



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114787197 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 22

(21) 申请号 202080064375.8

(22) 申请日 2020.08.13

(30) 优先权数据

PCT/GB2020/051831 2020.07.30 GB  
62/885,947 2019.08.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2022.03.14

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/GB2020/051923 2020.08.13

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02021/028686 EN 2021.02.18

(71) 申请人 拜斯科技开发有限公司  
地址 英国剑桥

(72) 发明人 K·麦克唐奈 P·鄂波驮耶  
G·马德

(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 韩文华

(51) Int.Cl.  
C07K 19/00 (2006.01)  
A61K 47/64 (2017.01)  
A61K 47/66 (2017.01)  
A61K 49/00 (2006.01)  
A61K 51/08 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01)  
A61P 31/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 35/02 (2006.01)

权利要求书5页 说明书63页

序列表5页 附图5页

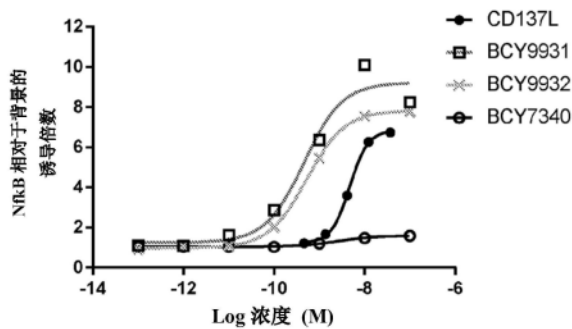
按照条约第19条修改的权利要求书5页

(54) 发明名称

修饰的多聚双环肽配体

(57) 摘要

本发明涉及多肽的多聚体,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两个或更多个肽环,其特征在于所述多聚结合复合物另外包含与其偶联的修饰基团。本发明还描述了通过各种化学接头和不同长度和刚性的铰链、使用多肽内不同的连接点进行多肽的多聚化。特别地,本发明描述了作为CD137的高亲和力结合物和激活剂的肽多聚体。本发明还包括包含与一个或多个效应子基团和/或官能团偶联的所述多聚结合复合物的药物偶联物,包含所述多聚结合复合物和药物偶联物的药物组合物,以及所述多聚结合复合物和药物偶联物在预防、抑制或治疗CD137介导的疾病或疾患中的用途、和在分析方法中的用途(即作为示踪物或标签)。



1. 一种多聚结合复合物,其包含至少两个双环肽配体和分子支架,其中所述肽配体可以是相同的或不同的,其各自包含多肽,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,其特征在于所述多聚结合复合物另外包含与其偶联的修饰基团。

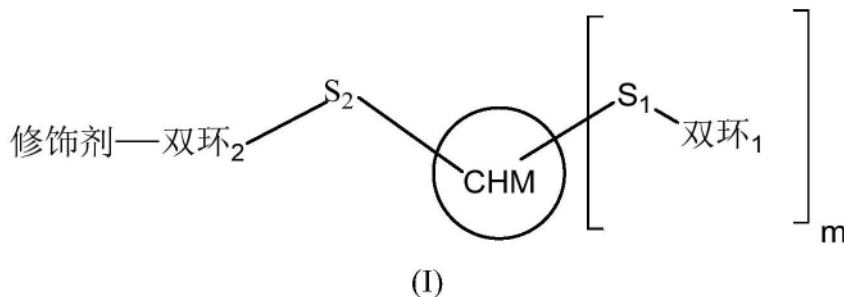
2. 根据权利要求1所述的多聚结合复合物,其中所述修饰基团包括示踪分子、可检测部分或脂质。

3. 根据权利要求2所述的多聚结合复合物,其中所述示踪分子是选自荧光素、Alexa Fluor™ 488、青色素-5和BODIPY™ FL的荧光团。

4. 根据权利要求2所述的多聚结合复合物,其中所述可检测部分是结合的可检测部分,如含有生物素的部分,特别是含有生物素并且聚乙二醇化的部分,例如生物素-Peg4和生物素-Peg12。

5. 根据权利要求2所述的多聚结合复合物,其中所述脂质是含有棕榈酰基的部分。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的多聚结合复合物,其包含式(I)的化合物:



其中CHM表示中央铰链部分;

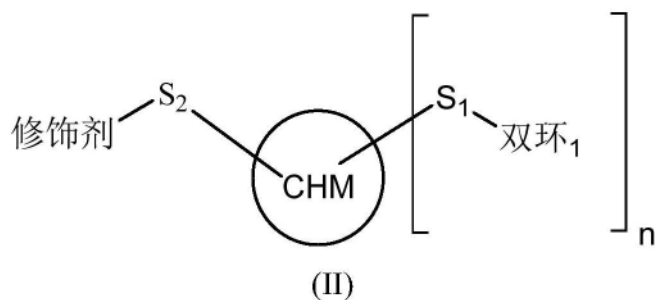
$S_1$ 和 $S_2$ 表示间隔子基团;

双环<sub>1</sub>和双环<sub>2</sub>表示如权利要求1所定义的双环肽配体;

$m$ 表示选自1至9的整数;和

修饰剂表示如权利要求1至5中任一项所定义的修饰基团。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的多聚结合复合物,其包含式(II)的化合物:



其中CHM表示中央铰链部分;

$S_1$ 和 $S_2$ 表示间隔子基团;

双环<sub>1</sub>表示如权利要求1所定义的双环肽配体;

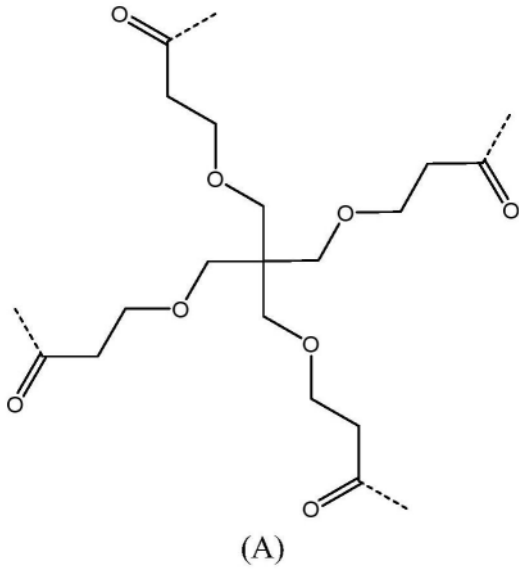
$n$ 表示选自2至10的整数;和

修饰剂表示如权利要求1至5中任一项所定义的修饰基团。

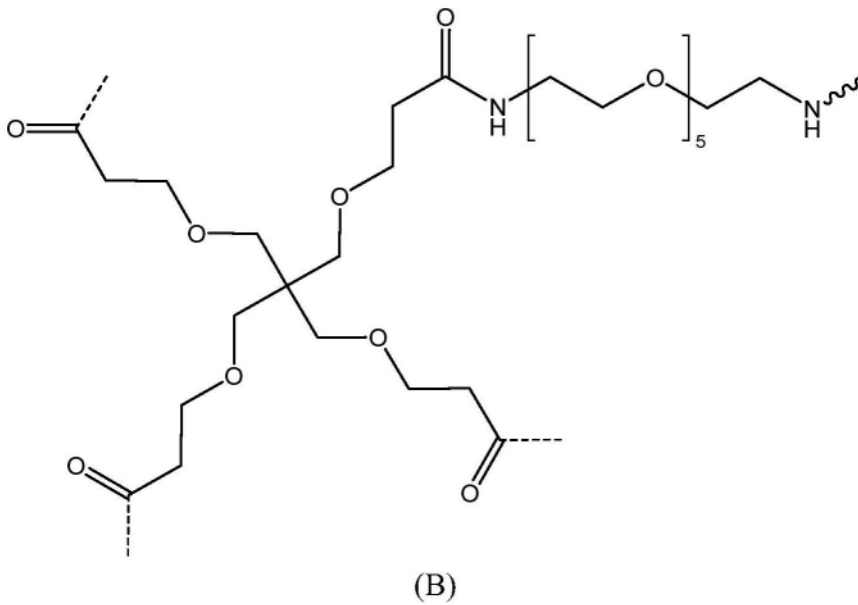
8. 根据权利要求6或7所述的多聚结合复合物,其中, $m$ 和 $n$ 表示选自2至9的整数,如2或

3。

9. 根据权利要求8所述的多聚结合复合物,其中m和n表示3,CHM是式(A)的基序:

其中“-----”表示与每个间隔子基团( $S_1$ 或 $S_2$ )的连接点。

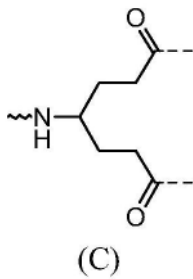
10. 根据权利要求8所述的多聚结合复合物,其中n表示3,CHM是式(B)的基序:



其中“-----”表示与间隔子基团的连接点;和

“~~~~~”表示与修饰基团的连接点。

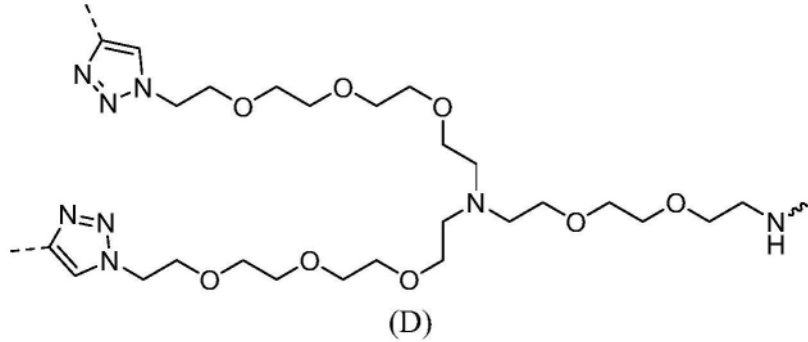
11. 根据权利要求8所述的多聚结合复合物,其中n表示2,CHM是式(C)的基序:



其中“-----”表示与间隔子基团的连接点;和

“~~~~~”表示与修饰基团的连接点。

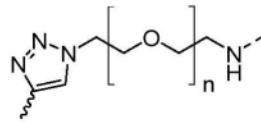
12. 根据权利要求8所述的多聚结合复合物,其中n表示2,CHM是式(D)的基序:



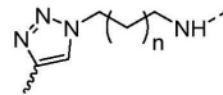
其中“-----”表示与间隔子基团的连接点;和

“~~~~~”表示与修饰基团的连接点。

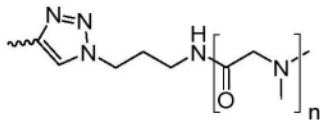
13. 根据权利要求6至12中任一项所述的多聚结合复合物,其中所述间隔子(S<sub>1</sub>和S<sub>2</sub>)选自间隔子S<sub>A</sub>、S<sub>B</sub>、S<sub>C</sub>、S<sub>D</sub>、S<sub>E</sub>、S<sub>F</sub>、S<sub>G</sub>和S<sub>H</sub>中的任一种:



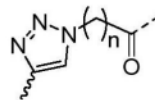
S<sub>A</sub>  
n = 5, 10 和 23



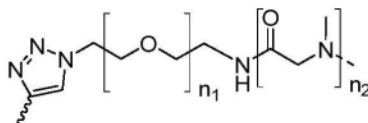
S<sub>E</sub>  
n = 1



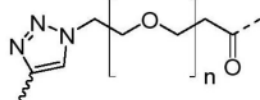
S<sub>B</sub>  
n = 5, 10



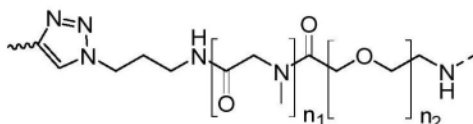
S<sub>F</sub>  
n = 1



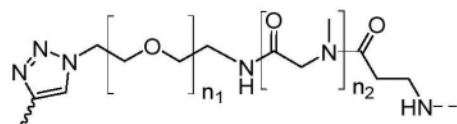
S<sub>C</sub>  
n<sub>1</sub> = 5, n<sub>2</sub> = 5  
n<sub>1</sub> = 10, n<sub>2</sub> = 10



S<sub>G</sub>  
n = 5 和 10




S<sub>D</sub>  
n<sub>1</sub> = 5, n<sub>2</sub> = 5  
n<sub>1</sub> = 10, n<sub>2</sub> = 10



S<sub>H</sub>  
n<sub>1</sub> = 5, n<sub>2</sub> = 5  
n<sub>1</sub> = 10, n<sub>2</sub> = 10

其中“-----”表示与CHM基团的连接点;和

“”表示与双环或修饰基团的连接点,如S<sub>n</sub>,其中n是5、10或23,如10或23。

14. 根据权利要求6至12中任一项所述的多聚结合复合物,其中所述间隔子(S<sub>1</sub>和S<sub>2</sub>)缺失。

15. 根据权利要求1至14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CD137具有特异性,如每种所述肽配体均对CD137具有特异性。

16. 根据权利要求1至15中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述环序列包含6个氨基酸。

17. 根据权利要求1至16中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述肽配体包含选自以下的核心氨基酸序列:

C<sub>i</sub>IEEGQYC<sub>ii</sub>FADPY[N1e]C<sub>iii</sub> (SEQ ID NO:1);

C<sub>i</sub>IEEGQYC<sub>ii</sub>FADPYMC<sub>iii</sub> (SEQ ID NO:2);

C<sub>i</sub>IEE[dK(PYA)]QYC<sub>ii</sub>FADPY[N1e]C<sub>iii</sub> (SEQ ID NO:3);

[dC<sub>i</sub>][dI][dE][dE]K[dQ][dY][dC<sub>ii</sub>][dF][dA][dD][dP][dY][dN1e][dC<sub>iii</sub>] (SEQ ID NO:4);

[dC<sub>i</sub>][dI][dE][dE]K(PYA)[dQ][dY][dC<sub>ii</sub>][dF][dA][dD][dP][dY][dN1e][dC<sub>iii</sub>] (SEQ ID NO:5);

C<sub>i</sub>[tBuAla]PK(PYA)[dA]PYC<sub>ii</sub>FADPY[N1e]C<sub>iii</sub> (SEQ ID NO:6);和

C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[N1e]C<sub>iii</sub> (SEQ ID NO:7);

其中C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>和C<sub>iii</sub>分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,N1e表示正亮氨酸,PYA表示炔丙氨酸,tBuAla表示叔丁基丙氨酸,或其药学上可接受的盐。

18. 根据权利要求17所定义的多聚结合复合物,其中所述肽配体包含N和C末端添加,并包含选自以下的氨基酸序列:

Ac-A- (SEQ ID NO:1) -[Dap(PYA)]-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY7741);

Ac-A- (SEQ ID NO:1) -[Dap(Lys(PYA))]-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY12799);

Ac- (SEQ ID NO:2) -A-Pra-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY7077);

Ac-A- (SEQ ID NO:3) -A-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY7744);

Ac-A- (SEQ ID NO:3) -K-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY11613);

Ac-[dA]- (SEQ ID NO:4) -[dA]-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY11506);

Ac-[dA]- (SEQ ID NO:5) -[dK]-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY12144);

Ac- (SEQ ID NO:6) -A-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY8927);

Ac- (SEQ ID NO:6) -K-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY12357);

Ac- (SEQ ID NO:7) -A (在本文中称为BCY8928);和

Ac- (SEQ ID NO:7) -K (在本文中称为BCY13389);

其中Dap表示二氨基丙氨酸,PYA表示炔丙氨酸,Pra表示炔丙基甘氨酸,或其药学上可接受的盐。

19. 根据权利要求1至18中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述反应性基团包含半胱氨酸。

20. 根据权利要求1至19中任一项所定义的多聚结合复合物,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)。

21. 根据权利要求1至20中任一项所定义的多聚结合复合物,其列于表1中,但非结合对照BCY12374除外。

22. 根据权利要求1至14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(如两种)对CD137具有特异性,并且至少一种所述肽配体(如一种)对粘连蛋白-4具有特异性,如表2中所列出的那些。

23. 根据权利要求1至14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(如两种)对CD137具有特异性,并且至少一种所述肽配体(如一种)对EphA2具有特异性,如表3中所列出的那些。

24. 根据权利要求1至23中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述药学上可接受的盐选自游离酸或钠、钾、钙、铵盐。

25. 根据权利要求13至24中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述CD137为人CD137。

26. 一种药物偶联物,其包含如权利要求1至25中任一项所定义的多聚结合复合物,所述多聚结合复合物与一个或多个效应子基团和/或官能团偶联。

27. 一种药物组合物,其包含权利要求1至25中任一项的多聚结合复合物或权利要求26的药物偶联物,与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

28. 根据权利要求1至25中任一项所定义的多聚结合复合物或如权利要求26中所定义的药物偶联物,其用于预防、抑制或治疗CD137介导的疾病或疾患。

29. 根据权利要求1至25中任一项所定义的多聚结合复合物的用途,用于分析方法中(例如作为示踪物或标签)。

## 修饰的多聚双环肽配体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及多肽的多聚体,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,其特征在于所述多聚结合复合物另外包含与其偶联的修饰基团。本发明还描述了通过各种化学接头和不同长度和刚性的铰链、使用多肽内不同的连接点进行多肽的多聚化。特别地,本发明描述了作为CD137的高亲和力结合物和激活剂的肽多聚体。本发明还包括包含与一个或多个效应子基团和/或官能团偶联的所述多聚结合复合物的药物偶联物,包含所述多聚结合复合物和药物偶联物的药物组合物,以及所述多聚结合复合物和药物偶联物在预防、抑制或治疗CD137介导的疾病或疾患中的用途、和在分析方法中的用途(即作为示踪物或标签)。

### 背景技术

[0002] 蛋白质-蛋白质相互作用是细胞功能的重要调节因子。这些相互作用通常涉及大的表面积,因此使用典型的小分子治疗剂既不能被轻易抑制也不能被模拟。此外,许多重要的受体类别(受体酪氨酸激酶、细胞因子受体、肿瘤坏死因子(TNF)受体、T细胞受体和G蛋白偶联受体)需要以特定方向寡聚化受体单体单元,以激活受体信号传导途径。重组蛋白如单克隆抗体和融合蛋白(例如配体-Fc融合体)由于高亲和力和具有多价结合潜力的大的相互作用表面积而能够结合并诱导此类受体的寡聚化。然而,大蛋白质在穿透组织方面效率低下,可能不是调节受体的理想治疗方式,尤其是那些在血管化不良或被穿透屏障(如胰腺癌中的基质屏障)包围的细胞上发现的受体。具有比小分子更大的相互作用表面的小型合成和模块化治疗方式对于绕过穿透屏障并通过寡聚化激活靶受体将是理想的。

[0003] 最近免疫检查点抑制剂(如抗PD-1和抗PD-L1抗体)在治疗各种类型癌症方面的成功提高了对激活共刺激靶标(包括T细胞上的CD137)的分子的兴趣。CD137(4-1BB/TNFRSF9)属于TNF受体超家族,为T细胞提供共刺激信号。

[0004] 在激活的T细胞、B细胞、树突状细胞和自然杀伤(NK)细胞上发现了可诱导的CD137表达。通过其天然配体CD137L或激动性抗体刺激CD137,诱导T细胞剧烈增殖并防止激活诱导的细胞死亡。4-1BB形成异源三聚体复合物,其由两个TNF受体相关因子TRAF-2复合物与TRAF-1组成。这种相互作用通过白细胞特异性蛋白1(LSP-1)增强通过JNK和ERK途径以及通过β-连环蛋白和AKT的信号传导。这些信号传导途径汇聚于主转录因子NF-κB,以调节4-1BB信号传导以及效应免疫反应。

[0005] 激动性抗CD137抗体在小鼠模型中显示出有效的、通常具有治愈性的抗肿瘤活性。与抗PD-1或抗CTLA-4抗体组合时,其抗肿瘤活性甚至进一步提高。这些作用主要由细胞毒性T细胞介导并生成持久的记忆应答。两种人抗CD137抗体目前正在临床进行试验:乌瑞芦单抗(urelumab)已在黑色素瘤中显示出单一药剂的部分应答,但在剂量 $\geq 1\text{mg/kg}$ 时观察到肝毒性,因此将它以次优剂量 $0.1\text{mg/kg}$ 与其他免疫疗法组合;也正在将utolimumab与其他免疫疗法组合在实体瘤中进行评估,但虽然在高达 $5\text{mg/kg}$ 时未观察到肝毒性,但它几乎没有或没有单一药剂活性。

[0006] 环肽能够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 ( $400 \text{ \AA}^2$ ;Wu等人(2007),*Science* 330,1066-71)、具有与整合蛋白 $\alpha\text{V}\beta 3$ ( $355 \text{ \AA}^2$ )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( $603 \text{ \AA}^2$ ;Zhao等人(2007),*J Struct Biol* 160(1),1-10)。

[0007] **Bicycle®**是一类新型治疗类的全合成、受限的双环肽,其具有传统小分子方法无法实现的高亲和力和精细的靶标特异性。**Bicycle®**平台使用噬菌体展示来快速识别和优化结合物,然后可以容易地对其进行化学优化以调整亲和力和物理化学性质。它们的小尺寸(1.5-2kDa)在穿透肿瘤和快速肾脏清除方面具有优势,避免了通常与其他药物形式(包括某些抗体)相关的肝脏和胃肠道毒性。具有快速肾脏清除并缺乏Fc受体相互作用的**Bicycle®**CD137激动剂可以诱导抗肿瘤活性,同时避免肝毒性。

[0008] 需要提供具有修饰特性的可选的双环肽,以便能够检测、追踪、标签或改变所述双环肽的药代动力学特征。

## 发明内容

[0009] 根据本发明的第一方面,提供了多聚结合复合物,其包含至少两个双环肽配体和分子支架,其中所述肽配体可以是相同的或不同的,其各自包含多肽,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,其特征在于所述多聚结合复合物另外包含与其偶联的修饰基团。

[0010] 根据本发明的进一步的方面,提供了一种药物偶联物,其包含与一个或多个效应子基团和/或官能团偶联的如本文所定义的多聚结合复合物。

[0011] 根据本发明的进一步的方面,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。

[0012] 根据本发明的进一步的方面,提供了如本文所定义的多聚结合复合物或药物偶联物,其用于预防、抑制或治疗疾病或疾患,如CD137介导的疾病或疾患。

[0013] 根据本发明的进一步的方面,提供了如本文所定义的多聚结合复合物用于分析方法中的用途(即作为示踪物或标签)。

## 附图说明

[0014] 图1:BCY7340、BCY9931和BCY9932与CD137L相比的CD137报告基因细胞活性测定数据。

[0015] 图2:BCY9931和BCY9932与CD137L相比的CD137报告基因细胞冲洗(Washout)测定。

[0016] 图3:(A) BCY9931、BCY9932和BCY7340与从人PBMC中分离的纯化CD8+/CD137+T细胞

结合。BCY0215是荧光EphA2双环肽单体,其用作结合的阴性对照。(B) BCY12239和BCY11856与CD3+/CD137+原代人免疫细胞结合。BCY11856被设计为非结合荧光多聚体。

