



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113811541 A

(43) 申请公布日 2021. 12. 17

(21) 申请号 202080033959.9

(22) 申请日 2020.05.11

(30) 优先权数据

62/845,473 2019.05.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.11.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2020/051144 2020.05.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/225577 EN 2020.11.12

(71) 申请人 拜斯科技术开发有限公司

地址 英国剑桥

(72) 发明人 N·基恩 K·麦克唐奈

T·L·史蒂芬 L·陈 H·哈里森

P·帕克 M·斯金纳 H·切赫

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 韩文华

(51) Int.Cl.

C07K 7/56 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 47/64 (2017.01)

A61K 47/55 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书10页 说明书39页

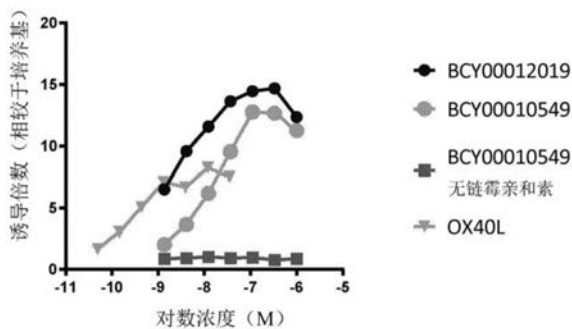
序列表18页 附图2页

(54) 发明名称

OX40特异性的双环肽配体

(57) 摘要

本发明涉及多肽,其与分子支架共价结合,使得在支架的连接点之间对向存在(subtend)两个或更多个肽环。特别地,本发明描述了结合OX40的肽。本发明还涉及是OX40的功能性激动剂的多肽的多聚结合复合物,所述多肽与分子支架共价结合,使得在支架的连接点之间对向存在(subtend)两个或更多个肽环。本发明还包括包含与一个或多个效应子和/或官能团偶联的所述肽和复合物的药物偶联物,包含所述肽配体、复合物和药物偶联物的药物组合物,以及所述肽配体和药物偶联物在预防、抑制或治疗OX40介导的疾病或疾患中的用途。



1. 一种OX40特异性的肽配体,其包含多肽和分子支架,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个反应性基团,并且所述分子支架与所述多肽的反应性基团形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

2. 如权利要求1所定义的肽配体,其中所述反应性基团包含半胱氨酸残基。

3. 如权利要求1或2所定义的肽配体,其中所述环序列包含2、3、4、5、6、7或8个氨基酸。

4. 如权利要求1至3中任一项所定义的肽配体,其中所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含2个氨基酸,第二个包含7个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

C_i DAC $_{ii}$ LYPDYYVC $_{iii}$ (SEQ ID NO:12);

其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐,如:

A- (SEQ ID NO:12) -A (在本文中称为BCY10375)。

5. 如权利要求11至3中任一项所定义的肽配体,其中所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含3个氨基酸,第二个包含7个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

C_i ILWC $_{ii}$ LPEPHDEC $_{iii}$ (SEQ ID NO:1); 或

C_i RLWC $_{ii}$ IPAPTDDC $_{iii}$ (SEQ ID NO:13);

C_i TMWC $_{ii}$ IPAKGDC $_{iii}$ (SEQ ID NO:14);

C_i MLWC $_{ii}$ LPAPTDEC $_{iii}$ (SEQ ID NO:15);

C_i ILWC $_{ii}$ LPEPPDEC $_{iii}$ (SEQ ID NO:16);

C_i LLWC $_{ii}$ IPNPDDNC $_{iii}$ (SEQ ID NO:17);

C_i WLWC $_{ii}$ VPNPDDTC $_{iii}$ (SEQ ID NO:18);

C_i VLWC $_{ii}$ TPYPGDDC $_{iii}$ (SEQ ID NO:19);

C_i ALWC $_{ii}$ IPDPQDEC $_{iii}$ (SEQ ID NO:20);

C_i TLWC $_{ii}$ IPDASDSC $_{iii}$ (SEQ ID NO:21);

C_i QLWC $_{ii}$ IPDADDDC $_{iii}$ (SEQ ID NO:22);

C_i QLWC $_{ii}$ VPEPGDSC $_{iii}$ (SEQ ID NO:23);

C_i ALWC $_{ii}$ IPEESDDC $_{iii}$ (SEQ ID NO:24);

C_i VLWC $_{ii}$ IPEPQDKC $_{iii}$ (SEQ ID NO:25);

C_i TLWC $_{ii}$ IPDPDDSC $_{iii}$ (SEQ ID NO:26);

C_i RLWC $_{ii}$ VPKAEDYC $_{iii}$ (SEQ ID NO:27);

C_i TKPC $_{ii}$ IAYYNQSC $_{iii}$ (SEQ ID NO:28);

C_i MNPC $_{ii}$ IAYYQDEC $_{iii}$ (SEQ ID NO:29);

C_i TNAC $_{ii}$ VAYYHQAC $_{iii}$ (SEQ ID NO:30); 和

C_i SDPC $_{ii}$ ISYYNQAC $_{iii}$ (SEQ ID NO:31);

其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐,如:

A- (SEQ ID NO:1) -A-[Sar6]-[Kbiot] (在本文中称为BCY10551);

A- (SEQ ID NO:1) -A (在本文中称为BCY10371);

A- (SEQ ID NO:13) -A (在本文中称为BCY10364) ;
 A- (SEQ ID NO:14) -A (在本文中称为BCY10365) ;
 A- (SEQ ID NO:15) -A (在本文中称为BCY10366) ;
 A- (SEQ ID NO:16) -A (在本文中称为BCY10367) ;
 A- (SEQ ID NO:17) -A (在本文中称为BCY10368) ;
 A- (SEQ ID NO:18) -A (在本文中称为BCY10369) ;
 A- (SEQ ID NO:19) -A (在本文中称为BCY10374) ;
 A- (SEQ ID NO:20) -A (在本文中称为BCY10376) ;
 A- (SEQ ID NO:21) -A (在本文中称为BCY10737) ;
 A- (SEQ ID NO:22) -A (在本文中称为BCY10738) ;
 A- (SEQ ID NO:23) -A (在本文中称为BCY10739) ;
 A- (SEQ ID NO:24) -A (在本文中称为BCY10740) ;
 A- (SEQ ID NO:25) -A (在本文中称为BCY10741) ;
 A- (SEQ ID NO:26) -A (在本文中称为BCY10742) ;
 A- (SEQ ID NO:27) -A (在本文中称为BCY10380) ;
 A- (SEQ ID NO:28) -A (在本文中称为BCY10370) ;
 A- (SEQ ID NO:29) -A (在本文中称为BCY10372) ;
 A- (SEQ ID NO:30) -A (在本文中称为BCY10373) ;和
 A- (SEQ ID NO:31) -A (在本文中称为BCY10379) ;

如:

A- (SEQ ID NO:1) -A- [Sar6] - [KBiot] (在本文中称为BCY10551) 。

6. 如权利要求1至3中任一项所定义的肽配体,其中所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含3个氨基酸,第二个包含8个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

$C_i A^K / S^N / E C_{ii} DPFWYQFYC_{iii}$ (SEQ ID NO:2), 如
 $C_i AKNC_{ii} DPFWYQFYC_{iii}$ (SEQ ID NO:3) 和 $C_i ASEC_{ii} DPFWYQFYC_{iii}$ (SEQ ID NO:4) ;
 $C_i DPPC_{ii} DPFWYAFYC_{iii}$ (SEQ ID NO:32) ; 和
 $C_i PDDC_{ii} DPFWYNFYC_{iii}$ (SEQ ID NO:33) ;

其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐,如:

A- (SEQ ID NO:3) -A- [Sar6] - [KBiot] (在本文中称为BCY10552) ;
 [Biot] -G- [Sar5] -A- (SEQ ID NO:3) -A (在本文中称为BCY10479) ;
 A- (SEQ ID NO:3) -A (在本文中称为BCY10378) ;
 [Biot] -G- [Sar5] -A- (SEQ ID NO:4) -A (在本文中称为BCY11371) ;
 A- (SEQ ID NO:4) -A (在本文中称为BCY10743) ,
 A- (SEQ ID NO:32) -A (在本文中称为BCY10377) ; 和
 A- (SEQ ID NO:33) -A (在本文中称为BCY10744) ,特别是:
 A- (SEQ ID NO:3) -A- [Sar6] - [KBiot] (在本文中称为BCY10552) ;
 [Biot] -G- [Sar5] -A- (SEQ ID NO:3) -A (在本文中称为BCY10479) ; 和

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO:4)-A(在本文中称为BCY11371)。

7.如权利要求1至3中任一项所定义的肽配体,其中所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含4个氨基酸,第二个包含5个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

C_i RYS P_{ii} C $_{iii}$ YHPHNC $_{iii}$ (SEQ ID NO:34);

其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐,如:

A-(SEQ ID NO:34)-A(在本文中称为BCY10343)。

8.如权利要求1至3中任一项所定义的肽配体,其中所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含4个氨基酸,第二个包含6个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

C_i^L/N YSPC $_{ii}$ WHPLN $^D/K$ C $_{iii}$ (SEQ ID NO:5),如

C_i LYSPC $_{ii}$ WHPLNDC $_{iii}$ (SEQ ID NO:6)和 C_i NYSPC $_{ii}$ WHPLNKC $_{iii}$ (SEQ ID NO:7);

C_i LYSPC $_{ii}$ NHPLNSC $_{iii}$ (SEQ ID NO:35);

C_i EDNYC $_{ii}$ FMWTPYC $_{iii}$ (SEQ ID NO:36);

C_i LDSPC $_{ii}$ WHPLNDC $_{iii}$ (SEQ ID NO:37);

C_i RFSPC $_{ii}$ SHPLNQC $_{iii}$ (SEQ ID NO:38);

C_i KYSPC $_{ii}$ WHPLNLC $_{iii}$ (SEQ ID NO:39);和

C_i RYS P_{ii} C $_{iii}$ WHPLNNC $_{iii}$ (SEQ ID NO:40);

其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐,如:

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO:6)-A(在本文中称为BCY10482);

A-(SEQ ID NO:6)-A-[Sar6]-[KBiot](在本文中称为BCY10549);

A-(SEQ ID NO:6)-A-K(Pyra)(在本文中称为BCY11607);

Ac-A-(SEQ ID NO:6)-A-K(Pyra)(在下文中称为BCY12708);

A-(SEQ ID NO:6)-A(在本文中称为BCY10351);

A-(SEQ ID NO:7)-A-[Sar6]-[KBiot](在本文中称为BCY11501);和

A-(SEQ ID NO:7)-A(在本文中称为BCY10729),如:

[Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO:6)-A(在本文中称为BCY10482);

A-(SEQ ID NO:6)-A-[Sar6]-[KBiot](在本文中称为BCY10549);

A-(SEQ ID NO:6)-A-K(Pyra)(在本文中称为BCY11607);

A-(SEQ ID NO:7)-A-[Sar6]-[KBiot](在本文中称为BCY11501);

A-(SEQ ID NO:35)-A(在本文中称为BCY10350);

A-(SEQ ID NO:36)-A(在本文中称为BCY10352);

A-(SEQ ID NO:37)-A(在本文中称为BCY10353);

A-(SEQ ID NO:38)-A(在本文中称为BCY10354);

A-(SEQ ID NO:39)-A(在本文中称为BCY10730);和

A-(SEQ ID NO:40)-A(在本文中称为BCY10731);

其中Pyra表示4-戊炔酰基部分,特别是:

A- (SEQ ID NO:6) -A-K (Pya) (在本文中称为BCY11607); 和
 Ac-A- (SEQ ID NO:6) -A-K (Pya) (在下文中称为BCY12708);
 其中Pya表示4-戊炔酰基部分。

9. 如权利要求1至3中任一项所定义的肽配体, 其中所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基, 所述两个环序列的第一个包含4个氨基酸, 第二个包含8个氨基酸, 并且氨基酸序列包含:

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

其中C_i、C_{ii}和C_{iii}分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基, 或其修饰衍生物, 或其药理学上可接受的盐, 如:

A- (SEQ ID NO:41) -A (在本文中称为BCY10339);
 A- (SEQ ID NO:42) -A (在本文中称为BCY10340);
 A- (SEQ ID NO:43) -A (在本文中称为BCY10342);
 A- (SEQ ID NO:44) -A (在本文中称为BCY10345);
 A- (SEQ ID NO:45) -A (在本文中称为BCY10347);
 A- (SEQ ID NO:46) -A (在本文中称为BCY10348);
 A- (SEQ ID NO:47) -A (在本文中称为BCY10720);
 A- (SEQ ID NO:48) -A (在本文中称为BCY10721);
 A- (SEQ ID NO:49) -A (在本文中称为BCY10722);
 A- (SEQ ID NO:50) -A (在本文中称为BCY10723);
 A- (SEQ ID NO:51) -A (在本文中称为BCY10724);
 A- (SEQ ID NO:52) -A (在本文中称为BCY10725);
 A- (SEQ ID NO:53) -A (在本文中称为BCY10726);
 A- (SEQ ID NO:54) -A (在本文中称为BCY10727); 和
 A- (SEQ ID NO:55) -A (在本文中称为BCY10728)。

10. 如权利要求1至3中任一项所定义的肽配体, 其中所述环序列包含被两个环序列隔

开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列均包含5个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

C_i WYEDC_{ii}NNWERC_{iii} (SEQ ID NO:8),
 C_i NEDMYC_{ii}FMWMEC_{iii} (SEQ ID NO:56);
 C_i LYEYDC_{ii}YTWRRRC_{iii} (SEQ ID NO:57);
 C_i RYEYDC_{ii}HTWQRC_{iii} (SEQ ID NO:58);
 C_i WYEDC_{ii}TTWERC_{iii} (SEQ ID NO:59);
 C_i WYEDC_{ii}RTWTRC_{iii} (SEQ ID NO:60);
 C_i LYEYDC_{ii}HTWTRC_{iii} (SEQ ID NO:61);和
 C_i WYEDC_{ii}RTWTFC_{iii} (SEQ ID NO:62);

其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药理学上可接受的盐,如:

A- (SEQ ID NO:8) -A-[Sar6]-[KBiot] (在本文中称为BCY10550);
 A- (SEQ ID NO:8) -A (在本文中称为BCY10361);
 A- (SEQ ID NO:56) -A (在本文中称为BCY10360);
 A- (SEQ ID NO:57) -A (在本文中称为BCY10363);
 A- (SEQ ID NO:58) -A (在本文中称为BCY10732);
 A- (SEQ ID NO:59) -A (在本文中称为BCY10733);
 A- (SEQ ID NO:60) -A (在本文中称为BCY10734);
 A- (SEQ ID NO:61) -A (在本文中称为BCY10735);和
 A- (SEQ ID NO:62) -A (在本文中称为BCY10736),如:
 A- (SEQ ID NO:8) -A-[Sar6]-[KBiot] (在本文中称为BCY10550)。

11. 如权利要求1至3中任一项所定义的肽配体,其中所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含5个氨基酸,第二个包含7个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

C_i HGGVWC_{ii}IPNINDSC_{iii} (SEQ ID NO:63);
 C_i DSPVRC_{ii}YWNTQKGC_{iii} (SEQ ID NO:64);和
 C_i GSPVPC_{ii}YWNTRKGC_{iii} (SEQ ID NO:65);

其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药理学上可接受的盐,如:

A- (SEQ ID NO:63) -A (在本文中称为BCY10336);
 A- (SEQ ID NO:64) -A (在本文中称为BCY10337);和
 A- (SEQ ID NO:65) -A (在本文中称为BCY10338)。

12. 如权利要求1至3中任一项所定义的肽配体,其中所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含6个氨基酸,第二个包含5个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

C_i VIRYSPC_{ii}SHYLNC_{iii} (SEQ ID NO:9);
 C_i APFEFNC_{ii}YTWRPC_{iii} (SEQ ID NO:66);和
 C_i RVLYSPC_{ii}YHWLNC_{iii} (SEQ ID NO:67);

其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药理学

上可接受的盐,如:

- A- (SEQ ID NO:9) -A-[Sar6]-[KBiot] (在本文中称为BCY10794);
- A- (SEQ ID NO:9) -A (在本文中称为BCY10349);
- A- (SEQ ID NO:66) -A (在本文中称为BCY10346); 和
- A- (SEQ ID NO:67) -A (在本文中称为BCY10357), 如:
- A- (SEQ ID NO:9) -A-[Sar6]-[KBiot] (在本文中称为BCY10794)。

13. 如权利要求1至3中任一项所定义的肽配体, 其中所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基, 所述两个环序列均包含6个氨基酸, 并且氨基酸序列包含:

C_i SIMYSPC_{ii}EHPHNC_{iii} (SEQ ID NO:68);

其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基, 或其修饰衍生物, 或其药学上可接受的盐, 如:

A- (SEQ ID NO:68) -A (在本文中称为BCY10362)。

14. 如权利要求1至3中任一项所定义的肽配体, 其中所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基, 所述两个环序列的第一个包含8个氨基酸, 第二个包含3个氨基酸, 并且氨基酸序列包含:

C_i DYSPWWHPC_{ii}NHIC_{iii} (SEQ ID NO:10);

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

C_i DAWPETHVC_{ii}YWWC_{iii} (SEQ ID NO:70); 和

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

其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基, 或其修饰衍生物, 或其药学上可接受的盐, 如:

[Biot]-G-[Sar5]-A- (SEQ ID NO:10) -A (在本文中称为BCY11369);

A- (SEQ ID NO:10) -A (在本文中称为BCY10331);

A- (SEQ ID NO:69) -A (在本文中称为BCY10332);

A- (SEQ ID NO:70) -A (在本文中称为BCY10717); 和

A- (SEQ ID NO:71) -A (在本文中称为BCY10718), 如:

[Biot]-G-[Sar5]-A- (SEQ ID NO:10) -A (在本文中称为BCY11369)。

15. 如权利要求1至3中任一项所定义的肽配体, 其中所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基, 所述两个环序列的第一个包含8个氨基酸, 第二个包含4个氨基酸, 并且氨基酸序列包含:

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

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

其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基, 或其修饰衍生物, 或其药学上可接受的盐, 如:

A- (SEQ ID NO:72) -A (在本文中称为BCY10334); 和

A- (SEQ ID NO:73) -A (在本文中称为BCY10719)。

16. 如权利要求1至3中任一项所定义的肽配体, 其中所述肽配体选自BCY10551、BCY10552、BCY10479、BCY11371、BCY10482、BCY10549、BCY11501、BCY10550、BCY10794和BCY11369, 如BCY10551、BCY11371和BCY10549, 特别是BCY10549。

17. 如权利要求1至16中任一项所定义的肽配体,其中所述分子支架是1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA)。

18. 如权利要求1至17中任一项所定义的肽配体,其中所述药学上可接受的盐选自游离酸或钠、钾、钙或铵盐。

19. 一种多聚结合复合物,其包含至少两个肽配体,其中至少一个肽配体是如权利要求1至18中任一项所定义的OX40特异性的,并且所述肽配体可以是相同的或不同的,其各自包含多肽和分子支架,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个反应性基团,并且所述分子支架与所述多肽的反应性基团形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

20. 如权利要求19所定义的多聚结合复合物,其中每个肽配体通过间隔基团连接至中央铰链部分。

21. 如权利要求19或20所定义的多聚结合复合物,其包含式(I)的化合物:



其中CHM表示中央铰链部分;

S_1 表示间隔基团;

双环表示如权利要求1至18中任一项所定义的肽配体;和

m 表示选自2至10的整数。

22. 如权利要求19至21中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述肽配体对相同靶标具有特异性。

23. 如权利要求19至22中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述多聚结合复合物包含至少两个相同的肽配体。

24. 如权利要求23所定义的多聚结合复合物,其中所述多聚结合复合物包含四个相同的肽配体,如四个BCY10549肽配体,并包含四聚复合物BCY12019。

25. 如权利要求19至22中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述多聚结合复合物包含至少两个不同的肽配体。

26. 如权利要求19至21中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述肽配体对不同的靶标具有特异性。

27. 如权利要求19至26中任一项所定义的多聚结合复合物,其中至少一种所述肽配体对OX40具有特异性,并且至少一种所述另外的肽配体结合免疫细胞上的另外的组分。

28. 如权利要求27所定义的多聚结合复合物,其中所述免疫细胞上的另外的组分是CD137。

29. 如权利要求27或28所定义的多聚结合复合物,其中结合免疫细胞上的另外的组分的所述至少一种另外的肽配体包含结合CD137的肽配体。

30. 如权利要求19至29中任一项所定义的多聚结合复合物,其中至少一种所述肽配体对OX40具有特异性,并且至少一种所述另外的肽配体结合存在于癌细胞上的组分,任选地其中至少一种所述肽配体结合免疫细胞上的另外的组分。

