



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114555626 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 08

(21) 申请号 202080059317.6

(22) 申请日 2020.07.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114555626 A

(43) 申请公布日 2022.05.27

(30) 优先权数据
62/880,191 2019.07.30 US
62/910,088 2019.10.03 US
62/931,442 2019.11.06 US
63/022,667 2020.05.11 US
63/024,715 2020.05.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.02.22

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2020/051827 2020.07.30

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/019243 EN 2021.02.04

(73) 专利权人 拜斯科技术开发有限公司
地址 英国剑桥

(72) 发明人 K·麦克唐奈 P·乌帕德亚雅
J·拉赫登兰塔 G·穆德

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
专利代理师 程伟 程云

(51) Int.Cl.
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 107148425 A, 2017.09.08
US 2015050351 A1, 2015.02.19

审查员 周陈林

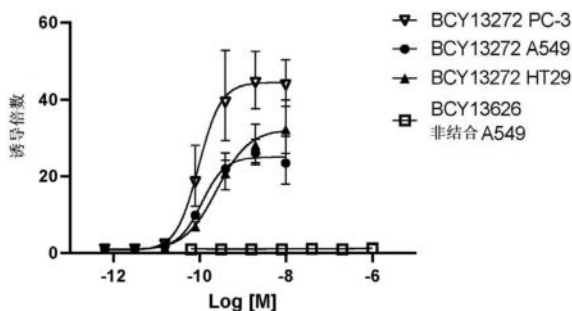
权利要求书2页 说明书24页
序列表3页 附图6页

(54) 发明名称

异串联双环肽复合物

(57) 摘要

本发明涉及异串联双环肽复合物,其包含结合EphA2的第一肽配体,所述第一肽配体通过接头与两个结合CD137的第二肽配体缀合。本发明还涉及所述异串联双环肽复合物在预防、抑制或治疗癌症中的用途。



1. 一种异串联双环肽复合物或其药学上可接受的盐,其中所述异串联双环肽复合物由以下组成:

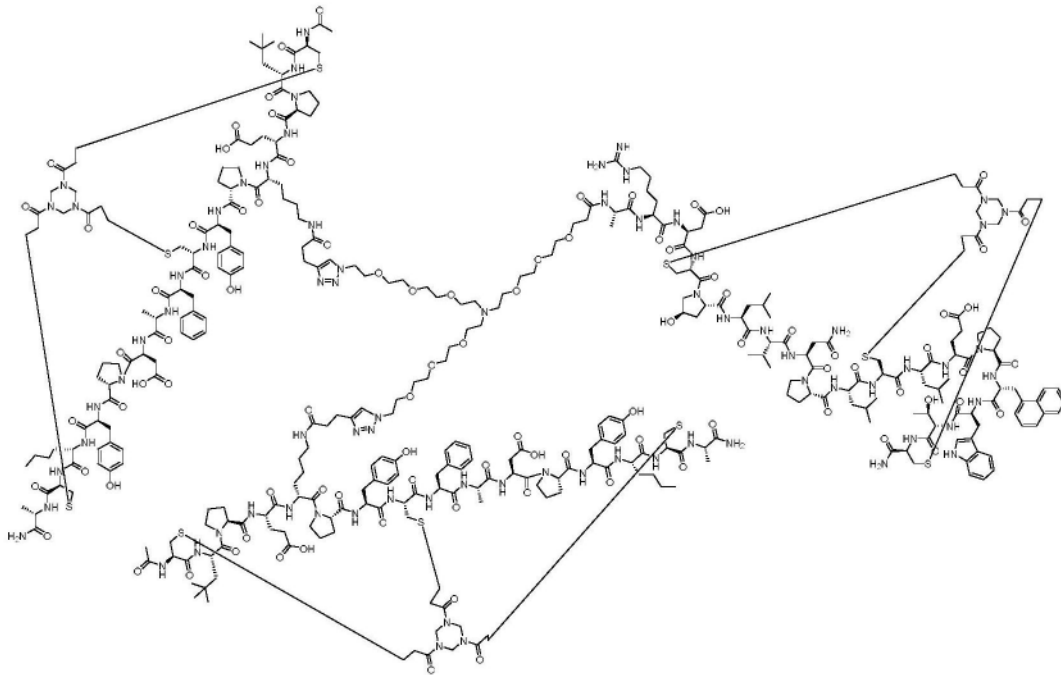
(a) 结合EphA2的第一肽配体,其包含多肽和分子支架,其中所述多肽由序列A-[HArg]-D-C_i[HyP]LVNPL C_{ii}LEP[d1Na1]WTC_{iii}(SEQ ID NO:1;BCY13118)组成,以及所述分子支架是1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA),所述分子支架与所述多肽的反应性半胱氨酸基团(C_i、C_{ii}和C_{iii})形成共价键,使得在所述分子支架上形成两个多肽环;

其通过N-(酸-PEG₃)-N-双(PEG₃-叠氮化物)接头与以下缀合,

(b) 两个结合CD137的第二肽配体,其均包含多肽和分子支架,其中所述多肽由序列Ac-C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii}-A(SEQ ID NO:2;BCY8928)组成,以及所述分子支架是1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA),所述分子支架与所述多肽的反应性半胱氨酸基团(C_i、C_{ii}和C_{iii})形成共价键,使得在所述分子支架上形成两个多肽环;

其中Ac表示乙酰基,HArg表示高精氨酸,HyP表示反式-4-羟基-L-脯氨酸,1Na1表示1-萘丙氨酸,tBuAla表示叔丁基丙氨酸,PYA表示4-戊烯酸,N1e表示正亮氨酸。

2. 根据权利要求1所述的异串联双环肽复合物或其药学上可接受的盐,其是BCY13272:



BCY13272,

或其药学上可接受的盐。

3. 根据权利要求1或2所定义的异串联双环肽复合物或其药学上可接受的盐,其中所述药学上可接受的盐选自游离酸或钠、钾、钙或铵盐。

4. 一种药物组合物,其包含权利要求1至3中任一项所述的异串联双环肽复合物或其药学上可接受的盐,与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的异串联双环肽复合物或其药学上可接受的盐在制造用于预防、抑制或治疗EphA2相关癌症的药物中的用途;

其中所述EphA2相关癌症选自前列腺癌、肺癌、结肠癌和纤维瘤。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的异串联双环肽复合物或其药学上可接受的盐在制造用于治疗EphA2相关癌症的药物中的用途,其中所述治疗包括以不维持所述复合物的血浆浓度高于所述复合物的体外 EC_{50} 的剂量频率来施用所述异串联双环肽复合物或其药学上可接受的盐;

其中所述EphA2相关癌症选自前列腺癌、肺癌、结肠癌和纤维瘤。

异串联双环肽复合物

技术领域

[0001] 本发明涉及异串联 (heterotandem) 双环肽复合物,其包含结合EphA2的第一肽配体,所述第一肽配体通过接头与两个结合CD137的第二肽配体缀合。本发明还涉及所述异串联双环肽复合物在预防、抑制或治疗癌症中的用途。

背景技术

[0002] 环肽可以以高亲和力和靶标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 α Vb3 (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。这种作用已通过一种基质金属蛋白酶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) 一个合成的分子结构上 (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)。WO 2019/122860和WO 2019/122863中公开了生成候选药物化合物的方法,其中所述化合物是通过将含有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1,1',1'' - (1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基) 三丙-2-烯-1-酮 (TATA)。

[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 (三 (溴甲基) 苯) 而得以环化。

发明内容

[0006] 根据本发明的第一方面,提供了异串联双环肽复合物,其包含:

[0007] (a) 结合EphA2的第一肽配体,其具有序列A-[HArg]-D-C_i[HyP]LVNP LC_{ii}LEP [d1Na1]WTC_{iii}(SEQ ID NO:1;BCY13118);其通过N-(酸-PEG₃)-N-双(PEG₃-叠氮化物)接头与以下缀合,

[0008] (b) 两个结合CD137的第二肽配体,其具有序列Ac-C_i[tBuAla]PE[D-Lys (PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A(SEQ ID NO:2;BCY8928);

[0009] 其中每个所述肽配体包含多肽和分子支架,所述多肽包含被两个环序列隔开的三个反应性半胱氨酸基团(C_i、C_{ii}和C_{iii}),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),所述分子支架与所述多肽的反应性半胱氨酸基团形成共价键,使得在分子支架上形成两个多肽环;

[0010] 其中Ac表示乙酰基,HArg表示高精氨酸,HyP表示反式-4-羟基-L-脯氨酸,d1Na1表示D-1-萘丙氨酸,tBuAla表示叔丁基丙氨酸,PYA表示4-戊烯酸,Nle表示正亮氨酸。

[0011] 根据本发明的另一方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所定义的异串联双环肽复合物,与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0012] 根据本发明的另一方面,提供了用于预防、抑制或治疗癌症的如本文所定义的异串联双环肽复合物。

附图说明

[0013] 图1:在表达EphA2的A549、PC-3和HT29细胞(n=3)存在下,在Promega CD137荧光素酶报告基因测定中,分析了EphA2/CD137异串联双环肽复合物BCY13272。BCY13626是异串联双环肽复合物,类似于BCY13272,但包含D-氨基酸,并且不与EphA2或CD137结合。

[0014] 图2:在5.5mg/kg IV给药的CD1小鼠(n=3)、3.6mg/kg IV输注(15min)的SD大鼠(n=3)和8.9mg/kg IV输注(15min)的食蟹猴(n=2)中,BCY13272的血浆浓度对时间的曲线图。BCY13272的药代动力学特征具有以下终末半衰期:在CD-1小鼠中为2.9小时,在SD大鼠中为2.5小时,在食蟹猴中为8.9小时。

[0015] 图3:BCY13272在同基因MC38肿瘤模型中的抗肿瘤活性。(A) BCY13272治疗期间和之后的MC38肿瘤体积。在括号中表示D28时完全应答者(CR)小鼠(并且在D62时保持CR)的数量。BIW:每周两次给药;IV:静脉施用。(B) 移植MC38肿瘤细胞后,对BCY13272的完全应答者动物和初始(naïve)年龄匹配对照动物的肿瘤生长曲线。CR:完全应答者。

[0016] 图4:BCY13272在(A) PBMC/MC38和(B) PBMC/HT29共培养测定中诱导IFN- γ 细胞因子分泌。BCY12762是与EphA2结合但不与CD137结合的异串联双环肽复合物。BCY13692是与CD137结合但不与EphA2结合的异串联双环肽复合物。(C) 在PBMC共培养测定中,BCY13272诱导的IL-2和IFN- γ 分泌的EC50(nM)值的图,其中MC38(小鼠)细胞系和5个PBMC供体、以及HT1080(人)细胞系和4个PBMC供体。

[0017] 图5:BCY13272与固定的(A) EphA2和(B) CD137结合的表面等离子共振(SPR)。

具体实施方式

[0018] 根据本发明的第一方面,提供了异串联双环肽复合物,其包含:

[0019] (a) 结合EphA2的第一肽配体,其具有序列A-[HArg]-D-C_i[HyP]LVNPL C_{ii}LEP [d1Na1]WTC_{iii}(SEQ ID NO:1;BCY13118);其通过N-(酸-PEG₃)-N-双(PEG₃-叠氮化物)接头与

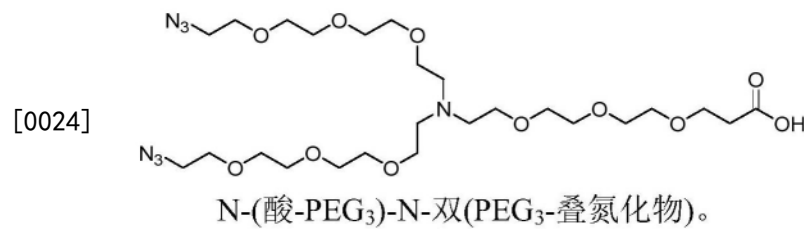
以下缀合，

[0020] (b) 两个结合CD137的第二肽配体，其具有序列Ac-C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}-A (SEQ ID NO:2;BCY8928)；