[0017] 图4:BCY9931、BCY9932和BCY7340与从食蟹猴PBMC中分离的纯化CD8+/CD137+T细胞结合。BCY0215是荧光EphA2双环肽单体,其用作结合的阴性对照。

[0018] 图5:受体占有率测定,其测量了用BCY8945、BCY7842、BCY7839和BCY11451(未修饰的多聚体)处理后,T细胞上游离CD137受体的水平,其中BCY7340作为标记试剂。BCY11451被合成为非结合多聚体。

[0019] 图6:在(A) CD4+T细胞或(B) CD8+T细胞亚群中,荧光标记的CD137二聚体(BCY15416)与CD137+或CD137-细胞的细胞结合。

[0020] 图7:受体占有率测定,其测量了用BCY12491(EphA2/CD137异串联物(heterotandem))和BCY12797(非结合对照)处理后,T细胞上游离CD137受体的水平,其中BCY15416作为标记试剂。

### 具体实施方式

[0021] 根据本发明的第一方面,提供了多聚结合复合物,其包含至少两个双环肽配体和分子支架,其中所述肽配体可以是相同的或不同的,其各自包含多肽,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,其特征在于所述多聚结合复合物另外包含与其偶联的修饰基团。

[0022] 本发明描述了修饰的多聚结合复合物,其中所述修饰基团的存在提供了优于其未修饰多聚体的多种优点。例如,此类修饰的多聚复合物能够用作示踪物、标签,甚至改变其药代动力学特征,用于分析方法或增强的治疗方法。因此,根据本发明,提供了如本文所定义的多聚结合复合物用于分析方法中的用途(即作为示踪物或标签)。根据本发明,还提供了如本文所定义的多聚结合复合物用于治疗方法中的用途(即作为具有增强的药代动力学特征的治疗剂)。

[0023] 本文提及的术语“修饰剂”是指能够改变未修饰的多聚结合复合物的性质和/或特征的任何基团。

[0024] 在一个实施方案中,修饰基团包括示踪分子、可检测部分或脂质。

[0025] 在一个实施方案中,修饰基团包括示踪分子。此类示踪分子在体外或体内实验中、在追踪、标签或标记(flag)多聚结合复合物的存在方面具有特殊用途。可选地,此类示踪分子的存在能够识别或确定所述多聚结合复合物的结合配偶体。在进一步的实施方案中,示踪分子是荧光团。在更进一步的实施方案中,示踪分子是选自荧光素、Alexa Fluor™ 488、青色素-5和BODIPY™ FL的荧光团。

[0026] 在可选的实施方案中,修饰基团包含可检测部分。在进一步的实施方案中,修饰基团包含结合的可检测部分。在更进一步的实施方案中,修饰基团包含含有生物素的部分,如含有生物素并且聚乙二醇化的部分,如生物素-Peg4和生物素-Peg12。

[0027] 在可选的实施方案中,修饰基团包括脂质。此类脂质分子的存在提供了改变多聚结合复合物的药代动力学特征的优势,例如通过改变所述多聚结合复合物的半衰期。在进一步的实施方案中,脂质是含有棕榈酰基的部分。

[0028] 在一个实施方案中,修饰基团选自荧光团、生物素或脂质。

[0029] 不受理论的束缚,据信,多聚化双环肽能够通过同源交联多于一个的相同受体来激活受体。因此,在一个实施方案中,所述双环肽配体对同一靶标具有特异性。在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双环肽配体。“相同”是指具有相同氨基酸序列的双环肽,最重要的是,相同的氨基酸序列是指所述双环肽的结合部分(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双环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双环肽)、同源三聚体(如果多聚复合物包含三个相同的双环肽)或同源四聚体(如果多聚复合物包含四个相同的双环肽)等。

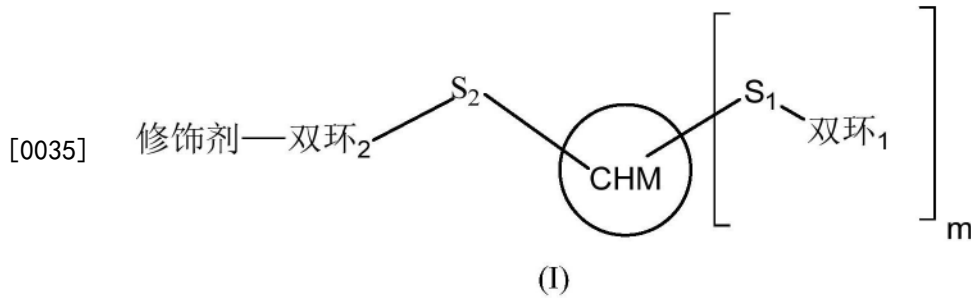
[0030] 在一个可选的实施方案中,多聚结合复合物包含至少两个不同的双环肽配体。“不同”是指双环肽具有不同的氨基酸序列。在该实施方案中,多聚结合复合物中的不同双环肽配体将与同一靶标上的不同表位结合——因此所得靶标结合复合物将产生双互补位(biparatopic)(如果多聚复合物包含两个不同的双环肽)、三互补位(triparatopic)(如果多聚复合物包含三个不同的双环肽)或四互补位(tetraparatopic)(如果多聚复合物包含四个不同的双环肽)等。

[0031] 不受理论束缚,据信,多聚化双环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,所述双环肽配体对不同的靶标具有特异性。将理解的是,在该实施方案中,多聚结合复合物包含至少两种不同的双环肽配体(即具有不同氨基酸序列的双环肽配体)。在该实施方案中,多聚结合复合物中的每个双环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双环肽)、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双环肽)、四特异多聚结合复合物(如果多聚复合物包含四种不同的双环肽)等。

[0032] 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,对于上文提及的双、三和四特异性多聚结合复合物,双环肽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。

[0033] 本发明的多聚结合复合物中的双环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,每个间隔或臂元件将含有一个双环肽。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双环肽。

[0034] 在一个实施方案中,每个双环肽配体通过间隔子基团( $S_1$ 或 $S_2$ )连接至中央铰链部分(CHM),并且修饰基团直接偶联至多聚结合复合物中的双环肽之一。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:



[0036] 其中CHM表示中央铰链部分；

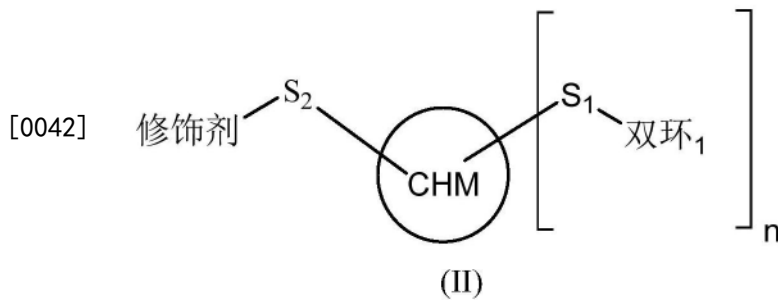
[0037] S<sub>1</sub>和S<sub>2</sub>表示间隔子基团；

[0038] 双环<sub>1</sub>和双环<sub>2</sub>表示如本文所定义的双环肽配体；

[0039] m表示选自1至9的整数；和

[0040] 修饰剂表示如本文所定义的修饰基团。

[0041] 在可选的实施方案中，每个双环肽配体通过间隔子基团(S<sub>1</sub>)连接至中央铰链部分(CHM)，并且修饰基团通过进一步的间隔子基团(S<sub>2</sub>)也连接至中央铰链部分(CHM)。因此，在一个实施方案中，多聚结合复合物包含式(II)的化合物：



[0043] 其中CHM表示中央铰链部分；

[0044] S<sub>1</sub>和S<sub>2</sub>表示间隔子基团；

[0045] 双环<sub>1</sub>表示如本文所定义的双环肽配体；

[0046] n表示选自2至10的整数；和

[0047] 修饰剂表示如本文所定义的修饰基团。

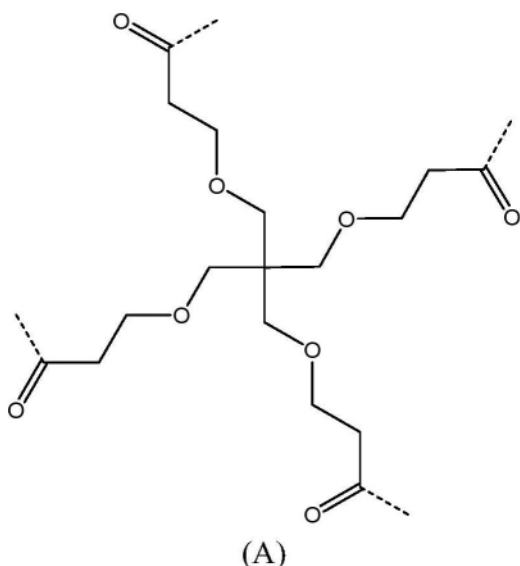
[0048] 在一个实施方案中，m表示选自2至9的整数。在进一步的实施方案中，m表示选自2或3的整数。

[0049] 当m表示3时，将理解的是，中央铰链部分将需要4个连接点(即与3个双环<sub>1</sub>部分的3个连接点、和与单个双环<sub>2</sub>部分的1个连接点)。

[0050] 在更进一步的实施方案中，m表示3。当m表示3时，将理解的是，中央铰链部分将需要4个连接点(即与3个双环<sub>1</sub>部分的3个连接点、和与单个双环<sub>2</sub>部分的1个连接点)。

[0051] 因此，在一个实施方案中，m表示3，并且CHM是式(A)的基序：

[0052]

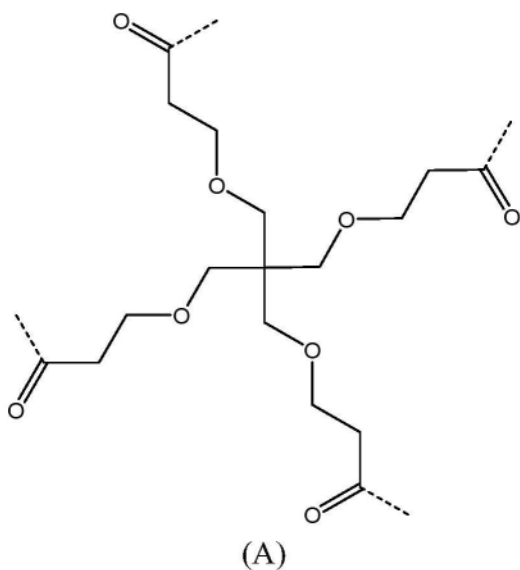


[0053] 其中“-----”表示与每个间隔子基团 ( $S_1$ 或 $S_2$ ) 的连接点。

[0054] 在一个实施方案中,  $n$ 表示选自2至9的整数。在进一步的实施方案中,  $n$ 表示选自2或3的整数。

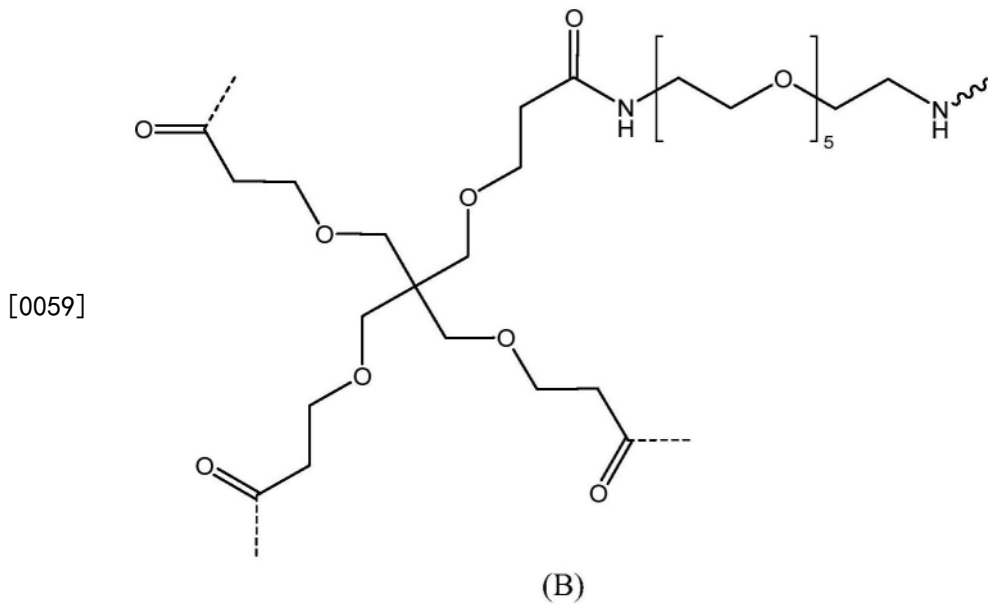
[0055] 当 $n$ 表示3时, 将理解的是, 中央铰链部分将需要4个连接点 (即与3个双环 $_1$ 部分的3个连接点、和与修饰基团的1个连接点)。因此, 在一个实施方案中,  $n$ 表示3, 并且CHM是式 (A) 的基序:

[0056]



[0057] 其中“-----”表示与修饰基团或双环的每个间隔子基团 ( $S_1$ 或 $S_2$ ) 的连接点。

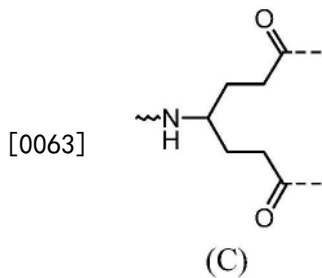
[0058] 在可选的实施方案中,  $n$ 表示3, 并且CHM是式 (B) 的基序:



[0060] 其中“-----”表示与间隔子基团的连接点;和

[0061] “~~~~~”表示与修饰基团的连接点。

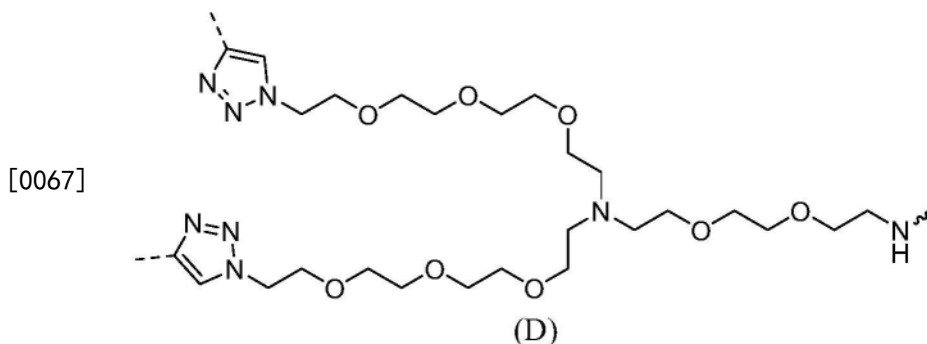
[0062] 当n表示2时,将理解的是,中央铰链部分将需要3个连接点(即与2个双环<sub>1</sub>部分的2个连接点、和与修饰基团的1个连接点)。因此,在一个实施方案中,n表示2,并且CHM是式(C)的基序:



[0064] 其中“-----”表示与间隔子基团的连接点;和

[0065] “~~~~~”表示与修饰基团的连接点。

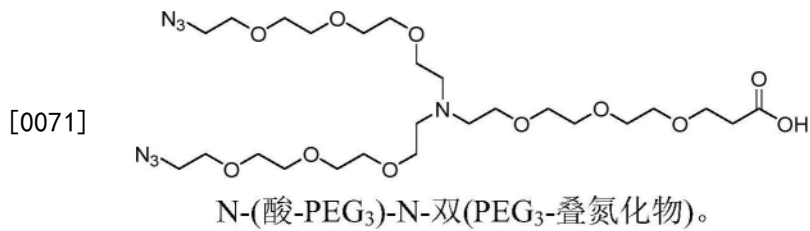
[0066] 在可选的实施方案中,n表示2,并且CHM是式(D)的基序:



[0068] 其中“-----”表示与间隔子基团的连接点;和

[0069] “~~~~~”表示与修饰基团的连接点。

[0070] 在一个具体的实施方案中,CHM是:

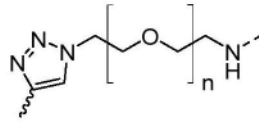


[0072] 如何根据m和n的值来构建可选的中央铰链部分对于本领域技术人员是显而易见的。

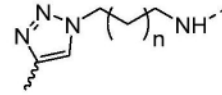
[0073] 将理解的是,间隔子 ( $S_1$  和  $S_2$ ) 可以是任何将双环肽中央铰链部分连接至双环肽合适的结构。在一个实施方案中,间隔子 ( $S_1$  和  $S_2$ ) 包含三唑基部分。该实施方案的优点是三唑基部分可以使用通常可用的“点击”化学在合成中并入。合适的间隔子 ( $S_1$  和  $S_2$ ) 基团的例子包括一个或多个PEG部分、肽序列、碳水化合物、脂质等。

[0074] 在进一步的实施方案中,间隔子 ( $S_1$  和  $S_2$ ) 包括一个或多个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:  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$  (其中n表示任何数字,如1至30)。

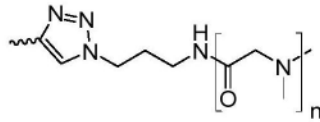
[0075] 因此,在进一步的实施方案中,间隔子 ( $S_1$  和  $S_2$ ) 选自间隔子  $S_A$ 、 $S_B$ 、 $S_C$ 、 $S_D$ 、 $S_E$ 、 $S_F$ 、 $S_G$  和  $S_H$  中的任一种:



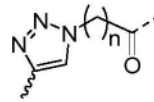
S<sub>A</sub>  
n = 5, 10 和 23



S<sub>E</sub>  
n = 1

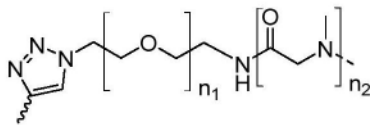


S<sub>B</sub>  
n = 5, 10

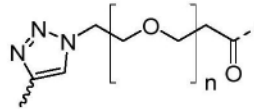


S<sub>F</sub>  
n = 1

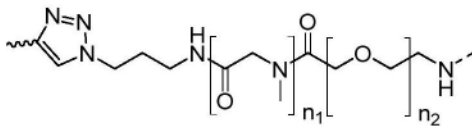
[0076]



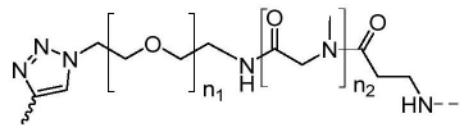
S<sub>C</sub>  
n<sub>1</sub> = 5, n<sub>2</sub> = 5  
n<sub>1</sub> = 10, n<sub>2</sub> = 10



S<sub>G</sub>  
n = 5 和 10



S<sub>D</sub>  
n<sub>1</sub> = 5, n<sub>2</sub> = 5  
n<sub>1</sub> = 10, n<sub>2</sub> = 10



S<sub>H</sub>  
n<sub>1</sub> = 5, n<sub>2</sub> = 5  
n<sub>1</sub> = 10, n<sub>2</sub> = 10

[0077] 其中“-----”表示与CHM基团的连接点；和

[0078] “~~~~~”表示与双环或修饰基团的连接点。

[0079] 在更进一步的实施方案中，间隔子(S<sub>1</sub>和S<sub>2</sub>)是S<sub>A</sub>，n是5、10或23，如10或23。

[0080] 将理解的是，双环肽配体可以通过多种方式连接至间隔子。在一个实施方案中，双环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双环肽连接至间隔子。

[0081] 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，每个双环肽配体都与生物素偶联，并通过链霉亲和素连接至间隔子。

[0082] 在一个实施方案中，所述间隔子(S<sub>1</sub>和S<sub>2</sub>)之一或两者缺失，即有直接键连接双环<sub>1</sub>和CHM、和/或双环<sub>2</sub>和CHM、和/或CHM和修饰剂。在进一步的实施方案中，所述间隔子(S<sub>1</sub>和S<sub>2</sub>)两者均缺失。在更进一步的实施方案中，n表示2，CHM是式(D)的基序，并且所述间隔子(S<sub>1</sub>和S<sub>2</sub>)两者均缺失。

[0083] 双环肽

[0084] 将理解的是，本文的多聚结合复合物将包含多个单体双环肽。

[0085] CD137双环肽单体

[0086] 在一个实施方案中,每种所述肽配体(即单体)对CD137(如人CD137)具有特异性。

[0087] 在一个实施方案中,所述环序列包含6个氨基酸。

[0088] 在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,所述两个环序列均由6个氨基酸组成。

[0089] 在更进一步的实施方案中,所述肽配体包含选自以下的核心氨基酸序列:

[0090]  $C_i$ IEEGQYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub>(SEQ ID NO:1);

[0091]  $C_i$ IEEGQYC<sub>ii</sub>FADPYMC<sub>iii</sub>(SEQ ID NO:2);

[0092]  $C_i$ IEE[dK(PYA)]QYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub>(SEQ ID NO:3);

[0093] [dC<sub>i</sub>][dI][dE][dE]K[dQ][dY][dC<sub>ii</sub>][dF][dA][dD][dP][dY][dNle][dC<sub>iii</sub>](SEQ ID NO:4);

[0094] [dC<sub>i</sub>][dI][dE][dE]K(PYA)[dQ][dY][dC<sub>ii</sub>][dF][dA][dD][dP][dY][dNle][dC<sub>iii</sub>](SEQ ID NO:5);

[0095]  $C_i$ [tBuAla]PK(PYA)[dA]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub>(SEQ ID NO:6);和

[0096]  $C_i$ [tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub>(SEQ ID NO:7);

[0097] 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,Nle表示正亮氨酸,PYA表示炔丙基酸,tBuAla表示叔丁基丙氨酸,或其药学上可接受的盐。

[0098] 在更进一步的实施方案中,所述肽配体包含N和C末端添加,并包含选自以下的氨基酸序列:

[0099] Ac-A-(SEQ ID NO:1)-[Dap(PYA)]-CONH<sub>2</sub>(在下文中称为BCY7741);

[0100] Ac-A-(SEQ ID NO:1)-[Dap(Lys(PYA))]-CONH<sub>2</sub>(在下文中称为BCY12799);

