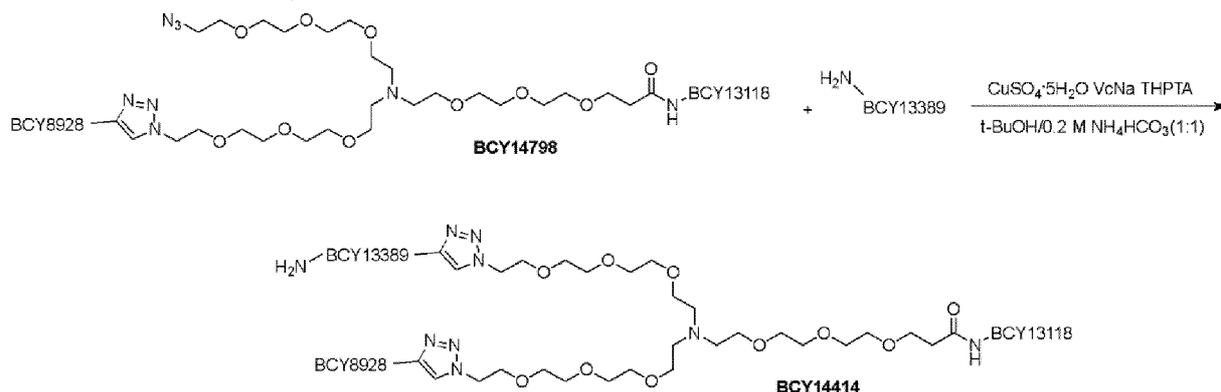


Методика получения BCY14798



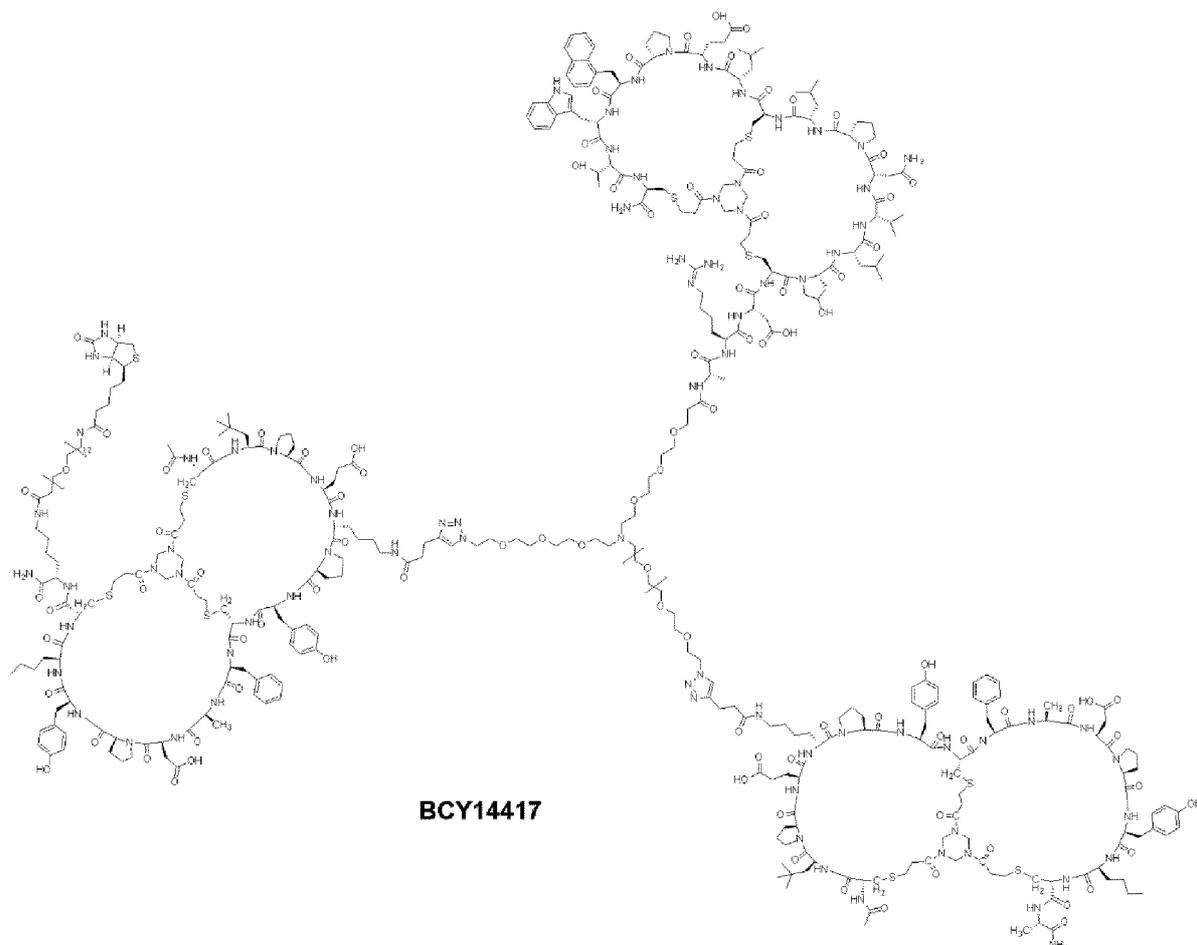
Смесь ВСУ14964 (55,0 мг, 18,26 мкмоль, 1,0 экв), ВСУ8928 (32,4 мг, 14,61 мкмоль, 0,8 экв) и ТНРТА (39,8 мг, 91,32 мкмоль, 5,0 экв) растворяли в *t*-BuOH/0,2 М NH₄HCO₃ (1:1, 0,5 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 23,0 мкл, 0,5 экв) и аскорбат натрия (72,0 мг, 365,27 мкмоль, 20,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 7,5 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 *t*-BuOH/0,2 М NH₄HCO₃), и раствор приобретал светло-желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1,5 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что оставалось ВСУ14964, соединение ВСУ8928 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной *m/z*. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали ВСУ14798 (51 мг, 9,17 мкмоль, 33,37% выход, 94% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 5229,07, наблюдаемые величины *m/z*: 1308,3 ([M+4H]⁴⁺), 1046,7 ([M+5H]⁵⁺).

Методика получения ВСУ14414

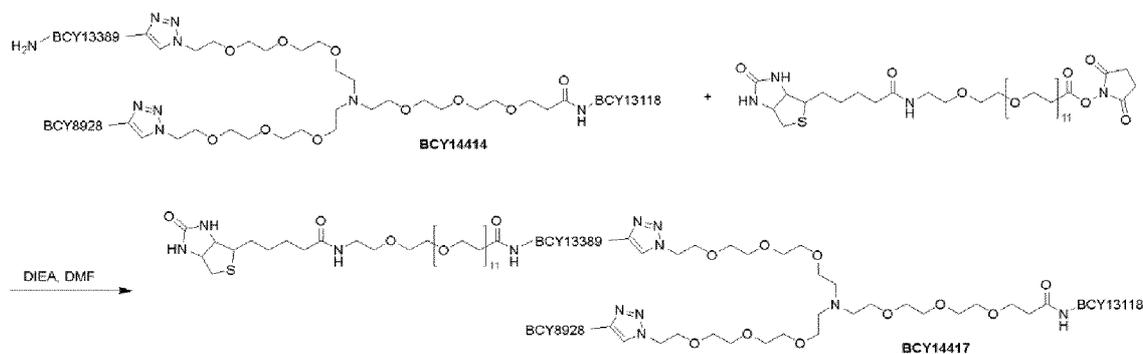


Смесь ВСУ14798 (21,0 мг, 4,02 мкмоль, 1,0 экв), ВСУ13389 (10,0 мг, 4,42 мкмоль, 1,1 экв) и ТНРТА (1,8 мг, 4,02 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в *t*-BuOH/0,2 М NH₄HCO₃ (1:1, 0,5 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 5,0 мкл, 0,5 экв) и аскорбат натрия (2,8 мг, 16,06 мкмоль, 4,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 7,5 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 *t*-BuOH/0,2 М NH₄HCO₃), и раствор приобретал светло-желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что ВСУ14798 полностью прореагировало, оставалось некоторое количество ВСУ13389 и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной *m/z*. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной и получали ВСУ14414 (20 мг, 2,40 мкмоль, 59,73% выход, 90,9% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7503,74, наблюдаемые величины *m/z*: 1251,5 ([M+5H]⁵⁺), 1072,9 ([M+7H]⁷⁺).

Пример 17. Синтез ВСУ14417



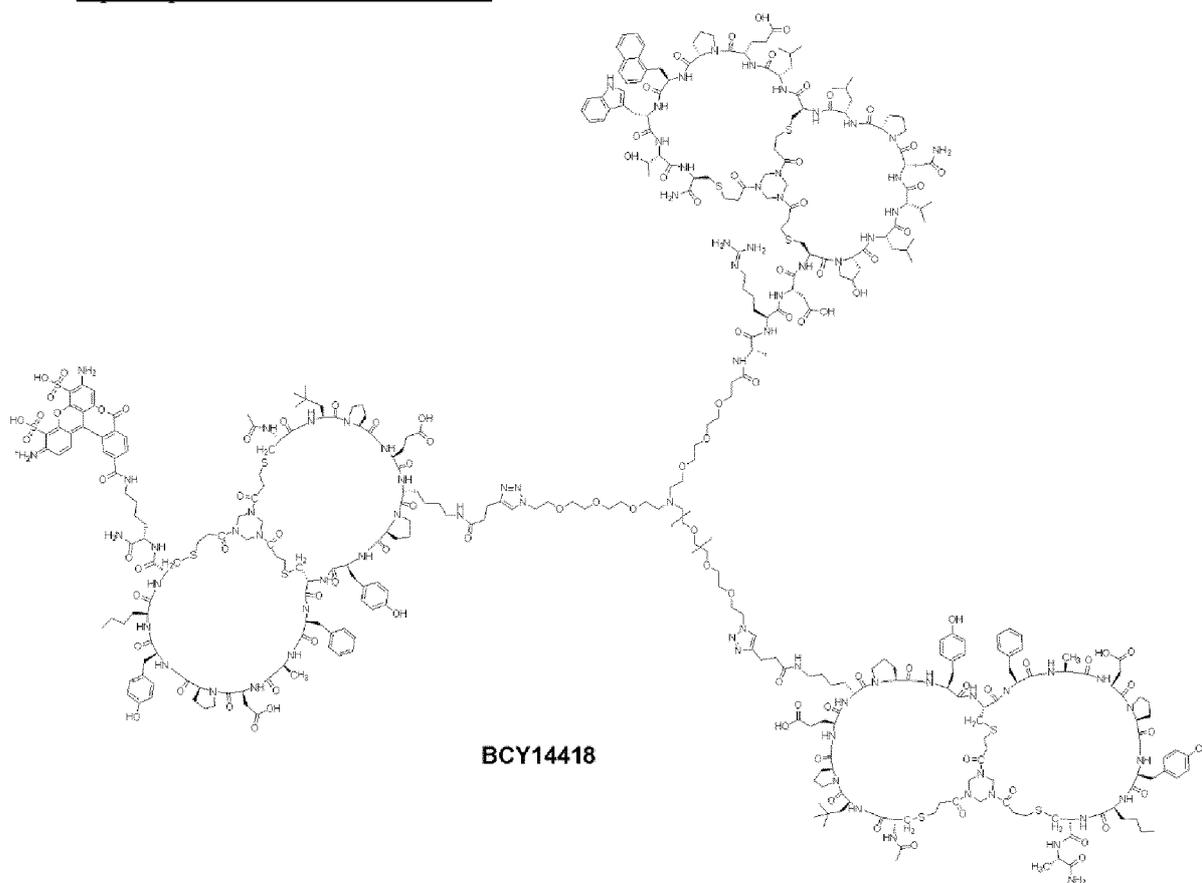
Методика получения ВСУ14417



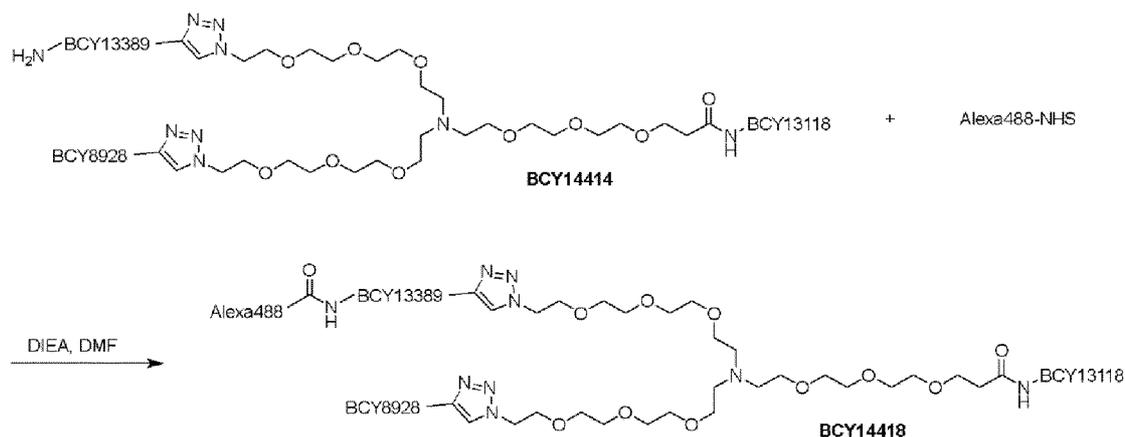
Смесь ВСУ14414 (13,0 мг, 1,73 мкмоль, 1,0 экв) и биотин-PEG12-NHS эфира (CAS 365441-71-0, 4,2 мг, 4,50 мкмоль, 2,6 экв) растворяли в DMF (0,5 мл). Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям DIEA. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что ВСУ14414 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной *m/z*. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC и получали ВСУ14417 (9,0 мг, 1,07 мкмоль, 80,49% выход, 90,8% чистота) в виде белого

твёрдого вещества. Рассчитанная величина MW: 8329,74, наблюдаемые величины m/z: 1389,6 ($[M+6H]^{6+}$), 1191,9 ($[M+7H]^{7+}$).

Пример 18. Синтез BCY14418



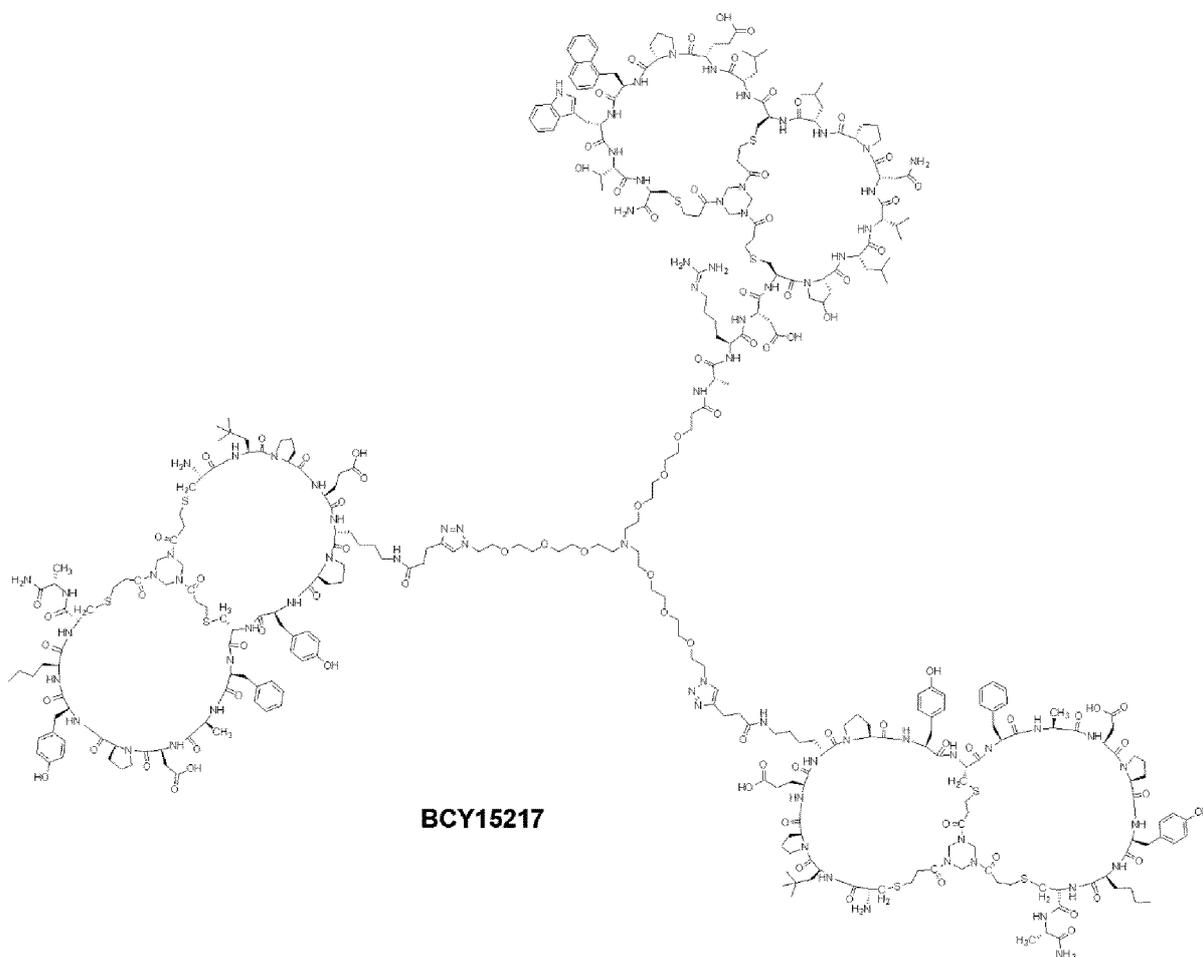
Методика получения BCY14418



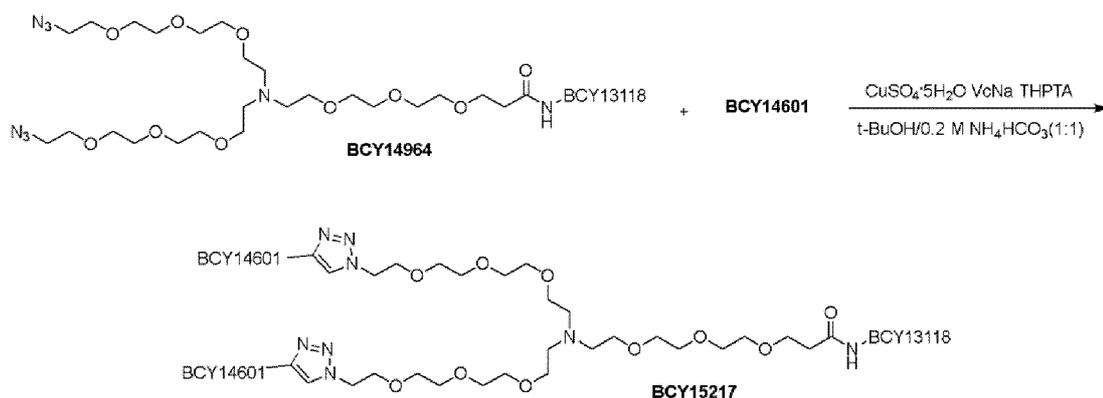
Смесь BCY14414 (5,6 мг, 0,75 мкмоль, 1,0 экв) и Alexa fluor® 488 (0,9 мг, 1,49 мкмоль, 2,0 экв) растворяли в DMF (0,3 мл). Затем величину pH этого раствора довели до 8 путем добавления по каплям DIEA. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1,0 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что BCY14414 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали

BCY14418 (2,3 мг, 0,25 мкмоль, 32,89% выход, 85,6% чистота) в виде красного твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 8020,19, наблюдаемая величина m/z: 1337,2 ($[M+6H]^{6+}$).

Пример 19. Синтез BCY15217



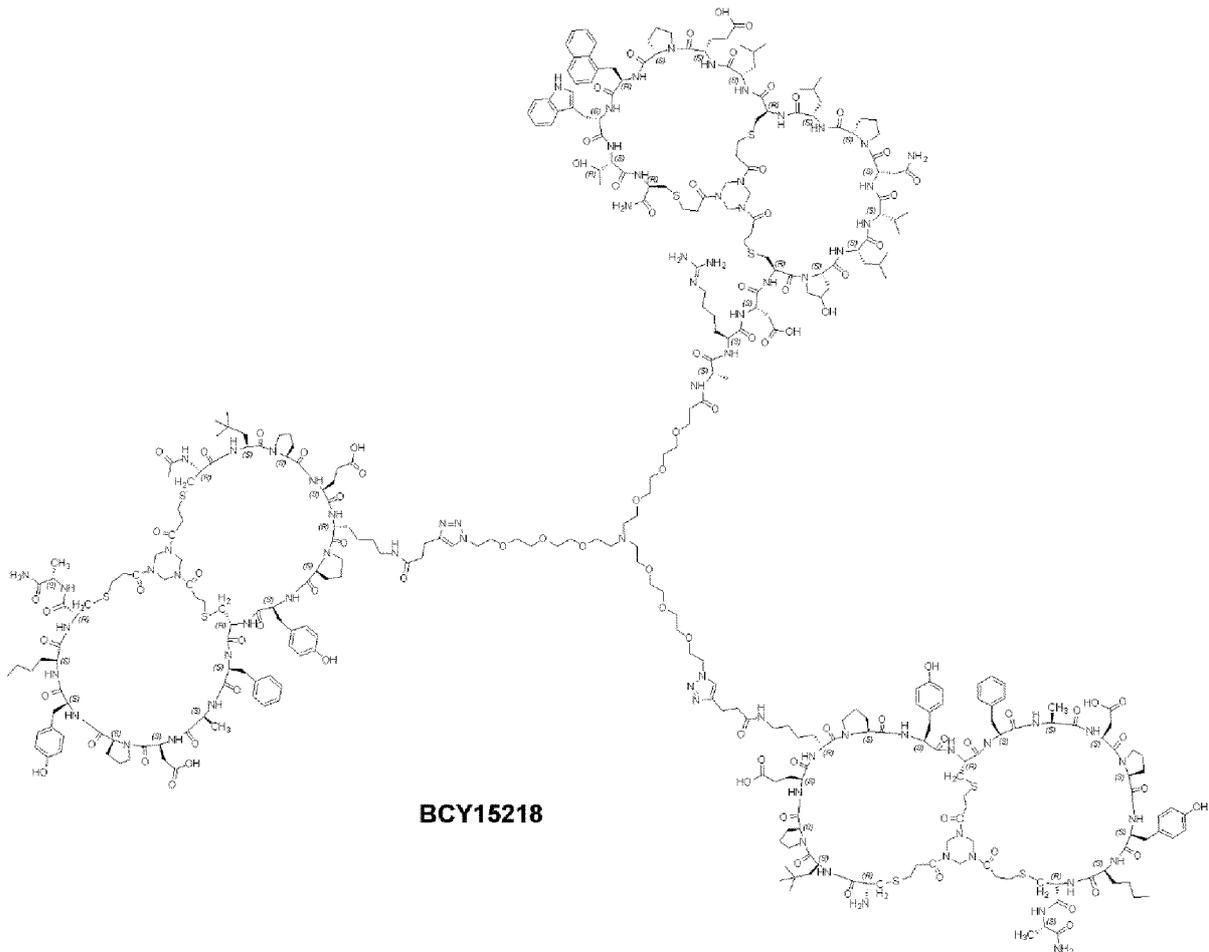
Методика получения BCY15217



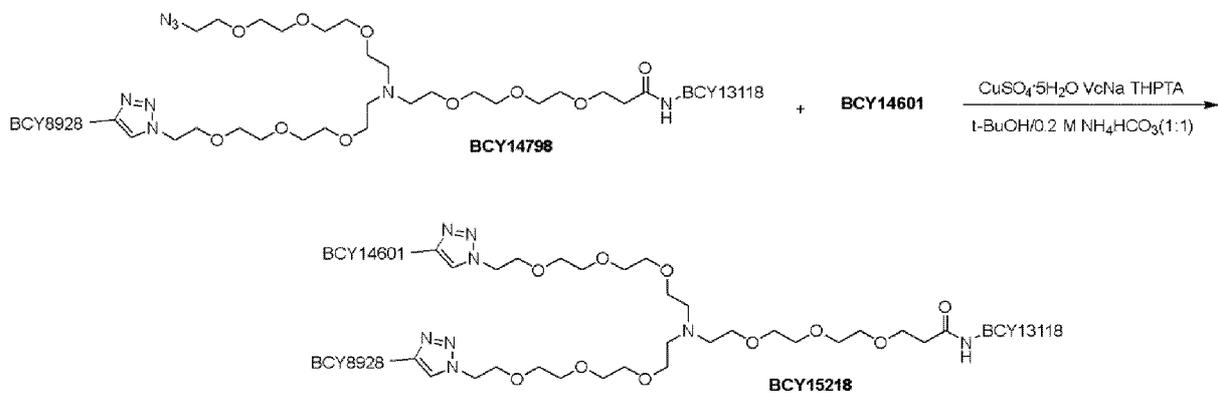
Смесь BCY14964 (20,0 мг, 6,64 мкмоль, 1,0 экв), BCY14601 (30,5 мг, 13,95 мкмоль, 2,1 экв) и THPTA (2,9 мг, 6,64 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в *t*-BuOH/0,2 М NH₄HCO₃ (1:1, 0,5 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 16,6 мкл, 1,0 экв) и аскорбат натрия (4,7 мг, 26,56 мкмоль, 4,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8, и раствор приобретал светло-желтый цвет.

Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что оставалось BCY14964, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY15217 (19,7 мг, 2,41 мкмоль, 36,26% выход, 96,2% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7362,5, наблюдаемые величины m/z: 1473,5 ([M+5H]⁵⁺), 1228,2 ([M+6H]⁶⁺), 1052,8 ([M+7H]⁷⁺).

Пример 20. Синтез BCY15218

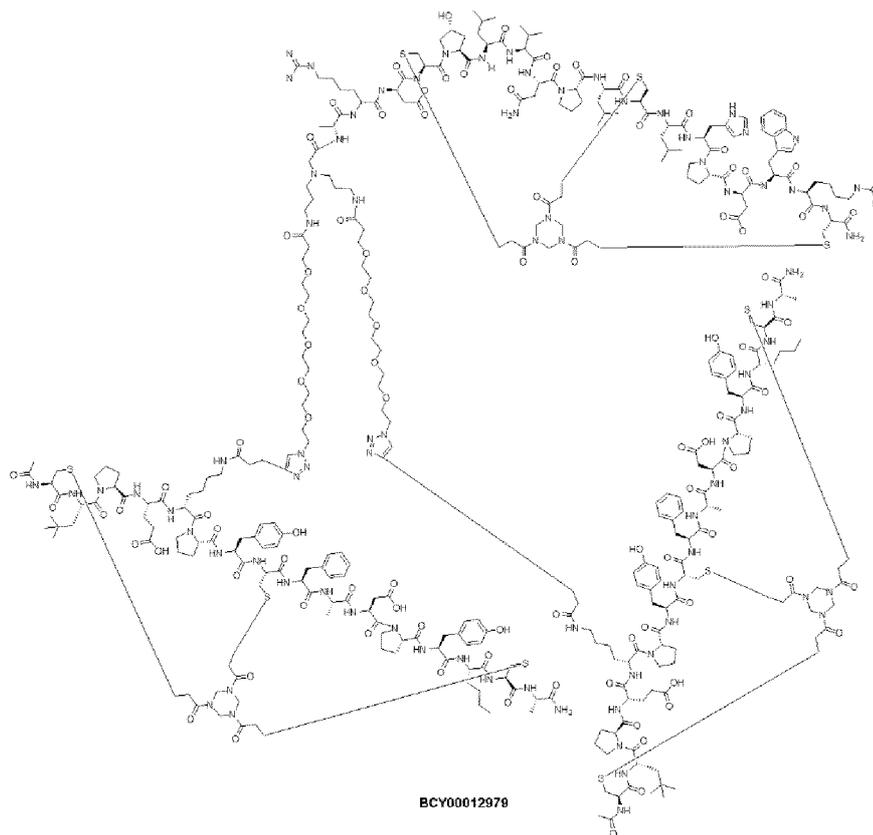


Методика получения BCY15218

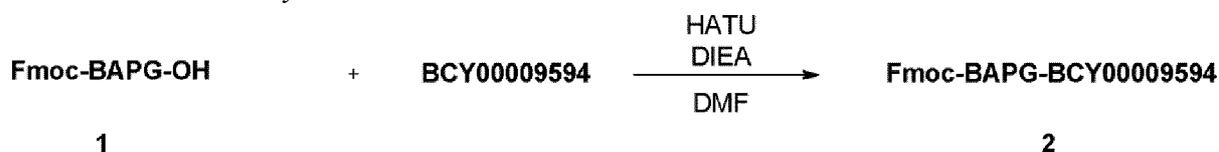


Смесь ВСУ14798 (30,0 мг, 5,74 мкмоль, 1,0 экв), ВСУ14601 (15,0 мг, 6,88 мкмоль, 1,2 экв) и ТНРТА (2,5 мг, 5,74 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в *t*-BuOH/0,2 М NH₄HCO₃ (1:1, 0,5 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 14,0 мкл, 1,0 экв) и аскорбат натрия (4,0 мг, 22,95 мкмоль, 4,0 экв) в атмосфере N₂. Величину рН этого раствора доводили до 7,5 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 *t*-BuOH/0,2 М NH₄HCO₃), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что ВСУ14798 полностью прореагировало, оставалось ВСУ14601, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной *m/z*. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали ВСУ15218 (22 мг, 2,67 мкмоль, 46,61% выход, 95,0% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7404,6, наблюдаемая величина *m/z*: 1234,8 ([M+6H]⁶⁺).

Пример 21. Синтез ВСУ12979

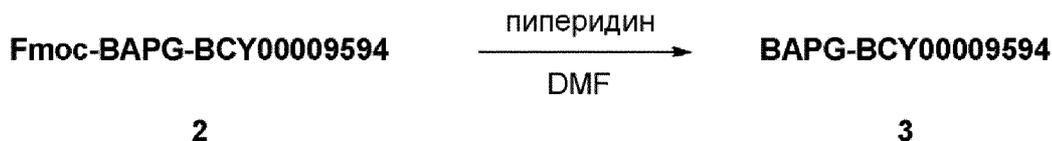


Методика получения Fmoc-BAPG- ВСУ9594



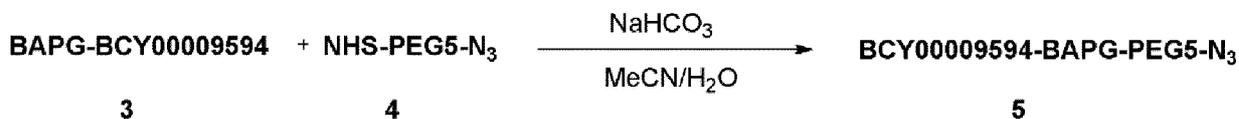
Соединение 1 (N, N-бис[3-(Fmoc-амино)пропил]глицина калия сульфат, 10,0 мг, 15,78 мкмоль, 1,0 экв) и HATU (7,2 мг, 18,94 мкмоль, 1,2 экв) сначала растворяли в 1 мл DMF, затем добавляли DIEA (11,0 мкл, 63,15 мкмоль, 4,0 экв). Смесь перемешивали при 30°C в течение 30 минут, и затем добавляли BCY9594 (80,0 мг, 30,09 мкмоль, 1,0 экв). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. Анализ методом LC-MS показывал один основной пик с требуемой величиной m/z (рассчитанная величина MW: 3016,51, наблюдаемая величина m/z: 1006,4 ($[M+3H]^{3+}$). Реакционную смесь использовали на следующей стадии без очистки.

Методика получения BAPG-BCY9594:



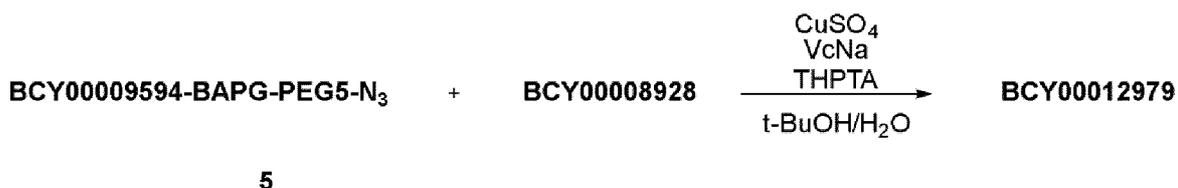
Соединение 2 (47,6 мг, 15,78 мкмоль, 1,0 экв) сначала растворяли в 1 мл DMF, затем добавляли пиперидин (0,2 мл, 2,03 ммоль, 128,0 экв). Смесь перемешивали при 30°C в течение 30 минут. Анализ методом LC-MS показывал один основной пик с требуемой величиной m/z (рассчитанная величина MW: 2572,04, наблюдаемые величины m/z: 1286,8 ($[M+2H]^{2+}$), 858,1 ($[M+3H]^{3+}$). Реакционную смесь очищали препаративной HPLC и получали соединение 3 (24,4 мг, 9,06 мкмоль, 57% выход, 95% чистота) в виде белого твердого вещества.

Методика получения BCY9594-BAPG-PEG5-N₃



Соединение 3 (24,4 мг, 9,06 мкмоль, 1,0 экв) и соединение 4 (10,0 мг, 23,13 мкмоль, 2,4 экв) растворяли в 2 мл MeCN/H₂O (1:1), добавляли 1 M NaHCO₃ для доведения величины pH до 8. Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 3 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z (рассчитанная величина MW: 3206,71, наблюдаемая величина m/z: 1069,7 ($[M+3H]^{3+}$). Реакционную смесь очищали препаративной HPLC и получали соединение 5 (12,8 мг, 3,99 мкмоль, 42,08% выход, 88,62% чистота) в виде белого твердого вещества.

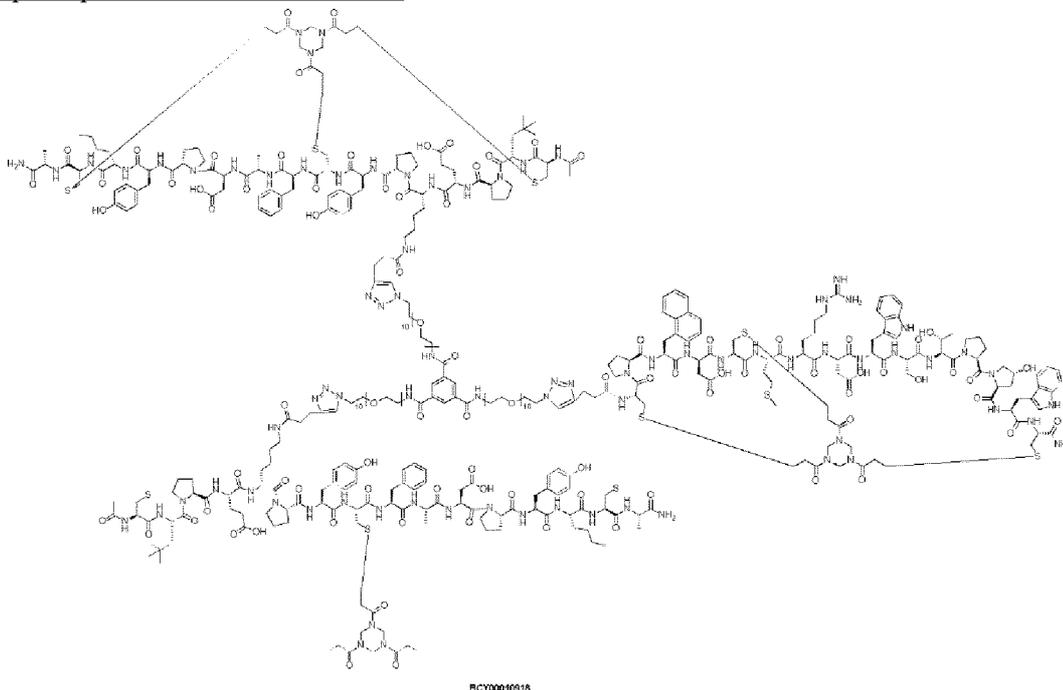
Методика получения BCY12979



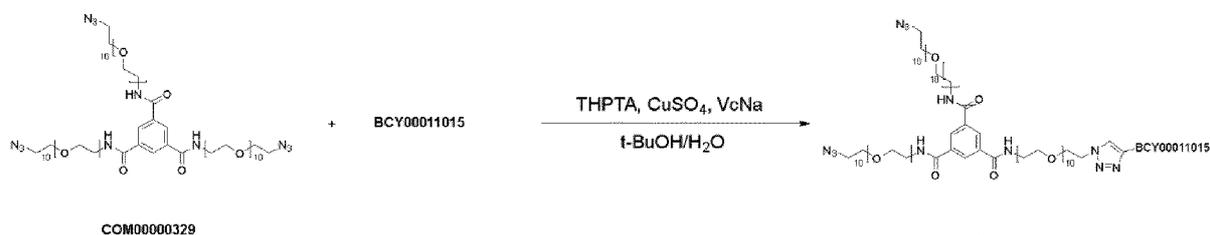
Соединение 5 (12,8 мг, 3,99 мкмоль, 1,0 экв) и BCY8928 (18,0 мг, 8,12 мкмоль, 2,0 экв) сначала растворяли в 2 мл t-BuOH/H₂O (1:1), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 M, 20,0 мкл,

2,0 экв), VcNa (3,2 мг, 16,1 мкмоль, 4,0 экв) и ТНРТА (3,5 мг, 8,0 мкмоль, 2,0 экв). И наконец, добавляли 1М NH_4HCO_3 для доведения величины pH до 8. Все растворители дегазировали и продували с помощью N_2 . Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 часов в атмосфере N_2 . Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 5 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь очищали препаративной HPLC и получали BCY12979 (16,0 мг, 2,02 мкмоль, 51% выход, 96,6% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7641,87, наблюдаемые величины m/z: 1911,2 ($[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$), 1528,3 ($[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$), 1247,5 ($[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$), 1092,2 ($[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$).

Пример 22. Синтез BCY10918



Методика получения соединения 1



Смесь COM00000329 (102 мг, 58,76 мкмоль, 1,0 экв), BCY11015 (92,6 мг, 41,13 мкмоль, 0,7 экв) и ТНРТА (0,4 М, 146,9 мкл, 1,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/ H_2O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N_2), и затем добавляли CuSO_4 (0,4 М, 146,9 мкл, 1,0 экв) и VcNa (0,4 М, 293,8 мкл, 2,0 экв) в атмосфере N_2 . Величину pH этого раствора довели до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH_4HCO_3 (в 1:1 t-BuOH/ H_2O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N_2 . Анализ методом LC-MS показывал, что

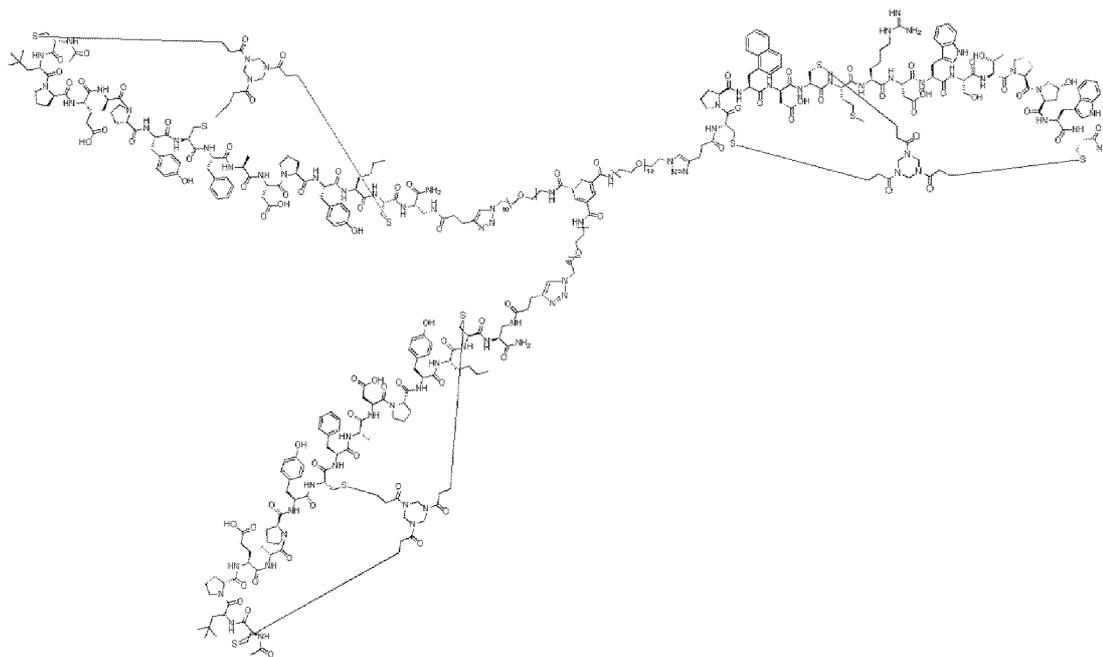
СОМ00000329 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z . Реакционную смесь непосредственно очищали препаративной HPLC. Получали соединение 1 (60 мг, 13,61 мкмоль, 23,16% выход, 90,45% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 3988,52, наблюдаемые величины m/z : 1329,97 ($[M+3H]^{3+}$), 990,56 ($[M+4H]^{4+}$).

Методика получения ВСУ10918

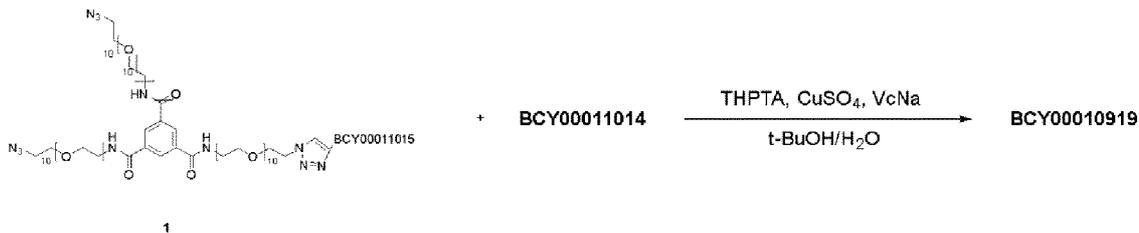


Смесь соединения 1 (60 мг, 15,04 мкмоль, 1,0 экв), ВСУ8928 (72,0 мг, 32,47 мкмоль, 2,2 экв) и THPTA (0,4 М, 37,6 мкл, 1,0 экв) растворяли в смеси $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 2 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N_2), и затем добавляли CuSO_4 (0,4 М, 37,6 мкл, 1,0 экв) и VcNa (0,4 М, 75,2 мкл, 2,0 экв) в атмосфере N_2 . Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH_4HCO_3 (в 1:1 $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N_2 . Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z . Реакционную смесь непосредственно очищали препаративной HPLC. Получали ВСУ10918 (48 мг, 5,47 мкмоль, 36% выход, 96% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 8423,67, наблюдаемые величины m/z : 1404,27 ($[M+6H]^{6+}$), 1203,73 ($[M+7H]^{7+}$).