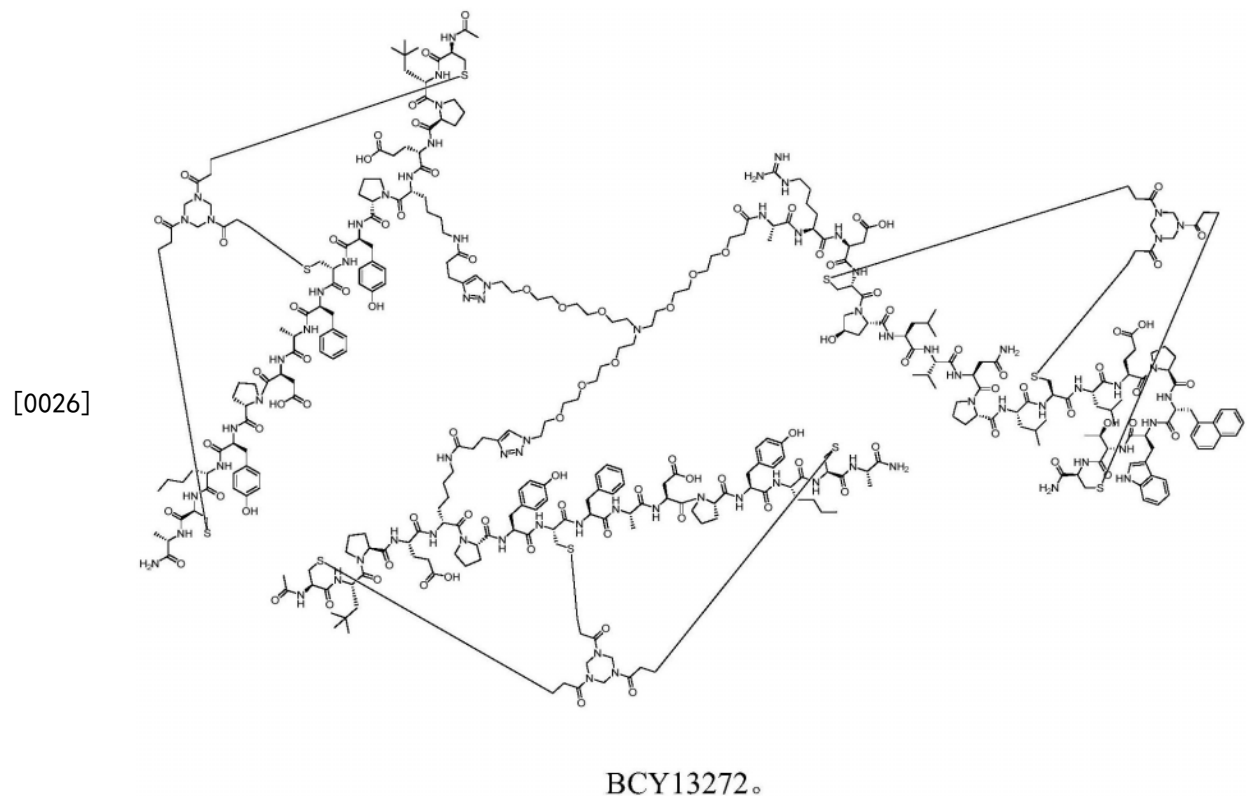
[0021] 其中每个所述肽配体包含多肽和分子支架，所述多肽包含被两个环序列隔开的三个反应性半胱氨酸基团(C_i、C_{ii}和C_{iii})，所述分子支架是1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA)，所述分子支架与所述多肽的反应性半胱氨酸基团形成共价键，使得在分子支架上形成两个多肽环；

[0022] 其中Ac表示乙酰基，HArg表示高精氨酸，HyP表示反式-4-羟基-L-脯氨酸，d1Na1表示D-1-萘丙氨酸，tBuAla表示叔丁基丙氨酸，PYA表示4-戊烯酸，Nle表示正亮氨酸。

[0023] 本文中提及的N-(酸-PEG₃)-N-双(PEG₃-叠氮化物)接头包括：



[0025] 在一个实施方案中，所述异串联双环肽复合物是BCY13272：



[0027] BCY13272的完整细节示于下表A中：

[0028] 表A:BCY13272的组成

复合物编号	EphA2 BCY 编号	连接位点	接头	CD137 BCY 编号	连接位点
[0029] BCY13272	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG ₃)-N-双(PEG ₃ -叠氮化物)	BCY8928, BCY8928	dLys (PYA)4

[0030] 数据示于图3中,表明BCY13272在小鼠的MC38肿瘤模型中导致显著的抗肿瘤作用。

[0031] 本文提及了BCY13272的某些类似物(即修饰衍生物)和代谢物,其各自形成本发明的其他方面并总结于下表B中:

[0032] 表B:BCY13272的标记类似物和潜在代谢物的组成

复合物编号	EphA2 BCY 编号	连接位点	接头	CD137 BCY 编号	连接位点	修饰
BCY14414	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG ₃)-N-双(PEG ₃ -叠氮化物)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	N/A
BCY14417	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG ₃)-N-双(PEG ₃ -叠氮化物)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Peg12-生物素
BCY14418	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG ₃)-N-双(PEG ₃ -叠氮化物)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Alexa Fluor® 488
[0033] BCY15217	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG ₃)-N-双(PEG ₃ -叠氮化物)	BCY14601 BCY14601	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	N/A
BCY15218	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG ₃)-N-双(PEG ₃ -叠氮化物)	BCY8928 BCY14601	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	N/A

[0034] 其中BCY14601表示具有序列C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii}-A (SEQ ID NO:3)的双环肽配体,其中TATA作为分子支架;

[0035] 和其中BCY13389表示具有序列[Ac]C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii}-K (SEQ ID NO:4)的双环肽配体,其中TATA作为分子支架。

[0036] 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相同含义,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。

[0037] 术语

[0038] 编号

[0039] 当提及本发明的化合物内的氨基酸残基位置时,由于半胱氨酸残基(C_i 、 C_{ii} 和 C_{iii})不变而将其从编号中省略,因此,SEQ ID NO:1内氨基酸残基的编号如下提及:

[0040] C_i -HyP₁-L₂-V₃-N₄-P₅-L₆-C_{ii}-L₇-E₈-P₉-d1NaI₁₀-W₁₁-T₁₂-C_{iii} (SEQ ID NO:1)。

[0041] 为了该描述的目的,双环肽与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。

[0042] 分子形式

[0043] 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 β Ala-Sar10-Ala尾巴将表示为:

[0044] β Ala-Sar10-A- (SEQ ID NO:X)。

[0045] 反向肽序列

[0046] 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)。为避免疑义,除非另有说明,否则在本文中以其全名或以其氨基酸单字母或三字母代码提及氨基酸旨在表示L-氨基酸。如果这种氨基酸旨在表示D-氨基酸,则该氨基酸将在方括号内以小写d开头,例如[dA]、[dD]、[dE]、[dK]、[d1NaI]、[dN1e]等。

[0047] 肽配体的优点

[0048] 本发明的某些异串联双环肽复合物具有许多有利的性质,使它们被认为是适合注射、吸入、经鼻、经眼、口服或局部施用的类药物分子。这样的有利的性质包括:

[0049] -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;

[0050] -蛋白酶稳定性。异串联双环肽复合物应理想地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异串联双环肽先导候选物,并可以有把握地对人施用;

[0051] -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和分子内/分子间氢键的比例的函数,其对于制剂和吸收目的很重要;

[0052] -选择性。本发明的某些异串联双环肽复合物表现出优于其他靶标的良好选择性;

[0053] -在循环中最佳的血浆半衰期。取决于临床适应症和治疗方案,可能需要开发在急性疾病管理环境中短时间暴露的异串联双环肽复合物;或者开发在循环中保留增强的异串联双环肽复合物,其因此对于管理更慢性的疾病状态是最佳的。导致理想的血浆半衰期的其他因素,是持续暴露以实现最大治疗效率(相对于由于持续暴露于试剂而伴随的毒理)的要求。

[0054] 至关重要的是,本文提供了数据,其中本发明的异串联双环肽复合物在以不能将血浆浓度维持高于该化合物的体外 EC_{50} 的频率给药时,显示出抗肿瘤功效。这与用于CD137激动或双特异性CD137激动的更大重组生物(即基于抗体的)方法形成对比(Segal等人,Clin Cancer Res.,23(8):1929-1936(2017),Claus等人,Sci Trans Med.,11(496):eaav5989,1-12(2019),Hinner等人,Clin Cancer Res.,25(19):5878-5889(2019))。不受理论束缚,认为这种观察的原因是如下事实:异串联双环复合物具有相对低的分子量(通常<15kDa),它们是完全合成的,并且它们是CD137的肿瘤靶向激动剂。因此,它们具有相对短

的血浆半衰期,但具有良好的肿瘤穿透率和保留率。本文中提供的数据完全支持这些优势。例如,在小鼠同基因啮齿动物模型中,每天或每3天使用人源化CD137均显示出抗肿瘤功效。此外,腹膜内药代动力学数据显示血浆半衰期<3小时,这将预示复合物的循环浓度将持续下降到给药之间低于体外 EC_{50} 。此外,肿瘤药代动力学数据表明,与血浆水平相比,肿瘤组织中异串联双环复合物的水平可能更高且更持久。

[0055] 将理解的是,该观察形成了本发明的重要的进一步方面。因此,根据本发明的一个进一步的方面,提供了一种治疗癌症的方法,其包括,以不能将所述复合物的血浆浓度维持高于所述复合物的体外 EC_{50} 的给药频率,施用如本文所定义的异串联双环肽复合物。

[0056] -免疫记忆。将结合癌细胞的双环肽配体与结合免疫细胞的双环肽配体偶联提供了免疫记忆的协同优势。据信,本发明的异串联双环肽复合物不仅根除肿瘤,而且在重新施用致瘤剂后,接种的完全应答者小鼠均不发生肿瘤。这表明用本发明的异串联双环肽复合物治疗已在完全应答者小鼠中诱导了免疫原性记忆。这具有显著的临床优势,以防止所述肿瘤在最初得到控制和根除后复发。

[0057] 肽配体

[0058] 如本文所指的,肽配体是指与分子支架共价结合的肽。通常,这样的肽包含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(subtend)存在的序列,所述序列因为当所述肽与所述支架结合时形成环而被称为环序列。在这种情况下,所述肽包含至少三个反应性基团,其选自半胱氨酸、3-巯基丙酸和/或半胱胺,并且在所述支架上形成至少两个环。

[0059] 药学上可接受的盐

[0060] 应当理解,盐形式在本发明范围内,并且提及肽配体包括所述配体的盐形式。

[0061] 本发明的盐可以由包含碱性或酸性部分的母体化合物合成,其通过常规化学方法如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。

[0062] 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-葡萄糖酸、葡萄糖醛酸(例如D-葡萄糖醛酸)、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。

[0063] 一组特别的盐由通过以下形成的盐组成: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

(methanesulfonic, mesylate)、乙磺酸、萘磺酸、戊酸、丙酸、丁酸、丙二酸、葡萄糖醛酸和乳糖酸。一种特别的盐是盐酸盐。另一种特别的盐是乙酸盐。

[0064] 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Zn²⁺。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⁺。

[0065] 当本发明的化合物含有胺官能团时,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范围内。

[0066] 修饰衍生物

[0067] 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,例如带有叠氮基或炔基的氨基酸,其分别允许用带有炔基或叠氮基的部分进行官能化。

[0068] 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。

[0069] 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-末端半胱氨酸基团(在本文中称为C₁的基团)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。

[0070] 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,其促进效应基团的缀合和保持所述双环肽对其靶标的效力。

[0071] 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-末端半胱

氨酸基团(在本文中称为 C_{iii} 的基团)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。

[0072] 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。

[0073] 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、 $C\alpha$ -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。

[0074] 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在N-末端半胱氨酸(C_i)和/或C-末端半胱氨酸(C_{iii})上添加间隔基团。

[0075] 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。

[0076] 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,(如果所述肽药物已经皮下施用)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。

[0077] 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)。

[0078] 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取代。该实施方案提供了去除潜在的蛋白水解进攻位点的优点。

[0079] 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:

[0080] -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;

[0081] -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

[0082] -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标结合时熵的损失最小,通过限制骨架的扭转角使得在靶标结合时熵的损失最小,和出于相同的原因在分子中引入另外的环化。

[0083] (综述见Gentilucci等人,Curr.Pharmaceutical Design(2010)16,3185-203和Nestor等人,Curr.Medicinal Chem(2009)16,4399-418)。

[0084] 同位素变体

[0085] 本发明包括所有药学上可接受的(放射性)同位素标记的本发明肽配体,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。

[0086] 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 ;和镱同位素如 ^{177}Lu ;和铋同位素如 ^{213}Bi 。

[0087] 某些同位素标记的本发明肽配体,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粘连蛋白-4(Nectin-4)靶标的存在和/或不存在。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,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 ^{14}C),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。

[0088] 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。

[0089] 用正电子发射同位素如 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 和 ^{13}N 取代,可以用于正电子发射成像(PET)研究以检查靶标占有率。

[0090] 通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过与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,来制备本发明的肽配体的同位素标记的化合物。

[0091] 合成

[0092] 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。

[0093] 因此,本发明还涉及如本文所述选择的多肽或缀合物的制造,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/缀合物上进行。

[0094] 制造缀合物或复合物时,目标多肽中的氨基酸残基可任选地被取代。

[0095] 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。

[0096] 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)缀合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,例如使用如(Chang等人,

Proc Natl Acad Sci U S A.1994Dec 20;91(26):12544-8或Hikari等人,Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters Volume 18,Issue 22,15November 2008,6000-6003页)中描述的变位酶(subtiligase)。

[0097] 可选地,可以通过二硫键的进一步缀合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-肽缀合物。

[0098] 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。

[0099] 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。

[0100] 药物组合物

[0101] 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,与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0102] 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。

[0103] 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)。

[0104] 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。其可以包括抗体、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。

[0105] 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。

[0106] 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。

[0107] 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、杀伤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。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。

[0108] 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、杀伤或去除。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伤、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伤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。