[0101] Ac-(SEQ ID NO:2)-A-Pra-CONH<sub>2</sub>(在下文中称为BCY7077);

[0102] Ac-A-(SEQ ID NO:3)-A-CONH<sub>2</sub>(在下文中称为BCY7744);

[0103] Ac-A-(SEQ ID NO:3)-K-CONH<sub>2</sub>(在下文中称为BCY11613);

[0104] Ac-[dA]-(SEQ ID NO:4)-[dA]-CONH<sub>2</sub>(在下文中称为BCY11506);

[0105] Ac-[dA]-(SEQ ID NO:5)-[dK]-CONH<sub>2</sub>(在下文中称为BCY12144);

[0106] Ac-(SEQ ID NO:6)-A-CONH<sub>2</sub>(在下文中称为BCY8927);

[0107] Ac-(SEQ ID NO:6)-K-CONH<sub>2</sub>(在下文中称为BCY12357);

[0108] Ac-(SEQ ID NO:7)-A(在本文中称为BCY8928);和

[0109] Ac-(SEQ ID NO:7)-K(在本文中称为BCY13389);

[0110] 其中Dap表示二氨基丙酸,PYA表示炔丙基酸,Pra表示炔丙基甘氨酸,或其药学上可接受的盐。

[0111] 粘连蛋白-4(Nectin-4)双环肽单体

[0112] 在可选的实施方案中,至少一种所述肽配体(即单体)对CD137具有特异性(即选自一种或多种(如两种)上述CD137双环肽单体),并且至少一种(如一种)所述肽配体(即单体)对粘连蛋白-4具有特异性。

[0113] 在一个实施方案中,所述环序列包含3或8个氨基酸。

[0114] 在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,所述两个环序列的一个由3个氨基酸组成,另一个由8个氨基酸组成。

[0115] 在更进一步的实施方案中,所述肽配体包含核心氨基酸序列,其是:

[0116]  $C_iP[1Na1][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (SEQ ID NO:8;在本文中称为BCY8116);

[0117] 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,1Na1表示1-萘丙氨酸,HArg表示高精氨酸,HyP表示羟脯氨酸,或其药学上可接受的盐。

[0118] EphA2双环肽单体

[0119] 在一个可选的实施方案中,至少一种所述肽配体(即单体)对CD137具有特异性(即选自一种或多种(如两种)上述CD137双环肽单体),并且至少一种(如一种)所述肽配体(即单体)对EphA2具有特异性。

[0120] 在一个实施方案中,所述环序列包含6个氨基酸。

[0121] 在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,所述两个环序列均由6个氨基酸组成。

[0122] 在更进一步的实施方案中,所述肽配体包含选自以下的核心氨基酸序列:

[0123]  $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (SEQ ID NO:9);

[0124]  $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[d1Na1]WTC_{iii}$  (SEQ ID NO:10);

[0125] 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,1Na1表示1-萘丙氨酸,HArg表示高精氨酸,HyP表示羟脯氨酸,或其药学上可接受的盐。

[0126] 在更进一步的实施方案中,所述肽配体包含N和C末端添加,并包含选自以下的氨基酸序列:

[0127] A-[HArg]-D- (SEQ ID NO:9) (在本文中称为BCY9594);和

[0128] A-[HArg]-D- (SEQ ID NO:10) (本文中称为BCY13118);

[0129] 其中HArg表示高精氨酸或其药学上可接受的盐。

[0130] 在一个实施方案中,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)。

[0131] 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。

[0132] 编号

[0133] 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:

[0134]  $C_i-I_1-E_2-E_3-G_4-Q_5-Y_6-C_{ii}-F_7-A_8-D_9-P_{10}-Y_{11}-Nle_{12}-C_{iii}$  (SEQ ID NO:1)。

[0135] 为了该描述的目的,假定所有双环肽都与TBMB(1,3,5-三(溴甲基)苯)或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TBMB和TATA的环化发生在 $C_i$ 、 $C_{ii}$ 和 $C_{iii}$ 上。

[0136] 分子形式

[0137] 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 $\beta$ Ala-Sar<sub>10</sub>-Ala尾将表示为:

[0138]  $\beta$ Ala-Sar<sub>10</sub>-A- (SEQ ID NO:X)。

[0139] 反向肽序列

[0140] 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)。

[0141] 肽配体

[0142] 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。在本案例中,所述肽包含至少三个半胱氨酸残基(在本文中称为C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>和C<sub>iii</sub>),并且在所述支架上形成至少两个环。

[0143] 多聚结合复合物

[0144] 在一个实施方案中,修饰的多聚结合复合物包含下表1中描述的结合复合物:

[0145] 表1:示例性的本发明的修饰的多聚结合复合物

[0146]

多聚物编号	式	CHM	双环 <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	m/n	双环 <sub>2</sub>	S <sub>2</sub>	修饰剂
BCY9 931	(I)	A	BCY1 2799	S <sub>A</sub> : n = 23	m=3	BCY1 2799	S <sub>A</sub> : n = 23	Alexa Fluor™ 488 - COOH
BCY9 932	(II)	B	BCY7 741	S <sub>A</sub> : n = 10	n=3	-	无间隔子	Alexa Fluor™ 488 - COOH
BCY7 340	(II)	C	BCY7 077	S <sub>A</sub> : n = 23	n=2	-	无间隔子	荧光素-COOH
BCY1 1467	(II)	A	BCY7 744	S <sub>A</sub> : n = 10	n=3	-	S <sub>A</sub> : n = 10	1X 棕榈酰-Pra-COOH
BCY1 1554	(II)	A	BCY7 744	S <sub>A</sub> : n = 10	n=3	-	S <sub>A</sub> : n = 10	1 X 生物素-Peg4-炔烃
BCY1 1856	(II)	A	BCY1 1506	S <sub>A</sub> : n = 10	n=3	-	S <sub>A</sub> : n = 10	1 X Alexa Fluor™ 488 炔烃 (Alexa Fluor™ 488 5-甲酰胺-(炔丙基))
BCY1	(I)	A	BCY7	S <sub>A</sub> : n	m=3	BCY1	S <sub>A</sub> : n =	生物素-Peg12-COOH

	1862			744	= 23		1613	23	
	BCY1 2239	(I)	A	BCY7 744	S <sub>A</sub> : n = 23	m=3	BCY1 1613	S <sub>A</sub> : n = 23	Alexa Fluor™ 488 - COOH
	BCY1 2240	(I)	A	BCY7 744	S <sub>A</sub> : n = 23	m=3	BCY1 1613	S <sub>A</sub> : n = 23	青色素 5- COOH
	BCY1 2380	(I)	A	BCY7 744	S <sub>A</sub> : n = 23	m=3	BCY1 1613	S <sub>A</sub> : n = 23	BODIPY™ FL -COOH
	BCY1 2374	(I)	A	BCY1 1506	S <sub>A</sub> : n = 23	m=3	BCY1 2144	S <sub>A</sub> : n = 23	生物素-Peg12-COOH
[0147]	BCY1 2657	(I)	A	BCY8 927	S <sub>A</sub> : n = 23	m=3	BCY1 2357	S <sub>A</sub> : n = 23	生物素-Peg12-COOH
	BCY1 2660	(I)	A	BCY8 927	S <sub>A</sub> : n = 23	m=3	BCY1 2357	S <sub>A</sub> : n = 23	BODIPY™ FL -COOH
	BCY1 2658	(I)	A	BCY8 927	S <sub>A</sub> : n = 23	m=3	BCY1 2357	S <sub>A</sub> : n = 23	Alexa Fluor™ 488 - COOH
	BCY1 2659	(I)	A	BCY8 927	S <sub>A</sub> : n = 23	m=3	BCY1 2357	S <sub>A</sub> : n = 23	青色素 5- COOH
	BCY1 5416	(II)	D	BCY8 928	无间 隔子	n = 2	-	无间隔 子	Alexa Fluor™ 488 - COOH
	BCY1 5985	(II)	D	BCY8 928	无间 隔子	n = 2	-	无间隔 子	生物素-Peg12-COOH

[0148] 在一个实施方案中,修饰的多聚结合复合物包含不是BCY12374的结合复合物。BCY12374表示非结合对照。

[0149] 表2:靶向粘连蛋白-4的修饰的多聚体复合物的组成

复合物编号	粘连蛋白-4 BCY 编号	连接点	接头	CD137 BCY 编号	连接点	修饰剂
[0150] BCY13582	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-双 (PEG <sub>3</sub> -叠氮化物)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	生物素 -Peg12
BCY13583	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-双 (PEG <sub>3</sub> -叠氮化物)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Alexa Fluor 488
BCY13628	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-双 (PEG <sub>3</sub> -叠氮化物)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	青色素 5

[0151] 表3:靶向EphA2的修饰的多聚体复合物的组成

复合物编号	EphA2 BCY 编号	连接点	接头	CD137 BCY 编号	连接点	修饰剂
[0152] BCY14417	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-双 (PEG <sub>3</sub> -叠氮化物)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Peg12-生 物素
BCY14418	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-双 (PEG <sub>3</sub> -叠氮化物)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Alexa Fluor®

						488
[0153]	BCY14415	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG3)-N-双 (PEG3-叠氮化物)	BCY8928 BCY13389	dLys (PYA)4 dLys (PYA)4 Peg12-生 物素
	BCY14416	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG3)-N-双 (PEG3-叠氮化物)	BCY8928 BCY13389	dLys (PYA)4 dLys (PYA)4 Alexa Fluor® 488

[0154] 药学上可接受的盐

[0155] 将理解的是,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。

[0156] 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。

[0157] 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)、 $\alpha$ -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。

[0158] 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。

[0159] 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<sup>-</sup>),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<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>,碱土金属阳离子如Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>,和其他阳离子如Al<sup>3+</sup>或Zn<sup>+</sup>。合适的有机阳离子的示例包括但不限于铵离子(即NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)和被取代的铵离子(例如NH<sub>3</sub>R<sup>+</sup>、NH<sub>2</sub>R<sub>2</sub><sup>+</sup>、NHR<sub>3</sub><sup>+</sup>和NR<sub>4</sub><sup>+</sup>)。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(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>。

[0160] 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。

### [0161] 同位素变体

[0162] 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。

[0163] 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<sup>2</sup>H(D)和<sup>3</sup>H(T),碳同位素如<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>C和<sup>14</sup>C,氯同位素如<sup>36</sup>Cl,氟同位素如<sup>18</sup>F,碘同位素如<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I和<sup>131</sup>I,氮同位素如<sup>13</sup>N和<sup>15</sup>N,氧同位素如<sup>15</sup>O、<sup>17</sup>O和<sup>18</sup>O,磷同位素如<sup>32</sup>P,硫同位素如<sup>35</sup>S,铜同位素如<sup>64</sup>Cu,镓同位素如<sup>67</sup>Ga或<sup>68</sup>Ga,钇同位素如<sup>90</sup>Y,和镧同位素如<sup>177</sup>Lu,和铋同位素如<sup>213</sup>Bi。

[0164] 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CD137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<sup>3</sup>H(T)和碳-14即<sup>14</sup>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。

[0165] 用更重的同位素如氘即<sup>2</sup>H(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。

[0166] 用正电子发射同位素如<sup>11</sup>C、<sup>18</sup>F、<sup>15</sup>O和<sup>13</sup>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。

[0167] 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。

### [0168] 分子支架

[0169] 分子支架描述于例如WO 2009/098450和在其中引用的参考文献中,特别是WO 2004/077062和WO 2006/078161。

[0170] 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。

[0171] 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。

[0172] 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。

[0173] 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。

[0174] 在一个实施方案中,所述分子支架可以包含六氢-1,3,5-三嗪,尤其是1,3,5-三丙烯酰六氢-1,3,5-三嗪(“TATA”)或其衍生物,或由其组成。

[0175] 在一个实施方案中,所述分子支架是2,4,6-三(溴甲基)均三甲苯。该分子类似于1,3,5-三(溴甲基)苯(TBMB),但包含三个附着于苯环上的额外的甲基。其具有所述额外的甲基可以与多肽形成进一步接触并因此增加额外的结构约束的优点。

[0176] 本发明的分子支架包含化学基团,其允许本发明编码文库的多肽的官能团与所述分子支架形成共价连接。所述化学基团选自范围广泛的官能团,包括胺、硫醇、醇、酮、醛、腈、羧酸、酯、烯烃、炔烃、酸酐、琥珀酰亚胺、马来酰亚胺、叠氮化物、烷基卤和酰基卤。

[0177] 可以用于分子支架上以与半胱氨酸的硫醇基团反应的支架反应性基团是烷基卤(或也称为卤代烃(halogenoalkane)或卤代烷(haloalkane))。

[0178] 例子包括溴甲基苯或碘乙酰胺。用于选择性地将化合物与蛋白质中的半胱氨酸偶联的其他支架反应性基团是马来酰亚胺、含有 $\alpha\beta$ 不饱和羰基的化合物和含有 $\alpha$ -卤代甲基羰基的化合物。可以用作本发明的分子支架的马来酰亚胺的示例包括:三-(2-马来酰亚胺乙基)胺、三-(2-马来酰亚胺乙基)苯、三-(马来酰亚胺)苯。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)。含有 $\alpha$ -卤代甲基羰基的化合物的示例是N,N',N''-(苯-1,3,5-三基)三(2-溴乙酰胺)。硒代半胱氨酸也是一种天然氨基酸,其与半胱氨酸具有相似的反应性并且可以用于相同的反应。因此,无论在何处提及半胱氨酸,除非上下文另有说明,否则通常可以接受取代硒代半胱氨酸。

[0179] 效应子和官能团

[0180] 根据本发明的进一步的方面,提供了一种药物偶联物,其包含与一个或多个效应子基团和/或官能团偶联的如本文所定义的多聚结合复合物。

[0181] 效应子基团和/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。

[0182] 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)。

[0183] 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。

[0184] 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。

[0185] 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途径的分子。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 269p10444),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。

[0186] 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。

[0187] 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 半衰期。在另一个进一步的实施方案中,半衰期将在12至26小时的范围内。

[0188] 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。

[0189] 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。

[0190] 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阻碍,并由此控制裂解率和伴随的结合物的释放。

[0191] 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。

[0192] 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阻碍。

[0193] 合成

[0194] 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。

[0195] 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。

[0196] 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。

[0197] 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。

[0198] 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 Volume18,Issue 22,2008年11月15日,6000-6003页)中描述的。

[0199] 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。

[0200] 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。

[0201] 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。

[0202] 药物组合物

[0203] 根据本发明的一进一步的方面,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。

[0204] 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。

[0205] 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/或其他添加剂,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)。

[0206] 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。

[0207] 根据本发明的药物组合物的施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。

[0208] 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。

[0209] 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。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。

[0210] 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。

[0211] 治疗用途

[0212] 本发明的双环肽作为CD137结合物具有特殊的用途。

[0213] CD137是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员。它的可选名称是肿瘤坏死因子受体超家族成员9(TNFRSF9)、4-1BB和由淋巴细胞激活诱导(ILA)。CD137可以由激活的T细胞表达,但在CD8<sup>+</sup>上的表达程度大于在CD4<sup>+</sup>T细胞上的表达程度。此外,在树突状细胞、滤泡树突细胞、自然杀伤细胞、粒细胞和炎症部位的血管壁细胞上发现了CD137表达。CD137的一项特征活性是其对激活的T细胞的共刺激活性。CD137的交联增强T细胞增殖、IL-2分泌、存活和细胞溶解活性。此外,它可以增强免疫活性以在小鼠中消除肿瘤。

[0214] CD137是TCR激活诱导的T细胞共刺激受体(Nam等人,Curr.Cancer Drug Targets, 5:357-363(2005); Waits等人,Annu.Rev.Immunol., 23:23-68(2005))。除了在激活的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞上表达之外,CD137还在CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞、自然杀伤(NK)和NK-T细胞、单核细胞、中性粒细胞和树突状细胞上表达。已在抗原呈递细胞(包括B细胞、单核细胞/巨噬细胞和树突状细胞)上描述了其天然配体CD137L(Watts等人Annu.Rev.Immunol, 23:23-68(2005))。在与其配体相互作用时,CD137导致增加TCR诱导的T细胞增殖、细胞因子产生、功能成熟和延长CD8<sup>+</sup>T细胞的存活(Nam等人,Curr.Cancer Drug Targets, 5:357-363(2005), Watts等人,Annu.Rev.Immunol, 23:23-68(2005))。

[0215] 由CD137L或针对CD137的激动性单克隆抗体(mAb)通过CD137的信号传导,导致增加TCR诱导的T细胞增殖、细胞因子产生、功能成熟和延长CD8<sup>+</sup>T细胞的存活。这些影响来自:(1)激活NF- $\kappa$ B、c-Jun NH<sub>2</sub>-末端激酶/应激活化蛋白激酶(JNK/SAPK)和p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号传导途径,以及(2)控制抗凋亡和细胞周期相关基因的表达。

[0216] 在CD137和CD137L缺陷小鼠中进行的实验另外证明了CD137共刺激在产生完全有能力的T细胞反应中的重要性。

[0217] IL-2和IL-15激活的NK细胞表达CD137,激动性mAb与CD137的连接刺激NK细胞增殖和IFN- $\gamma$ 分泌,但不刺激其溶细胞活性。

[0218] 此外,CD137刺激的NK细胞在体外促进激活的T细胞的扩增。

[0219] 根据其共刺激功能,已表明针对CD137的激动剂mAb促进对心脏和皮肤同种异体移植物的排斥,根除已形成的肿瘤,扩大原发性抗病毒CD8<sup>+</sup>T细胞反应,并增加T细胞的溶细胞潜能。这些研究支持CD137信号传导促进T细胞功能的观点,这可能增强对肿瘤和感染的免疫力。

[0220] 根据本发明的方法选择的多肽配体可以用于体内治疗和预防应用、体外和体内诊断应用、体外试验和试剂应用等。具有所选择的特异性水平的配体可以用于涉及在期望交叉反应性的非人动物中进行测试的应用中,或在需要小心控制与同源物或旁系同源物的交叉反应性的诊断应用中。在某些应用如疫苗应用中,可以利用对预定范围的抗原引起免疫反应的能力来调整疫苗适应特定的疾病和病原体。

[0221] 对哺乳动物的施用优选具有至少90%至95%同质性的基本纯的肽配体,对于药物用途,特别是当所述哺乳动物是人时,最优选98%至99%或更高的同质性。所选择的多肽一旦部分纯化或纯化至所期望的同质性,就可以用于诊断或治疗(包括体外)或用于开发和进行试验步骤、免疫荧光染色等(Lefkovite和Pernis(1979和1981), Immunological Methods, Volumes I and II, Academic Press, NY)。

[0222] 根据本发明的一个进一步的方面,提供了如本文所定义的多聚结合复合物或药物偶联物,其用于预防、抑制或治疗CD137介导的疾病或疾患。

[0223] 根据本发明的进一步的方面,提供了一种预防、抑制或治疗CD137介导的疾病或疾患的方法,其包括向需要其的患者施用如本文所定义的效应子基团和多聚结合复合物的药物偶联物。

[0224] 在一个实施方案中,CD137是哺乳动物CD137。在进一步的实施方案中,哺乳动物CD137是人CD137(hCD137)。

[0225] 在一个实施方案中,CD137介导的疾病或疾患选自癌症、感染和炎症。在进一步的实施方案中,CD137介导的疾病或疾患选自癌症。

[0226] 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(腺瘤和各种类型的癌,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、角膜棘皮瘤和增生性痣);血液系统恶性肿瘤(即白血病和淋巴瘤)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]、慢性粒细胞性白血病[CML]、慢性骨髓单核细胞性白血病[CMML]、高嗜酸性粒细胞增多症、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)；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症，其使患者容易患恶性肿瘤(例如着色性干皮病)。

[0227] 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)、慢性B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)。

[0228] 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。

[0229] 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。

[0230] 以下参考下列实施例进一步描述本发明。

[0231] 实施例

[0232] 材料与amp;方法

[0233] 肽的合成

[0234] 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50:50MeCN:H<sub>2</sub>O稀释至约35mL，加入约500μL的100mM TATA的乙腈溶液，然后用5mL的1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>的H<sub>2</sub>O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1mL的1M L-半胱氨酸盐酸盐一水合物(Sigma)的H<sub>2</sub>O溶液加入反应中约60分钟以淬灭任何过量的TATA。

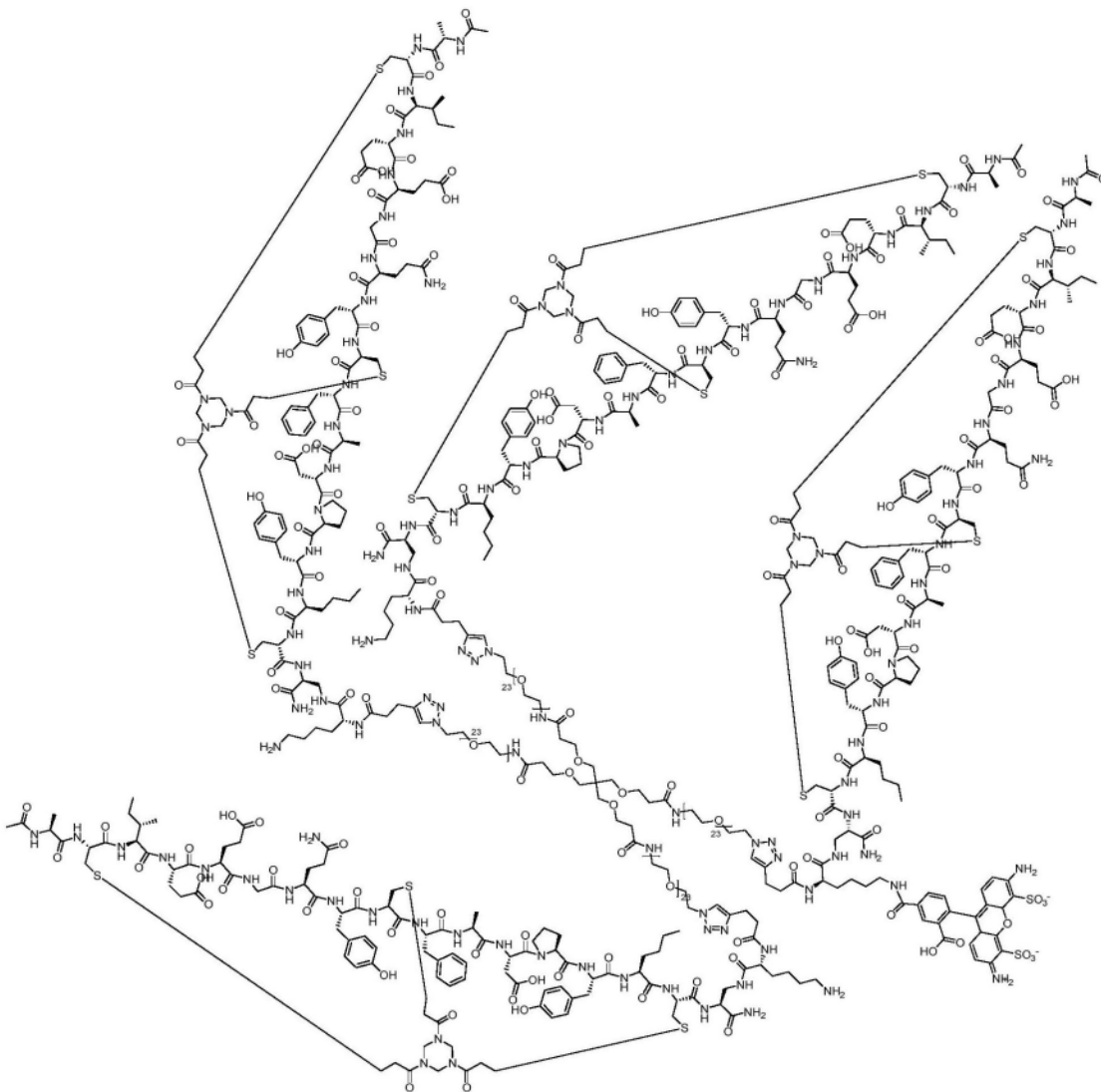
[0235] 冻干后，如上纯化修饰的肽，同时用Gemini C18柱(Phenomenex)替换Luna C8，并将酸改为0.1%三氟乙酸。合并包含正确的TATA修饰材料的纯级分，冻干并在-20℃进行保存。