Пример 23. Синтез ВСУ10919

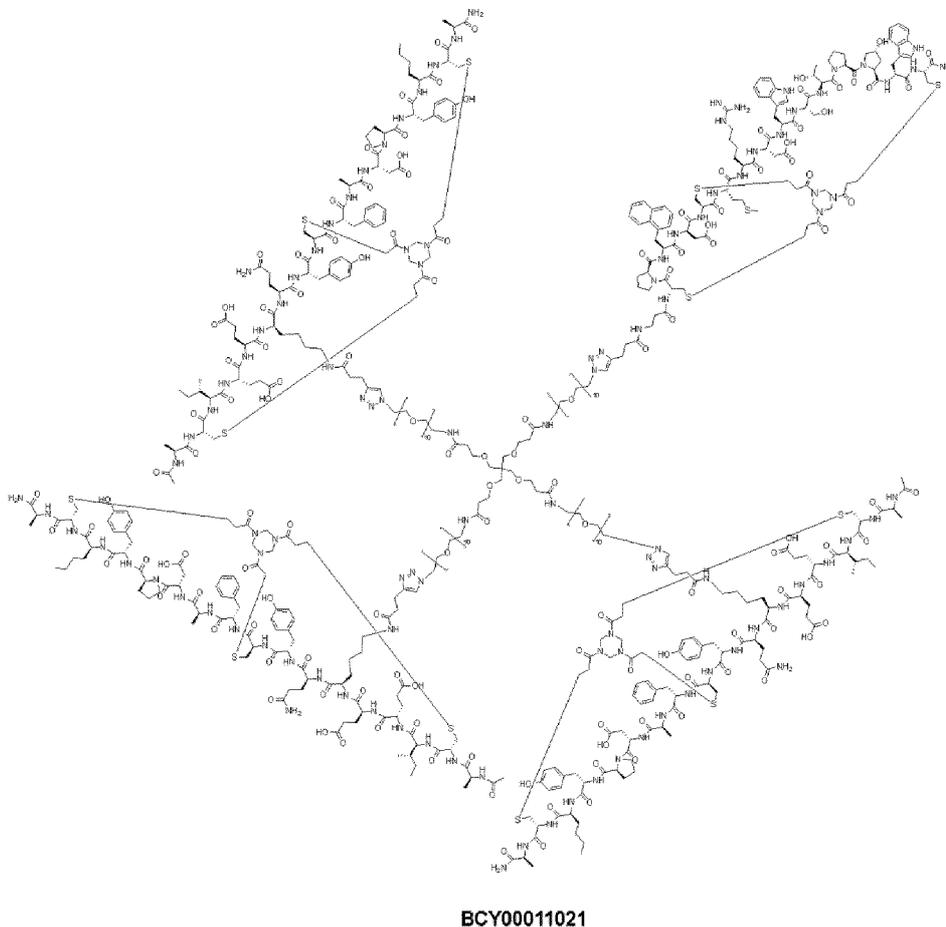


Методика получения ВСУ10919

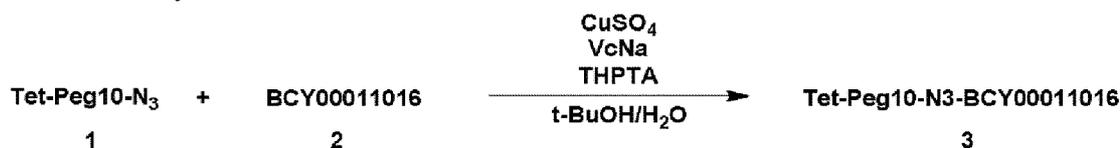


Смесь соединения 1 (75 мг, 18,8 мкмоль, 1,0 экв), ВСУ11014 (93,75 мг, 43,1 мкмоль, 2,3 экв) и THPTA (0,4 М, 47,0 мкл, 1,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 47,0 мкл, 1,0 экв) и VcNa (0,4 М, 94,0 мкл, 2,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25-30°C в течение 12 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь непосредственно очищали препаративной HPLC. Получали ВСУ10919 (96 мг, 11,39 мкмоль, 60,59% выход, 96,12% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 8339,54, наблюдаемые величины m/z: 1391,3 ([M+6H]⁶⁺), 1192,5 ([M+7H]⁷⁺).

Пример 24. Синтез ВСУ11021

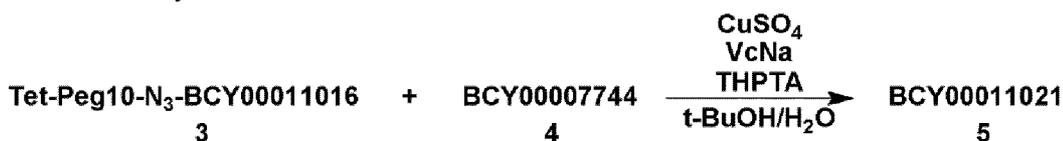


Методика получения соединения 3



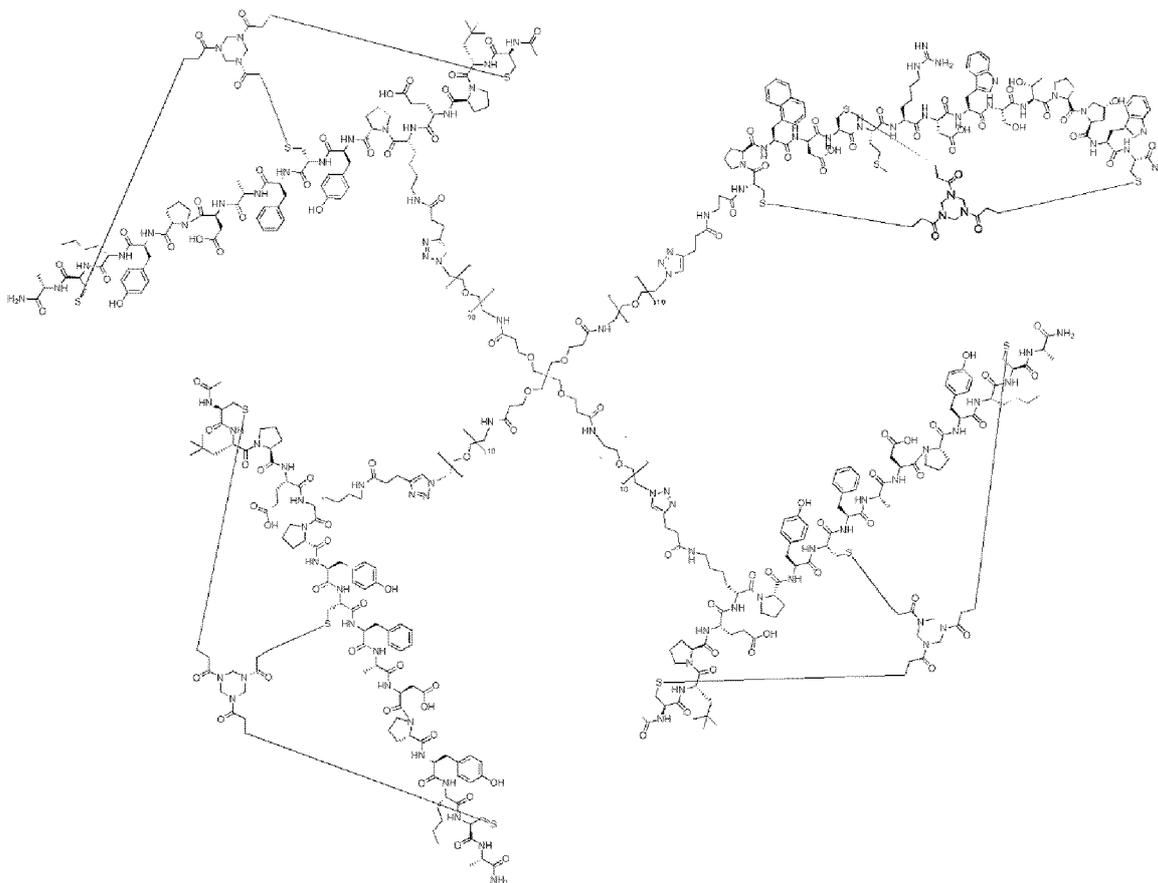
Смесь соединения 1 (15,0 мг, 6,10 мкмоль, 1,0 экв), BCY11016 (18,4 мг, 7,93 мкмоль, 1,3 экв) и THPTA (2,65 мг, 6,10 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (30,0 мкл, 0,4М, 2,0 экв) и VcNa (0,4 М, 30,0 мкл, 2,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 4 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь затем концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получали остаток, который затем очищали препаративной HPLC. Получали соединение 3 (2,89 мг, 0,514 мкмоль, 8,42% выход, 83,4% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 4782,46, наблюдаемая величина m/z: 963,9 ([M+3H+2H₂O]⁵⁺).

Методика получения BCY11021



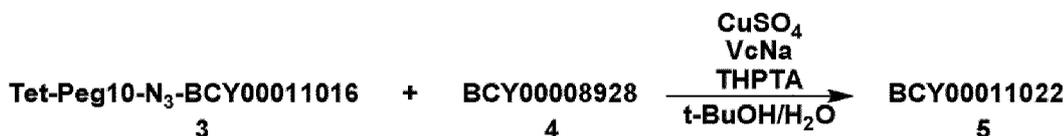
Смесь соединения 3 (2,89 мг, 0,60 мкмоль, 1,0 экв), BCY7744 (4,38 мг, 1,87 мкмоль, 3,1 экв) и THPTA (0,9 мг, 2,1 мкмоль, 3,5 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 3,0 мкл, 2,0 экв) и VcNa (0,4 М, 6,0 мкл, 4,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 4 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 3 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY11021 (2,8 мг, 0,229 мкмоль, 37% выход, 96,4% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 11795,38, наблюдаемые величины m/z: 1310,6 ([M+9H]⁹⁺), 786,6 ([M+15H]¹⁵⁺).

Пример 25. Синтез BCY11022



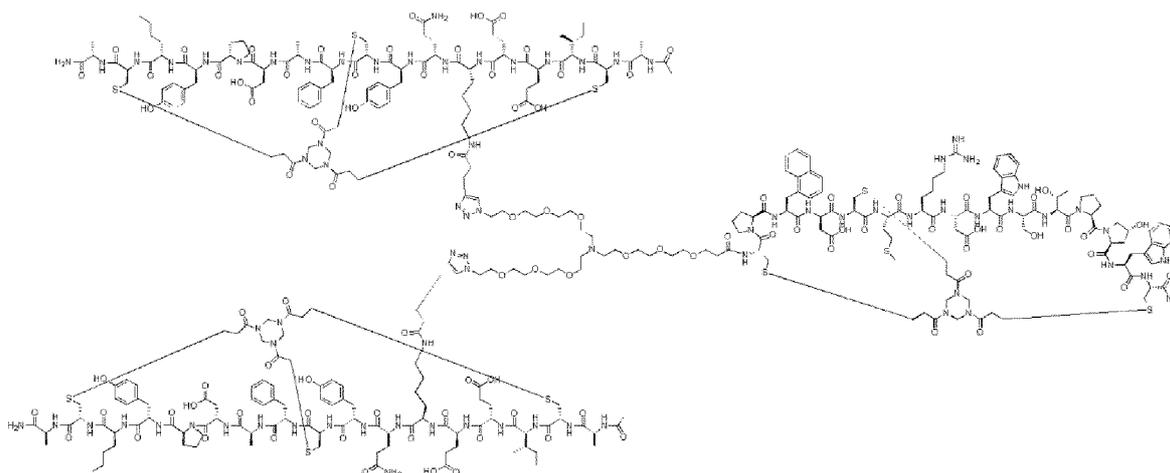
BCY00011022

Методика получения BCY11022



Смесь соединения 3 (2,7 мг, 0,6 мкмоль, 1,0 экв), BCY8928 (5,3 мг, 2,38 мкмоль, 4,0 экв) и THPTA (0,9 мг, 2,1 мкмоль, 3,5 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 6,0 мкл, 4,0 экв) и VcNa (0,4 М, 6,0 мкл, 4,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора довели до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 4 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 3 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY11022 (1,9 мг, 1,0 мкмоль, 23,2% выход, 94,6% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 11435,19, наблюдаемая величина m/z: 1143,2 ([M+10H]¹⁰⁺).

Пример 26. Синтез BCY11864



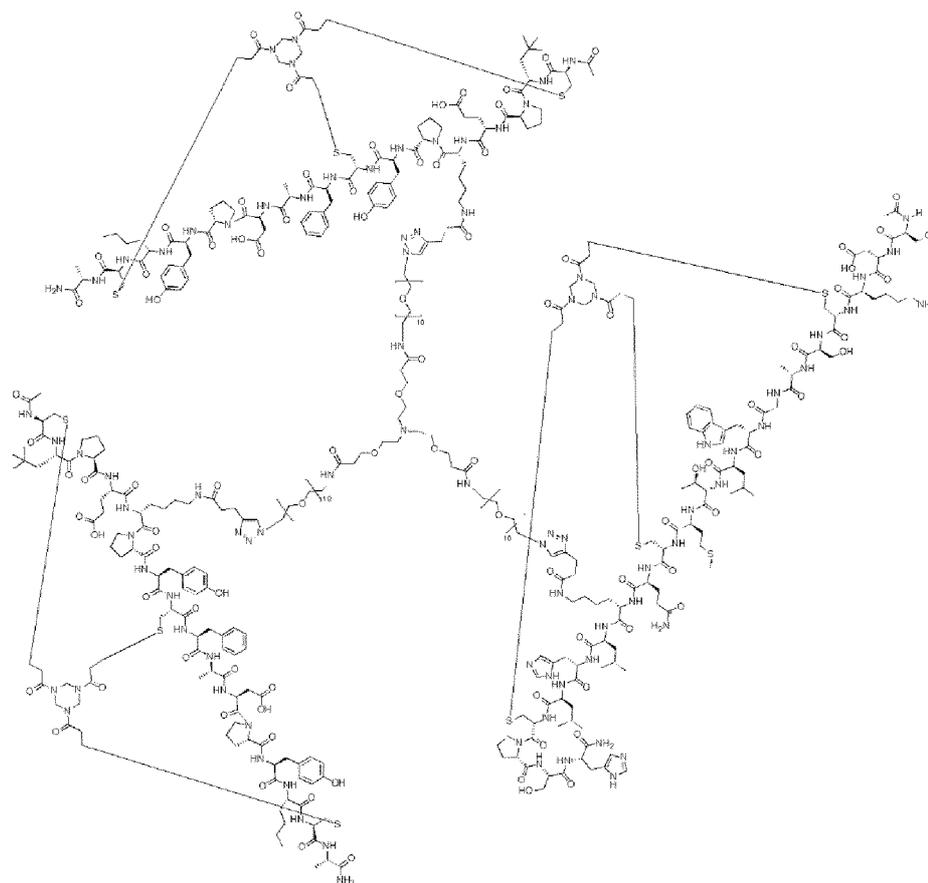
BCY00011864

Методика получения BCY11864



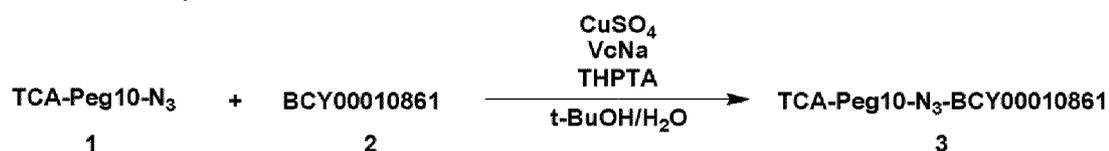
Смесь соединения **2** (5 мг, 1,80 мкмоль, 1,0 экв), BCY7744 (9 мг, 3,85 мкмоль, 2,1 экв), THPTA (0,4 М, 9 мкл, 1,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 2 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 9 мкл, 2,0 экв) и VcNa (0,4 М, 18 мкл, 4,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора довели до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что оставалось BCY7744, и был обнаружен пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь непосредственно очищали препаративной HPLC. Получали BCY11864 (5,2 мг, 0,62 мкмоль, 34% выход, 89% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7453,44, наблюдаемая величина m/z: 1490,70 ([M+5H]⁵⁺).

Пример 27. Синтез BCY11780



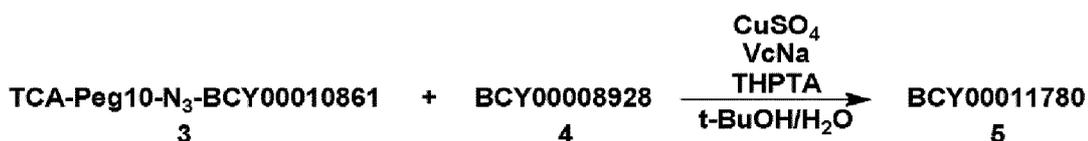
BCY00011780

Методика получения соединения 3



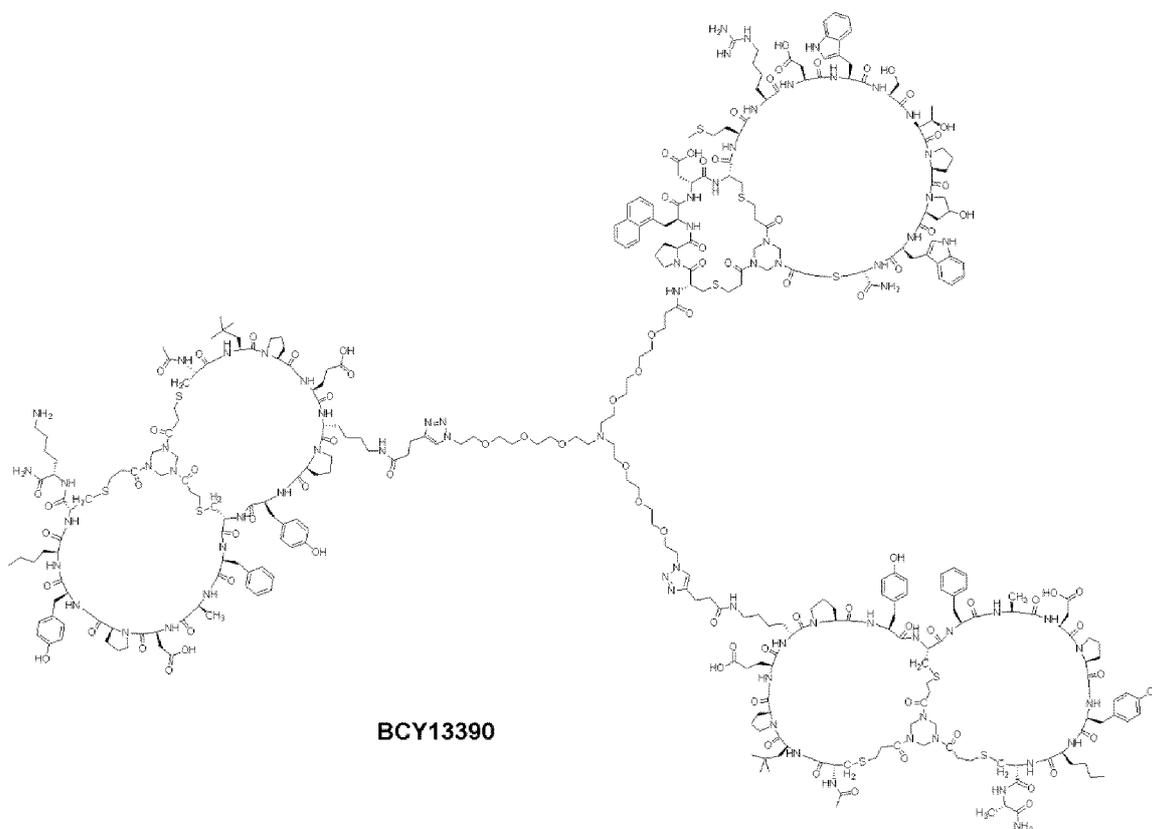
Смесь соединения 1 (40,0 мг, 21,15 мкмоль, 1,0 экв), соединение 2 (43,0 мг, 15,86 мкмоль, 0,75 экв) и THPTA (10,0 мг, 21,20 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (53,0 мкл, 0,4М, 1,0 экв) и VcNa (0,4 М, 53,0 мкл, 1,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 4 часов, Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 2 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь затем концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя, и получали остаток. Остаток очищали препаративной HPLC. Получали соединение 3 (11,7 мг, 2,44 мкмоль, 11% выход, 96,2% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 4607,33, наблюдаемая величина m/z: 1152,36 ([M+4H]⁴⁺).

Методика получения BCY11780

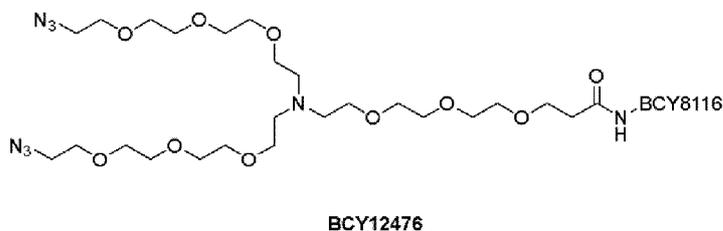
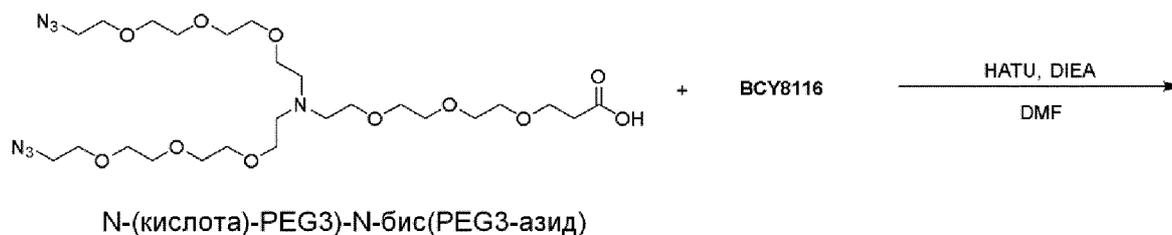


Смесь соединения 3 (11,7 мг, 2,54 мкмоль, 1,0 экв), VCY8928 (11,8 мг, 5,33 мкмоль, 2,1 экв) и THPTA (2,3 мг, 5,3 мкмоль, 2,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 1 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 М, 12,7 мкл, 2,0 экв) и VcNa (0,4 М, 25,4 мкл, 4,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 4 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 3 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали VCY11780 (5,0 мг, 0,509 мкмоль, 20,03% выход, 92,0% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 9042,48, наблюдаемые величины m/z: 1292,8 ([M+7H]⁷⁺), 1130,96 ([M+8H]⁸⁺).

Пример 28. Синтез VCY13390

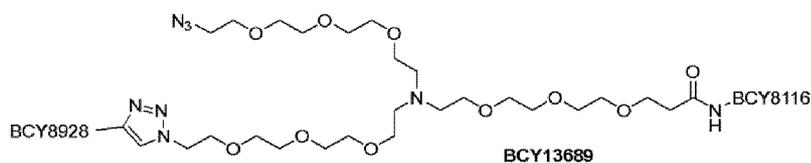
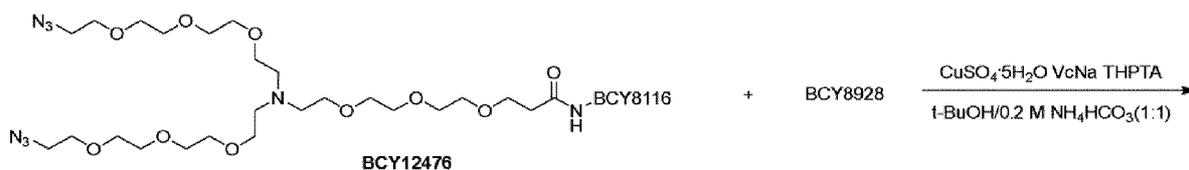


Методика получения VCY12476



Смесь N-(кислота-PEG3)-N-бис(PEG3-азид) (70,0 мг, 112,2 мкмоль, 1,0 экв), HATU (51,2 мг, 134,7 мкмоль, 1,2 экв) и DIEA (29,0 мг, 224,4 мкмоль, 40 мкл, 2,0 экв) растворяли в DMF (2 мл), и смешивали в течение 5 минут. Затем добавляли BCY8116 (294,0 мг, 135,3 мкмоль, 1,2 экв). Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя и получали остаток. Остаток затем очищали препаративной HPLC. Получали BCY12476 (194,5 мг, 66,02 мкмоль, 29% выход, 94% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина m/z: 2778,17, наблюдаемые величины m/z: 1389,3 ($[M+2H]^{2+}$), 926,7 ($[M+3H]^{3+}$).

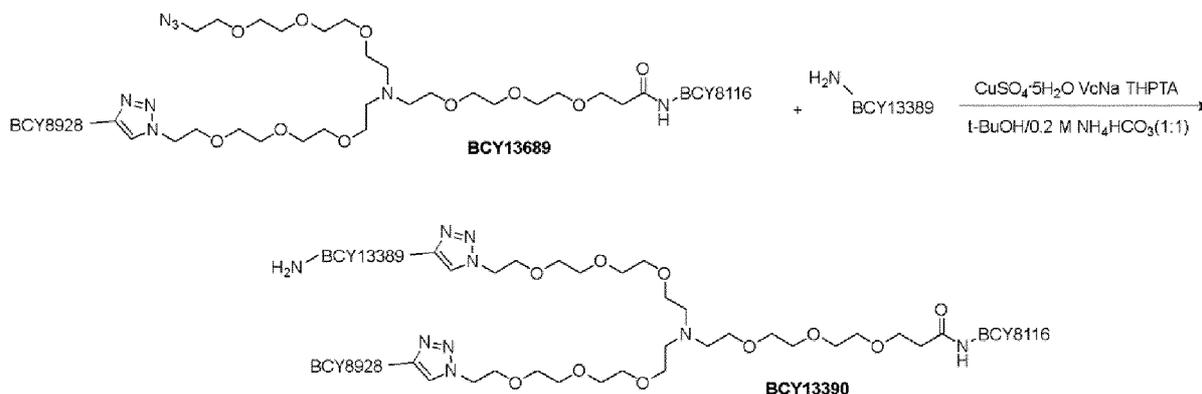
Методика получения BCY13689



Смесь BCY12476 (47,0 мг, 16,91 мкмоль, 1,0 экв), BCY8928 (30,0 мг, 13,53 мкмоль, 0,8 экв) и THPTA (36,7 мг, 84,55 мкмоль, 5,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/H₂O (1:1, 8 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 мг, 21,0 мкл, 0,5 экв) и VcNa (67,0 мг, 338,21 мкмоль, 20,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора довели до 8 путем добавления по каплям 0,2 М NH₄HCO₃ (в 1:1 t-BuOH/H₂O), и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1,5 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что оставалось

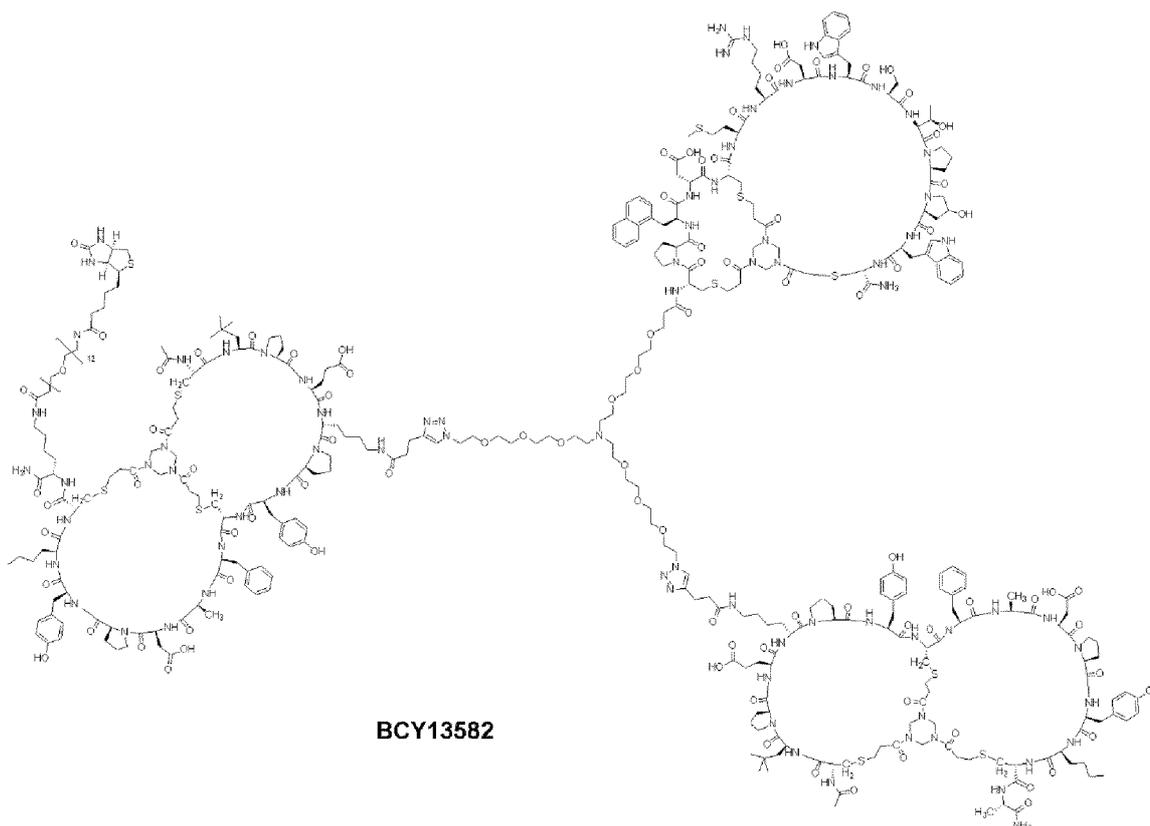
некоторое количество BCY12476, BCY8928 полностью прореагировало, и был обнаружен пик с требуемой величиной m/z . Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY13689 (25,3 мг, 4,56 мкмоль, 27% выход, 90% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 4995,74, наблюдаемые величины m/z : 1249,4 ($[M+4H]^{4+}$), 999,9 ($[M+5H]^{5+}$).

Методика получения BCY13390

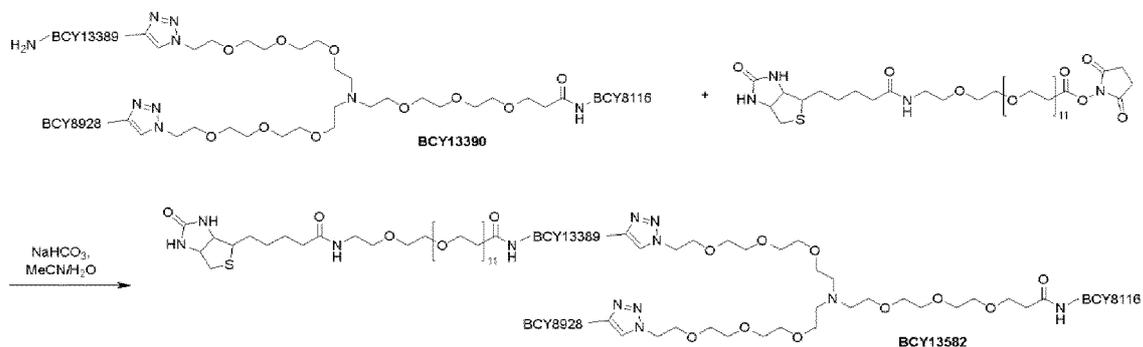


Смесь BCY13689 (43,6 мг, 8,73 мкмоль, 1,0 экв), BCY13389 (20,8 мг, 9,16 мкмоль, 1,05 экв) и THPTA (3,8 мг, 8,73 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в смеси $t-BuOH/H_2O$ (1:1, 1 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N_2), и затем добавляли $CuSO_4$ (0,4 М, 22,0 мкл, 1,0 экв) и $VcNa$ (3,5 мг, 17,45 мкмоль, 2,0 экв) в атмосфере N_2 . Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям $0,2 M NH_4HCO_3$ (в 1:1 $t-BuOH/H_2O$), и раствор приобретал светло-желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при $25^\circ C$ в течение 2 часов в атмосфере N_2 . Анализ методом LC-MS показывал наличие что значительного по размеру пика, соответствующего требуемой величине m/z . Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY13390 (33,8 мг, 4,21 мкмоль, 48% выход, 90% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7270,41, наблюдаемые величины m/z : 1454,9 ($[M+5H]^{5+}$), 1213,2 ($[M+6H]^{6+}$).

Пример 29. Синтез BCY13582

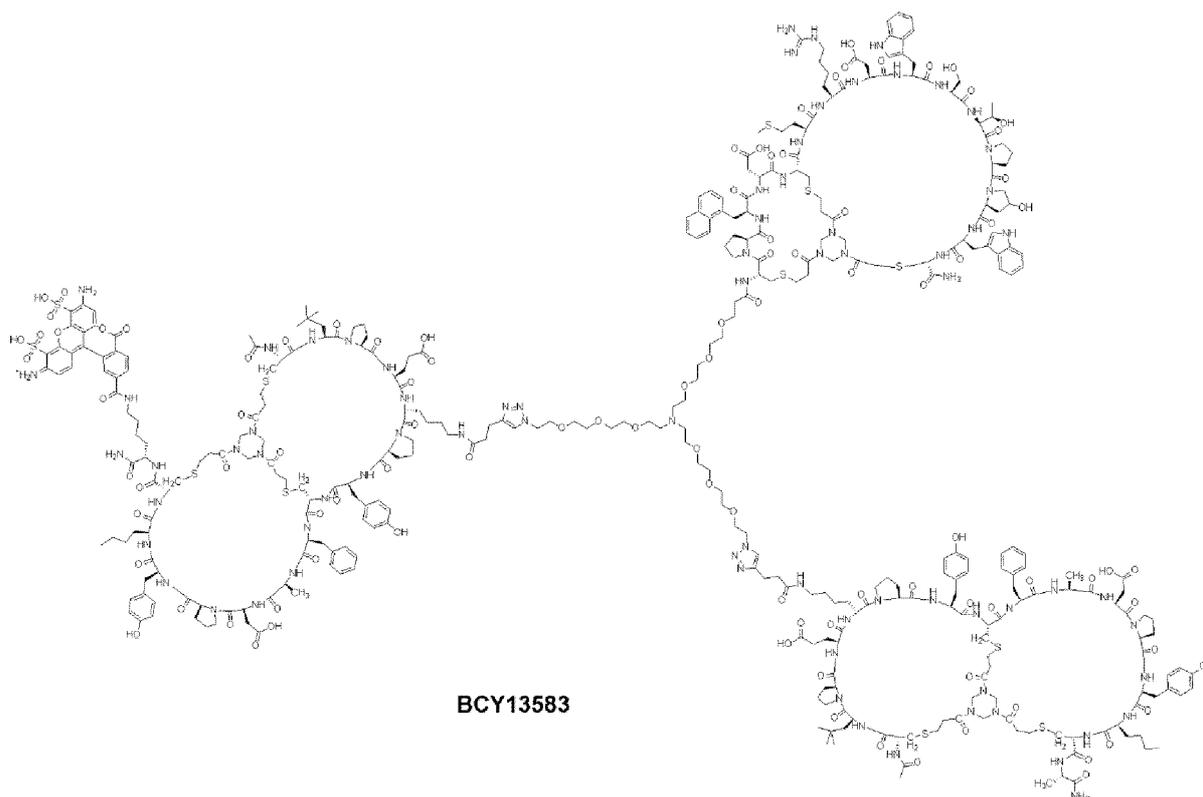


Методика получения BCU13582

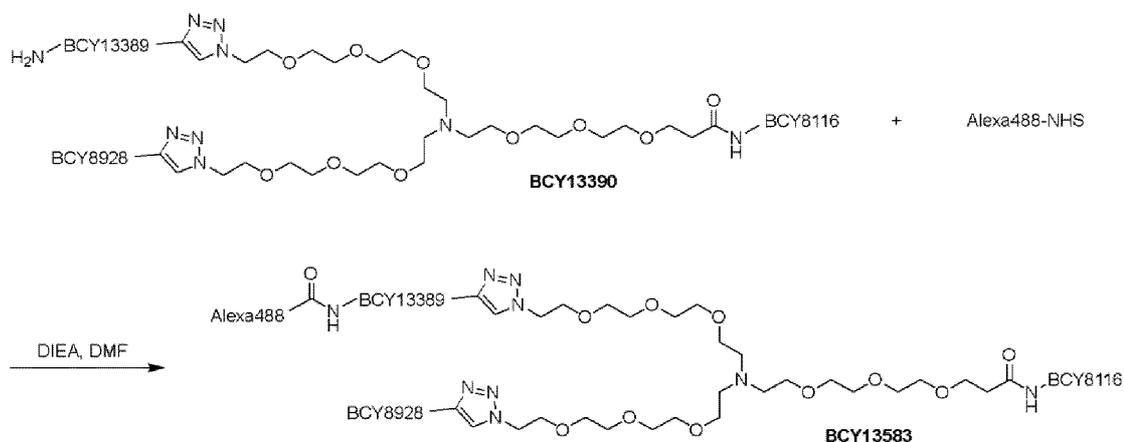


Смесь BCU13390 (5,0 мг, 0,6 мкмоль, 1,0 экв), биотин-PEG12-NHS эфира (CAS 365441-71-0, 0,7 мг, 0,72 мкмоль, 1,1 экв) растворяли в MeCN/H₂O (1:1, 2 мл). Величину pH этого раствора довели до 8 путем добавления по каплям 1,0 М NaHCO₃. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что BCU13390 полностью прореагировало, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCU13582 (2,5 мг, 0,30 мкмоль, 43% выход, 96% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 8096,43, наблюдаемые величины m/z: 1351,1 ([M+6H]⁶⁺), 1158,5 ([M+7H]⁷⁺).

Пример 30. Синтез BCU13583



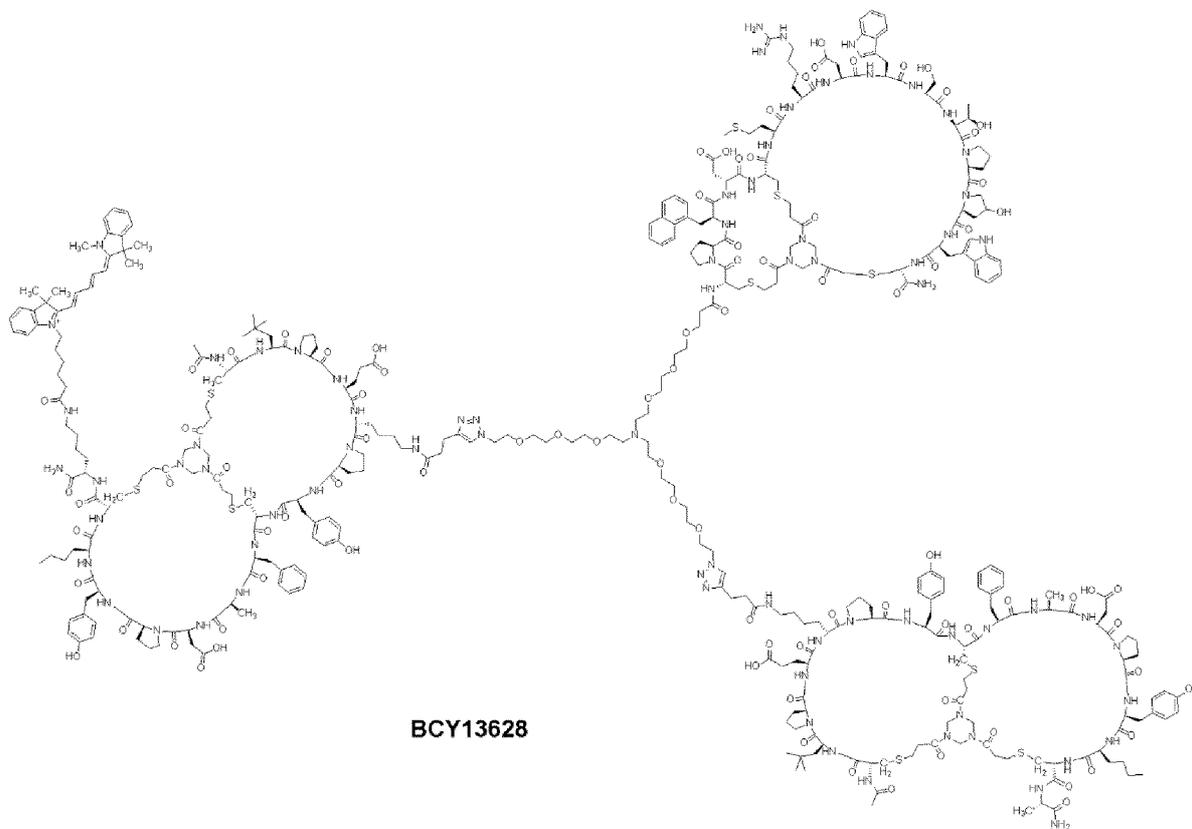
Методика получения BCY13583



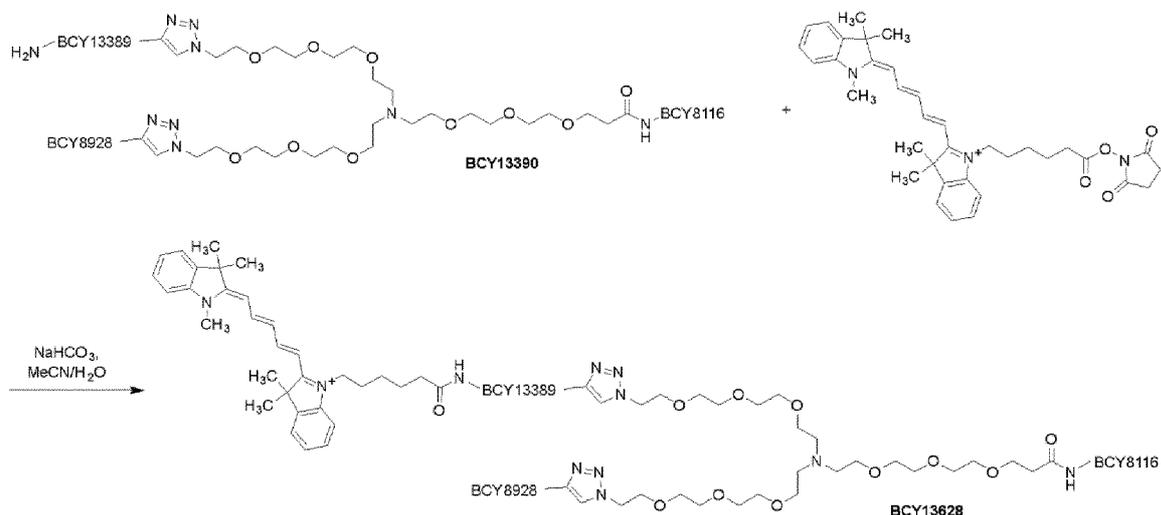
Смесь BCY13390 (15,0 мг, 2,06 мкмоль, 1,0 экв) и Alexa fluor® 488 NHS эфира (2,5 мг, 4,12 мкмоль, 2,0 экв) растворяли в DMF (0,5 мл). Затем добавляли по каплям DIEA (2,6 мг, 20,63 мкмоль, 3,6 мкл, 10 экв). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что оставалось BCY13390, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z . К реакционной смеси добавляли дополнительное количество Alexa fluor® 488 NHS эфира (2,0 мг, 3,09 мкмоль, 1,5 экв), и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение еще одного часа. Анализ методом HPLC показывал, что BCY13390 полностью прореагировало. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY13583 (5 мг, 0,61 мкмоль, 29% выход, 95% чистота) в виде красного твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7787,9,

наблюдаемые величины m/z : 1948,8 ($[M+4H+H_2O]^{4+}$), 1558,6 ($[M+5H+H_2O]^{5+}$), 1299,1 ($[M+7H+H_2O]^{7+}$).