[0109] 治疗用途

[0110] 根据本发明的另一方面,提供了用于预防、抑制或治疗癌症的如本文所定义的异串联双环肽复合物。

[0111] 可以治疗(或抑制)的癌症(及其良性对应物)的示例包括但不限于:上皮起源的肿瘤(各种类型的腺瘤和癌,包括腺癌、鳞状癌、移行细胞癌和其他癌),如膀胱和泌尿道癌、乳腺癌、胃肠道癌(包括食道、胃(胃部)、小肠、结肠、直肠和肛门的癌症)、肝癌(肝细胞癌)、胆囊和胆道系统癌、胰腺外分泌癌、肾癌、肺癌(例如腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、支气管肺泡癌和间皮瘤)、头颈癌(例如舌癌、颊腔癌、喉癌、咽癌、鼻咽癌、扁桃体癌、唾液腺癌、鼻腔癌和鼻旁窦癌)、卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌、阴道癌、外阴癌、阴茎癌、宫颈癌、子宫肌层癌、子宫内膜癌、甲状腺癌(例如甲状腺滤泡癌)、肾上腺癌、前列腺癌、皮肤和附件癌(例如黑色素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、角膜棘皮瘤、增生性痣);血液系统恶性肿瘤(即白血病、淋巴瘤)和血液系统癌前疾患以及边缘恶性肿瘤,包括淋巴系的血液系统恶性肿瘤和相关状况病症(例如急性淋巴细胞性白血病[ALL]、慢性淋巴细胞性白血病[CLL]、B细胞淋巴瘤如弥漫性大B细胞淋巴瘤[DLBCL]、滤泡性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和白血病、自然杀伤性[NK]细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、毛细胞白血病、原因不明的单克隆免疫球蛋白增多症、浆细胞瘤、多发性骨髓瘤和移植后的淋巴增生性疾病),和骨髓系的血液系统恶性肿瘤和相关病症(例如急性骨髓性白血病[AML]、慢性骨髓性白血病[CML]、慢性骨髓单核细胞性白血病[CMML]、高嗜酸性粒细胞增多综合征、骨髓增生性疾病如真性红细胞增多症、原发性血小板增多症和原发性骨髓纤维化、骨髓增生综合征、骨髓增生异常综合征和早幼粒细胞白血病);间充质起源的肿瘤,例如软组织、骨或软骨肉瘤如骨肉瘤、纤维肉瘤、软骨肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、尤因氏肉瘤、滑膜肉瘤、上皮样肉瘤、胃肠道间质瘤、良性和恶性组织细胞瘤和隆突性皮肤纤维肉瘤;中枢或周围神经系统的肿瘤(例如星形细胞瘤、神经胶质瘤和成胶质细胞瘤、脑膜瘤、室管膜瘤、松果体瘤和神经鞘瘤);内分泌肿瘤(例如垂体瘤、肾上腺瘤、胰岛细胞瘤、甲状旁腺肿瘤、类癌瘤和甲状腺髓样癌);眼部和附属器肿瘤(例如视网膜母细胞瘤);生殖细胞和滋养细胞肿瘤(例如畸胎瘤、精原细胞瘤、无性细胞瘤、葡萄胎和绒毛膜癌);以及,小儿和胚胎肿瘤(例如髓母细胞瘤、神经母细胞瘤、维尔姆斯瘤和原始神经外胚层肿瘤);或先天性或其他形式的综合征,其使患者容易患恶性肿瘤(例如着色性干皮病)。

[0112] 在一个进一步的实施方案中,所述癌症选自造血系统恶性肿瘤如选自:非霍奇金淋巴瘤(NHL)、伯基特淋巴瘤(BL)、多发性骨髓瘤(MM)、B慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)、B和T急性淋巴细胞性白血病(ALL)、T细胞淋巴瘤(TCL)、急性骨髓性白血病(AML)、毛细胞白血病(HCL)、霍奇金淋巴瘤(HL)和慢性骨髓性白血病(CML)。

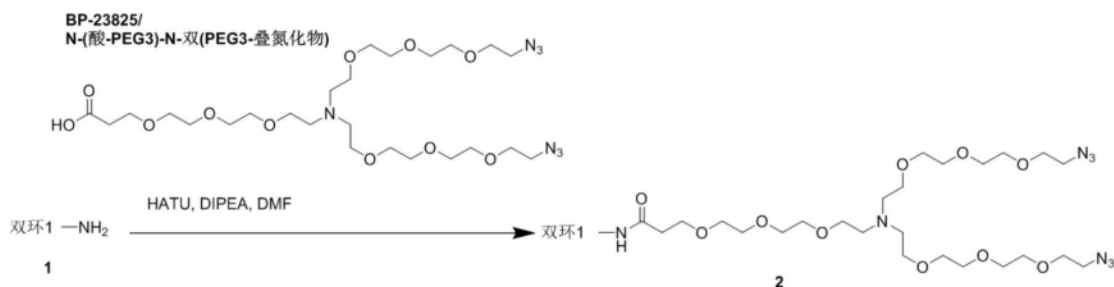
[0113] 本文提及的术语“预防”涉及在诱导疾病之前施用保护性组合物。“抑制”是指在诱导事件之后但在疾病的临床表现之前施用组合物。“治疗”涉及在疾病症状变得明显之后施用保护性组合物。

[0114] 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。

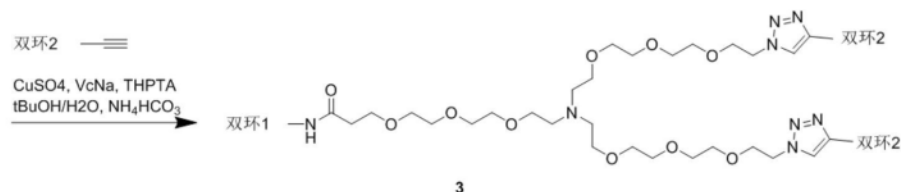
[0115] 以下参考下列实施例进一步描述本发明。

[0116] 实施例

[0117] 通常,可以按照以下一般方法制备本发明的异串联双环肽复合物:



[0118]



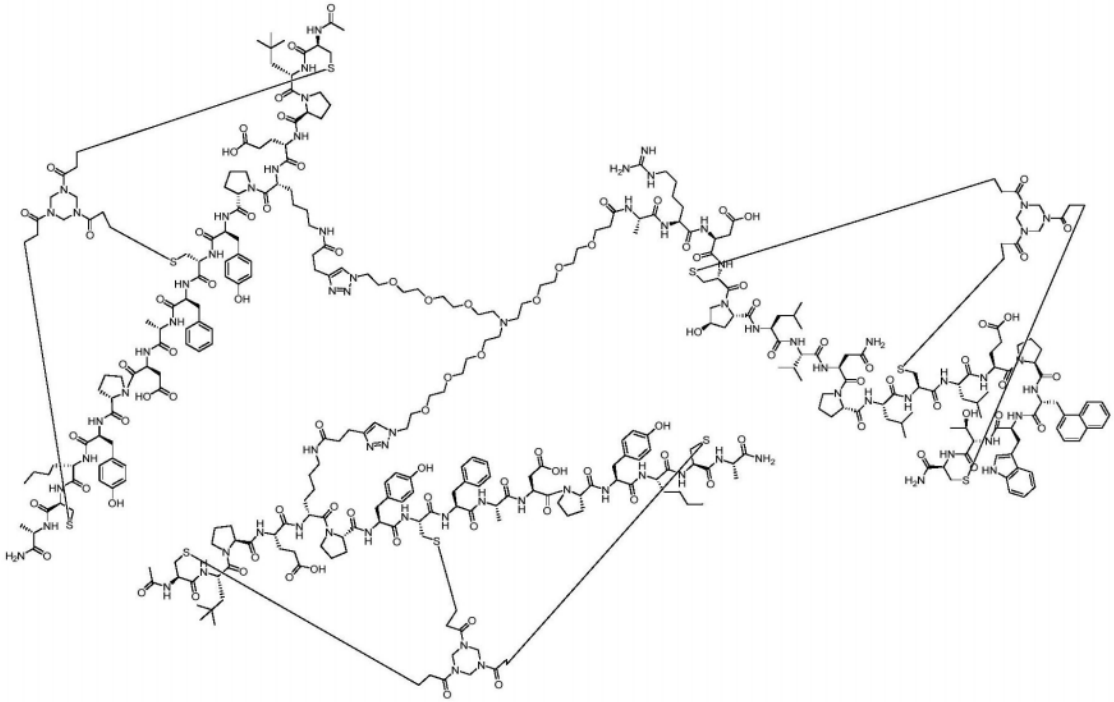
[0119] 将所有溶剂脱气并用N₂吹扫3次。将BP-23825 (1.0eq)、HATU (1.2eq) 和DIEA (2.0eq) 的DMF溶液混合5分钟,然后加入双环1 (1.2eq.)。在40°C搅拌反应混合物16小时。然后将反应混合物减压浓缩以除去溶剂,并通过制备型HPLC纯化以得到中间体2。

[0120] 将中间体2 (1.0eq) 和双环2 (2.0eq) 的混合物溶解于t-BuOH/H₂O (1:1) 中,然后加入CuSO₄ (1.0eq)、VcNa (4.0eq) 和THPTA (2.0eq)。最后,加入0.2M NH₄HCO₃以调节pH至8。在N₂气氛下、在40°C搅拌反应混合物16小时。直接通过制备型HPLC纯化反应混合物。

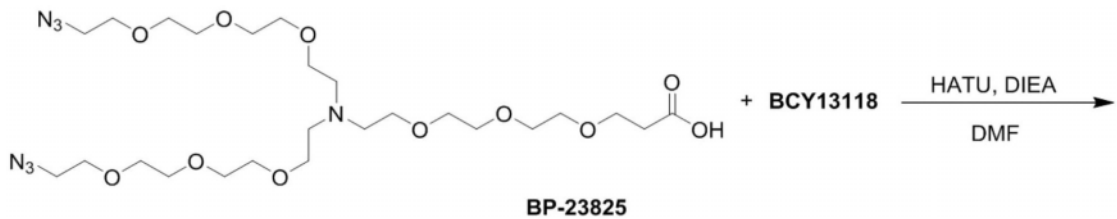
[0121] 下文提供了本发明的异串联双环肽复合物的更详细的实验:

[0122] 实施例1:BCY13272的合成

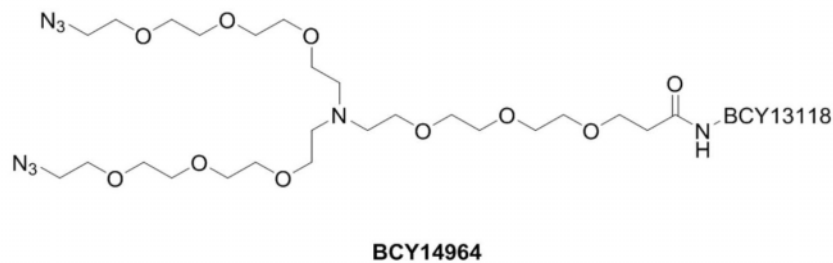
[0123]



[0124] 制备BCY14964的程序

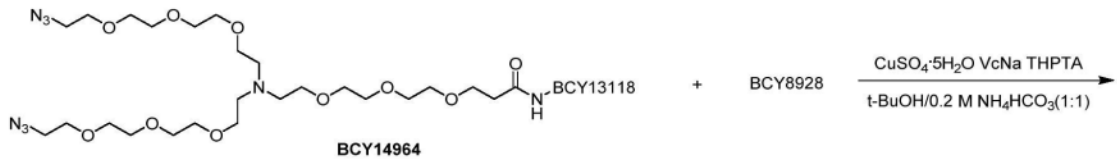


[0125]

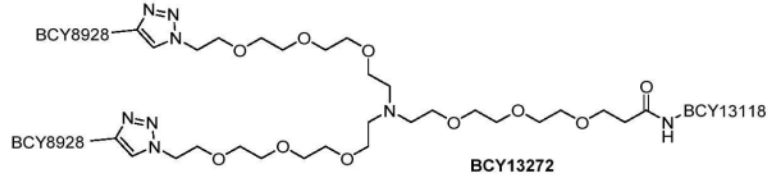


[0126] 将BP-23825 (155.5mg, 249.40 μ mol, 1.2eq) 和HATU (95.0mg, 249.92 μ mol, 1.2eq) 的混合物溶解于NMP (1.0mL) 中, 然后通过滴加DIEA (64.6mg, 499.83 μ mol, 87.0 μ L, 2.4eq) 将该溶液的pH调节至8, 然后在25 $^{\circ}$ C搅拌溶液5min。将BCY13118 (500.0mg, 207.83 μ mol, 1.0eq) 溶解于NMP (5.0mL) 中, 然后加入反应液中, 通过滴加DIEA将所得溶液的pH调节至8。在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物45min。LC-MS显示BCY13118完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z的主峰。减压浓缩反应混合物以除去溶剂并产生残余物。然后通过制备型HPLC纯化残余物, 得到白色固体状的BCY14964 (1.35g, 403.46 μ mol, 64.7%产率, 90%纯度)。计算MW: 3011.53, 观测m/z: 1506.8 ([M+2H]²⁺), 1005.0 ([M+3H]³⁺)。

[0127] 制备BCY13272的程序



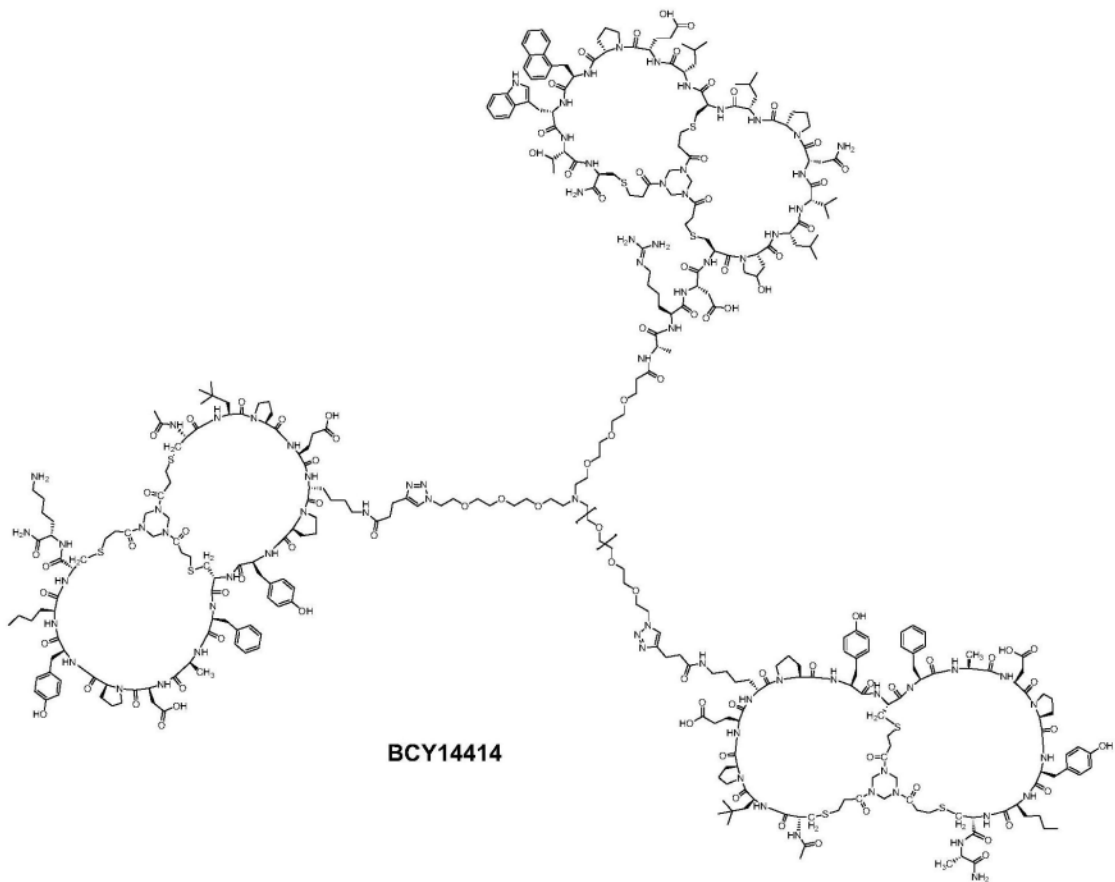
[0128]