31. 如权利要求19所述的多聚结合复合物,其是异源串联肽复合物,其包含:

(a) 一种或多种如权利要求1至18中任一项所定义的结合OX40的肽配体;通过接头偶联至

(b) 至少一种第二肽配体,其结合存在于癌细胞上的组分;

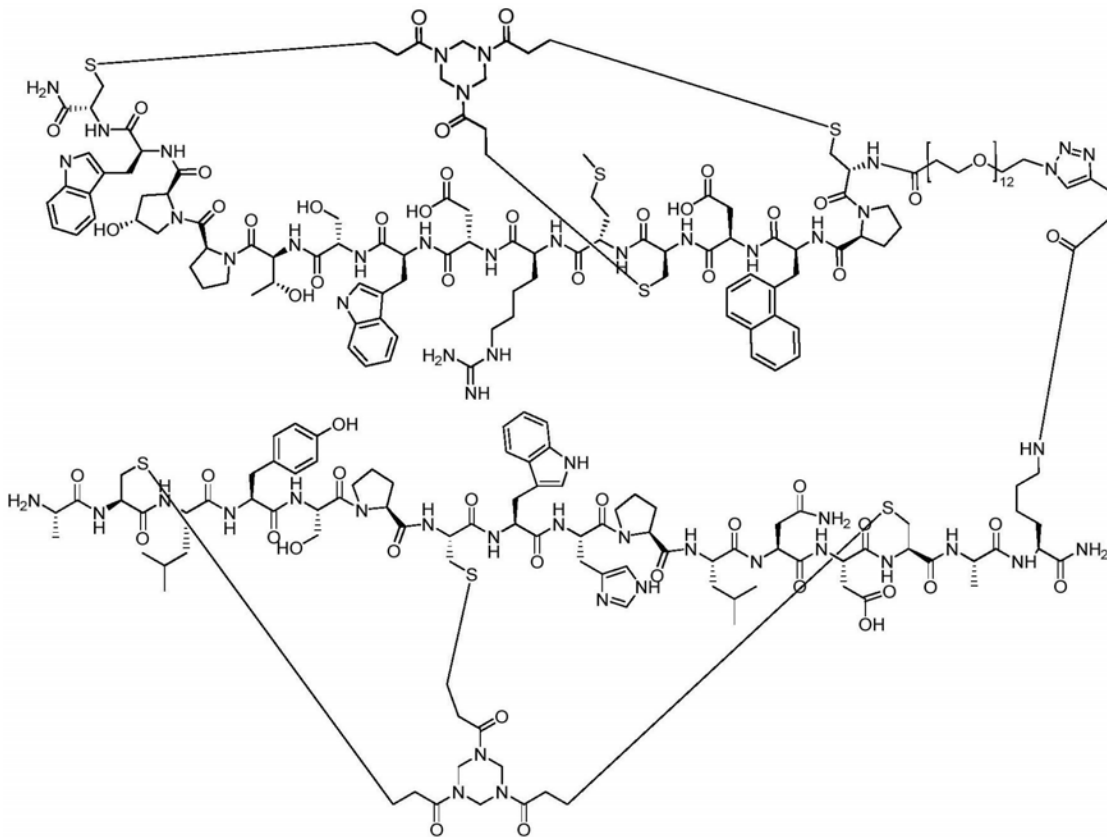
其中,每个所述肽配体包含多肽和分子支架,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个半胱氨酸残基,并且所述分子支架与所述多肽的半胱氨酸残基形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

32. 如权利要求31所述的多聚结合复合物,其中第二肽配体包含结合EphA2、PD-L1、粘连蛋白-4或PSMA的双环肽配体,如结合粘连蛋白-4的双环肽配体,其包含具有以下序列的氨基酸:

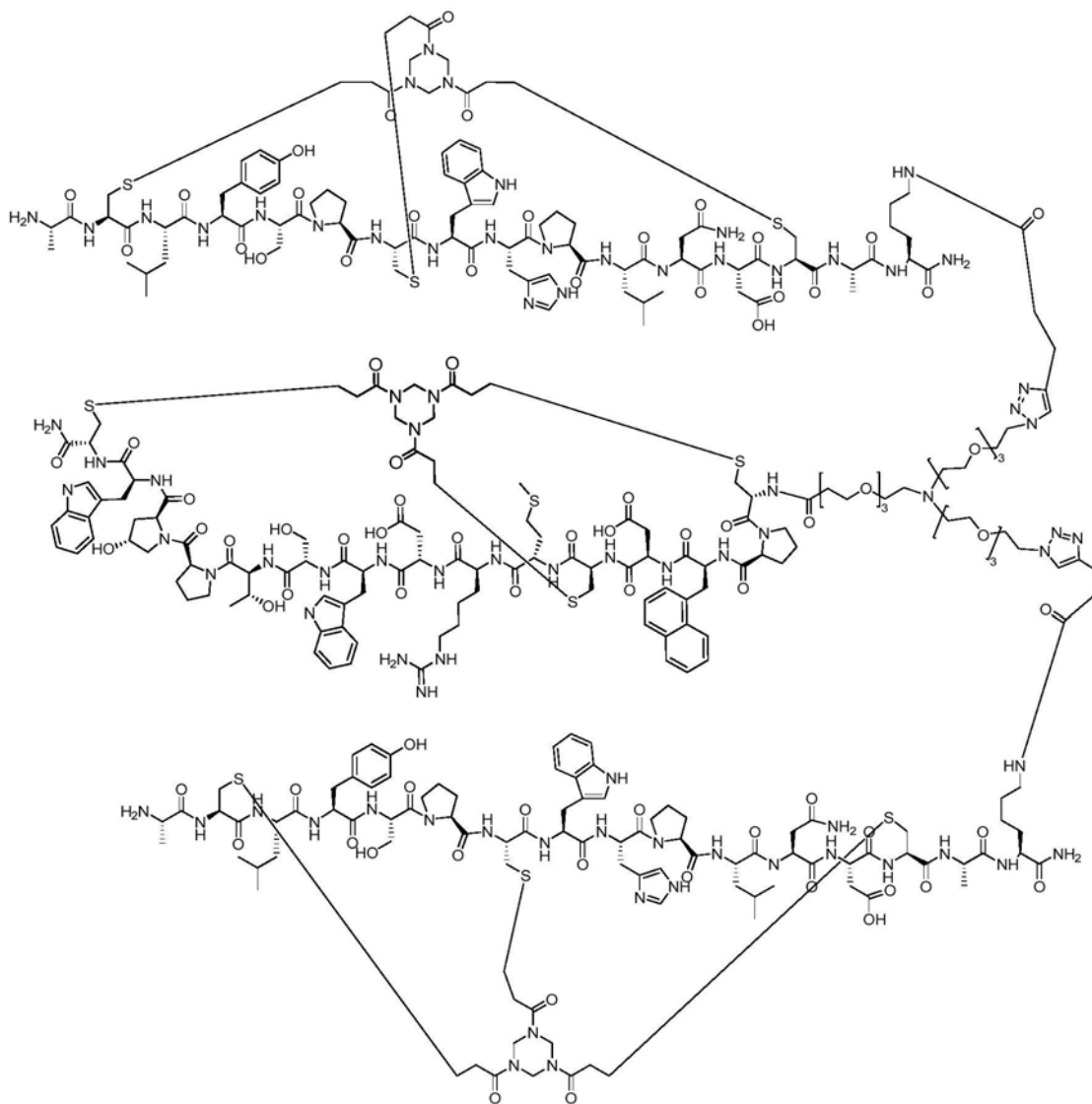
CP[1Na1][dD]CM[HArg]DWSTP[HyP]WC (SEQ ID NO:11;在下文中称为BCY8116),

其中1Na1表示1-萘丙氨酸,HArg表示高精氨酸,HyP表示羟脯氨酸,如BCY8116的PEG12衍生物、BCY8116的PEG5衍生物和BCY8116的三官能PEG3衍生物。

33. 如权利要求31或32所述的多聚结合复合物,其选自BCY12141、BCY12721和BCY12697:



BCY12141;



BCY12697。

34. 一种药物偶联物,其包含如权利要求1至18中任一项所定义的肽配体或如权利要求19至33中任一项所定义的多聚结合复合物,所述肽配体或多聚结合复合物与一个或多个效应子和/或官能团偶联。

35. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至18中任一项所定义的肽配体、如权利要求19至33中任一项所定义的多聚结合复合物或如权利要求34所述的药物偶联物,与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

36. 如权利要求1至18中任一项所定义的肽配体、如权利要求19至33中任一项所定义的多聚结合复合物或如权利要求34所述的药物偶联物的用途,用于预防、抑制或治疗OX40介导的疾病或疾患。

OX40特异性的双环肽配体

技术领域

[0001] 本发明涉及多肽,其与分子支架共价结合,使得在支架的连接点之间对向存在(subtend)两个或更多个肽环。特别地,本发明描述了结合OX40的肽。本发明还涉及是OX40的功能性激动剂的多肽的多聚结合复合物,所述多肽与分子支架共价结合,使得在支架的连接点之间对向存在(subtend)两个或更多个肽环。本发明还包括包含与一个或多个效应子和/或官能团偶联的所述肽和复合物的药物偶联物,包含所述肽配体、复合物和药物偶联物的药物组合物,以及所述肽配体和药物偶联物在预防、抑制或治疗OX40介导的疾病或疾患中的用途。

背景技术

[0002] 环肽能够以高亲和力和特异性与蛋白质靶标结合,因此是对于治疗剂开发有吸引力的分子类别。事实上,临床上已经成功使用了几种环肽,例如抗菌肽万古霉素、免疫抑制剂环孢霉素或抗癌药奥曲肽(Driggers等人(2008),Nat Rev Drug Discov 7(7),608-24)。良好的结合特性是由于肽与靶标之间形成的相对较大的相互作用表面以及环状结构的构象柔韧性降低所致。通常,大环与数百平方埃的表面结合,例如环肽CXCR4拮抗剂CVX15(400 \AA^2 ;Wu等人(2007),Science 330,1066-71)、具有与整合蛋白 $\alpha\text{V}\beta 3$ (355 \AA^2)结合的Arg-Gly-Asp基序的环肽(Xiong等人(2002),Science 296(5565),151-5)或结合尿激酶型纤溶酶原激活因子的环肽抑制剂upain-1(603 \AA^2 ;Zhao等人(2007),J Struct Biol 160(1),1-10)。

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

[0004] 不同的研究团队先前已将具有半胱氨酸残基的多肽系于(tether)合成的分子结构上(Kemp和McNamara(1985),J.Org.Chem;Timmerman等人(2005),ChemBioChem)。Meloan和同事已使用三(溴甲基)苯和相关分子将多个肽环快速定量地环化到合成支架上,以结构模拟蛋白质表面(Timmerman等人(2005),ChemBioChem)。生成候选药物化合物的方法,其中所述化合物是通过将包含半胱氨酸的多肽连接到分子支架上而生成的,所述分子支架例如为1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-1-烯-2-酮(TATA)(Heinis等人(2014),Angewandte Chemie,International Edition 53(6),1602-1606)。

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

环化。

发明内容

[0006] 根据本发明的第一个方面,提供了一种OX40特异性的肽配体,其包含多肽和分子支架,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个反应性基团,并且所述分子支架与所述多肽的反应性基团形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

[0007] 根据本发明的一个进一步的方面,提供了多聚结合复合物,其包含至少两个肽配体,其中至少一个肽配体如本文所定义是OX40特异性的,并且所述肽配体可以是相同的或不同的,其各自包含多肽和分子支架,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个反应性基团,并且所述分子支架与所述多肽的反应性基团形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

[0008] 根据本发明的一个仍进一步的方面,提供了一种药物偶联物,其包含与一个或多个效应子和/或官能团偶联的如本文所定义的肽配体或多聚结合复合物。

[0009] 根据本发明的一个仍进一步的方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所定义的肽配体、多聚结合复合物或药物偶联物,与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0010] 根据本发明的一个进一步的方面,提供了如本文所定义的肽配体、多聚结合复合物、药物偶联物或药物组合物,其用于预防、抑制或治疗OX40介导的疾病或疾患。

附图说明

[0011] 图1:在Promega的OX40报告细胞试验中,测试OX40L、BCY10549(生物素化单体)、BCY10549+链霉亲和素和BCY12019(四聚体)的结果。

[0012] 图2:在PBMC-肿瘤细胞共培养试验中测试BCY12141的结果。

[0013] 图3:在与肿瘤细胞共培养的Promega的OX40细胞活性试验中,与OX40L和非结合对照肽BCY12968相比,BCY12141、BCY12721和BCY12967的结果。

具体实施方式

肽配体

[0015] 根据本发明的第一个方面,提供了一种OX40特异性的肽配体,其包含多肽和分子支架,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个反应性基团,并且所述分子支架与所述多肽的反应性基团形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

[0016] 在一个实施方案中,所述反应性基团包含半胱氨酸残基。

[0017] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含2、3、4、5、6、7或8个氨基酸。

[0018] 在一个更进一步的实施方案中,所述环序列包含3、4、5、6、7或8个氨基酸。

[0019] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个由2个氨基酸组成,第二个由7个氨基酸组成。

[0020] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个由3个氨基酸组成,第二个由7个氨基酸组成。

[0021] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个由3个氨基酸组成,第二个由8个氨基酸组成。

[0022] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个由4个氨基酸组成,第二个由5个氨基酸组成。

[0023] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个由4个氨基酸组成,第二个由6个氨基酸组成。

[0024] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个由4个氨基酸组成,第二个由8个氨基酸组成。

[0025] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列均由5个氨基酸组成。

[0026] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个由5个氨基酸组成,第二个由7个氨基酸组成。

[0027] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个由6个氨基酸组成,第二个由5个氨基酸组成。

[0028] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列均由6个氨基酸组成。

[0029] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个由8个氨基酸组成,第二个由3个氨基酸组成。

[0030] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个由8个氨基酸组成,第二个由4个氨基酸组成。

[0031] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个由2个氨基酸组成,第二个由7个氨基酸组成,并且氨基酸序列包含:

[0032] $C_i DAC_{ii} LYPDYVC_{iii}$ (SEQ ID NO:12);

[0033] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0034] 在一个实施方案中,本发明的肽不是SEQ ID NO:12。

[0035] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个由2个氨基酸组成,第二个由7个氨基酸组成,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0036] A-(SEQ ID NO:12)-A(在本文中称为BCY10375)。

[0037] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含3个氨基酸,第二个包含7个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

[0038] $C_i RLWC_{ii} IPAPTDDC_{iii}$ (SEQ ID NO:13);

[0039] $C_i TMWC_{ii} IPAKGDWC_{iii}$ (SEQ ID NO:14);

[0040] $C_i MLWC_{ii} LPAPTDEC_{iii}$ (SEQ ID NO:15);

[0041] $C_i ILWC_{ii} LPEPPDEC_{iii}$ (SEQ ID NO:16);

[0042] $C_i LLWC_{ii} IPNPDDNC_{iii}$ (SEQ ID NO:17);

[0043] $C_i WLWC_{ii} VPNPDDTC_{iii}$ (SEQ ID NO:18);

[0044] $C_i VLWC_{ii} TPYPGDDC_{iii}$ (SEQ ID NO:19);

[0045] $C_i ALWC_{ii} IPDPQDEC_{iii}$ (SEQ ID NO:20);

[0046] $C_i TLWC_{ii} IPDASDSC_{iii}$ (SEQ ID NO:21);

- [0047] C_i QLWC_{ii}PDADDDC_{iii} (SEQ ID NO:22);
- [0048] C_i QLWG_{ii}VPEPGDSC_{iii} (SEQ ID NO:23);
- [0049] C_i ALWG_{ii}IPEESDDC_{iii} (SEQ ID NO:24);
- [0050] C_i VLWC_{ii}IPEPQDKC_{iii} (SEQ ID NO:25);
- [0051] C_i TLWC_{ii}IPDPDDSC_{iii} (SEQ ID NO:26);
- [0052] C_i RLWC_{ii}VPKAEDYC_{iii} (SEQ ID NO:27);
- [0053] C_i TKPC_{ii}IAYYNQSC_{iii} (SEQ ID NO:28);
- [0054] C_i MNPC_{ii}IAYYQDEC_{iii} (SEQ ID NO:29);
- [0055] C_i TNAC_{ii}VAYYHQAC_{iii} (SEQ ID NO:30); 和
- [0056] C_i SDPC_{ii}ISYYNQAC_{iii} (SEQ ID NO:31);
- [0057] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0058] 在一个实施方案中,本发明的肽不是SEQ ID NO:13-31中任何一种或多种或全部。

[0059] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含3个氨基酸,第二个包含7个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

- [0060] A- (SEQ ID NO:13) -A (在本文中称为BCY10364);
- [0061] A- (SEQ ID NO:14) -A (在本文中称为BCY10365);
- [0062] A- (SEQ ID NO:15) -A (在本文中称为BCY10366);
- [0063] A- (SEQ ID NO:16) -A (在本文中称为BCY10367);
- [0064] A- (SEQ ID NO:17) -A (在本文中称为BCY10368);
- [0065] A- (SEQ ID NO:18) -A (在本文中称为BCY10369);
- [0066] A- (SEQ ID NO:19) -A (在本文中称为BCY10374);
- [0067] A- (SEQ ID NO:20) -A (在本文中称为BCY10376);
- [0068] A- (SEQ ID NO:21) -A (在本文中称为BCY10737);
- [0069] A- (SEQ ID NO:22) -A (在本文中称为BCY10738);
- [0070] A- (SEQ ID NO:23) -A (在本文中称为BCY10739);
- [0071] A- (SEQ ID NO:24) -A (在本文中称为BCY10740);
- [0072] A- (SEQ ID NO:25) -A (在本文中称为BCY10741);
- [0073] A- (SEQ ID NO:26) -A (在本文中称为BCY10742);
- [0074] A- (SEQ ID NO:27) -A (在本文中称为BCY10380);
- [0075] A- (SEQ ID NO:28) -A (在本文中称为BCY10370);
- [0076] A- (SEQ ID NO:29) -A (在本文中称为BCY10372);
- [0077] A- (SEQ ID NO:30) -A (在本文中称为BCY10373); 和
- [0078] A- (SEQ ID NO:31) -A (在本文中称为BCY10379)。

[0079] 在一个可选的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含3个氨基酸,第二个包含7个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

- [0080] C_i ILWC_{ii}LPEPHDEC_{iii} (SEQ ID NO:1),

[0081] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0082] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含3个氨基酸,第二个包含7个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0083] A-(SEQ ID NO:1)-A-[Sar6]-[KBiot](在本文中称为BCY10551);和

[0084] A-(SEQ ID NO:1)-A(在本文中称为BCY10371),如:

[0085] A-(SEQ ID NO:1)-A-[Sar6]-[KBiot](在本文中称为BCY10551)。

[0086] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含3个氨基酸,第二个包含8个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

[0087] C_i DPPC $_{ii}$ DPFWYAFYC $_{iii}$ (SEQ ID NO:32);和

[0088] C_i PDDC $_{ii}$ DPFWYNFYC $_{iii}$ (SEQ ID NO:33);

[0089] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0090] 在一个实施方案中,本发明的肽不是SEQ ID NO:32-33之一或两者。

[0091] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含3个氨基酸,第二个包含8个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0092] A-(SEQ ID NO:32)-A(在本文中称为BCY10377);和

[0093] A-(SEQ ID NO:33)-A(在本文中称为BCY10744)。

[0094] 在一个可选的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含3个氨基酸,第二个包含8个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

[0095] $C_iA^K/S^N/E C_{ii}$ DPFWYQFYC $_{iii}$ (SEQ ID NO:2),

[0096] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0097] 在一个进一步的实施方案中, $C_iA^K/S^N/E C_{ii}$ DPFWYQFYC $_{iii}$ (SEQ ID NO:2)的肽配体包含选自以下的氨基酸序列:

[0098] C_i AKNC $_{ii}$ DPFWYQFYC $_{iii}$ (SEQ ID NO:3),和

[0099] C_i ASEC $_{ii}$ DPFWYQFYC $_{iii}$ (SEQ ID NO:4);

[0100] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0101] 在一个更进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含3个氨基酸,第二个包含8个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0102] A-(SEQ ID NO:3)-A-[Sar6]-[KBiot](在本文中称为BCY10552);

[0103] [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO:3)-A(在本文中称为BCY10479);

[0104] A-(SEQ ID NO:3)-A(在本文中称为BCY10378);

[0105] [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO:4)-A(在本文中称为BCY11371);和