Пример 31. Синтез BCY13628



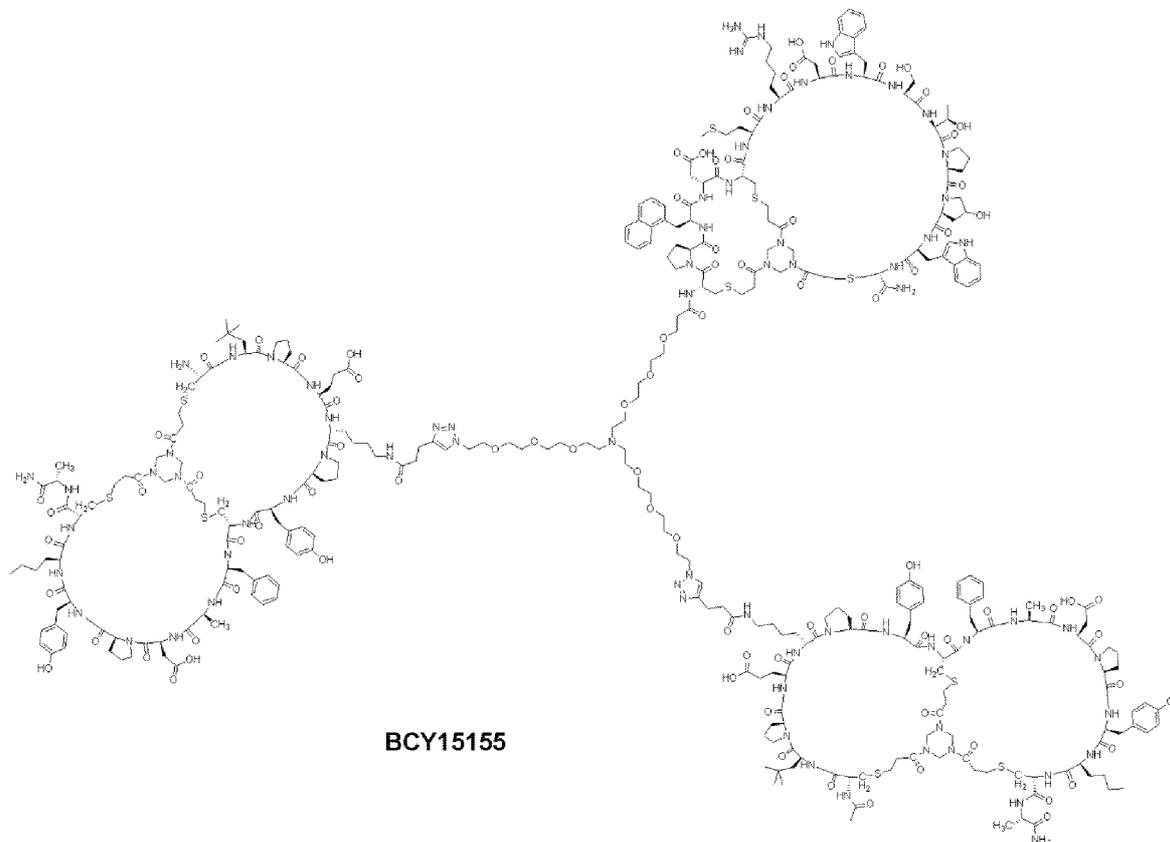
Методика получения BCY13628



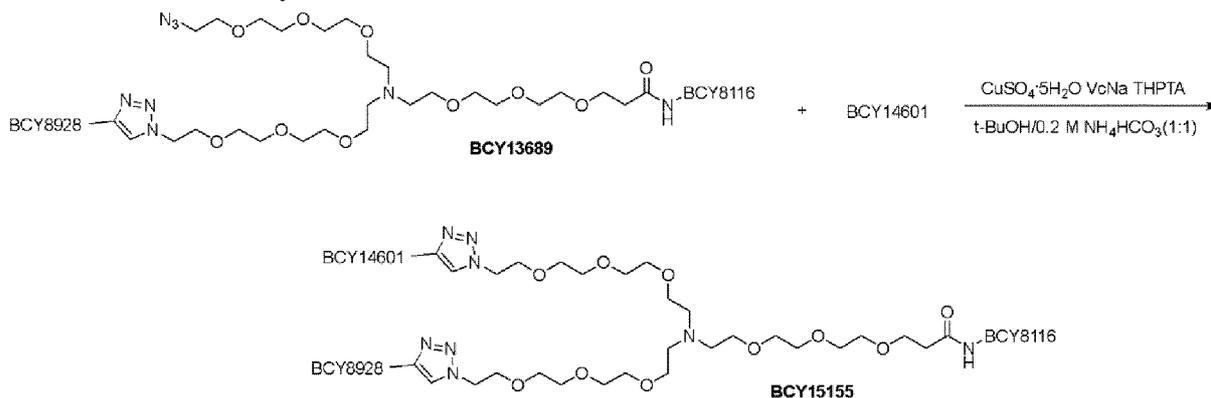
Смесь BCY13390 (5,6 мг, 0,77 мкмоль, 1,0 экв) и цианин 5 NHS эфира (0,5 мг, 0,85 мкмоль, 1,1 экв) растворяли в MeCN/H₂O (1:1, 2 мл). Величину pH этого раствора доводили до 8 путем добавления по каплям 1,0 М NaHCO₃. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что BCY13390 полностью прореагировало и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z . Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с

получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY13628 (2,9 мг, 0,36 мкмоль, 46% выход, 95% чистота) в виде голубого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7736,06, наблюдаемые величины m/z: 1289,9 ($[M+6H]^{6+}$), 1105,5 ($[M+7H]^{7+}$).

Пример 32. Синтез BCY15155



Методика получения BCY15155



Смесь BCY13689 (25,0 мг, 5,00 мкмоль, 1,0 экв), BCY14601 (13,0 мг, 6,01 мкмоль, 1,2 экв) и THPTA (2,0 мг, 5,00 мкмоль, 1,0 экв) растворяли в смеси t-BuOH/0,2 M NH₄HCO₃ (1:1, 0,5 мл, предварительно дегазированной и продутой с помощью N₂), и затем добавляли CuSO₄ (0,4 M, 12,5 мкл, 1,0 экв) and Vc (3,5 мг, 20,02 мкмоль, 4,0 экв) в атмосфере N₂. Величину pH этого раствора доводили до 8, и раствор приобретал желтый цвет. Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов в атмосфере N₂. Анализ

методом LC-MS показывал, что BCY13689 полностью прореагировало, осталось некоторое количество BCY14601, и был обнаружен один основной пик с требуемой величиной m/z . Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Неочищенный продукт очищали препаративной HPLC, и получали BCY15155 (19,7 мг, 2,41 мкмоль, 36% выход, 97% чистота) в виде белого твердого вещества. Рассчитанная величина MW: 7171,3, наблюдаемый величины m/z : 1434,7 ($[M+5H]^{5+}$), 1196,2 ($[M+6H]^{6+}$).

ДАННЫЕ АНАЛИЗА

Проводили анализ следующих гетеротандемных бициклических пептидных комплексов по изобретению методами масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Анализы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии А-С проводили при указанных ниже условиях:

Подвижная фаза: А: 0,1%TFA in H₂O В: 0,1%TFA in ACN

Расход: 1,0 мл/мин

Колонка: Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 мм x 4,6 мм

Прибор: Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)

Анализы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии D проводили при указанных ниже условиях:

Подвижная фаза: А: 0,1%TFA в H₂O В: 0,1%TFA в ACN

Расход: 1,0мл/мин

Колонка: Kintex 1,7 мкм C18 100A 2,1 мм x 150 мм

Прибор: Agilent UPLC 1290

Используемые градиенты описаны в таблице ниже:

Метод анализа	Описание градиента
А	25-55% В в течение 20 минут
В	30-60% В в течение 20 минут
С	45-75% В в течение 20 минут
Д	30-60% В в течение 20 минут

и были получены следующие данные:

№ комплекса	Данные анализа методом масс-спектрометрии	Время удерживания (мин) методом HPLC	Метод анализа
BCY11027	рассчитанная величина MW: 8578,91, наблюдаемая величина m/z : 1430,6 ($[M+6H]^{6+}$)	13,423	А
BCY11863	рассчитанная величина MW: 7213,32, наблюдаемая величина m/z : 1444,0 ($[M+5H]^{5+}$)	10,649	В

BCY12486	рассчитанная величина MW: 7069,21, наблюдаемые величины m/z: 1768,2([M+4H] ⁴⁺), 1415,0([M+5H] ⁵⁺)	15,799	A
BCY12487	рассчитанная величина MW: 7099,21, наблюдаемая величина m/z: 1775,8([M+4H] ⁴⁺)	10,936	B
BCY12586	рассчитанная величина MW: 6985,11, наблюдаемая величина m/z: 1746,5([M+4H] ⁴⁺)	11,512	B
BCY12588	рассчитанная величина MW: 6871,01, наблюдаемая величина m/z: 1718,5([M+4H] ⁴⁺)	12,44	B
BCY12491	рассчитанная величина MW: 7441,63, наблюдаемые величины m/z: 1861,1 ([M+4H] ⁴⁺), 1489,0 ([M+5H] ⁵⁺)	12,274	A
BCY12723	рассчитанная величина MW: 7363,49, наблюдаемые величины m/z: 1473,3 [M+5H] ⁵⁺ , 1841,5 [M+4H] ⁴⁺	13,33	A
BCY12724	рассчитанная величина MW: 7299,50, наблюдаемые величины m/z: 1217,5 [M+6H] ⁶⁺ , 1460,8 [M+5H] ⁵⁺ , 1825,5 [M+4H] ⁴⁺	12,411	A
BCY12725	рассчитанная величина MW: 7295,51, наблюдаемые величины m/z: 1460,7 [M+5H] ⁵⁺ , 1825,4 [M+4H] ⁴⁺	8,704	B
BCY12726	рассчитанная величина MW: 7327,55, наблюдаемые величины m/z: 1466,7 [M+5H] ⁵⁺ , 1832,2 [M+4H] ⁴⁺	8,679	B
BCY12728	рассчитанная величина MW: 7325,58, наблюдаемые величины m/z: 1466,3 [M+5H] ⁵⁺ , 1831,9 [M+4H] ⁴⁺	11,81	A
BCY12729	рассчитанная величина MW: 7213,44, наблюдаемые величины m/z: 1443,4 [M+5H] ⁵⁺ , 1803,9 [M+4H] ⁴⁺	13,066	A

BCY12730	рассчитанная величина MW: 7185,39, наблюдаемые величины m/z: 1197,5 [M+6H] ⁶⁺ , 1438,4 [M+5H] ⁵⁺	9,81	B
BCY12731	рассчитанная величина MW: 7099,34, наблюдаемые величины m/z: 1184,5 [M+6H] ⁶⁺ , 1421,3 [M+5H] ⁵⁺	10,583	B
BCY12732	рассчитанная величина MW: 8208,70, наблюдаемая величина m/z: 1173,4 [M+7H] ⁷⁺	11,117	C
BCY13272	рассчитанная величина MW: 7102,28, наблюдаемые величины m/z: 1776,4 [M+4H] ⁴⁺ , 1421,3 [M+5H] ⁵⁺	7,07	D

Дополнительно были получены следующие данные:

№ комплекса	Данные анализа методом масс-спектрологии
BCY13279	MW: 7562,83 наблюдаемые величины m/z: 2521,9 ([M+3H] ³⁺), 1891,4 ([M+4H] ⁴⁺), 1513,5 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY13283	MW: 7215,45 наблюдаемые величины m/z: 2406,1 ([M+3H] ³⁺), 1804,8 ([M+4H] ⁴⁺), 1444,1 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY13287	MW: 7397,64 наблюдаемые величины m/z: 2467,1 ([M+3H] ³⁺), 1850,6 ([M+4H] ⁴⁺), 1480,7 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY14049	MW: 7455,68 наблюдаемые величины m/z: 2486,2 ([M+3H] ³⁺), 1864,9 ([M+4H] ⁴⁺), 1492,1 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY14050	MW: 7455,68 наблюдаемые величины m/z: 2486,2 ([M+3H] ³⁺), 1864,9 ([M+4H] ⁴⁺), 1492,1 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY14051	MW: 7458,7 наблюдаемые величины m/z: 2487,2 ([M+3H] ³⁺), 1865,6 ([M+4H] ⁴⁺), 1492,7 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY14052	MW: 7451,69 наблюдаемые величины m/z: 2484,9 ([M+3H] ³⁺), 1863,9 ([M+4H] ⁴⁺), 1491,3 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY14053	MW: 7457,71 наблюдаемые величины m/z: 2486,8 ([M+3H] ³⁺), 1865,4 ([M+4H] ⁴⁺), 1492,5 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY14054	MW: 7457,71 наблюдаемые величины m/z: 2486,8 ([M+3H] ³⁺), 1865,4 ([M+4H] ⁴⁺), 1492,5 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY14055	MW: 7418,62 наблюдаемые величины m/z: 2473,8 ([M+3H] ³⁺), 1855,6 ([M+4H] ⁴⁺), 1484,7 ([M+5H] ⁵⁺)

BCY14056	MW: 7432,64 наблюдаемые величины m/z: 2478,5 ($[M+3H]^{3+}$), 1859,1 ($[M+4H]^{4+}$), 1487,5 ($[M+5H]^{5+}$)
BCY14334	MW: 8052,48 наблюдаемые величины m/z: 1611,4 ($[M+5H]^{5+}$), 1343,0 ($[M+6H]^{6+}$), 1151,2 ($[M+7H]^{7+}$)
BCY14335	MW: 8052,48 наблюдаемые величины m/z: 1611,4 ($[M+5H]^{5+}$), 1342,8 ($[M+6H]^{6+}$), 1151,1 ($[M+7H]^{7+}$)
BCY14413	MW: 7498,75 наблюдаемые величины m/z: 938,3 ($[M+8H]^{8+}$), 1072,2 ($[M+7H]^{7+}$), 1250,9 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY14415	MW: 8324,75 наблюдаемые величины m/z: 1388,4 ($[M+6H]^{6+}$), 1190,2 ($[M+7H]^{7+}$), 1041,5 ($[M+8H]^{8+}$)
BCY14416	MW: 8015,2 наблюдаемая величина m/z: 1336,5 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY12733	MW: 7307,33 наблюдаемые величины m/z: 1827,1 ($[M+4H]^{4+}$), 1462,1 ($[M+5H]^{5+}$)
BCY12973	MW: 7611,86 наблюдаемая величина m/z: 1269,9 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY12974	MW: 7474,70 наблюдаемые величины m/z: 1869,3 ($[M+4H]^{4+}$), 1246,1 ($[M+5H]^{5+}$)
BCY12975	MW: 7498,70 наблюдаемая величина m/z: 1249,8 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY12976	MW: 7498,70 наблюдаемая величина m/z: 1249,8 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY12977	MW: 7455,68 наблюдаемая величина m/z: 1242,7 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY12978	MW: 7469,68 наблюдаемая величина m/z: 1067,1 ($[M+7H]^{7+}$)
BCY12979	MW: 7641,87 наблюдаемые величины m/z: 1911,2 ($[M+4H]^{4+}$), 1528,3 ($[M+5H]^{5+}$), 1247,5 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY13042	MW: 7433,62 наблюдаемые величины m/z: 1859,8 ($[M+4H]^{4+}$), 1487,1 ($[M+5H]^{5+}$)
BCY13043	MW: 7372,54 наблюдаемые величины m/z: 1843,5 ($[M+4H]^{4+}$), 1474,8 ($[M+5H]^{5+}$)
BCY13044	MW: 7364,50 наблюдаемая величина m/z: 1842,0 ($[M+4H]^{4+}$)
BCY13045	MW: 7435,60 наблюдаемая величина m/z: 1859,4 ($[M+4H]^{4+}$)
BCY13046	MW: 7320,51 наблюдаемая величина m/z: 1831,1 ($[M+4H]^{4+}$), 1464,6 ($[M+5H]^{5+}$)
BCY13047	MW: 7458,67 наблюдаемая величина m/z: 1865,7 ($[M+4H]^{4+}$)
BCY13049	MW: 7079,22 наблюдаемые величины m/z: 1770,9 ($[M+4H]^{4+}$), 1416,7 ($[M+5H]^{5+}$)

BCY13051	MW: 7376,53 наблюдаемые величины m/z: 1844,5 ([M+4H] ⁴⁺), 1476,1 ([M+5H] ⁵⁺),
BCY13052	MW: 7447,61 наблюдаемые величины m/z: 1862,6 ([M+4H] ⁴⁺), 1490,2 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY13054	MW: 7527,78 наблюдаемые величины m/z: 1882,6 ([M+4H] ⁴⁺), 1506,7 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY13138	MW: 7108,24 наблюдаемые величины m/z: 1422,5 ([M+5H] ⁵⁺), 1185,6 ([M+6H] ⁶⁺)
BCY13139	MW: 7249,37 наблюдаемая величина m/z: 1449,8 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY13140	MW: 7172,24 наблюдаемые величины m/z: 1435,4 ([M+5H] ⁵⁺), 1196,2 ([M+6H] ⁶⁺)
BCY13270	MW: 7523,8 наблюдаемые величины m/z: 1881,87 ([M+4H] ⁴⁺), 1505,70 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY13271	MW: 7501,75 наблюдаемые величины m/z: 1876,4 ([M+4H] ⁴⁺), 1501,3 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY13273	MW: 7076,26 наблюдаемые величины m/z: 1770,1 ([M+4H] ⁴⁺), 1416,2 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY13274	MW: 7272,51 наблюдаемые величины m/z: 1819,1 ([M+4H] ⁴⁺), 1455,5 ([M+5H] ⁵⁺)
BCY13275	MW: 7455,66 наблюдаемые величины m/z: 1865,5 ([M+4H] ⁴⁺), 1492,2 ([M+5H] ⁵⁺), 1243,5 ([M+6H] ⁶⁺)
BCY13276	MW: 7378,52 наблюдаемые величины m/z: 1845,7 ([M+4H] ⁴⁺), 1476,7 ([M+5H] ⁵⁺), 1230,6 ([M+6H] ⁶⁺)
BCY13277	MW: 7403,58 наблюдаемые величины m/z: 1850,9 ([M+4H] ⁴⁺), 1481,4 ([M+5H] ⁵⁺), 1234,8 ([M+6H] ⁶⁺)
BCY13278	MW: 7529,73 наблюдаемые величины m/z: 1506,4 ([M+5H] ⁵⁺), 1255,2 ([M+6H] ⁶⁺)
BCY13280	MW: 7323,4 наблюдаемые величины m/z: 1831,0 ([M+4H] ⁴⁺), 1465,4 ([M+5H] ⁵⁺), 1221,1 ([M+6H] ⁶⁺)
BCY13281	MW: 7265,36 наблюдаемые величины m/z: 1817,0 ([M+4H] ⁴⁺), 1453,6 ([M+5H] ⁵⁺), 1211,3 ([M+6H] ⁶⁺)
BCY13282	MW: 7194,29 наблюдаемые величины m/z: 1439,6 ([M+5H] ⁵⁺), 1199,9 ([M+6H] ⁶⁺)

BCY13284	MW: 7471,61 наблюдаемые величины m/z: 1245,5 ($[M+6H]^{6+}$), 1068,1 ($[M+7H]^{7+}$)
BCY13285	MW: 7471,61 наблюдаемая величина m/z: 1246,4 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY13286	MW: 7447,63 наблюдаемая величина m/z: 1241,7 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY13288	MW: 7439,7 наблюдаемые величины m/z: 1860,8 ($[M+4H]^{4+}$), 1240,6 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY13289	MW: 7417,65 наблюдаемые величины m/z: 1854,8 ($[M+4H]^{4+}$), 1484,4 ($[M+5H]^{5+}$), 1237,0 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY10918	MW: 8423,67 наблюдаемые величины m/z: 1404,27 ($[M+6H]^{6+}$), 1203,73 ($[M+7H]^{7+}$)
BCY10919	MW: 8339,54 наблюдаемые величины a m/z: 1391,3 ($[M+6H]^{6+}$), 1192,5 ($[M+7H]^{7+}$)
BCY11021	MW: 11795,38 наблюдаемые величины m/z: 1310,6 ($[M+9H]^{9+}$), 786,6 ($[M+15H]^{15+}$)
BCY11022	MW: 11435,19 наблюдаемая величина m/z: 1143,2 ($[M+10H]^{10+}$)
BCY11385	MW: 7129,18 наблюдаемые величины m/z: 1782,2 ($[M+4H]^{4+}$), 1426,3 ($[M+5H]^{5+}$), 1188,9 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY11864	MW: 7453,44 наблюдаемые величины m/z: 1864,31 ($[M+4H]^{4+}$), 1490,70 ($[M+5H]^{5+}$)
BCY12484	MW: 7135,17 наблюдаемые величины m/z: 1784,8 ($[M+4H]^{4+}$), 1427,8 ($[M+5H]^{5+}$)
BCY12485	MW: 7071,18 наблюдаемые величины m/z: 1768,7 ($[M+4H]^{4+}$), 1416,4 ($[M+5H]^{5+}$)
BCY12490	MW: 7268,46 наблюдаемые величины m/z: 1818,0 ($[M+4H]^{4+}$), 1453,9 ($[M+5H]^{5+}$)
BCY12587	MW: 6957,08 наблюдаемые величины m/z: 1740,2 ($[M+4H]^{4+}$), 1392,6 ($[M+5H]^{5+}$)
BCY12589	MW: 7724,06 наблюдаемые величины m/z: 1931,4 ($[M+4H]^{4+}$), 1545,1 ($[M+5H]^{5+}$), 1288,3 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY12590	MW: 7241,39 наблюдаемые величины m/z: 1810,7 ($[M+4H]^{4+}$), 1448,6 ($[M+5H]^{5+}$), 1208,4 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY11780	MW: 9042,48 наблюдаемые величины m/z: 1292,8 ($[M+7H]^{7+}$), 1130,96 ($[M+8H]^{8+}$)

BCY12662	MW: 7889,16 наблюдаемые величины m/z: 1578,8 ($[M+5H]^{5+}$), 1315,6 ($[M+6H]^{6+}$), 1128,3 ($[M+7H]^{7+}$)
BCY12722	MW: 7866,12 наблюдаемые величины m/z: 1967,0 ($[M+4H]^{4+}$), 1574,0 ($[M+5H]^{5+}$), 1312,0 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY12760	MW: 7047,16, наблюдаемая величина m/z: 1762,5 $[M+4H]^{4+}$
BCY12761	MW: 7047,16, наблюдаемые величины m/z: 1411,5 $[M+5H]^{5+}$, 1762,7 $[M+4H]^{4+}$
BCY13390	MW: 7270,41, наблюдаемые величины m/z: 1454,9($[M+5H]^{5+}$), 1213,2($[M+6H]^{6+}$)
BCY13582	MW: 8096,43, наблюдаемые величины m/z: 1351,1 ($[M+6H]^{6+}$), 1158,5 ($[M+7H]^{7+}$)
BCY13583	MW: 7787,9, наблюдаемые величины m/z: 1948,8 ($[M+4H+H_2O]^{4+}$), 1558,6 ($[M+5H+H_2O]^{5+}$), 1299,1 ($[M+7H+H_2O]^{7+}$)
BCY13628	MW: 7736,06, наблюдаемые величины m/z: 1289,9 ($[M+6H]^{6+}$), 1105,5 ($[M+7H]^{7+}$)
BCY14602	MW: 7129,2, наблюдаемые величины m/z: 1426,6 ($[M+5H]^{5+}$), 1189,1($[M+6H]^{6+}$)
BCY15155	MW: 7171,3, наблюдаемые величины m/z: 1434,7 ($[M+5H]^{5+}$), 1196,2 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY13048	MW: 7102,28, наблюдаемые величины m/z: 1776,4($[M+4H]^{4+}$), 1421,3($[M+3H]^{3+}$)
BCY13050	MW: 7453,66, наблюдаемая величина m/z: 1864,2($[M+4H]^{4+}$)
BCY13053	MW: 7185,38, наблюдаемая величина m/z: 1796,7 ($[M+4H]^{4+}$)
BCY13341	MW: 6929,13, наблюдаемые величины m/z: 1386,5($[M+5H]^{5+}$) and 1155,8($[M+6H]^{6+}$)
BCY13343	MW: 6846,04, наблюдаемая величина m/z: 1370,3 ($[M+5H]^{5+}$)
BCY14414	MW: 7503,74, наблюдаемые величины m/z: 1251,5 ($[M+5H]^{5+}$), 1072,9 ($[M+7H]^{7+}$)
BCY14417	MW: 8329,74, наблюдаемые величины m/z: 1389,6 ($[M+6H]^{6+}$), 1191,9 ($[M+7H]^{7+}$)
BCY14418	MW: 8020,19, наблюдаемая величина m/z: 1337,2 ($[M+6H]^{6+}$)
BCY15217	MW: 7362,5, наблюдаемые величины m/z: 1473,5 ($[M+5H]^{5+}$), 1228,2 ($[M+6H]^{6+}$), 1052,8 ($[M+7H]^{7+}$)
BCY15218	MW: 7404,6, наблюдаемая величина m/z: 1234,8 ($[M+6H]^{6+}$)

BCY12967	MW: 7077,7 наблюдаемые величины m/z: 1416,3 ([M+5H] ⁵⁺), 1180,4 ([M+6H] ⁶⁺), 1011,9 ([M+7H] ⁷⁺)
----------	---

ДАННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

1. Репортерный анализ на CD137 в совместной культуре с опухолевыми клетками

Культуральную среду, называемую средой R1, готовят путем добавления 1% FBS к RPMI-1640 (компонент набора Promega CS196005). Серийные разведения испытуемых образцов в R1 готовят в стерильном 96-луночном планшете. Добавляют 25 мкл на лунку исследуемых образцов или R1 (в качестве фонового контроля) в указанные лунки в планшете белого цвета для культивирования клеток. Опухолевые клетки* собирают и ресуспендируют в среде R1 при концентрации 400000 клеток/мл. Двадцать пять (25) мкл/лунка опухолевых клеток добавляют в планшет белого цвета для культивирования клеток. Клетки Jurkat (набор Promega CS196005, 0,5 мл) размораживают на водяной бане и затем добавляют к 5 мл предварительно подогретой среды R1. Двадцать пять (25) мкл/лунка клеток Jurkat затем добавляют в планшет белого цвета для культивирования клеток. Инкубируют клетки и испытуемые образцы в течение 6 часов при 37°C, 5% CO₂. По истечении 6 часов, добавляют 75 мкл/лунка реагента Bio-Glo™ (Promega) и инкубируют в течение 10 мин, затем считывают люминесценцию на планшет-ридере (Clariostar, BMG). Рассчитывают кратность изменения по отношению к взятым отдельно клеткам (клетки Jurkat+клеточная линия, используемая при совместном культивировании) и строят графическую зависимость ответа от логарифма концентрации (агониста) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism для определения величины EC₅₀ (нМ) и кратности индукции относительно фона (Max).

Опухолевые клетки, используемые в совместной культуре, представляют собой NCI-H292 и HT1376, которые, как было показано, экспрессируют нектин-4. Опухолевые клетки, используемые в совместной культуре для EphA2, представляют собой A549, PC3 и HT29. Опухолевые клетки, используемые в совместной культуре для PD-L1 представляют собой RKO.

Данные, представленные на фигуре 1А, показывают, что гетеротандем нектин-4/CD137 (BCY11863) индуцирует сильную активацию CD137 в репортерном анализе на CD137, и активация зависит от связывания гетеротандема с CD137. BCY11617, молекула, в которой CD137 бициклический пептид состоит полностью из D-аминокислот, которые предотвращают связывание, не индуцирует агонизма CD137.

Данные по величине EC₅₀ (нМ) и кратности индукции, вызываемой гетеротандемными бициклическими пептидными комплексами, полученные при репортерном анализе на CD137 в совместной культуре с нектин-4-экспрессирующей линией опухолевых клеток, приведены в таблице 1А ниже.

Таблица 1А. Кратность индукции, вызываемой нектин-4/CD137 гетеротандемным бициклическим пептидным комплексом в репортерном анализе на CD137

№ комплекса	Опухоль-мишень	Линия клеток, используемая в совместной культуре	EC ₅₀ (нМ)	Кратность индукции относительно фона
BCY11863	Нектин-4	NCI-H292	0,168±0,049	81±29

Данные по величине EC₅₀ (нМ), индуцируемой гетеротандемными бициклическими пептидными комплексами BCY11863 и наиболее близкими их аналогами при репортерном анализе на CD137 в совместной культуре с нектин-4-экспрессирующей линией опухолевых клеток, приведены в таблице 1В ниже и изображены на фигуре 1В. Эти данные демонстрируют способность BCY11863 индуцировать агонизм CD137 в совместной культуре с клеточными линиями, которые в различной степени экспрессируют нектин-4.

Таблица 1В. Величина EC₅₀ (нМ) кратности индукции относительно фона, вызываемой нектин-4/CD137 гетеротандемными бициклическими пептидными комплексами в репортерном анализе на CD137

№ комплекса	Линия опухолевых клеток представителя биологического вида	Линия клеток, используемая в совместной культуре	Средняя арифметическая величина EC ₅₀ (нМ)
BCY11863	мышь	CT26#7	0,14±0,07
BCY11863	мышь	MC38#13	0,31±0,26
BCY11863	человек	NCI-H292	0,28±0,20
BCY11863	человек	HT1376	0,52±0,30
BCY11863	человек	NCI-H322	0,33±0,21
BCY11863	человек	T47D	0,42±0,24
BCY11863	человек	MDA-MB-468	0,23±0,01
BCY13582	человек	HT1376	0,58±0,27
BCY13582	человек	MDA-MB-468	0,34±0,02
BCY13583	человек	HT1376	1,7±0,9
BCY13583	человек	MDA-MB-468	0,84±0,07

Данные по кратности индукции, вызываемой нектин-4/CD137 гетеротандемными пептидами в репортерном анализе на CD137 в совместной культуре с клетками NCI-H292, приведены в таблице 2 ниже. Все соединения сравниваются с планшетом, с контрольным BCY10000, который имеет среднюю величину EC₅₀ 1,1±0,5 нМ и кратность индукции относительно фона E_{max} 28±11.

Таблица 2. Кратность индукции, вызываемой нектин-4/CD137 гетеротандемными бициклическими пептидными комплексами в репортерном анализе на CD137

№ комплекса	Повышение кратности для EC ₅₀ относительно ВСУ10000 на одном и том же планшете	Повышение кратности для E _{max} относительно ВСУ10000 на одном и том же планшете
ВСУ12484	5,46	1,86
ВСУ11385	9,35	1,28
ВСУ11863	4,56	2,16
ВСУ11864	1,54	2,43
ВСУ12485	3,82	2,18
ВСУ12486	0,25	1,73
ВСУ12586	1,9	3,79
ВСУ12587	4,2	2,90
ВСУ12588	0,72	3,20
ВСУ12590	5,5	2,73
ВСУ11021	9,63	4,42

Данные по кратность индукции, вызываемой нектин-4/CD137 гетеротандемными пептидами в репортерном анализе на CD137 в совместной культуре с опухолевыми клетками T1376, представлены в таблице 2А ниже, в которой приводятся величины EC₅₀ (нМ) и E_{max} (кратность индукции относительно фона). Большинство нектин-4/CD137 гетеротандемов имеют величину EC₅₀ ниже 1 нМ.

Таблица 2А. Данные по EC₅₀ и E_{max} репортерного анализа в присутствии линии клеток, экспрессирующей нектин-4

№ комплекса	Линия клеток, экспрессирующая нектин-4	Число реплик (n)	EC ₅₀ (нМ)	Стандартное отклонение EC ₅₀ (нМ)	E _{max}	Стандартное отклонение E _{max}
ВСУ10918	HT1376	6	0,16	0,08	63	12
ВСУ10919	HT1376	6	0,19	0,12	62	11
ВСУ11022	HT1376	10	0,20	0,12	66	28
ВСУ11027	HT1376	4	0,18	0,08	45	13
ВСУ12487	HT1376	3	13	6	12	6
ВСУ12490	HT1376	3	0,23	0,07	70	16
ВСУ12589	HT1376	6	0,44	0,12	79	6
ВСУ12760	HT1376	6	1,8	0,4	76	12
ВСУ12761	HT1376	6	0,37	0,08	76	10
ВСУ13582	HT1376	3	0,58	0,27	57	16
ВСУ13583	HT1376	3	1,7	0,9	63	17

Данные, представленные на фигуре 16, показывают, что EphA2/CD137 гетеротандем ВСУ13272 индуцирует сильную активацию CD137 в репортерном анализе на CD137 в присутствии клеточной линии, экспрессирующей EphA2 (PC3, A549 и HT29), в то время как несвязывающая контрольная молекула (ВСУ13626) не вызывает активации CD137.

Данные по кратности индукции, вызываемой EphA2/CD137 гетеротандемными пептидами в репортерном анализе на CD137 в совместной культуре с клетками PC3, приведены в таблице 3А ниже. Все соединения сравниваются с планшетом с контрольным ВСУ9173, которые имеет среднюю величину EC_{50} 0,54 нМ и кратность E_{max} 42 относительно фона.

Таблица 3А. Кратность индукции, вызываемой EphA2/CD137 гетеротандемными бициклическими пептидными комплексами в репортерном анализе на CD137

№ комплекса	Клеточная линия EphA2	Повышение кратности относительно ВСУ9173, EC_{50} (нМ)	Повышение кратности относительно E_{max}
ВСУ12723	PC3	2,2	1,8
ВСУ12724	PC3	1,1	1,9
ВСУ12725	PC3	0,1	0,7
ВСУ12726	PC3	0,2	0,9
ВСУ12729	PC3	0,5	1,6
ВСУ12731	PC3	0,2	1,5
ВСУ12732	PC3	0,5	0,4
ВСУ12491	PC3	2,3	1,8
ВСУ13279	PC3	4,74	2,08
ВСУ13283	PC3	1,80	2,06
ВСУ13287	PC3	3,26	1,98
ВСУ14049	PC3	2,65	1,82
ВСУ14050	PC3	2,05	1,91
ВСУ14051	PC3	3,15	1,88
ВСУ14052	PC3	4,16	1,89
ВСУ14053	PC3	4,83	1,84
ВСУ14054	PC3	2,44	1,88
ВСУ14055	PC3	3,28	1,87
ВСУ14056	PC3	4,02	1,80
ВСУ14334	PC3	7,21	1,62
ВСУ14335	PC3	7,14	0,94

Данные по величине EC_{50} (нМ) и кратности индукции, вызываемой ВСУ13272 в репортерном анализе на CD137 в совместной культуре с линией опухолевых клеток, экспрессирующей EphA2, приведены в таблице 3В ниже.

Таблица 3В. Активность EphA2/CD137 гетеротандемных бициклических пептидных комплексов в репортерном анализе на CD137

№ комплекса	Клеточная линия, экспрессирующая EphA2	EC_{50} (нМ)	E_{max}	Средняя геометрическая величина EC_{50} /клеточная линия
ВСУ13272	РС-3	0,245	44,5	0,117
		0,0805	44,2	
		0,0898	53	
	А549	0,1468	25,7	0,127
		0,107	23,6	
		0,132	30,2	
	НТ-29	0,567	36,5	0,279
		0,187	26	
		0,205	36,4	

Данные по кратности индукции, вызываемой EphA2/CD137 гетеротандемными пептидами в репортерном анализе на CD137 в совместной культуре с опухолевыми клетками РС3, представлены в таблице 3С ниже, в которой приводятся величины EC_{50} (нМ) и E_{max} (кратность индукции относительно фона). Большинство EphA2/CD137 гетеротандемов имеют величину EC_{50} ниже 1 нМ.

Таблица 3С. Данные по EC_{50} и E_{max} репортерного анализа в присутствии линии клеток, экспрессирующей EphA2

№ комплекса	Клеточная линия, экспрессирующая EphA2-4	Число реплик (n)	EC_{50} (нМ)	Стандартное отклонение EC_{50} (нМ)	E_{max}	Стандартное отклонение E_{max}
ВСУ12730	РС3	4	0,25	0,31	61,73	25,80
ВСУ12973	РС3	3	0,16	0,01	48,57	6,24
ВСУ12974	РС3	3	0,18	0,05	59,60	21,23
ВСУ12975	РС3	3	0,16	0,13	68,80	18,37
ВСУ12976	РС3	3	0,18	0,16	73,20	23,93

BCY12977	PC3	3	0,08	0,07	67,17	20,03
BCY12978	PC3	3	0,05	0,04	78,10	11,62
BCY12979	PC3	2	0,08		71,60	
BCY13042	PC3	3	0,08	0,03	58,27	12,43
BCY13043	PC3	4	0,11	0,02	52,70	6,04
BCY13044	PC3	3	0,21	0,06	49,53	16,53
BCY13045	PC3	3	0,23	0,09	49,87	15,25
BCY13046	PC3	2	0,17		57,60	
BCY13047	PC3	4	0,07	0,02	46,43	5,56
BCY13048	PC3	2	0,09		48,35	
BCY13049	PC3	3	0,30	0,19	46,03	14,81
BCY13050	PC3	5	0,09	0,01	42,46	3,84
BCY13051	PC3	2	0,21		37,05	
BCY13052	PC3	2	0,21		32,90	
BCY13053	PC3	3	0,10	0,04	40,33	8,56
BCY13054	PC3	3	0,07	0,03	36,53	6,01
BCY13138	PC3	1	0,17		32,60	
BCY13139	PC3	2	0,16		43,75	
BCY13140	PC3	1	0,12		46,70	
BCY13270	PC3	4	0,10	0,04	42,50	3,45
BCY13271	PC3	3	0,09	0,03	44,20	4,61
BCY13273	PC3	3	0,13	0,08	51,27	5,37
BCY13274	PC3	3	0,19	0,10	47,43	7,50
BCY13275	PC3	2	0,08		47,50	
BCY13276	PC3	2	0,10		50,55	
BCY13277	PC3	2	0,08		51,10	
BCY13278	PC3	2	0,14		37,90	
BCY13280	PC3	3	0,19	0,03	38,13	8,29
BCY13281	PC3	3	0,17	0,06	35,60	5,89
BCY13282	PC3	3	0,22	0,05	40,03	11,87
BCY13284	PC3	3	0,25	0,12	34,73	6,18
BCY13285	PC3	3	0,26	0,10	36,53	8,56
BCY13286	PC3	3	0,11	0,02	34,13	12,00
BCY13288	PC3	4	0,09	0,02	43,28	5,69

BCY13289	PC3	4	0,08	0,04	45,78	5,15
BCY13341	PC3	2	0,19		49,15	
BCY13343	PC3	2	0,11		44,00	

Данные по кратности индукции, вызываемой PD-L1/CD137 гетеротандемными пептидами в репортерном анализе на CD137 в совместной культуре с клетками RKO, приведены в таблице 4 ниже.

Таблица 4. Кратность индукции, вызываемой PD-L1/CD137 гетеротандемными бициклическими пептидными комплексами в репортерном анализе на CD137

№ комплекса	EC ₅₀ (нМ)	Кратность индукции относительно фона
BCY11780	1,9	13

2. Анализ в совместной культуре мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC)-опухолевые клетки (анализ стимуляции цитокинов)

Клеточные линии Cтumor культивировали в соответствии с протоколом, рекомендованным поставщиками. Замороженные PBMC здоровых людей-доноров оттаивали и промывали один раз в PBS при комнатной температуре, а затем ресуспендировали в среде R10. Для анализа совместной культуры, высевали 100 мкл PBMC (1000000 PBMC/мл) и 100 мкл опухолевых клеток (100000 опухолевых клеток/мл) (соотношение эффектор:клетки-мишени (Э:Т) 10:1) в каждую лунку 96-луночного планшета с плоским дном. 100 нг/мл растворимого моноклонального антитела (mAb) против CD3 (клон ОКТ3) добавляли в культуру в день 0 для стимуляции PBMC человека. Испытуемые соединения, контрольные соединения или контрольные среды (плацебо) разводили в среде R10 и добавляли по 50 мкл в соответствующие лунки с доведением конечного объема лунки до 250 мкл. Планшеты накрывали воздухопроницаемой пленкой и инкубировали во влажной камере при 37°C с 5% CO₂ в течение трех дней. Через 48 часов после стимуляции, собирали надосадочные жидкости и определяли в них IL-2 и IFN-γ человека с помощью анализатора Luminex. Вкратце, стандарты и образцы добавляли в 96-луночный планшет черного цвета. Добавляли и встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре коктейль из микрочастиц (предоставляется в комплекте Luminex, R&D Systems). Планшет промывали 3 раза с использованием магнитного держателя. Затем в планшет добавляли коктейль с биотином и встряхивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет промывали 3 раза с использованием магнитного держателя. Добавляли в планшет коктейль из стрептавидина и встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза с использованием магнитного держателя, ресуспендировали в 100 мкл промывочного буфера, встряхивали в течение 2 минут при комнатной температуре и считывали с помощью анализатора Luminex 2000. Проводили анализ полученных исходных данных с использованием встроенного программного обеспечения Luminex для построения стандартных кривых и интерполяции концентраций белка, все остальные анализы данных и построение графиков проводили с

использованием программного обеспечения Excel и Prism. Данные относятся к одному исследованию с тремя независимыми донорскими РВМС, подвергнутых испытанию в двух параллельных экспериментах.

Данные, представленные на фигурах 2А и 2В, показывают, что нектин-4/CD137 гетеротандем (BCY11863) индуцирует устойчивую секрецию цитокинов IL-2 и IFN- γ при анализе в совместной культуре РВМС-4Т1. BCY11617 используют в качестве отрицательного контроля, который связывает нектин-4, но не связывает CD137.