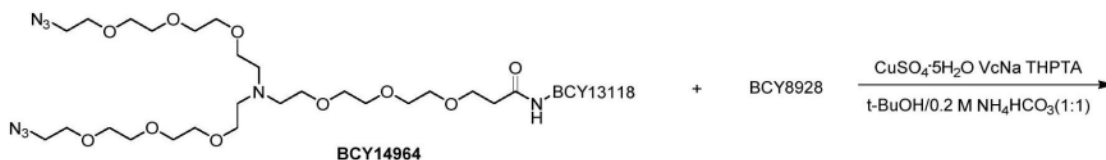
[0129] 将BCY8928 (644.0mg, 290.55 μmol , 2.5eq)、THPTA (50.5mg, 116.22 μmol , 1.0eq)、 CuSO_4 (0.4M, 145.0 μL , 0.5eq) 和抗坏血酸钠 (82.0mg, 464.89 μmol , 4.0eq) 的混合物溶解于 t-BuOH/0.2M NH_4HCO_3 (1:1, 6.0mL) 中。通过滴加0.2M NH_4HCO_3 (在1:1t-BuOH/0.2M NH_4HCO_3 中) 将该溶液的pH调节至7.5, 然后在25 $^\circ\text{C}$ 搅拌溶液3min。将BCY14964 (350.0mg, 116.22 μmol , 1.0eq) 溶解于 t-BuOH/0.2M NH_4HCO_3 (1:1, 11.0mL) 中, 然后滴加入搅拌的溶液中。此处所有溶剂均预脱气并用 N_2 吹扫。通过滴加0.2M NH_4HCO_3 (在1:1t-BuOH/0.2M NH_4HCO_3 中) 将该溶液的pH调节至7.5, 溶液变为浅黄色。在 N_2 气氛下、在25 $^\circ\text{C}$ 搅拌反应混合物6小时。LC-MS显示检测到一个具有所需m/z的主产物峰。过滤并减压浓缩反应混合物, 以得到残余物。通过制备型HPLC纯化粗产物, 获得白色固体状的BCY13272 (1.75g, 235.01 μmol , 67.40%产率, 94%纯度)。计算MW: 7446.64, 观测m/z: 1242.0 ($[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$), 1491.0 ($[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$)。

[0130] 实施例2: BCY14414的合成

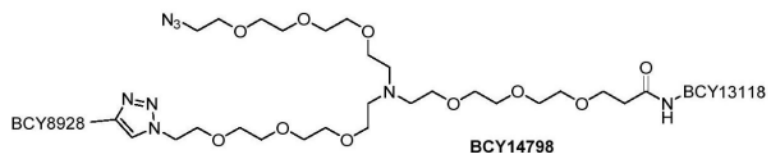
[0131]



[0132] 制备BCY14798的程序

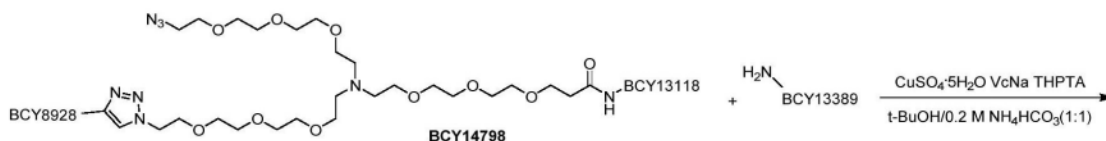


[0133]

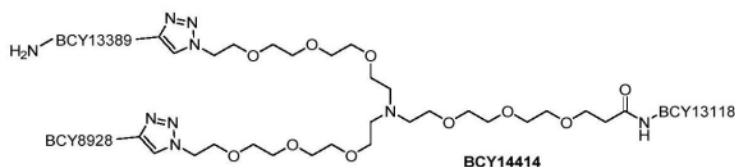


[0134] 将BCY14964 (55.0mg, 18.26 μ mol, 1.0eq)、BCY8928 (32.4mg, 14.61 μ mol, 0.8eq) 和 THPTA (39.8mg, 91.32 μ mol, 5.0eq) 的混合物溶解于t-BuOH/0.2MNH₄HCO₃ (1:1, 0.5mL, 预脱气并用N₂吹扫) 中, 然后在N₂下加入CuSO₄ (0.4M, 23.0 μ L, 0.5eq) 和抗坏血酸钠 (72.0mg, 365.27 μ mol, 20.0eq)。通过滴加0.2M NH₄HCO₃ (在1:1t-BuOH/0.2M NH₄HCO₃中) 将该溶液的pH调节至7.5, 溶液变为浅黄色。在N₂气氛下、在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物1.5小时。LC-MS显示保留了BCY14964, 化合物BCY8928完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z的主峰。过滤并减压浓缩反应混合物, 以得到残余物。通过制备型HPLC纯化粗产物, 获得白色固体状的BCY14798 (51mg, 9.17 μ mol, 33.37%产率, 94%纯度)。计算MW: 5229.07, 观测m/z: 1308.3 ([M+4H]⁴⁺), 1046.7 ([M+5H]⁵⁺)。

[0135] 制备BCY14414的程序



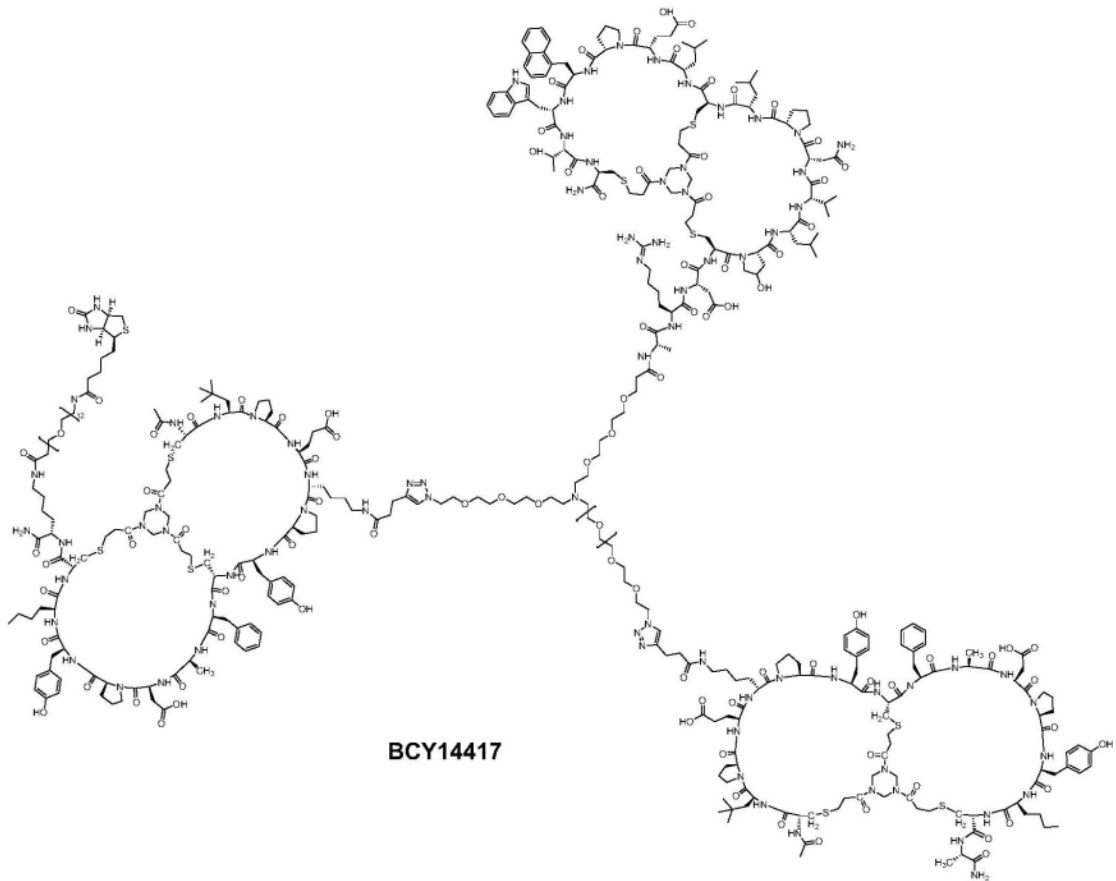
[0136]



[0137] 将BCY14798 (21.0mg, 4.02 μ mol, 1.0eq)、BCY13389 (10.0mg, 4.42 μ mol, 1.1eq) 和 THPTA (1.8mg, 4.02 μ mol, 1.0eq) 的混合物溶解于t-BuOH/0.2MNH₄HCO₃ (1:1, 0.5mL, 预脱气并用N₂吹扫) 中, 然后在N₂下加入CuSO₄ (0.4M, 5.0 μ L, 0.5eq) 和抗坏血酸钠 (2.8mg, 16.06 μ mol, 4.0eq)。通过滴加0.2MNH₄HCO₃ (在1:1t-BuOH/0.2M NH₄HCO₃中) 将该溶液的pH调节至7.5, 溶液变为浅黄色。在N₂气氛下、在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物2小时。LC-MS显示BCY14798完全消耗, 保留了一些BCY13389, 并检测到一个具有所需m/z的主峰。过滤并减压浓缩反应混合物, 以得到残余物。通过制备型纯化粗产物, 获得白色固体状的BCY14414 (20mg, 2.40 μ mol, 59.73%产率, 90.9%纯度)。计算MW: 7503.74, 观测m/z: 1251.5 ([M+5H]⁵⁺), 1072.9 ([M+7H]⁷⁺)。

[0138] 实施例3: BCY14417的合成

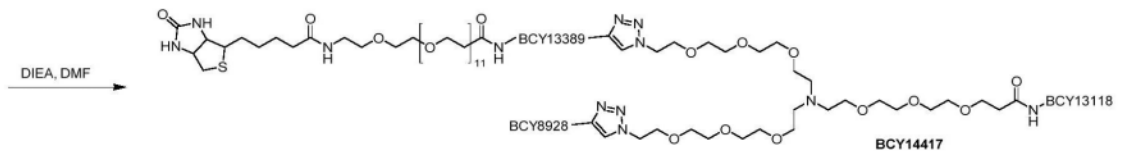
[0139]



[0140] 制备BCY14417的程序



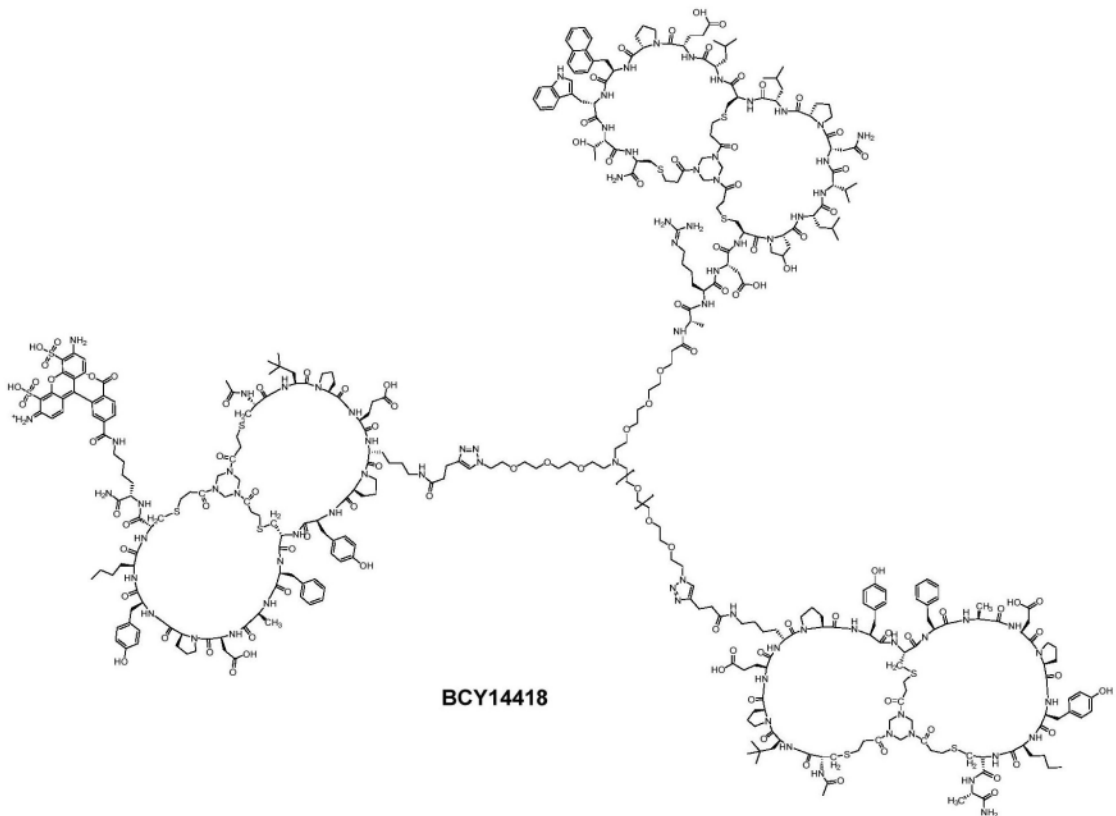
[0141]