- [0106] A- (SEQ ID NO:4) -A (在本文中称为BCY10743), 如:
- [0107] A- (SEQ ID NO:3) -A- [Sar6]- [KBiot] (在本文中称为BCY10552);
- [0108] [Biot]-G- [Sar5]-A- (SEQ ID NO:3) -A (在本文中称为BCY10479); 和
- [0109] [Biot]-G- [Sar5]-A- (SEQ ID NO:4) -A (在本文中称为BCY11371)。
- [0110] 在一个实施方案中, 所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基, 所述两个环序列的第一个包含4个氨基酸, 第二个包含5个氨基酸, 并且氨基酸序列包含:
- [0111] $C_iRYSPC_{ii}YHPHNC_{iii}$ (SEQ ID NO:34);
- [0112] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基, 或其修饰衍生物, 或其药学上可接受的盐。
- [0113] 在一个实施方案中, 本发明的肽不是EQ ID NO:34。
- [0114] 在一个进一步的实施方案中, 所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基, 所述两个环序列的第一个包含4个氨基酸, 第二个包含5个氨基酸, 并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:
- [0115] A- (SEQ ID NO:34) -A (在本文中称为BCY10343)。
- [0116] 在一个实施方案中, 所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基, 所述两个环序列的第一个包含4个氨基酸, 第二个包含6个氨基酸, 并且氨基酸序列包含:
- [0117] $C_iLYSPC_{ii}NHPLNSC_{iii}$ (SEQ ID NO:35);
- [0118] $C_iEDNYC_{ii}FMWTPYC_{iii}$ (SEQ ID NO:36);
- [0119] $C_iLDSPC_{ii}WHPLNDC_{iii}$ (SEQ ID NO:37);
- [0120] $C_iRFSPC_{ii}SHPLNQC_{iii}$ (SEQ ID NO:38);
- [0121] $C_iKYSPC_{ii}WHPLNLC_{iii}$ (SEQ ID NO:39); 和
- [0122] $C_iRYSPC_{ii}WHPLNNC_{iii}$ (SEQ ID NO:40);
- [0123] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基, 或其修饰衍生物, 或其药学上可接受的盐。
- [0124] 在一个实施方案中, 本发明的肽不是SEQ ID NO:35-40中的一种或多种或全部。
- [0125] 在一个进一步的实施方案中, 所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基, 所述两个环序列的第一个包含4个氨基酸, 第二个包含6个氨基酸, 并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:
- [0126] A- (SEQ ID NO:35) -A (在本文中称为BCY10350);
- [0127] A- (SEQ ID NO:36) -A (在本文中称为BCY10352);
- [0128] A- (SEQ ID NO:37) -A (在本文中称为BCY10353);
- [0129] A- (SEQ ID NO:38) -A (在本文中称为BCY10354);
- [0130] A- (SEQ ID NO:39) -A (在本文中称为BCY10730); 和
- [0131] A- (SEQ ID NO:40) -A (在本文中称为BCY10731)。
- [0132] 在一个可选的实施方案中, 所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基, 所述两个环序列的第一个包含4个氨基酸, 第二个包含6个氨基酸, 并且氨基酸序列包含:
- [0133] $C_i^L/NYSPC_{ii}WHPLN^D/KC_{iii}$ (SEQ ID NO:5),
- [0134] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基, 或其修饰衍生物, 或其

药学上可接受的盐。

[0135] 在一个进一步的实施方案中, C_i^L/N YSPC_{ii}WHPLN^D/_KC_{iii} (SEQ ID NO:5) 的肽配体包含选自以下的氨基酸序列:

[0136] C_i LYSPC_{ii}WHPLNDC_{iii} (SEQ ID NO:6); 和

[0137] C_i NYSPC_{ii}WHPLNKC_{iii} (SEQ ID NO:7);

[0138] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基, 或其修饰衍生物, 或其药学上可接受的盐。

[0139] 在一个更进一步的实施方案中, 所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基, 所述两个环序列的第一个包含4个氨基酸, 第二个包含6个氨基酸, 并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0140] [Biot]-G-[Sar5]-A- (SEQ ID NO:6) -A (在本文中称为BCY10482);

[0141] A- (SEQ ID NO:6) -A-[Sar6]-[KBiot] (在本文中称为BCY10549);

[0142] A- (SEQ ID NO:6) -A-K (Pya) (在本文中称为BCY11607);

[0143] Ac-A- (SEQ ID NO:6) -A-K (Pya) (在下文中称为BCY12708);

[0144] A- (SEQ ID NO:6) -A (在本文中称为BCY10351);

[0145] A- (SEQ ID NO:7) -A-[Sar6]-[KBiot] (在本文中称为BCY11501); 和

[0146] A- (SEQ ID NO:7) -A (在本文中称为BCY10729), 如:

[0147] [Biot]-G-[Sar5]-A- (SEQ ID NO:6) -A (在本文中称为BCY10482);

[0148] A- (SEQ ID NO:6) -A-[Sar6]-[KBiot] (在本文中称为BCY10549);

[0149] A- (SEQ ID NO:6) -A-K (Pya) (在本文中称为BCY11607); 和

[0150] A- (SEQ ID NO:7) -A-[Sar6]-[KBiot] (在本文中称为BCY11501),

[0151] 其中Pya表示4-戊炔酰基部分(4-pentynoyl moiety)。

[0152] 在一个更进一步的实施方案中, 所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基, 所述两个环序列的第一个包含4个氨基酸, 第二个包含6个氨基酸, 并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0153] A- (SEQ ID NO:6) -A-K (Pya) (在本文中称为BCY11607); 和

[0154] Ac-A- (SEQ ID NO:6) -A-K (Pya) (在下文中称为BCY12708);

[0155] 其中Pya表示4-戊炔酰基部分。

[0156] 在一个实施方案中, 所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基, 所述两个环序列的第一个包含4个氨基酸, 第二个包含8个氨基酸, 并且氨基酸序列包含:

[0157] C_i EWISC_{ii}PGEPHRWWC_{iii} (SEQ ID NO:41);

[0158] C_i VWEAC_{ii}PEHPDQWWC_{iii} (SEQ ID NO:42);

[0159] C_i STWHC_{ii}FWNLQEGKC_{iii} (SEQ ID NO:43);

[0160] C_i EWKAC_{ii}EHDRERWWC_{ii} (SEQ ID NO:44);

[0161] C_i RTWQC_{ii}FYEWQNGHC_{iii} (SEQ ID NO:45);

[0162] C_i KTWDC_{ii}FWASQVSEC_{iii} (SEQ ID NO:46);

[0163] C_i STWQC_{ii}FYDLQEGHC_{iii} (SEQ ID NO:47);

[0164] C_i TTWEC_{ii}FYDLQEGHC_{iii} (SEQ ID NO:48);

[0165] C_i ETWEC_{ii}FWRLQAGEC_{iii} (SEQ ID NO:49);

- [0166] C_i RTWQC_{ii}FWDLQEGLC_{iii} (SEQ ID NO:50) ;
[0167] C_i STWQC_{ii}FWDSQLGAC_{iii} (SEQ ID NO:51) ;
[0168] C_i ETWEC_{ii}FEWQVGSC_{iii} (SEQ ID NO:52) ;
[0169] C_i TTWEC_{ii}FWDLQEGLC_{iii} (SEQ ID NO:53) ;
[0170] C_i HTWDC_{ii}FYQWQDGHGHC_{iii} (SEQ ID NO:54) ;和
[0171] C_i TTWEC_{ii}FYSLQDGHGHC_{iii} (SEQ ID NO:55) ;
[0172] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0173] 在一个实施方案中,本发明的肽不是SEQ ID NO:41-55中的一种或多种或全部。

[0174] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含4个氨基酸,第二个包含8个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

- [0175] A- (SEQ ID NO:41) -A (在本文中称为BCY10339) ;
[0176] A- (SEQ ID NO:42) -A (在本文中称为BCY10340) ;
[0177] A- (SEQ ID NO:43) -A (在本文中称为BCY10342) ;A- (SEQ ID NO:44) -A (在本文中称为BCY10345) ;
[0178] A- (SEQ ID NO:45) -A (在本文中称为BCY10347) ;
[0179] A- (SEQ ID NO:46) -A (在本文中称为BCY10348) ;
[0180] A- (SEQ ID NO:47) -A (在本文中称为BCY10720) ;
[0181] A- (SEQ ID NO:48) -A (在本文中称为BCY10721) ;
[0182] A- (SEQ ID NO:49) -A (在本文中称为BCY10722) ;
[0183] A- (SEQ ID NO:50) -A (在本文中称为BCY10723) ;
[0184] A- (SEQ ID NO:51) -A (在本文中称为BCY10724) ;
[0185] A- (SEQ ID NO:52) -A (在本文中称为BCY10725) ;
[0186] A- (SEQ ID NO:53) -A (在本文中称为BCY10726) ;
[0187] A- (SEQ ID NO:54) -A (在本文中称为BCY10727) ;和
[0188] A- (SEQ ID NO:55) -A (在本文中称为BCY10728) 。

[0189] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列均包含5个氨基酸,氨基酸序列包含:

- [0190] C_i NEDMYC_{ii}FMWMEC_{iii} (SEQ ID NO:56) ;
[0191] C_i LYEYDC_{ii}YTWRRRC_{iii} (SEQ ID NO:57) ;
[0192] C_i RYEYDC_{ii}HTWQRC_{iii} (SEQ ID NO:58) ;
[0193] C_i WYEYDC_{ii}TTWERC_{iii} (SEQ ID NO:59) ;
[0194] C_i WYEYDC_{ii}RTWTRC_{iii} (SEQ ID NO:60) ;
[0195] C_i LYEYDC_{ii}HTWTRC_{iii} (SEQ ID NO:61) ;和
[0196] C_i WYEYDC_{ii}RTWTFC_{iii} (SEQ ID NO:62) ;
[0197] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0198] 在一个实施方案中,本发明的肽不是SEQ ID NO:56-62中的一种或多种或全部。

[0199] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列均包含5个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0200] A-(SEQ ID NO:56)-A(在本文中称为BCY10360);

[0201] A-(SEQ ID NO:57)-A(在本文中称为BCY10363);

[0202] A-(SEQ ID NO:58)-A(在本文中称为BCY10732);

[0203] A-(SEQ ID NO:59)-A(在本文中称为BCY10733);

[0204] A-(SEQ ID NO:60)-A(在本文中称为BCY10734);

[0205] A-(SEQ ID NO:61)-A(在本文中称为BCY10735);和

[0206] A-(SEQ ID NO:62)-A(在本文中称为BCY10736)。

[0207] 在一个可选的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列均包含5个氨基酸,氨基酸序列包含:

[0208] C_i WYEDC_{ii}NNWERC_{iii}(SEQ ID NO:8),

[0209] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0210] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列均包含5个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0211] A-(SEQ ID NO:8)-A-[Sar6]-[KBiot](在本文中称为BCY10550);和

[0212] A-(SEQ ID NO:8)-A(在本文中称为BCY10361),如:

[0213] A-(SEQ ID NO:8)-A-[Sar6]-[KBiot](在本文中称为BCY10550)。

[0214] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含5个氨基酸,第二个包含7个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

[0215] C_i HGGVWC_{ii}IPNINDSC_{iii}(SEQ ID NO:63);

[0216] C_i DSPVRC_{ii}YWNTQKGC_{iii}(SEQ ID NO:64);和

[0217] C_i GSPVPC_{ii}YWNTRKGC_{iii}(SEQ ID NO:65);

[0218] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0219] 在一个实施方案中,本发明的肽不是SEQ ID NO:63-65中的一种或多种或全部。

[0220] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含5个氨基酸,第二个包含7个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0221] A-(SEQ ID NO:63)-A(在本文中称为BCY10336);

[0222] A-(SEQ ID NO:64)-A(在本文中称为BCY10337);和

[0223] A-(SEQ ID NO:65)-A(在本文中称为BCY10338)。

[0224] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含6个氨基酸,第二个包含5个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

[0225] C_i APFEFNC_{ii}YTWRPC_{iii}(SEQ ID NO:66);

[0226] C_i RVLYSPC_{ii}YHWLNC_{iii}(SEQ ID NO:67);

[0227] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0228] 在一个实施方案中,本发明的肽不是SEQ ID NO:66-67之一或两者。

[0229] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含6个氨基酸,第二个包含5个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0230] A-(SEQ ID NO:66)-A(在本文中称为BCY10346);和

[0231] A-(SEQ ID NO:67)-A(在本文中称为BCY10357)。

[0232] 在一个可选的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含6个氨基酸,第二个包含5个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

[0233] C_i VIRYSPC $_{ii}$ SHYLN C_{iii} (SEQ ID NO:9),

[0234] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0235] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含6个氨基酸,第二个包含5个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0236] A-(SEQ ID NO:9)-A-[Sar6]-[KBiot](在本文中称为BCY10794);和

[0237] A-(SEQ ID NO:9)-A(在本文中称为BCY10349),如:

[0238] A-(SEQ ID NO:9)-A-[Sar6]-[KBiot](在本文中称为BCY10794)。

[0239] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列均包含6个氨基酸,氨基酸序列包含:

[0240] C_i SIMYSPC $_{ii}$ EHPHN C_{iii} (SEQ ID NO:68);

[0241] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0242] 在一个实施方案中,本发明的肽不是SEQ ID NO:68。

[0243] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列均包含6个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0244] A-(SEQ ID NO:68)-A(在本文中称为BCY10362)。

[0245] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含8个氨基酸,第二个包含3个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

[0246] C_i DKWEPDHL C_{ii} YWW C_{iii} (SEQ ID NO:69);

[0247] C_i DAWPETHV C_{ii} YWW C_{iii} (SEQ ID NO:70);和

[0248] C_i DEYTPHEL C_{ii} YWW C_{iii} (SEQ ID NO:71);

[0249] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0250] 在一个实施方案中,本发明的肽不是SEQ ID NO:69-71中的一种或多种或全部。

[0251] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸

残基,所述两个环序列的第一个包含8个氨基酸,第二个包含3个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0252] A-(SEQ ID NO:69)-A(在本文中称为BCY10332);

[0253] A-(SEQ ID NO:70)-A(在本文中称为BCY10717);和

[0254] A-(SEQ ID NO:71)-A(在本文中称为BCY10718)。

[0255] 在一个可选的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含8个氨基酸,第二个包含3个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

[0256] C_i DYSPWWHPC_{ii}NHIC_{iii}(SEQ ID NO:10),

[0257] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0258] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含8个氨基酸,第二个包含3个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0259] [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO:10)-A(在本文中称为BCY11369);和

[0260] A-(SEQ ID NO:10)-A(在本文中称为BCY10331),如:

[0261] [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO:10)-A(在本文中称为BCY11369)。

[0262] 在一个实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含8个氨基酸,第二个包含4个氨基酸,并且氨基酸序列包含:

[0263] C_i WINYSISPC_{ii}YVGEC_{iii}(SEQ ID NO:72);和

[0264] C_i RYEYPEHLC_{ii}YTWQC_{iii}(SEQ ID NO:73);

[0265] 其中 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,或其修饰衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0266] 在一个实施方案中,本发明的肽不是SEQ ID NO:72-73之一或两者。

[0267] 在一个进一步的实施方案中,所述环序列包含被两个环序列隔开的三个半胱氨酸残基,所述两个环序列的第一个包含8个氨基酸,第二个包含4个氨基酸,并且氨基酸序列具有N-末端和/或C-末端修饰并包含:

[0268] A-(SEQ ID NO:72)-A(在本文中称为BCY10334);和

[0269] A-(SEQ ID NO:73)-A(在本文中称为BCY10719)。

[0270] 在一个更进一步的实施方案中,氨基酸序列选自BCY10551、BCY10552、BCY10479、BCY11371、BCY10482、BCY10549、BCY11501、BCY10550、BCY10794和BCY11369。在基于OX40细胞的试验中测试了该实施方案的肽,证明了良好的OX40激动作用(见表2)。

[0271] 在一个更进一步的实施方案中,氨基酸序列选自BCY10551、BCY11371和BCY10549。此类肽在基于OX40细胞的试验中表现出小于100nM的 EC_{50} 值,表现出特别高水平的激动作用(见表2)。

[0272] 在一个更进一步的实施方案中,氨基酸序列是BCY10549。当该肽以四聚体形式与链霉亲和素结合时,在基于OX40细胞的试验中表现出小于20nM的 EC_{50} 值,并表现出高水平的OX40激动作用(见图1和表2)。

[0273] 在一个可选的实施方案中,氨基酸序列是BCY11607。

[0274] 在一个可选的实施方案中,氨基酸序列是BCY12708。

[0275] 在一个进一步的实施方案中,药学上可接受的盐选自游离酸或钠、钾、钙或铵盐。

[0276] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义,如肽化学、细胞培养和噬菌体展示、核酸化学和生物化学领域。分子生物学、遗传和生化方法使用了标准技术(参见Sambrook等人,Molecular Cloning: A Laboratory Manual,第3版,2001,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY;Ausubel等人,Short Protocols in Molecular Biology(1999),第4版,John Wiley&Sons,Inc.),其通过引用并入本文。

[0277] 编号

[0278] 当提及本发明的肽内的氨基酸残基位置时,由于其不变而从编号中省略了半胱氨酸残基(C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii}),因此,本发明的肽内的氨基酸残基的编号参照如下:

[0279] $-C_i-I_1-L_2-W_3-C_{ii}-N_4-P_5-E_6-P_7-H_8-D_9-E_{10}-C_{iii}-$ (SEQ ID NO:1)。

[0280] 为了该描述的目的,假定所有双环肽都与1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA)环化并产生三取代的结构。与TATA的环化发生在 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii} 上。

[0281] 分子形式

[0282] 双环核心序列的N-或C-末端延伸区添加于序列的左侧或右侧,以连字符分隔。例如,N-末端的生物素-G-Sar₅尾巴将表示为:

[0283] [Biot]-G-[Sar5]-A-(SEQ ID NO:X)。

[0284] 反向肽序列

[0285] 根据Nair等人(2003),J Immunol 170(3),1362-1373中的公开,设想本文公开的肽序列也将以其逆-反形式使用。例如,该序列逆转(即N-末端变为C-末端,反之亦然),其立体化学同样也逆转(即D-氨基酸变为L-氨基酸,反之亦然)。

[0286] 肽配体的定义

[0287] 如本文所指的,肽配体是指与分子支架共价结合的肽(peptide)、肽(peptidic)或拟肽(peptidomimetic)。通常,这样的肽、肽或拟肽包含具有天然或非天然氨基酸的肽、两个或更多个能够与支架形成共价键的反应性基团(即半胱氨酸残基)、和在所述反应性基团之间对向存在的序列,所述序列因为当所述肽、肽或拟肽与所述支架结合时形成环而被称为环序列。在本案例中,所述肽、肽或拟肽包含至少三个半胱氨酸残基(在本文中称为 C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii}),并且在所述支架上形成至少两个环。

[0288] 肽配体的优点

[0289] 本发明的某些双环肽具有许多有利的性质,其使它们被认为是适合注射、吸入、鼻、眼、口服或局部施用的类药物分子。这样的有利的性质包括:

[0290] -物种交叉反应性。这是临床前药效学和药代动力学评估的典型要求;

[0291] -蛋白酶稳定性。双环肽配体应当在大多数情况下表现出对血浆蛋白酶、上皮(“膜锚定的”)蛋白酶、胃和肠蛋白酶、肺表面蛋白酶、细胞内蛋白酶等的稳定性。蛋白酶的稳定性应当在不同物种之间保持,使得可以在动物模型中开发双环肽先导候选物,并可以有把握地对人施用;

[0292] -理想的溶解度曲线。其是带电荷的和亲水的残基相对于疏水的残基的比例和分子内/分子间氢键的函数,其对于制剂和吸收目的很重要;和

[0293] -在循环中最佳的血浆半衰期。根据临床适应症和治疗方案,可能需要开发具有短的或长的体内暴露时间的双环肽,以管理慢性或急性疾病状态。最佳暴露时间将由持续暴露的要求(以获得最大治疗效率)与短的暴露时间的要求来控制,以最小化持续暴露于药剂而引起的毒理学效应。

[0294] 药学上可接受的盐

[0295] 应当理解,盐形式在本发明的范围内,并且提及肽配体包括所述配体的盐形式。

[0296] 本发明的盐可以通过常规化学方法由包含碱性或酸性部分的母体化合物合成,如 *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (编辑), Camille G. Wermuth (编辑), ISBN: 3-90639-026-8, 精装, 388页, 2002年8月中所述的方法。通常,这样的盐可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与合适的碱或酸在水中或在有机溶剂中、或在两者的混合物中反应来制备。