Данные по величине EC₅₀ (нМ) и максимальной секреции цитокина IFN- γ (пг/мл), индуцированной выбранными нектин-4/CD137 гетеротандемными бициклическими пептидными комплексами в анализе совместной культуре РВМС человека (высвобождение цитокина), приведены в таблице 4А ниже и изображены на фигуре 2С. Они демонстрируют способность BCY11863 индуцировать секрецию цитокина в присутствии ряда различных линий опухолевых клеток, экспрессирующих нектин-4.

Таблица 4А. Величина EC₅₀ при секреции цитокина IFN- γ , индуцированной выбранными нектин-4/CD137 гетеротандемными бициклическими пептидными комплексами при анализе в совместной культуре РВМС человека-4Т1 (высвобождение цитокина)

Клеточная линия	IL-2 (нМ)	IFN- γ (нМ)	Число доноров
MC38 # 13 (мыши)	0,25±0,08	0,17±0,11	4
4Т1-D02 (мыши)	0,16±0,22	0,04±0,04	4
HT1376 (человека)	0,39±0,29	0,23±0,15	5
T-47D (человека)	0,20±0,07	0,08±0,06	3
H322 (человека)	0,84±0,15	0,85±0,66	3
4Т1-парентерально(нектин4-)	Отсутствие индуцирования вплоть до 100 нМ		

3. Исследование фармакокинетики CD137 гетеротандемных бициклических пептидных комплексов на крысах SD

Самцам крыс SD вводили каждому гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, приготовленный в 25 мМ гистидина HCl, 10% сахарозы, pH 7, путем внутривенного струйного введения или внутривенного капельного введения (15 минут). Проводили последовательный отбор крови (приблизительно 80 мкл крови/ момент времени) из подчелюстной или подкожной вены в каждый момент времени. Все образцы крови незамедлительно переносили в предварительно охлажденные микроцентрифужные пробирки, содержащие 2 мкл K2-EDTA (0,5М) в качестве антикоагулянта, и помещали на натуральный лед. Образцы крови незамедлительно подвергали обработки с получением плазмы путем центрифугирования при приблизительно 4°C при 3000 g. В плазму быстро добавляли осадитель, содержащий внутренний стандарт, хорошо смешивали и центрифугировали при 12000 об/мин, при 4°C в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переносили в предварительно маркированные полипропиленовые микроцентрифужные

пробирки, и затем быстро замораживали на сухом льду. Образцы хранили при -70°C или ниже в необходимом количестве до проведения анализа. Образцы надосадочной жидкости объемом 7,5 мкл непосредственно вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце. Проводили анализ зависимости концентрации в плазме от времени в соответствии с некомпартментными методиками, используя программное обеспечение Phoenix WinNonlin 6.3. Регистрировали C_0 , Cl , V_{dss} , $T_{1/2}$, $AUC(0\text{-last})$, $AUC(0\text{-inf})$, $MRT(0\text{-last})$, $MRT(0\text{-inf})$ и строили кривые зависимости концентрации в плазме от времени. Фармакокинетические параметры, полученные в этом эксперименте, приведены в таблице 6А.

Таблица 6А. Фармакокинетические параметры на крысах SD

Соединение	Способ дозирования	$T_{1/2}$ (ч)	V_{dss} (л/кг)	Cl_p (мл/мин/кг)
BCY12491	внутривенный болюс	1,3	1,6	20
BCY12730	внутривенная инфузия	2,0	2,6	18
BCY12724	внутривенная инфузия	1,5	1,2	13
BCY13050	внутривенная инфузия	3,3	1,4	11
BCY13048	внутривенная инфузия	3,8	1,2	11
BCY13272	внутривенная инфузия	2,5	1,0	7,4

Фармакокинетические параметры конкретно для BCY11863 приведены в таблице 6В.

Таблица 6В. Фармакокинетические параметры на крысах SD

Соединение	Доза (мг/кг)	Способ дозирования	$T_{1/2}$ (ч)	V_{dss} (л/кг)	Cl_p (мл/мин/кг)	% F
BCY11863	1,9	внутривенный болюс	4,1	1,6	7,7	-

	3,2	внутривенная инфузия (15 мин)	3,1	1,3	9,3	-
	6,3	подкожно	2,5	-	-	95%

Данные в таблице 6В выше и на фигуре 5 показывают, что ВСУ11863 представляет собой молекулу с низким клиренсом с объемом распределения большим, чем объем плазмы. Кроме того, биодоступность при подкожном дозировании ВСУ11863 является высокой у крыс.

Таблица 6С. Фармакокинетические параметры ВСУ11863 и возможных метаболитов, полученные при фармакокинетическом исследовании на крысах SD после внутривенного введения дозы 100 мг/кг

Анализируемые вещества	C _{max} (нг/мл)	AUC (нг.ч/мл)	T _{1/2} (ч)	V _{dss} (л/кг)	Cl _p (мл/мин/кг)
ВСУ11863	279540	129863	5,4	2,3	13
ВСУ15155	2854	1296	3,1	-	-
ВСУ14602	-	-	-	-	-

Данные в таблице 6С и на фигуре 25 показывают, что < 1% ВСУ11863 метаболизируется в ВСУ15155 при внутривенном введении ВСУ11863 крысам SD. Не отмечается значимого превращения в ВСУ14602 в течение первых 24 часов исследования.

4. Исследование фармакокинетики CD137 гетеротандемных бициклических пептидных комплексов на яванских макаках

Ненаивным яванским макакам вводили путем внутривенной инфузии (15 или 30 мин) в подкожную вену 1 мг/кг каждому гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, приготовленный в 25 мМ гистидина HCl, 10% сахарозы, pH 7. Проводили последовательный отбор крови (приблизительно 1,2 мл крови/момент времени) из периферического кровеносного сосуда обездвиженных, не подвергнутых воздействию седативных средств животных, в каждый момент времени в выпускаемые промышленностью пробирки, содержащие соль калий (K₂) EDTA *2H₂O (0,85-1,15 мг), на натуральном льду и подвергали обработке с целью получения плазмы. Образцы центрифугировали (3000 x g в течение 10 минут при температуре от 2 до 8°C) сразу после отбора образцов. Плазму в объеме 0,1 мл переносили в маркированные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки. В плазму быстро добавляли 5-кратное количество осадителя, включающего внутренний стандарт 100 нг/мл лабеталол+100 нг/мл дексаметазон+100 нг/мл толбутамид+100 нг/мл верапамил+100 нг/мл глибурид+100 нг/мл целекоксиб в растворе плазмы в MeOH, хорошо смешивали и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 минут при температуре от 2 до 8°C. Образцы надосадочной жидкости переносили в предварительно маркированные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки и замораживали на сухом льду. Образцы хранили при -60°C или ниже до

проведения анализа методом LC-MS/MS. Аликвоту 40 мкл калибровочного стандарта, контроля качества, одиночного холостого и двойного холостого образцов добавляли в пробирку объемом 1,5 мл. Каждый образец (за исключением двойного холостого) гасили с помощью 200 мкл IS1, соответственно (двойной холостой образец гасили с помощью 200 мкл MeOH с 0,5% triton X-100), и затем смесь хорошо смешивали с помощью смесителя Vortex (по меньшей мере, 15 секунд) и центрифугировали в течение 15 минут при 12000 g при 4°C. Образцы надосадочной жидкости объемом 10 мкл вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце. Проводили анализ зависимости концентрации в плазме от времени в соответствии с некомпаратментными методиками, используя программное обеспечение Phoenix WinNonlin 6.3. Регистрировали C₀, C₁, V_{dss}, T_{1/2}, AUC(0-last), AUC(0-inf), MRT(0-last), MRT(0-inf) и кривые зависимости концентрации в плазме от времени. Фармакокинетические параметры для трех биспецифичных соединений приведены в таблице 7.

Таблица 7. Фармакокинетические параметры на яванском макаке

Соединение	Способ дозирования	T _{1/2} (ч)	Clp (мл/мин/кг)	V _{dss} (л/к)
BCY11863 (0,93 мг/кг)	внутривенная инфузия (30 мин)	5,3	3,3	0,62
BCY11863 (0,97 мг/кг)	внутривенная инфузия (15 мин)	4,5	4,8	0,91
BCY11863 (9,4 мг/кг)	внутривенная инфузия (15 мин)	8,9	3,9	1,1
BCY12491	внутривенная инфузия (15 мин)	3,2	3,0	0,36
BCY13272	внутривенная инфузия (15 мин)	8,9	4,1	0,82

На фигуре 3 приведена кривая зависимости концентрации в плазме от времени для BCY11863 после внутривенного введения 2 мг/кг крысам SD (n=3) и внутривенной инфузии 1 мг/кг IV яванским макакам (n=2). BCY11863 имеет объем распределения в равновесном состоянии (V_{dss}) 1,6 л/кг и клиренс 7,7 мл/мин/кг у крыс, что дает в результате конечный

период полувыведения 4,1 часа. ВСУ11863 имеет объем распределения в равновесном состоянии (V_{dss}) 0,62 л/кг и клиренс 3,3 мл/мин/кг у яванских макаков, что дает в результате конечный период полувыведения 5,3 часа.

На фигуре 12 приведена кривая зависимости концентрации в плазме от времени для ВСУ12491 после внутривенной инфузии 1 мг/кг в течение 15 минут яванским макакам ($n=2$).

На фигуре 17 приведена кривая зависимости концентрации в плазме от времени для ВСУ13272 после внутривенной инфузии 3,6 мг/кг IV (15 мин) крысам SD ($n=3$) и внутривенной инфузии 9,2 мг/кг (15 мин) яванским макакам ($n=3$). ВСУ13272 имеет объем распределения в равновесном состоянии (V_{dss}) 1,0 л/кг и клиренс 7,5 мл/мин/кг у крыс, что дает в результате конечный период полувыведения 2,9 часа. ВСУ13272 имеет объем распределения в равновесном состоянии (V_{dss}) 0,82 л/кг и клиренс 4,1 мл/мин/кг у яванских макаков, что дает в результате конечный период полувыведения 8,9 часа.

5. Исследование фармакокинетики CD137 гетеротандемных бициклических пептидных комплексов на мышях CD1

Шести самцам мышей CD-1 вводили каждому интраперитонеально или внутривенно 15 мг/кг гетеротандемного бициклического пептидного комплекса, приготовленного в 25 мМ гистидина HCl, 10% сахарозы, pH 7. Проводили последовательный отбор крови (приблизительно 80 мкл крови/ момент времени) из подчелюстной или подкожной вены в каждый момент времени. Все образцы крови незамедлительно переносили в предварительно охлажденные микроцентрифужные пробирки, содержащие 2 мкл K₂-EDTA (0,5M) в качестве антикоагулянта, и помещали на натуральный лед. Образцы крови незамедлительно подвергали обработки с получением плазмы путем центрифугирования при приблизительно 4°C при 3000 g. В плазму быстро добавляли осадитель, содержащий внутренний стандарт, хорошо смешивали и центрифугировали при 12000 об/мин, при 4°C в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переносили в предварительно маркированные полипропиленовые микроцентрифужные пробирки, и затем быстро замораживали на сухом льду. Образцы хранили при -70°C или ниже в необходимом количестве до проведения анализа. Образцы надосадочной жидкости объемом 7,5 мкл непосредственно вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце. Проводили анализ зависимости концентрации в плазме от времени в соответствии с некомпартментными методиками, используя программное обеспечение Phoenix WinNonlin 6.3. Регистрировали C_0 , Cl , V_{dss} , $T_{1/2}$, $AUC(0-last)$, $AUC(0-inf)$, $MRT(0-last)$, $MRT(0-inf)$ и строили кривые зависимости концентрации в плазме от времени.

На фигуре 11 представлены кривые зависимости концентрации в плазме от времени для ВСУ11863 и ВСУ12491 при интраперитонеальном введении 15 мг/кг мышам CD1 ($n=3$) и конечные периоды полувыведения из плазмы крови для ВСУ11863 и ВСУ12491.

Таблица 7А. Фармакокинетические параметры на мышях CD-1

Соединение	Доза (мг/кг)	Способ дозирования	T1/2 (ч)	Vdss (л/кг)	Clp (мл/мин/кг)	% F
BCY11863	5,6	внутривенный болюс	2,6	1,6	9,7	
	0,96	внутривенный болюс	1,7	2,9	21	
	12	внутривенный болюс	2,6	2,5	17	
	32	внутривенный болюс	2,4	2,1	16	
	15,5	интраперитонеально	2,5	-	-	100

Данные на фигуре 11 и в таблице 7А выше показывают, что BCY11863 может быть введен мышам в форме внутривенного болюса и интраперитонеально. Биодоступность при интраперитонеальном дозировании BCY11863 является высокой у мышей. Фармакокинетические параметры, полученные при исследовании внутривенного введения, указывают, что BCY11863 представляет собой молекулу с низким клиренсом с объемом распределения большим, чем объем плазмы.

На фигуре 17 приведена кривая зависимости концентрации в плазме от времени для BCY13272 после внутривенного введения 5,5 мг/кг мышам CD1 (n=3); объем распределения в равновесном состоянии (Vdss) для BCY13272 составляет 1,1 л/кг при клиренсе 7,5 мл/мин/кг, что дает в результате конечный период полувыведения 2,9 часа.

6. Противоопухолевая активность BCY11863 в модели сингенной опухоли MC38 (MC38#13), сверхэкспрессирующей нектин-4

Самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 в возрасте 6-8 недель инокулировали в бок 1×10^6 сингенных клеток MC38 (MC38#13), сверхэкспрессирующих нектин-4. Когда опухоли достигали среднего размера 72 мм^3 , мышам рандомизировали для введения среды (плацебо) или BCY11863 (путем интраперитонеального введения). BCY11863 вводили (n=6 мышей/подвергаемая лечению группа) в дозе либо 1 мг/кг, либо 10 мг/кг, или ежедневно (QD), или один раз каждые три дня (Q3D). Дозируемые ежедневно мыши получали 16 доз BCY11863, а дозируемые один раз каждые три дня мыши получали 10 доз BCY11863. Рост опухоли постоянно контролировали путем проведения измерений с помощью штангенциркуля вплоть до дня 69 после начала лечения. Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 4, на которой видно статистически значимое уменьшение ($p < 0,05$, двухфакторный дисперсионный анализ с критерием Даннета для множественных сравнений) роста опухоли в двух подвергаемых лечению группах 2 ко дню 7, и ко дню 14 все подвергаемые лечению группы статистически значимо отличались от группы с плацебо (в которой вводили среду). Ко дню 48, 22 из 24 подвергнутых лечению с помощью

BCY11863 животных демонстрировали полный ответ на лечение и не имели оставшихся пальпируемых опухолей.

Исходя из периода полувыведения циркулирующего в плазме BCY11863 у мышей после интраперитонеальной инъекции (2,5 часа), минимальные уровни в плазме будут близки к 0 после обеих доз BCY11863 (1 и 10 мг/кг) и интервалов дозирования (QD и Q3D), тем самым демонстрируя, что не являющееся постоянным содержание в плазме BCY11863 в результате интермиттирующего дозирования является достаточным для достижения значительной противоопухолевой активности, приводящей к длительным полным ответам.

7. Лечение с помощью BCY11863 вызывает иммунологическую память в модели опухоли MC38, сверхэкспрессирующей нектин-4

На день 69, 5 животным, которые имели полные ответы на лечение с помощью BCY11863, повторно инокулировали 1×10^6 клеток MC38#13. Группе из 5 наивных самок мышей линии C57BL/6J-hCD137 инокулировали 1×10^6 клеток MC38#13 в качестве контроля. Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 5, на которой видно, что у всех 5 инокулированных наивных самок мышей линии C57BL/6J-hCD137 выросли опухоли ко дню 13 после инокуляции, в то время как ни у одной из инокулированных мышей с полным ответом опухоли не развивались. Это показывает, что животные, которые достигали полного противоопухолевого ответа в результате лечения с помощью BCY11863, имеют развитую иммунологическую память.

8. BCY11863 демонстрирует противоопухолевую активность в модели сингенной опухоли CT26 (CT26#7), сверхэкспрессирующей нектин-4

Самкам мышей линии BALB/c-hCD137 в возрасте 6-8 недель инокулировали в бок 3×10^5 сингенных клеток CT26 (CT26#7), сверхэкспрессирующих нектин-4. Когда опухоли достигали среднего размера 72 мм^3 , мышей рандомизировали для введения среды (плацебо) или 5 мг/кг BCY11863 интраперитонеально один раз каждые три дня (суммарно 6 доз). Рост опухоли постоянно контролировали путем проведения измерений с помощью штангенциркуля вплоть до дня 14 после начала лечения. Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 6, на которой видно, что лечение с помощью BCY11863 статистически значимо ($p < 0,0001$, критерий Стьюдента) уменьшало рост опухоли от дня 7 и далее.

Исходя из периода полувыведения циркулирующего в плазме BCY11863 у мышей после интраперитонеальной инъекции (2,5 часа), содержание BCY11863 в плазме крови не будет постоянным на протяжении всего периода дозирования, демонстрируя, что не являющееся постоянным содержание в плазме BCY11863 является достаточным для достижения значительной противоопухолевой активности.

9. Суммарное количество T-клеток и CD8+ T-клеток увеличивается в ткани опухоли CT26#7 через 1 час после последнего (шестого) Q3D дозирования BCY11863

Через 1 час после последнего введения плацебо (среды) или BCY11863, несущих опухоли CT26#7 мышей умерщвляли, и опухоли собирали, обрабатывали с целью получения суспензий отдельных клеток и окрашивали для анализа методом проточной

цитометрии на суммарное количество Т-клеток (CD45+CD3+), CD8+ Т-клеток (CD45+CD3+CD8+), CD4+ Т-клеток (CD45+CD3+CD4+) и регуляторных Т-клеток (регуляторные Т-клетки; CD45+CD3+CD4+Foxp3+). Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 7, на которой можно увидеть, что лечение с помощью ВСУ11863 приводило к статистически значимому увеличению суммарного количества Т-клеток ($p < 0,0001$, критерий Стьюдента) и CD8+ Т-клеток ($p < 0,0001$, критерий Стьюдента), а также к статистически значимому увеличению отношения CD8+ Т клетки/регуляторные Т-клетки ($p < 0,05$, критерий Стьюдента).

Это показывает, что лечение с помощью ВСУ11863 может приводить к повышению уровня Т-клеток локально в опухолевой ткани после интермиттирующего дозирования.

10. Фармакокинетические профили ВСУ11863 в плазме и опухолевой ткани животных, несущих сингенную опухоль СТ26#7, после разового внутривенного (iv) введения 5 мг/кг ВСУ11863

Самкам мышей линии BALB/c в возрасте 6-8 недель инокулировали в бок 3×10^5 сингенных клеток опухоли СТ26 (СТ26#7), сверхэкспрессирующих нектин-4. Когда опухоли достигали среднего размера приблизительно 400 мм^3 , мышей рандомизировали для введения им разовой внутривенной дозы плацебо (среды) или 5 мг/кг ВСУ11863. Группу мышей ($n=3$ /момент времени) умерщвляли в моменты времени 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 и 24 часа, и собранную плазму и опухолевую ткань анализировали на ВСУ11863. Для анализа содержания ВСУ11863 в опухоли, pripravляли гомогенат опухоли путем гомогенизации ткани опухоли с 10 объемами (масса:объем) гомогенизирующего раствора (MeOH/15 mM PBS (1:2, по объему)). 40 мкл образца гасили с помощью 200 мкл IS1, и смесь перемешивали на вортексе в течение 10 минут при 800 об/мин и центрифугировали в течение 15 минут при 3220 g при 4°C . Надосадочную жидкость переносили в другой чистый 96-луночный планшет и центрифугировали в течение 5 минут при 3220 g при 4°C , и 10,0 мкл надосадочной жидкости вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце. Для анализа содержания ВСУ11863 в плазме, собирали образцы крови в пробирки с K2-EDTA и незамедлительно подвергали обработки с получением плазмы путем центрифугирования при приблизительно 4°C , 3000 g. 40 мкл образца плазмы гасили с помощью 200 мкл IS1, и смесь перемешивали на вортексе в течение 10 минут при 800 об/мин и центрифугировали в течение 15 минут при 3220 g при 4°C . Надосадочную жидкость переносили в другой чистый 96-луночный планшет и центрифугировали в течение 5 минут при 3220 g при 4°C , и 10,0 мкл надосадочной жидкости затем вводили в прибор для проведения жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) Orbitrap Q Exactive в режиме детекции положительно заряженных ионов для определения концентраций в анализируемом образце.

Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 8, на которой можно увидеть, что ВСУ11863 удерживался в ткани опухоли после удаления из кровообращения

BCY11863, содержащегося в плазме, на что указывает разница величин $T_{1/2}$ плазмы (1,65 часа) и $T_{1/2}$ опухоли (13,4 часа) для BCY11863

11. Противоопухолевая активность BCY12491 в модели сингенной опухоли MC38

Самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 в возрасте 6-8 недель инокулировали в бок 1×10^6 сингенных клеток MC38. Когда опухоли достигали среднего размера 76 мм^3 , мышей рандомизировали для введения среды (плацебо) или BCY12491 (путем интраперитонеального введения). BCY12491 вводили ($n=6$ мышей/подвергаемая лечению группа) в дозе либо 5 мг/кг, либо 15 мг/кг, или ежедневно (QD), или один раз каждые три дня (Q3D). Дозируемые ежедневно мыши получали 22 дозы BCY12491, а дозируемые один раз каждые три дня мыши получали 8 BCY12491. Рост опухоли постоянно контролировали путем проведения измерений с помощью штангенциркуля вплоть до дня 73 после начала лечения. Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 9, на которой видно, что воздействие BCY12491 на рост опухоли становится очевидным в первые две недели периода дозирования, уменьшая рост опухоли и вызывая уменьшение объемов многих из подвергнутых лечению опухолей. Ко дню 41, 15 из 24 подвергнутых лечению с помощью BCY12491 животных демонстрировали полный ответ на лечение и не имели оставшихся пальпируемых опухолей.

Исходя из периода полувыведения циркулирующего в плазме BCY12491 у мышей после интраперитонеальной инъекции (2,5 часа), минимальные уровни в плазме будут близки к 0 после обеих доз BCY12491 (5 и 15 мг/кг) и интервалов дозирования (QD и Q3D), тем самым демонстрируя, что не являющееся постоянным содержание в плазме BCY12491 в результате интермиттирующего дозирования является достаточным для достижения значительной противоопухолевой активности, приводящей к длительным полным ответам.

12. EphA2/CD137 гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY12491, BCY13272, BCY12723, BCY13050, BCY13048 и BCY13047 индуцирует секрецию цитокина IFN- γ при проведении анализа в совместной культуре с MC38

Клетки линии MC38 опухоли молочной железы у мышей культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой (FBS), 1x пенициллин/стрептомицин, 10 mM HEPES и 2 mM L- глутамина (называемой средой R10). Замороженные PBMC, полученные от здоровых людей-доноров, оттаивали и промывали один раз при комнатной температуре с помощью PBS с бензоназой и затем ресуспендировали в среде RPMI, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой (FBS), 1x пенициллин/стрептомицин, 10 mM HEPES и 2 mM L- глутамина (называемой средой R10). Высеивали 100 мкл PBMC (1000000 PBMC/мл) и 100 мкл опухолевых клеток (100000 опухолевых клеток/мл) (отношение эффектор:клетка-мишень (E:T) 10:1) в каждой лунке 96-луночного планшета с плоским дном для проведения анализа в совместной культуре. На день 0, добавляли в культуру 100 нг/мл растворимого моноклонального антитела (mAb) против CD3 (клон ОКТ3) для стимуляции PBMC человека. Испытуемые соединения, контрольные соединения или среды в качестве плацебо

разбавляли в среде R10, и добавляли 50 мкл в соответствующие лунки с доведением конечного объема лунки до 250 мкл. Планшеты накрывали воздухопроницаемой пленкой и инкубировали в увлажненной камере при 37°C с 5% CO₂ в течение двух дней. Собирали надосадочные жидкости через 24 и 48 часов после стимуляции и проводили анализ на IFN- γ на анализаторе Luminex. Вкратце, стандарты и образцы добавляли в 96-луночный планшет черного цвета. Добавляли и встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре коктейль из микрочастиц (предоставляется в комплекте Luminex, R&D Systems). Планшет промывали 3 раза с использованием магнитного держателя. Затем в планшет добавляли коктейль с биотином и встряхивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет промывали 3 раза с использованием магнитного держателя. Добавляли в планшет коктейль из стрептавидина и встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза с использованием магнитного держателя, ресуспендировали в 100 мкл промывочного буфера, встряхивали в течение 2 минут при комнатной температуре и считывали с помощью анализатора Luminex 2000. Проводили анализ полученных исходных данных с использованием встроенного программного обеспечения Luminex для построения стандартных кривых и интерполяции концентраций белка, все остальные анализы данных и построение графиков проводили с использованием программного обеспечения Excel и Prism. Данные относятся к одному исследованию с тремя независимыми донорскими РВМС, подвергнутых испытанию в двух параллельных экспериментах.

Данные, представленные на фигуре 10, показывают, что EphA2/CD137 гетеротандемный бициклический пептидный комплекс BCY12491 индуцирует секрецию IFN- γ цитокина при анализе в совместной культуре с MC38 с величиной EC₅₀ 34 пМ (фигура 10A=донор 228769) или 85 пМ (фигура 10B=донор 228711) при использовании РВМС от двух различных доноров-людей. BCY12762 представляет собой гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, который связывается с EphA2 с такой же аффинностью, как и BCY12491, но не связывается с CD137.

Аналогично, РВМС от здоровых доноров культивировали с EphA2 экспрессирующими раковыми клетками (MC38 и HT-1080) при отношении 5:1 в присутствии антитела против CD3 и BCY13272. Через 48 часов, надосадочные жидкости анализировали на цитокины (IL-2 и IFN γ) на анализаторе Luminex, данные приведены в таблице 8 и относятся к РВМС от одного донора (при проведении суммарно n=4 и 5 отдельных экспериментов).

Таблица 8. Величины EC₅₀ при секреции цитокина IL-2, индуцированной с помощью EphA2/CD137 гетеротандемных бициклических комплексов в анализе совместной культуры человеческие РВМС-MC38/HT-1080

№ комплекса	Линия клеток	EC ₅₀ (нМ)	N =
BCY13272	MC38	0,79± 0,24	5
BCY13272	HT-1080	0,55± 0,47	4

Данные, представленные на фигуре 26 и приведенные в таблице 8А, показывают, что EphA2/CD137 гетеротандемные бициклические пептидные комплексы индуцируют секрецию цитокина IFN- γ в анализе совместной культуры с МС38 с активностью в субнанолярном диапазоне.

Таблица 8А. Величины EC₅₀ и Emax при секреции IFN γ , индуцированной EphA2/CD137 гетеротандемными бициклическими комплексами в анализе совместной культуры человеческие РВМС-МС38.

№ комплекса	Время инкубации (ч)	Донор 1 EC ₅₀ (нМ)	Донор 2 EC ₅₀ (нМ)
BCY12491	48	0,034	0,085
BCY12730	48	0,13	0,19
BCY12723	72	0,13	0,095
BCY13050	72	0,38	0,19
BCY13048	48	0,30	0,24
BCY13047	48	0,31	0,30

13. Зависимое от мишени высвобождение цитокина в ex vivo культурах, полученных от пациентов клеток первичных опухолей легких

Полученных от пациентов первичные опухолевые клетки, поставленные фирмой Discovery Life Sciences (DLS), медленно оттаивали в 10 мл предварительно подогретой среды для отмывки клеток, в которую была добавлена бензоназа. Набор трехмерного шарообразного планшета фирмы Greiner (cat# 655840) использовали для сохранения клеток в культуре в течение 2 дней. Вкратце, проводили подсчет опухолевых клеток, окрашенных красителем трипановым синим, в счетной камере. Клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут для промывки, и осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл на 1×10^6 клеток с намагничивающими наночастицами N3D. Для того чтобы сделать клетки намагниченными, клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут и ресуспендировали; этот процесс повторяли суммарно 4 раза. После конечного центрифугирования, клетки ресуспендировали в соответствующем количестве свежей рассеивающей свет среды Lung (DLS) с получением 50000-100000 клеток на лунку в 100 мкл/лунка. Для этого эксперимента использовали 96-луночные планшеты для работы с адгезивными культурами клеток фирмы Greiner (cat #655976). В случае, если визуально обнаруживались клеточные скопления или дебрис, образец наносили на фильтр с размером пор 70-100 мкм перед посевом клеток. По меньшей мере, 50000 клеток на образец резервировали для проведения анализа методом проточной цитометрии в день 0, эти клетки окрашивали, фиксировали и хранили при 4°C для проведения в дальнейшем анализа методом проточной цитометрии. Готовили разведения контрольного/испытуемого соединения в отдельном планшете при 2х в рассеивающей свет среде Lung, и 100 мкл/лунка этих 2X разбавленных раствором лекарственных средств добавляли в лунки, как описано на карте планшета. Аналитический планшет затем помещали на 96-луночный магнитный шарообразный привод в увлажненную камеру при 37°C, 5% CO₂. Через 24 часа, магнитный

шарообразный привод удаляли. Через 48 часов, собирали среду для анализа на цитокины, и собирали клетки для проведения анализа методом проточной цитометрии в день 2. Количественно определяли цитокины с использованием специально приготовленной фирмой R&D systems по заказу панели цитокин/хемокин (IP-10, гранзим В, IFN γ , IL-2, IL-6, TNF α , IL-8, MIP-1a, MIP-1b, MCP-1, IL-10, MIG) на ридере Luminex. Панели для проточной цитометрии: день 0=живые/мертвые, CD45, EpCAM, нектин 4, CD3, CD4, CD8, CD137; день 2=живые/мертвые, CD45, EpCAM, нектин 4, CD3, CD8, Ki67, и микросферы для подсчета. Полученные методом проточной цитометрии данные анализировали с помощью программного обеспечения Flowjo.

Данные, представленные на фигуре 13, показывают, что нектин-4/CD137 гетеротандем BCY11027 индуцирует зависимое от мишени высвобождение цитокина в *ex vivo* культурах первичных опухолей легких, полученных у пациента. Лечение с помощью BCY11027 индуцировало нектин-4 зависимое изменение нескольких иммунных маркеров (нормализованное к плацебо (среде)) и %CD8 +ki67+ Т-клеток в полученных у пациента образцах, что коррелировало с уровнем экспрессии нектин-4.

14. Анализ фирмы Promega активности OX40 в клетках в совместной культуре с опухолевыми клетками

Фирма Promega разработала анализ активности OX40 в клетках, в котором используется люминесценция люциферазы NF-кВ в качестве считываемого сигнала, характеризующего активацию OX40 в клетках Jurkat (Promega CS197704). В день эксперимента, приготавливают среду путем оттаивания FBS и добавления 5% FBS к среде RPMI-1640. Оттаивают OX40 клетки Jurkat на водяной бане и затем добавляют 500 мкл клеток к 11,5 мл предварительно подогретой среде 5% FBS RPMI-1640. Добавляют 55 мкл клетки/лунка в планшеты для культивации клеток белого цвета. Собирают опухолевые клетки из культуры. 4T1 представляет собой нектин-4 отрицательную эпителиальную раковую клетку молочной железы мышей, и ее подвергают генетической модификации с целью экспрессирования мышинового нектин-4 на поверхности клетки (4T1 нектин-4 положительного; клон 4T1-D02). Опухолевые клетки культивируют до 80% конфлюентности *in vitro* в среде RPMI 1640, дополненной 10% термоинактивированной FBS, 1X пенициллин/стрептомицин, 1X L-глутамином, 20 mM HEPES и 1X NEAA (рабочая среда RPMI). Опухолевые клетки трипсинизируют и промывают два раза при 1500 об/мин в течение 5 минут в рабочей среде RPMI 1640, предварительно подогретой до 37°C. Клетки считают и ресуспендируют при 2000000 клеток/мл в среде R5 (для 10000 клеток/лунка). Добавляют 5 мкл опухолевых клеток на лунку.

Разбавляют агонисты до концентрации, дающей максимальную кратность индукции и затем оттитровывают количество в стерильном 96-луночном планшете. Приготавливают достаточное количество реагента для повторных проб и затем проводят серию разбавлений 1/3 или серию разбавлений 1/10. Вводят в качестве положительного контроля тример OX40L (AcroBiosystems, R&D systems) и в качестве отрицательного контроля мономерные

или несвязывающие пептиды. Добавляют 20 мкл агониста в качестве повторных проб или только 5% FBS RPMI-1640 в качестве контроля уровня фона.

Совместно инкубируют клетки вместе с агонистами в течение 6 часов при 37°C, 5% CO₂. Через 6 часов, оттаивают Bio-Glo™ и проводят анализ при комнатной температуре. Добавляют 80 мкл Bio-Glo™ на лунку и инкубируют 5-10 минут. Считывают сигнал люциферазы на планшет-ридере CLAIROStar, используя программу MARS, и нормализуют кратность индукции относительно фона (только одной среды). Проводят анализ данных путем трансформирования данных в $x = \log(X)$, затем строят кривую с переменной крутизной зависимости ответа от $\log(\text{агонист})$ (4 параметра) для расчета величин EC₅₀.

Результаты этого анализа представлены в таблице 9 и на фигуре 14, на которых можно увидеть, что BCY12967 нектин-4:OX40 соединение демонстрировало сильный агонизм OX40 в совместной культуре с нектин-4 положительными 4T1-D02 клетками при сравнении с OX40L и несвязывающим контрольным пептидом BCY12968.

Таблица 9. Величины EC₅₀ в анализе фирмы Promega активности OX40 в клетках в совместной культуре с опухолевыми клетками

Номер пептида	EC ₅₀ (нМ)
BCY12967	0,83

15. Дозирование EphA2 : CD137 1:2 гетеротандемного комплекса индуцирует очень сильный иммунный ответ в моделях опухолей на мышах

Самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 [мышь В-hTNFRSF9(CD137); Biocytogen] в возрасте 6-8 недель имплантировали подкожно 1×10⁶ клеток MC38. Мышей рандомизировали по группам лечения, когда средние объемы опухолей достигали приблизительно 240 мм³, и проводили лечение (n=6/группа лечения) путем внутривенного введения плацебо (25 мМ гистидин, 10% сахара, рН 7), внутривенного введения 15 мг/кг BCY12491 (EphA2 : CD137 1:2 гетеротандемного комплекса), внутривенного введения 15 мг/кг BCY13626 (несвязывающего контрольного комплекса для EphA2) или интраперитонеального введения 2 мг/кг антитела против CD137 (аналога урелумаба). Все лечебные процедуры проводили с частотой один раз каждые три дня (Q3D) для трех доз, и опухолевые ткани собирали через 1 час после введения последней дозы. Часть опухолевой ткани использовали для выделения РНК для транскрипционного анализа, и часть опухолевой ткани использовали для приготовления зафиксированного в формалине и залитого парафином (FFPE) образца для иммуногистохимического (ИHC) анализа. РНК выделяли из опухолевых тканей с использованием набора RNeasy [Qiagen], а транскрипционный анализ проводили с использованием панели nCounter Mouse PanCancer IO 360 (Nanostring) от 100 нг РНК/опухоль. Данные анализировали с помощью программного обеспечения nSolver Analysis Software (Nanostring). CD8⁺ опухолевый клеточный инфильтрат окрашивали в FFPE срезах ткани, используя антимышиное антитело против CD8 (Abcam, # ab217344) и набор Ventana Discovery OmniMap антикроличьей-HRP (Ventana #760 4310).

Результаты этого исследования представлены на фигурах 15A - D, на которых можно увидеть, что транскрипционный анализ выявил значительное увеличение числа иммунных клеток, например, числа цитотоксических клеток (Figure 15A), числа макрофагов (Figure 15B) и Т-клеток (Figure 15C) в опухолевой ткани после проведения лечения с помощью EphA2 BCY12491 по сравнению с опухолями у мышей, которым вводили плацебо. Введение антитела против CD137 также значительно увеличивало число цитотоксических клеток и число Т-клеток в опухолевой ткани, хотя и в меньшей степени, чем в случае BCY12491. Не обнаруживалось никаких изменений числа иммунных клеток в опухолевых тканях животных, которым вводили несвязывающее контрольное соединение (BCY13626). Иммуногистохимический анализ на CD8+ клетки в опухолевых тканях показал интенсивную инфильтрацию опухолей CD8+ клетками при введении мышам BCY12491 по сравнению с опухолями мышей, которым вводили плацебо или несвязывающий BCY13626 (фигура 15D). Некоторое увеличение инфильтрации CD8+ клетками также обнаруживалось в опухолях мышей, которым вводили антитело против CD137. Эти изменения числа иммунных клеток и CD8+ клеток в опухолевой ткани указывает на то, что агонизм CD137 в опухолевой ткани под воздействием EphA2 : CD137 1:2 гетеротандемного комплекса BCY12491 приводит к значительному модулированию (увеличению) инфильтрации опухоли иммунными клетками и иммунного ответа.

16. Противоопухолевая активность BCY13272 в модели сингенной опухоли MC38

Самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 [мыши B-hTNFRSF9(CD137); Biocytogen] в возрасте 6-8 недель имплантировали подкожно 1×10^6 клеток MC38. Мышей рандомизировали по группам лечения, когда средние объемы опухолей достигали приблизительно 80 мм^3 , и проводили лечение путем внутривенного введения плацебо (25 мМ гистидин, 10% сахара, рН 7), внутривенного введения 8 мг/кг BCY13272, 0,9 мг/кг BCY13272 и 0,1 мг/кг BCY13272. Все лечебные процедуры проводили с частотой два раза в неделю (BIW) суммарно для 6 доз. Рост опухоли постоянно контролировали вплоть до дня 28 от начала лечения. За животными с полным ответом (n=7) проводили наблюдения вплоть до дня 62 от начала лечения и повторно имплантировали им 2×10^6 опухолевых клеток MC38, и рост опухоли постоянно контролировали вплоть до дня 28. Одновременно, наивным соответствующим возрастной группе контрольным мышам линии huCD137 C57Bl/6 (n=5) имплантировали 2×10^6 MC38 опухолевых клеток и проводили наблюдения в течение 28 дней.

Результаты этого эксперимента представлены на фигуре 18, на которой можно увидеть, что BCY13272 приводит к значительной противоопухолевой активности с полными ответами, наблюдаемыми при уровнях доз 0,9 мг/кг (2 из 6 полных ответов) и 8 мг/кг (5 из 6 полных ответов) (фигура 18A). В отличие от наивных соответствующих возрастной группе контрольных мышей линии huCD137 C57Bl/6 (показатель приживления имплантированной опухоли 100%), не обнаруживалось возобновления роста опухоли у животных с полным ответом после лечения с помощью BCY13272 (фигура 18B). Эти данные указывают на то, что BCY13272 обладает значительной противоопухолевой

активностью и что лечение с помощью BCY13272 может вызывать иммунологическую память у животных с полным ответом.

17. Связывание BCY13272 с EphA2 и CD137, измеряемое методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

(a) CD137

Проводили эксперименты с использованием анализатора Biacore для определения величин k_a ($M^{-1}s^{-1}$), k_d (s^{-1}), K_D (нМ) для гетеротандемных пептидов, связывающихся с человеческим белком CD137. Рекомбинантный человеческий CD137 (R&D systems) ресуспендировали в PBS и биотинилировали, используя реагент EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Fisher) в соответствии с протоколом, предлагаемым фирмой-производителем. Белок обессоливали с удалением несвязанного биотина, используя центрифужные колонки, в PBS.

Для анализа пептидного связывания, использовали прибор Biacore T200 или Biacore 3000 с чипом XanTec CMD500D. Стрептавидин иммобилизировали на чипе, используя стандартные химические реакции сочетания с амином при 25°C с HBS-N (10 mM HEPES, 0,15 M NaCl, pH 7,4) в качестве подвижного буфера. Вкратце, поверхность карбоксиметилдекстрана активировали с помощью инъекции в течение 7 минут смеси 1:1 0,4 M 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)- карбодиимида гидрохлорид (EDC)/0,1 M N-гидроксисукцинимид (NHS) при расходе 10 мкл/мин. Для захвата стрептавидина, белок разбавляли до 0,2 мг/мл в 10 mM ацетате натрия (pH 4,5) и захватывали путем инъекции 120 мкл на активированную поверхность чипа. Остаточные активированные группы блокировали путем инъекции в течение 7 минут 1 M этаноламина (pH 8,5), и биотинилированный CD137 захватывали до уровня 270-1500 RU (резонансных единиц). Буфер заменяли на PBS/0,05% Tween 20, и приготавливали последовательные разбавления пептидов в этом буфере с конечной концентрацией DMSO 0,5%. Наивысшая концентрация пептида составляла 500 нМ с 6 дополнительными 2-кратными или 3-кратными разбавлениями. Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) проводили при 25°C при расходе 90 мкл/мин с ассоциацией 60 секунд и диссоциацией 900 секунд. После каждого цикла использовали стадию регенерации (10 мкл 10 mM глицина pH 2). В случае необходимости, проводили коррекцию данных с учетом эффектов исключенного объема DMSO. Все данные дважды сверяли с холостыми инъекциями и референсной поверхностью с использованием стандартных методик обработки, и проводили обработку данных и аппроксимацию кинетических данных, используя программное обеспечение Scrubber software, version 2.0c (BioLogic Software). Данные аппроксимировали, используя модель простого связывания 1:1, допускающую, в соответствующих случаях, эффекты массопереноса.

(b) EphA2

Проводили эксперименты с использованием анализатора Biacore для определения величин k_a ($M^{-1}s^{-1}$), k_d (s^{-1}), K_D (нМ) для связывания BCY13272 с человеческим белком EphA2.

EphA2 биотинилировали с помощью EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC- Biotin в течение 1 часа в 4 мМ ацетата натрия, 100 мМ NaCl, pH 5,4 при 3х молярном избытке биотина по отношению к белку. Степень введения метки определяли с помощью набора для количественного определения биотина флуоресцентным методом Fluorescence Biotin Quantification Kit (Thermo) после диализа реакционной смеси в PBS. Для анализа пептидного связывания, использовали прибор Biacore T200 с чипом ХанТес CMD500D. Стрептавидин иммобилизировали на чипе, используя стандартные химические реакции сочетания с амином при 25°C с HBS-N (10 мМ HEPES, 0,15 М NaCl, pH 7,4) в качестве подвижного буфера. Вкратце, поверхность карбоксиметилдекстрана активировали с помощью инъекции в течение 7 минут смеси 1:1 0,4 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид (EDC)/0,1 М N-гидроксисукцинимид (NHS) при расходе 10 мкл/мин. Для захвата стрептавидина, белок разбавляли до 0,2 мг/мл в 10 мМ ацетате натрия (pH 4,5) и захватывали путем инъекции 120 мкл на активированную поверхность чипа. Остаточные активированные группы блокировали путем инъекции в течение 7 минут смеси 1 М этаноламина (pH 8,5):HBS-N (1:1). Буфер заменяли на PBS/0,05% Tween 20, и биотинилированный EphA2 захватывали до уровня 500-1500 RU, используя разбавление белка до 0,2 мкМ в буфере. Приготавливали последовательные разбавления пептидов в этом буфере с конечной концентрацией DMSO 0,5%, наивысшая концентрация пептида составляла 50 или 100 нМ с 6 дополнительными 2-кратными разбавлениями. Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) проводили при 25°C при расходе 90 мкл/мин с ассоциацией 60 секунд и диссоциацией 900-1200 секунд. Проводили коррекцию данных с учетом эффектов исключенного объема DMSO. Все данные дважды сверяли с холостыми инъекциями и референсной поверхностью с использованием стандартных методик обработки, и проводили обработку данных и аппроксимацию кинетических данных, используя программное обеспечение Scrubber software, version 2.0c (BioLogic Software). Данные аппроксимировали, используя модель простого связывания 1:1, допускающую, в соответствующих случаях, эффекты массопереноса.