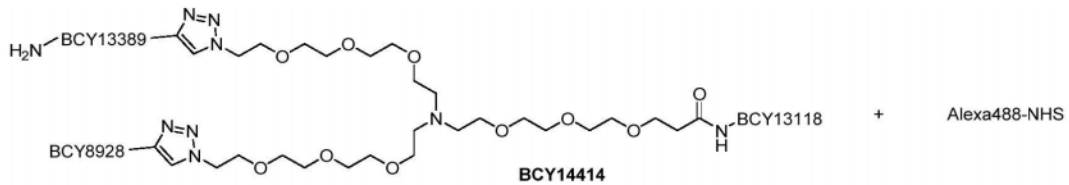
[0142] 将BCY14414(13.0mg, 1.73 μ mol, 1.0eq)和生物素-PEG12-NHS酯(CAS365441-71-0, 4.2mg, 4.50 μ mol, 2.6eq)的混合物溶解于DMF(0.5mL)中。通过滴加DIEA将该溶液的pH调节至8。在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物0.5小时。LC-MS显示BCY14414完全消耗,并检测到一个具有所需m/z的主峰。过滤并减压浓缩反应混合物,以得到残余物。通过制备型HPLC纯化粗产物,获得白色固体状的BCY14417(9.0mg, 1.07 μ mol, 80.49%产率, 90.8%纯度)。计算MW: 8329.74, 观测m/z: 1389.6([M+6H]⁶⁺), 1191.9([M+7H]⁷⁺)。

[0143] 实施例4: BCY14418的合成

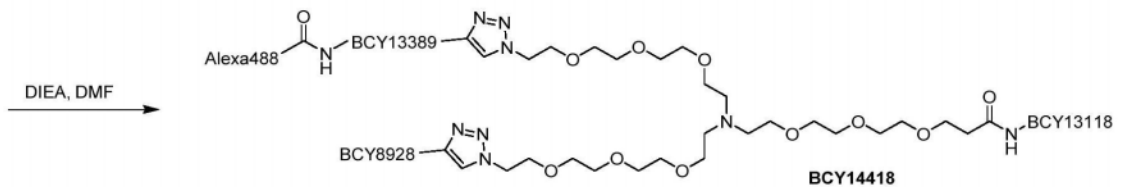
[0144]



[0145] 制备BCY14418的程序



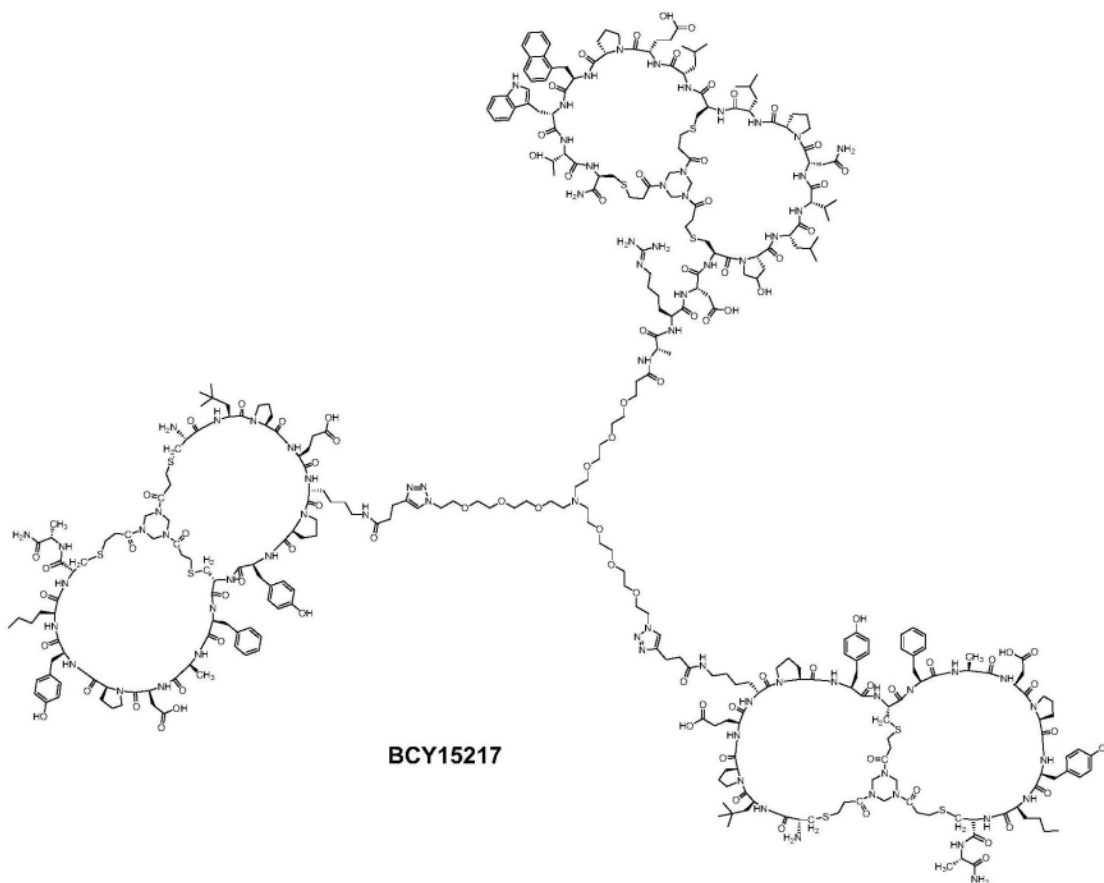
[0146]



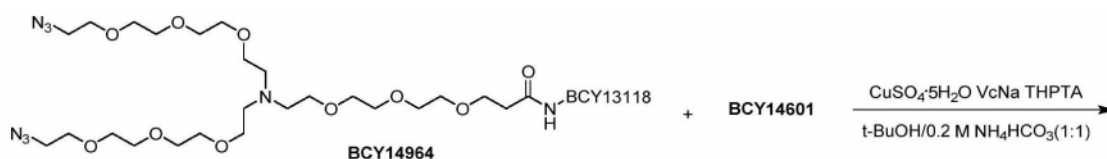
[0147] 将BCY14414 (5.6mg, 0.75 μ mol, 1.0eq) 和Alexa fluor® 488 (0.9mg, 1.49 μ mol, 2.0eq) 的混合物溶解于DMF (0.3mL) 中。然后通过滴加DIEA将该溶液的pH调节至8。在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物1.0小时。LC-MS显示BCY14414完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z的主峰。过滤并减压浓缩反应混合物, 以得到残余物。通过制备型HPLC纯化粗产物, 获得红色固体状的BCY14418 (2.3mg, 0.25 μ mol, 32.89% 产率, 85.6% 纯度)。计算MW: 8020.19, 观测m/z: 1337.2 ([M+6H]⁶⁺)。

[0148] 实施例5: BCY15217的合成

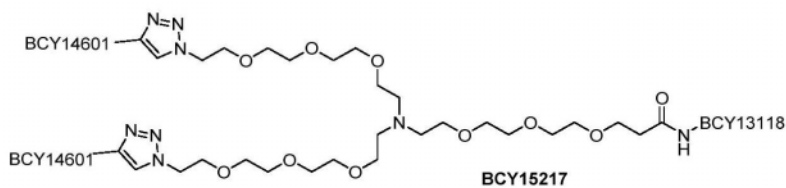
[0149]



[0150] 制备BCY15217的程序



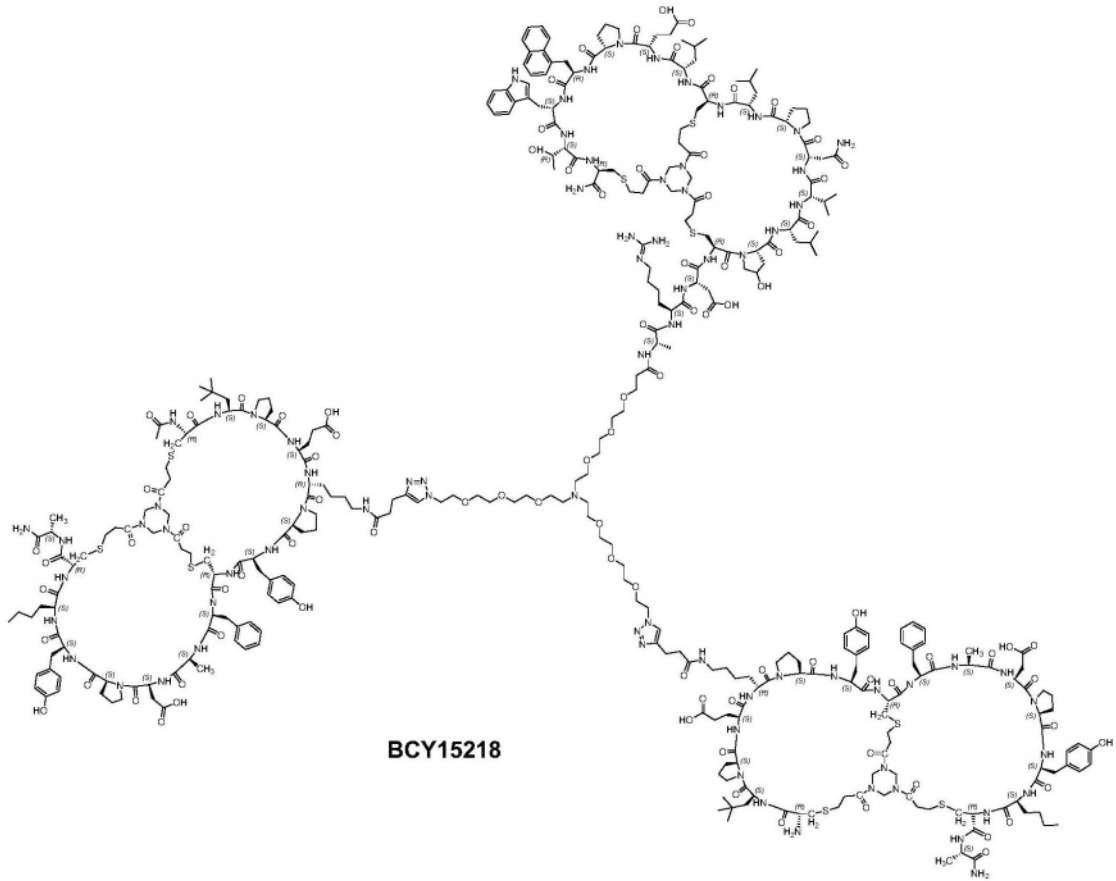
[0151]



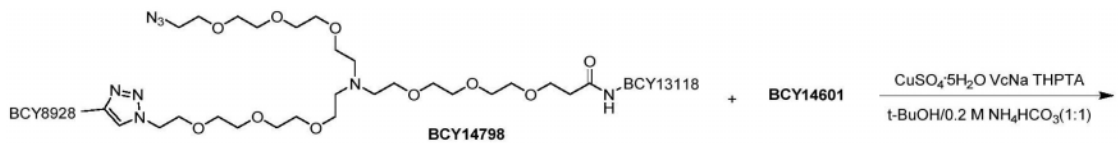
[0152] 将BCY14964 (20.0mg, 6.64 μmol , 1.0eq)、BCY14601 (30.5mg, 13.95 μmol , 2.1eq) 和 THPTA (2.9mg, 6.64 μmol , 1.0eq) 的混合物溶解于 t-BuOH/0.2MNH₄HCO₃ (1:1, 0.5mL, 预脱气并用 N₂吹扫) 中, 然后在 N₂ 下加入 CuSO₄ (0.4M, 16.6 μL , 1.0eq) 和抗坏血酸钠 (4.7mg, 26.56 μmol , 4.0eq)。将该溶液的 pH 调节至 8, 溶液变为浅黄色。在 N₂ 气氛下、在 25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应混合物 2 小时。LC-MS 显示保留了 BCY14964, 并检测到一个具有所需 m/z 的主峰。过滤并减压浓缩反应混合物, 以得到残余物。通过制备型 HPLC 纯化粗产物, 获得白色固体状的 BCY15217 (19.7mg, 2.41 μmol , 36.26% 产率, 96.2% 纯度)。计算 MW: 7362.5, 观测 m/z: 1473.5 ([M+5H]⁵⁺), 1228.2 ([M+6H]⁶⁺), 1052.8 ([M+7H]⁷⁺)。

[0153] 实施例6:BCY15218的合成

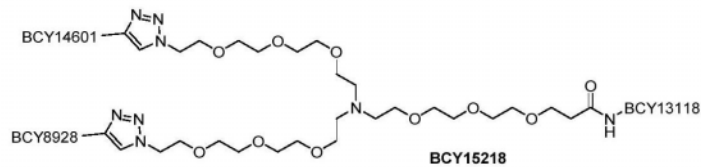
[0154]



[0155] 制备BCY15218的程序



[0156]