[0236] 除非另有说明，所有氨基酸均以L-构型使用。

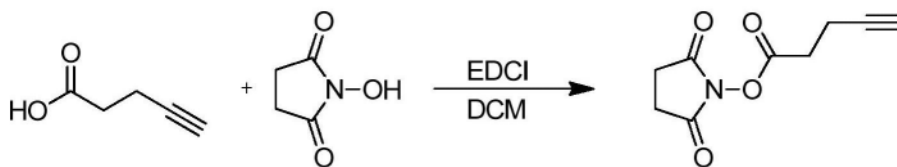
[0237] 多聚体的合成

[0238] BCY9931

[0239]

[0240] BCY9297的制备

[0241]

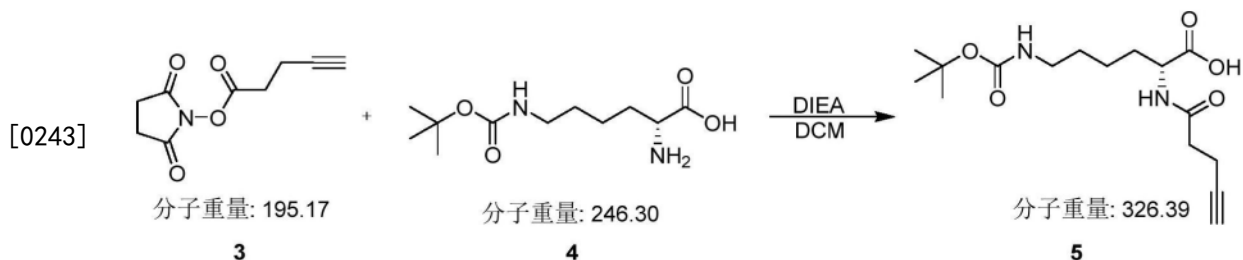


1

2

3

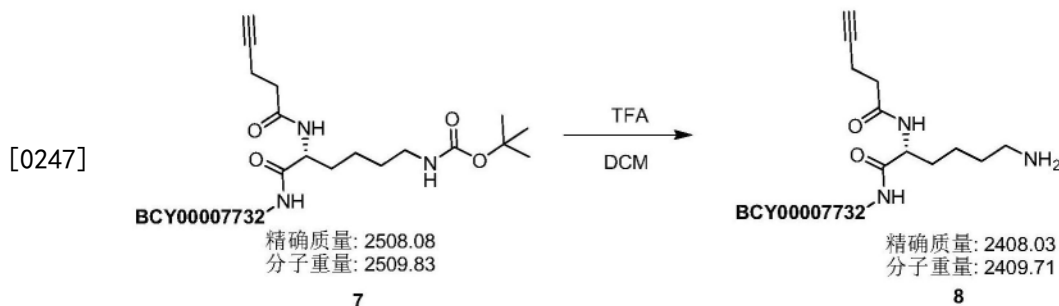
[0242] 向化合物1 (2g, 20.4mmol) 的DCM溶液 (50mL) 中加入EDCI (7.82g, 40.8mmol) 和化合物2 (2.58g, 22.43mmol, 1.1eq)。在25-30℃搅拌混合物1小时。TLC (洗脱剂:石油醚:二氯甲烷=0:1, 显色剂:溴甲酚绿,  $R_f=0.44$ ) 显示反应物1完全消耗, 形成一个新斑点。根据TLC, 反应是纯净的 (clean)。然后减压浓缩反应混合物以得到残余物, 随后通过快速硅胶色谱法 (ISCO®; 40g SepaFlash® 硅胶快速柱, 0~50% 乙酸乙酯/石油醚梯度洗脱液, @40 mL/min) 得到白色固体状的化合物3 (2.8g, 13.63mmol, 66.8% 产率)。



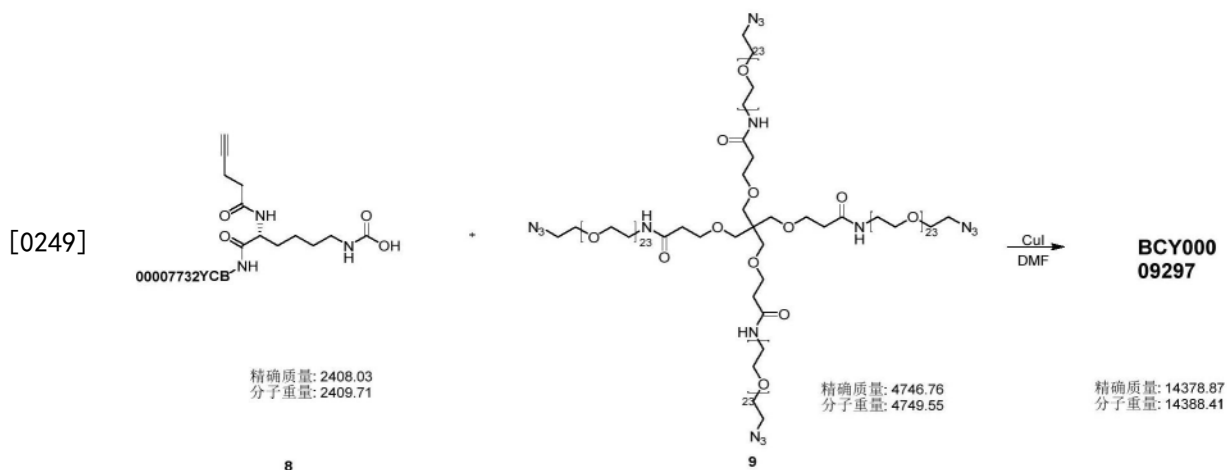
[0244] 向化合物4 (200mg, 707.3 $\mu$ mol, HCl) 和化合物3 (151.8mg, 778.0 $\mu$ mol) 的DCM溶液 (10mL) 中加入DIEA (457.0mg, 3.54mmol, 616 $\mu$ L)。在25-30 $^{\circ}$ C搅拌混合物2小时。LC-MS显示检测到了所需的质量 (观测m/z, [M+Na<sup>+</sup>], 349.2)。减压浓缩反应混合物以除去溶剂以得到残余物。通过制备型HPLC (中性条件) 纯化残余物, 得到白色固体状的化合物5 (200mg, 551.49 $\mu$ mol, 77.9%产率, 90%纯度)。



[0246] 向化合物5 (20mg, 61.28 $\mu$ mol) 的DMF溶液 (5mL) 中加入HOSu (8.46mg, 73.53 $\mu$ mol)、化合物6 (134.9mg, 61.28 $\mu$ mol) 和EDCI (14.10mg, 73.53 $\mu$ mol)、DMAP (2.25mg, 18.38 $\mu$ mol)。在25 $^{\circ}$ C搅拌混合物2小时。LC-MS显示检测到了所需的质量 (计算MW: 2509.83, 观测m/z [ (M-Boc) / 5 + H<sup>+</sup> ] 482.3)。通过制备型HPLC (中性条件) 纯化残余物, 得到白色固体状的化合物7 (95mg, 37.85 $\mu$ mol, 61.7%产率)。



[0248] 向化合物7 (95mg, 37.85 $\mu$ mol) 的DCM溶液 (5mL) 中加入TFA (4.32mg, 37.85 $\mu$ mol, 2.80 $\mu$ L)。在25 $^{\circ}$ C搅拌混合物0.5小时。LC-MS显示反应物1完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z (计算MW: 2409.71, 观测m/z: [M/2+H<sup>+</sup>] 1205.3, [M/3+H<sup>+</sup>] 803.8) 的主峰。减压浓缩反应混合物以除去溶剂以得到残余物。通过制备型HPLC (中性条件) 纯化残余物, 得到白色固体状的化合物8 (60mg, 24.90 $\mu$ mol, 65.8%产率)。



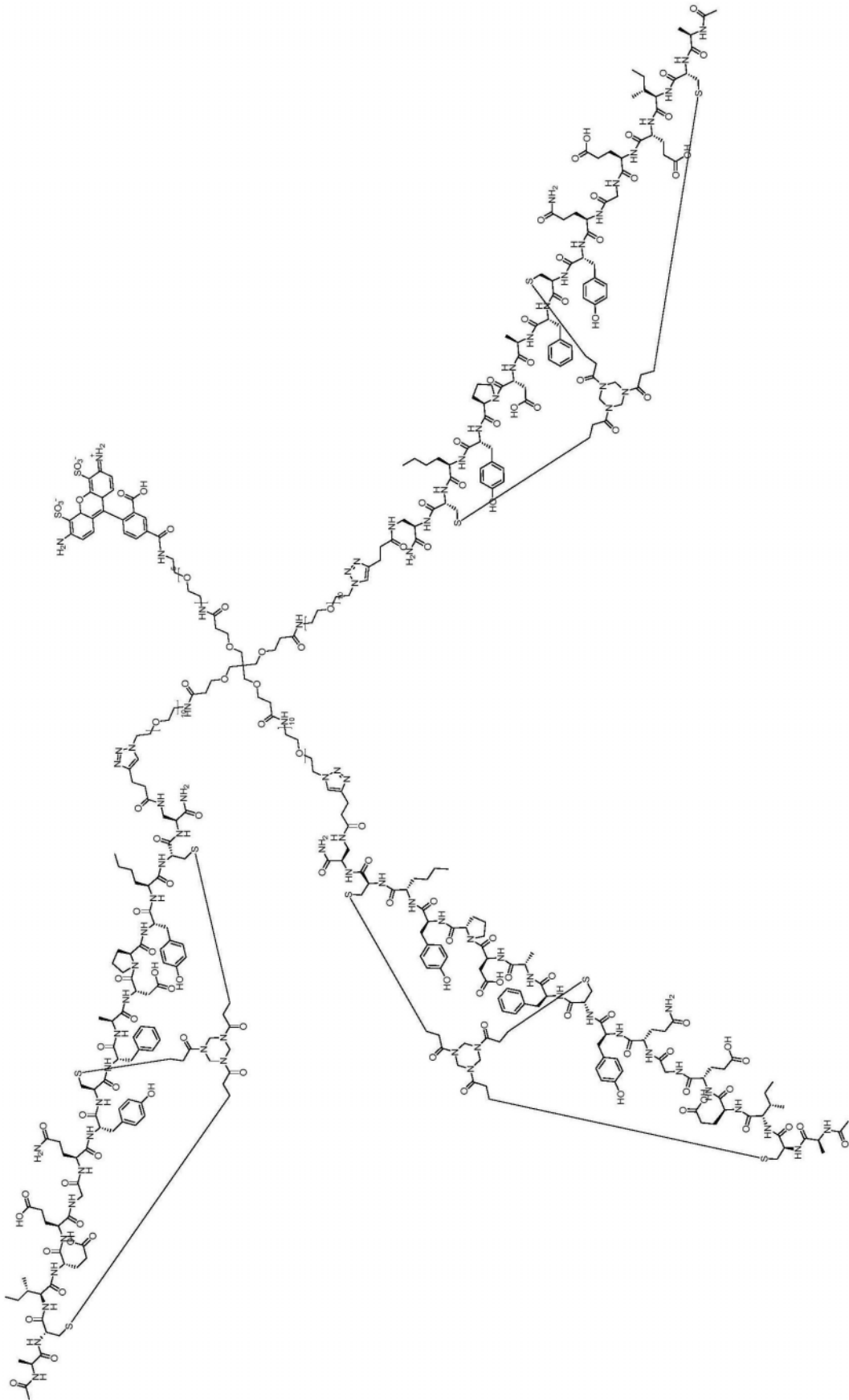
[0250] 向化合物8 (60mg, 24.9 $\mu$ mol, 5.0eq)、化合物9 (23.6mg, 5.0 $\mu$ mol, 1.0eq) 的DCM溶液 (5mL) 加入CuI (23.71mg, 124.5 $\mu$ mol, 24.9eq)。在N<sub>2</sub>气氛下、在25℃搅拌混合物16小时。LC-MS显示化合物8完全消耗,并在HRMS中检测到所需m/z (计算MW: 14388.41, 观测m/z: [M/10+H] 1439.8430。通过制备型HPLC (TFA条件) 纯化残余物, 得到白色固体状的BCY9297-1 (6.3mg, 95.30%) BCY9297-2 (9.8mg, 69.40%)。

[0251] BCY9931的制备

[0252] 将BCY9297的DMF溶液 (370 $\mu$ L, 1mM, 3.7 $\times 10^{-7}$  mol) 加入Alexa Fluor 488的DMF溶液 (370 $\mu$ L, 1.5mM, 5.6 $\times 10^{-7}$  mol) 中。加入DIPEA (25 $\mu$ L) 并在室温搅拌混合物过夜。使用6M盐酸胍将溶液稀释至10mL并用半制备型RP-HPLC纯化, 然后冻干得到黄色固体状的BCY9931 (350 $\mu$ g, 2.34 $\times 10^{-8}$  mol, 6.3%), 其具有所需m/z (计算MW: 14906.01, 观测m/z: [M/11+H<sup>+</sup>] 1356.03。

[0253] BCY9932

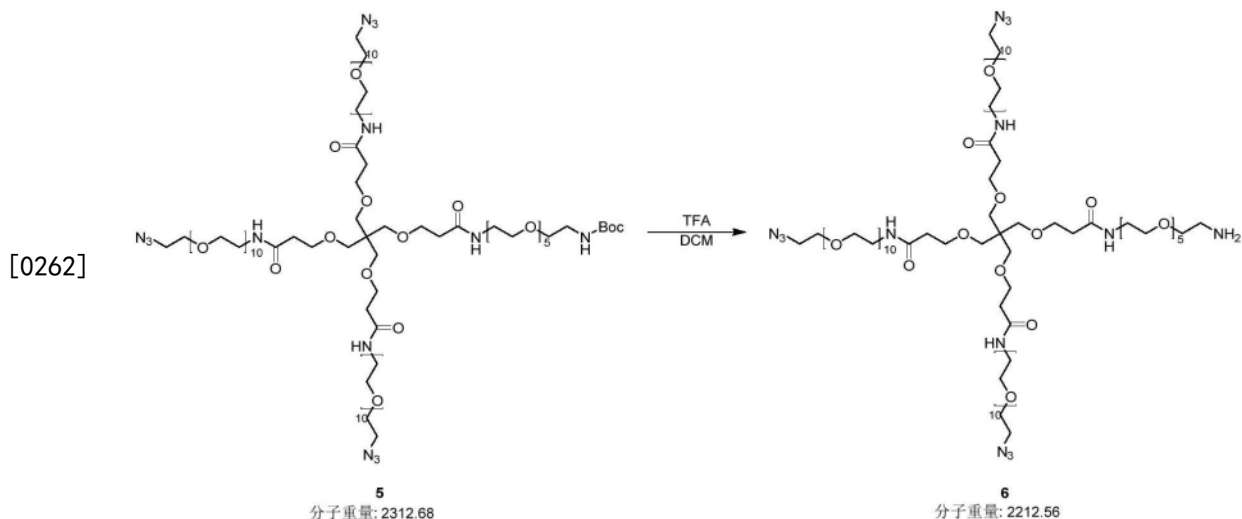
[0254]



BCY00009295

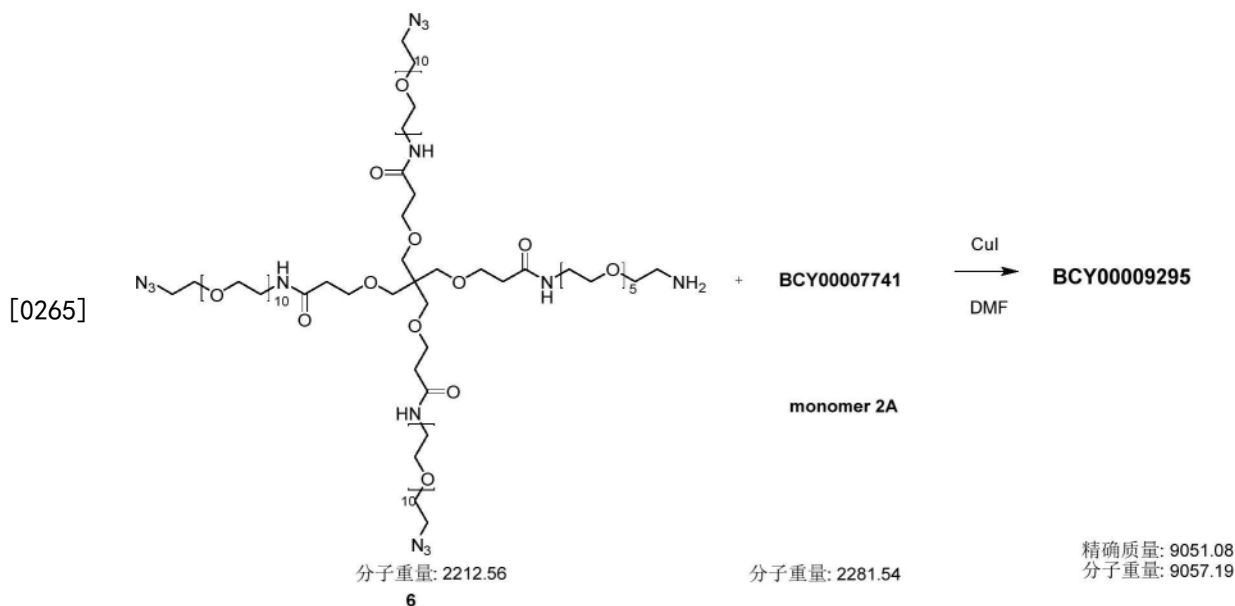
[0255] 化合物3的制备





[0263] 向化合物5 (40.0mg, 17.30 $\mu$ mol) 的DCM溶液 (0.75mL) 中加入TFA (385.0mg, 3.38mmol, 0.25mL)。然后在15 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物2小时。LC-MS显示一个具有所需m/z (计算MW: 2212.56, 观测m/z:  $[M/3+H^+]$  738.1) 的主峰。用20mL DCM稀释反应混合物, 然后减压浓缩五倍以去除TFA。反应混合物不经任何纯化直接用于下一步, 得到白色固体状的化合物6 (30mg, 13.56 $\mu$ mol, 78.4%产率)。

[0264] BCY9295的制备



[0266] 将化合物6 (30mg, 13.56 $\mu$ mol, 1.0eq)、单体2A (123.74mg, 54.24 $\mu$ mol, 4.0eq)、CuI (41.25mg, 216.59 $\mu$ mol, 16.0eq) 的混合物溶解于DMF (20mL, 溶剂脱气并用 $N_2$ 吹扫3次) 中, 然后在 $N_2$ 气氛下、在15 $^{\circ}$ C搅拌混合物2小时。LCMS显示检测到所需m/z (计算MW: 9057.19, 观测m/z: 1510.2  $[M/6+H^+]$ , 1294.3  $[M/7+H^+]$ , 1132.5  $[M/8+H^+]$ , 1006.8  $[M/9+H^+]$ )。用2mL  $H_2O$  稀释反应混合物。通过制备型HPLC (TFA条件) 纯化残余物, 得到白色固体状的BCY9295 (18mg, 1.99 $\mu$ mol, 53.6%纯度, 14.66%产率)。

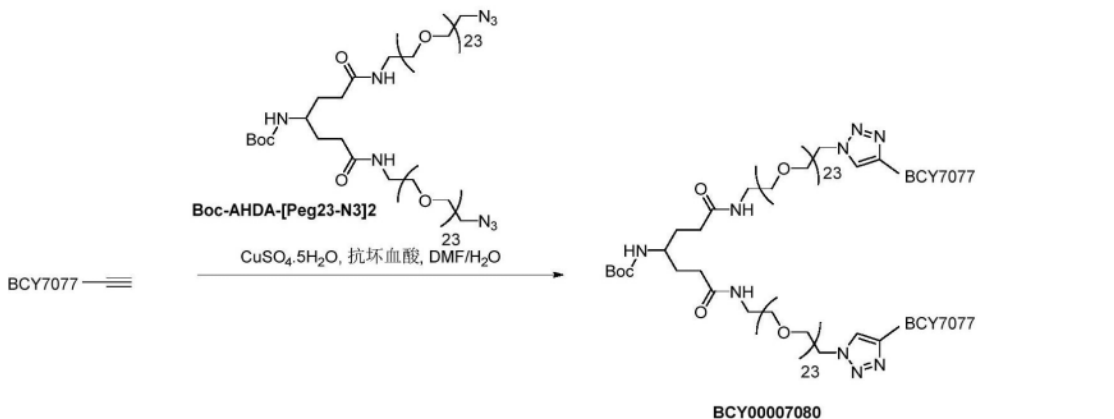
[0267] BCY9932的制备

[0268] 将BCY9295的DMF溶液 (90 $\mu$ L, 10mM,  $9 \times 10^{-7}$  mol) 加入Alexa Fluor 488的DMF溶液 (90 $\mu$ L, 15mM,  $1.35 \times 10^{-6}$  mol) 中。加入DIPEA (16 $\mu$ L) 并在室温搅拌混合物1小时。加入另外90 $\mu$