На фигуре 20А представлена сенсограмма, которая показывает, что BCY13272 связывается с EphA2 (человека) с аффинностью 2,0 нМ. На фигуре 20В представлена сенсограмма, которая показывает, что BCY13272 связывается с CD137 (человека) с высокой аффинностью. Вследствие присутствия в BCY13272 двух CD137 связывающих бициклов, скорость диссоциации из иммобилизованного белка CD137 является очень медленной, и приведенная величина K_D может быть завышенной (фигура 19В).

18. Преклиническое связывание BCY11863 с нектин-4 и CD137 у четырех видов животных с перекрестной реактивностью

Связывание BCY11863 с его главной мишенью нектин-4 и CD137 исследовали методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

(а) Нектин-4

BCY11863 связывается с нектин-4 яванского макака, крысы, мыши и человека с величиной K_D в диапазоне 5-27 нМ, измеренной путем прямого связывания с внеклеточным доменом, который был биотинилирован и захвачен стрептавидином на поверхности сенсорного чипа.

Таблица 10. Величины аффинности связывания BCY11863 с биотинилированным - нектин-4 внеклеточным доменом, полученные методом SPR

SPR K_D (нМ)	Тип анализа	Человек (25°C)	Человек (37 °C)	NHP (25°C)	Крыса (25°C)	Мышь (25°C)
BCY1186 3	Прямое связы- вание	5,0±2,1 n=7	5,2±1,1 n=9	27±15 n=9	15±1 n=6	4,6±2,1 n=9

Для того чтобы выяснить, изменяется ли связывание BCY11863 с нектин-4 в случае тройного комплекса, то есть, когда также происходит связывание с CD137, был разработан анализ многокомпонентного связывания методом SPR. BCY11863 сначала захватывался CD137 человека, иммобилизованным на поверхности чипа SPR, и затем нектин-4 от различных животных пропускали над поверхностью чипа для определения величин их аффинности к захваченному BCY11863 (смотрите фигуру 21C). Величины аффинностей к нектин-4 обычно сохранялись в присутствии связывания CD137, как показано ниже.

Таблица 11. Величины аффинности связывания BCY11863 с биотинилированным - нектин-4 внеклеточным доменом при использовании биотинилированного CD137 человека в качестве реагента захвата

SPR K_D (нМ)	Тип анализа	Человек	NHP	Крыса	Мышь
BCY11863	Сэндвич- анализ	12±2 n=4	28±5 n=3	25±2 n=3	6,7±1,7 n=3

(b) CD137

Прямое связывание BCY11863 с поверхностно связанным CD137 не может быть измерено корректно методом SPR вследствие avidности, обусловленной двумя CD137 связывающими бициклами в BCY11863, что приводит к экстремально медленной k_{off} (смотрите фигуру 21B). Кроме того, биотинилирование CD137 яванского макака аннулирует связывание BCY11863, вероятно, вследствие модификации лизина на белке яванского макака, который является необходимым для BCY11863 связывания. Поэтому, аналог BCY11863, содержащий С-концевой биотинилированный лизин (BCY13582), подвергали анализу методом SPR для определения межвидовой специфичности BCY11863. BCY13582 захватывали на сенсорном чипе, используя набор для обратимого захвата биотина, и определяли величины аффинностей к нектин-4 различных видов животных. Оба подхода показали, что эти аналоги BCY11863 связывались с CD137 человека или яванского макака с величиной $K_D < 10$ нМ и характеризовались пренебрежимо малой величиной связывания как с CD137 мыши, так и с CD137 крысы.

Таблица 12. Величины аффинности связывания биотинилированных аналогов ВСУ11863 с CD137 внеклеточным доменом, полученные методом SPR

SPR K_D (нМ)	Тип анализа	Человек	NHP	Крыса	Мышь
ВСУ13582	Прямое связывание	8,4±4,2 n=3	4,23 n=1	NB n=1	NB n=1

Для того чтобы выяснить, изменяется ли связывание ВСУ11863 с CD137 в случае тройного комплекса, то есть, когда также происходит связывание с нектин-4, был разработан анализ двойного связывания методом SPR. ВСУ11863 сначала захватывался нектин-4 человека, иммобилизованным на поверхности чипа SPR, и затем растворимый CD137 от различных животных пропускали над поверхностью чипа для определения величин их аффинности к захваченному ВСУ11863 (смотрите фигуру 21D). Величины аффинностей к CD137 обычно сохранялись в присутствии связывания нектин-4, как показано ниже.

Таблица 13. Величины аффинности связывания с CD137 внеклеточным доменом при использовании биотинилированного нектин-4 человека в качестве реагента захвата

SPR K_D (нМ)	Тип анализа	Человек	NHP	Крыса	Мышь
ВСУ11863	Двойное связывание	6,3±0,7 n=4	18±6 n=3	NB n=2	NB n=2

На фигуре 21А представлен один пример сенсограммы, которая показывает, что ВСУ11863 связывается с нектин-4 (человека) с величиной аффинности 4,1 нМ. На фигуре 21В представлена сенсограмма, которая показывает, что ВСУ11863 связывается с CD137 (человека) с высокой аффинностью. Вследствие присутствия двух CD137 связывающих бициклов в ВСУ11863, скорость диссоциации иммобилизованного белка CD137 является очень медленной, и приведенная величина K_D может быть завышенной (фигура 21В). На фигуре 21С показано, что ВСУ11863 связывается с нектин-4, в то время как CD137 боковые цепи связаны с белком CD137, иммобилизованным на чипе, с образованием тройного комплекса. На фигуре 21D показано, что ВСУ11863 связывается с CD137, в то время как нектин-4 связывающая боковая цепь связана с белком нектин-4, иммобилизованным на чипе, с образованием тройного комплекса. На фигуре 21Е представлена способность ВСУ13582, иммобилизованного на чипе SPR, связывать CD137 человека.

19. Селективность ВСУ11863 в отношении нектин-4 и CD137

Скрининг паралога нектин-4. Методом SPR оценивали связывание ВСУ11863 с нектин-1 (2880-N1, R&D Systems), нектин-2 (2229-N2, R&D Systems), нектин-3 (3064-N3, R&D Systems), нектин-подобным-1 (3678-S4-050, R&D Systems), нектин-подобным-2 (3519-S4-050, R&D Systems), нектин-подобным-3 (4290-S4-050, R&D Systems), нектин-подобным-4 (4164-S4, R&D Systems) и нектин-подобным-5 (2530-CD-050, R&D Systems) путем введения в них метки биотина и иммобилизования их на поверхности

стрептавидина. ВСУ11863 не демонстрировал никакого связывания с этими мишенями вплоть до концентрации 5000 нМ.

Скрининг паралога CD137. Методом SPR оценивали связывание захваченного стрептавидином ВСУ13582 (биотинилированного-ВСУ11863) с растворимыми рецепторами OX40 and CD40, являющимися представителями семейства TNF. ВСУ13582 не связывался с этими мишенями вплоть до концентрации 100 нМ.

Скрининг методом микроматричного анализа фирмы Retrogenix. Технологию микроматричного анализа клеток фирмы Retrogenix использовали для скрининга специфичных нецелевых связывающих взаимодействий биотинилированного ВСУ11863, известного как ВСУ13582.

Исследование уровней связывания испытуемого пептида с фиксированными, нетрансфицированными клетками НЕК293 и с клетками, сверхэкспрессирующими нектин-4 и CD137 (TNFRSF9), показало, что для скрининга является достаточной концентрация пептида 1 мкМ. При этих условиях, проводили скрининг испытуемого пептида на связывания с клетками НЕК293 человека, индивидуально экспрессирующими 5484 полноразмерных белков клеточных мембран человека и выделяемых белков. Скрининг выявил 9 первичных попаданий в цель, включающих нектин-4 и CD137.

Каждое первичное попадание в цель повторно экспрессировали, наряду с двумя контрольными рецепторами (TGFB2 and EGFR), и повторно проводили исследование с использованием 1 мкМ испытуемого пептида ВСУ13582, 1 мкМ испытуемого пептида ВСУ13582 в присутствии 100 мкМ ВСУ11863, и других положительных и отрицательных контрольных веществ, вводимых при лечении (фигура 4). После удаления неспецифичных, невоспроизводимых и не значимых попаданий, оставались три специфичных взаимодействия для испытуемого пептида. Они являлись несвязанными и связанными формами нектин-4 и CD137, представляющими собой основные мишени.

Не были выявлено специфичных нецелевых взаимодействий для ВСУ13582, что указывало на высокую специфичность в отношении его главных мишеней.

20. Противоопухолевая активность ВСУ11863 в модели сингенной опухоли МС38 (МС38#13), сверхэкспрессирующей нектин-4, при введении два раза в неделю дозы 5 мг/кг при 0, 24 ч и 10 мг/кг при 0 ч

Самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 [B-hTNFRSF9(CD137); Biocytogen] в возрасте 6-8 недель имплантировали подкожно 1×10^6 клеток МС38#13 (клеток МС38, сконструированных для сверхэкспрессии нектин-4 мышей). Мышей рандомизировали по группам лечения (n=6/группа лечения), когда средние объемы опухолей достигали приблизительно 95 мм³, и проводили лечение путем еженедельного дозирования плацебо (25 мМ гистидин, 10% сахароза, pH7) или 10 мг/кг ВСУ11863 при различных режимах дозирования на протяжении двух циклов дозирования (5 мг/кг ВСУ11863 при 0 ч и 24 ч на день D0 и день D7, или 10 мг/кг при 0 ч на день D0 и день D7). Все лечебные процедуры проводили путем внутривенного введения. Рост опухоли постоянно контролировали вплоть до дня 15 от начала лечения.

BCY11863 приводил к значительной противоопухолевой активности при обоих режимах дозирования, но режим дозирования при дозе 5 мг/кг, вводимой в моменты времени 0 ч и 24 ч, был более предпочтительным по сравнению с дозированием 10 мг/кг в момент времени 0 ч, что обнаруживалось при анализе достижения полных ответов на день 15 после начала лечения (фигура 23). Введение дозы 5 мг/кг BCY11863 в моменты времени 0 ч и 24 ч на день D0 и D7 давало в результате 4 полных ответов из 6 ответов, в то время как введение дозы 10 мг/кг BCY11863 в момент времени 0 ч на день D0 и D7 давало один полный ответ из 6 ответов. Эти данные вместе с фармакокинетическими данными для BCY11863 в плазме мышей указывают, что поддержание концентрации BCY11863 в плазме крови на уровне, который продуцируется в результате введения 5 мг/кг в момент времени 0 ч и момент времени 24 ч при еженедельном цикле, позволяет достигать ответа, близкого к полному противоопухолевому ответу, в модели опухоли MC38#13.

21. Противоопухолевая активность BCY11863 в модели сингенной опухоли MC38 (MC38#13), сверхэкспрессирующей нектин-4

Для проведения лечения при 3 еженедельных дозах 3, 10 и 30 мг/кг при дозах, разделенных на дозирование один раз в неделю, два раза в неделю и один раз в день, самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 [B-hTNFRSF9(CD137); Biocytogen] в возрасте 6-8 недель имплантировали подкожно 1×10^6 клеток MC38#13 (клеток MC38, сконструированных для сверхэкспрессии нектин-4 мышей). Мышей рандомизировали по группам лечения ($n=6$ /группа лечения), когда средние объемы опухолей достигали приблизительно 107 мм^3 , и подвергали лечению путем введения 21 ежедневных доз плацебо (25 мМ гистидина, 10% сахарозы, pH7). Лечение с помощью BCY11863 проводили при трех различных уровнях доз (3, 10 и 30 мг/кг суммарная еженедельная доза), разделенных на три различных режима (QD: один раз в сутки; BIW: два раза в неделю или QW: один раз в неделю). Различные группы лечения с помощью BCY11863 получали либо 21 ежедневную дозу (0,43, 1,4 или 4,3 мг/кг), 6 доз два раза в неделю (1,5, 5 или 15 мг/кг), либо 3 еженедельных дозы (3, 10 или 30 мг/кг). Все лечебные процедуры проводили путем внутривенного введения. Рост опухолей постоянно контролировали до достижения их объемов выше 2000 мм^3 или вплоть до дня 31 после начала лечения. Продолжали наблюдения за животными с полными ответами (животными с не пальпируемыми опухолями) до дня D52.

BCY11863 приводит к значительной противоопухолевой активности при многих режимах дозирования, при этом режим дозирования два раза в неделю (BIW) является самым эффективным режимом, в частности дозирование 5 мг/кг два раза в неделю. Это демонстрируется числом животных с полным ответом на день 52. На день 52 после начала лечения, у 15 из 18 мышей, подвергнутых лечению с помощью BCY11863 путем введения два раза в неделю, обнаруживали полные ответы, у 12 из 18 мышей, подвергнутых лечению с помощью BCY11863 путем введения один раз в сутки, обнаруживали полные ответы, и у 6 из 18 мышей, подвергнутых лечению с помощью BCY11863 путем введения один раз в неделю, обнаруживали полные ответы. Дозирование 5 мг/кг два раза в неделю приводило к 100% полных ответов при 6 полных ответов из 6 (фигура 24). Эти данные

вместе с фармакокинетическими данными для ВСУ11863 в плазме мышей указывают, что для противоопухолевого ответа на воздействие ВСУ11863 в модели опухоли МС38#13 не требуется постоянного присутствия ВСУ11863 в плазме крови.

22. Исследование in vivo эффективности EphA2 гетеротандемных бициклических комплексов

Самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 [B-hTNFRSF9(CD137); Biocytogen] в возрасте 6-8 недель имплантировали подкожно 1×10^6 клеток МС38. Мышей рандомизировали по группам лечения ($n=6$ /группа лечения), когда средние объемы опухолей достигали приблизительно 76 мм^3 , и подвергали лечению путем введения 21 ежедневных доз плацебо (25 мМ гистидина, 10% сахарозы, рН7). Лечение с помощью ВСУ12491 проводили при двух различных уровнях дозы (5 и 15 мг/кг) и двух различных режимах дозирования (QD: один раз в сутки; Q3D: один раз в три дня). Животным вводили либо 22 QD дозы, либо 8 Q3D доз интраперитонеально (ip). Рост опухолей постоянно контролировали до достижения их объемов выше 2000 мм^3 или вплоть до дня 73 после начала лечения. После дня 73, 5 животным с полным ответом повторно имплантировали клетки опухоли МС38 наряду с 5 наивными мышами линии C57BL/6J-hCD137. Рост опухолей постоянно контролировали на протяжении 20 дней.

ВСУ12491 приводил к значительной противоопухолевой активности при всех уровнях доз и всех режимах дозирования, используемых в исследовании. К дню 41 после начала лечения, 2 из 6 животных, подвергнутых лечению с помощью ВСУ12491 в дозе 5 мг/кг один раз в три дня (Q3D) имели полные ответы (CR; не пальпируемая опухоль), 3 из 6 животных, подвергнутых лечению с помощью ВСУ12491 в дозе 5 мг/кг один раз в сутки имели полные ответы 4 из 6 животных, при лечении с помощью ВСУ12491 в дозе 15 мг/кг один раз в три дня (Q3D) все животные имели полный ответ (6 из 6), при лечении с помощью ВСУ12491 в дозе 15 мг/кг один раз в сутки все животные имели полные ответы. Эти данные вместе с фармакокинетическими данными для ВСУ12491 в плазме мышей указывают, что для максимального противоопухолевого ответа на лечение с помощью ВСУ12491 в модели опухоли МС38 не требуется постоянного присутствия ВСУ12491 в плазме крови. Кроме того, животные с полным ответом отторгали повторный имплантат опухолевых клеток МС38 и не обнаруживали никакого роста опухолей, в то время как у наивных мышей, которым имплантировали одновременно те же самые опухолевые клетки, обнаруживался рост опухоли в 100% случаев ко дню 22 после имплантации опухолевых клеток. Это указывает на развитие иммунологической памяти после лечения с помощью ВСУ12491, приводящего к полному опухолевому ответу (фигура 27).

Определяли зависимость активности ВСУ12491 в популяциях различных иммунных клеток при лечении с помощью ВСУ12491 несущих опухоль МС38 мышей линии C57BL/6J-hCD137, которые были истощены по CD8⁺ Т-клеткам или NK 1.1⁺ NK клеткам. Самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 [B-hTNFRSF9(CD137); Biocytogen] в возрасте 6-8 недель имплантировали подкожно 1×10^6 клеток МС38#13 (клон клеток МС38, который был сконструирован для сверхэкспрессии нектин-4). Через три дня после имплантации клеток,

мышам интраперитонеально вводили плацебо (PBS), 100 мкг истощающего антитела против CD8 (Rat IgG2b, клон 2.42) или антител против NK (мышинный IgG2a, клон PK136) antibodies (или их комбинацию), или соответствующих изотипических контрольных антител (крысиный изотипический контрольный IgG2b или мышинный изотипический контрольный IgG2a). Мыши получали дополнительные дозы истощающих антител (или изотипических контролей) через 5 и 10 дней после первого дозирования антител. Истощение популяции клеток подтверждали методом проточной цитометрии через 4 и 12 дней после первой дозы истощающего антитела. Когда объемы опухолей достигали приблизительно 111 мм^3 (через 5 дней после первой дозы истощающего антитела), мышам начинали вводить внутривенно плацебо или BCY12491 в дозе 15 мг/кг два раза в неделю (BIW). Мыши получали суммарно 4 дозы BCY12491. Рост опухоли постоянно контролировали вплоть до дня 28 или до момента времени, когда объем опухоли начинал превышать 2000 мм^3 .

Лечение с помощью BCY12491 приводило к значительному снижению скорости роста опухоли и к увеличению выживаемости несущих опухоль MC38#13 мышей, которым были введены плацебо или изотипические контрольные антитела. Положительное воздействие лечения с помощью BCY12491 на снижение скорости роста опухоли и выживаемость утрачивалось в случае CD8-истощенных мышей. Истощение NK1.1+ клеток не оказывало отрицательного влияния на противоопухолевую активность лечения с помощью BCY12491 и последующее повышение выживаемости. Эти данные показывают, что активность BCY12491 в модели опухоли MC38#13 зависит от CD8+ Т-клеток, но не зависит от NK1.1+ NK клеток (фигура 28).

Противоопухолевая активность BCY12730 и BCY12723 была продемонстрирована наряду с активностью BCY12491. Самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 [B-hTNFRSF9(CD137); *Biocytogen*] в возрасте 6-8 недель имплантировали подкожно 1×10^6 клеток MC38. Мышей рандомизировали по группам лечения ($n=6$ /группа лечения), когда средние объемы опухолей достигали приблизительно 92 мм^3 , и подвергали лечению путем внутривенного введения 1 раз в три дня (Q3D) доз плацебо (25 mM гистидина, 10% сахарозы, pH7), 15 мг/кг BCY12730, BCY12723 или BCY12491 (7 доз Q3D). Рост опухоли постоянно контролировали в течение 28 дней или до момента времени, когда объемы опухолей начинали превышать 2000 мм^3 . BCY12491, BCY12730 и BCY12723 демонстрировали значительную противоопухолевую активность, приводящую к полным ответам у 4 из 6 животных, подвергавшихся лечению с помощью BCY12491, у 3 из 6 животных, подвергавшихся лечению с помощью BCY12730, и 2 из 6 животных, подвергавшихся лечению с помощью BCY12723 (фигура 29).

Противоопухолевая активность BCY13048 и BCY13050 была продемонстрирована наряду с активностью BCY12491. Самкам мышей линии C57BL/6J-hCD137 [B-hTNFRSF9(CD137); *Biocytogen*] в возрасте 6-8 недель имплантировали подкожно 1×10^6 клеток MC38. Мышей рандомизировали по группам лечения ($n=6$ /группа лечения), когда средние объемы опухолей достигали приблизительно 76 мм^3 , и подвергали лечению путем

внутривенного введения два раза в неделю (BIW) доз плацебо (25 мМ гистидина, 10% сахарозы, рН7), 5 мг/кг ВСУ13048, ВСУ13050, или ВСУ12491 (6 доз BIW). Рост опухоли постоянно контролировали в течение 28 дней или до момента времени, когда объемы опухолей начинали превышать 2000 мм³. ВСУ12491, ВСУ13048 и ВСУ13050 демонстрировали значительную противоопухолевую активность, приводящую к полным ответам у 2 из 6 животных, подвергавшихся лечению с помощью ВСУ12491, у 5 из 6 животных, подвергавшихся лечению с помощью ВСУ13048, и у 3 из 6 животных, подвергавшихся лечению с помощью ВСУ13050 (фигура 30).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс, включающий:

(а) первый пептидный лиганд, который связывается с компонентом, присутствующим на раковой клетке, конъюгированный через линкер с

(b) двумя или более вторыми пептидными лигандами, которые связываются с компонентом, присутствующим на иммунной клетке,

где каждый из указанных пептидных лигандов включает полипептид, содержащий, по меньшей мере, три реакционно-способных группы, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционно-способными группами полипептида, вследствие чего на молекулярном каркасе образуются, по меньшей мере, две полипептидных петли.

2. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 1, где иммунную клетку выбирают из лейкоцитов, лимфоцитов (например, Т-лимфоцитов или Т-клеток, В-клеток или естественных клеток-киллеров), CD8 или CD4, CD8, дендритных клеток, фолликулярных дендритных клеток и гранулоцитов.

3. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 1 или п. 2, где указанные реакционно-способные группы выбирают из остатков цистеина, 3-меркаптопропионовой кислоты и/или цистеамина.

4. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-3, где компонент, присутствующий на иммунной клетке, представляет собой CD137.

5. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-4, где два или более вторых пептидных лиганда включают CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд.

6. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 5, где CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из

C_i IEEGQYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 5);

C_i [tBuAla]PE[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 6);

C_i IEEGQYC_{ii}F[D-Ala]DPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 7);

C_i [tBuAla]PK[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 8);

C_i [tBuAla]PE[D-Lys]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 9);

C_i [tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 10);

C_i [tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 11);

(SEQ ID NO: 11)-A (именуемой в изобретении как BCY14601);

C_i IEE[D-Lys(PYA)]QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii} (SEQ ID NO: 12);

C_i [tBuAla]PE[dK]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 60);

C_i IEE[dK(PYA)]QYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 61);

C_i [tBuAla]EE(dK)PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 62);

C_i [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 63);

C_i [tBuAla]EE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 64);

C_i [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FANPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 65);
 C_i [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FAEPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 66);
 C_i [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FA[Aad]PY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 67);
 C_i [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FAQPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 68);
 C_i [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle][Cysam]_{iii} (SEQ ID NO: 69);
 [MerPro]_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 70; именуемой в изобретении как BCY12353);
 [MerPro]_i[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle][Cysam]_{iii} (SEQ ID NO: 71; именуемой в изобретении как BCY12354);
 C_i [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 72);
 C_i [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 73);
 C_i [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 74; именуемой в изобретении как BCY12372);
 C_i [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FAD[NMeAla]Y[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 75);
 C_i [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FAD[NMeDAla]Y[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 76);
 C_i [tBuAla]P[K(PYA)][dA]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 77);
 C_i [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 78);
 C_i [tBuAla]PE[dK(Me, PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 79);
 C_i [tBuAla]PE[dK(Me, PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 80); и
 [MerPro]_i[tBuAla]EE[dK]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 81; именуемой в изобретении как BCY13137);

где [MerPro]_i, C_i, C_{ii}, C_{iii} и [Cysam]_{iii} представляют первую (i), вторую (ii) и третью (iii) реакционно-способные группы, которые выбирают из цистеина, MerPro и Cysam, Nle представляет норлейцин, tBuAla представляет третбутил-аланин, PYA представляет 4-пентиноую кислоту, Aad представляет альфа-L-аминоадипиновую кислоту, MerPro представляет 3-меркаптопропионовую кислоту и Cysam представляет цистеамин, NMeAla представляет N-метил-аланин, или их фармацевтически приемлемую соль.

7. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 5 или п. 6, где CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, которая представляет собой

C_i [tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii} (SEQ ID NO: 11);

где C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, tBuAla представляет третбутил-аланин, PYA представляет 4-пентиноую кислоту, Nle представляет норлейцин, или их фармацевтически приемлемую соль.

8. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 6 или п. 7, где CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд включает N- и C-концевые модификации и включает

Ac-A-(SEQ ID NO: 5)-Дар (именуемую в изобретении как BCY7732);

Ac-A-(SEQ ID NO: 5)-Дар(PYA) (именуемую в изобретении как BCY7741);

Ac-(SEQ ID NO: 6)-Дар (именуемой в изобретении как BCY9172);

Ac-(SEQ ID NO: 6)-Dap(PYA) (именуемую в изобретении как BCY11014);
 Ac-A-(SEQ ID NO: 7)-Dap (именуемую в изобретении как BCY8045);
 Ac-(SEQ ID NO: 8)-A (именуемую в изобретении как BCY8919);
 Ac-(SEQ ID NO: 9)-A (именуемую в изобретении как BCY8920);
 Ac-(SEQ ID NO: 10)-A (именуемую в изобретении как BCY8927);
 Ac-(SEQ ID NO: 11)-A (именуемую в изобретении как BCY8928);
 Ac-A-(SEQ ID NO: 12)-A (именуемую в изобретении как BCY7744);
 Ac-(SEQ ID NO: 60)-Dap(PYA) (именуемую в изобретении как BCY11144);
 Ac-A-(SEQ ID NO: 61)-K (именуемую в изобретении как BCY11613);
 Ac-(SEQ ID NO: 62)-Dap(PYA) (именуемую в изобретении как BCY12023);
 Ac-(SEQ ID NO: 63) (именуемую в изобретении как BCY12149);
 Ac-(SEQ ID NO: 64) (именуемую в изобретении как BCY12143);
 Ac-(SEQ ID NO: 65) (именуемую в изобретении как BCY12147);
 Ac-(SEQ ID NO: 66) (именуемую в изобретении как BCY12145);
 Ac-(SEQ ID NO: 67) (именуемую в изобретении как BCY12146);
 Ac-(SEQ ID NO: 68) (именуемую в изобретении как BCY12150);
 Ac-(SEQ ID NO: 69) (именуемую в изобретении как BCY12352);
 Ac-(SEQ ID NO: 72)-[1,2-диаминоэтан] (именуемую в изобретении как BCY12358);
 [Palmitic Acid]-[yGlu]-[yGlu]-(SEQ ID NO: 73) (именуемую в изобретении как BCY12360);

Ac-(SEQ ID NO: 75) (именуемую в изобретении как BCY12381);
 Ac-(SEQ ID NO: 76) (именуемую в изобретении как BCY12382);
 Ac-(SEQ ID NO: 77)-K (именуемую в изобретении как BCY12357);
 Ac-(SEQ ID NO: 78)-[dA] (именуемую в изобретении как BCY13095);
 [Ac]-(SEQ ID NO: 78)-K (именуемую в изобретении как BCY13389);
 Ac-(SEQ ID NO: 79)-[dA] (именуемую в изобретении как BCY13096); и
 Ac-(SEQ ID NO: 80) (именуемую в изобретении как BCY13097);

wherein Ac представляет ацетильную группу, Dap представляет диаминопропионовую кислоту и PYA представляет 4-пентиноевую кислоту, или их фармацевтически приемлемую соль.

9. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 6-8, где CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд включает N- и C-концевые модификации и включает

Ac-(SEQ ID NO: 11)-A (именуемую в изобретении как BCY8928);

где Ac представляет ацетильную группу, или их фармацевтически приемлемую соль.

10. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-3, где компонент, присутствующий на иммунной клетке, представляет собой OX40.

11. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-3 и 10, где два или более вторых пептидных лиганда включают OX40 связывающий бициклический пептидный лиганд.

12. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 11, где OX40 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность

- $C_iILWC_{ii}LPEPHDEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 82);
 $C_iA^{K/S^N/E}C_{ii}DPFWYQFYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 83);
 $C_iAKNC_{ii}DPFWYQFYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 84);
 $C_iASEC_{ii}DPFWYQFYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 85);
 $C_i^{L/N}YSPC_{ii}WHPLN^{D/K}C_{iii}$ (SEQ ID NO: 86);
 $C_iLYSPC_{ii}WHPLNDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 87);
 $C_iNYSPC_{ii}WHPLNKC_{iii}$ (SEQ ID NO: 88);
 $C_iWYEYDC_{ii}NNWERC_{iii}$ (SEQ ID NO: 89);
 $C_iVIRYSPC_{ii}SHYLNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 90);
 $C_iDYSPWWHPC_{ii}NHIC_{iii}$ (SEQ ID NO: 91);
 $C_iDAC_{ii}LYPDYYVC_{iii}$ (SEQ ID NO: 92);
 $C_iRLWC_{ii}IPAPTDDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 93);
 $C_iTMWC_{ii}IPAKGDWC_{iii}$ (SEQ ID NO: 94);
 $C_iMLWC_{ii}LPAPTDEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 95);
 $C_iILWC_{ii}LPEPPDEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 96);
 $C_iLLWC_{ii}IPNPDDNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 97);
 $C_iWLWC_{ii}VPNPDDTC_{iii}$ (SEQ ID NO: 98);
 $C_iVLWC_{ii}TPYPGDDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 99);
 $C_iALWC_{ii}IPDPQDEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 100);
 $C_iTLWC_{ii}IPDASDSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 101);
 $C_iQLWC_{ii}IPDADDDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 102);
 $C_iQLWC_{ii}VPEPGDSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 103);
 $C_iALWC_{ii}IPEESDDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 104);
 $C_iVLWC_{ii}IPEPQDKC_{iii}$ (SEQ ID NO: 105);
 $C_iTLWC_{ii}IPDPDDSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 106);
 $C_iRLWC_{ii}VPKAEDYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 107);
 $C_iTKPC_{ii}IAYYNQSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 108);
 $C_iMNPC_{ii}IAYYQSEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 109);
 $C_iTNAC_{ii}VAYYHQAC_{iii}$ (SEQ ID NO: 110);
 $C_iSDPC_{ii}ISYYNQAC_{iii}$ (SEQ ID NO: 111);
 $C_iDPPC_{ii}DPFWYAFYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 112);
 $C_iPDDC_{ii}DPFWYNFYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 113);
 $C_iRYSPC_{ii}YHPHNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 114);
 $C_iLYSPC_{ii}NHPLNSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 115);
 $C_iEDNYC_{ii}FMWTPYC_{iii}$ (SEQ ID NO: 116);
 $C_iLDSPC_{ii}WHPLNDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 117);
 $C_iRFSPC_{ii}SHPLNQC_{iii}$ (SEQ ID NO: 118);

$C_iKYSPC_{ii}WHPLNLC_{iii}$ (SEQ ID NO: 119);
 $C_iRYSPC_{ii}WHPLNNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 120);
 $C_iEWISC_{ii}PGEPHRWWC_{iii}$ (SEQ ID NO: 121);
 $C_iVWEAC_{ii}PEHPDQWWC_{iii}$ (SEQ ID NO: 122);
 $C_iSTWHC_{ii}FWNLQEGKC_{iii}$ (SEQ ID NO: 123);
 $C_iEWKAC_{ii}EHDRERWWC_{iii}$ (SEQ ID NO: 124);
 $C_iRTWQC_{ii}FYEWQNGHC_{iii}$ (SEQ ID NO: 125);
 $C_iKTWDC_{ii}FWASQVSEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 126);
 $C_iSTWQC_{ii}FYDLQEGHC_{iii}$ (SEQ ID NO: 127);
 $C_iTTWEC_{ii}FYDLQEGHC_{iii}$ (SEQ ID NO: 128);
 $C_iETWEC_{ii}FWRLQAGEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 129);
 $C_iRTWQC_{ii}FWDLQEGLC_{iii}$ (SEQ ID NO: 130);
 $C_iSTWQC_{ii}FWDSQLGAC_{iii}$ (SEQ ID NO: 131);
 $C_iETWEC_{ii}FWEWQVGSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 132);
 $C_iTTWEC_{ii}FWDLQEGLC_{iii}$ (SEQ ID NO: 133);
 $C_iHTWDC_{ii}FYQWQDGHC_{iii}$ (SEQ ID NO: 134);
 $C_iTTWEC_{ii}FYSLQDGHC_{iii}$ (SEQ ID NO: 135);
 $C_iNEDMYC_{ii}FMWMEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 136);
 $C_iLYEYDC_{ii}YTWRRRC_{iii}$ (SEQ ID NO: 137);
 $C_iRYEYDC_{ii}HTWQRC_{iii}$ (SEQ ID NO: 138);
 $C_iWYEYDC_{ii}TTWERC_{iii}$ (SEQ ID NO: 139);
 $C_iWYEYDC_{ii}RTWTRC_{iii}$ (SEQ ID NO: 140);
 $C_iLYEYDC_{ii}HTWTRC_{iii}$ (SEQ ID NO: 141);
 $C_iWYEYDC_{ii}RTWTFC_{iii}$ (SEQ ID NO: 142);
 $C_iHGGVWC_{ii}IPNINDSC_{iii}$ (SEQ ID NO: 143);
 $C_iDSPVRC_{ii}YWNTQKGC_{iii}$ (SEQ ID NO: 144);
 $C_iGSPVPC_{ii}YWNTRKGC_{iii}$ (SEQ ID NO: 145);
 $C_iAPFEFNC_{ii}YTWRPC_{iii}$ (SEQ ID NO: 146);
 $C_iRVLYSPC_{ii}YHWLNC_{iii}$ (SEQ ID NO: 147);
 $C_iSIMYSPC_{ii}EHPHNHC_{iii}$ (SEQ ID NO: 148);
 $C_iDKWEPDHL C_{ii}YWWC_{iii}$ (SEQ ID NO: 149);
 $C_iDAWPETHVC_{ii}YWWC_{iii}$ (SEQ ID NO: 150);
 $C_iDEYTPEHLC_{ii}YWWC_{iii}$ (SEQ ID NO: 151);
 $C_iWINYSISPC_{ii}YVGEC_{iii}$ (SEQ ID NO: 152); и
 $C_iRYEYPEHLC_{ii}YTWQC_{iii}$ (SEQ ID NO: 153);

такую как

$C_iLYSPC_{ii}WHPLNDC_{iii}$ (SEQ ID NO: 87);

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

13. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 12, где OX40 связывающий бициклический пептидный лиганд дополнительно включает N- и/или C-концевые модификации и включает аминокислотную последовательность, выбранную из

A-(SEQ ID NO: 82)-A-[Sar6]-[KBiot] (именуемой в изобретении как BCY10551);
A-(SEQ ID NO: 82)-A (именуемой в изобретении как BCY10371);
A-(SEQ ID NO: 84)-A-[Sar6]-[KBiot] (именуемой в изобретении как BCY10552);
[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 84)-A (именуемой в изобретении как BCY10479);
A-(SEQ ID NO: 84)-A (именуемой в изобретении как BCY10378);
[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 85)-A (именуемой в изобретении как BCY11371);
A-(SEQ ID NO: 85)-A (именуемой в изобретении как BCY10743);
[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 87)-A (именуемой в изобретении как BCY10482);
A-(SEQ ID NO: 87)-A-[Sar6]-[KBiot] (именуемой в изобретении как BCY10549);
A-(SEQ ID NO: 87)-A-K(Pyu) (именуемой в изобретении как BCY11607);
Ac-A-(SEQ ID NO: 87)-A-K(Pyu) (именуемой в изобретении как BCY12708);
A-(SEQ ID NO: 87)-A (именуемой в изобретении как BCY10351);
A-(SEQ ID NO: 88)-A-[Sar6]-[KBiot] (именуемой в изобретении как BCY11501);
A-(SEQ ID NO: 88)-A (именуемой в изобретении как BCY10729);
A-(SEQ ID NO: 89)-A-[Sar6]-[KBiot] (именуемой в изобретении как BCY10550);
A-(SEQ ID NO: 89)-A (именуемой в изобретении как BCY10361);
A-(SEQ ID NO: 90)-A-[Sar6]-[KBiot] (именуемой в изобретении как BCY10794);
A-(SEQ ID NO: 90)-A (именуемой в изобретении как BCY10349);
[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO: 91)-A (именуемой в изобретении как BCY11369);
A-(SEQ ID NO: 91)-A (именуемой в изобретении как BCY10331);
A-(SEQ ID NO: 92)-A (именуемой в изобретении как BCY10375);
A-(SEQ ID NO: 93)-A (именуемой в изобретении как BCY10364);
A-(SEQ ID NO: 94)-A (именуемой в изобретении как BCY10365);
A-(SEQ ID NO: 95)-A (именуемой в изобретении как BCY10366);
A-(SEQ ID NO: 96)-A (именуемой в изобретении как BCY10367);
A-(SEQ ID NO: 97)-A (именуемой в изобретении как BCY10368);
A-(SEQ ID NO: 98)-A (именуемой в изобретении как BCY10369);
A-(SEQ ID NO: 99)-A (именуемой в изобретении как BCY10374);
A-(SEQ ID NO: 100)-A (именуемой в изобретении как BCY10376);
A-(SEQ ID NO: 101)-A (именуемой в изобретении как BCY10737);
A-(SEQ ID NO: 102)-A (именуемой в изобретении как BCY10738);
A-(SEQ ID NO: 103)-A (именуемой в изобретении как BCY10739);
A-(SEQ ID NO: 104)-A (именуемой в изобретении как BCY10740);
A-(SEQ ID NO: 105)-A (именуемой в изобретении как BCY10741);
A-(SEQ ID NO: 106)-A (именуемой в изобретении как BCY10742);
A-(SEQ ID NO: 107)-A (именуемой в изобретении как BCY10380);
A-(SEQ ID NO: 108)-A (именуемой в изобретении как BCY10370);

A-(SEQ ID NO: 149)-A (именуемой в изобретении как BCY10332);
 A-(SEQ ID NO: 150)-A (именуемой в изобретении как BCY10717);
 A-(SEQ ID NO: 151)-A (именуемой в изобретении как BCY10718);
 A-(SEQ ID NO: 152)-A (именуемой в изобретении как BCY10334); и
 A-(SEQ ID NO: 153)-A (именуемой в изобретении как BCY10719);
 такой как

A-(SEQ ID NO: 87)-A-K(P_{ua}) (именуемой в изобретении как BCY11607);
 где P_{ua} представляет 4-пептиноильный фрагмент.

14. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-13, где раковую клетку выбирают из HT1080, A549, SC-OV-3, PC3, HT1376, NCI-H292, LnCap, MC38, MC38 #13, 4T1-D02, H322, HT29, T47D и RKO опухолевой клетки.

15. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-14, где компонент, присутствующий на раковой клетке, представляет собой нектин-4.

16. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-15, где первый пептидный лиганд включает нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд.

17. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 16, где нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из

C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 1; именуемой в изобретении как BCY8116);

C_iP[1Nal][dK](Sar₁₀-(B-Ala))C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 3);

C_iPFGC_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 4; именуемой в изобретении как BCY11414);

C_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 14);

[MerPro]_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 15; именуемой в изобретении как BCY12363);

C_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]W[Cysam]_{iii} (SEQ ID NO: 16);

[MerPro]_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]W[Cysam]_{iii} (SEQ ID NO: 17; именуемой в изобретении как BCY12365);

C_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HArg]HWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 18);

C_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HArg]EWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 19);

C_iP[1Nal][dE]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 20; именуемой в изобретении как BCY12368);

C_iP[1Nal][dA]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 21; именуемой в изобретении как BCY12369);

C_iP[1Nal][dE]C_{ii}L[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 22; именуемой в изобретении как BCY12370); и

C_iP[1Nal][dE]C_{ii}M[HArg]EWSTP[HyP]WC_{iii} (SEQ ID NO: 23; именуемой в изобретении как BCY12384);

где [MerPro]_i, C_i, C_{ii}, C_{iii} и [Cysam]_{iii} представляют первую (i), вторую (ii) и третью (iii) реакционно-способные группы, которые выбирают из цистеина, MerPro и Cysam, 1Nal представляет 1-нафтилаланин, HArg представляет гомоаргинин, HуP представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, Sar₁₀ представляет 10 звеньев саркозина, B-Ala представляет бета-аланин, MerPro представляет 3-меркаптопропионовую кислоту и Cysam представляет цистеамин, или их фармацевтически приемлемую соль.

18. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 17, где нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно включает N-концевые модификации и включает:

SEQ ID NO: 1 (именуемую в изобретении как BCY8116);
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-[SEQ ID NO: 1] (именуемую в изобретении как BCY8846);
 [PYA]-[SEQ ID NO: 1] (именуемую в изобретении как BCY11015);
 [PYA]-[B-Ala]-[SEQ ID NO: 1] (именуемую в изобретении как BCY11016);
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-[SEQ ID NO: 2] (именуемую в изобретении как BCY11942);
 Ac-[SEQ ID NO: 3] (именуемую в изобретении как BCY8831);
 SEQ ID NO: 4 (именуемую в изобретении как BCY11414);
 [PYA]-[B-Ala]-[SEQ ID NO: 14] (именуемую в изобретении как BCY11143);
 Palmitic-yGlu-yGlu-[SEQ ID NO: 14] (именуемую в изобретении как BCY12371);
 Ac-[SEQ ID NO: 14] (именуемую в изобретении как BCY12024);
 Ac-[SEQ ID NO: 16] (именуемую в изобретении как BCY12364);
 Ac-[SEQ ID NO: 18] (именуемую в изобретении как BCY12366); и
 Ac-[SEQ ID NO: 19] (именуемую в изобретении как BCY12367);

где PYA представляет 4-пентиноевую кислоту, B-Ala представляет бета-аланин, Sar₁₀ представляет 10 звеньев саркозина, или их фармацевтически приемлемую соль.

19. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 17 или п. 18, где нектин-4 связывающий бициклический пептидный лиганд включает SEQ ID NO: 1 (именуемую в изобретении как BCY8116).

20. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 15-19, который выбирают из любого одного из комплексов, приведенных в таблицах А и В, таких как BCY11027, BCY11863 и BCY11864.

21. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 15-19, который выбирают из любого одного из комплексов, приведенных в таблице Е, такого как BCY12967.