[0157] 将BCY14798 (30.0mg, 5.74 μ mol, 1.0eq)、BCY14601 (15.0mg, 6.88 μ mol, 1.2eq) 和 THPTA (2.5mg, 5.74 μ mol, 1.0eq) 的混合物溶解于t-BuOH/0.2MNH₄HCO₃ (1:1, 0.5mL, 预脱气并用N₂吹扫) 中, 然后在N₂下加入CuSO₄ (0.4M, 14.0 μ L, 1.0eq) 和抗坏血酸钠 (4.0mg, 22.95 μ mol, 4.0eq)。通过滴加0.2M NH₄HCO₃ (在1:1t-BuOH/0.2M NH₄HCO₃中) 将该溶液的pH调节至7.5, 溶液变为浅黄色。在N₂气氛下、在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物2小时。LC-MS显示BCY14798完全消耗, 保留了BCY14601, 并检测到一个具有所需m/z的主峰。过滤并减压浓缩反应混合物, 以得到残余物。通过制备型HPLC纯化粗产物, 获得白色固体状的BCY15218 (22mg, 2.67 μ mol, 46.61%产率, 95.0%纯度)。计算MW: 7404.6, 观测m/z: 1234.8 ([M+6H]⁶⁺)。

[0158] 分析数据

[0159] 使用质谱和HPLC分析了本发明的异串联双环肽复合物。HPLC设置如下:

[0160] 流动相:A:H₂O中0.1%TFA B:ACN中0.1%TFA

[0161] 流速:1.0ml/min

[0162] 柱:Kintex 1.7 μ m C18 100A 2.1mm*150mm

[0163] 仪器:Agilent UPLC 1290

[0164] 使用的梯度为10分钟的30-60%B,生成的数据如下:

复合物ID	分析数据-质谱	HPLC 保留时间 (min)
[0165] BCY13272	计算 MW: 7102.28, 观测 m/z: 1776.4 [M+4H] ⁴⁺ , 1421.3 [M+5H] ⁺	7.07

[0166] 生物数据

[0167] 1. 与肿瘤细胞共培养的CD137报告基因测定

[0168] 通过将1%FBS加入RPMI-1640 (Promega试剂盒CS196005的成分)中制备培养介质,称为R1介质。在无菌96孔板中制备测试物在R1中的系列稀释液。在白色细胞培养板的指定孔中加入25 μ L每孔的测试物或R1 (作为背景对照)。收获肿瘤细胞*,并以400,000个细胞/mL的浓度重悬于R1介质中。将25 μ L/孔的肿瘤细胞加入白色细胞培养板中。在水浴中解冻Jurkat细胞 (Promega试剂盒CS196005,0.5mL),然后加入5ml预加温的R1介质中。然后将25 μ L/孔的Jurkat细胞加入白色细胞培养板中。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂将细胞和测试物孵育6h。在6h结束时,加入75 μ L/孔的Bio-GloTM试剂 (Promega)并孵育10min,然后在读板器 (Clariostar, BMG)中读取发光值。计算相对于仅细胞 (Jurkat细胞+共培养中使用的细胞系)的变化倍数,并在GraphPad Prism中绘制为log (激动剂)与应答的曲线,以确定EC₅₀ (nM)和相对于背景的诱导倍数(最大值)。

[0169] 对于EphA2,用于共培养的肿瘤细胞类型是A549、PC-3和HT29。

[0170] 图1所示的数据显示,在CD137报告基因测定中,在存在表达EphA2的细胞系 (A549)时,EphA2/CD137异串联BCY13272诱导强烈的CD137激活,而非结合对照分子 (BCY13626)未显示CD137激活。

[0171] 图1和下表1所示的数据显示,在CD137报告基因测定中,BCY13272诱导强烈的CD137激活。如不与EphA2或CD137关联的非结合对照 (BCY13626)缺乏活性所示的,所述激活依赖于异串联物与CD137和EphA2二者的结合。

[0172] 下表1报告了在与表达EphA2的肿瘤细胞系共培养的CD137报告基因测定中,BCY13272诱导的EC₅₀ (nM)和诱导倍数的总结:

[0173] 表1:EphA2/CD137异串联双环肽复合物在CD137报告基因测定中的活性

复合物ID	EphA2 细胞系	EC50 (nM)	E _{max}	EC50 几何平均值/细胞系
[0174] BCY13272	PC-3	0.245	44.5	0.117
		0.0805	44.2	
		0.0898	53	
	A549	0.1468	25.7	0.127
		0.107	23.6	
		0.132	30.2	
	HT-29	0.567	36.5	0.279
		0.187	26	
		0.205	36.4	

[0175] 2. SD大鼠中异串联复合物BCY13272的药代动力学

[0176] 通过IV推注或IV输注(15分钟),将在25mM组氨酸HCl、10%蔗糖pH7中配制的异串联复合物BCY13272给药至雄性SD大鼠。在每个时间点通过下颌下静脉或大隐静脉进行连续放血(约80 μ L血液/时间点)。立即将所有血样转移到预冷的含有2 μ L K₂-EDTA(0.5M)作为抗凝剂的微量离心管中,并置于湿冰上。通过在大约4 $^{\circ}$ C、3000g离心,将血样立即处理为血浆。立即将包含内标的沉淀剂加入血浆中,充分混合并在12,000rpm、4 $^{\circ}$ C离心10分钟。将上清液转移到预先标记的聚丙烯微量离心管中,然后在干冰上快速冷冻。根据需要将样品储存在70 $^{\circ}$ C或以下直至分析。使用Orbitrap Q Exactive在正离子模式下,直接进样7.5 μ L上清液样品进行LC-MS/MS分析,以确定分析物的浓度。使用Phoenix WinNonlin 6.3软件程序,通过非房室(non-compartmental)方法分析血浆浓度对时间的数据。报告了C₀、C₁、V_{dss}、T_{1/2}、AUC(0-末点(last))、AUC(0-无限)、MRT(0-末点)、MRT(0-无限)和血浆浓度对时间的曲线图。实验的药代动力学参数如表2所示:

[0177] 表2:SD大鼠中的药代动力学参数

化合物	给药途径	T _{1/2} (h)	V _{dss} (L/kg)	Cl _p (ml/min/kg)
BCY13272	IV Inf	2.5	1.0	7.4

[0179] 3. 食蟹猴中异串联复合物BCY13272的药代动力学

[0180] 通过静脉输注(15或30min)到头静脉中,将在25mM组氨酸HCl、10%蔗糖pH 7中配制的1mg/kg异串联复合物BCY13272给药至非初始食蟹猴。在每个时间点通过受约束的非镇静动物的外周血管进行连续放血(约1.2ml血液/时间点),将血液放入市售可获得的含有钾(K₂)-EDTA*2H₂O(0.85-1.15mg)的管中,置于湿冰上并处理以获得血浆。收集后立即将样品离心(3,000 \times g,在2至8 $^{\circ}$ C离心10分钟)。将0.1mL血浆转移到标记的聚丙烯微量离心管中。立即将5倍的沉淀剂(包含内标100ng/mL拉贝洛尔和100ng/mL地塞米松和100ng/mL甲苯磺丁脲和100ng/mL维拉帕米和100ng/mL格列本脲和100ng/mL塞来昔布的甲醇溶液)加入血浆中,充分混合并在2至8 $^{\circ}$ C、12,000rpm离心10分钟。将上清液样品转移到预先标记的聚丙烯微量离心管中,并在干冰上冷冻。样品储存在-60 $^{\circ}$ C或以下直至LC-MS/MS分析。将40 μ L校准标准品、质量控制、单空白和双空白样品的等分试样加入1.5mL管中。分别用200 μ L IS1淬灭每个样品(双空白除外,双空白样品用200 μ L MeOH和0.5% tritonX-100淬灭),然后用涡旋器将混合物充分涡旋混合(至少15s)并在4 $^{\circ}$ C、12000g离心15min。使用Orbitrap Q Exactive在正离子模式下进样10 μ L上清液进行LC-MS/MS分析,以确定分析物的浓度。使用Phoenix WinNonlin 6.3软件程序,通过非房室方法分析血浆浓度对时间的数据。报告了C₀、C₁、V_{dss}、T_{1/2}、AUC(0-末点)、AUC(0-无限)、MRT(0-末点)、MRT(0-无限)和血浆浓度对时间的曲线图。BCY13272的药代动力学参数如表3所示。

[0181] 表3:食蟹猴中的药代动力学参数

化合物	途径	T _{1/2} (h)	Cl _p (ml/min/kg)	V _{dss} (L/kg)
BCY13272	IV输注(15min)	8.9	4.1	0.82

[0183] 图2显示了3.6mg/kg IV输注(15min)的SD大鼠(n=3)和9.2mg/kg IV输注(15min)的食蟹猴(n=3)中,BCY13272的血浆浓度对时间的曲线。BCY13272在大鼠中具有的稳定分布容积(V_{dss})为1.0L/kg,清除率为7.5mL/min/kg,导致终末半衰期为2.9h。BCY13272在食蟹猴中具有的稳定分布容积(V_{dss})为0.82L/kg,清除率为4.1mL/min/kg,导

致终末半衰期为8.9h。

[0184] 4. CD1小鼠中异串联复合物BCY13272的药代动力学

[0185] 通过腹膜内或静脉施用,将在25mM组氨酸HCl、10%蔗糖pH 7中配制的15mg/kg异串联复合物BCY13272给药至6只雄性CD-1小鼠。在每个时间点通过下颌下静脉或大隐静脉进行连续放血(约80 μ L血液/时间点)。立即将所有血样转移到预冷的含有2 μ L K2-EDTA (0.5M)作为抗凝剂的微量离心管中,并置于湿冰上。通过在大约4 $^{\circ}$ C、3000g离心,将血样立即处理为血浆。立即将包含内标的沉淀剂加入血浆中,充分混合并在12,000rpm、4 $^{\circ}$ C离心10分钟。将上清液转移到预先标记的聚丙烯微量离心管中,然后在干冰上快速冷冻。根据需要将样品储存在70 $^{\circ}$ C或以下直至分析。使用Orbitrap Q Exactive在正离子模式下直接进样7.5 μ L上清液样品进行LC-MS/MS分析,以确定分析物的浓度。使用Phoenix WinNonlin 6.3软件程序,通过非房室方法分析血浆浓度对时间的数据。报告了C₀、C₁、V_{dss}、T_{1/2}、AUC (0-末点)、AUC (0-无限)、MRT (0-末点)、MRT (0-无限)和血浆浓度对时间的曲线图。

[0186] 图2显示了5.5mg/kg IV给药的CD1小鼠(n=3)中BCY13272的血浆浓度对时间的曲线;BCY13272的分布容积(V_{dss})为1.1L/kg,清除率为7.5mL/min/kg,导致终末血浆半衰期为2.9h。

[0187] 5. EphA2/CD137异串联双环肽复合物BCY13272在MC38共培养测定中诱导IFN- γ 细胞因子分泌

[0188] 根据推荐的方案培养MC38和HT1080细胞系。将来自健康人供体的冷冻PBMC解冻并在室温PBS中用benzonase酶洗涤一次,然后重新悬浮于补充10%热灭活胎牛血清(FBS)、1 \times 青霉素/链霉素、10mM HEPES和2mM L-谷氨酰胺的RPMI中(在本文中称为R10介质)。将100 μ L PBMC(1,000,000个PBMC/ml)和100 μ L肿瘤细胞(100,000个肿瘤细胞/ml)(效应细胞:靶细胞比例(E:T)10:1)铺于96孔平板的每个孔中,用于共培养测定。在第0天将100ng/ml可溶性抗CD3 mAb(克隆OKT3)加入培养物中,以刺激人PBMC。在R10介质中稀释待测物、对照化合物或载体对照,并将50 μ L加入各个孔中,使每孔的最终体积达到250 μ L。用透气膜覆盖板并在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的加湿室中孵育两天。刺激后24和48小时收集上清液,用Luminex检测人IFN- γ 。简要地,将标准品和样品加入黑色96孔板中。加入微粒混合物(microparticle cocktail)(在Luminex试剂盒中提供,R&D Systems)并在室温震荡2小时。使用磁性支架,洗板3次。然后将生物素混合物加入板中并在RT震荡1小时。使用磁性支架,洗板3次。将链霉亲和素混合物加入板中并在RT震荡30分钟。使用磁性支架,洗板3次,将细胞重悬于100 μ L洗涤缓冲液中,在RT震荡2分钟,然后使用Luminex 2000读数。使用内置Luminex软件分析原始数据以生成标准曲线并插入蛋白质浓度,所有其他数据分析和绘图均使用Excel和Prism软件进行。数据表示一项研究,其中测试三个独立供体PBMC的实验重复。

[0189] 图2和下表4所示的数据显示,如CD3刺激后的IFN- γ 和IL-2分泌所证明的,BCY13272诱导强烈的CD137激活。如非结合对照BCY12762和BCY13692缺乏活性所证明的(其中CD137和EphA2结合剂分别包含所有D-氨基酸,而产生非结合类似物),所述激活依赖于异串联物与CD137和EphA2二者的结合。

[0190] 表4:在人PBMC-MC38/HT-1080共培养测定中EphA2/CD137异串联双环复合物BCY13272诱导的IL-2细胞因子分泌的EC₅₀

[0191]