[0297] 可以用很多种无机和有机酸形成酸加成盐(单盐或二盐)。酸加成盐的示例包括与酸形成的单盐或二盐,所述酸选自乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、藻酸、抗坏血酸(例如L-抗坏血酸)、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、丁酸、(+)-樟脑、樟脑磺酸、(+)-(1S)-樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、肉桂酸、柠檬酸、环己氨磺酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡庚糖酸、D-葡萄糖糖酸、葡糖醛酸(例如D-葡糖醛酸)、谷氨酸(例如L-谷氨酸)、 α -氧代戊二酸、乙醇酸、马尿酸、氢卤酸(例如氢溴酸、盐酸、氢碘酸)、羟基乙磺酸、乳酸(例如(+)-L-乳酸、(±)-DL-乳酸)、乳糖酸、马来酸、苹果酸、(-)-L-苹果酸、丙二酸、(±)-DL-扁桃酸、甲磺酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸、1-羟基-2-萘酸、烟酸、硝酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、扑酸、磷酸、丙酸、丙酮酸、L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、鞣酸、(+)-L-酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、十一碳烯酸和戊酸,以及酰化的氨基酸和阳离子交换树脂。

[0298] 一组特别的盐由以下形成的盐组成:乙酸、盐酸、氢碘酸、磷酸、硝酸、硫酸、柠檬酸、乳酸、琥珀酸、马来酸、苹果酸、羟基乙磺酸、富马酸、苯磺酸、甲苯磺酸、硫酸、甲磺酸(mesylate)、乙磺酸、萘磺酸、戊酸、丙酸、丁酸、丙二酸、葡糖醛酸和乳糖酸。一种特别的盐是盐酸盐。另一种特别的盐是乙酸盐。

[0299] 如果化合物是阴离子的,或具有可以是阴离子的官能团(例如-COOH可以是-COO⁻),则可以与有机或无机碱形成盐,生成合适的阳离子。合适的无机阳离子的示例包括但不限于:碱金属离子如Li⁺、Na⁺和K⁺,碱土金属阳离子如Ca²⁺和Mg²⁺,和其他阳离子如Al³⁺或Zn⁺。合适的有机阳离子的示例包括但不限于铵离子(即NH₄⁺)和被取代的铵离子(例如NH₃R⁺、NH₂R₂⁺、NHR₃⁺和NR₄⁺)。一些合适的被取代的铵离子的示例是那些衍生自以下的:甲胺、乙胺、二乙胺、丙胺、二环己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、苄胺、苯基苄胺、胆碱、葡甲胺和氨丁三醇,以及氨基酸,如赖氨酸和精氨酸。常见的季铵离子的一个示例是N(CH₃)₄⁺。

[0300] 当本发明的肽包含胺官能团时,其可以例如根据技术人员众所周知的方法与烷基化剂反应而形成季铵盐。这样的季铵化合物在本发明的肽的范围内。

[0301] 修饰衍生物

[0302] 应当理解,本文所定义的肽配体的修饰衍生物在本发明的范围内。这样的合适的修饰衍生物的示例包括选自以下的一种或多种修饰:N-末端和/或C-末端修饰;用一个或多

个非天然氨基酸残基替换一个或多个氨基酸残基(如用一个或多个电子等排的或等电子的氨基酸替换一个或多个极性氨基酸残基;用其它非天然电子等排的或等电子的氨基酸替换一个或多个非极性氨基酸残基);间隔基团的添加;用一个或多个抗氧化氨基酸残基替换一个或多个对氧化敏感的氨基酸残基;用一种或多种替换氨基酸如丙氨酸替换一个或多个氨基酸残基,用一个或多个D-氨基酸残基替换一个或多个L-氨基酸残基;双环肽配体中一个或多个酰胺键的N-烷基化;用替代键替换一个或多个肽键;肽骨架长度的修饰;用另一个化学基团取代一个或多个氨基酸残基的 α -碳上的氢,用合适的胺、硫醇、羧酸和酚反应性试剂修饰氨基酸如半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸/天冬氨酸和酪氨酸)以官能化所述氨基酸,以及引入或替换引入适合于官能化的正交反应活性的氨基酸,例如带有叠氨基或炔基的氨基酸,其分别允许用带有炔基或叠氨基的部分进行官能化。

[0303] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包含N-末端和/或C-末端修饰。在一个进一步的实施方案中,其中所述修饰衍生物包含使用合适的氨基反应性化学的N-末端修饰和/或使用合适的羧基反应性化学的C-末端修饰。在一个进一步的实施方案中,所述N-末端或C-末端修饰包括添加效应基团,所述效应基团包括但不限于细胞毒性剂、放射螯合剂或发色团。

[0304] 在一个进一步的实施方案中,所述修饰衍生物包含N-末端修饰。在一个进一步的实施方案中,所述N-末端修饰包含N-末端乙酰基。在该实施方案中,在肽合成过程中,N-末端残基被乙酸酐或其它合适的试剂封端,导致分子被N-末端乙酰化。该实施方案提供了去除氨基肽酶的潜在识别点的优点,并避免了所述双环肽降解的可能性。

[0305] 在一个可选的实施方案中,所述N-末端修饰包括添加分子间隔基团,其促进效应基团的偶联和保持所述双环肽对其靶标的效力。

[0306] 在一个进一步的实施方案中,所述修饰衍生物包含C-末端修饰。在一个进一步的实施方案中,所述C-末端修饰包含酰胺基。在该实施方案中,在肽合成过程中,C-末端残基被合成为酰胺,导致分子被C-末端酰胺化。该实施方案提供了去除羧肽酶的潜在识别点的优点,并降低了所述双环肽的蛋白水解降解的可能性。

[0307] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个非天然氨基酸残基替换一个或多个氨基酸残基。在该实施方案中,可以选择具有电子等排的/等电子的侧链的非天然氨基酸,其既不被降解蛋白酶识别,也不对靶标效力产生任何不利影响。

[0308] 可选地,可以使用具有受约束的氨基酸侧链的非天然氨基酸,使得附近的肽键的蛋白水解在构象和空间上受到阻碍。特别地,其涉及脯氨酸类似物、大型侧链、 α -二取代的衍生物(例如氨基异丁酸(Aib))和环氨基酸,一个简单的衍生物是氨基-环丙基羧酸。

[0309] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括添加间隔基团。在一个进一步的实施方案中,所述修饰衍生物包括向N-末端半胱氨酸(C_i)和/或C-末端半胱氨酸(C_{iii})添加间隔基团。

[0310] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个抗氧化氨基酸残基替换一个或多个对氧化敏感的氨基酸残基。在一个进一步的实施方案中,所述修饰衍生物包括用萘丙氨酸或丙氨酸残基替换色氨酸残基。该实施方案提供了改善所得双环肽配体的药物稳定性特征的优点。

[0311] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个疏水氨基酸残基替换一个

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

[0312] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括用一个或多个D-氨基酸残基替换一个或多个L-氨基酸残基。该实施方案被认为通过空间位阻和通过D-氨基酸稳定 β -转角构象的倾向来增加蛋白水解稳定性(Tugyi等人(2005),PNAS,102(2),413-418)。

[0313] 在一个实施方案中,所述修饰衍生物包括去除任何氨基酸残基并用丙氨酸(如D-丙氨酸)取代。该实施方案提供了鉴定关键结合残基和去除潜在的蛋白水解进攻位点的优点。

[0314] 应当指出的是,每个上述修饰用于有意地改善所述肽的效力或稳定性。通过修饰,可以通过以下机制进一步提高效力:

[0315] -并入利用疏水作用并导致较低的解离速率的疏水部分,使得实现更高的亲和力;

[0316] -并入利用长距离离子相互作用的带电基团,导致更快的结合速率和更高的亲和力(参见例如Schreiber等人,Rapid,electrostatically assisted association of proteins(1996),Nature Struct.Biol.3,427-31);和

[0317] -将附加的约束并入肽中,例如通过正确地约束氨基酸的侧链使得在靶结合时熵的损失最小,通过限制骨架的扭转角使得在靶结合时熵的损失最小,

[0318] 和出于相同的原因在分子中引入另外的环化。

[0319] (综述见Gentilucci等人,Curr.Pharmaceutical Design 16,3185-203和Nestor等人(2009),Curr.Medicinal Chem 16,4399-418)。

[0320] 同位素变体

[0321] 本发明包括本发明的所有药学上可接受的(放射性)同位素标记的肽配体,其中一个或多个原子被具有相同原子序数但原子质量或质量数不同于通常自然界中存在的原子质量或质量数的原子替换,和本发明的肽配体,其中连接金属螯合基团(称为“效应子”),其能够持有相关的(放射性)同位素,和本发明的肽配体,其中某些官能团被相关的(放射性)同位素或同位素标记的官能团共价取代。

[0322] 适用于包含在本发明的肽配体中的同位素的示例包括氢同位素如 ^2H (D)和 ^3H (T),碳同位素如 ^{11}C 、 ^{13}C 和 ^{14}C ,氯同位素如 ^{36}Cl ,氟同位素如 ^{18}F ,碘同位素如 ^{123}I 、 ^{125}I 和 ^{131}I ,氮同位素如 ^{13}N 和 ^{15}N ,氧同位素如 ^{15}O 、 ^{17}O 和 ^{18}O ,磷同位素如 ^{32}P ,硫同位素如 ^{35}S ,铜同位素如 ^{64}Cu ,镓同位素如 ^{67}Ga 或 ^{68}Ga ,钇同位素如 ^{90}Y ,和镥同位素如 ^{177}Lu ,和铋同位素如 ^{213}Bi 。

[0323] 本发明的某些同位素标记的肽配体,例如并入放射性同位素的那些,可用于药物和/或底物的组织分布研究,和用于在临床上评估患病组织上DLL3靶标的存在和/或不存在的存在。本发明的肽配体进一步可以具有有价值的诊断特性,其可用于检测或鉴定标记的化合物与其它分子、肽、蛋白质、酶或受体之间的复合物的形成。检测或鉴定方法可以使用用标记剂标记的化合物,所述标记剂如放射性同位素、酶、荧光物质、发光物质(例如鲁米诺、鲁

米诺衍生物、荧光素、水母发光蛋白和荧光素酶)等。放射性同位素氚即³H(T)和碳-14即¹⁴C,由于其易于并入和现成的检测方法而对于这一目的特别有用。

[0324] 用更重的同位素如氘即²H(D)取代,可以由于更大的代谢稳定性而提供某些治疗优势,例如增加的体内半衰期或减少的剂量要求,因此在某些情况下可能是优选的。

[0325] 用正电子发射同位素如¹¹C、¹⁸F、¹⁵O和¹³N取代,可以用于正电子发射成像(PET)研究以检查靶标占有率。

[0326] 本发明的肽配体的同位素标记的化合物通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过与其所附实施例中描述的那些方法类似的方法,使用合适的同位素标记的试剂代替之前采用的非标记的试剂来制备。

[0327] 分子支架

[0328] 在一个实施方案中,分子支架包括非芳香族分子支架。本文提及的“非芳香族分子支架”是指不包含芳香族(即不饱和)碳环或杂环系统的如本文所定义的任何分子支架。

[0329] 非芳香族分子支架的合适示例描述于Heinis等人(2014),*Angewandte Chemie, International Edition* 53(6),1602-1606中。

[0330] 如上述文档中所提及,所述分子支架可以是小分子,如有机小分子。

[0331] 在一个实施方案中,所述分子支架可以是高分子。在一个实施方案中,所述分子支架是由氨基酸、核苷酸或碳水化合物组成的大分子。

[0332] 在一个实施方案中,所述分子支架包含能够与多肽的官能团反应以形成共价键的反应性基团。

[0333] 所述分子支架可以包含与肽形成连接的化学基团,如胺、硫醇、醇、酮、醛、腈、羧酸、酯、烯烃、炔烃、叠氮化物、酸酐、琥珀酰亚胺、马来酰亚胺、烷基卤和酰基卤。

[0334] 含有 $\alpha\beta$ 不饱和羰基的化合物的一个示例是1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA)(*Angewandte Chemie International Edition*(2014),53(6),1602-1606)。

[0335] 多聚结合复合物

[0336] 根据本发明的一个方面,提供了多聚结合复合物,其包含至少两个肽配体,其中至少一个肽配体如本文所定义是OX40特异性的,并且所述肽配体可以是相同的或不同的,其各自包含多肽和分子支架,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个反应性基团,并且所述分子支架与所述多肽的反应性基团形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

[0337] 本发明描述了一系列多聚化双环肽,其具有各种长度和刚性的各种化学接头和铰链,所述接头和铰链使用所述双环肽内的不同连接位点,所述双环肽以广泛的效力和功效结合并激活靶标(如OX40)。

[0338] 本领域技术人员将理解,本发明的概念是认识到,与含有单个双环肽的相应单体结合复合物相比,多重排列的(多聚)双环肽凭借所述多聚结合复合物的所得特性而提供协同益处。例如,本发明的多聚结合复合物通常比其单体对应物具有更高水平的结合效力或功能活性(如本文中通过EC₅₀值测量的)。此外,本发明的多聚结合复合物被设计成足够小以被肾脏清除。

[0339] 本发明的复合物特别适用于治疗癌症。因此,在一个实施方案中,至少一种所述肽

配体对存在于T细胞或癌细胞上的表位具有特异性。在一个进一步的实施方案中,每个所述肽配体对存在于T细胞或癌细胞上的表位具有特异性。

[0340] 在一个具体的实施方案中,至少一种所述肽配体对OX40具有特异性,并且至少一种所述另外的肽配体结合免疫细胞上的另外的组分。在一个进一步的实施方案中,所述免疫细胞上的另外的组分是CD137。因此,在一个更进一步的实施方案中,至少一种所述肽配体包含结合CD137的肽配体。

[0341] 在另外的实施方案中,至少一种所述肽配体对OX40具有特异性,并且至少一种所述另外的肽配体结合存在于癌细胞上的组分。因此,在某些实施方案中,本发明的多聚化肽包含至少一种对OX40具有特异性的肽配体、至少一种与存在于癌细胞上的组分结合的肽配体和任选地至少一种与免疫细胞上的组分结合的肽配体。在另外的实施方案中,本发明的多聚化肽包含至少一种对OX40具有特异性的肽配体、至少一种与免疫细胞上的另外的组分结合的肽配体和任选地至少一种与存在于癌细胞上的组分结合的肽配体。

[0342] 在进一步的实施方案中,所述免疫细胞选自:白细胞;淋巴细胞(例如T淋巴细胞或T细胞、B细胞或自然杀伤细胞);CD8或CD4;CD4;树突细胞、滤泡树突细胞和粒细胞。在具体的实施方案中,至少一种所述肽配体对OX40具有特异性,并且所述免疫细胞是CD4 T细胞。在进一步的实施方案中,所述免疫细胞选自CD4 T细胞和CD8细胞。在更进一步的实施方案中,所述免疫细胞选自CD4T细胞和另一种免疫细胞。

[0343] 不受理论的束缚,据信,多聚化肽能够通过同源交联一个以上的相同受体来激活受体。因此,在一个实施方案中,所述肽配体对同一靶标具有特异性。在一个进一步的实施方案中,多聚结合复合物包含至少两个相同的肽配体。“相同”是指具有相同氨基酸序列的肽,最重要的是,相同的氨基酸序列是指所述肽的结合部分(例如,序列在连接位置上可能不同)。在该实施方案中,多聚结合复合物中的每个肽将与同一靶标上的相同表位结合——因此所得靶标结合复合物将产生同源二聚体(如果多聚复合物包含两个相同的肽)、同源三聚体(如果多聚复合物包含三个相同的肽)或同源四聚体(如果多聚复合物包含四个相同的肽)等。

[0344] 在一个可选的实施方案中,多聚结合复合物包含至少两个不同的肽配体。“不同”是指肽具有不同的氨基酸序列。在该实施方案中,多聚结合复合物中的不同肽配体将与同一靶标上的不同表位结合——因此所得靶标结合复合物将产生双互补位(如果多聚复合物包含两个不同的肽)、三互补位(如果多聚复合物包含三个不同的肽)或四互补位(如果多聚复合物包含四个不同的肽)等。

[0345] 不受理论束缚,据信,多聚化肽能够通过异源交联不同靶标(如不同靶标受体)来激活受体。因此,在一个实施方案中,所述肽配体对不同的靶标具有特异性。应当理解,在该实施方案中,多聚结合复合物包含至少两种不同的肽配体(即具有不同氨基酸序列的肽配体)。在该实施方案中,多聚结合复合物中的每个肽将结合不同靶标上的不同表位——因此所得靶标结合复合物将产生双特异性多聚结合复合物(如果多聚复合物包含两种不同的肽)、三特异性多聚结合复合物(如果多聚复合物包含三种不同的肽)、四特异性多聚结合复合物(如果多聚复合物包含四种不同的肽)等。

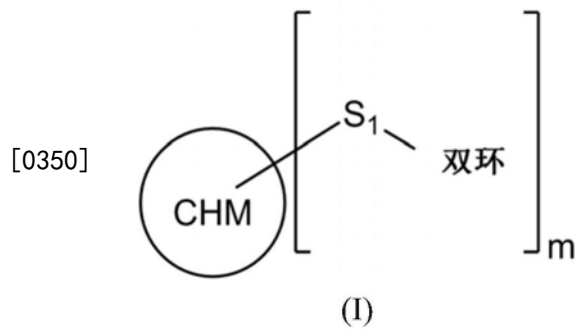
[0346] 将理解的是,本发明的多聚结合复合物可以设计成能够结合一系列不同的靶标(如受体)。合适的例子包括癌症中涉及的任何靶标(即受体),如TNF受体超家族的成员(即

CD137)、受体酪氨酸激酶(RTK)、Ig结构域受体(免疫检查点)等。将理解的是,上文提及的双、三和四特异性多聚结合复合物可以结合至少两种不同细胞(如T、NK或其他免疫细胞)上的靶标。

[0347] 本发明的多聚结合复合物中的肽可以通过多种不同的选项进行组装。例如,可以有一个中央铰链或分支部分,间隔或臂(arm)元件从所述铰链或分支点放射出来,其中各自将含有一个肽。可选地,可以设想一个圆形支撑构件可以支持多个向内或向外突出的肽。

[0348] 在一个实施方案中,每个肽配体通过间隔基团连接至中央铰链部分。

[0349] 应当理解,间隔基团可以是直链的,并且将单个肽与中央铰链部分连接。因此,在一个实施方案中,多聚结合复合物包含式(I)的化合物:



[0351] 其中CHM表示中央铰链部分;

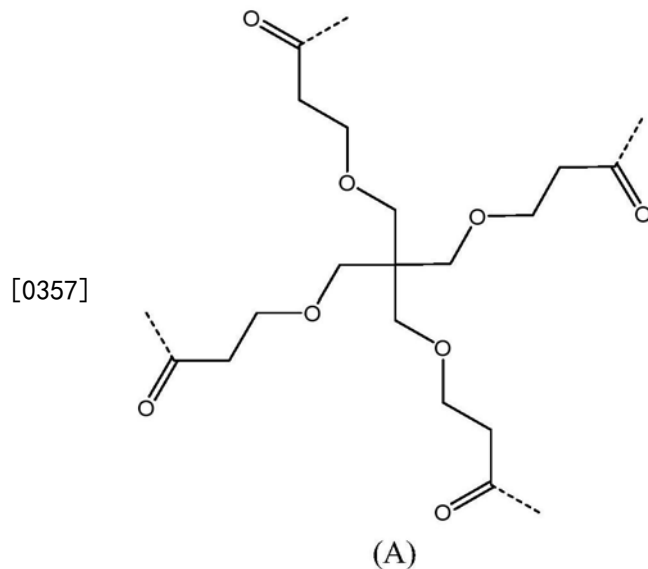
[0352] S₁表示间隔基团;

[0353] 双环表示如本文所定义的肽配体;和

[0354] m表示选自2至10的整数。

[0355] 在一个实施方案中,m表示选自3至10的整数。在一个进一步的实施方案中,m表示选自3或4的整数。

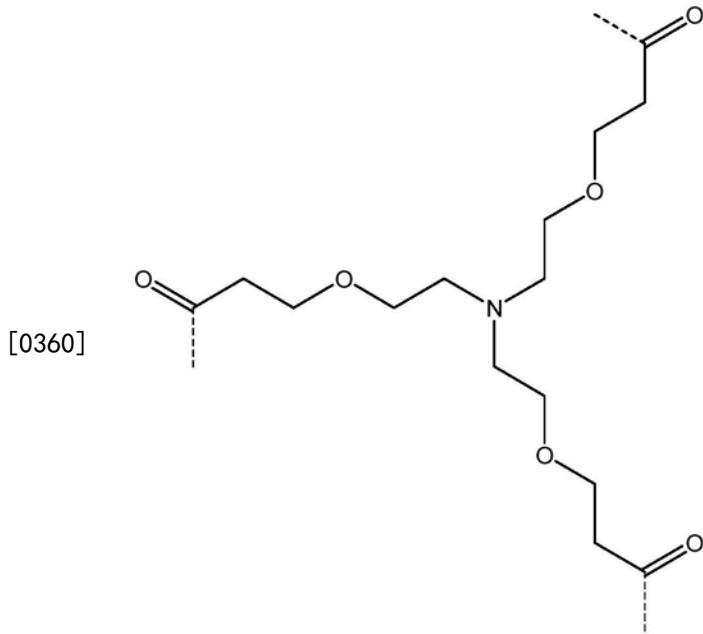
[0356] 当m表示4时,将理解的是,中央铰链部分将需要4个连接位点。因此,在一个实施方案中,m表示4,并且CHM是式(A)的基序:



[0358] 其中“-----”表示与每个S₁基团的连接位点。

[0359] 当m表示3时,将理解的是,中央铰链部分将需要3个连接位点。因此,在一个实施方

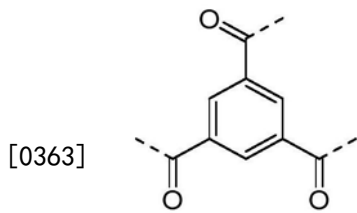
案中, m 表示3, 并且CHM是式 (B) 的基序:



(B)

[0361] 其中“-----”表示与每个 S_1 基团的连接位点。

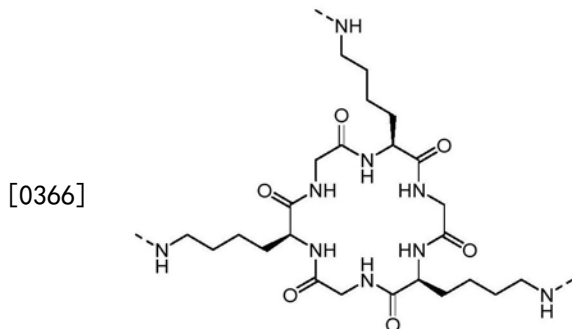
[0362] 在一个可选的实施方案中, m 表示3, 并且CHM是式 (C) 的基序:



(C)

[0364] 其中“-----”表示与每个 S_1 基团的连接位点。

[0365] 在一个可选的实施方案中, m 表示3, 并且CHM是式 (D) 的基序:



(D)

[0367] 其中“-----”表示与每个 S_1 基团的连接位点。

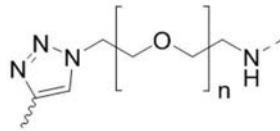
[0368] 如何根据 m 的值来构建可选的中央铰链部分对于本领域技术人员是显然的。

[0369] 将理解的是, 间隔 (S_1) 可以是任何合适的将肽中央铰链部分连接到肽的结构。在一个实施方案中, 间隔 (S_1) 包含三唑基部分。该实施方案的优点是三唑基部分可以使用通

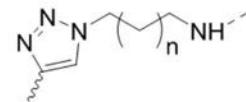
常可用的“点击”化学合并到合成中。合适的间隔 (S_1) 基团的例子包括一个或多个PEG部分、肽序列、碳水化合物、脂质等。

[0370] 在一个进一步的实施方案中,间隔 (S_1) 包含一个或多个PEG部分。本文中对“PEG”的提及是指具有一般结构的规则重复单元的直链聚合物: $(CH_2CH_2O)_n$ - (其中n表示任何数字,如1至30)。

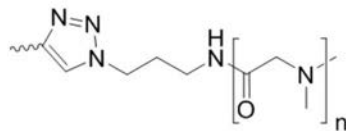
[0371] 因此,在一个进一步的实施方案中,间隔 (S_1) 选自间隔 S_{1A} 、 S_{1B} 、 S_{1C} 、 S_{1D} 、 S_{1E} 、 S_{1F} 、 S_{1G} 和 S_{1H} 中的任一种:



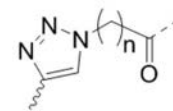
S_{1A}
n = 5, 10 和 23



S_{1E}
n = 1

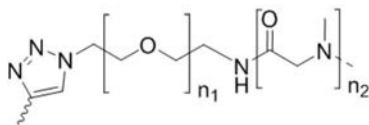


S_{1B}
n = 5, 10

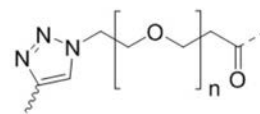


S_{1F}
n = 1

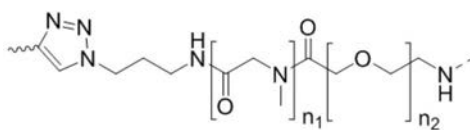
[0372]



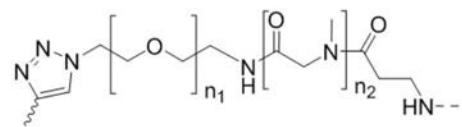
S_{1C}
 $n_1 = 5, n_2 = 5$
 $n_1 = 10, n_2 = 10$



S_{1G}
n = 5 和 10



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



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

[0373] 其中“-----”表示与CHM基团的连接位点;和

[0374] “~~~~~”表示与双环基团的连接位点。

[0375] 在一个更进一步的实施方案中,间隔 (S_1) 是 S_{1A} 。

[0376] 四聚体

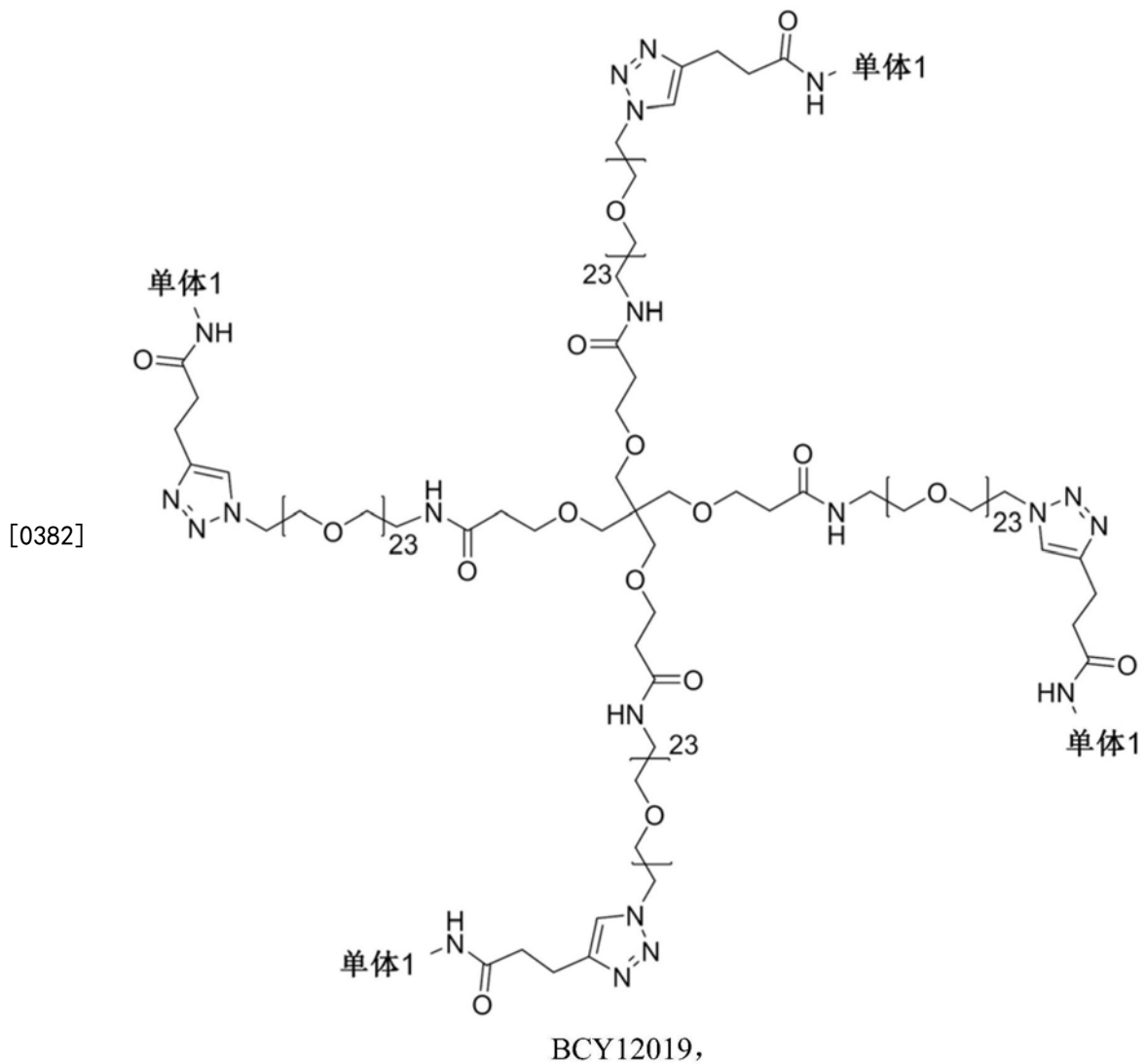
[0377] 在一个实施方案中,多聚结合复合物包含下表1中描述的四聚结合复合物:

[0378] 表1:示例性的本发明的四聚结合复合物

[0379] 多聚体化合物编号	对应单体	单体数量	中央铰链部分	间隔分子	连接位点
BCY12019	BCY11607	4	A (TET)	S ₁ A: n = 23	C-末端Lys(PYA)

[0380] 本文提供的数据表明,表1的四聚结合复合物显示出相对于单体OX40配体的EC₅₀改善(见表2)。

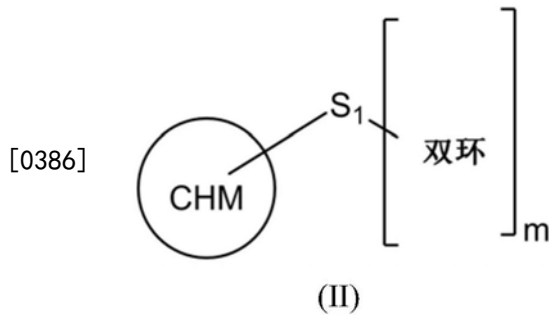
[0381] 在一个进一步的实施方案中,多聚结合复合物包含四聚体,所述四聚体包含四个双环肽,每个双环肽都是如本文所定义的BCY11607,其通过C-末端Lys(PYA)部分连接至间隔分子(S₁A),其中n表示23,并且其中(S₁A)连接至中心铰链部分,所述中心铰链部分为如本文所定义的(A)。该多聚结合复合物在本文中称为BCY12019:



[0383] 其中单体1表示BCY11607。

[0384] 本文在表2中提供的数据显示,与相应的生物素化单体(BCY10549)相比,激动作用几乎高出10倍。

[0385] 在一种可选的配置中,间隔基团可以是支链的,因此单个间隔基团可以将多个肽与中心铰链部分连接。因此,在一个可选的实施方案中,多聚结合复合物包含式(II)的化合物:



[0387] 其中CHM表示中央铰链部分；

[0388] S_1 表示间隔基团；

[0389] 双环表示如本文所定义的肽配体；和

[0390] m 表示选自2至10的整数。

[0391] 将理解的是，肽配体可以通过多种方式连接至间隔。在一个实施方案中，肽配体与结合对的一半偶联，并且所述结合对的所述另一半将每个肽连接至间隔。

[0392] 在一个实施方案中，所述结合对包含生物素和链霉亲和素。因此，每个肽配体都与生物素偶联，并通过链霉亲和素连接至间隔。

[0393] 异源串联 (heterotandem)

[0394] 在一个实施方案中，多聚结合复合物是异源串联双环肽复合物，其包括：

[0395] (a) 一个或多个如本文所定义的结合OX40的肽配体；通过接头偶联至

[0396] (b) 至少一个第二肽配体，其结合存在于癌细胞上的组分；

[0397] 其中，每个所述肽配体包含多肽和分子支架，所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个半胱氨酸残基，并且所述分子支架与所述多肽的半胱氨酸残基形成共价键，使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

[0398] 在一个进一步的实施方案中，多聚结合复合物是异源串联双环肽复合物，其包括：

[0399] (a) 如本文所定义的结合OX40的肽配体；通过接头偶联至

[0400] (b) 第二肽配体，其结合存在于癌细胞上的组分；

[0401] 其中，每个所述肽配体包含多肽和分子支架，所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个半胱氨酸残基，并且所述分子支架与所述多肽的半胱氨酸残基形成共价键，使得在分子支架上形成至少两个多肽环。

[0402] 本文对术语“癌细胞”的提及包括已知参与癌症的任何细胞。当负责调节细胞分裂的基因受损时，产生癌细胞。致癌作用 (carcinogenesis) 是由正常细胞遗传物质的突变和表观突变引起的，其破坏增殖和细胞死亡之间的正常平衡。这导致不受控制的细胞分裂和这些细胞在体内通过自然选择的进化。不受控制且通常是快速的细胞增殖，可以导致良性或恶性肿瘤 (癌症)。良性肿瘤不会扩散到身体的其他部位或侵入其他组织。恶性肿瘤可以侵入其他器官，扩散到远处 (转移) 并变得危及生命。

[0403] 在一个实施方案中，癌细胞选自HT1080、SC-0V-3、PC3、H1376、NCI-H292、LnCap、MC38、4T1-D02和RKO肿瘤细胞。

[0404] 在一个实施方案中，存在于癌细胞上的组分是EphA2。在一个进一步的实施方案中，第二肽配体包含结合EphA2的双环肽配体。

[0405] 在一个可选的实施方案中，存在于癌细胞上的组分是PD-L1。在一个进一步的实施

方案中,第二肽配体包含结合PD-L1的双环肽配体。

[0406] 在一个可选的实施方案中,存在于癌细胞上的组分是粘连蛋白-4(Nectin-4)。在一个进一步的实施方案中,第二肽配体包含结合粘连蛋白-4的双环肽配体。在一个更进一步的实施方案中,结合粘连蛋白-4的双环肽配体包含具有以下序列的氨基酸:

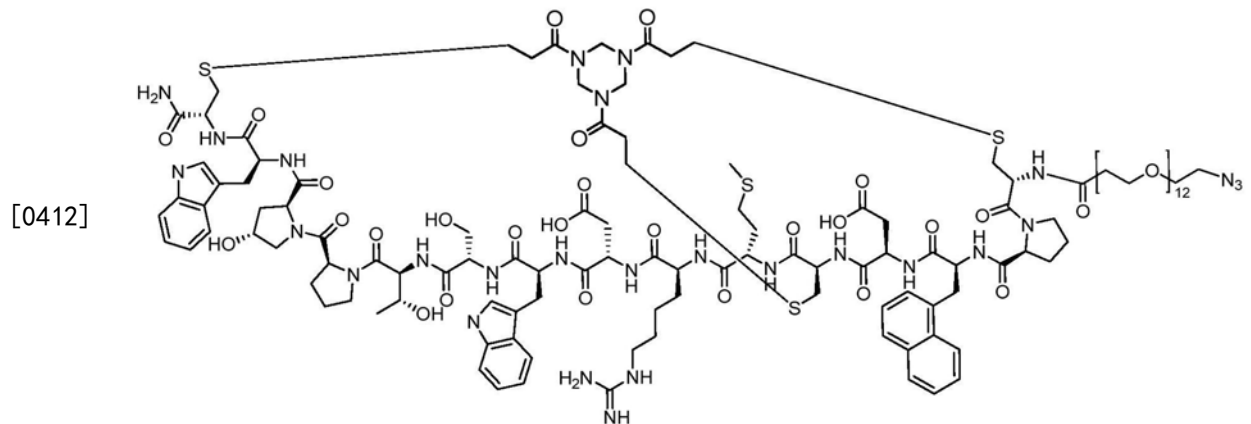
[0407] CP[1Na1][dD]CM[HArg]DWSTP[HyP]WC (SEQ ID NO:11;在下文中称为BCY8116),

[0408] 其中1Na1表示1-萘丙氨酸,HArg表示高精氨酸,HyP表示羟脯氨酸。

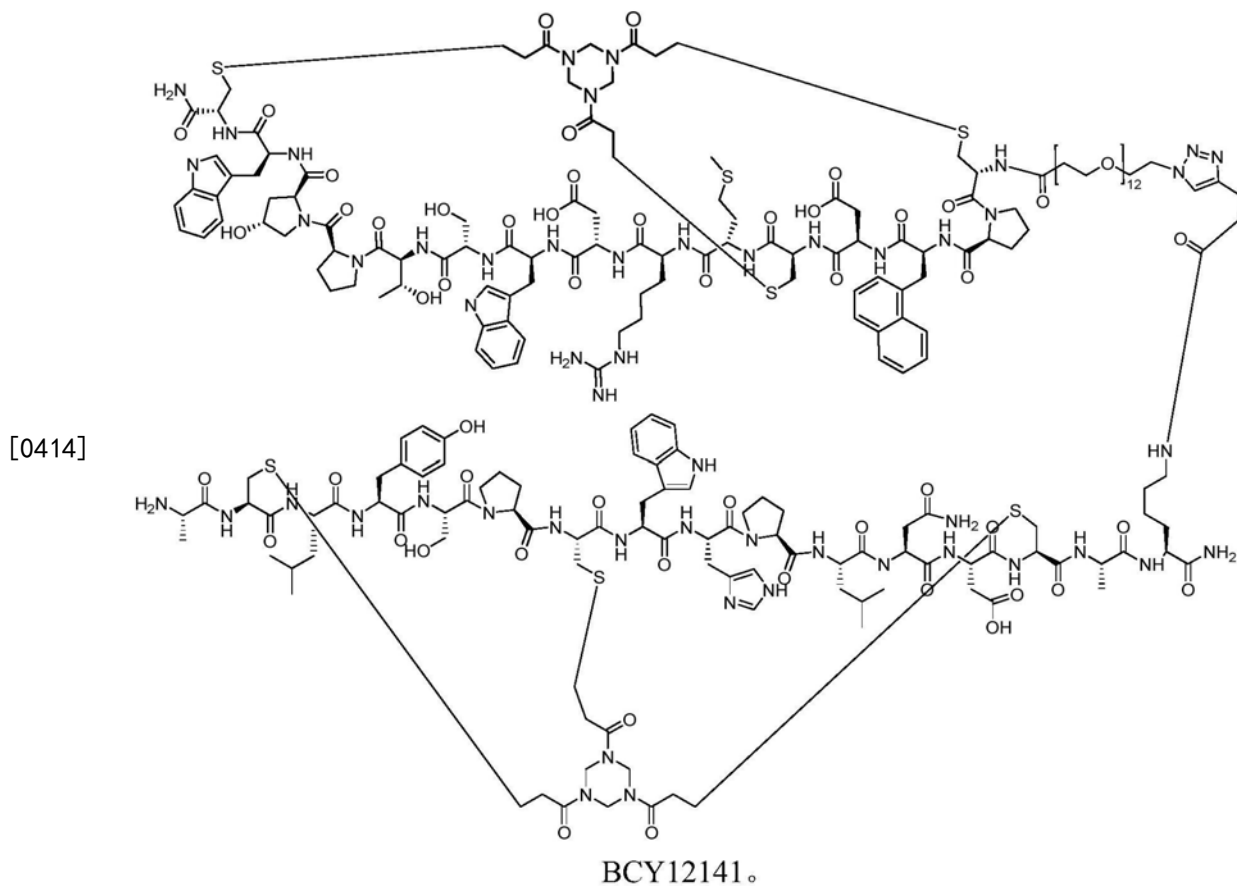
[0409] 在一个仍更进一步的实施方案中,结合粘连蛋白-4的双环肽配体选自BCY8116的PEG12衍生物、BCY8116的PEG5衍生物和BCY8116的三官能PEG3衍生物。

[0410] 在一个实施方案中,异源串联物包含一个结合OX40的肽和一个第二肽配体,所述第二肽配体与存在于癌细胞上的组分结合。在一个可选的实施方案中,异源串联物包含两个结合OX40的肽和一个第二肽配体,所述第二肽配体与存在于癌细胞上的组分结合。将理解的是,当异源串联物包含多于一个结合OX40的肽时,每个结合OX40的肽可以是相同序列或不同序列。在一个实施方案中,当异源串联物包含多于一个结合OX40的肽时,每个结合OX40的肽包含相同序列。