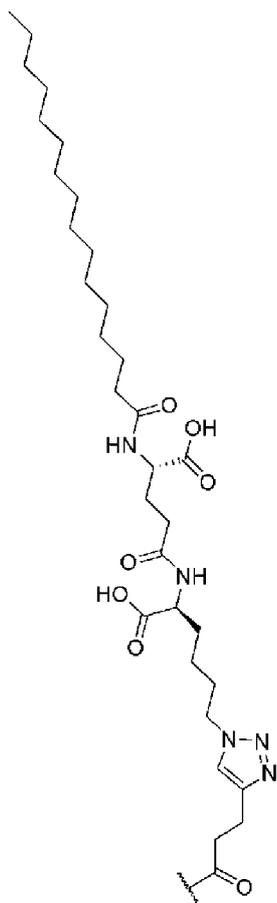
22. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-14, где компонент, присутствующий на раковой клетке, представляет собой EphA2.

23. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 22, где EphA2 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из

C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 24);
 C_iLWDPTPC_{ii}ANLHL[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 25);

C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[K(PYA)]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 26);
 C_i[HyP][K(PYA)]VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 27);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}[K(PYA)]HP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 28);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LKP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 29);
 C_i[HyP]KVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 30);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}KHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 31);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dE]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 32);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 33);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 34);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 35);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[dA]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 36);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 37; именуемой в изобретении
 как BCY12860);
 C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 38);
 C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}LEP[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 39);
 C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 40);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 41);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[d1Nal]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 42);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[1Nal]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 43);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[d1Nal]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 44);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[1Nal]P[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 45; именуемой в изобретении как
 BCY13119);
 C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}LEP[dA]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 46);
 C_i[HyP][hGlu]VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 47);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}[hGlu]HP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 48);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[hGlu]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 49);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dNle]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 50);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[Nle]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 51);
 [MerPro]_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]WTC_{iii} (SEQ ID NO: 154);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg][Cysam]_{iii} (SEQ ID NO: 155);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[His3Me]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 156);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[His1Me]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 157);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[4ThiAz]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 158);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LFP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 159);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[Thi]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 160);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[3Thi]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 161);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LNP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 162);
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LQP[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO: 163); и
 C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[K(PYA-(пальмитойл-Glu-LysN₃))]P[dD]W[HArg]C_{iii} (SEQ ID NO:

где [MetPro]_i, C_i, C_{ii}, C_{iii} и [Cysam]_{iii} представляют первую (i), вторую (ii) и третью (iii) реакционно-способные группы, который выбирают из цистеина, MetPro и Cysam, НуР представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, HArg представляет гомоаргинин, РУА представляет 4-пентиную кислоту, 3,3-DPA представляет 3,3-дифенилаланин, Сба представляет β-циклобутилаланин, 1Nal представляет 1-нафтилаланин, hGlu представляет гомоглутаминовую кислоту, Thi представляет тиенилаланин, 4ThiAz представляет бета-(4-тиазолил)-аланин, His1Me представляет N1-метил-L-гистидин, His3Me представляет N3-метил-L-гистидин, 3Thi представляет 3-тиенилаланин, пальмитоил-Glu-LysN₃[PYA] представляет:



(пальмитоил-Glu-LysN₃)[PYA] ,

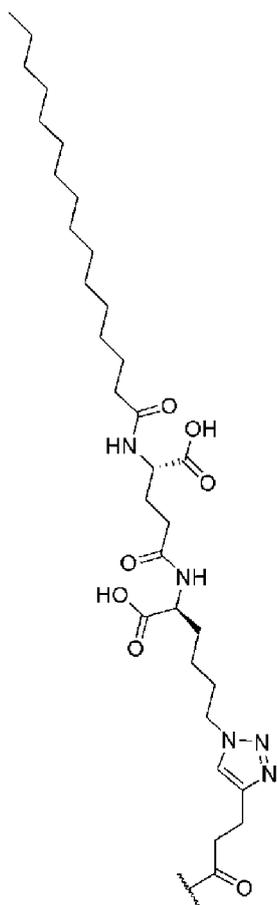
[K(PYA-(пальмитоил-Glu-LysN₃))] представляет:

26. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 23-25, где EphA2 связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно включает N-концевые модификации и включает:

- A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 24) (именуемую в изобретении как ВСУ9594);
 [B-Ala]-[Sar₁₀]-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 24) (именуемой в изобретении как ВСУ6099);
 [PYA]-A-[HArg]-D-(SEQ NO: 24) (именуемую в изобретении как ВСУ11813);
 Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 24)-[K(PYA)] (именуемую в изобретении как ВСУ11814);
 Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 24)-K (именуемую в изобретении как ВСУ12734);
 [NMeAla]-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 24) (именуемую в изобретении как ВСУ13121);
 [Ac]-(SEQ ID NO: 24)-L[dH]G[dK] (именуемую в изобретении как ВСУ13125);
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-VGP-(SEQ ID NO: 25) (именуемую в изобретении как ВСУ8941);
 Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 26) (именуемую в изобретении как ВСУ11815);
 Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 27) (именуемую в изобретении как ВСУ11816);
 Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 28) (именуемую в изобретении как ВСУ11817);
 Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 29) (именуемую в изобретении как ВСУ12735);
 (Пальмитоил-Glu-LysN₃)[PYA]A[HArg]D-(SEQ ID NO: 29) (именуемую в изобретении как ВСУ14327);
 Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 30) (именуемую в изобретении как ВСУ12736);
 Ac-A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 31) (именуемую в изобретении как ВСУ12737);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 32) (именуемую в изобретении как ВСУ12738);
 A-[HArg]-E-(SEQ ID NO: 32) (именуемую в изобретении как ВСУ12739);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 33) (именуемую в изобретении как ВСУ12854);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 34) (именуемую в изобретении как ВСУ12855);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 35) (именуемую в изобретении как ВСУ12856);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 35)-[dA] (именуемую в изобретении как ВСУ12857);
 (SEQ ID NO: 35)-[dA] (именуемую в изобретении как ВСУ12861);
 [NMeAla]-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 35) (именуемую в изобретении как ВСУ13122);
 [dA]-ED-(SEQ ID NO: 35) (именуемую в изобретении как ВСУ13126);
 [dA]-[dA]-D-(SEQ ID NO: 35) (именуемую в изобретении как ВСУ13127);
 AD-(SEQ ID NO: 35) (именуемую в изобретении как ВСУ13128);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 36) (именуемую в изобретении как ВСУ12858);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 37) (именуемую в изобретении как ВСУ12859);
 Ac-(SEQ ID NO: 37)-[dK] (именуемую в изобретении как ВСУ13120);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 38) (именуемую в изобретении как ВСУ12862);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 39) (именуемую в изобретении как ВСУ12863);
 [dA]-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 39)-[dA] (именуемую в изобретении как ВСУ12864);
 (SEQ ID NO: 40)-[dA] (именуемую в изобретении как ВСУ12865);

A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 41) (именуемую в изобретении как BCY12866);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 42) (именуемую в изобретении как BCY13116);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 43) (именуемую в изобретении как BCY13117);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 44) (именуемую в изобретении как BCY13118);
 [dA]-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 46)-[dA] (именуемую в изобретении как BCY13123);
 [d1Nal]-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 46)-[dA] (именуемую в изобретении как BCY13124);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 47) (именуемую в изобретении как BCY13130);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 48) (именуемую в изобретении как BCY13131);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 49) (именуемую в изобретении как BCY13132);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 50) (именуемую в изобретении как BCY13134);
 A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 51) (именуемую в изобретении как BCY13135);
 (SEQ ID NO: 154)-[dK] (именуемой в изобретении как BCY13129);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 155) (именуемую в изобретении как BCY13133);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 156) (именуемую в изобретении как BCY13917);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 157) (именуемую в изобретении как BCY13918);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 158) (именуемую в изобретении как BCY13919);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 159) (именуемую в изобретении как BCY13920);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 160) (именуемую в изобретении как BCY13922);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 161) (именуемую в изобретении как BCY13923);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 162) (именуемую в изобретении как BCY14047);
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 163) (именуемую в изобретении как BCY14048); and
 A[HArg]D-(SEQ ID NO: 164) (именуемую в изобретении как BCY14313);

где PYA представляет 4-пентиновую кислоту, B-Ala представляет бета-аланин, Sar₁₀ представляет 10 звеньев саркозина, HArg представляет гомоаргинин, NMeAla представляет N-метил-аланин, 1Nal представляет 1-нафтилаланин, пальмитоил-Glu-LysN₃[PYA] представляет:



(пальмитоил-Glu-LysN3)[PYA] ,

или их фармацевтически приемлемую соль.

27. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 23-26, где EphA2 связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно включает N-концевые модификации и включает

A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 24) (именуемую в изобретении как BCY9594);

где HArg представляет гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

28. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 23-26, где EphA2 связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно включает N-концевые модификации и включает

A-[HArg]-D-(SEQ ID NO: 44) (именуемую в изобретении как BCY13118),

где HArg представляет гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

29. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 22-28, который выбирают из любого одного из комплексов, приведенных в таблице С, такого как BCY12491, BCY12730, BCY13048, BCY13050, BCY13053 и BCY13272.

30. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 29, который представляет собой BCY12491.

31. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 29, который представляет собой BCY13272.

32. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-13, где компонент, присутствующий на раковой клетке, представляет собой PD-L1.

33. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 32, где PD-L1 связывающий бициклический пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из

C_i SAGWLTMC_{ii}QKLHLC_{iii} (SEQ ID NO: 52);
 C_i SAGWLTMC_{ii}Q[K(PYA)]LHLC_{iii} (SEQ ID NO: 53);
 C_i SKGWLTMC_{ii}Q[K(Ac)]LHLC_{iii} (SEQ ID NO: 54);
 C_i SAGWLTMC_{ii}Q[K(Ac)]LHLC_{iii} (SEQ ID NO: 55);
 C_i SAGWLTMC_{ii}K[K(Ac)]LHLC_{iii} (SEQ ID NO: 56);
 C_i SAGWLTMC_{ii}Q[K(Ac)]LKLC_{iii} (SEQ ID NO: 57);
 C_i SAGWLTMC_{ii}Q[HArg]LHLC_{iii} (SEQ ID NO: 58); и
 C_i SAGWLTMC_{ii}[HArg]QLNLC_{iii} (SEQ ID NO: 59);

где C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют собой первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, PYA представляет 4-пентиноую кислоту и HArg представляет гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

34. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 33, где PD-L1 связывающий бициклический пептидный лиганд необязательно включает N-концевые и/или C-концевые модификации и включает

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-SDK-(SEQ ID NO: 52) (именуемую в изобретении как BCY10043);

Ac-D-[HArg]-(SEQ ID NO: 52)-PSH (именуемую в изобретении как BCY11865);
 Ac-SDK-(SEQ ID NO: 53) (именуемую в изобретении как BCY11013);
 Ac-SDK-(SEQ ID NO: 53)-PSH (именуемую в изобретении как BCY10861);
 Ac-D-[HArg]-(SEQ ID NO: 54)-PSH (именуемую в изобретении как BCY11866);
 Ac-D-[HArg]-(SEQ ID NO: 55)-PSH (именуемую в изобретении как BCY11867);
 Ac-D-[HArg]-(SEQ ID NO: 56)-PSH (именуемую в изобретении как BCY11868);
 Ac-D-[HArg]-(SEQ ID NO: 57)-PSH (именуемую в изобретении как BCY11869);
 Ac-SD-[HArg]-(SEQ ID NO: 58)-PSHK (именуемую в изобретении как BCY12479);

and

Ac-SD-[HArg]-(SEQ ID NO: 59)-PSHK (именуемую в изобретении как BCY12477);

где PYA представляет 4-пентиноую кислоту, B-Ala представляет бета-аланин, Sar₁₀ представляет 10 звеньев саркозина и HArg представляет гомоаргинин, или их фармацевтически приемлемую соль.

35. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 32-34, который выбирают из любого одного из комплексов, приведенных в таблице D.

36. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-5, где два или более вторых пептидных лиганда включают один CD137 связывающий бициклический пептидный лиганд и один OX40 связывающий бициклический пептид.

37. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 36, который представляет собой комплекс, представленный в таблице F.

38. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по п. 1, который выбирают из любого одного из комплексов, приведенных в таблицах G и H.

39. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-38, где молекулярный каркас выбирают из 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА).

40. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-39, где фармацевтически приемлемую соль выбирают из свободной кислоты или натриевой, калиевой, кальциевой, аммонийной соли.

41. Фармацевтическая композиция, которая включает гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-40 в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

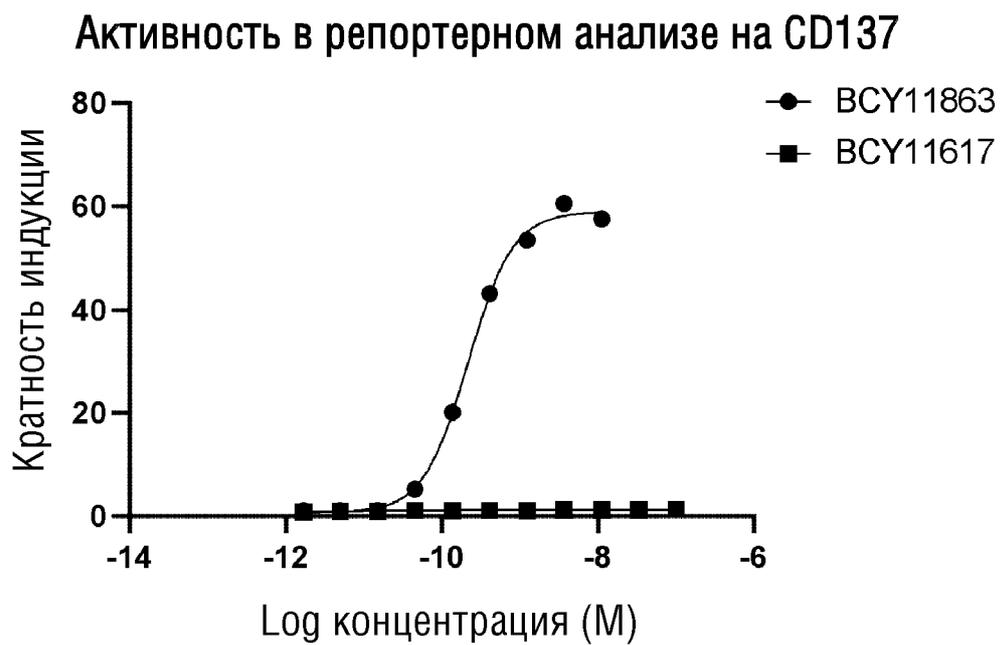
42. Гетеротандемный бициклический пептидный комплекс по любому одному из пп. 1-40 для применения с целью предотвращения, подавления или лечения рака.

43. Способ лечения рака, который включает введение гетеротандемного бициклического пептидного комплекса по любому одному из пп. 1-40 при частоте дозирования, при которой не поддерживаются концентрации указанного комплекса в плазме выше величины *in vitro* EC₅₀ для указанного комплекса.

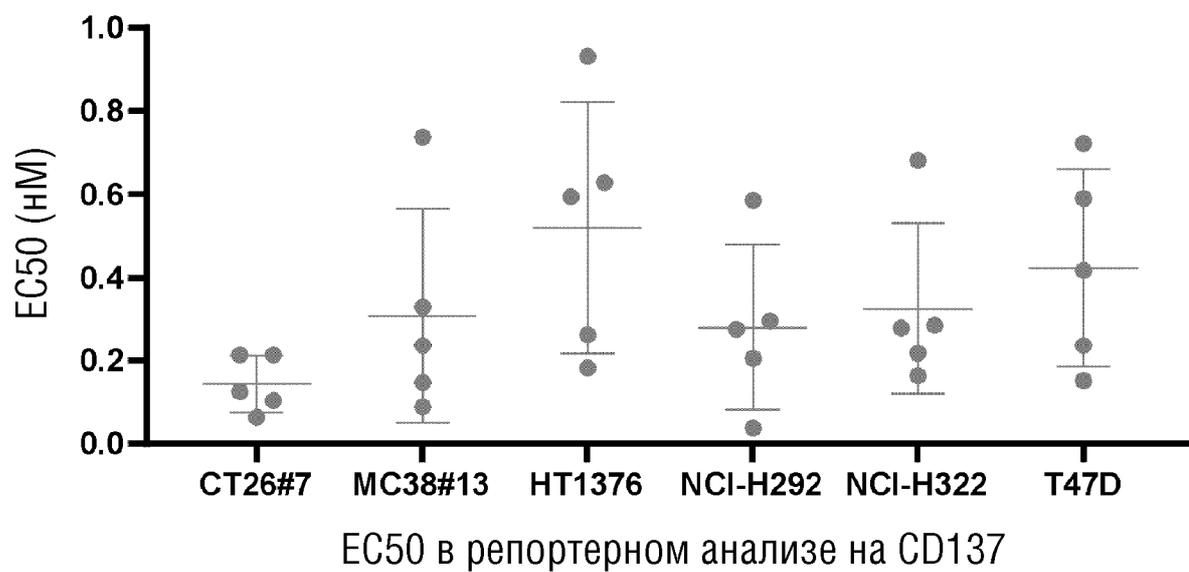
По доверенности

ФИГ.1

А



В

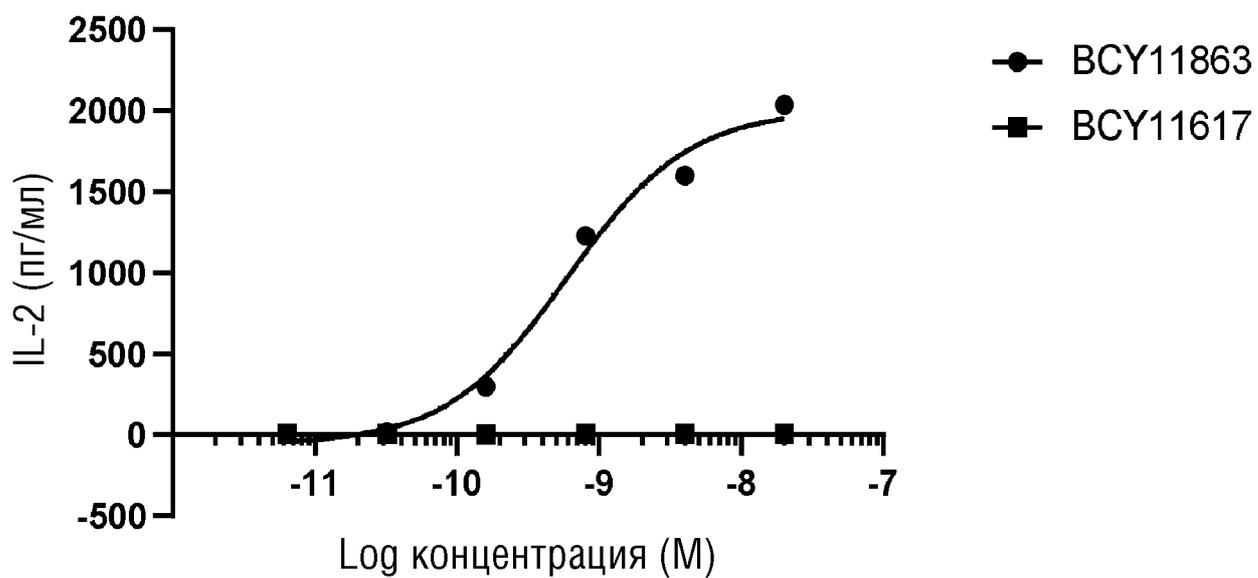


ФИГ. 2

А

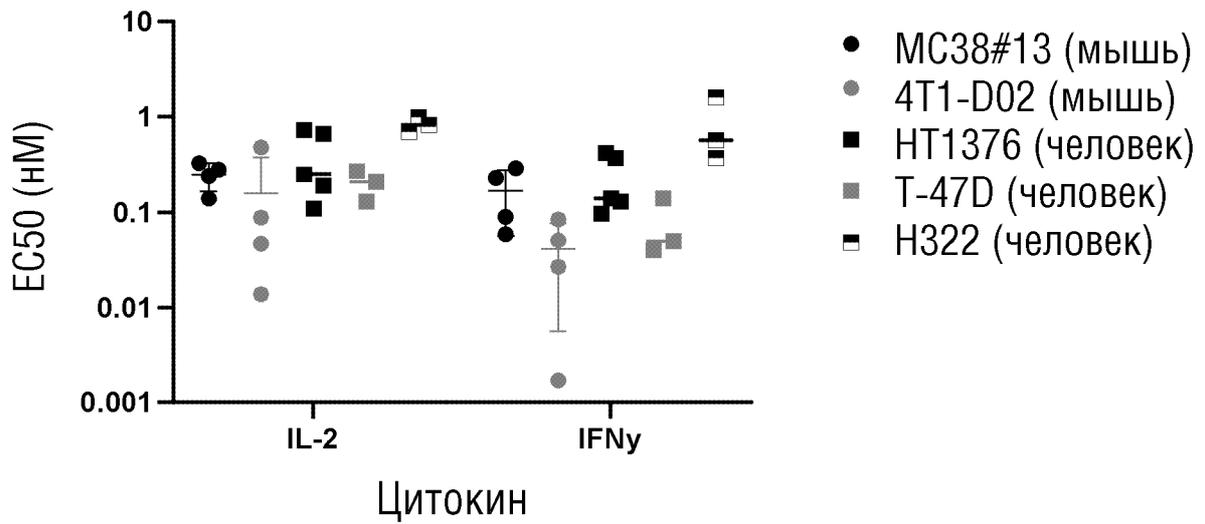


В

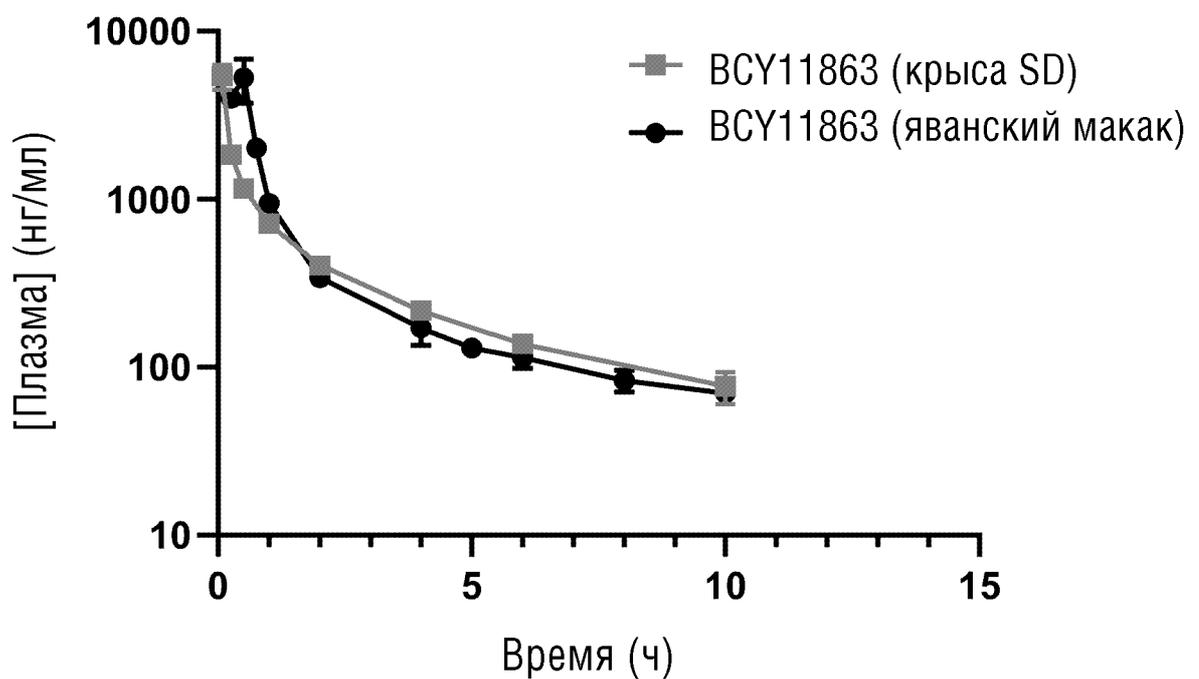


ФИГ.2 (продолжение)