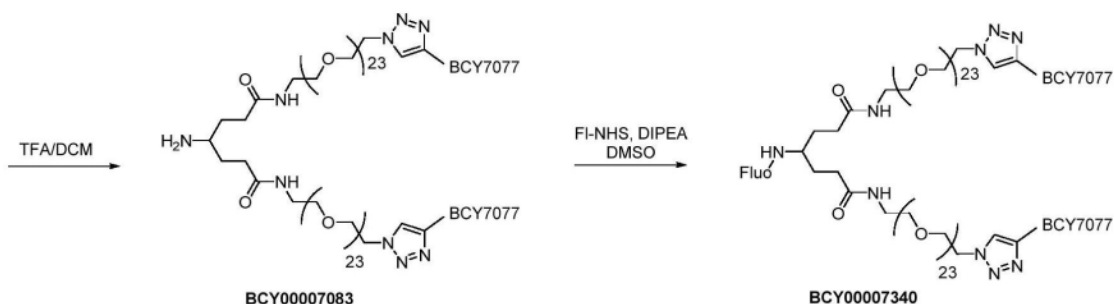
L AF488的DMF溶液(15mM)并搅拌混合物过夜。使用6M盐酸胍将溶液稀释至10mL并用制备型RP-HPLC纯化,然后冻干得到黄色固体状的BCY9932(1.1mg,  $1.15 \times 10^{-7}$  mol, 12.8%),其具有所需m/z(计算MW:9574.73,观测m/z:  $[M/6+H^+]$  1596.68。

[0269] BCY7340

[0270] BCY7080的制备



[0271]



[0272] 将BCY7077的DMF溶液(1mL, 11.1mM,  $1.1 \times 10^{-5}$  mol)加入Boc-AHDA-[Peg23-N3]2的溶液(247 $\mu$ L, 20mM,  $4.95 \times 10^{-6}$  mol)中,用N<sub>2</sub>吹扫所得混合物5分钟。在另一管中,将CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O的溶液(165 $\mu$ L, 200mM,  $3.3 \times 10^{-5}$  mol)与抗坏血酸的溶液(1.1mL, 200mM,  $2.2 \times 10^{-4}$  mol)混合。将两种混合物组合并允许反应1小时。用50mM EDTA溶液将反应混合物稀释至9mL并用制备型RP-HPLC纯化。收集含有纯产物的级分并冻干以得到白色固体状的BCY7080(19mg,  $2.9 \times 10^{-6}$  mol, 59%)。

[0273] BCY7083的制备

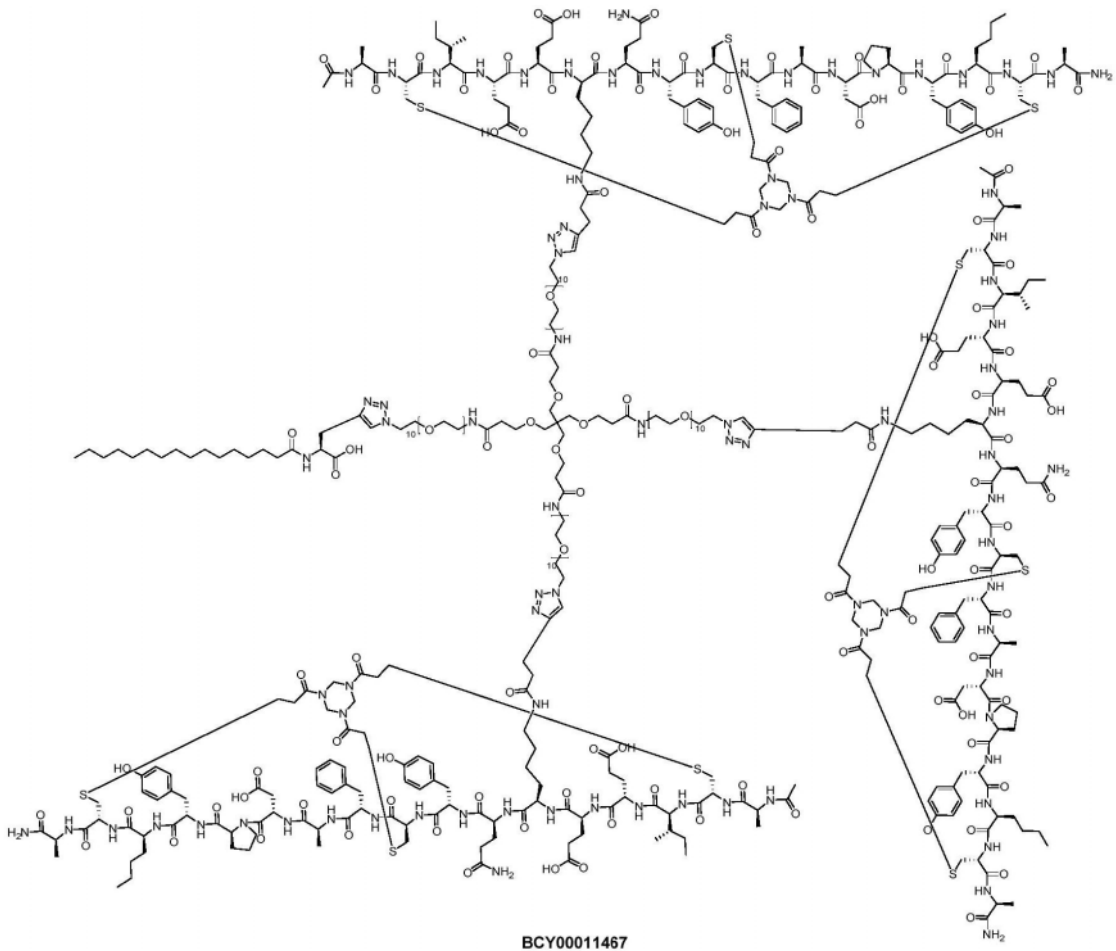
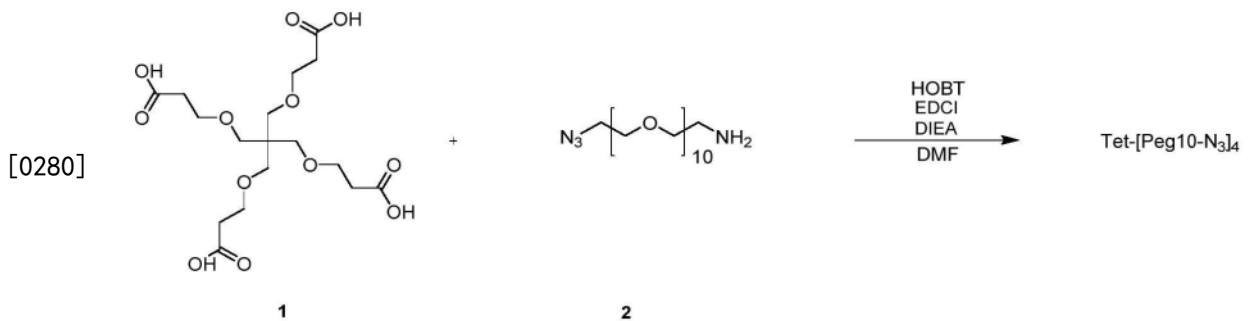
[0274] 将BCY7080(19mg,  $2.9 \times 10^{-6}$  mol)溶解于1mL DCM/TFA中并搅拌混合物1小时。在N<sub>2</sub>流下吹干溶剂,将残余物溶解于6M盐酸胍中并用制备型RP-HPLC纯化。合并纯净的级分并冻干以得到白色固体状的BCY7083(15.9mg,  $2.4 \times 10^{-6}$  mol, 83%)。

[0275] BCY7340的制备

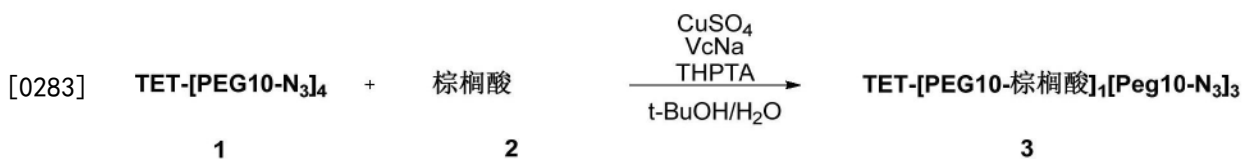
[0276] 将BCY7083的DMSO溶液(25 $\mu$ L, 24.7mM,  $6.17 \times 10^{-7}$  mol)与荧光素-NHS的溶液(30 $\mu$ L, 50mM,  $1.5 \times 10^{-6}$  mol)混合,并加入DIPEA(2.5 $\mu$ L)。2小时后,用6M盐酸胍将混合物稀释至10mL并用制备型RP-HPLC纯化。合并含有纯净的所需材料的样品并冻干以得到黄色固体状的BCY7340。

[0277] BCY11467

[0278]

[0279] Tet-[Peg10-N3]<sub>4</sub>的制备

[0281] 向化合物1 (100mg, 235.63 $\mu$ mol, 1eq) 的DMF溶液 (1mL) 中加入EDCI (200mg, 1.04mmol, 4.43eq) 和HOBT (140mg, 1.04mmol, 4.4eq) 和DIPEA (185.50mg, 1.44mmol, 0.25mL, 6.09eq)。滴加化合物2 (500mg, 949.45 $\mu$ mol, 4.03eq) 的DMF (1mL) 溶液。在25-30 $^{\circ}$ C搅拌混合物12小时。LC-MS显示形成了作为主要产物的新的峰。通过制备型HPLC (TFA条件) 纯化反应混合物, 得到浅黄色油状的Tet-[Peg10-N3]<sub>4</sub> (385mg, 148.75 $\mu$ mol, 63.13% 产率, 95% 纯度)。

[0282] 化合物3的制备

[0284] 首先将Tet-[Peg10-N3]<sub>4</sub> (42.0mg, 17.1 $\mu$ mol, 1.0eq) 和化合物2 (6.0mg, 17.1 $\mu$ mol, 1.0eq) 溶解于2mL t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1) 中, 然后加入CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 45.0 $\mu$ L, 1.0eq)、VcNa (9.0mg, 45.4 $\mu$ mol, 2.6eq) 和THPTA (9.0mg, 20.7 $\mu$ mol, 1.2eq)。最后加入0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>以调整pH至8。此处所有溶剂均脱气并用N<sub>2</sub>吹扫3次。在N<sub>2</sub>气氛下、在40 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物16小时。反应混合物不经进一步纯化即用于下一步。

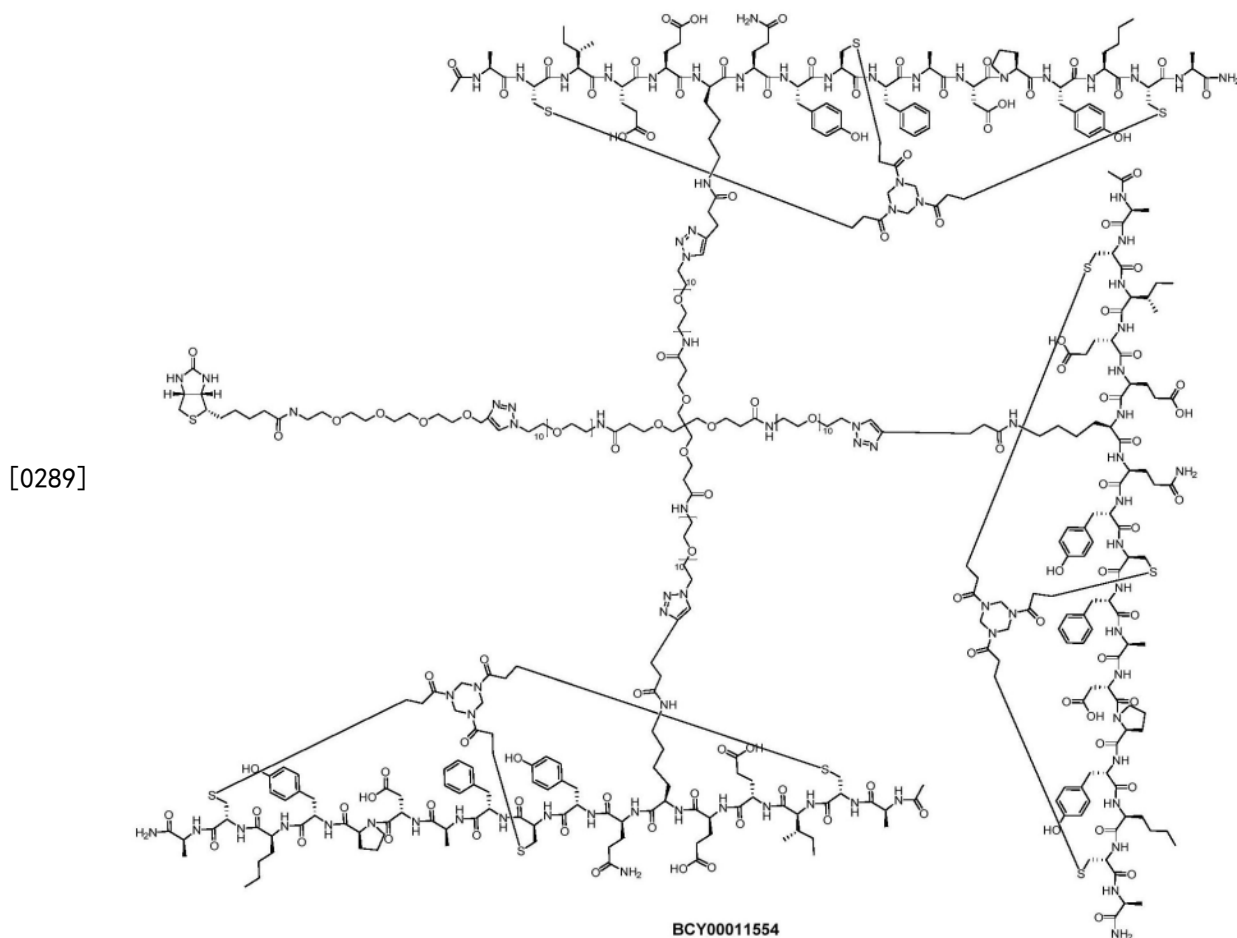
[0285] BCY11467的制备



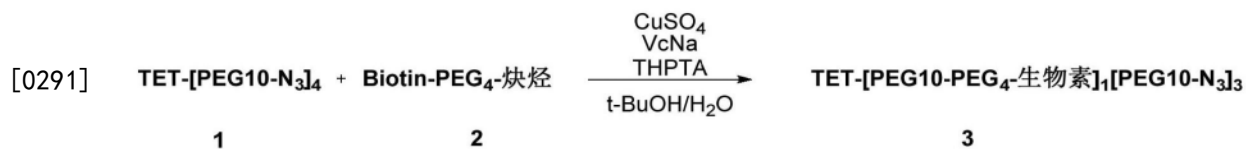
**3**

[0287] 首先将化合物3 (32.0mg, 11.4 $\mu$ mol, 1.0eq) 和BCY7744 (90.0mg, 38.5 $\mu$ mol, 3.4eq) 溶解于2mL t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1) 中, 然后加入CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 30.0 $\mu$ L, 1.0eq)、VcNa (6.0mg, 30.3 $\mu$ mol, 2.6eq) 和THPTA (10.0mg, 23.0 $\mu$ mol, 2.0eq)。最后加入0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>以调整pH至8。此处所有溶剂均脱气并用N<sub>2</sub>吹扫3次。在N<sub>2</sub>气氛下、在40 $^{\circ}$ 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: 9823.29观测m/z: 1228.7 ([M/8+H]<sup>+</sup>)) 的主峰。通过制备型HPLC (TFA条件) 纯化反应混合物, 得到白色固体状的BCY11467 (4.3mg, 0.41 $\mu$ mol, 3.65%产率, 97.32%纯度)。

[0288] BCY11554

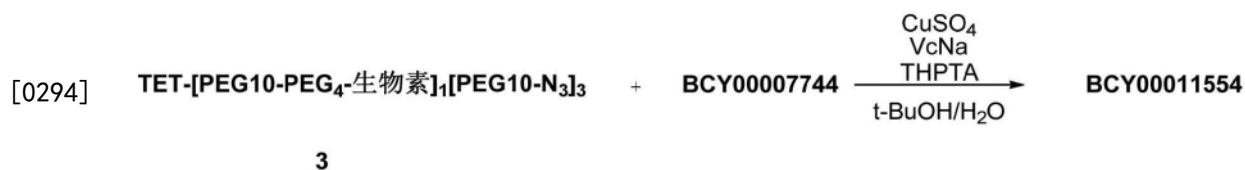


[0290] 化合物3的制备



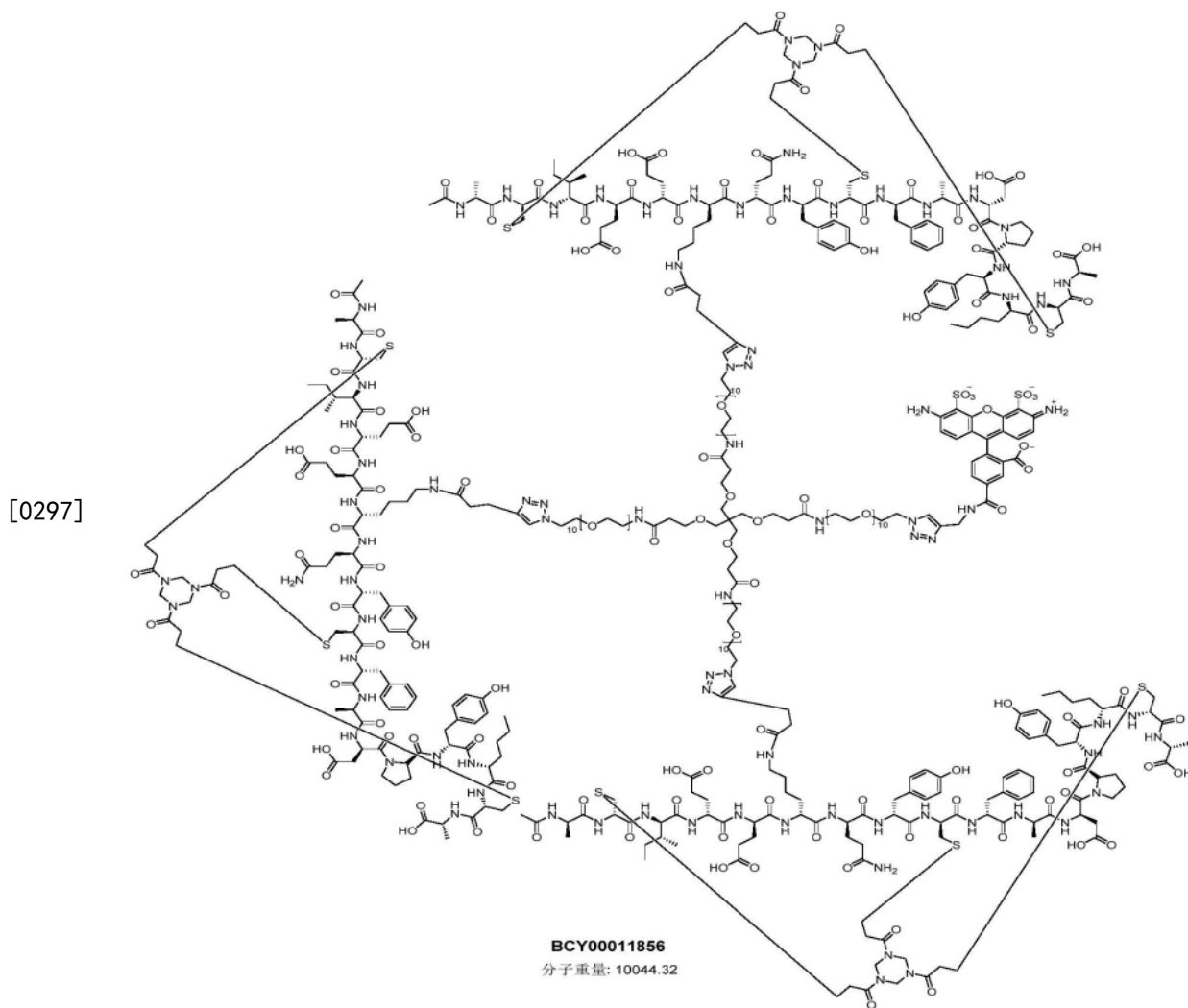
[0292] 首先将Tet-[Peg10-N3]<sub>4</sub> (11.0mg, 4.5μmol, 1.0eq) 和化合物2 (1.0mg, 4.4μmol, 1.0eq) 溶解于2mL t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1) 中, 然后加入CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 12.0μL, 1.1eq)、VcNa (2.0mg, 10.1μmol, 2.2eq) 和THPTA (3.0mg, 6.9μmol, 1.5eq)。最后加入0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>以调整pH至8。此处所有溶剂均脱气并用N<sub>2</sub>吹扫3次。在N<sub>2</sub>气氛下、在40℃搅拌反应混合物16小时。反应混合物不经进一步纯化即用于下一步。

[0293] BCY11554的制备

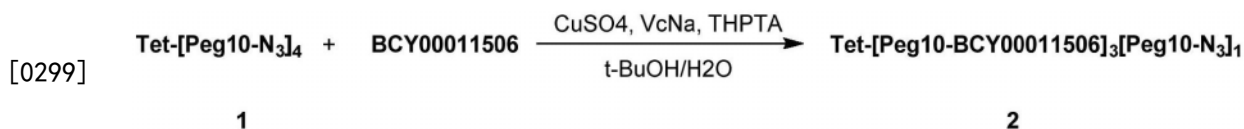


[0295] 首先将化合物3和BCY7744 (38.0mg, 16.3μmol, 3.6eq) 溶解于2mL t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1) 中, 然后加入CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 12.0μL, 1.1eq)、VcNa (2.0mg, 10.1μmol, 2.2eq) 和THPTA (3.0mg, 6.9μmol, 1.5eq)。最后加入0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>以调整pH至8。此处所有溶剂均脱气并用N<sub>2</sub>吹扫3次。在N<sub>2</sub>气氛下、在40℃搅拌反应混合物16小时。LC-MS显示一个具有所需m/z (计算MW: 9929.35, 观测m/z: 1419.2 ([M/7+H]<sup>+</sup>) 和1242.0 ([M/8+H]<sup>+</sup>)) 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BCY11554 (4.3mg, 0.43μmol, 9.67%产率, 99.52%纯度)。