复合物ID	细胞系	EC ₅₀ (nM)	N=
-------	-----	-----------------------	----

BCY13272	MC38	0.79±0.24	5
BCY13272	HT-1080	0.55±0.47	4

[0192] 6. BCY13272在同基因MC38肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0193] 向6-8周龄雌性C57BL/6J-hCD137小鼠[B-hTNFRSF9 (CD137) 小鼠; Biocytogen]皮下移植 1×10^6 个MC38细胞。当平均肿瘤体积达到约 80mm^3 时,将小鼠随机分为治疗组($n=6$ /队列),并用载体(25mM组氨酸、10%蔗糖、pH 7)、8mg/kg BCY13272、0.9mg/kg BCY13272和0.1mg/kg BCY13272静脉内(IV)治疗。所有治疗每周给予两次(BIW),共6次给药。从治疗开始到第28天监测肿瘤生长。跟踪完全应答者动物($n=7$)直至治疗开始后第62天,并以移植 2×10^6 个MC38肿瘤细胞进行再次挑战(re-challenge),并监测肿瘤生长28天。平行地,向初始年龄匹配对照huCD137 C57B1/6小鼠($n=5$)移植 2×10^6 个MC38肿瘤细胞,监测28天。

[0194] 该实验的结果可以见图3,其中可以看出BCY13272导致显著的抗肿瘤活性,在0.9(6只中有2只完全应答者)和8mg/kg(6只中有5只完全应答者)的剂量水平上观察到完全应答(图3的A)。与初始年龄匹配对照huCD137 C57B1/6小鼠(得肿瘤率100%)中不同,在BCY13272完全应答者动物中未观察到肿瘤再生长(图3的B)。这些数据表明BCY13272具有显著的抗肿瘤活性,并且BCY13272治疗可以在完全应答者动物中导致免疫原性记忆。

[0195] 7. 如SPR测量的BCY13272与EphA2和CD137结合

[0196] (a) CD137

[0197] 进行Biacore实验以确定异串联肽与人CD137蛋白结合的 k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)、 k_d (s^{-1})和 K_D (nM)值。将重组人CD137(R&D systems)重悬于PBS中,并按照制造商建议的方案使用EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin试剂(Thermo Fisher)进行生物素化。使用离心柱将蛋白质脱盐以去除未偶联的生物素,并将其移入PBS中。

[0198] 为了分析肽结合,使用Biacore T200或Biacore 3000仪器,使用XanTec CMD500D芯片。在25°C使用标准胺偶联化学将链霉亲和素固定在芯片上,使用HBS-N(10mM HEPES, 0.15M NaCl, pH 7.4)作为运行缓冲液。简要地,将1:1比例的0.4M 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)/0.1M N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)以 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流速注入7min,以活化羧甲基葡聚糖表面。为了捕获链霉亲和素,将蛋白质在10mM乙酸钠(pH 4.5)中稀释至0.2mg/mL,并通过将 $120 \mu\text{L}$ 注入活化的芯片表面进行捕获。用1M乙醇胺(pH 8.5)进样7min封闭残余的活化基团,以270-1500RU的水平捕获生物素化的CD137。将缓冲液更改为PBS/0.05%吐温20,并在该缓冲液中制备系列稀释的所述肽,使DMSO终浓度为0.5%。最高的肽浓度为500nM,进行6次进一步的2倍或3倍稀释。在25°C以 $90 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流速运行SPR分析,结合60秒,解离900秒。在每个循环后采用再生步骤($10 \mu\text{L}$ 的10mM甘氨酸pH 2)。数据根据需要对DMSO排除体积效应进行了校正。使用标准处理程序对所有数据针对空白注入和参照表面进行双重参照(double-referenced),并使用Scrubber软件2.0c版(BioLogic Software)进行数据处理和动力学拟合。使用简单1:1结合模型拟合数据,并在适当的情况下考虑质量传递(mass transport)的影响。

[0199] (b) EphA2

[0200] 进行Biacore实验以确定BCY13272与人EphA2蛋白结合的 k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)、 k_d (s^{-1})和 K_D (nM)值。

[0201] 在4mM乙酸钠、100mM NaCl、pH 5.4中用EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin对EphA2

进行生物素化1小时,生物素的摩尔数相对于蛋白质3倍过量。将反应混合物对PBS进行透析后,使用荧光生物素定量试剂盒(Thermo)确定标记程度。为了分析肽结合,使用Biacore T200仪器,使用XanTec CMD500D芯片。在25℃使用标准胺偶联化学将链霉亲和素固定在芯片上,使用HBS-N(10mM HEPES,0.15M NaCl,pH 7.4)作为运行缓冲液。简要地,将1:1比例的0.4M 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)/0.1M N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)以10 μ L/min的流速注入7min,活化羧甲基葡聚糖表面。为了捕获链霉亲和素,将蛋白质在10mM乙酸钠(pH 4.5)中稀释至0.2mg/mL,并通过将120 μ L注入活化的芯片表面进行捕获。用1M乙醇胺(pH 8.5):HBS-N(1:1)注射7min封闭残余的活化基团。将缓冲液更改为PBS/0.05%吐温20,使用在缓冲液中将蛋白质稀释为0.2 μ M,以500-1500RU的水平捕获生物素化的EphA2。在该缓冲液中制备肽的稀释系列,最终DMSO浓度为0.5%,最高肽浓度为50或100nM,进行6次进一步的2倍稀释。在25℃以90 μ L/min的流速运行SPR分析,结合60秒,解离900-1200秒。数据对DMSO排除体积效应进行了校正。使用标准处理程序对所有数据针对空白注入和参照表面进行双重参照(double-referenced),并使用Scrubber软件2.0c版(BioLogic Software)进行数据处理和动力学拟合。使用简单1:1结合模型拟合数据,并在适当的情况下考虑质量传递的影响。

[0202] 图5的A显示的传感图表明,BCY13272以2.0nM的亲合力与EphA2(人)结合。图5的B显示了BCY13272以高亲合力结合CD137(人)的传感图。由于BCY13272中存在2个CD137结合双环,从固定化CD137蛋白的解离速率非常慢,报告的 K_D 可能被高估(图4的B)。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 拜斯科技发展有限公司
[0003]	<120> 异串联双环肽复合物
[0004]	<130> BIC-C-P2831PCT
[0005]	<150> 62/880,191
[0006]	<151> 2019-07-30
[0007]	<150> 62/910,088
[0008]	<151> 2019-10-03
[0009]	<150> 62/931,442
[0010]	<151> 2019-11-06
[0011]	<150> 63/022,667
[0012]	<151> 2020-05-11
[0013]	<150> 63/024,715
[0014]	<151> 2020-05-14
[0015]	<160> 4
[0016]	<170> PatentIn version 3.5
[0017]	<210> 1
[0018]	<211> 18
[0019]	<212> PRT
[0020]	<213> 人工序列
[0021]	<220>
[0022]	<223> 合成肽
[0023]	<220>
[0024]	<221> Xaa
[0025]	<222> (2) .. (2)
[0026]	<223> Xaa是HArg
[0027]	<220>
[0028]	<221> Xaa
[0029]	<222> (5) .. (5)
[0030]	<223> Xaa是HyP
[0031]	<220>
[0032]	<221> Xaa
[0033]	<222> (15) .. (15)
[0034]	<223> Xaa是d1Na1
[0035]	<400> 1
[0036]	Ala Xaa Asp Cys Xaa Leu Val Asn Pro Leu Cys Leu Glu Pro Xaa Trp
[0037]	1 5 10 15
[0038]	Thr Cys

[0039] <210> 2
 [0040] <211> 16
 [0041] <212> PRT
 [0042] <213> 人工序列
 [0043] <220>
 [0044] <223> 合成肽
 [0045] <220>
 [0046] <221> Xaa
 [0047] <222> (2) .. (2)
 [0048] <223> Xaa是tBuAla
 [0049] <220>
 [0050] <221> Xaa
 [0051] <222> (5) .. (5)
 [0052] <223> Xaa是D-Lys (PYA)
 [0053] <220>
 [0054] <221> Xaa
 [0055] <222> (14) .. (14)
 [0056] <223> Xaa是Nle
 [0057] <400> 2
 [0058] Cys Xaa Pro Glu Xaa Pro Tyr Cys Phe Ala Asp Pro Tyr Xaa Cys Ala
 [0059] 1 5 10 15
 [0060] <210> 3
 [0061] <211> 16
 [0062] <212> PRT
 [0063] <213> 人工序列
 [0064] <220>
 [0065] <223> 合成肽
 [0066] <220>
 [0067] <221> Xaa
 [0068] <222> (2) .. (2)
 [0069] <223> Xaa是tBuAla
 [0070] <220>
 [0071] <221> Xaa
 [0072] <222> (5) .. (5)
 [0073] <223> Xaa是D-Lys (PYA)
 [0074] <220>
 [0075] <221> Xaa
 [0076] <222> (14) .. (14)
 [0077] <223> Xaa是Nle

[0078]	<400>	3																		
[0079]	Cys	Xaa	Pro	Glu	Xaa	Pro	Tyr	Cys	Phe	Ala	Asp	Pro	Tyr	Xaa	Cys	Ala				
[0080]	1				5						10					15				
[0081]	<210>	4																		
[0082]	<211>	16																		
[0083]	<212>	PRT																		
[0084]	<213>	人工序列																		
[0085]	<220>																			
[0086]	<223>	合成肽																		
[0087]	<220>																			
[0088]	<221>	Xaa																		
[0089]	<222>	(2) .. (2)																		
[0090]	<223>	Xaa是tBuAla																		
[0091]	<220>																			
[0092]	<221>	Xaa																		
[0093]	<222>	(5) .. (5)																		
[0094]	<223>	Xaa是D-Lys(PYA)																		
[0095]	<220>																			
[0096]	<221>	Xaa																		
[0097]	<222>	(14) .. (14)																		
[0098]	<223>	Xaa是Nle																		
[0099]	<400>	4																		
[0100]	Cys	Xaa	Pro	Glu	Xaa	Pro	Tyr	Cys	Phe	Ala	Asp	Pro	Tyr	Xaa	Cys	Lys				
[0101]	1				5						10					15				