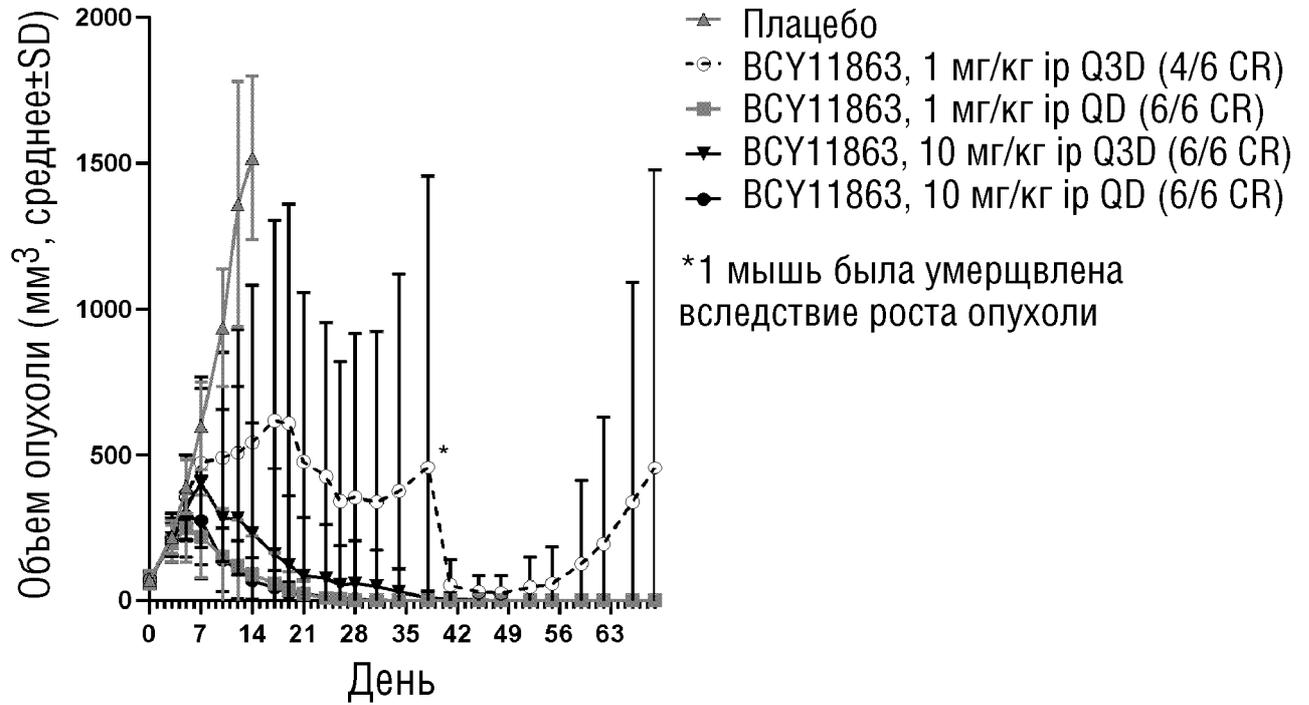
С



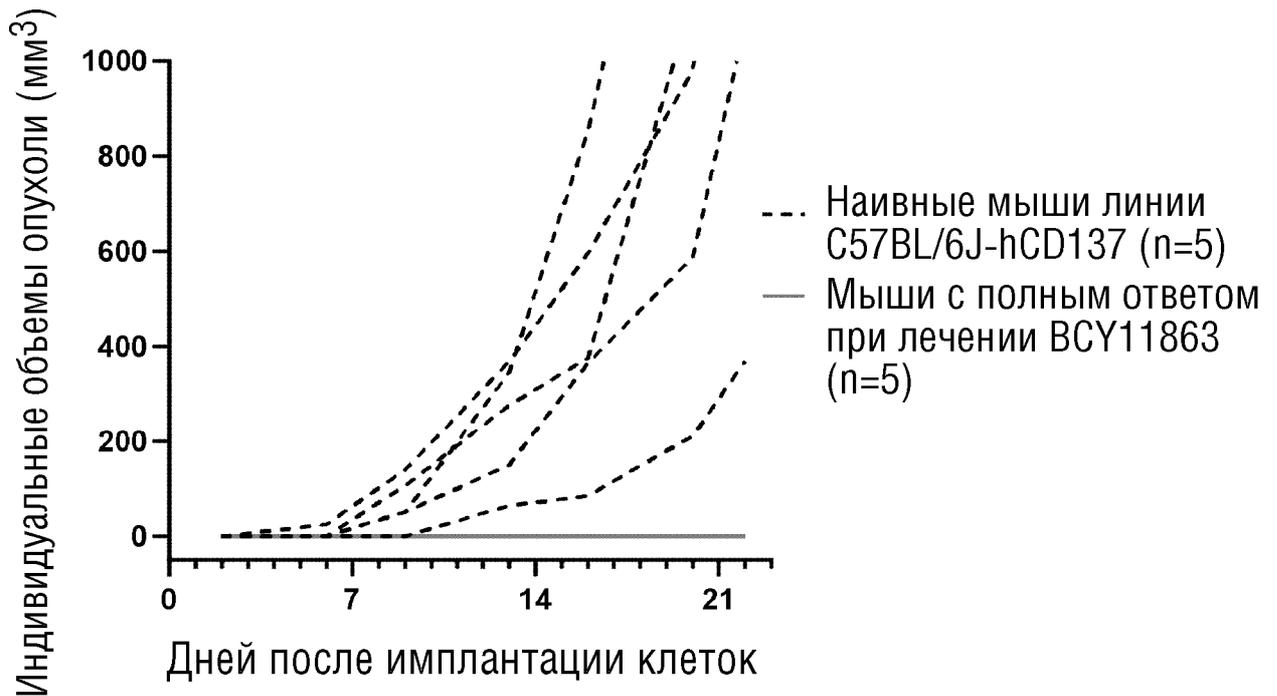
ФИГ.3



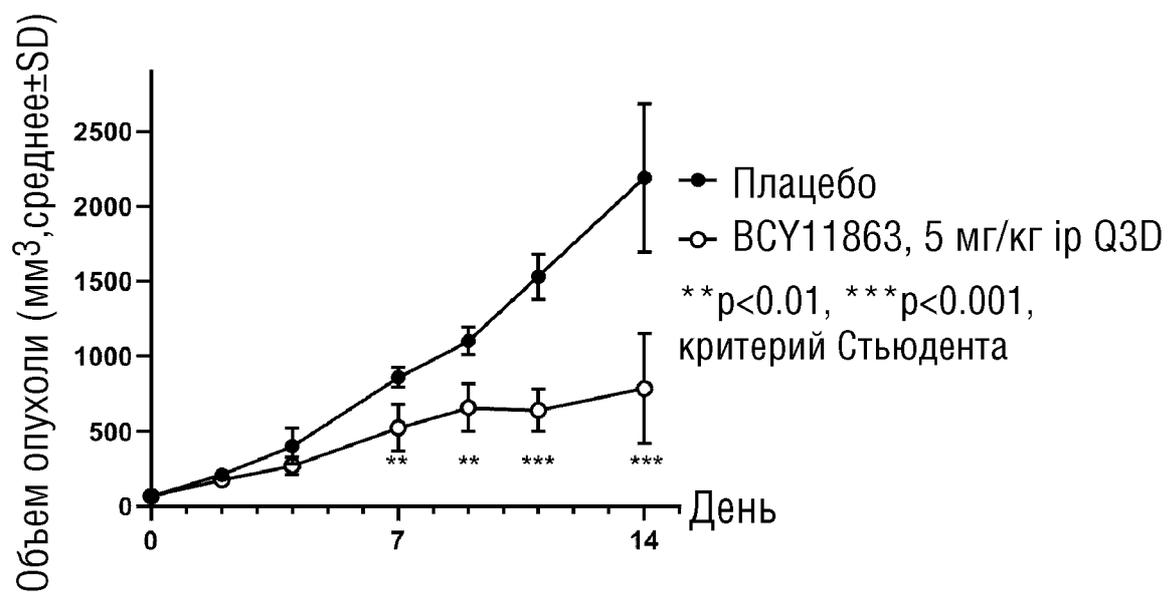
ФИГ.4



ФИГ.5

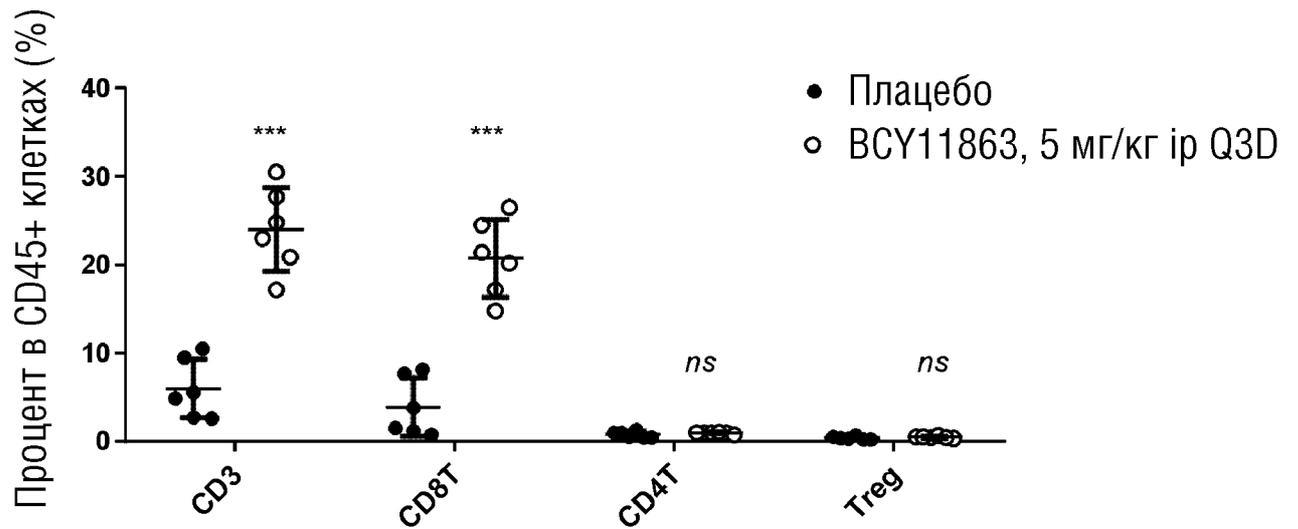


ФИГ.6

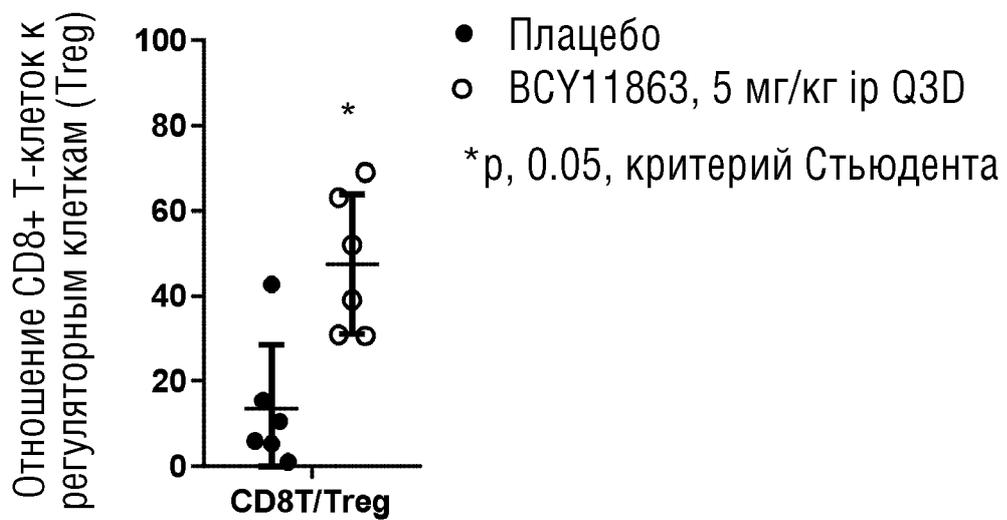


ФИГ.7

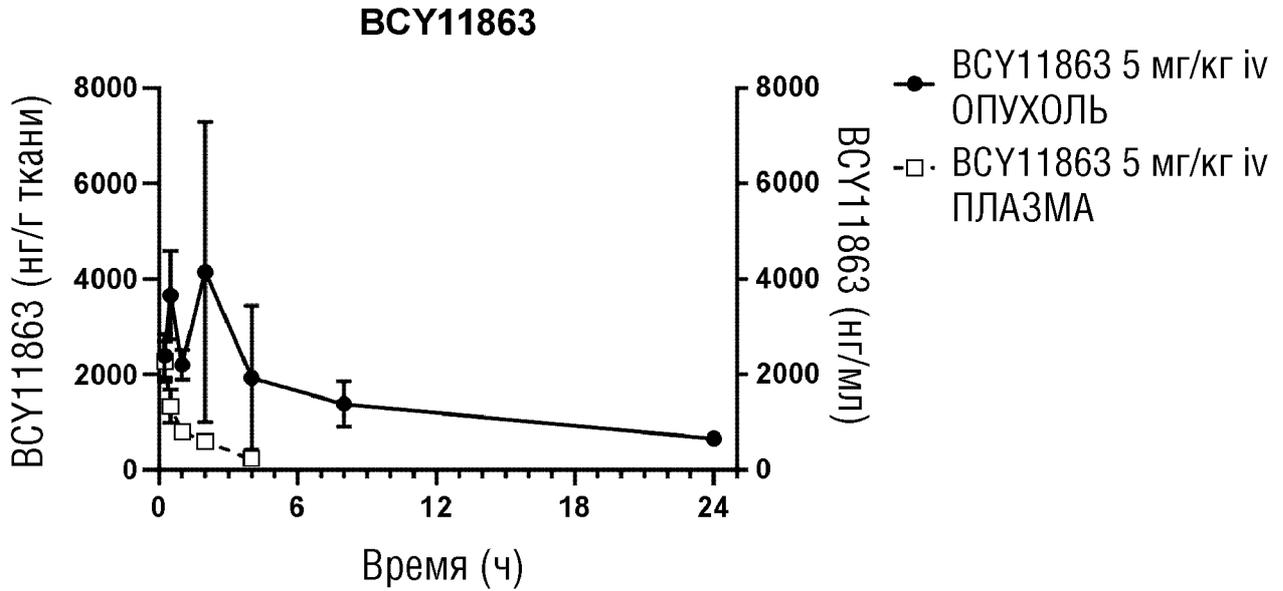
А



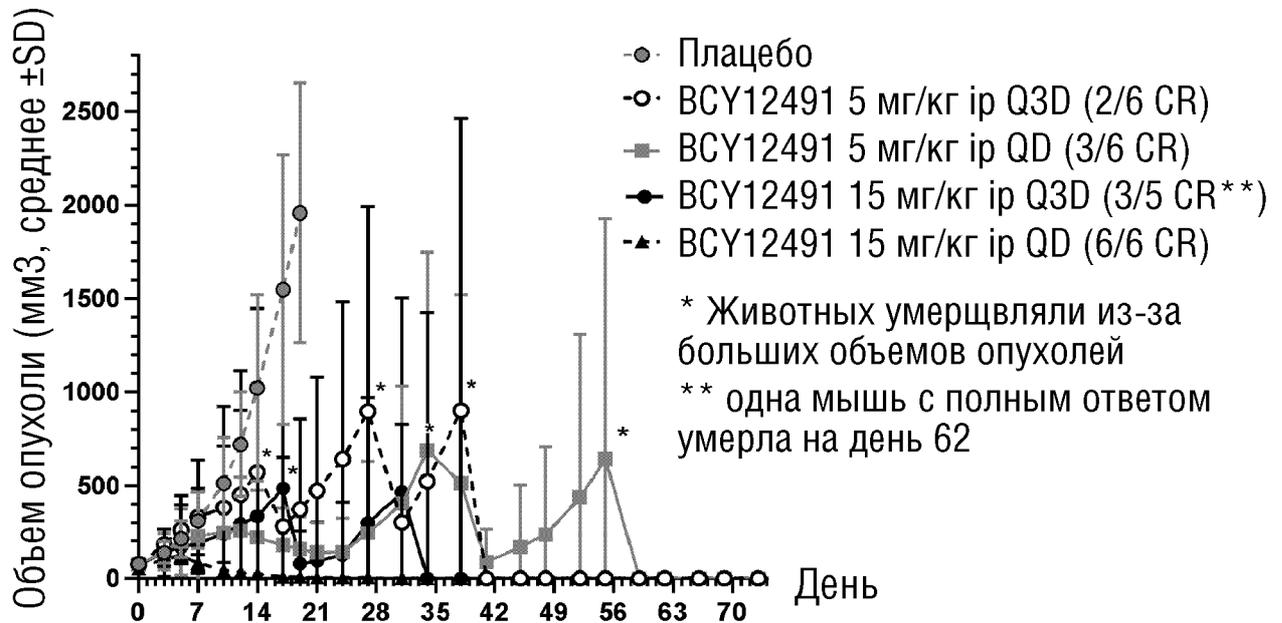
В



ФИГ.8

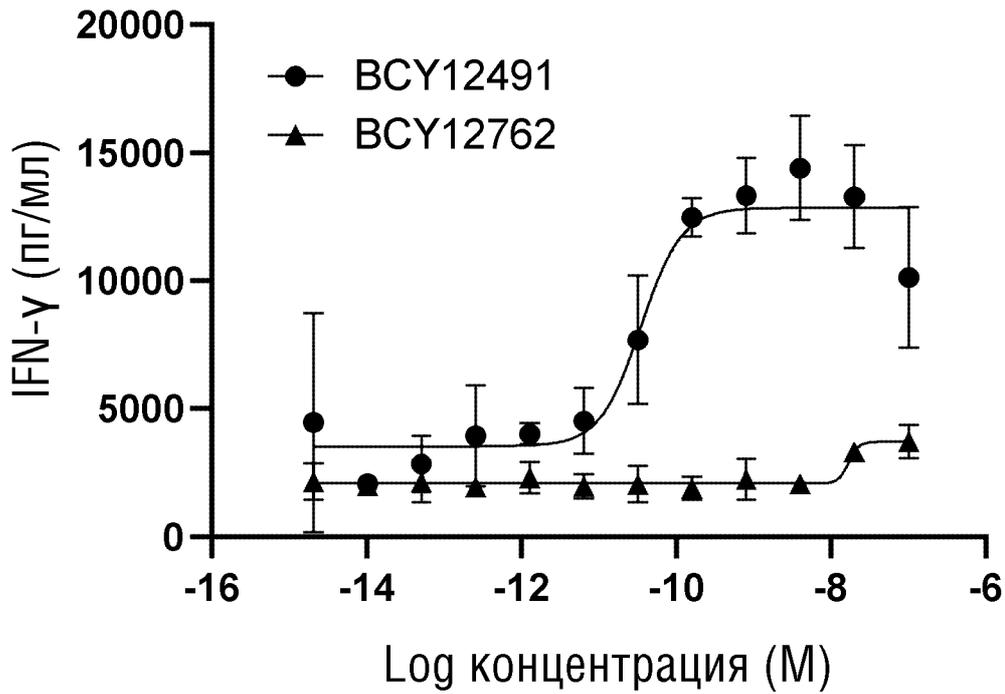


ФИГ.9

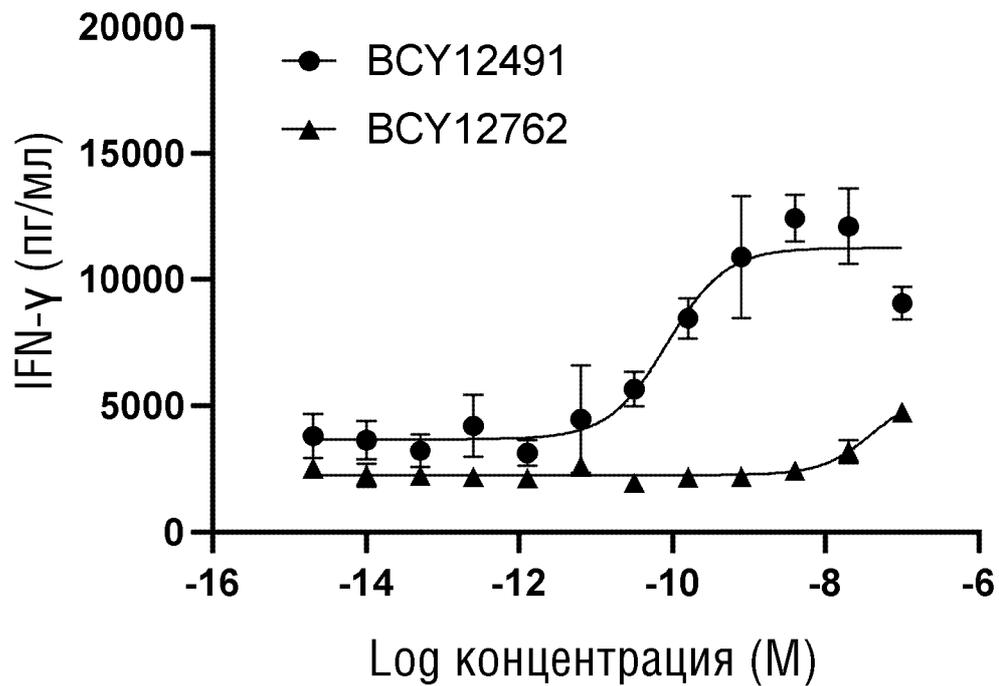


ФИГ.10

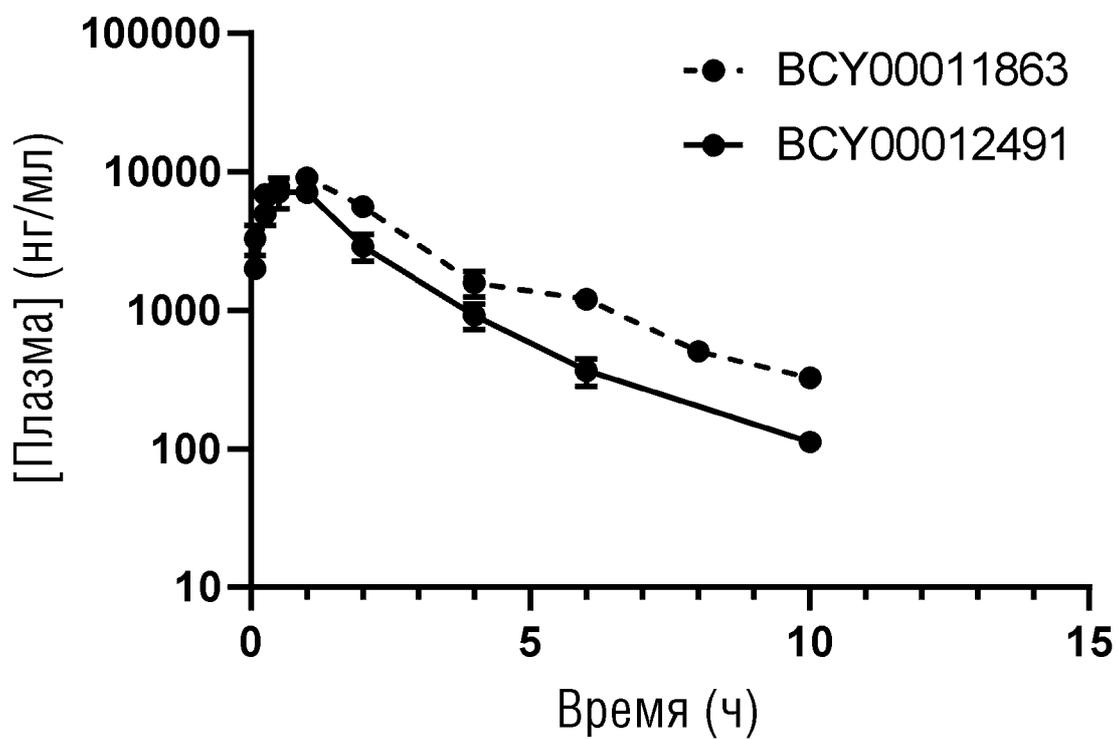
А



В

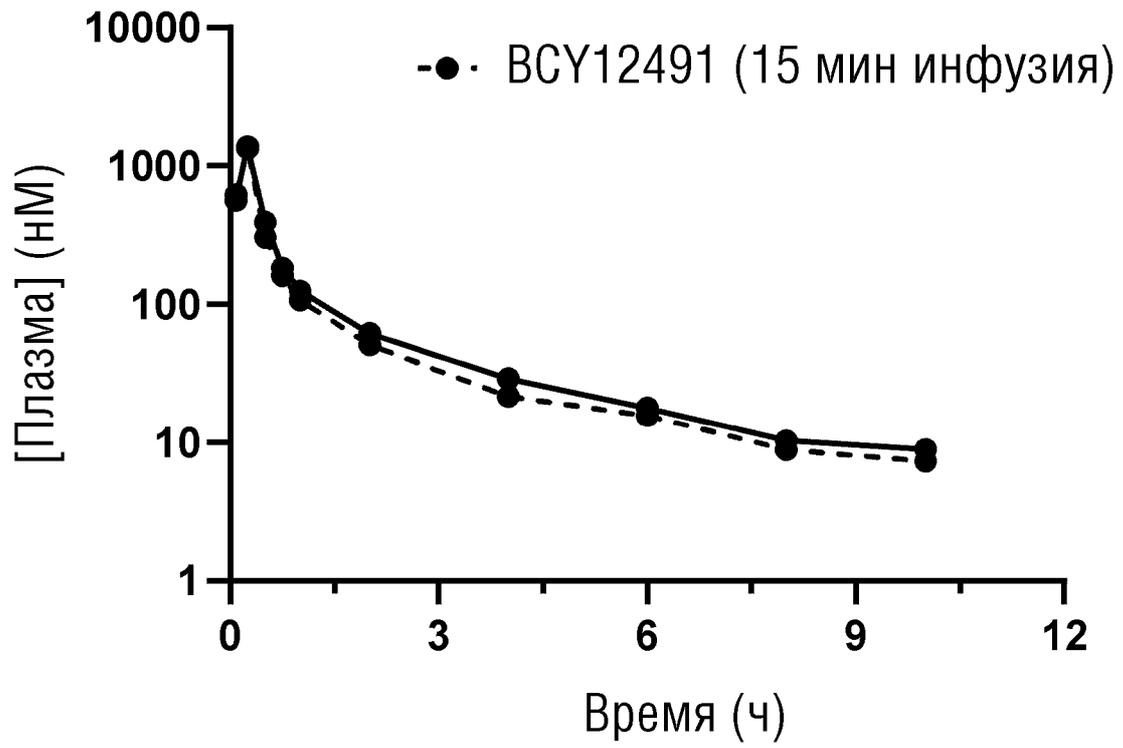


ФИГ.11



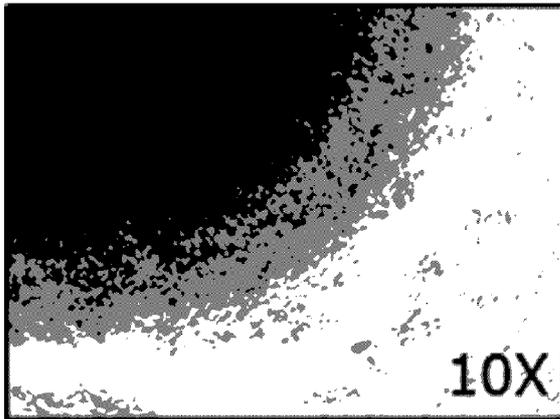
Соединение	Конечный период полувыведения, $T_{1/2}$ (ч)
BCY11863	2.5
BCY12491	2.0

ФИГ.12



ФИГ.13

А

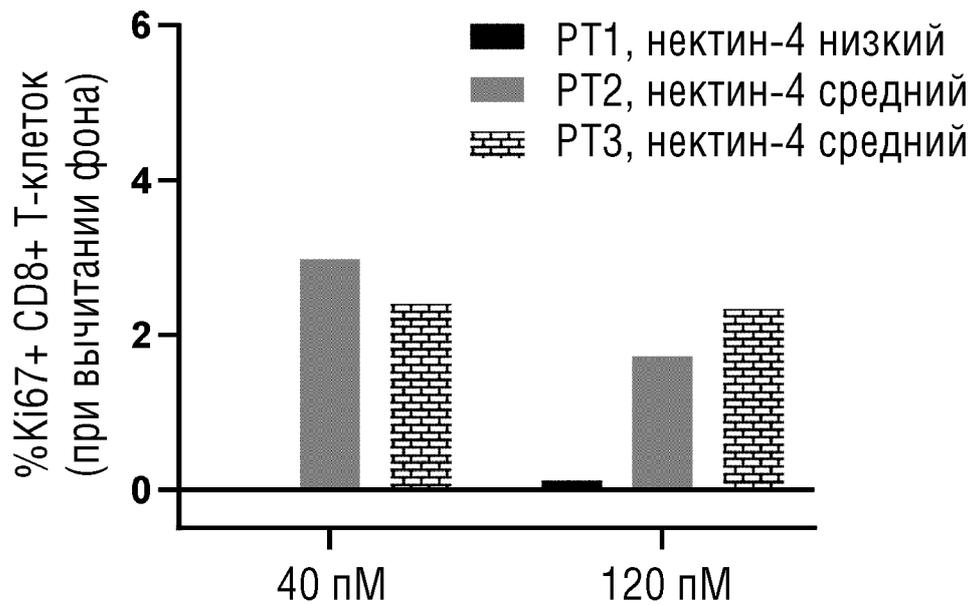


В

	CD137+ Т клетки (%)	Нектин-4+ клетки (%)
PT1	19.8	4.4
PT2	15.1	25.8
PT3	30.0	15.1

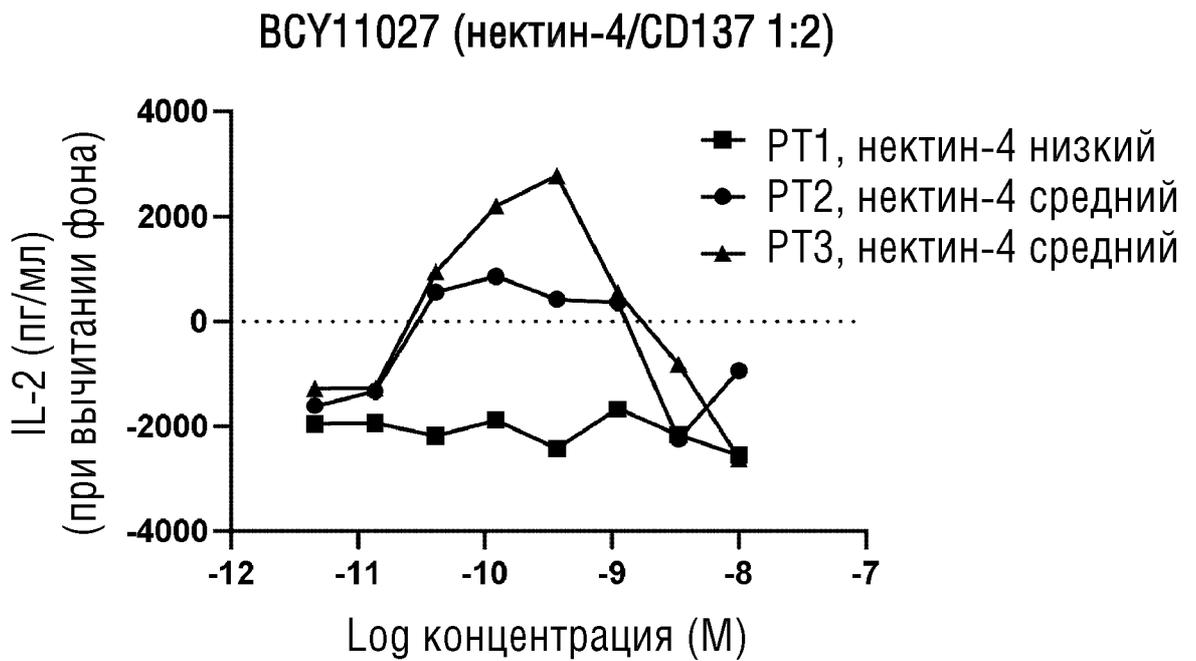
С

BCY11027

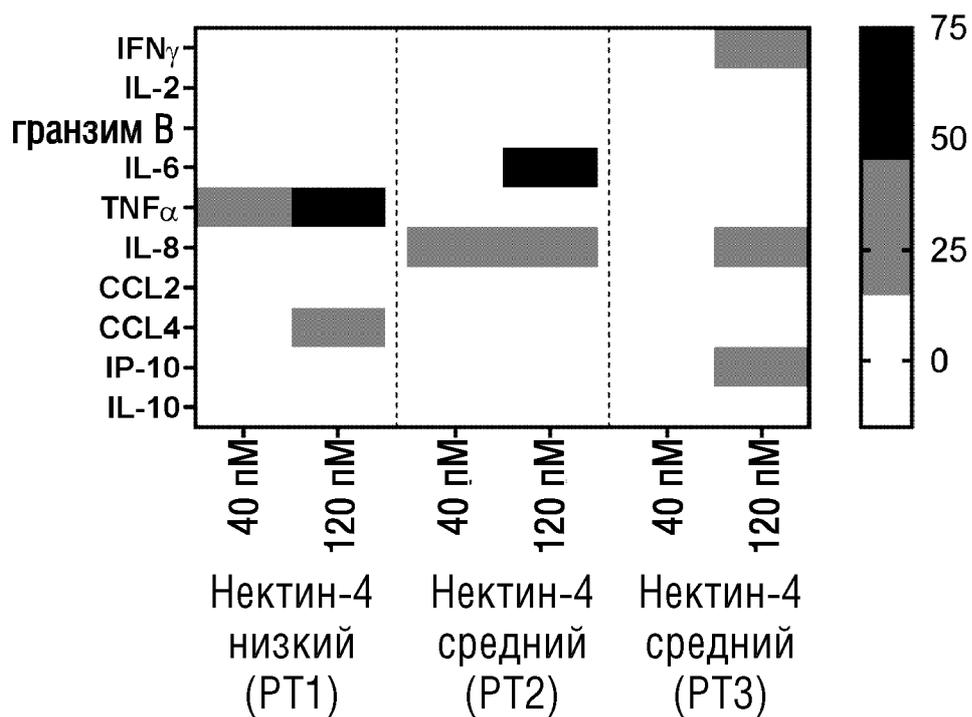


ФИГ.13 (продолжение)

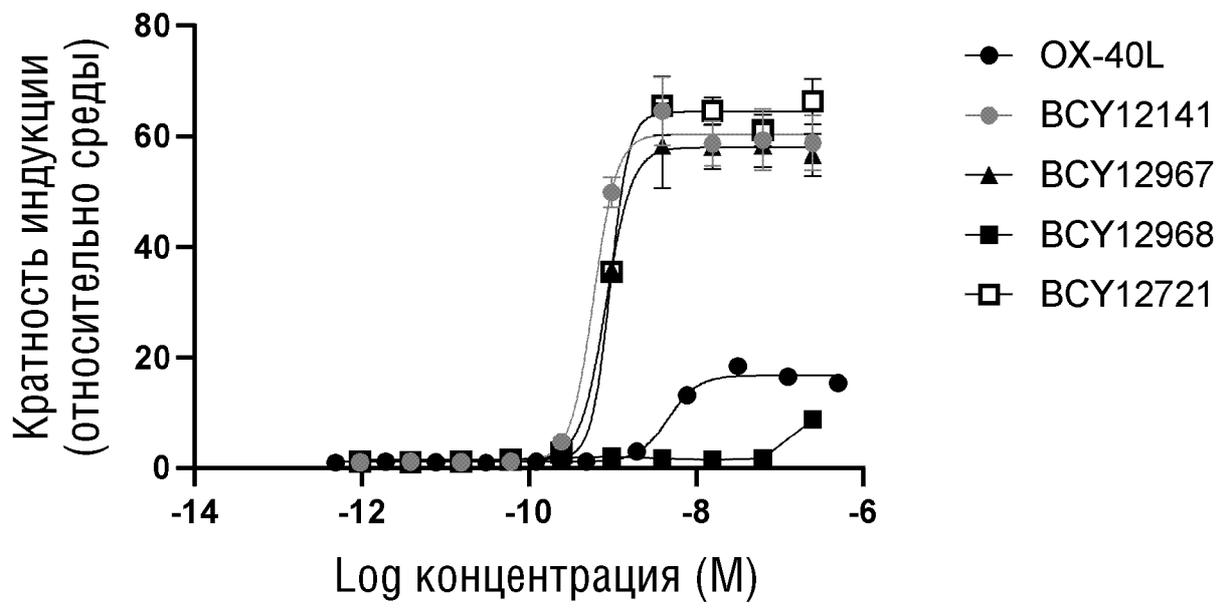
D



E

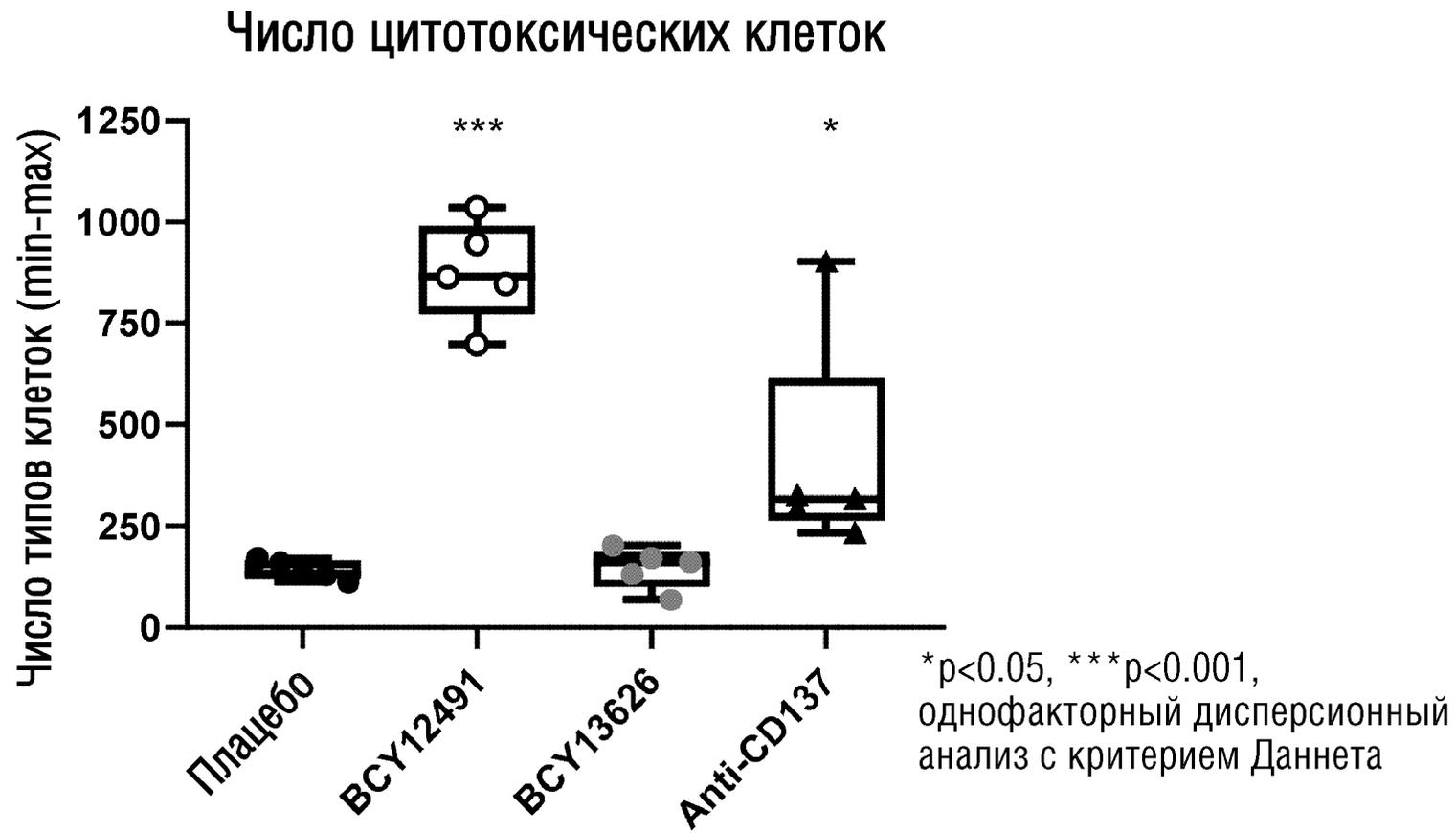


ФИГ.14



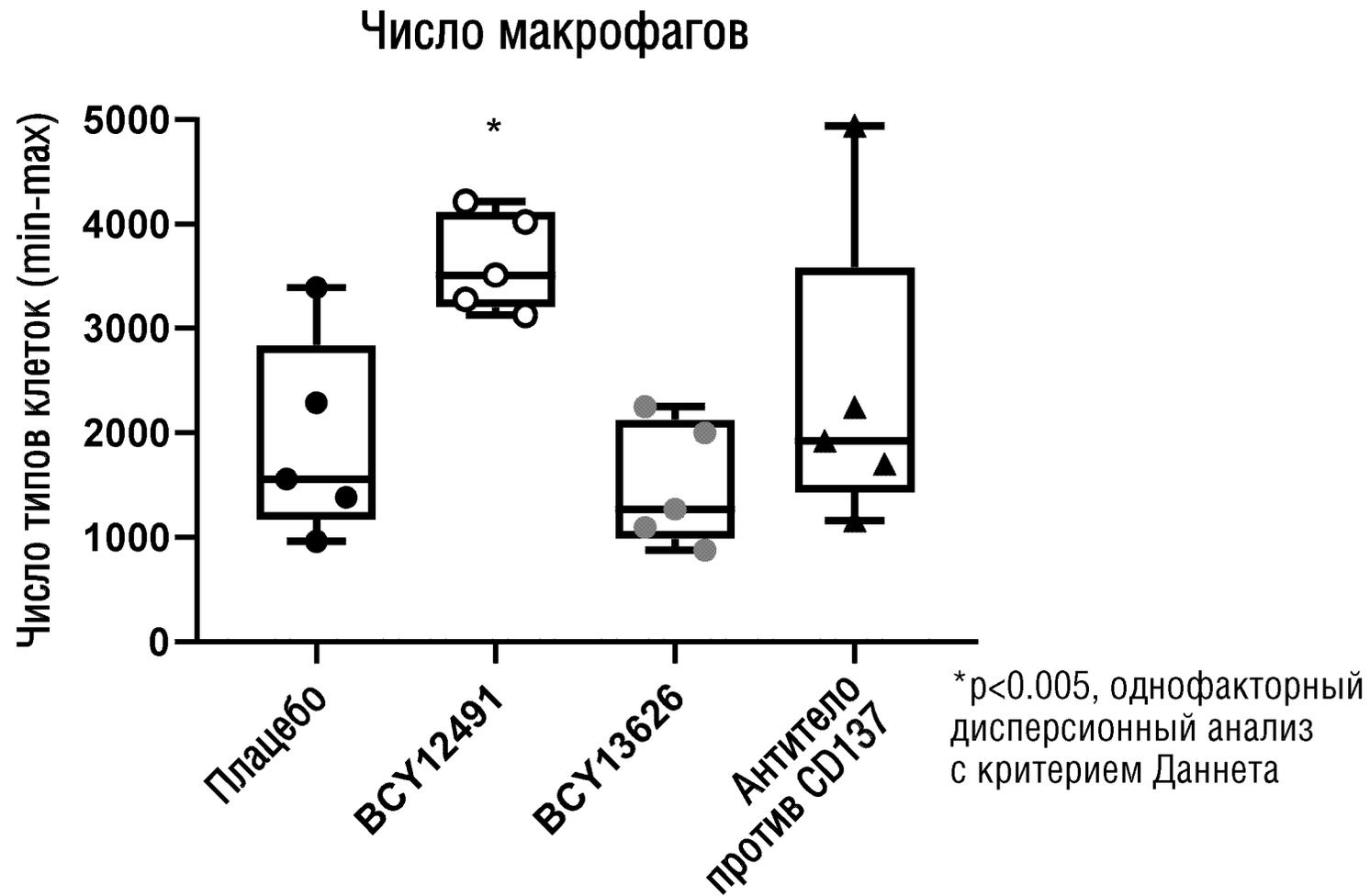
ФИГ.15

A



ФИГ.15 (продолжение)

В



ФИГ.15 (продолжение)

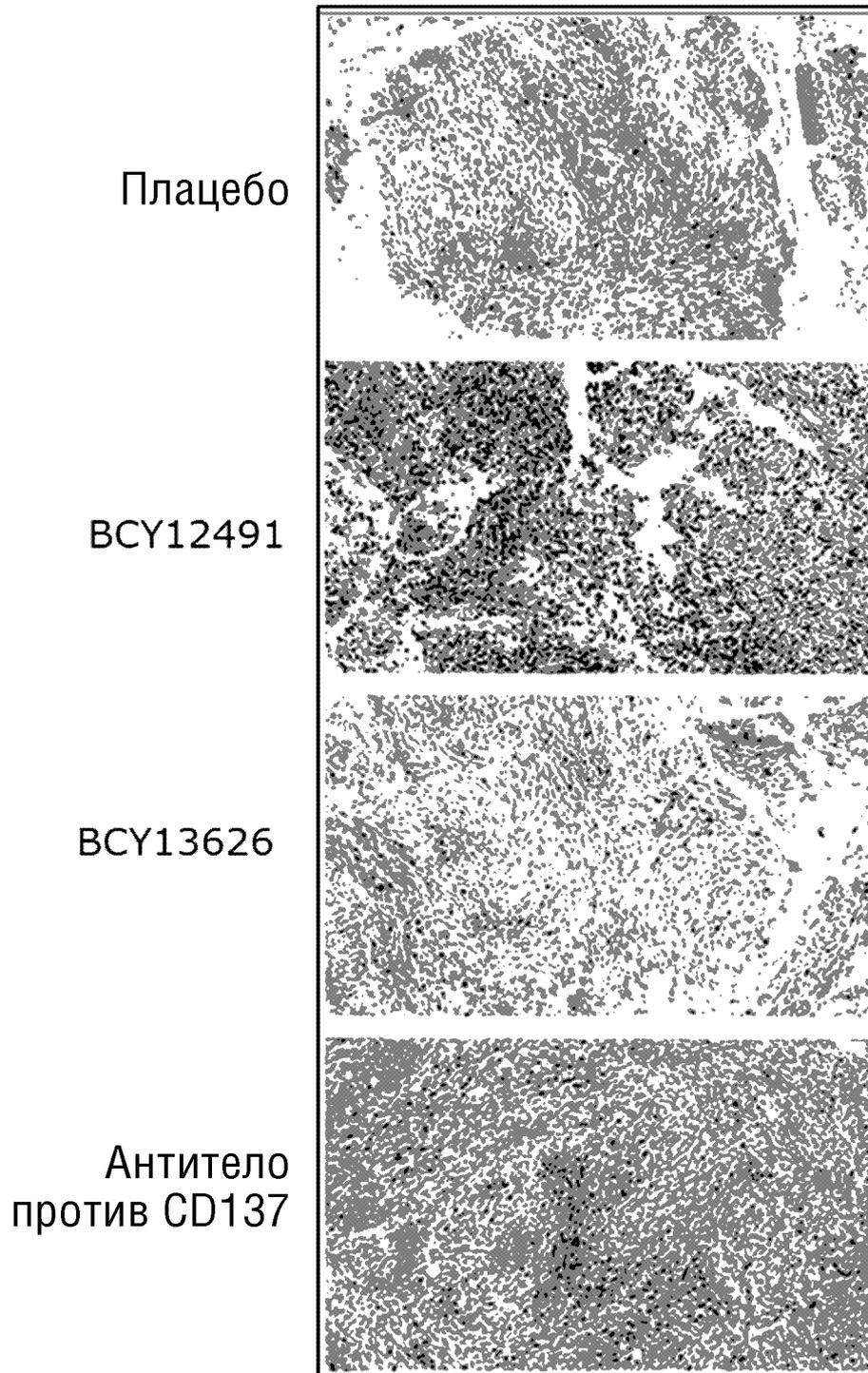
С



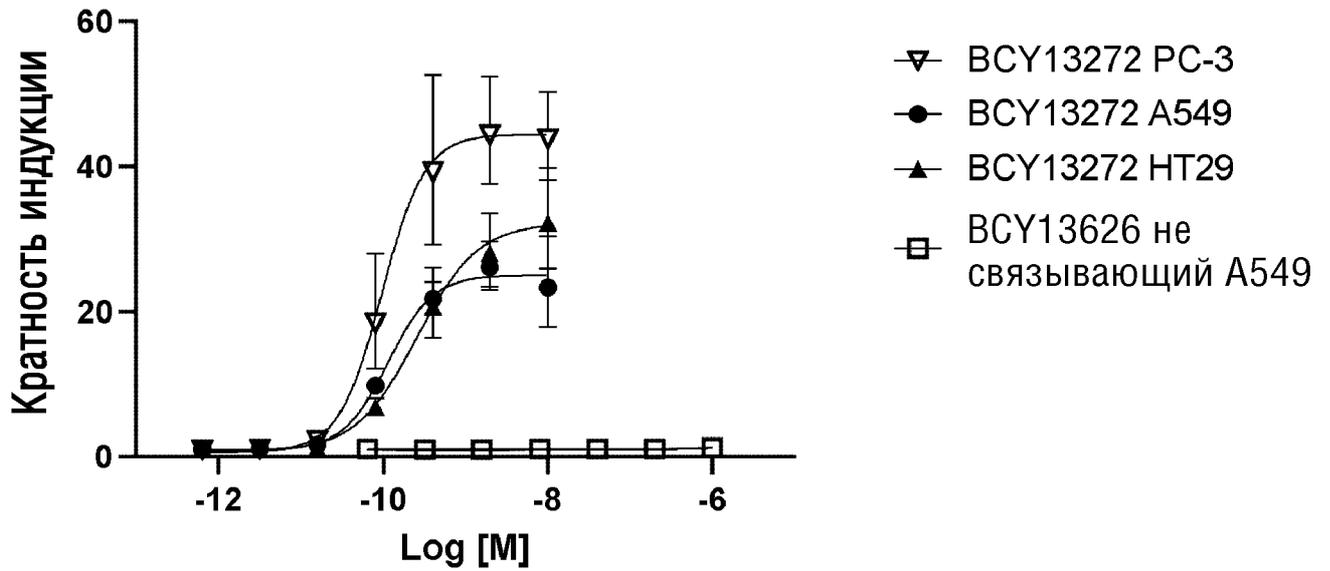
ФИГ.15 (продолжение)

D

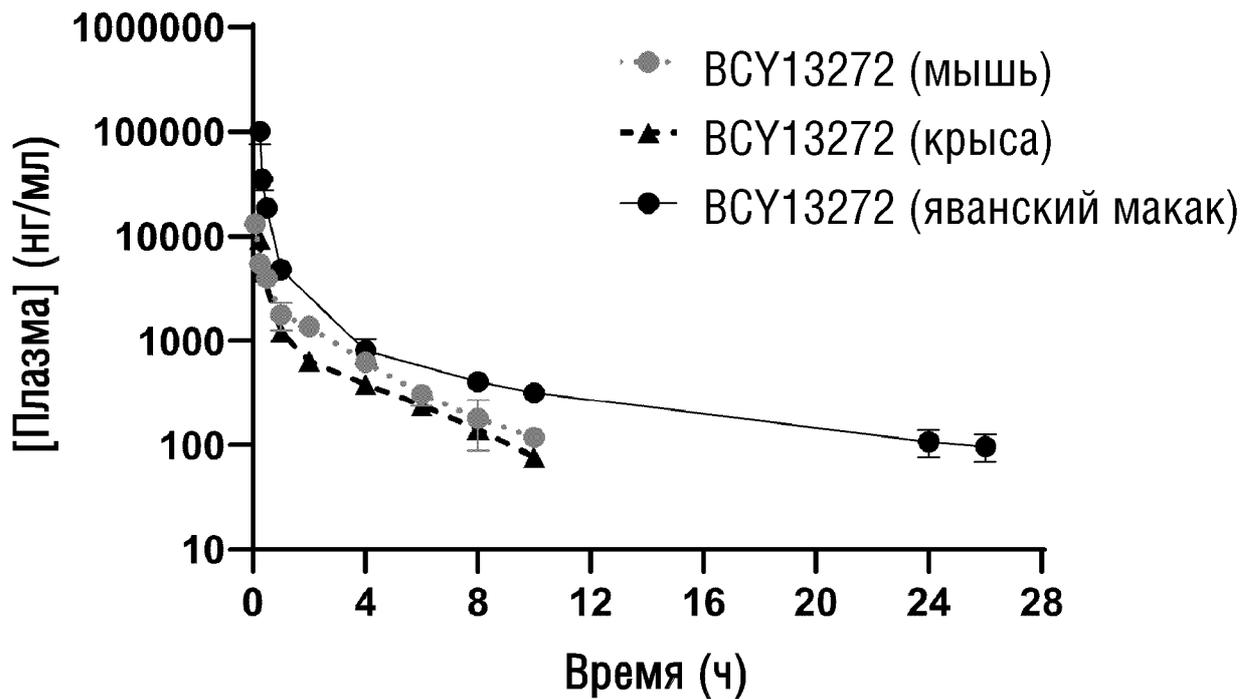
CD8+ клетки (черные) в тканях
опухоли MC38 на день D6



ФИГ.16

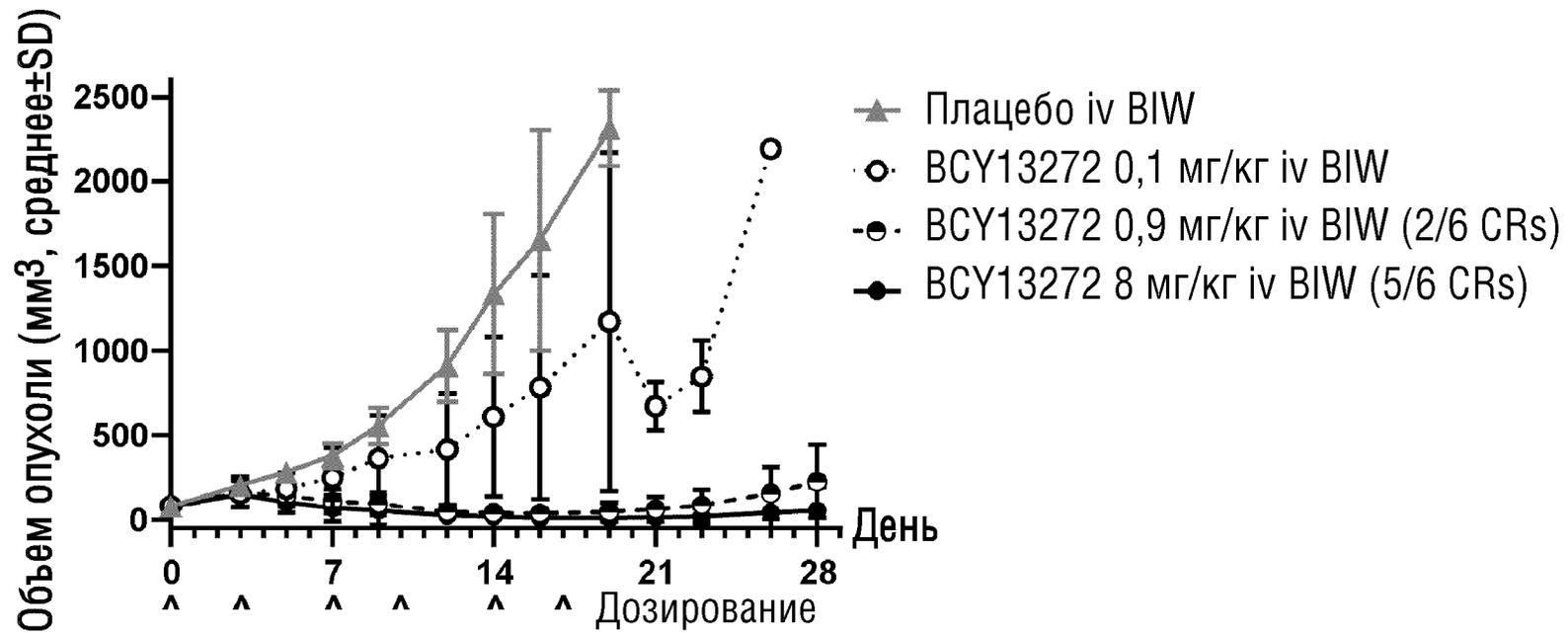


ФИГ.17



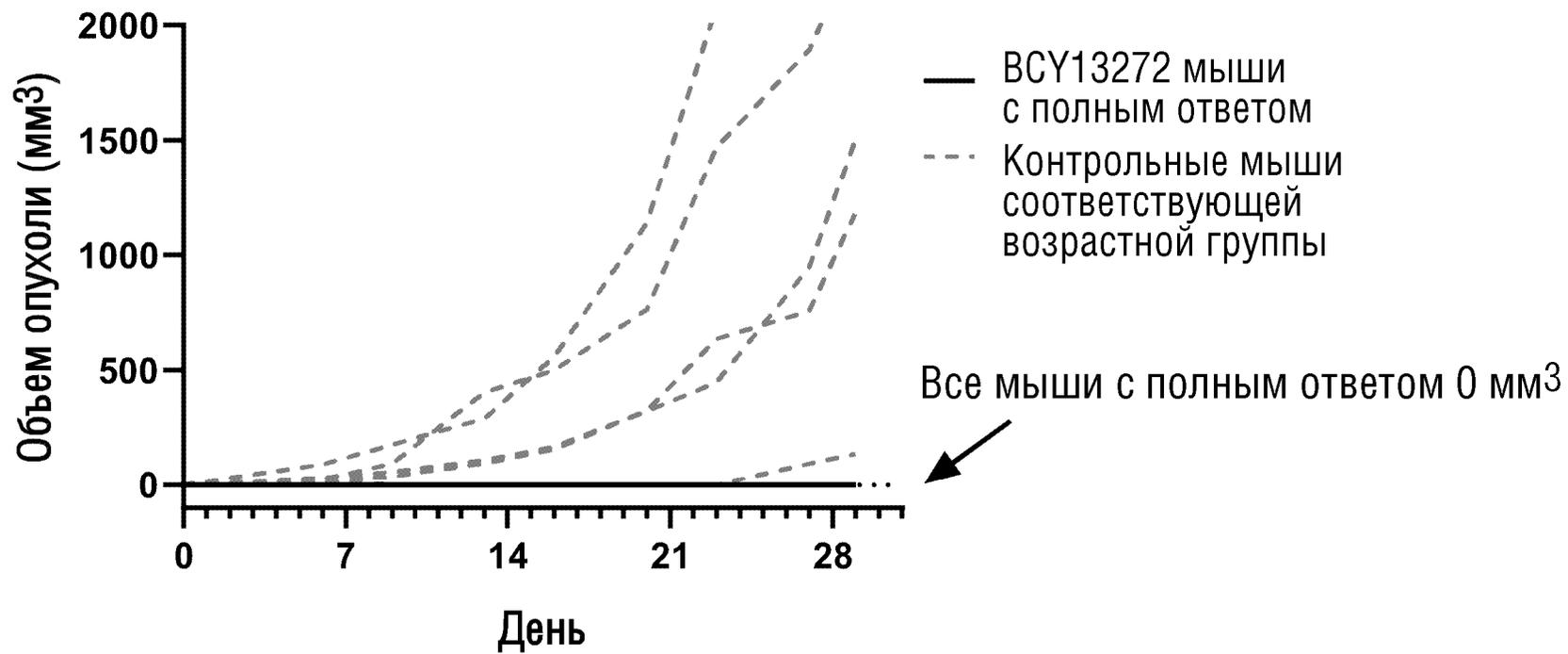
ФИГ.18

A



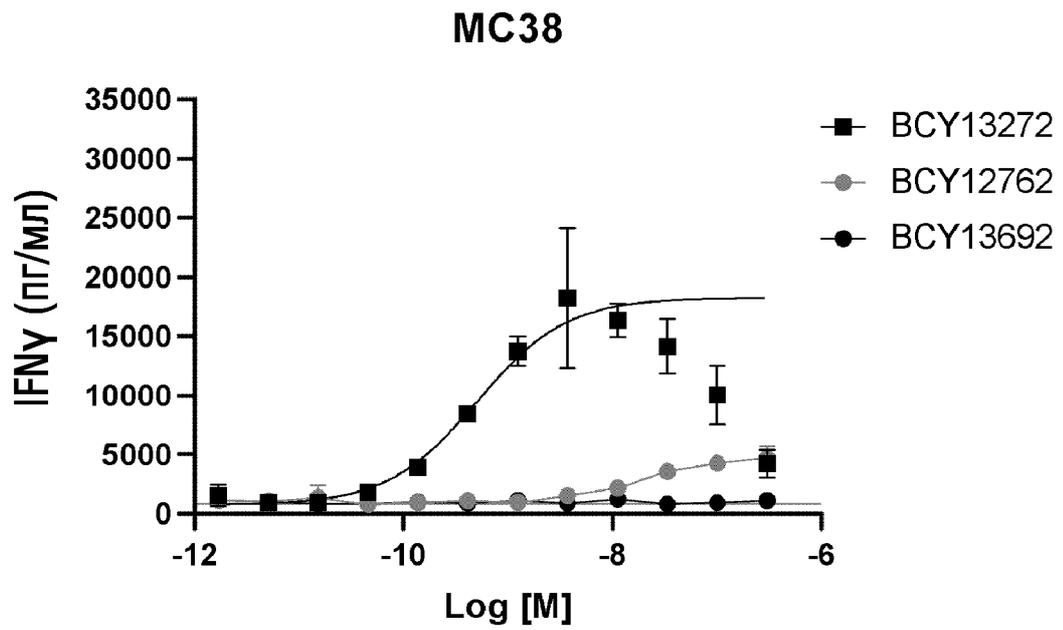
ФИГ.18 (продолжение)