[0296] BCY11856

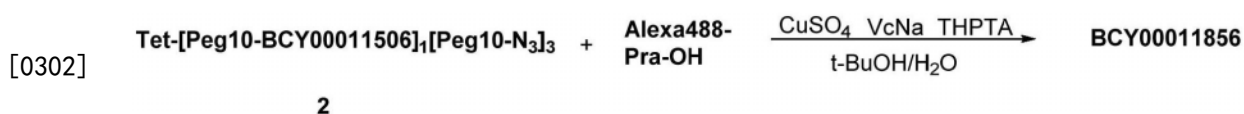


[0298] 化合物2的制备



[0300] 将Tet-[Peg10-N<sub>3</sub>]<sub>4</sub> (12mg, 4.9μmol, 1.0eq)、BCY11506 (35mg, 15.0μmol, 3.1eq)、THPTA (0.4M, 12.2μL, 1.0eq) 的溶液溶解于t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 2mL, 预脱气并用N<sub>2</sub>吹扫3次) 中, 然后在N<sub>2</sub>下加入CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 24.4μL, 2.0eq) 和VcNa (0.4M, 24.4μL, 2.0eq)。通过滴加0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (在1:1t-BuOH/H<sub>2</sub>O中) 将该溶液的pH调节至8, 溶液变为浅黄色。LC-MS显示化合物1完全消耗, 并检测到一些具有所需m/z (MW: 9474.69, 观测m/z: 1052.83 ([M/9+H]<sup>+</sup>), 1184.66 ([M/8+H]<sup>+</sup>) 的峰。减压浓缩反应混合物以除去溶剂以得到残余物。通过制备型HPLC纯化残余物 (TFA条件)。获得白色固体状的化合物2 (6.8mg, 6.47e-1μmol, 13.25%产率, 90.10%纯度)。

[0301] BCY11856的制备

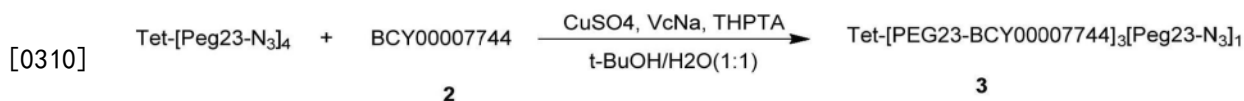


[0303] 将化合物2 (6.1mg, 6.44e-1μmol, 1.0eq)、Alexa488-Pra-OH (0.5mg, 6.44e-1μmol,



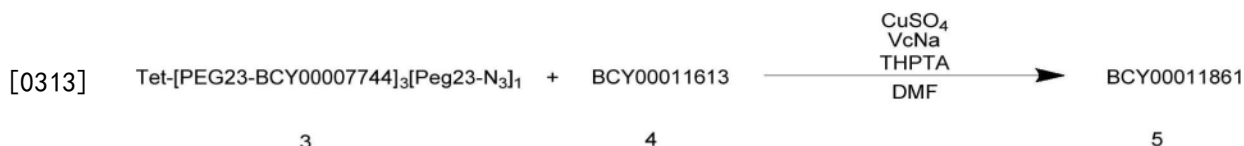
(420mg, 382.06 $\mu$ mol, 4.05eq) 的 DMF 溶液 (1mL)。反应混合物在 20 $^{\circ}$ C 搅拌 12 小时。LC-MS 显示化合物 1 完全消耗, 并检测到作为主要产物的新的峰。通过制备型 HPLC (TFA 条件) 纯化混合物, 得到白色固体状的 Tet-Peg23-N3 (225mg, 47.37 $\mu$ mol, 50.26% 产率, 100% 纯度)。

[0309] 化合物 3 的制备



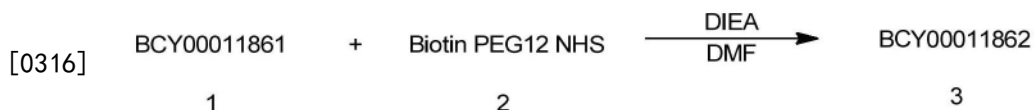
[0311] 将 Tet-[Peg23-N3]<sub>4</sub> (30mg, 6.3 $\mu$ mol, 1.0eq.)、化合物 2 (44.5mg, 19.0 $\mu$ mol, 3.0eq.) 和 THPTA (8.5mg, 19.6 $\mu$ mol, 3.1eq.) 的混合物溶解于 t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 1mL, 预脱气并用 N<sub>2</sub> 吹扫 3 次) 中, 然后在 N<sub>2</sub> 下加入 CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 48 $\mu$ L, 3.0eq.) 和 VcNa (8.0mg, 40.4 $\mu$ mol, 6.4eq.)。通过滴加 0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (在 1:1 t-BuOH/H<sub>2</sub>O 中) 将该溶液的 pH 调节至 8, 溶液变为浅黄色。在 N<sub>2</sub> 气氛下、在 40 $^{\circ}$ C 搅拌反应混合物 4 小时。LC-MS 显示 Tet-[Peg23-N3]<sub>4</sub> 完全消耗, 并检测到一个具有所需 m/z (计算 MW: 11762.46, 观测 m/z: 1176.96 ([M/10+H]<sup>+</sup>), 1307.57 ([M/9+H]<sup>+</sup>)) 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 (TFA 条件) 纯化粗产物, 获得白色固体状的化合物 3 (21.0mg, 1.27 $\mu$ mol, 20.18% 产率, 71.4% 纯度)。

[0312] BCY11861 的制备



[0314] 将化合物 3 (21.0mg, 1.8 $\mu$ mol, 1.0eq.)、BCY11613 (4.7mg, 2.0 $\mu$ mol, 1.1eq.) 和 THPTA (1.0mg, 2.3 $\mu$ mol, 1.3eq.) 的混合物溶解于 t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 1mL, 预脱气并用 N<sub>2</sub> 吹扫 3 次) 中, 然后在 N<sub>2</sub> 下加入 CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 4.5 $\mu$ L, 1.0eq.) 和 VcNa (1.0mg, 5.0 $\mu$ mol, 2.8eq.)。通过滴加 0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (在 1:1 t-BuOH/H<sub>2</sub>O 中) 将该溶液的 pH 调节至 8, 溶液变为浅黄色。在 N<sub>2</sub> 气氛下、在 40 $^{\circ}$ C 搅拌反应混合物 2 小时。LC-MS 显示化合物 3 完全消耗, 并检测到一个具有所需 m/z (计算 MW: 14157.2, 观测 m/z: 1287.34 ([M/11+H]<sup>+</sup>), 1180.2 ([M/12+H]<sup>+</sup>)) 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 (TFA 条件) 纯化粗产物, 获得白色固体状的 BCY11861 (4.2mg, 0.29 $\mu$ mol, 16.37% 产率, 98.5% 纯度)。

[0315] BCY11862 的制备

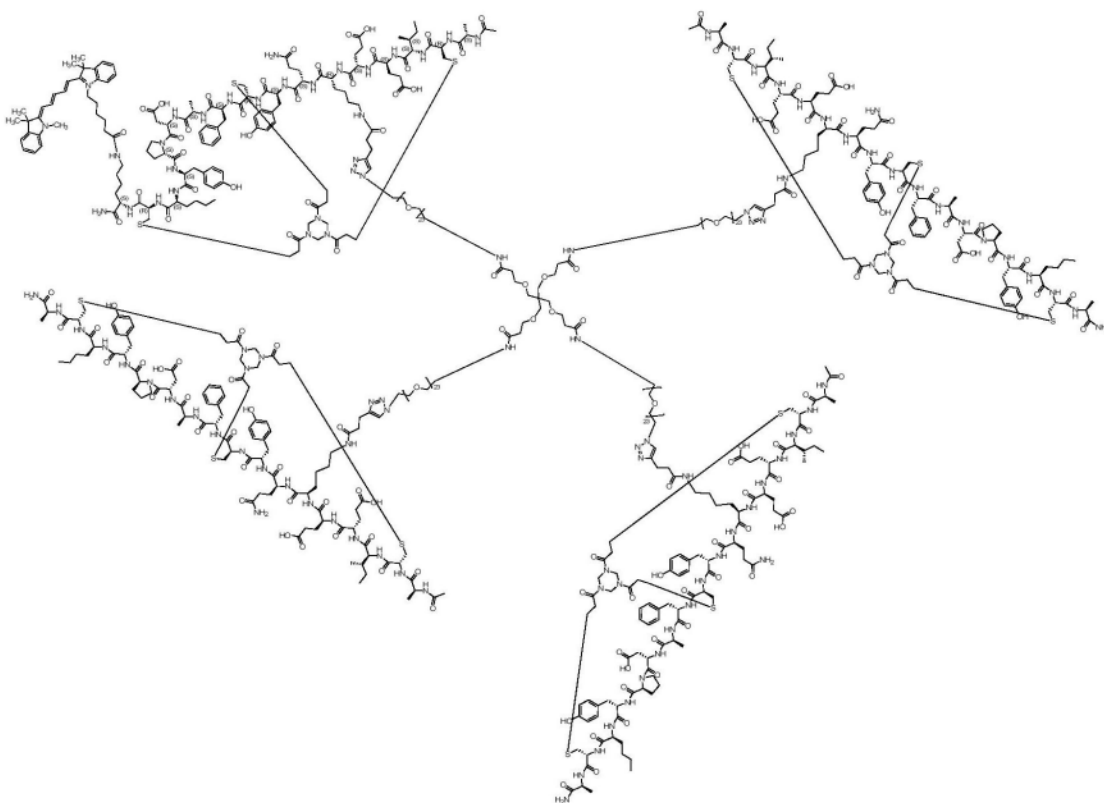


[0317] 将 BCY11861 (5.0mg, 0.35 $\mu$ mol, 1.0eq.)、化合物 2 (0.4mg, 0.42 $\mu$ mol, 1.2eq.) 和 DIEA (0.1mg, 0.74 $\mu$ mol, 0.14 $\mu$ L, 2.1eq.) 的混合物溶解于 DMF (0.5mL) 中。在 25 $^{\circ}$ C 搅拌反应混合物 1 小时。LC-MS 显示化合物 1 完全消耗, 并检测到一个具有所需 m/z (MW: 14983.2, 观测 m/z: 1500.29 ([M/10+H]<sup>+</sup>), 1362.66 ([M/11+H]<sup>+</sup>)) 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 (中性条件)。获得白色固体状的 BCY11862 (3.7mg, 0.23 $\mu$ mol, 65.79% 产率, 94.1% 纯度)。(MW: 14983.2, 观测 m/z: 1873.9180 ([M/8+H]<sup>+</sup>))。

[0318] BCY12239

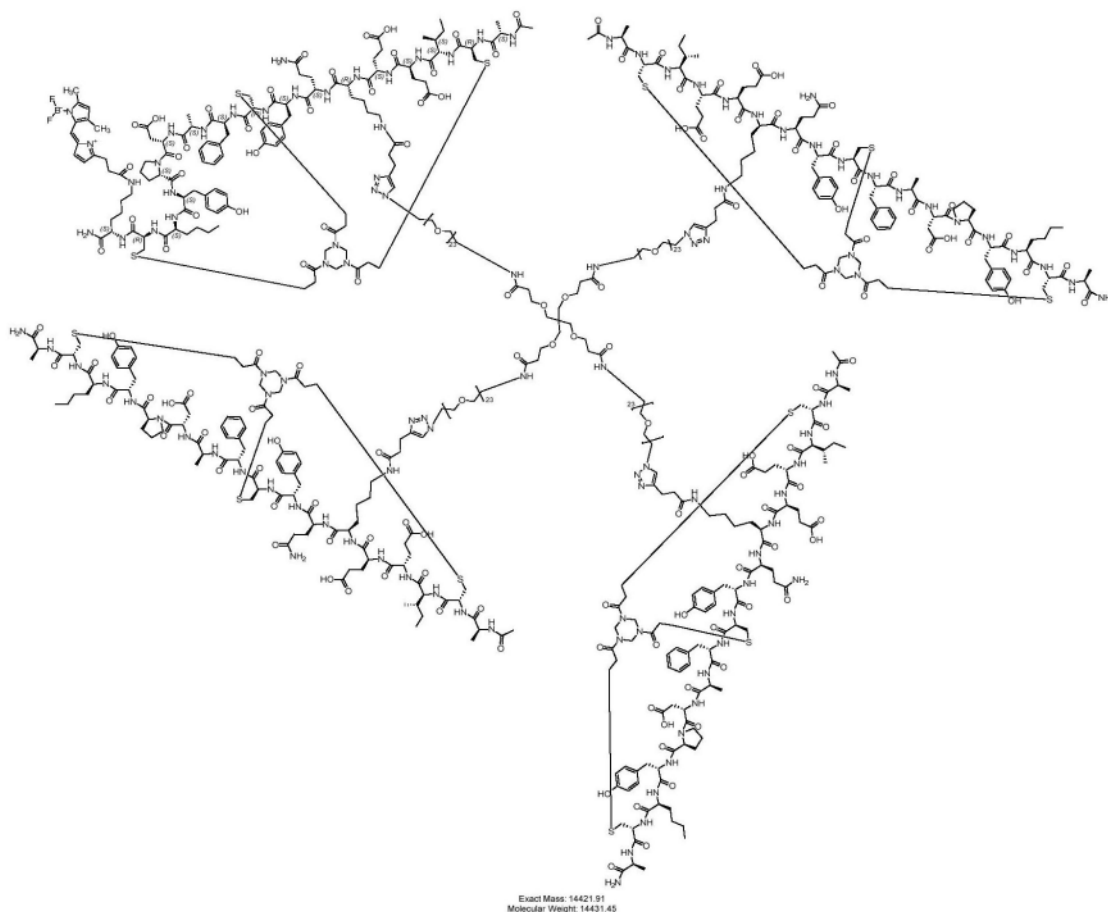


[0322]



[0323] 将BCY11861 (4.0mg, 0.28 $\mu\text{mol}$ , 1.0eq.)、化合物2 (0.2mg, 0.50 $\mu\text{mol}$ , 1.8eq.) 和 DIEA (0.1mg, 0.74 $\mu\text{mol}$ , 0.14 $\mu\text{L}$ , 2.6eq.) 的混合物溶解于DMF (0.5mL) 中。在25 $^{\circ}\text{C}$  搅拌反应混合物1小时。LC-MS显示化合物1完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z (MW:14622.89, 观测m/z:1219.0 ([M/12+H<sup>+</sup>])) 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 (中性条件)。获得浅蓝色固体状的BCY12240 (3.4mg, 0.21 $\mu\text{mol}$ , 77.13%产率, 93.9%纯度)。(MW:14622.89, 观测TOF m/z:14622.41) 1330.2719 ([M/11+H<sup>+</sup>])。

[0324] BCY12380



[0325]

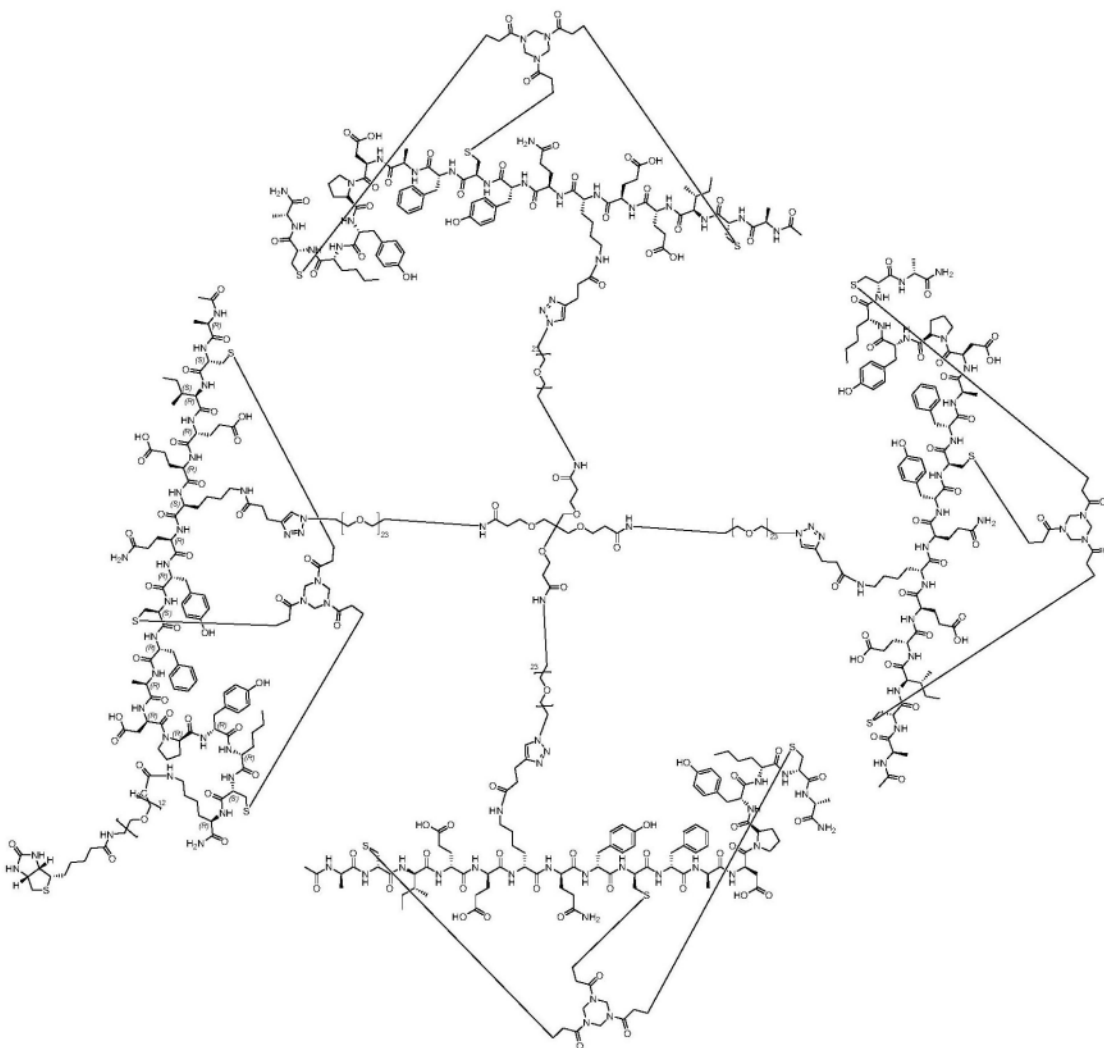
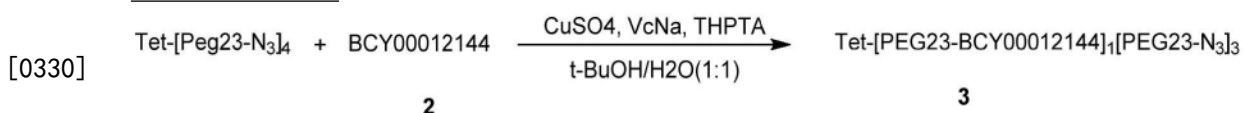
BCY00012380



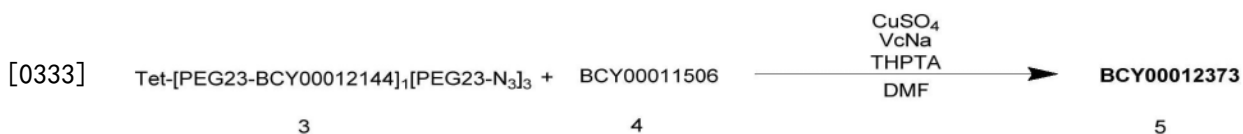
[0326] 将BCY11861 (4.2mg, 0.29 $\mu$ mol, 1.0eq.)、化合物2 (0.13mg, 0.33 $\mu$ mol, 1.2eq.) 和 DIEA (0.1mg, 0.78 $\mu$ mol, 0.14 $\mu$ L, 2.8eq.) 的混合物溶解于DMF (0.5mL) 中。在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物1小时。减压浓缩反应混合物以除去溶剂并产生残余物。然后通过制备型HPLC纯化残余物 (中性条件)。获得浅绿色固体状的BCY12380 (0.8mg, 0.21 $\mu$ mol, 21.4%产率, 87.3%纯度)。(计算MW: 14431.31, 观测m/z: 1804.8426 ([M/8+H<sup>+</sup>])。)

[0327] BCY12374

[0328]

[0329] 化合物3的制备

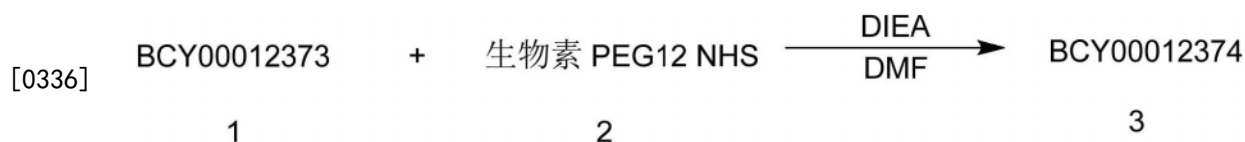
[0331] 将Tet-[Peg23-N<sub>3</sub>]<sub>4</sub> (60mg, 12.63μmol, 1.0eq.)、BCY12144 (8.3mg, 8.84μmol, 0.7eq.)和THPTA (5.5mg, 1.0eq.)的混合物溶解于t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 1mL, 预脱气并用N<sub>2</sub>吹扫3次)中,然后在N<sub>2</sub>下加入CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 32.0μL, 1.0eq.)和VcNa (5.5mg, 2.0eq.)。通过滴加0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (在1:1 t-BuOH/H<sub>2</sub>O中)将该溶液的pH调节至8,溶液变为浅黄色。在N<sub>2</sub>气氛下、在40℃搅拌反应混合物4小时。LC-MS显示BCY12144完全消耗,并检测到一个具有所需m/z (计算MW: 7144.27, 观测m/z: 1021.3 ([M/7+H]<sup>+</sup>))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 (TFA条件)纯化粗产物,获得白色固体状的化合物3 (21.5mg, 2.90μmol, 22.94%产率, 96.3%纯度)。