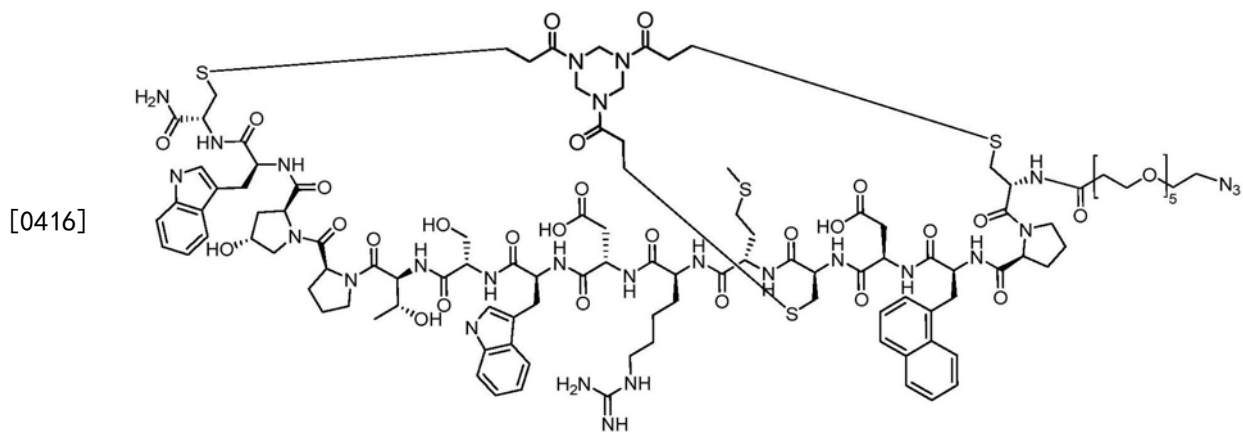
[0411] 在一个仍更进一步的实施方案中,结合OX40的肽配体是BCY11607,并且结合粘连蛋白-4的双环肽配体是BCY8116的PEG12衍生物,其具有以下结构:



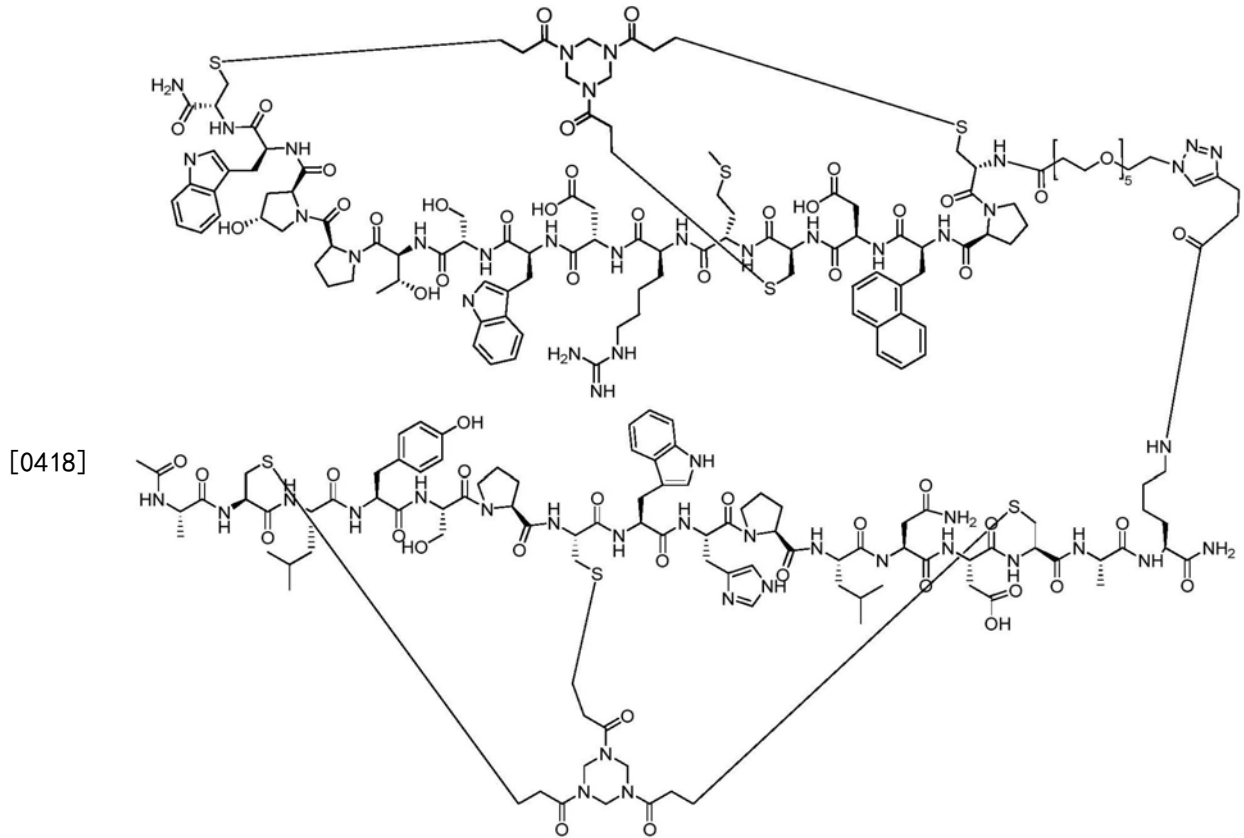
[0413] 并且得到的异源串联复合物具有以下结构:



[0415] 在一个可选的实施方案中,结合OX40的肽配体是BCY12708,并且结合粘连蛋白-4的双环肽配体是BCY8116的PEG5衍生物,其具有以下结构:

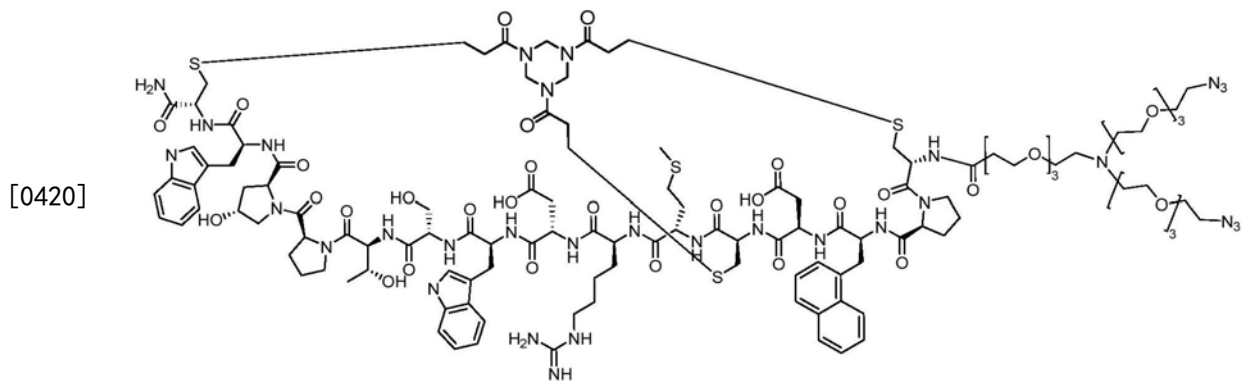


[0417] 并且得到的异源串联复合物具有以下结构:



BCY12721。

[0419] 在一个仍更进一步的实施方案中,结合OX40的肽配体是BCY11607,并且结合粘连蛋白-4的双环肽配体是BCY8116的三官能PEG3衍生物,其具有以下结构:

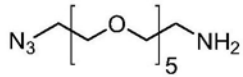


[0421] 并且得到的异源串联复合物具有以下结构:

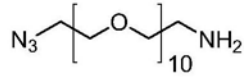
或可以有助于诱导靶受体之一或两者的寡聚化。

[0427] 在一个实施方案中,接头选自以下序列: $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{PEG}_5-$ 、 $-\text{PEG}_{10}-$ 、 $-\text{PEG}_{12}-$ 、 $-\text{PEG}_{23}-$ 、 $-\text{PEG}_{24}-$ 、 $-\text{PEG}_{15}-\text{Sar}_5-$ 、 $-\text{PEG}_{10}-\text{Sar}_{10}-$ 、 $-\text{PEG}_5-\text{Sar}_{15}-$ 、 $-\text{PEG}_5-\text{Sar}_5-$ 、 $-\text{B-Ala-Sar}_{20}-$ 、 $-\text{B-Ala-Sar}_{10}-\text{PEG}_{10}-$ 、 $-\text{B-Ala-Sar}_5-\text{PEG}_{15}-$ 和 $-\text{B-Ala-Sar}_5-\text{PEG}_5-$ 。

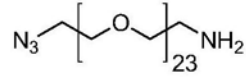
[0428] 合适的接头的结构表示详述如下:



H2N-Peg5-N3
COM00000132

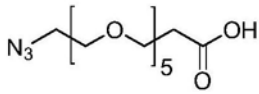


H2N-Peg10-N3
COM00000134

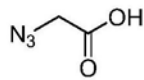


H2N-Peg23-N3
COM00000135

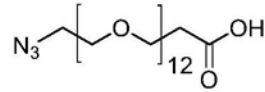
[0429]



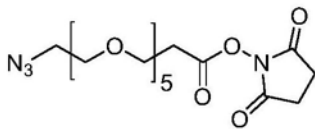
N3-PEG5-COOH
COM00000467



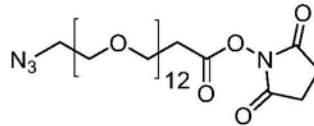
N3-CH2-COOH
COM00000468



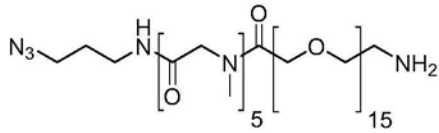
N3-PEG12-COOH
COM00000466



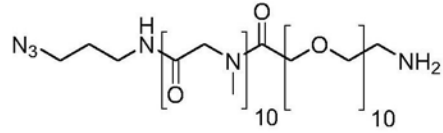
NHS-PEG5-N3



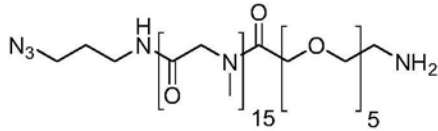
NHS-PEG12-N3



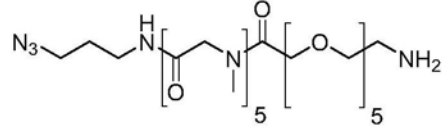
H2N-PEG15-SAR5-N3
COM00000128



H2N-PEG10-SAR10-N3
COM00000129

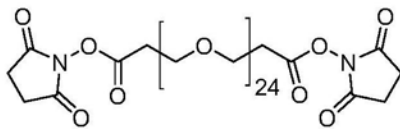


H2N-PEG5-SAR15-N3
COM00000130

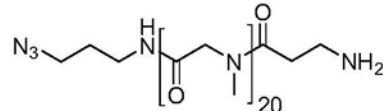


H2N-PEG5-SAR5-N3
COM00000131

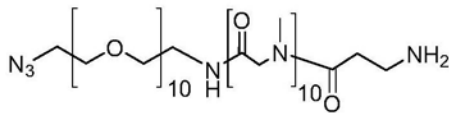
[0430]



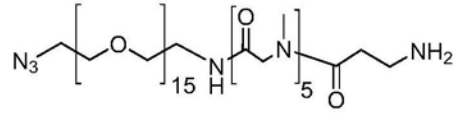
NHS-PEG24-NHS
COM00000469



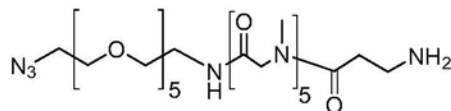
H2N-(B-Ala)-SAR20-N3
COM00000470



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



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

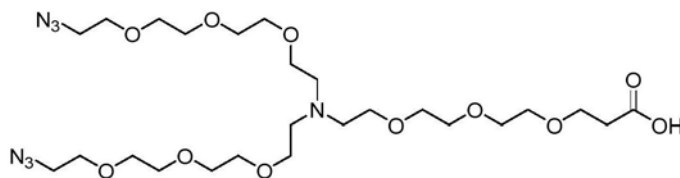


H2N-(B-Ala)-SAR5-PEG5-N3
COM00000473

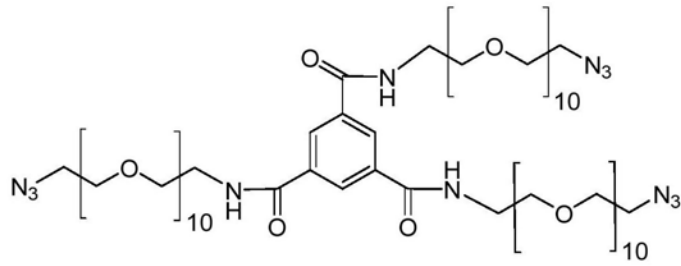
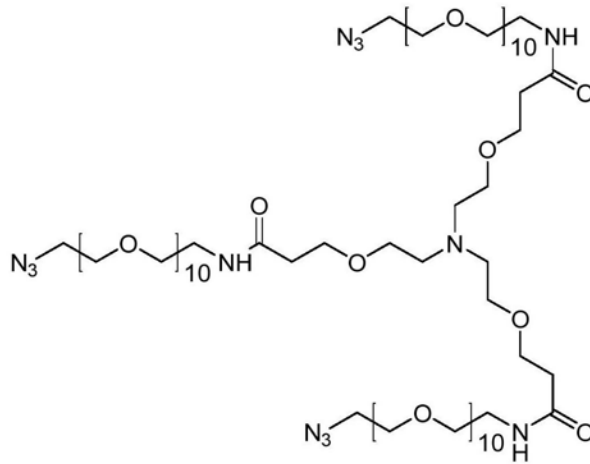
[0431] 在一个实施方案中,接头是支链接头,以允许在一端有一个第一肽而在另一端有两个或更多个第二肽。

[0432] 在一个进一步的实施方案中,支链接头选自:

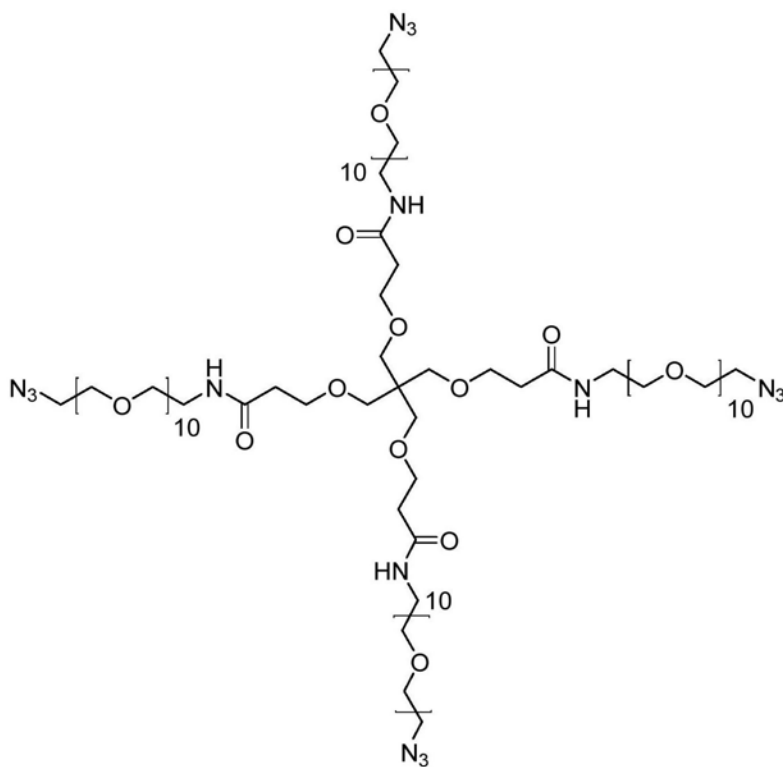
[0433]

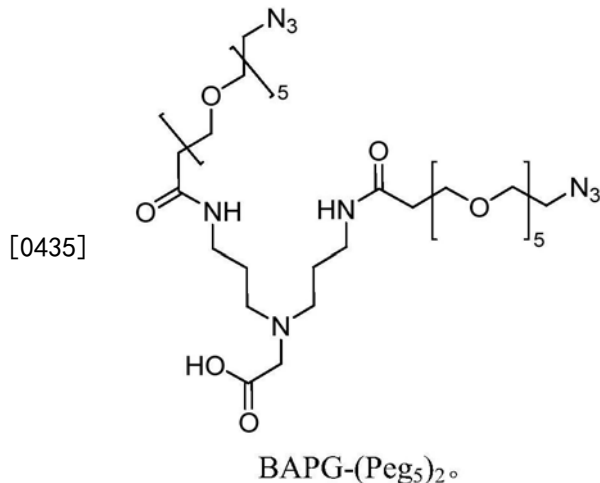


N-(酸-PEG₃)-N-双(PEG₃-叠氮化物):

三聚-[Peg₁₀]₃;TCA-[Peg₁₀]₃;

[0434]

Tet-[Peg₁₀]₄; 和



[0436] 在一个进一步的实施方案中,接头选自 N_3 -PEG₅-COOH、 N_3 -PEG₁₂-COOH和N-(酸-PEG₃)-N-双(PEG₃-叠氮化物)。

[0437] 合成

[0438] 本发明的肽可以通过标准技术合成制造,然后与分子支架在体外反应。进行此操作时,可以使用标准化学方法。这使得能够快速大规模地制备可溶性材料,以用于进一步的下游实验或验证。可以使用如Timmerman等人(同上)中公开的常规化学方法来完成这样的方法。

[0439] 因此,本发明还涉及如本文所述选择的多肽或偶联物的制造,其中所述制造包括如下所述的任选的进一步的步骤。在一个实施方案中,这些步骤在通过化学合成制备的最终产物多肽/偶联物上进行。

[0440] 制造偶联物或复合物时,目标多肽中的氨基酸残基可任选地被取代。

[0441] 肽也可以延伸,以并入例如另一个环并因此引入多种特异性。

[0442] 为了延伸所述肽,可以使用常规固相或溶液相化学方法,使用正交保护的赖氨酸(和类似物)简单地在其N-末端或C-末端或环内进行化学延伸。可以使用标准的(生物)偶联技术来引入激活的或可激活的N-或C-末端。可选地,可以通过片段缩合或天然化学连接进行添加,例如(Dawson等人1994,Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation.Science 266:776-779)中描述的,或通过酶进行添加,例如使用subtiligase,如(Chang等人,Proc Natl Acad Sci U S A.1994年12月20日;91(26):12544-8或Hikari等人,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters Volume 18,Issue 22,2008年11月15日,6000-6003页)中描述的。

[0443] 可选地,可以通过二硫键的进一步偶联来延伸或修饰所述肽。这具有额外的优点,即允许第一和第二肽一旦在细胞的还原环境中即彼此解离。在这种情况下,可以在第一肽的化学合成过程中加入分子支架(例如TATA),以便与三个半胱氨酸基团反应;然后可以将进一步的半胱氨酸或硫醇附加到第一肽的N-或C-末端,使得该半胱氨酸或硫醇仅与第二肽的游离半胱氨酸或硫醇反应,形成二硫键连接的双环肽-肽偶联物。

[0444] 类似的技术同样用于两个双环和双特异性大环的合成/偶联,潜在地产生四特异性分子。

[0445] 此外,可以使用适当的化学方法,以相同的方式,在N-或C-末端或经由侧链偶联来

添加其他官能团或效应子基团。在一个实施方案中,以不阻断任一个实体的活性的方式进行偶联。

[0446] 药物偶联物

[0447] 根据本发明的一个进一步的方面,提供了一种药物偶联物,其包含与一个或多个效应子和/或官能团偶联的如本文所定义的肽配体或多聚结合复合物。

[0448] 效应子和/或官能团可以连接至例如多肽的N和/或C末端、多肽内的氨基酸、或分子支架。

[0449] 适当的效应子基团包括抗体及其部分或片段。例如,效应子基团除了一个或多个恒定区结构域以外,还可以包括抗体轻链恒定区(CL)、抗体CH1重链结构域、抗体CH2重链结构域、抗体CH3重链结构域或其任意组合。效应子基团还可以包含抗体的铰链区(通常在IgG分子的CH1和CH2结构域之间存在的区)。

[0450] 在本发明该方面的一个进一步的实施方案中,根据本发明的效应子基团是IgG分子的Fc区。有利地,根据本发明的肽配体-效应子基团包含肽配体Fc融合体或由其组成,所述肽配体Fc融合体的 $t_{1/2}$ 半衰期为一天或更长,两天或更长,3天或更长,4天或更长,5天或更长,6天或更长或7天或更长。最有利地,根据本发明的肽配体包含半衰期为一天或更长的肽配体Fc融合体或由其组成。