В

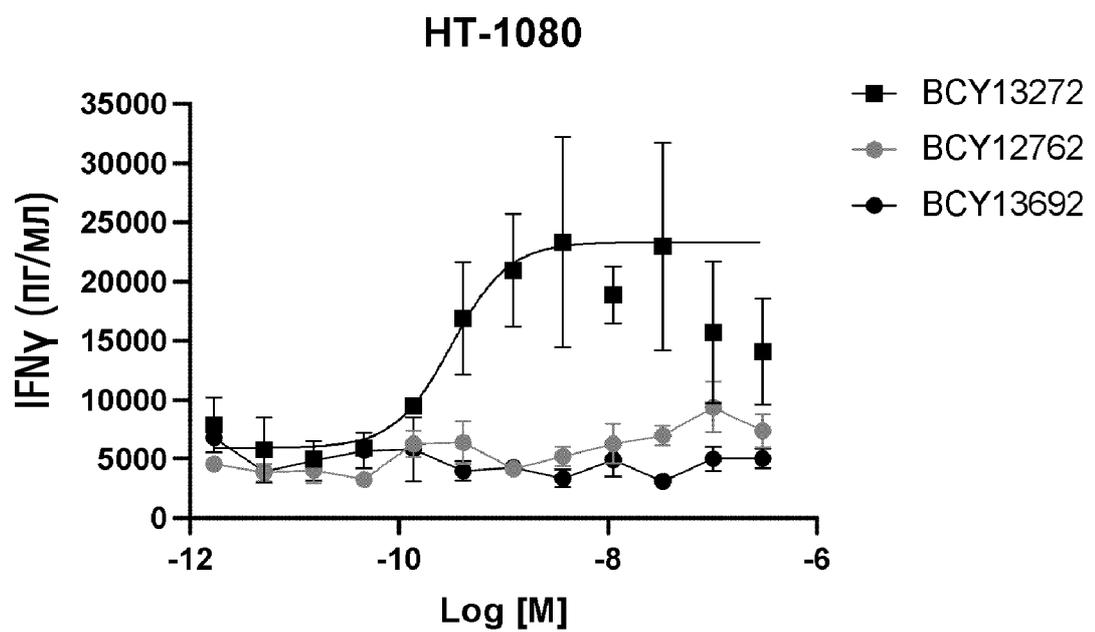


ФИГ.19

A

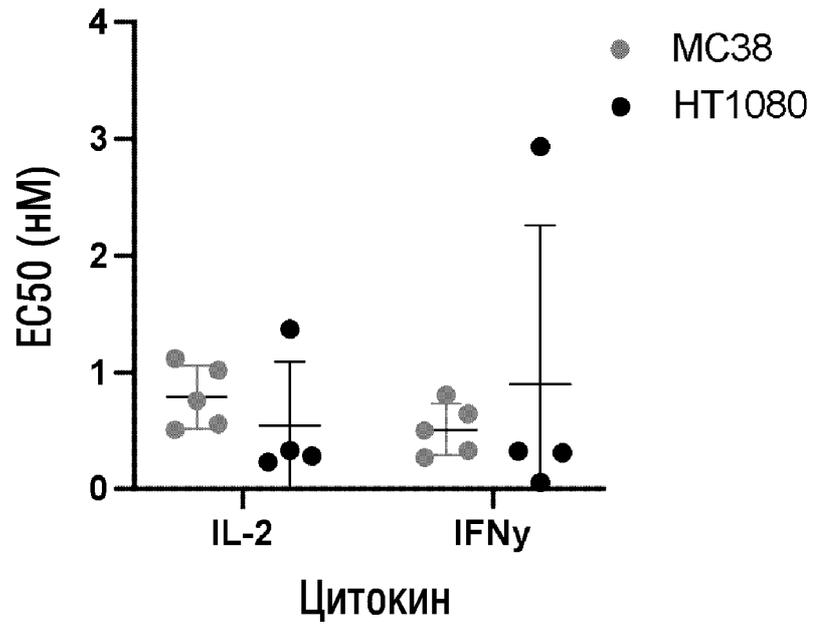


B



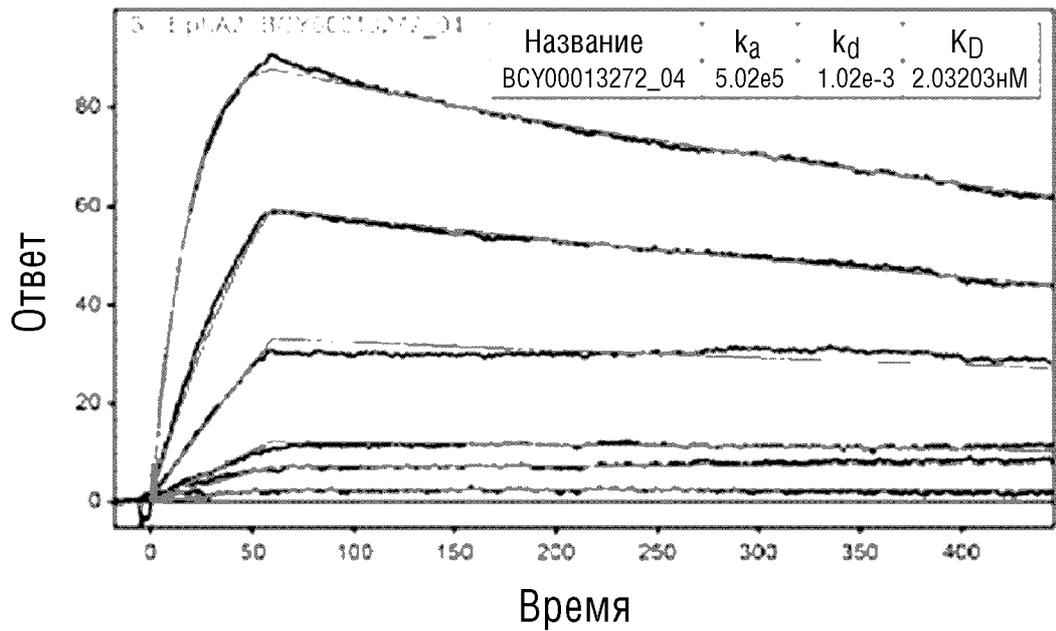
ФИГ.19 (продолжение)

С

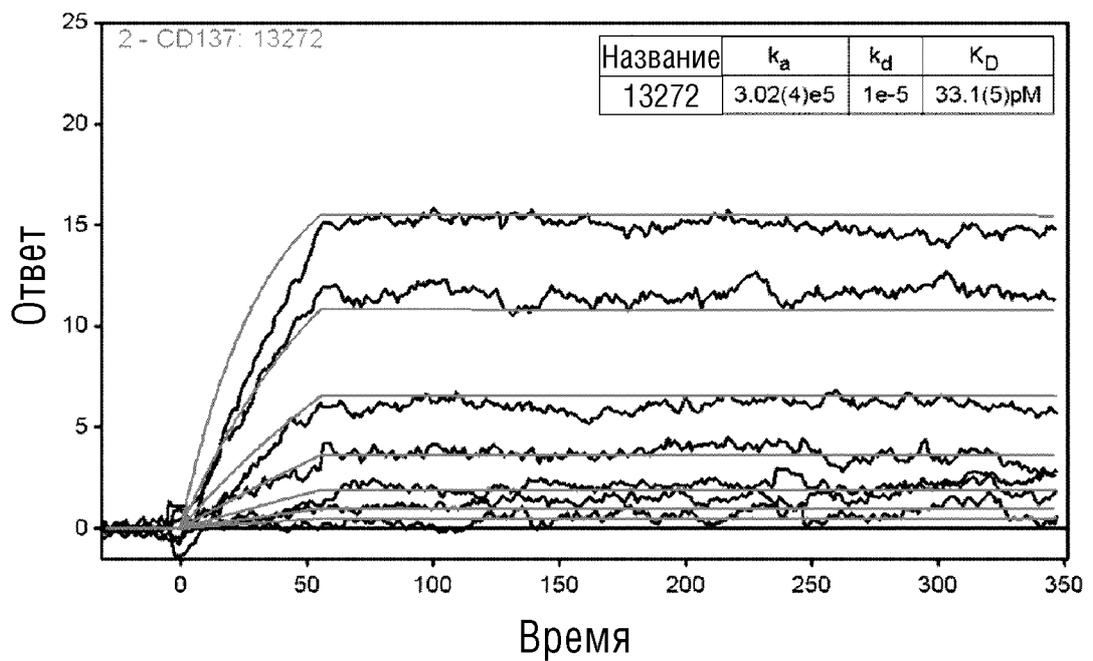


ФИГ.20

А

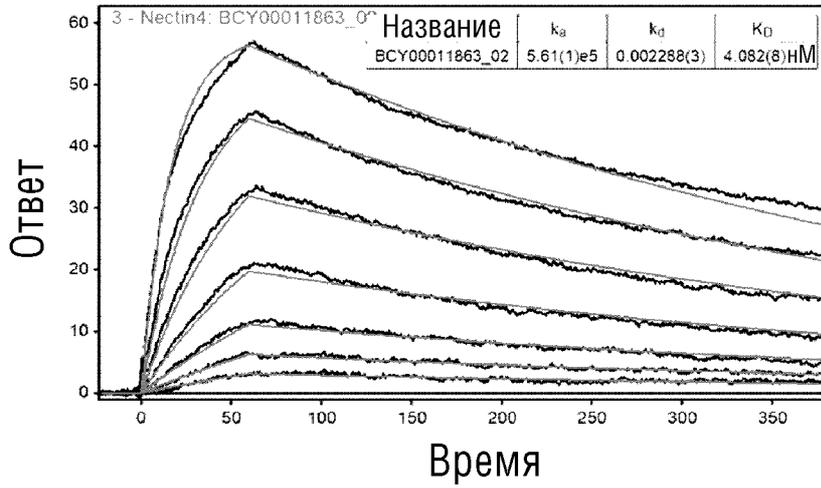


В

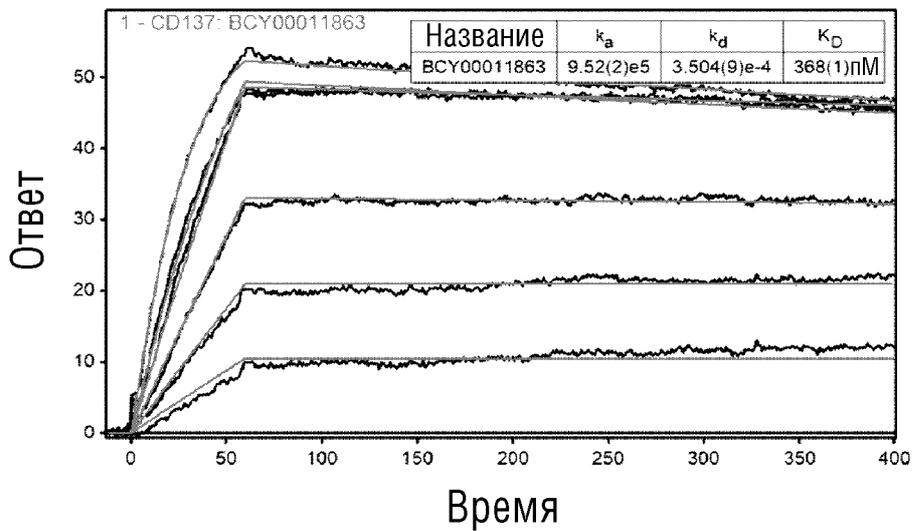


ФИГ.21

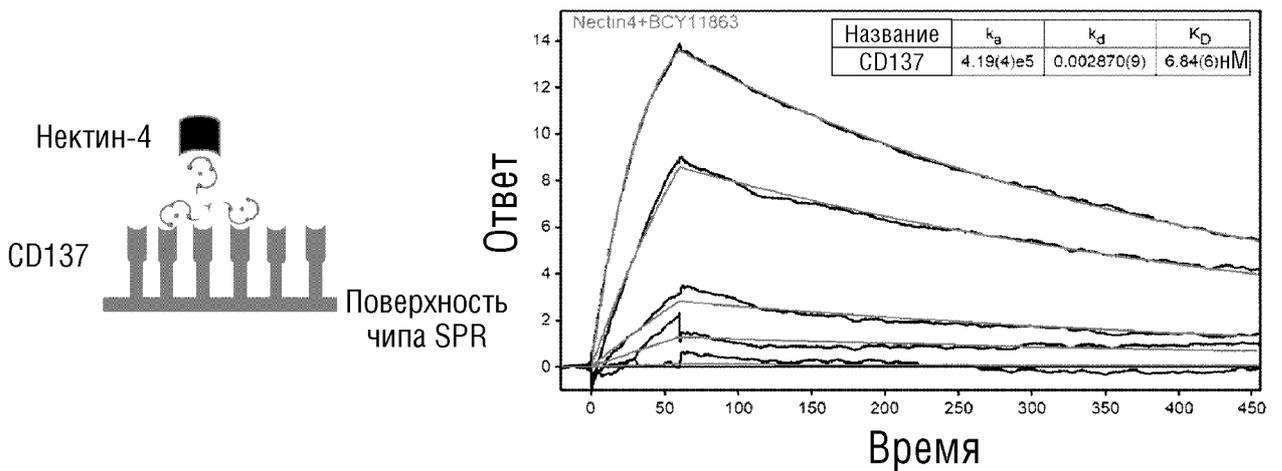
А



В

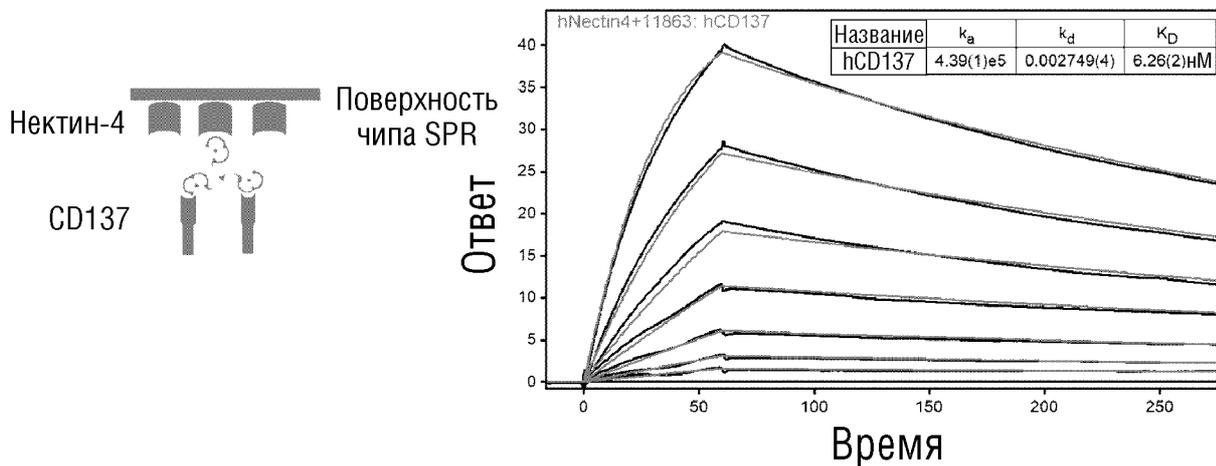


С

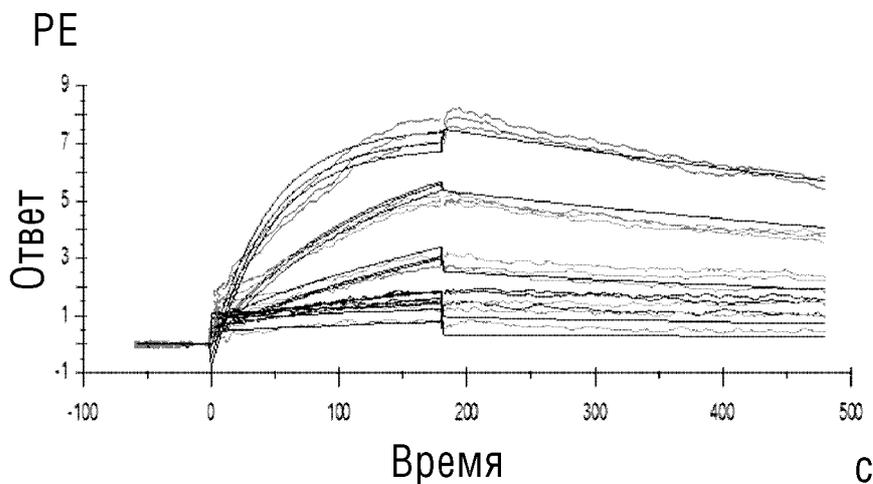


ФИГ.21 (продолжение)

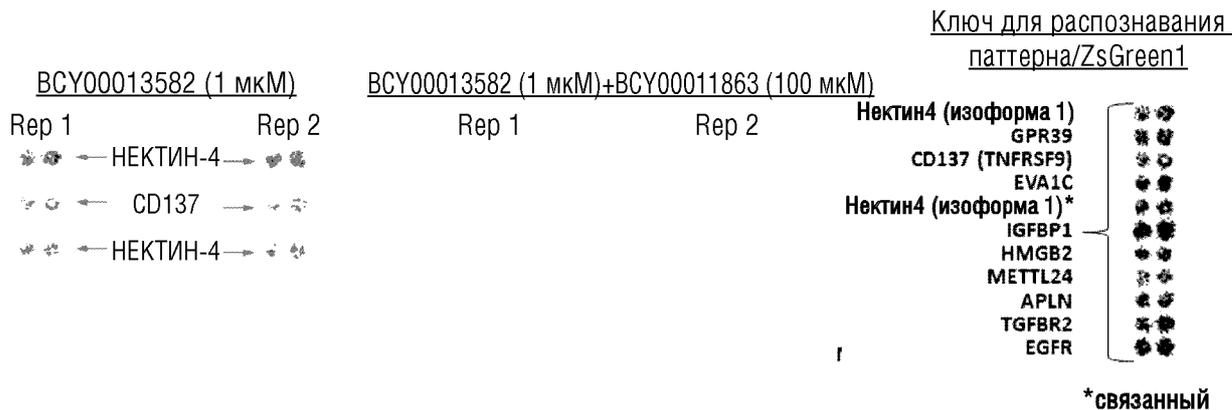
D



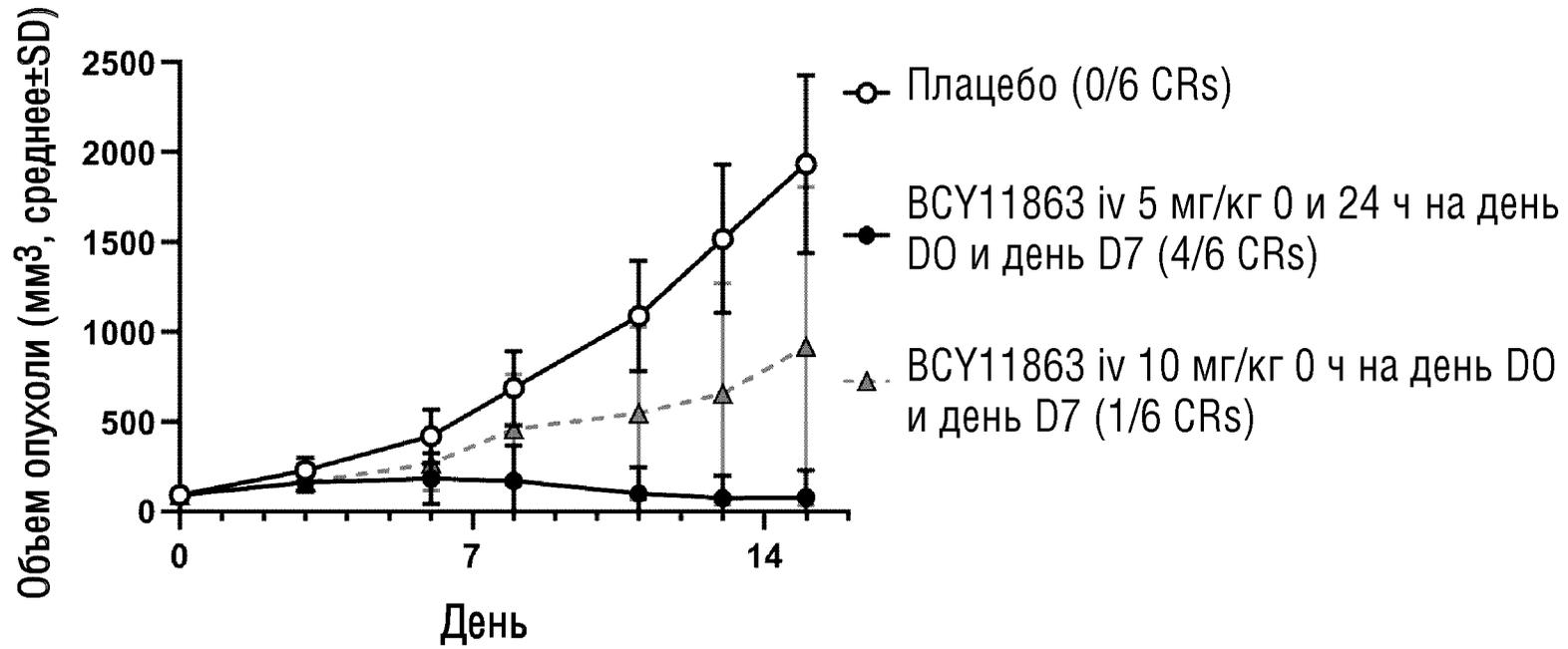
E



ФИГ.22

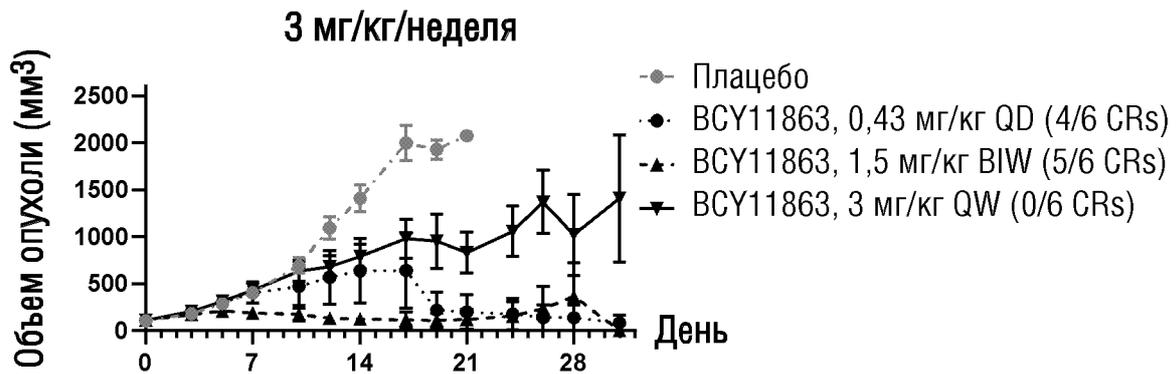


ФИГ.23

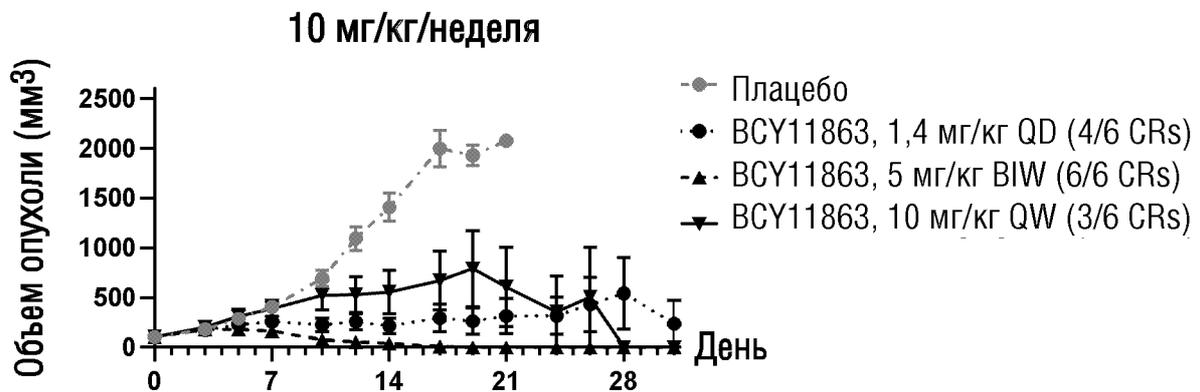


ФИГ.24

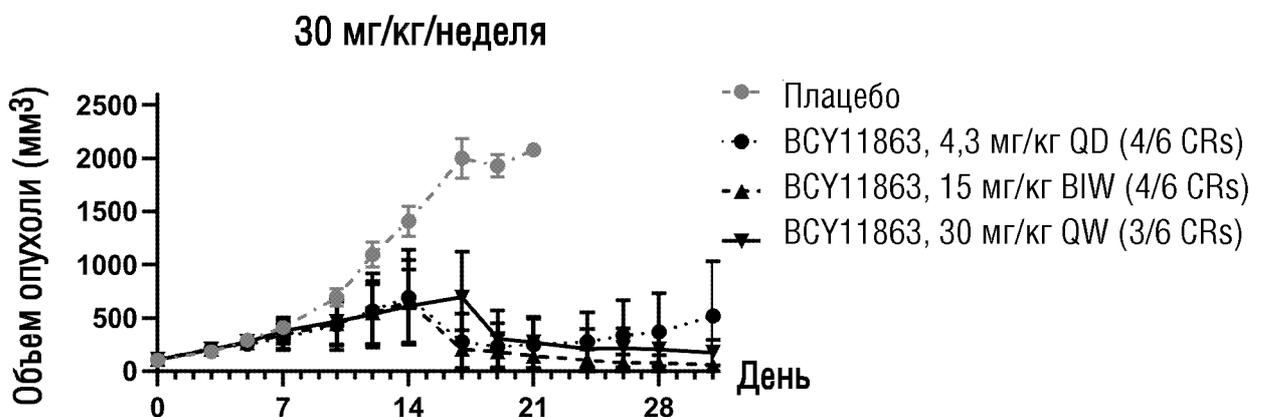
А



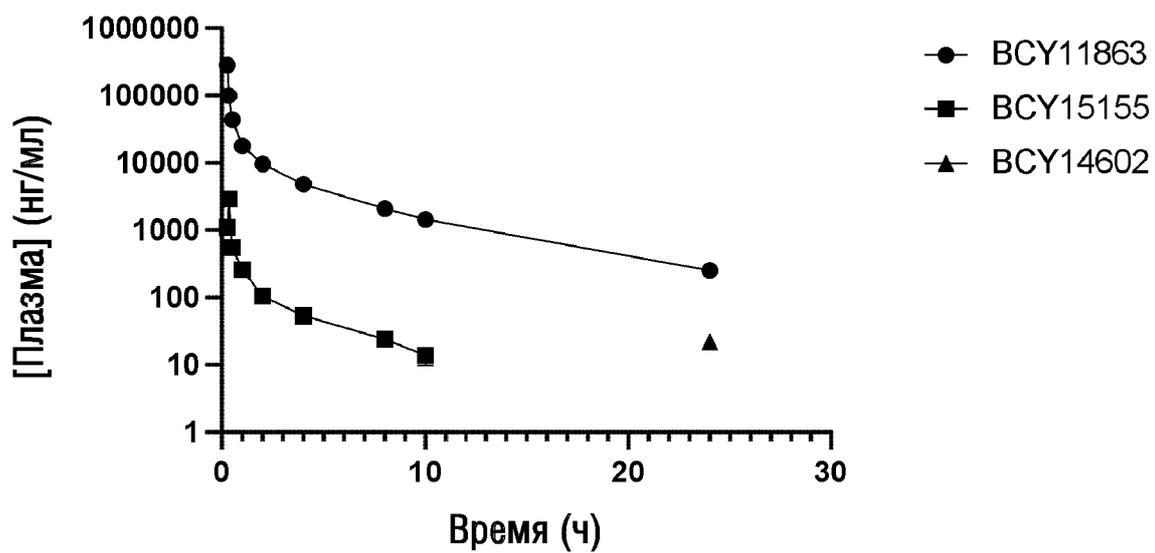
Б



С

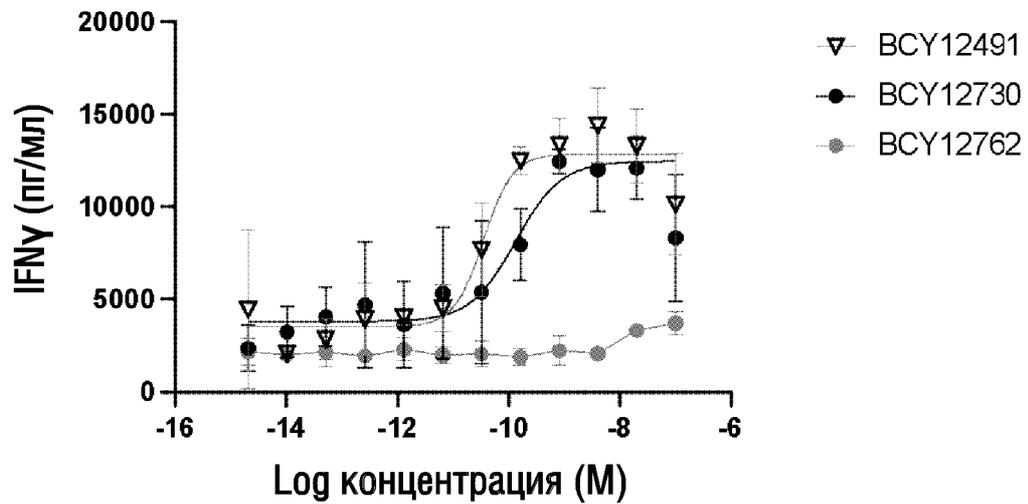


ФИГ.25

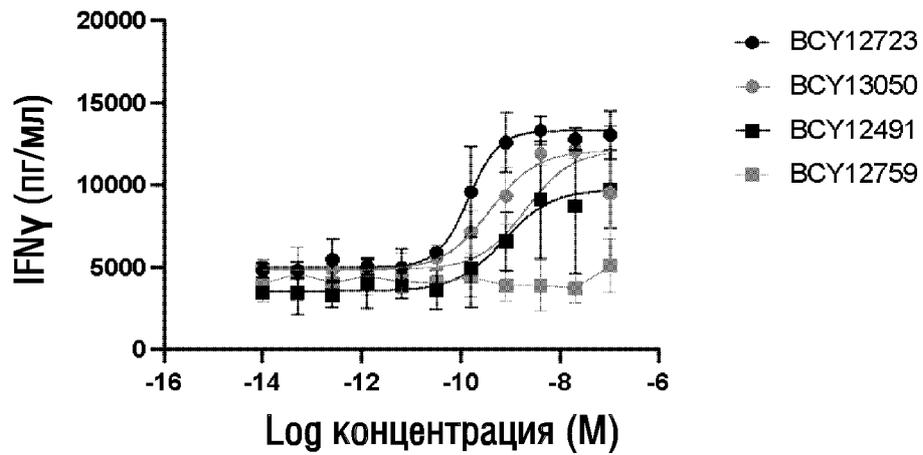


ФИГ.26

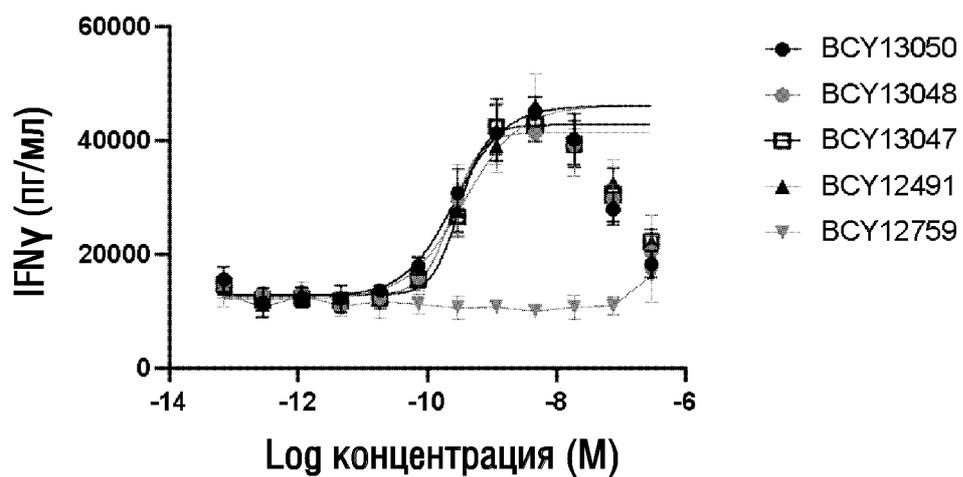
Донор 228769 (48 ч)

A**B**

Донор 228769 (72 ч)

**C**

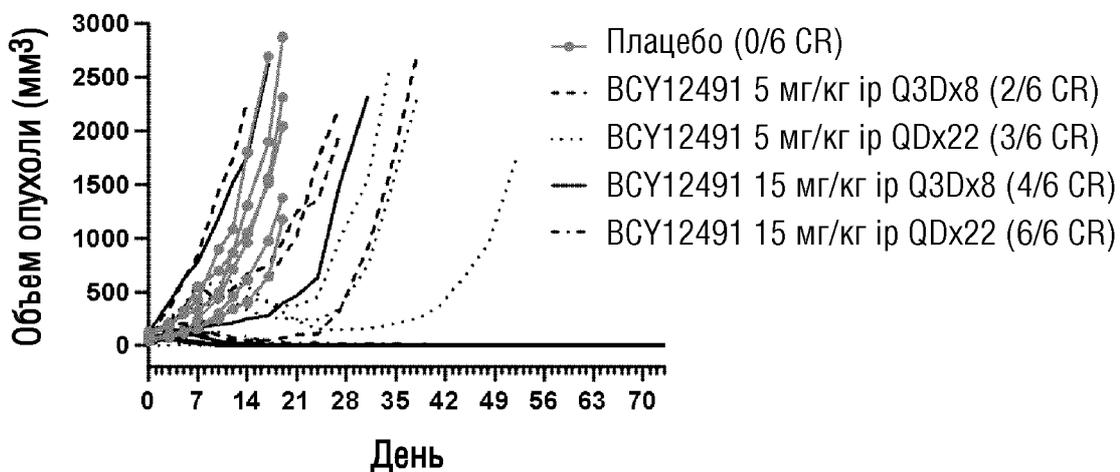
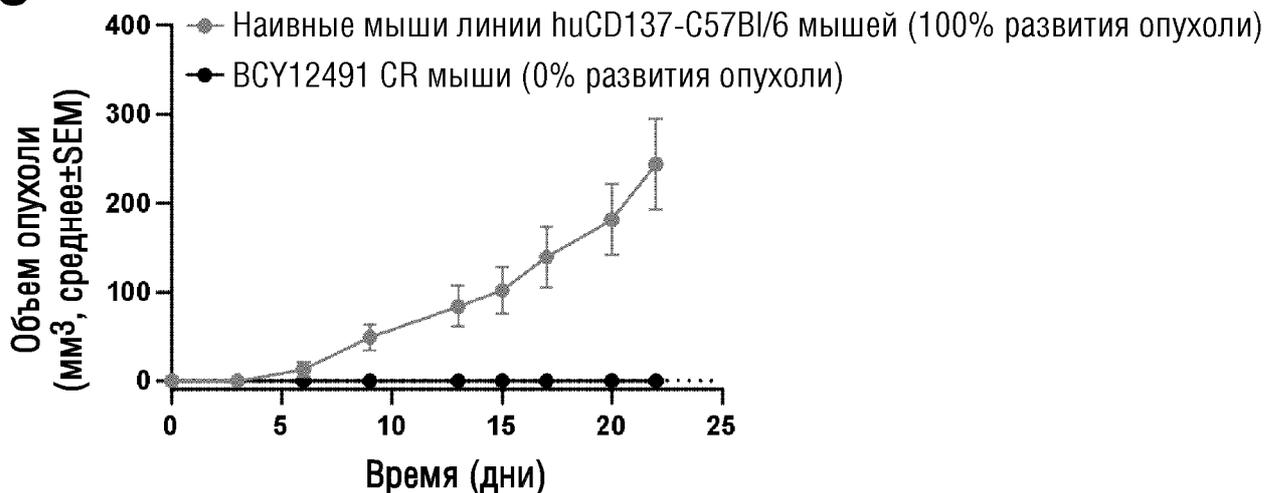
Донор 110032761 (48 ч)



ФИГ.27

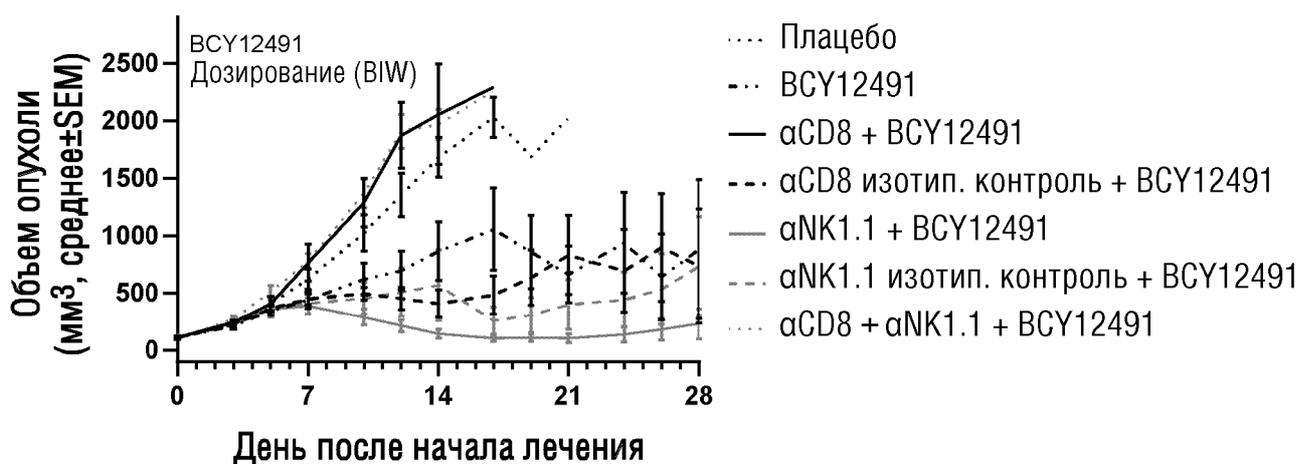
А**В**

Объемы индивидуальных опухолей

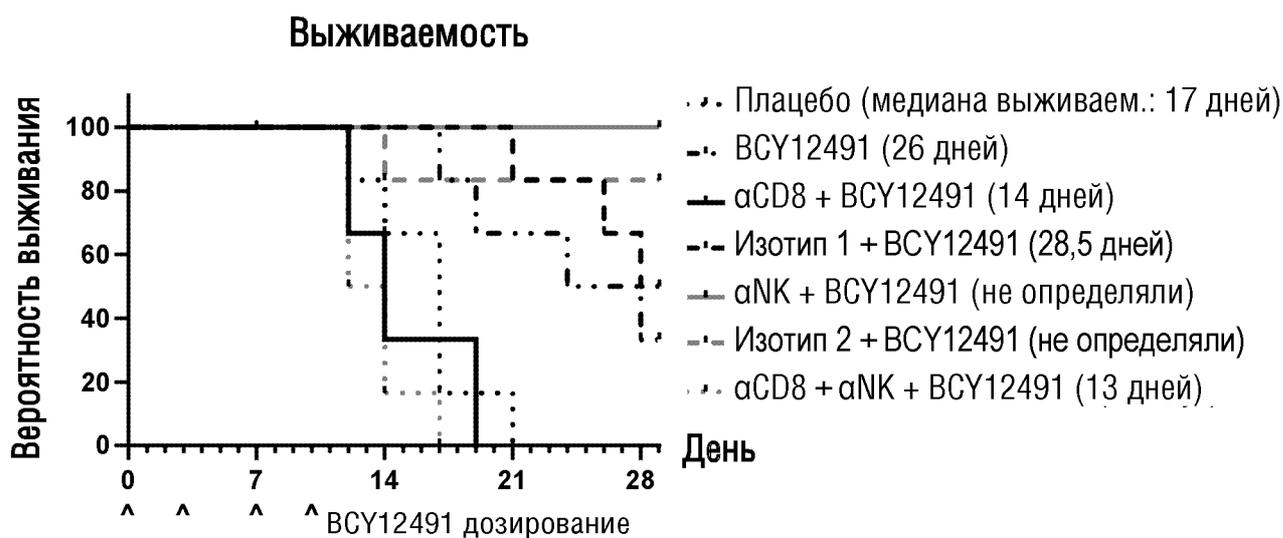
**С**

ФИГ.28

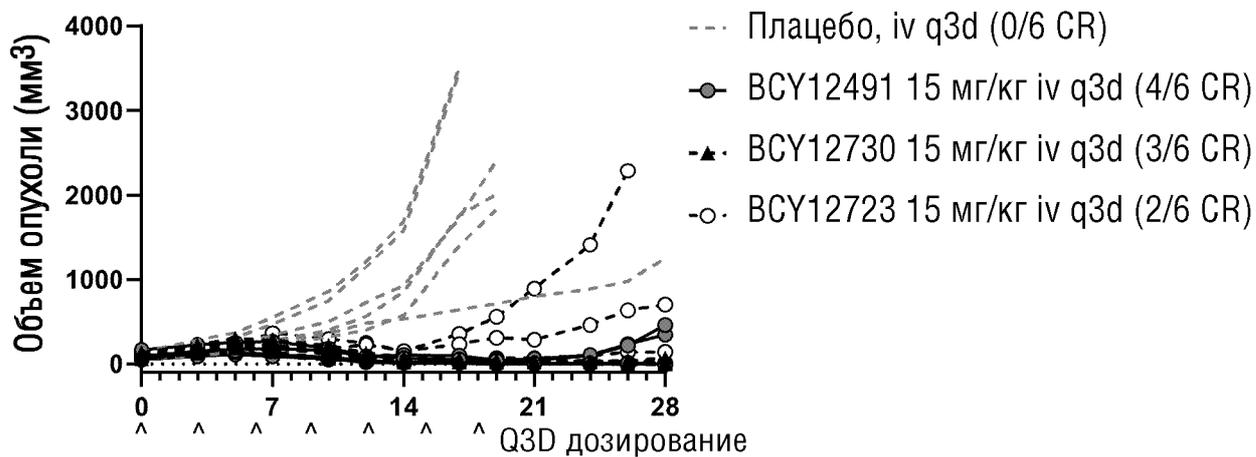
А



В



ФИГ.29



ФИГ.30