[0332] BCY12373的制备

[0334] 将化合物3 (21.5mg, 3.01μmol, 1.0eq.)、BCY11506 (21.2mg, 9.03μmol, 3.0eq.)和

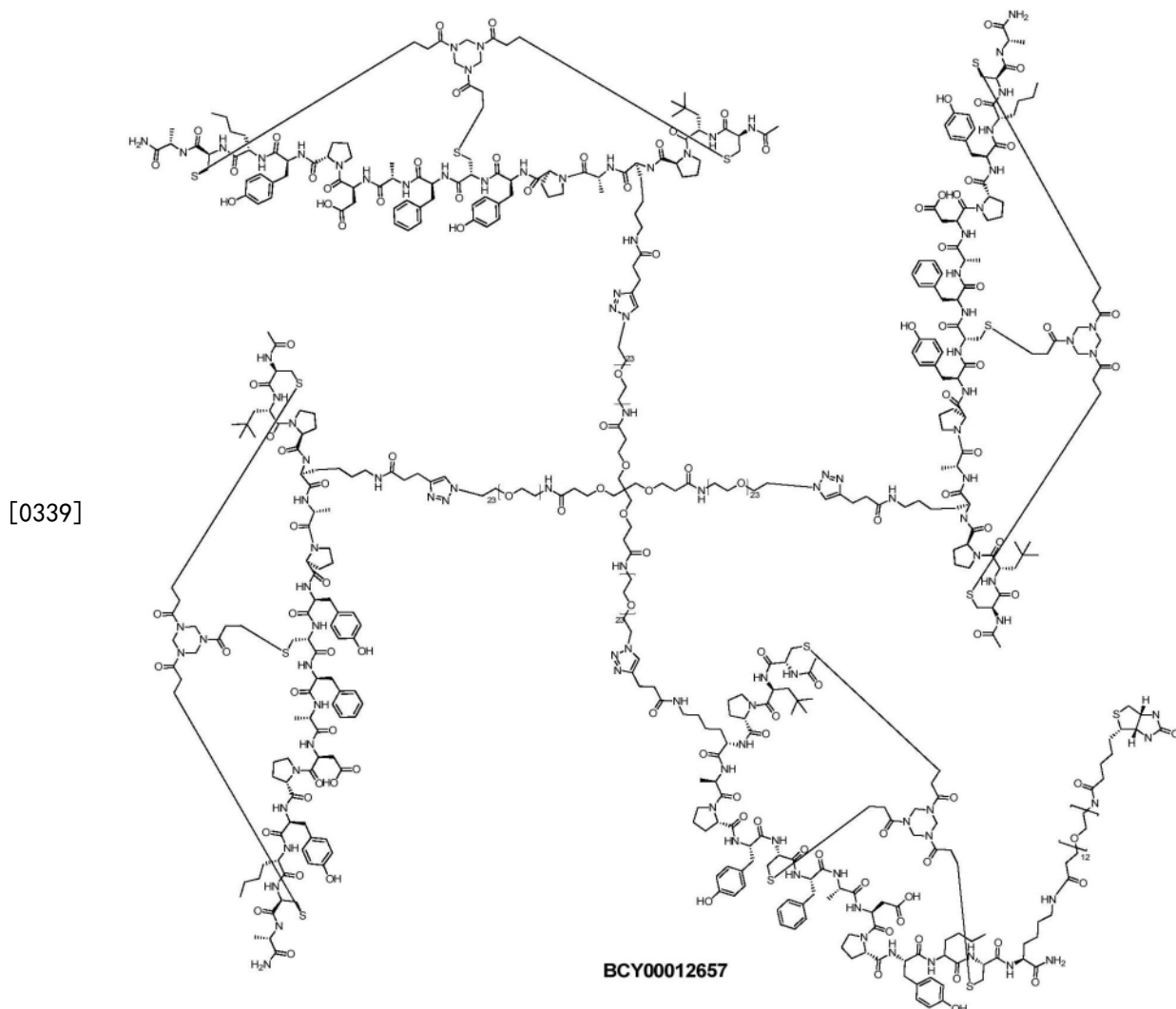
THPTA (4.0mg, 3.0eq.) 的混合物溶解于 t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 1mL, 预脱气并用 N<sub>2</sub> 吹扫 3 次) 中, 然后在 N<sub>2</sub> 下加入 CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 23.0μL, 3.0eq.) 和 VcNa (4.0mg, 20.2μmol, 6.0eq.)。通过滴加 0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (在 1:1 t-BuOH/H<sub>2</sub>O 中) 将该溶液的 pH 调节至 8, 溶液变为浅黄色。在 N<sub>2</sub> 气氛下、在 40℃ 搅拌反应混合物 3 小时。LC-MS 显示化合物 3 完全消耗, 并检测到一个具有所需 m/z (计算 MW: 14160.15, 观测 m/z: 1288.1 ([M/11+H]<sup>+</sup>)) 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 (TFA 条件) 纯化粗产物, 获得白色固体状的 BCY12373 (28.7mg, 1.86μmol, 61.96% 产率, 92.0% 纯度)。

[0335] BCY12374 的制备

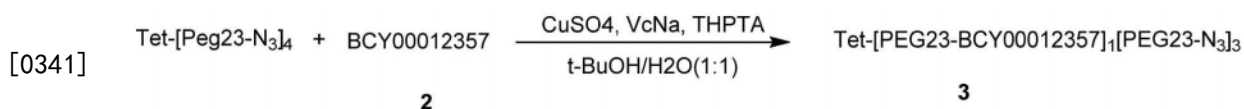


[0337] 将 BCY12373 (5mg, 0.37μmol, 1.0eq.)、化合物 2 (0.4mg, 0.37μmol, 1.0eq.) 和 DIEA (0.1mg, 0.74μmol, 0.14μL, 2.0eq.) 的混合物溶解于 DMF (0.5mL) 中。在 25℃ 搅拌反应混合物 1 小时。LC-MS 显示 BCY12373 完全消耗。减压浓缩反应混合物以除去溶剂并产生残余物。然后通过制备型 HPLC 纯化残余物 (中性条件)。获得白色固体状的 BCY12374 (2.4mg, 0.15μmol, 42.13% 产率, 92.9% 纯度)。(计算 MW: 14983.24, 观测 m/z: 1873.8652 ([M/8+H]<sup>+</sup>))。

[0338] BCY12657

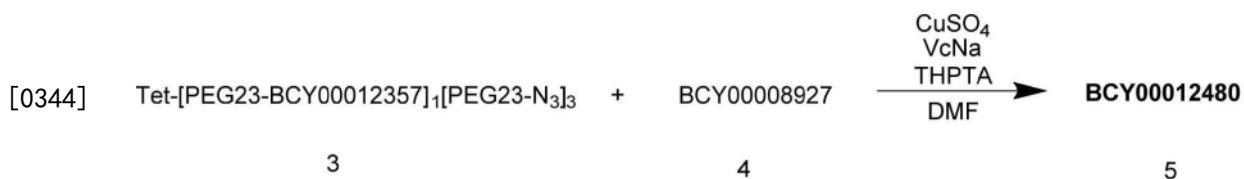


[0340] 化合物3的制备



[0342] 将Tet-[Peg23-N<sub>3</sub>]<sub>4</sub> (150mg, 31.6μmol, 1.0eq.)、化合物2 (49mg, 22.1μmol, 0.7eq.) 和THPTA (14.0mg, 32.2μmol, 1.0eq.) 的混合物溶解于t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 1mL, 预脱气并用N<sub>2</sub>吹扫3次) 中, 然后在N<sub>2</sub>下加入CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 80μL, 1.0eq.) 和VcNa (13.0mg, 65.6μmol, 2.1eq.)。通过滴加0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (在1:1t-BuOH/H<sub>2</sub>O中) 将该溶液的pH调节至8, 溶液变为浅黄色。在N<sub>2</sub>气氛下、在40℃搅拌反应混合物4小时。LC-MS显示化合物2完全消耗, 并检测到一个主峰。过滤并减压浓缩反应混合物, 以得到残余物。通过制备型HPLC (TFA条件) 纯化粗产物, 获得白色固体状的化合物3 (45.8mg, 6.17μmol, 19.53%产率, 93.8%纯度)。

[0343] BCY12480的制备



[0345] 将化合物3 (45.8mg, 6.6μmol, 1.0eq.)、BCY8927 (42.6mg, 19.7μmol, 3.0eq.) 和

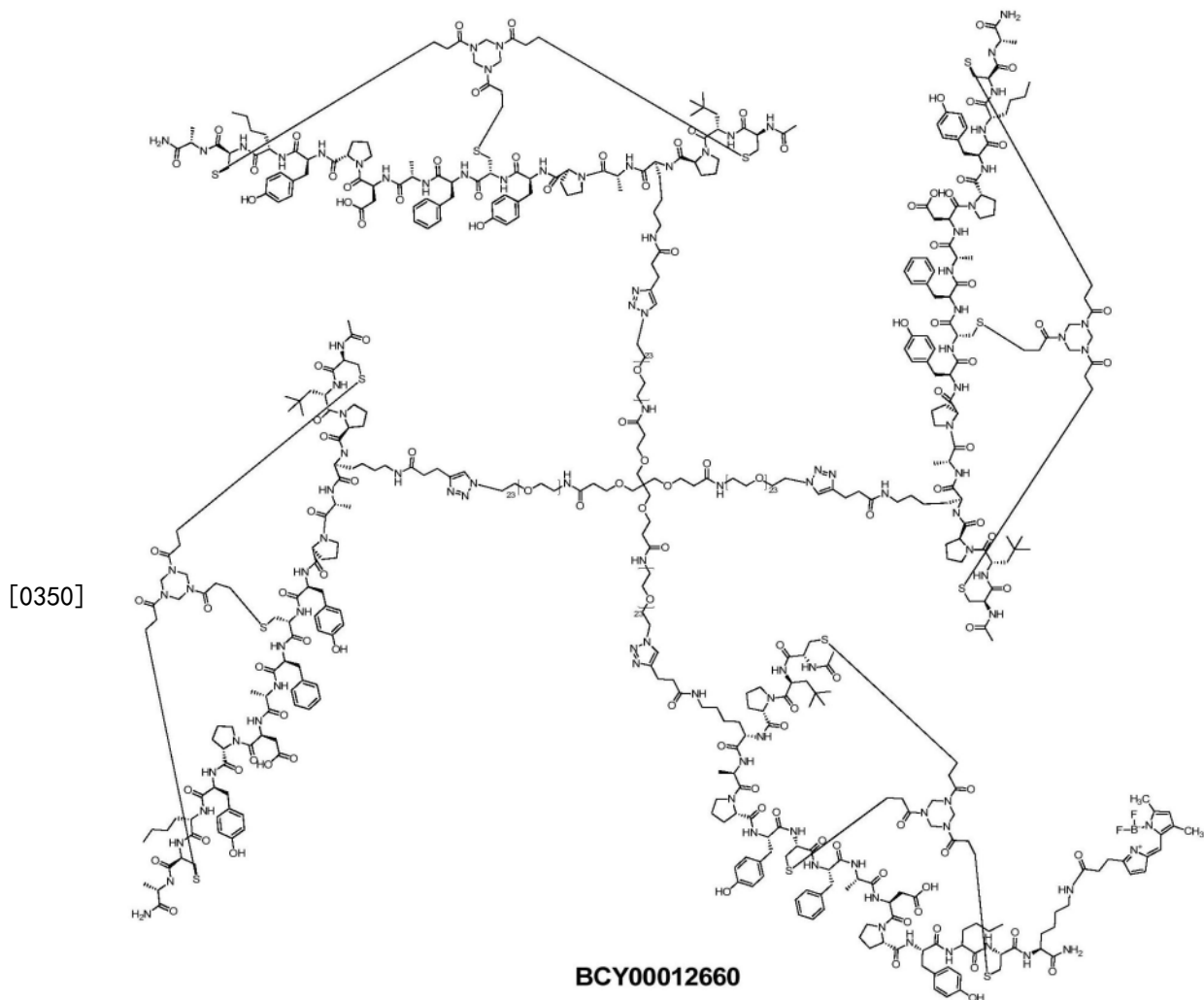
THPTA (9.0mg, 20.7 $\mu$ mol, 3.1eq.) 的混合物溶解于 t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 1mL, 预脱气并用 N<sub>2</sub> 吹扫 3 次) 中, 然后在 N<sub>2</sub> 下加入 CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 50.0 $\mu$ L, 3.0eq.) 和 VcNa (8.0mg, 40.4 $\mu$ mol, 6.1eq.)。通过滴加 0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (在 1:1 t-BuOH/H<sub>2</sub>O 中) 将该溶液的 pH 调节至 8, 溶液变为浅黄色。在 N<sub>2</sub> 气氛下、在 40℃ 搅拌反应混合物 3 小时。LC-MS 显示化合物 3 完全消耗, 并检测到一个具有所需 m/z (计算 MW: 13444.8, 观测 m/z: 1494.6 ([M/9+H]<sup>+</sup>), 1681.6 ([M/8+H]<sup>+</sup>) 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 (TFA 条件) 纯化粗产物, 获得白色固体状的 BCY12480 (32.0mg, 2.26 $\mu$ mol, 34.32% 产率, 96.6% 纯度)。

[0346] BCY12657 的制备



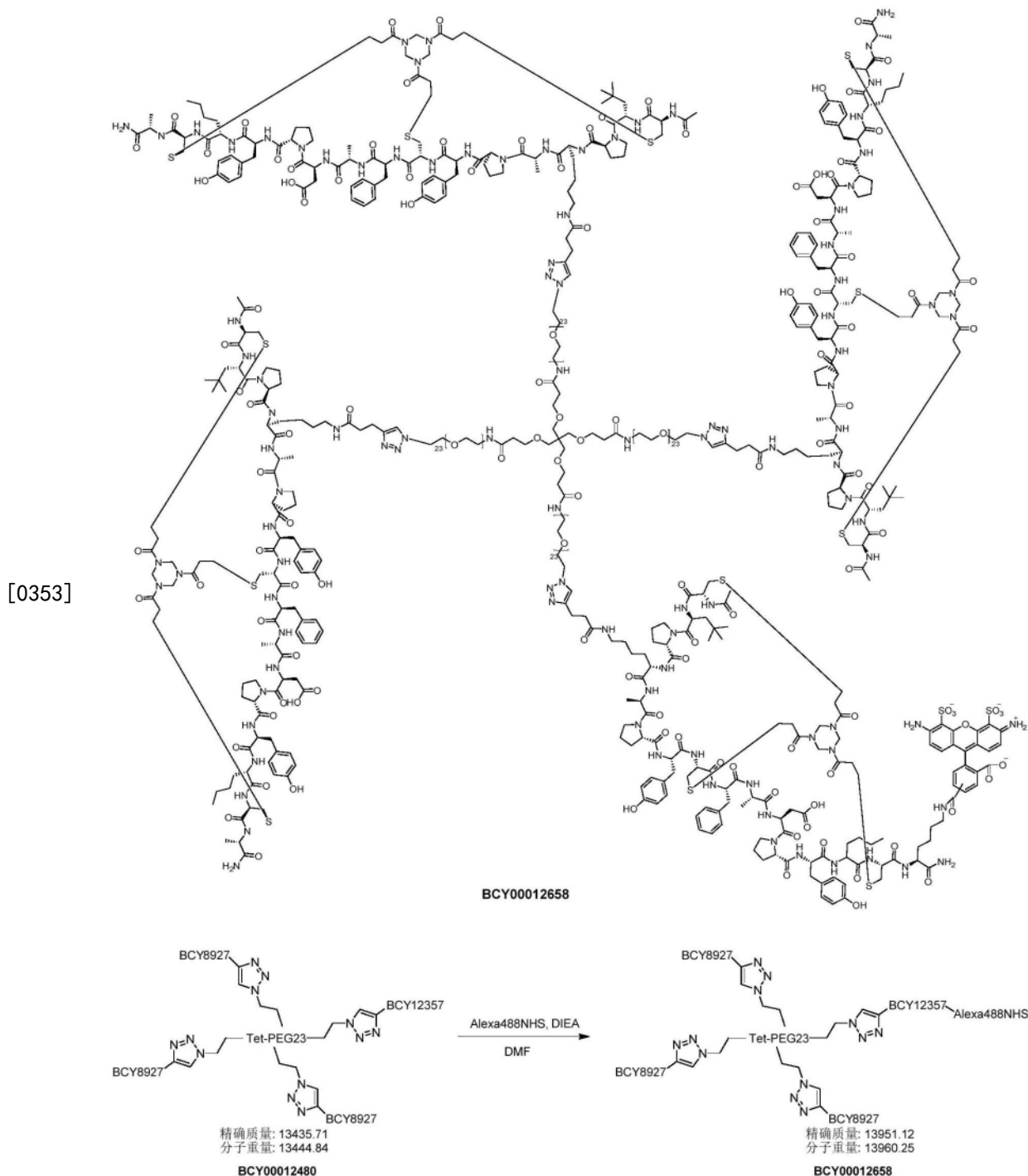
[0348] 将 BCY12480 (10mg, 0.74 $\mu$ mol, 1.0eq.)、化合物 2 (0.7mg, 0.74 $\mu$ mol, 1.0eq.) 和 DIEA (0.2mg, 1.48 $\mu$ mol, 0.3 $\mu$ L, 2.0eq.) 的混合物溶解于 DMF (0.5mL) 中。在 25℃ 搅拌反应混合物 1 小时。LC-MS 显示化合物 1 完全消耗, 并检测到一个具有所需 m/z (MW: 14270.8, 观测 m/z: 1586.3 ([M/9+H]<sup>+</sup>), 1428 ([M/10+H]<sup>+</sup>), 1298.6 ([M/11+H]<sup>+</sup>)) 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 (中性条件)。获得白色固体状的 BCY12657 (4.2mg, 0.29 $\mu$ mol, 38.10% 产率, 96.3% 纯度)。

[0349] BCY12660



[0351] 将BCY12480 (5mg, 0.37 $\mu$ mol, 1.0eq.)、化合物2 (0.2mg, 0.51 $\mu$ mol, 1.4eq.) 和DIEA (0.1mg, 0.74 $\mu$ mol, 0.14 $\mu$ L, 2.0eq.) 的混合物溶解于DMF (0.5mL) 中。在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物1小时。LC-MS显示BCY12480完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z (MW: 13718.9, 观测m/z: 1525.1 ([M/9+H]<sup>+</sup>), 1247.6 ([M/11+H]<sup>+</sup>) 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 (中性条件)。获得浅绿色固体状的BCY12660 (2.6mg, 0.17 $\mu$ mol, 47.69%产率, 93.6%纯度)。(计算MW: 13718.9, 观测m/z: 1715.8014 ([M/8+H]<sup>+</sup>)。)

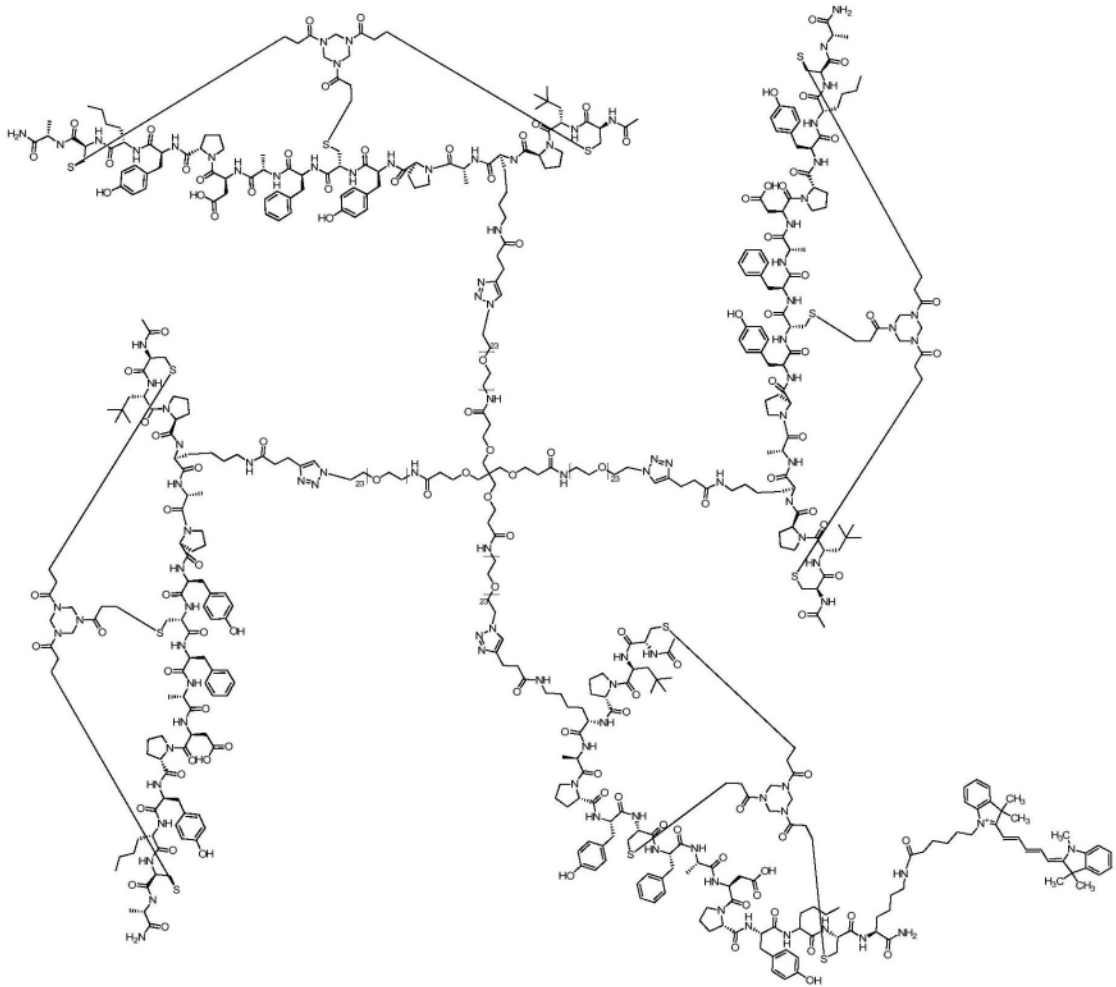
[0352] BCY12658



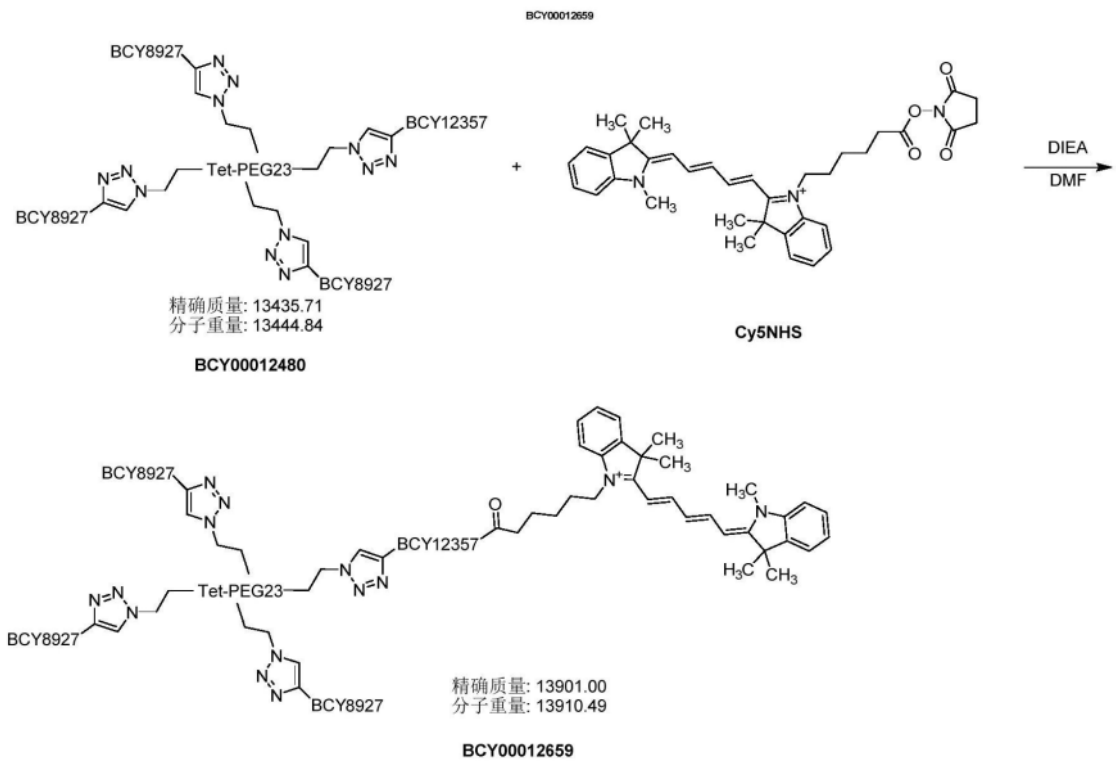
[0354] 向BCY12480 (5.0mg, 0.37 $\mu$ mol, 1.0eq)的DMF溶液 (0.5mL) 中加入DIEA (0.15mg, 1.12 $\mu$ mol, 0.2 $\mu$ L, 3.0eq) 并避光搅拌5min。然后在N<sub>2</sub>气氛下将Alexa488-NHS (0.24mg, 0.37 $\mu$ mol, 1.0eq) 加入混合物中。在25 $^{\circ}$ C避光搅拌混合物3小时。LC-MS显示BCY12480完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z (计算MW: 13960.25, 观测m/z: 1748.4 [(M+7H<sup>+</sup>+Na<sup>+</sup>)/8]) 的主峰。通过制备型HPLC纯化反应混合物 (A: H<sub>2</sub>O中的0.075% TFA, B: ACN) 以得到粉色固体状的BCY12658 (1.20mg, 8.18e-2 $\mu$ mol, 22.0%产率, 95.1%纯度)。(计算MW: 13960.25, 观测m/z: 1995.4625 [(M/7+H<sup>+</sup>)])