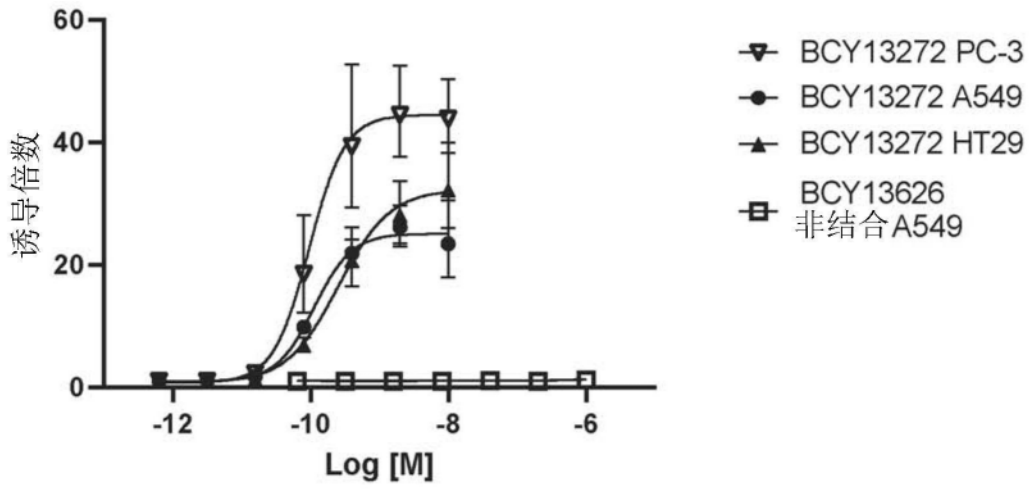


图1

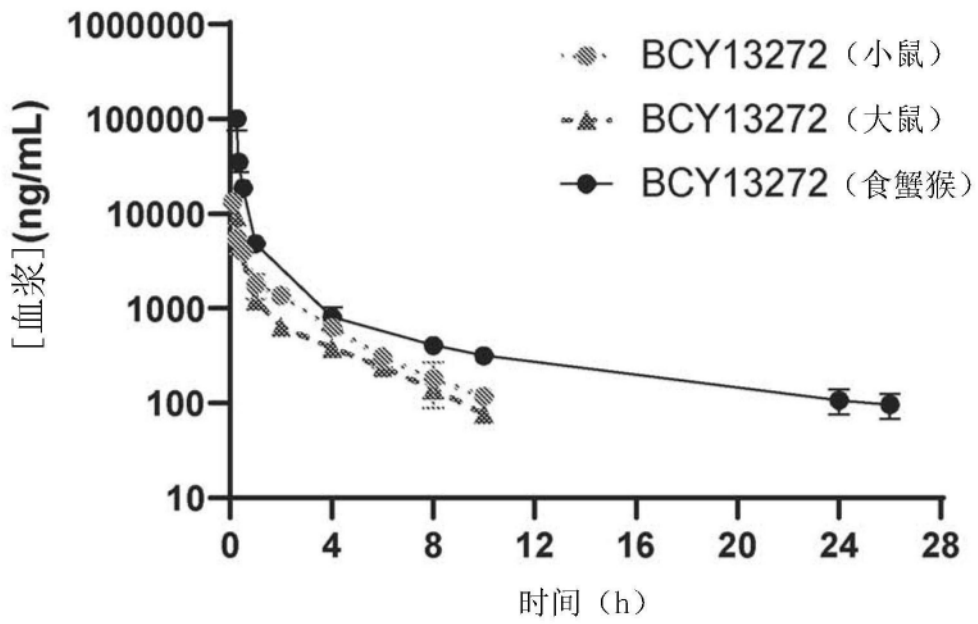


图2

A

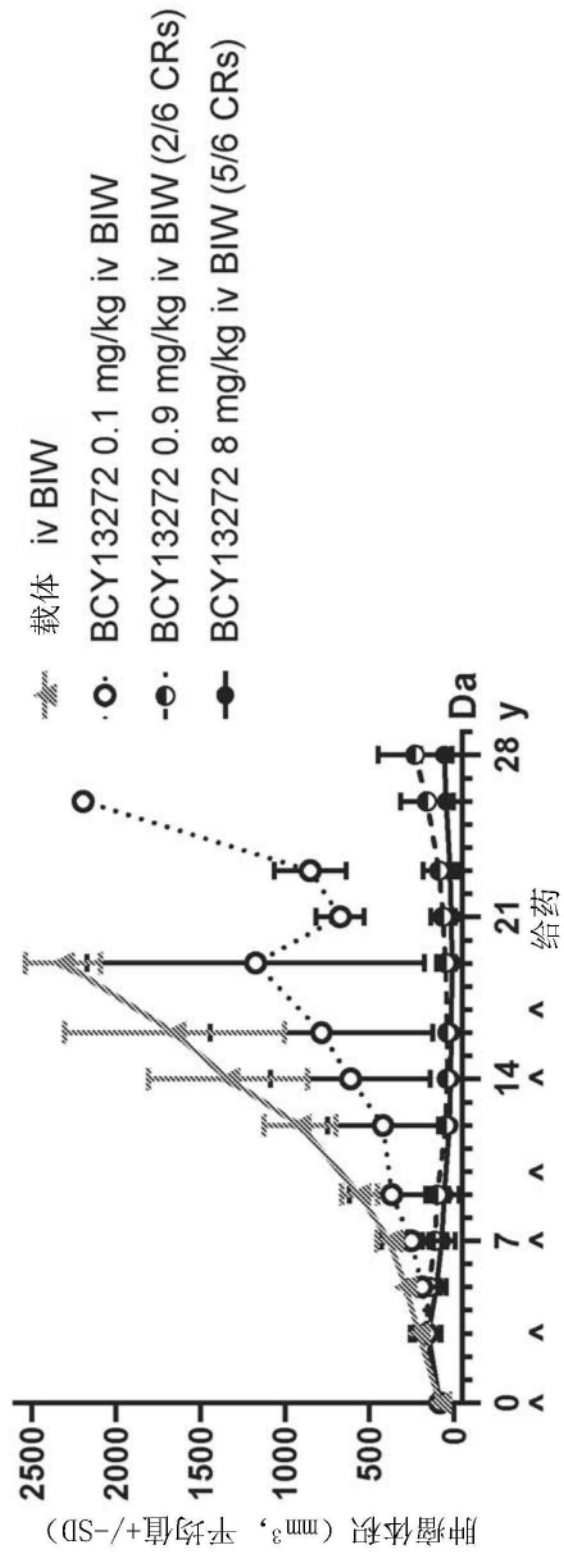


图3

B

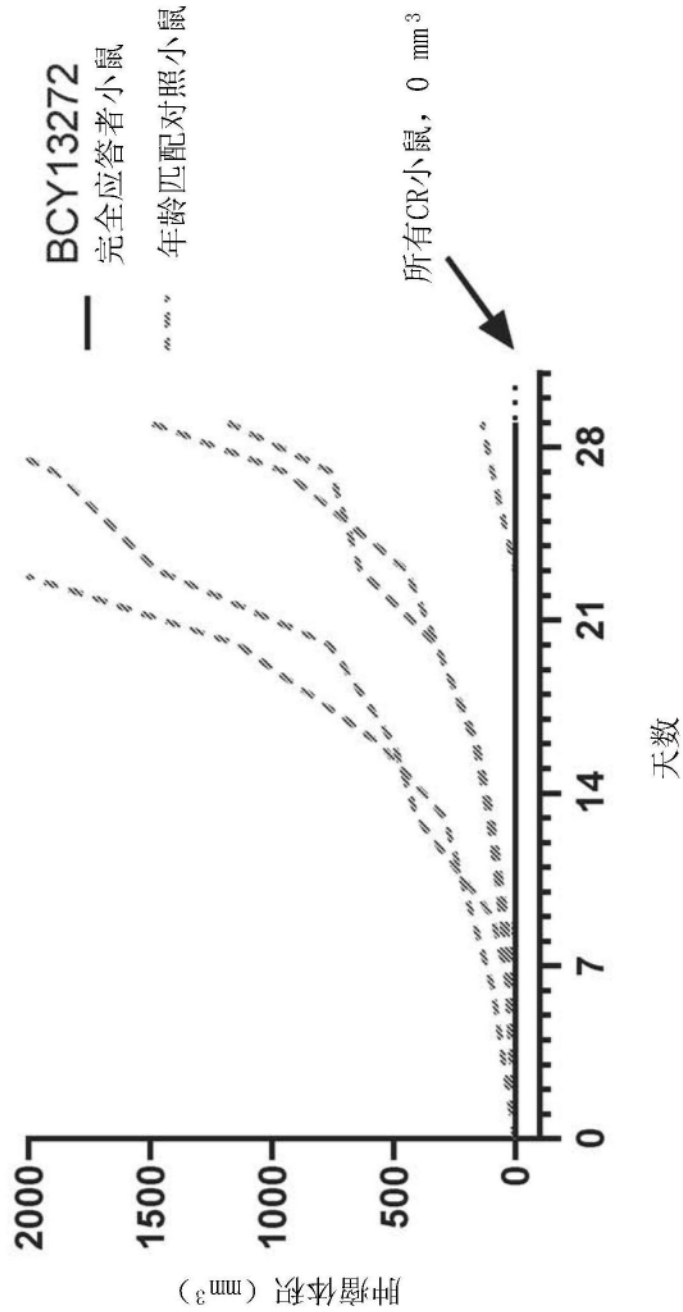
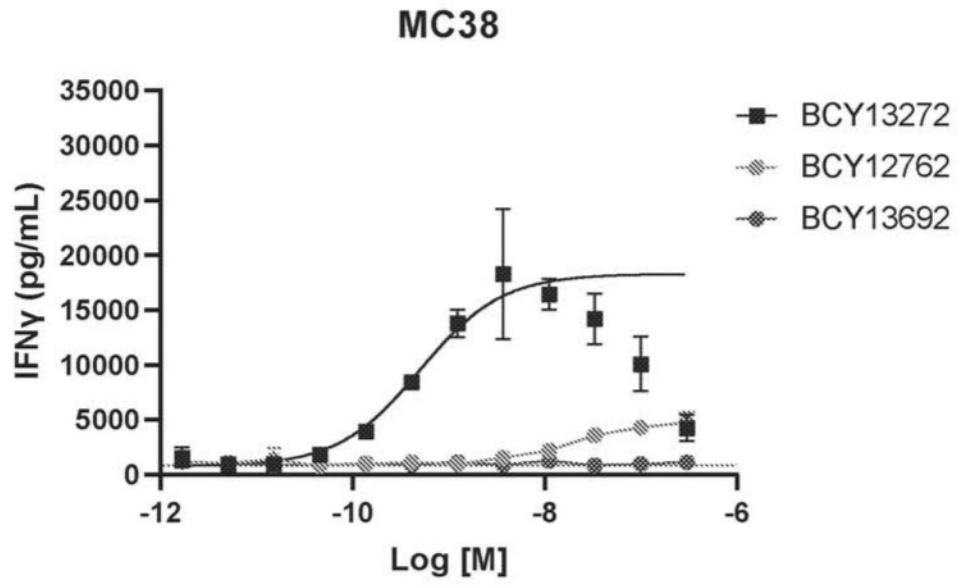


图3(续)

A



B

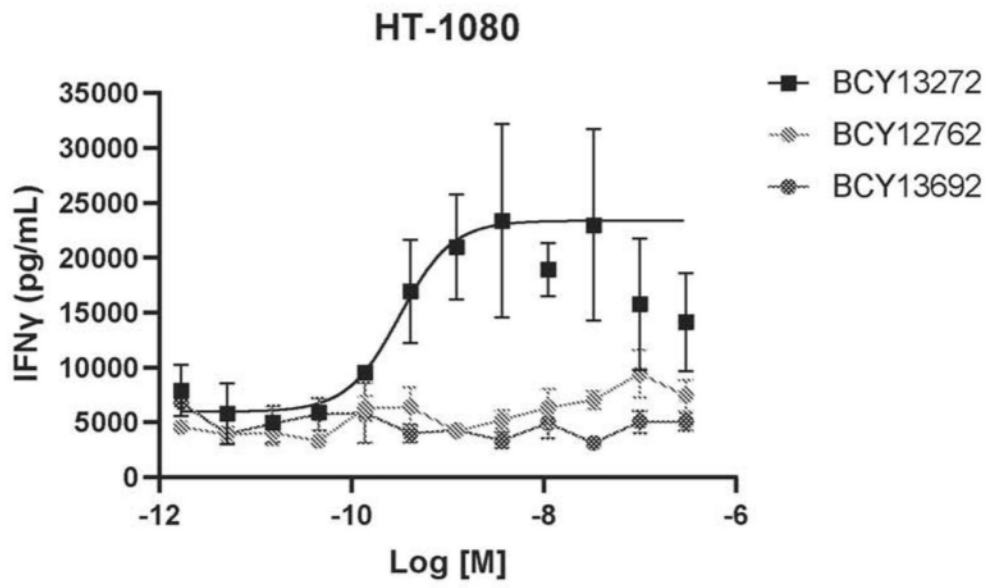


图4

C

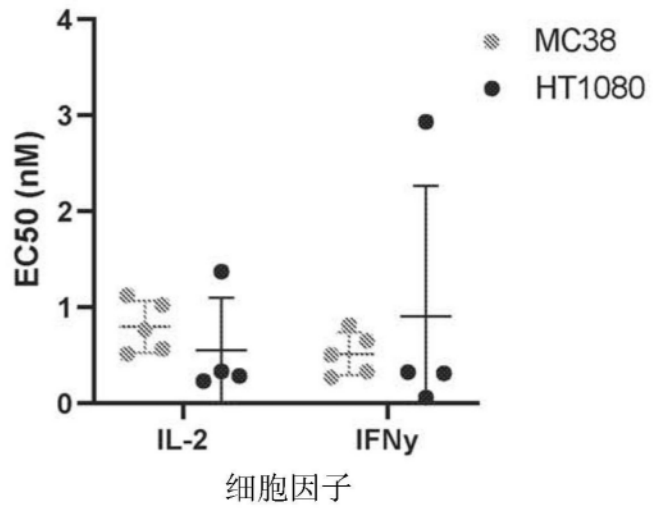
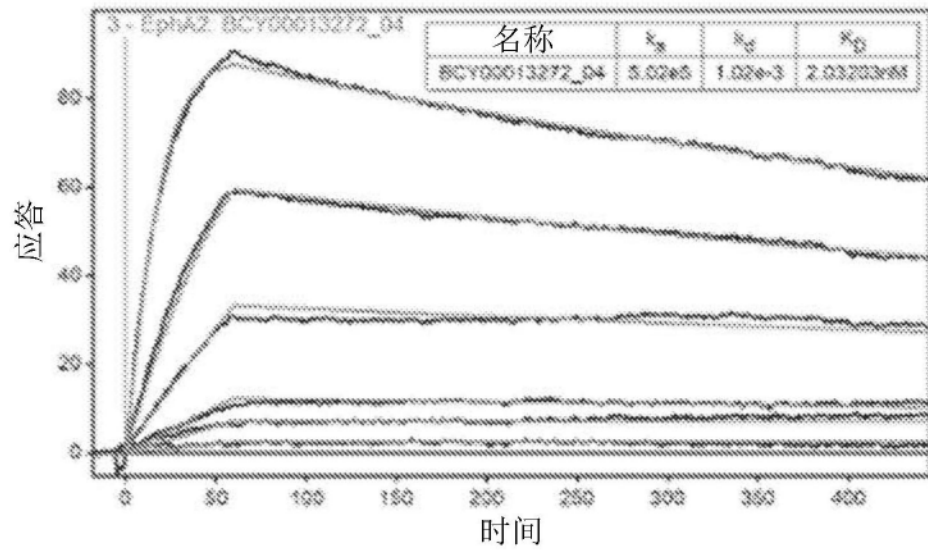


图4 (续)

A



B

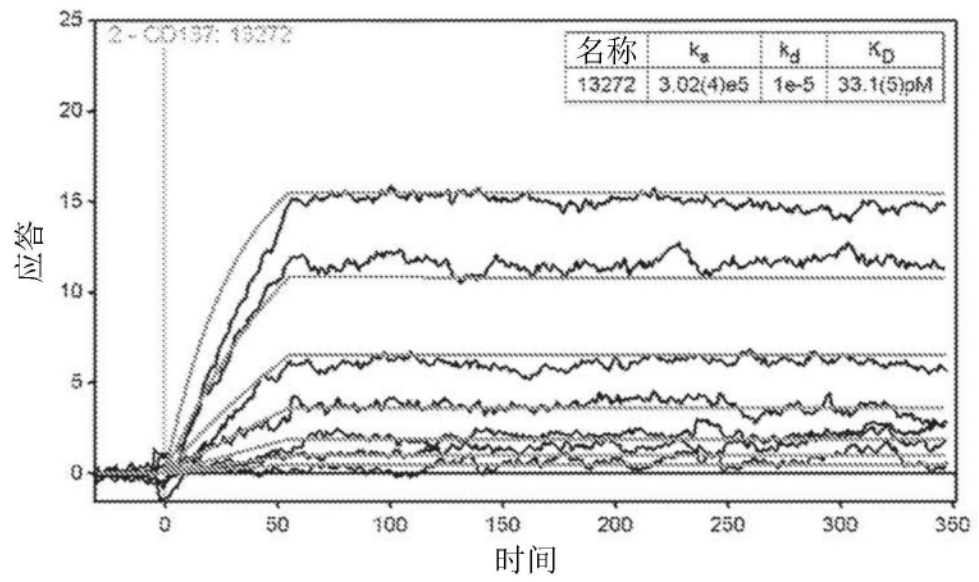


图5