[0451] 官能团通常包括结合基团、药物、用于连接其他实体的反应性基团、协助将大环肽摄入细胞中的官能团等。

[0452] 肽穿透入细胞的能力将允许肽有效针对细胞内的靶标。具有穿透入细胞的能力的肽可以接触的靶标包括转录因子、细胞内信号传导分子如酪氨酸激酶和参与凋亡通路的分子。使得能够穿透细胞的官能团包括肽或已被添加到肽或分子支架中的化学基团。肽如衍生自如VP22、HIV-Tat、果蝇的同源盒蛋白(触角足(Antennapedia))的那些,例如描述在Chen和Harrison(2007),Biochemical Society Transactions Volume 35,part 4,p821; Gupta等人(2004),Advanced Drug Discovery Reviews Volume 57,9637中。已显示有效通过质膜易位的短肽的示例包括来自果蝇触角足蛋白的16个氨基酸的穿膜肽(penetratin)(Derossi等人(1994),J Biol.Chem.Volume 269 p10444),18个氨基酸的“模型两亲性肽”(Oehlke等人(1998),Biochim Biophys Acts Volume 1414,p127)和HIV TAT蛋白的富含精氨酸的区域。非肽类方法包括使用小分子模拟物或SMOC,其可以容易地连接到生物分子上(Okuyama等人(2007),Nature Methods Volume 4,p153)。将胍基基团添加至分子的其他化学策略也增强细胞穿透(Elson-Scwab等人(2007),J Biol Chem Volume 282,p13585)。小分子量分子如类固醇可以被添加到分子支架中以增强摄入细胞。

[0453] 可以连接至肽配体的一类官能团包括抗体及其结合片段,如Fab、Fv或单结构域片段。特别地,可以使用与能够增加肽配体的体内半衰期的蛋白质结合的抗体。

[0454] 在一个实施方案中,根据本发明的肽配体-效应子基团具有选自以下的 $t_{1/2}$ 半衰期:12小时或更长,24小时或更长,2天或更长,3天或更长,4天或更长,5天或更长,6天或更长,7天或更长,8天或更长,9天或更长,10天或更长,11天或更长,12天或更长,13天或更长,14天或更长,15天或更长或20天或更长。有利地,根据本发明的肽配体-效应子基团或组合物的 $t_{1/2}$ 半衰期的范围将为12至60小时。在一个进一步的实施方案中,其将具有一天或更长的 $t_{1/2}$ 半衰期。在另一个进一步的实施方案中,其将在12至26小时的范围内。

[0455] 在本发明的一个特别的实施方案中,所述官能团选自金属螯合剂,其适合于复合药物相关的金属放射性同位素。

[0456] 可能的效应子基团还包括酶,例如用于酶/前药疗法的羧肽酶G2,其中肽配体替代了ADEPT中的抗体。

[0457] 在一个实施方案中,本发明的多聚结合复合物含有可裂解键,如二硫键或蛋白酶敏感键。不受理论束缚,据信,这种可裂解部分使复合物失活,直到复合物到达肿瘤微环境。该实施方案的益处使复合物在与靶标结合后尺寸减小。在一个进一步的实施方案中,与二硫键相邻的基团被修饰以控制二硫键的位阻,并由此控制裂解率和伴随的结合剂的释放。

[0458] 已发表的工作通过在二硫键的任一侧引入空间位阻,建立了修饰二硫键对还原的敏感性的潜力(Kellogg等人(2011),Bioconjugate Chemistry,22,717)。更大程度的空间位阻会降低通过细胞内谷胱甘肽以及细胞外(系统性)还原剂的还原率,从而降低了细胞内和细胞外毒素释放的容易程度。因此,可以通过仔细选择所述二硫键任一侧的位阻程度,来选择循环中二硫化物稳定性(其将毒素的不期望的副作用最小化)相对于细胞内环境中的有效释放(其将治疗效果最大化)的优化。

[0459] 可以通过在靶向实体(此处为双环肽)上引入一个或多个甲基来调节所述二硫键任一侧的位阻。

[0460] 药物组合物

[0461] 根据本发明的一个进一步的方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所定义的肽配体、多聚结合复合物或药物偶联物,与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0462] 一般地,本发明的肽配体将以纯化形式与药理学上合适的赋形剂或载体一起使用。通常,这些赋形剂或载体包括水性或醇/水性溶液,乳液或悬浮液,包括盐水和/或缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠和乳酸林格氏液。如果需要使多肽复合物保持悬浮,则合适的生理学上可接受的佐剂可以选自增稠剂如羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、明胶和藻酸盐。

[0463] 静脉内载体包括液体和营养补充剂和电解质补充剂,如基于林格氏葡萄糖的那些。也可以存在防腐剂和/或其它添加剂,如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体(Mack(1982),Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版)。

[0464] 本发明的肽配体可以用作单独施用的组合物或与其他试剂联用。这些其他试剂可以包括抗体、抗体片段和各种免疫治疗药物,如环孢霉素、甲氨蝶呤、阿霉素或顺铂和免疫毒素。药物组合物可以包括各种细胞毒性或其他试剂的“混合物(cocktails)”与本发明的蛋白质配体组合,或甚至与具有不同特异性的根据本发明选择的多肽组合,如使用不同靶标配体选择的多肽,无论其在施用前合并与否。

[0465] 根据本发明的药物组合物的施用途径可以是本领域普通技术人员通常已知的任何途径。为了治疗,可以根据标准技术将本发明的肽配体施用于任何患者。所述施用可以通过任何合适的方式进行,包括肠胃外、静脉内、肌肉内、腹膜内、经皮、经由肺途径、或者适当地通过用导管直接输注进行。优选地,根据本发明的药物组合物将通过吸入施用。施用的剂量和频率将取决于患者的年龄、性别和状况、其他药物的同时施用、禁忌症和临床医生要考虑的其他参数。

[0466] 可以将本发明的肽配体冻干用于储存,并在使用前在合适的载体中重构。已经表

明该技术是有效的,并且可以采用本领域已知的冻干和重构技术。本领域技术人员将认识到,冻干和重构可以导致不同程度的活性损失,并且可能必须向上调节水平以进行补偿。

[0467] 可以施用包含本发明的肽配体或其混合物的组合物以进行预防性和/或治疗性治疗。在某些治疗应用中,将足以完成所选择的细胞群体的至少部分抑制(inhibition)、抑制(suppression)、调节、杀死或一些其他可测量参数的量定义为“治疗有效剂量”。达到该剂量所需的量将取决于疾病的严重程度和患者自身免疫系统的一般状态,但一般为每千克体重0.005至5.0mg选择的肽配体,更常用的剂量为0.05至2.0mg/kg/剂量。对于预防性应用,也可以以相似或稍低的剂量施用包含本发明的肽配体或其混合物的组合物。

[0468] 包含根据本发明的肽配体的组合物可以用于预防和治疗环境,以协助哺乳动物中所选择的靶细胞群体的改变、失活、杀死或去除。另外,本文所述的肽配体可以在体外(extracorporeally)或体外(in vitro)选择性地用于从异质细胞集合中杀死、消耗或以其他方式有效地去除靶细胞群体。可以将来自哺乳动物的血液与所选择的肽配体在体外组合,从而将不期望的细胞杀死或以其他方式从血液中去掉,用于根据标准技术返回至哺乳动物。

[0469] 治疗用途

[0470] 本发明的双环肽作为OX40结合剂具有特殊的用途。根据本发明的一个进一步的方面,提供了如本文所定义的肽配体、多聚结合复合物、药物偶联物或药物组合物,其用于预防、抑制或治疗OX40介导的疾病或疾患。

[0471] OX40受体(也称为肿瘤坏死因子受体超家族,成员4(TNFRSF4),也称为CD134受体)是TNFR受体超家族的成员,与CD28不同,其在静息幼稚T细胞上没有组成型表达。OX40是次级共刺激免疫检查点分子,在激活后24至72小时后表达;其配体OX40L也不在静息抗原呈递细胞上表达,但会随着它们的活化而表达。OX40的表达取决于T细胞的完全激活;在没有CD28的情况下,OX40的表达被延迟并且水平降低四倍。

[0472] OX40在前三天对CD4+细胞的增殖能力没有影响,然而该时间后由于无法维持高水平的PKB活性和表达Bcl-2、Bcl-XL和存活蛋白(survivin),增殖开始减慢,细胞以更高的速度死亡。OX40L与T细胞上的OX40受体结合,防止T细胞死亡以及随后增加的细胞因子的产生。由于OX40能够增强存活,其在最初几天后维持免疫反应以及随后的记忆反应方面发挥关键作用。OX40也在体内Th1和Th2介导的反应中起至关重要的作用。

[0473] OX40通过未知机制结合TRAF2、3和5以及PI3K。通过NF- κ B和记忆细胞生成,TRAF2是生存所必需的,而TRAF5看来具有更负性的或调节的作用,因为敲除物(knockouts)具有更高水平的细胞因子并且更易受Th2介导的炎症的影响。TRAF3可能在OX40介导的信号转导中起关键作用。OX40在体内接合后,CTLA-4下调,并且体内阻断CTLA-4部分克服OX40特异性的TRAF3DN缺陷。TRAF3可能与OX40介导的记忆T细胞扩增和存活有关,并指向CTLA-4的下调作为可能的控制元件,以通过OX40信号传导增强早期T细胞扩增。

[0474] 在一个实施方案中,OX40是哺乳动物OX40。在一个进一步的实施方案中,哺乳动物OX40是人OX40(hOX40)。

[0475] OX40肽将主要(但不仅限于)用于激动性激活OX40,从而激活免疫细胞,以预防、抑制或治疗癌症,如早期或晚期人恶性肿瘤,其包括实体瘤,如非小细胞肺癌(NSCLC)、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌(TNBC))、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、尿路上皮癌、结直肠癌、头颈癌、头

颈鳞状细胞癌 (SCCHN)、黑色素瘤、胰腺癌和其他晚期实体瘤 (其中免疫抑制阻断抗肿瘤免疫)。OX40肽将用作治疗剂的其他实体和非实体恶性肿瘤包括但不限于B细胞淋巴瘤 (包括低级别/滤泡性非霍奇金淋巴瘤) 和急性髓系白血病 (AML)。

[0476] 在该实施方案中,本文提及的实体瘤被定义为组织的异常生长,其中没有很多液体物质,而非实体瘤通常是没有任何或显著的实体物质的分散癌。实体瘤的例子是癌 (carcinoma)、肉瘤和淋巴瘤。血癌 (白血病) 如急性髓系白血病 (AML) 和急性淋巴细胞 (或淋巴瘤母细胞) 白血病 (ALL) 是非实体瘤。OX40肽将在上述癌症适应症中用作单一治疗剂,以增强CD4、CD8T细胞和NK细胞介导的抗肿瘤免疫和免疫细胞介导的肿瘤细胞杀伤。此外,为了用作癌症的单一治疗剂,OX40肽及其缀合物 (如靶向肿瘤的异源串联物) 将与其他免疫治疗剂 (包括但不限于如抗PD-1和抗CTLA4) 联用。OX40肽的其他治疗应用包括但不限于单一或与放射癌症治疗联合的免疫疗法、和癌症疫苗。OX40肽作为单一疗法或与其他免疫调节药物 (如抗PD-1) 联用的非癌性治疗应用包括但不限于病毒感染 (如HIV和HPV)。

[0477] 将理解的是,本文定义的多聚结合复合物将可用于治疗癌症,其包含与存在于癌细胞上的组分结合的至少一种肽配体。

[0478] 本文提及的术语“预防”涉及在诱导疾病之前施用保护性组合物。“抑制”是指在诱导事件之后但在疾病的临床表现之前施用组合物。“治疗”涉及在疾病症状变得明显之后施用保护性组合物。

[0479] 已有可以用于筛选肽配体在预防或治疗疾病中的有效性的动物模型系统。本发明促进动物模型系统的使用,其允许开发可以与人和动物靶标交叉反应的多肽配体,从而允许使用动物模型。

[0480] 以下参考下列实施例进一步描述本发明。

[0481] 实施例

[0482] 材料和方法

[0483] 单体肽的合成

[0484] 单体肽的合成基于Fmoc化学,使用Peptide Instruments生产的Symphony肽合成仪和MultiSynTech生产的Syro II合成仪。使用标准的Fmoc-氨基酸 (Sigma, Merck), 其带有适当的侧链保护基团: 在每种情况下均使用适用的标准偶联条件, 然后使用标准方法进行脱保护。使用HPLC纯化肽, 并在分离后将其用1, 3, 5-三丙烯酰基六氢-1, 3, 5-三嗪 (TATA, Sigma) 修饰。为此, 将线性肽用50:50 MeCN:H₂O稀释至约35 mL, 加入约500 μL的100 mM TATA的乙腈溶液, 然后用5 mL的1 M NH₄HCO₃的H₂O溶液引发反应。使反应在室温进行约30至60分钟, 并且一旦反应完成即冻干 (通过MALDI-MS判断)。完成后, 在室温将1 mL的1 M L-半胱氨酸盐酸盐一水合物 (Sigma) 的H₂O溶液加入反应中约60分钟以淬灭任何过量的TATA。

[0485] 冻干后, 如上纯化修饰的肽, 同时用Gemini C18柱 (Phenomenex) 替换Luna C8, 并将酸改为0.1%三氟乙酸。合并包含正确的TATA修饰材料的纯级分, 冻干并在-20°C进行保存。

[0486] 除非另有说明, 所有氨基酸均以L-构型使用。

[0487] 多聚结合复合物的合成

[0488] 本文描述的多聚结合复合物可以与国际专利申请号PCT/GB2019/050485 (WO 2019/162682) 中描述的类似的方式来制备。

[0489] BCY12019的制备



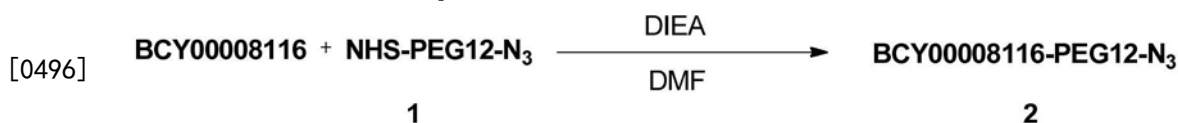
[0491] 将化合物1 (PCT/GB2019/050485 (WO 2019/162682) 中描述; 10mg, 2.11 μmol , 1.0eq.)、BCY11607 (18.5mg, 8.63 μmol , 4.1eq.) 和THPTA (3.7mg, 8.42 μmol , 4.0eq.) 的混合物溶解于t-BuOH/H₂O (1:1, 2mL, 预脱气并用N₂吹扫3次) 中。在N₂下加入CuSO₄ (21.0 μL , 0.4M, 4.0eq.) 和抗坏血酸钠 (42.0 μL , 0.4M, 8.0eq.)。通过逐滴加入0.2M NH₄HCO₃ (在1:1t-BuOH/H₂O中) 调节该溶液的pH至8。反应混合物在40 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌4小时, 此时LC-MS显示化合物1完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z (计算MW: 13347.41, 观测m/z: 1213.83 ([M/11+H]⁺) 的主峰。在减压下浓缩该反应混合物以去除溶剂, 并通过制备型HPLC (TFA条件) 纯化, 以获得白色固体状的BCY12019 (8.2mg, 0.54 μmol , 25.9%产率, 88.8%纯度)。

[0492] 异源串联合合物复合物的合成

[0493] 本文描述的异源串联合合物复合物可以与国际专利申请号PCT/GB2019/050951 (WO2019/193328) 中描述的类似的方式来制备。

[0494] BCY12141的制备

[0495] 制备BCY8116-PEG12-N₃的步骤



[0497] 将BCY8116 (20.0mg, 9.21 μmol , 1.0eq) 和化合物1 (11.0mg, 14.85 μmol , 1.6eq) 溶解于DMF (1mL) 中, 并加入DIEA (2.97mg, 22.96 μmol , 4.0 μl , 2.5eq), 并将混合物在室温下搅拌2小时。LC-MS显示BCY8116完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z (计算MW: 2798.19, 观测m/z: 1399.1 ([M/2+H]⁺) 的主峰。通过制备型HPLC (TFA条件) 纯化反应混合物, 获得白色固体状的化合物2 (18.0mg, 6.09 μmol , 66.13%产率, 94.64%纯度)。

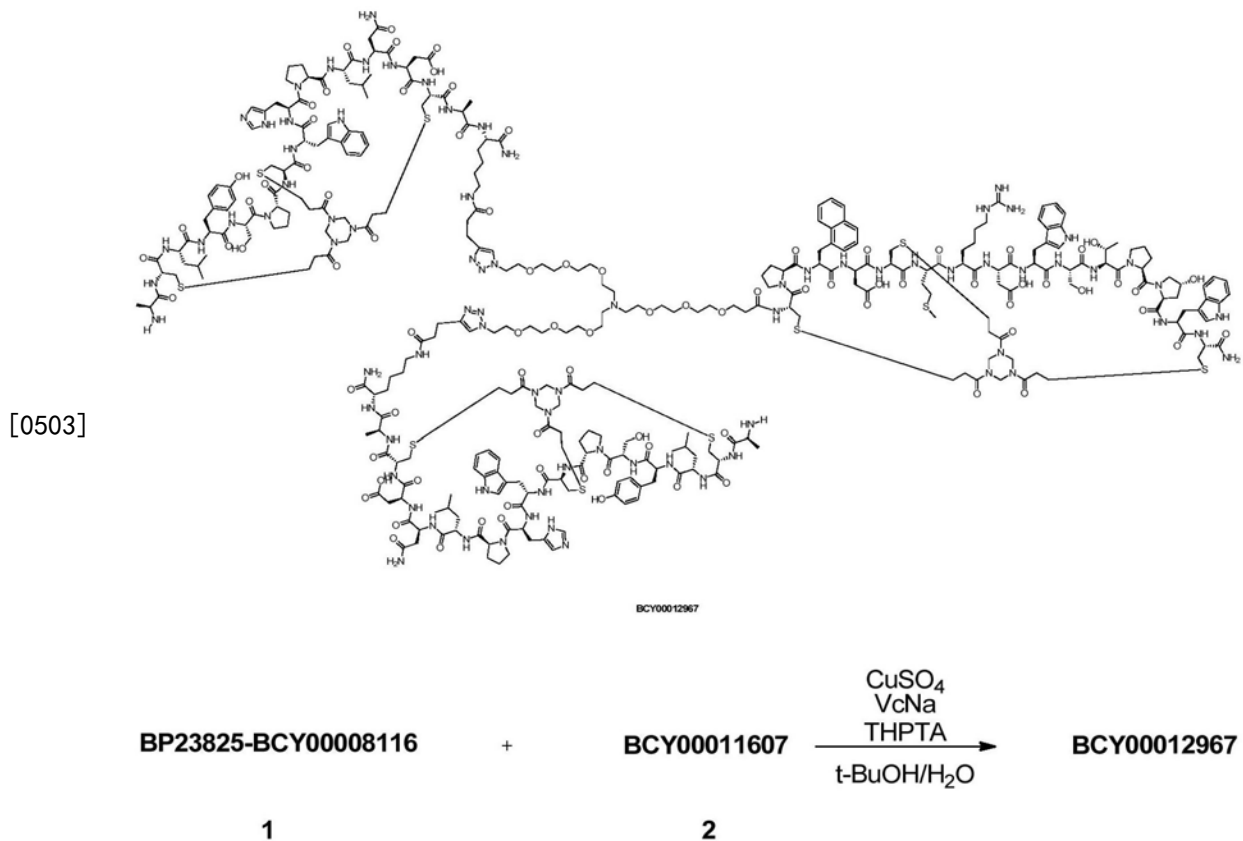
[0498] 谱图:

[0499] 制备BCY12141的步骤



[0501] 将化合物2 (10.0mg, 3.57 μmol , 1.0eq) 和BCY11607 (8.0mg, 3.72 μmol , 1.0eq) 溶于2mL t-BuOH/H₂O (1:1) 中, 并加入CuSO₄ (0.4M, 9.0 μL , 1.0eq)、抗坏血酸钠 (1.0mg, 5.04 μmol , 1.4eq) 和THPTA (1.4mg, 3.22 μmol , 1.0eq), 并加入1M NH₄HCO₃以调节pH至8。在N₂气氛下、在40 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应混合物16小时。LC-MS显示一个具有所需m/z (计算MW: 4947.65, 观测m/z: 1237.78 ([M/4+H]⁺) 的主峰。通过制备型HPLC (TFA条件) 纯化反应混合物, 获得白色固体状的BCY12141 (8.8mg, 1.65 μmol , 46.18%产率, 92.78%纯度)。

[0502] BCY12967的制备



[0504] 首先将化合物1 (BCY8116的三官能PEG3衍生物; 20.0mg, 7.20 μmol , 1.0eq) 和 BCY11607 (32.0mg, 14.9 μmol , 2.1eq) 溶解于2mL t-BuOH/H₂O (1:1) 中, 然后加入CuSO₄ (0.4M, 36.0 μL , 2.0eq)、VcNa (6.0mg, 30.3 μmol , 4.2eq) 和THPTA (6.4mg, 14.7 μmol , 2.0eq)。最后加入1M NH₄HCO₃以调整pH至8。此处所有溶剂均脱气并用N₂吹扫3次。在N₂气氛下、在40 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应混合物16小时。LC-MS显示化合物2完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z (计算MW: 7077.7观测m/z: 1416.3 ([M/5+H]⁺), 1180.4 ([M/6+H]⁺), 1011.9 ([M/7+H]⁺) 的主峰。通过制备型HPLC (TFA条件) 纯化反应混合物, 获得白色固体状的BCY12967 (20.6mg, 2.82 μmol , 39.17%产率, 96.82%纯度)。

[0505] BCY12721的制备

[0506] 可以根据与本文中描述的BCY12141、BCY12967和BCY12968的方法的类似方法来制备BCY12721。

[0507] 生物数据

[0508] Promega OX40细胞活性试验

[0509] Promega开发了一种OX40细胞活性试验, 其使用NF- κ B荧光素酶的发光作为Jurkat细胞中OX40激活的读数 (Promega CS197704)。在实验当天, 通过解冻FBS并向RPMI-1640中加入5%FBS来制备培养基。在水浴中解冻OX40 Jurkat细胞, 然后将500 μl 细胞加入11.5ml预加温的5%FBS RPMI-1640培养基中。向白色细胞培养板中加入60 μl 细胞/孔。继续以提供最大诱导倍数的浓度稀释激动剂, 然后在无菌96孔板中滴定用量。链霉亲和素偶联四聚体的建议起始浓度是4x1 μM (1 μM 生物素肽: 0.25 μM 链霉亲和素), 或4x 100nM用于强激动剂如合成多聚体。为重复样品准备足够的试剂, 然后进行1/3系列稀释或1/10系列稀释。将阳性对照OX40L三聚体 (R&D systems#1054-OX-010) 和阴性对照单体肽包括在内。加入20 μl 激动

剂作为重复样品或单独加入5%FBS RPMI-1640作为背景对照。

[0510] 将细胞与激动剂一起在37℃、5%CO₂下共孵育5小时。5小时后,解冻Bio-Glo™并在室温对试验进行显影。每孔加入80μl Bio-Glo™并孵育5-10min。使用MARS程序读取CLARIOStar读板器上的荧光素酶信号,并将诱导倍数相对于背景(单独的培养基)进行归一化。通过将数据转换为 $x = \log(X)$ 来分析数据,然后根据 $\log(\text{激动剂})$ 与反应变量斜率(4参数)作图,以计算EC₅₀值。

[0511] 该试验的结果示于表2中,其中可以看出,所有测试化合物都显示出良好的OX40激动作用,特别是BCY10551、BCY11371和BCY10549,当以四聚体形式与链霉亲和素结合时,表现出特别高水平的激动作用。此外,合成的多聚四价化合物BCY12019显示出比以四聚体形式与链霉亲和素结合的相应单体(BCY10549)几乎高10倍的激动作用。

[0512] 表2:来自Promega OX40细胞活性试验的EC₅₀值

肽编号	EC ₅₀ (nM), 2个独立实验
BCY10551	59, 19
BCY10552	350, 21
BCY10479	226, 1300
BCY11371	24, 37
[0513] BCY10482	160, 237
BCY10549	17, 19
BCY11501	120, 325
BCY10550	389, 74
BCY10794	186, 102
BCY11369	206, 130
BCY12019	2.6

[0514] 图1还显示了来自Promega的OX40报告细胞试验的数据。该试验中的BCY10549是一种生物素化单体,其通过与链霉亲和素结合组装成四价激动剂。OX40L用作OX40激动剂活性的阳性对照。合成的OX40四聚体BCY12019在Promega报告细胞试验中显示出有效的OX40激动作用,EC₅₀在低的纳摩尔级范围内。通过链霉亲和素交联生物素化的BCY10549肽产生一种生物活性复合物,而未与链霉亲和素结合的单体肽是无活性的。

[0515] 与肿瘤细胞共培养的Promega OX40细胞活性试验

[0516] Promega开发了一种OX40细胞活性试验,其使用NF-κB荧光素酶的发光作为Jurkat细胞中OX40激活的读数(Promega CS197704)。在实验当天,通过解冻FBS并向RPMI-1640中加入5%FBS来制备培养基。在水浴中解冻OX40 Jurkat细胞,然后将500μl细胞加入11.5ml预加温的5%FBS RPMI-1640培养基中。向白色细胞培养板中加入55μl细胞/孔。从培养物中收获肿瘤细胞。4T1是一种粘连蛋白-4阴性的鼠乳腺上皮癌细胞,它经过基因改造以在细胞表面表达鼠粘连蛋白-4(4T1粘连蛋白-4阳性;克隆4T1-D02)。在补充有10%热灭活FBS、1X青霉素/链霉素、1X L-谷氨酰胺、20mM HEPES和1X NEAA(RPMI工作培养基)的RPMI1640培养基中,体外培养肿瘤细胞至80%汇合度。将肿瘤细胞用胰蛋白酶消化,并在预加温至37℃的

RPMI1640工作培养基中以1500rpm洗涤两次,5分钟。计数细胞并在R5培养基中以2,000,000个细胞/mL重悬(10,000个细胞/孔)。每孔加入5 μ L肿瘤细胞。

[0517] 继续以提供最大诱导倍数的浓度稀释激动剂,然后在无菌96孔板中滴定用量。为重复样品准备足够的试剂,然后进行1/3系列稀释或1/10系列稀释。将阳性对照OX40L三聚体(AcroBiosystems,R&D systems)和阴性对照单体或非结合肽包括在内。加入20 μ L激动剂作为重复样品或单独加入5%FBS RPMI-1640作为背景对照。

[0518] 将细胞与激动剂一起在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下共孵育6小时。6小时后,解冻Bio-Glo™并在室温对试验进行显影。每孔加入80 μ L Bio-Glo™并孵育5-10min。使用MARS程序读取CLAIROStar读板器上的荧光素酶信号,并将诱导倍数相对于背景(单独的培养基)进行归一化。通过将数据转换为 $x = \log(X)$ 来分析数据,然后对 $\log(\text{激动剂})$ 与反应变量斜率(4参数)作图,以计算EC₅₀值。

[0519] 该试验的结果示于表3和图3中,其中可以看出,与OX40L和非结合对照肽BCY12968相比,当与粘连蛋白-4阳性4T1-D02细胞共培养时,BCY12141、BCY12721和BCY12967粘连蛋白-4:OX40化合物显示出有效的OX40激动作用。

[0520] 表3:来自与肿瘤细胞共培养的Promega OX40细胞活性试验的EC₅₀值

肽编号	EC ₅₀ (nM)
BCY12141	0.59
BCY12967	0.83
BCY12721	0.94

[0522] 用于体外测试粘连蛋白-4-OX40异源串联物的人PBMC-肿瘤细胞共培养试验

[0523] 在补充有10%热灭活FBS、1X青霉素/链霉素、1X L-谷氨酰胺、20mM HEPES和1X NEAA (RPMI工作培养基)的RPMI1640培养基中体外培养粘连蛋白-4阴性的鼠乳腺上皮癌细胞4T1(4T1粘连蛋白-4-ve;4T1-亲代)及其在细胞表面表达鼠粘连蛋白-4的基因修饰版本(4T1粘连蛋白-4+ve;克隆4T1-D02)至80%汇合度。将肿瘤细胞用胰蛋白酶消化,并在预加温至37 $^{\circ}$ C的RPMI1640工作培养基中以1500rpm洗涤两次,5分钟。在无菌384孔细胞培养板中每孔接种25 μ L中的四千个肿瘤细胞。将冷冻的人PBMC解冻,并在预加温的RPMI1640工作培养基中在1250rpm下洗涤一次,5分钟。向分别含有25 μ L培养基中的肿瘤细胞的每孔中,加入在补充有250ng/ml(2X浓度)人抗CD3(克隆OKT3)和500ng/ml(2X浓度)人抗CD28(克隆CD28.2)的50 μ L RPMI1640工作培养基中的20000个活PBMC,以获得1:10的肿瘤细胞和PBMC比例。在RPMI1640工作培养基中稀释DMSO中的测试化合物。将等量的DMSO加入试验对照中。向具有125ng/ml抗CD3、250ng/ml抗CD28、4000个肿瘤细胞和20000个PBMC的75 μ L细胞中加入测试化合物,最终体积为100 μ L。将试验板中的外孔排除在研究之外,并填充RPMI1640工作培养基。试验对照包括单独用抗CD3和抗CD28处理的细胞,或与测试化合物和人PBMC共培养的粘连蛋白-4-ve肿瘤细胞。试验板在加湿室内孵育长达72小时。在处理48小时后收集培养物上清液,并使用HTRF分析(CIS Bio)测量IL-2浓度。使用GraphPad Prism分析数据。

[0524] PBMC-肿瘤细胞共培养试验的结果示于图2。在有或没有BCY12141的情况下,将不表达或稳定表达鼠粘连蛋白4的鼠4T1肿瘤细胞与人PBMC和抗CD3和抗CD28刺激共培养48小时。然后使用HTRF测试细胞因子IL-2的浓度。在表达粘连蛋白-4的4T1细胞存在下,OX40-粘连蛋白-4双特异性异源串联BCY12141诱导人PBMC产生细胞因子IL-2。在4T1细胞上不存在

粘连蛋白-4表达的情况下,IL-2水平与对照基线CD3+CD28刺激相当。这表明仅在表达粘连蛋白-4的细胞存在下,OX40-粘连蛋白-4双特异性分子BCY12141才能够在人PBMC中诱导免疫反应。

1	5	10
<210> 7		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 7		
Cys Asn Tyr Ser Pro Cys Trp His Pro Leu Asn Lys Cys		
1	5	10
<210> 8		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 8		
Cys Trp Tyr Glu Tyr Asp Cys Asn Asn Trp Glu Arg Cys		
1	5	10
<210> 9		
<211> 14		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 9		
Cys Val Ile Arg Tyr Ser Pro Cys Ser His Tyr Leu Asn Cys		
1	5	10
<210> 10		
<211> 14		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 10		
Cys Asp Tyr Ser Pro Trp Trp His Pro Cys Asn His Ile Cys		
1	5	10
<210> 11		
<211> 15		

<223> 合成肽

<400> 18

Cys Trp Leu Trp Cys Val Pro Asn Pro Asp Asp Thr Cys

1 5 10

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 19

Cys Val Leu Trp Cys Thr Pro Tyr Pro Gly Asp Asp Cys

1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 20

Cys Ala Leu Trp Cys Ile Pro Asp Pro Gln Asp Glu Cys

1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 21

Cys Thr Leu Trp Cys Ile Pro Asp Ala Ser Asp Ser Cys

1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 22

Cys Gln Leu Trp Cys Ile Pro Asp Ala Asp Asp Asp Cys

1	5	10
<210> 23		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 23		
Cys Gln Leu Trp Cys Val Pro Glu Pro Gly Asp Ser Cys		
1	5	10
<210> 24		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 24		
Cys Ala Leu Trp Cys Ile Pro Glu Glu Ser Asp Asp Cys		
1	5	10
<210> 25		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 25		
Cys Val Leu Trp Cys Ile Pro Glu Pro Gln Asp Lys Cys		
1	5	10
<210> 26		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 26		
Cys Thr Leu Trp Cys Ile Pro Asp Pro Asp Asp Ser Cys		
1	5	10
<210> 27		
<211> 13		

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 27

Cys Arg Leu Trp Cys Val Pro Lys Ala Glu Asp Tyr Cys

1 5 10

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 28

Cys Thr Lys Pro Cys Ile Ala Tyr Tyr Asn Gln Ser Cys

1 5 10

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 29

Cys Met Asn Pro Cys Ile Ala Tyr Tyr Gln Gln Glu Cys

1 5 10

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 30

Cys Thr Asn Ala Cys Val Ala Tyr Tyr His Gln Ala Cys

1 5 10

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 31

Cys Ser Asp Pro Cys Ile Ser Tyr Tyr Asn Gln Ala Cys

1 5 10

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 32

Cys Asp Pro Pro Cys Asp Pro Phe Trp Tyr Ala Phe Tyr Cys

1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 33

Cys Pro Asp Asp Cys Asp Pro Phe Trp Tyr Asn Phe Tyr Cys

1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 34

Cys Arg Tyr Ser Pro Cys Tyr His Pro His Asn Cys

1 5 10

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 35

Cys Leu Tyr Ser Pro Cys Asn His Pro Leu Asn Ser Cys

1	5	10
<210> 36		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 36		
Cys Glu Asp Asn Tyr Cys Phe Met Trp Thr Pro Tyr Cys		
1	5	10
<210> 37		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 37		
Cys Leu Asp Ser Pro Cys Trp His Pro Leu Asn Asp Cys		
1	5	10
<210> 38		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 38		
Cys Arg Phe Ser Pro Cys Ser His Pro Leu Asn Gln Cys		
1	5	10
<210> 39		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 39		
Cys Lys Tyr Ser Pro Cys Trp His Pro Leu Asn Leu Cys		
1	5	10
<210> 40		
<211> 13		

<223> 合成肽

<400> 44

Cys Glu Trp Lys Ala Cys Glu His Asp Arg Glu Arg Trp Trp Cys
1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 45

Cys Arg Thr Trp Gln Cys Phe Tyr Glu Trp Gln Asn Gly His Cys
1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 46

Cys Lys Thr Trp Asp Cys Phe Trp Ala Ser Gln Val Ser Glu Cys
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 47

Cys Ser Thr Trp Gln Cys Phe Tyr Asp Leu Gln Glu Gly His Cys
1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 48

Cys Thr Thr Trp Glu Cys Phe Tyr Asp Leu Gln Glu Gly His Cys

1	5	10	15											
<210> 49														
<211> 15														
<212> PRT														
<213> 人工序列														
<220>														
<223> 合成肽														
<400> 49														
Cys	Glu	Thr	Trp	Glu	Cys	Phe	Trp	Arg	Leu	Gln	Ala	Gly	Glu	Cys
1				5					10					15
<210> 50														
<211> 15														
<212> PRT														
<213> 人工序列														
<220>														
<223> 合成肽														
<400> 50														
Cys	Arg	Thr	Trp	Gln	Cys	Phe	Trp	Asp	Leu	Gln	Glu	Gly	Leu	Cys
1				5					10					15
<210> 51														
<211> 15														
<212> PRT														
<213> 人工序列														
<220>														
<223> 合成肽														
<400> 51														
Cys	Ser	Thr	Trp	Gln	Cys	Phe	Trp	Asp	Ser	Gln	Leu	Gly	Ala	Cys
1				5					10					15
<210> 52														
<211> 15														
<212> PRT														
<213> 人工序列														
<220>														
<223> 合成肽														
<400> 52														
Cys	Glu	Thr	Trp	Glu	Cys	Phe	Trp	Glu	Trp	Gln	Val	Gly	Ser	Cys
1				5					10					15
<210> 53														
<211> 15														

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 53

Cys Thr Thr Trp Glu Cys Phe Trp Asp Leu Gln Glu Gly Leu Cys

1 5 10 15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 54

Cys His Thr Trp Asp Cys Phe Tyr Gln Trp Gln Asp Gly His Cys

1 5 10 15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 55

Cys Thr Thr Trp Glu Cys Phe Tyr Ser Leu Gln Asp Gly His Cys

1 5 10 15

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 56

Cys Asn Glu Asp Met Tyr Cys Phe Met Trp Met Glu Cys

1 5 10

<210> 57

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

1	5	10	
<210> 62			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成肽			
<400> 62			
Cys Trp Tyr Glu Tyr Asp Cys Arg Thr Trp Thr Phe Cys			
1	5	10	
<210> 63			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成肽			
<400> 63			
Cys His Gly Gly Val Trp Cys Ile Pro Asn Ile Asn Asp Ser Cys			
1	5	10	15
<210> 64			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成肽			
<400> 64			
Cys Asp Ser Pro Val Arg Cys Tyr Trp Asn Thr Gln Lys Gly Cys			
1	5	10	15
<210> 65			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成肽			
<400> 65			
Cys Gly Ser Pro Val Pro Cys Tyr Trp Asn Thr Arg Lys Gly Cys			
1	5	10	15
<210> 66			
<211> 14			

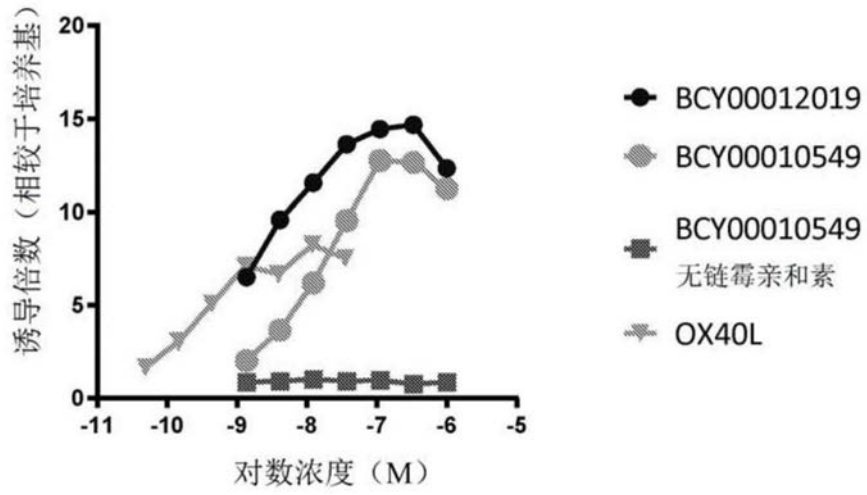


图1

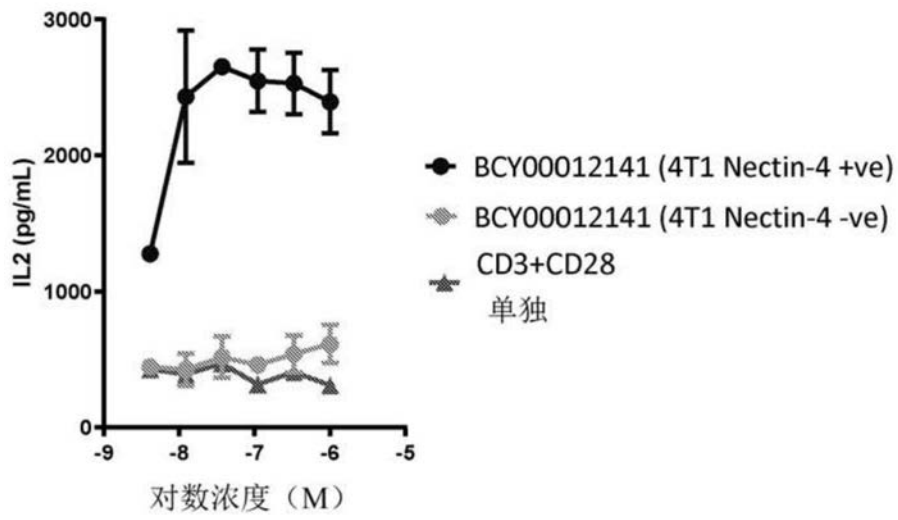


图2

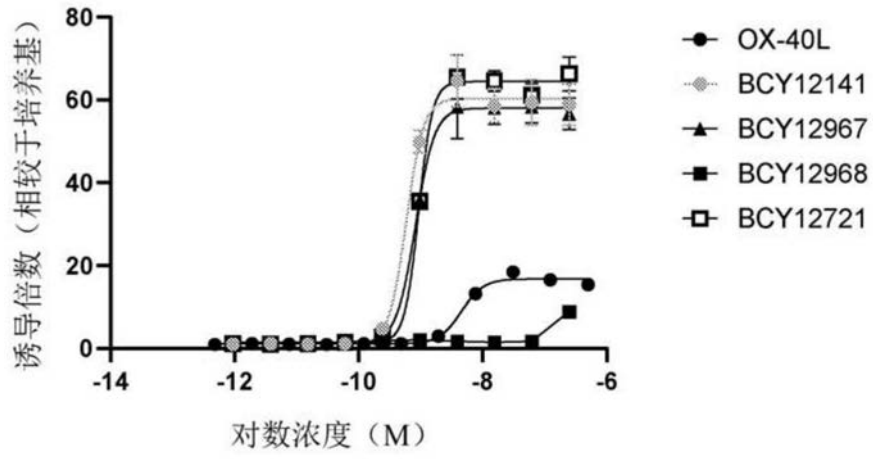


图3