[0355] BCY12659

[0356]



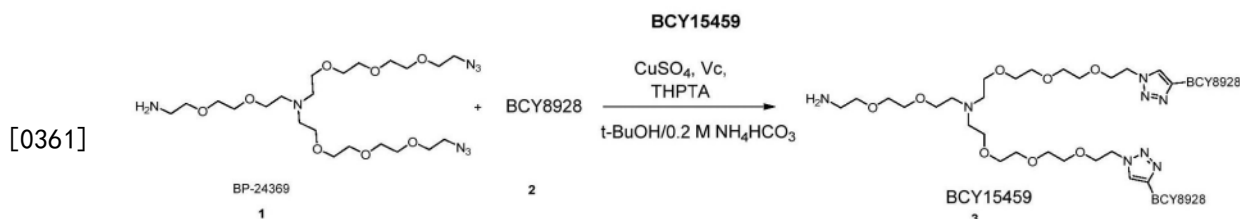
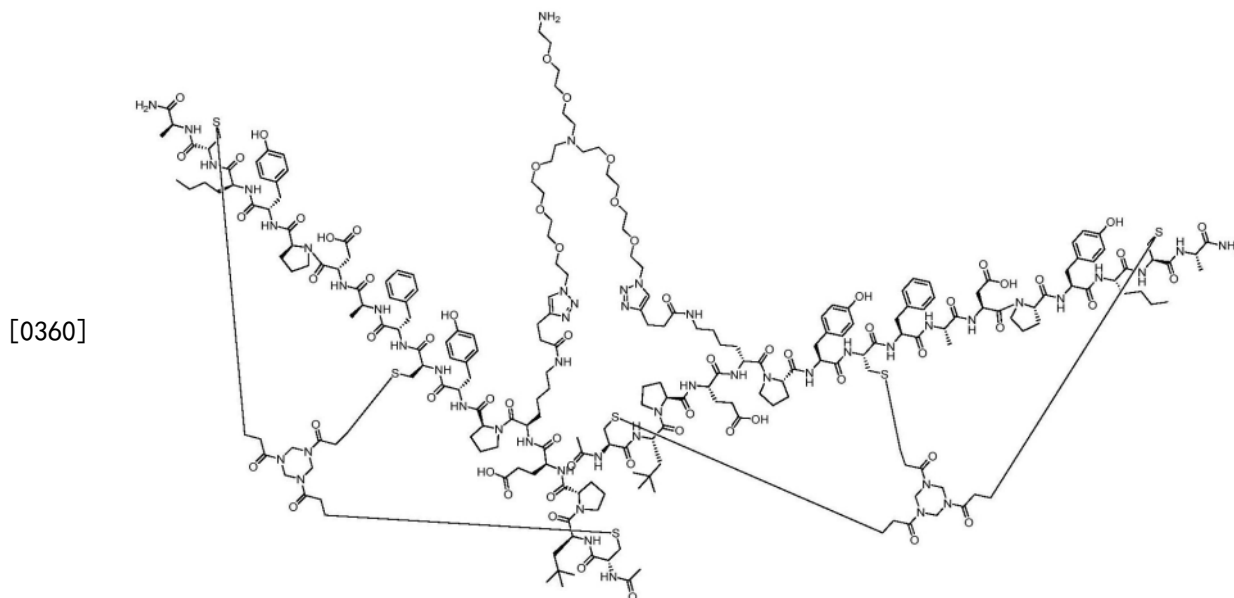
[0357]



[0358] 向BCY12480 (5.0mg, 0.37 $\mu$ mol, 1.0eq) 的DMF溶液 (0.5mL) 中加入DIEA (0.15mg,

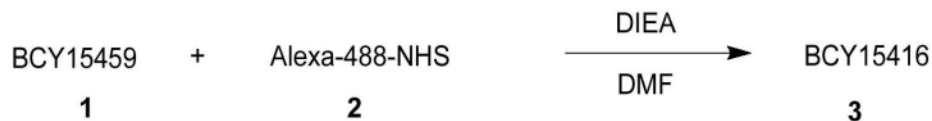
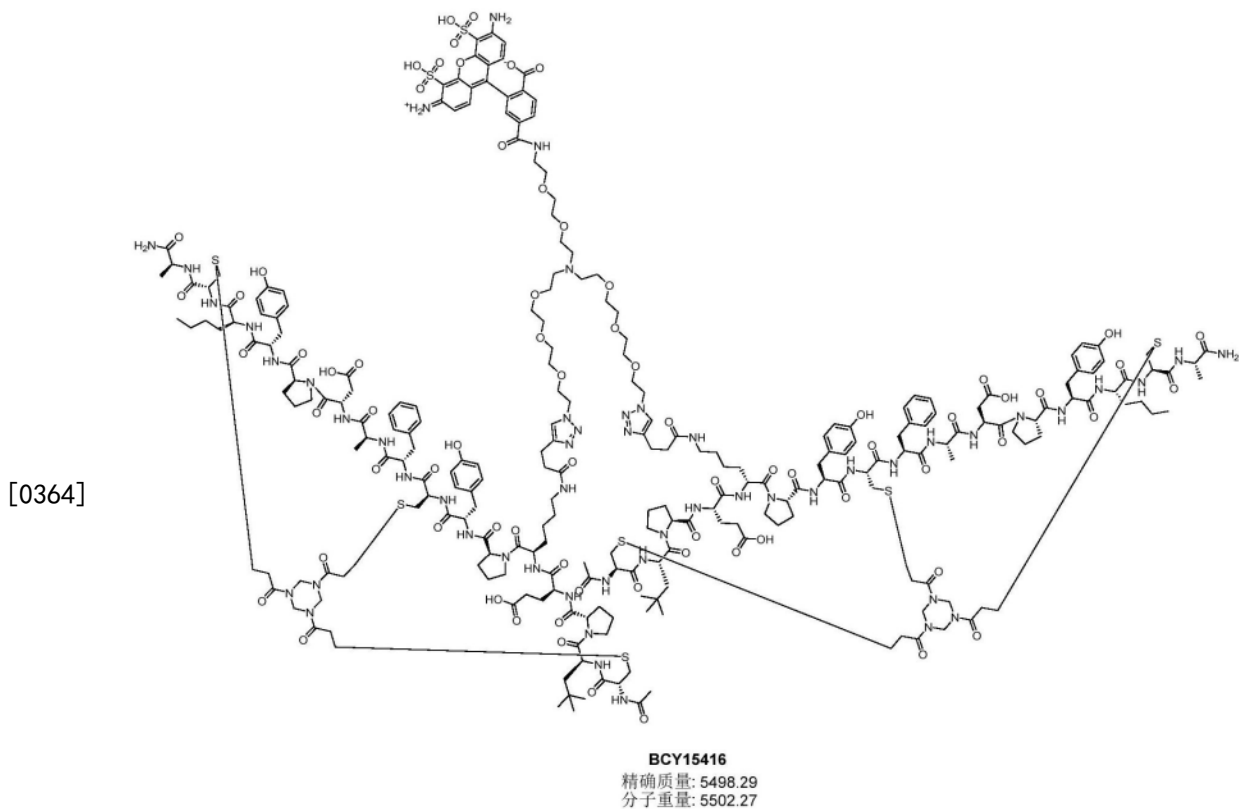
1.12 $\mu\text{mol}$ , 0.2 $\mu\text{L}$ , 3.0eq) 并避光搅拌5min。然后在 $\text{N}_2$ 气氛下将Cy5-NHS (0.3mg, 0.45 $\mu\text{mol}$ , 1.2eq) 加入混合物中。在25 $^\circ\text{C}$ 避光搅拌混合物3小时。LC-MS显示BCY12480完全消耗, 并检测到一个具有所需 $m/z$  (计算MW: 13910.49, 观测 $m/z$ : 1740.1  $[\text{M}/8+\text{H}]^+$ ) 的主峰。通过制备型HPLC纯化反应混合物 (A:  $\text{H}_2\text{O}$  中的0.075% TFA, B: ACN) 以得到浅蓝色固体状的BCY12659 (1.10mg, 7.24e-2 $\mu\text{mol}$ , 19.5%产率, 91.5%纯度)。(计算MW: 13910.49, 观测 $m/z$ : 1265.5352 ( $[\text{M}/11+\text{H}]^+$ ))

[0359] BCY15459



[0362] 将化合物1 (10.0mg, 18.16 $\mu\text{mol}$ , 1.0eq.)、化合物2 (84.5mg, 38.1 $\mu\text{mol}$ , 2.1eq.) 和 THPTA (7.9mg, 18.16 $\mu\text{mol}$ , 1.0eq.) 的混合物溶解于 $t\text{-BuOH}/0.2\text{M}$  (aq)  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1:1, 0.5mL) 中, 脱气并用 $\text{N}_2$ 吹扫, 然后在 $\text{N}_2$ 下加入 $\text{CuSO}_4$ 水溶液 (0.4M, 45.4 $\mu\text{L}$ , 1.0eq.) 和Vc (14.5mg, 72.64 $\mu\text{mol}$ , 4.0eq.)。将该溶液的pH调节至8, 溶液变为浅黄色。在 $\text{N}_2$ 气氛下、在25 $^\circ\text{C}$ 搅拌反应混合物2小时。LC-MS显示BP-24369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BCY15459 (55mg, 10.48 $\mu\text{mol}$ , 57.71%产率, 97.5%纯度)。计算MW: 4985.8, 观测 $m/z$ : 1247.7  $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ , 998.4  $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 。

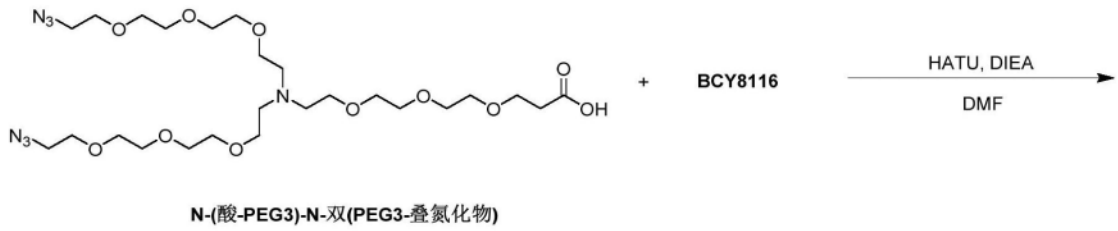
[0363] BCY15416



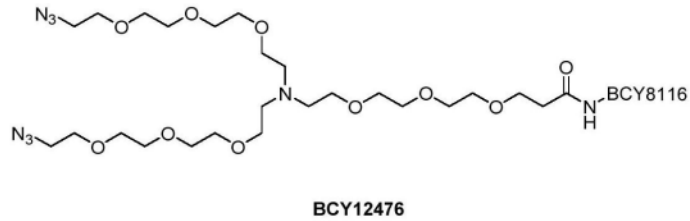
[0365] 将化合物1 (20.0mg, 4.01 $\mu\text{mol}$ , 1.0eq.)、化合物2 (5.0mg, 8.02 $\mu\text{mol}$ , 2.0eq.) 的混合物溶解于DMF (0.5mL) 中。通过滴加DIEA (5.2mg, 40.11 $\mu\text{mol}$ , 7.0 $\mu\text{L}$ , 10eq.) 将该溶液的pH调节至8。在25 $^{\circ}\text{C}$  搅拌反应混合物1小时。LC-MS显示保留了BCY15459 (计算MW: 4985.8, 观测m/z: 1247.9 ([M/4+H]<sup>+</sup>), 998.1 ([M/5+H]<sup>+</sup>)。然后将另外的化合物2 (5.0mg, 8.02 $\mu\text{mol}$ , 2.0eq.) 加入反应混合物中, 在25 $^{\circ}\text{C}$  搅拌反应混合物1小时。LC-MS显示BCY15459完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z (计算MW: 5502.27, 观测m/z: 1376.8 ([M/4+H]<sup>+</sup>), 1100.8 ([M/5+H]<sup>+</sup>)) 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BCY15416 (9.8mg, 1.72 $\mu\text{mol}$ , 42.76%产率, 96.3%纯度)。

[0366] BCY15985



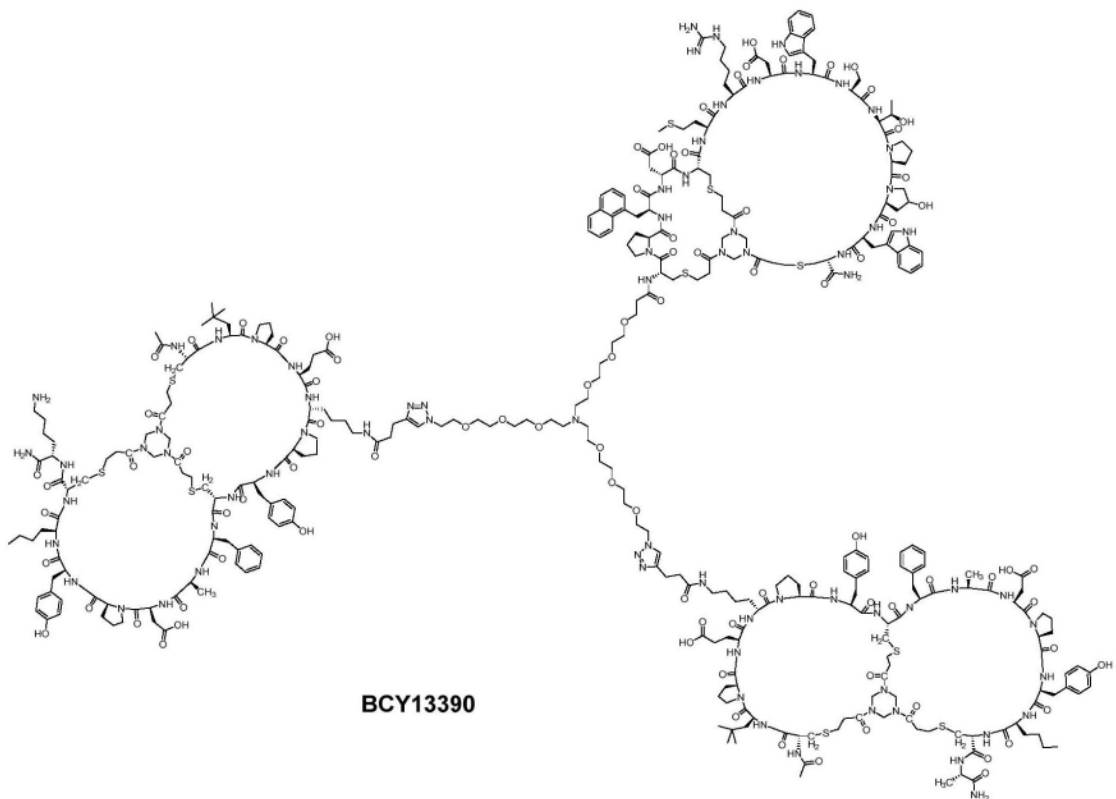


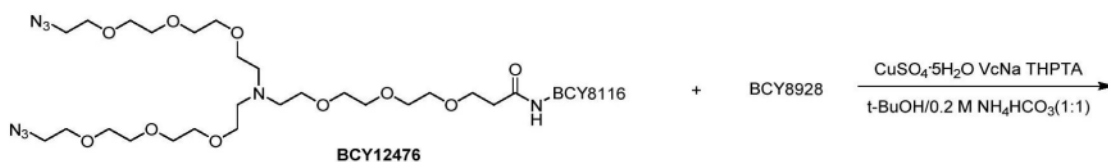
[0371]



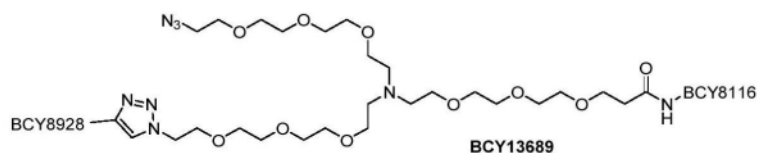
[0372] 将N-(酸-PEG3)-N-双(PEG3-叠氮化物) (70.0mg, 112.2 $\mu$ mol, 1.0eq)、HATU (51.2mg, 134.7 $\mu$ mol, 1.2eq) 和DIEA (29.0mg, 224.4 $\mu$ mol, 40 $\mu$ L, 2.0eq) 的混合物溶解于DMF (2mL) 中, 并混合5min。然后加入BCY8116 (294.0mg, 135.3 $\mu$ mol, 1.2eq)。在40 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物16小时。LC-MS显示一个具有所需m/z的主峰。减压浓缩反应混合物以除去溶剂并产生残余物。然后通过制备型HPLC纯化残余物。获得白色固体状的BCY12476 (194.5mg, 66.02 $\mu$ mol, 29%产率, 94%纯度)。计算MW: 2778.17, 观测m/z: 1389.3 ( $[M+2H]^{2+}$ ), 926.7 ( $[M+3H]^{3+}$ )。

[0373]

[0374] 制备BCY13689的程序

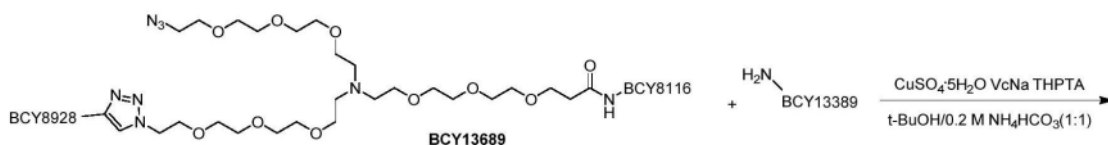


[0375]

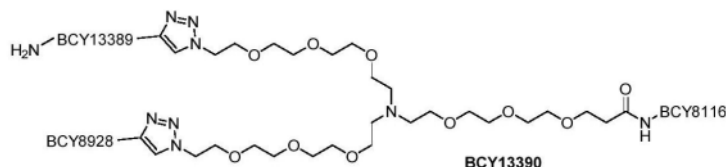


[0376] 将BCY12476 (47.0mg, 16.91 $\mu$ mol, 1.0eq)、BCY8928 (30.0mg, 13.53 $\mu$ mol, 0.8eq) 和 THPTA (36.7mg, 84.55 $\mu$ mol, 5.0eq) 的混合物溶解于 t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 8mL, 预脱气并用 N<sub>2</sub> 吹扫) 中, 然后在 N<sub>2</sub> 下加入 CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 21.0 $\mu$ L, 0.5eq) 和 VcNa (67.0mg, 338.21 $\mu$ mol, 20.0eq)。通过滴加 0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (在 1:1 t-BuOH/H<sub>2</sub>O 中) 将该溶液的 pH 调节至 8, 溶液变为浅黄色。在 N<sub>2</sub> 气氛下、在 25 $^{\circ}$ C 搅拌反应混合物 1.5h。LC-MS 显示保留了一些 BCY12476, BCY8928 完全消耗, 并检测到具有所需 m/z 的峰。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 BCY13689 (25.3mg, 4.56 $\mu$ mol, 27% 产率, 90% 纯度)。计算 MW: 4995.74, 观测 m/z: 1249.4 ([M+4H]<sup>4+</sup>), 999.9 ([M+5H]<sup>5+</sup>)。

[0377] 制备 BCY13390 的程序



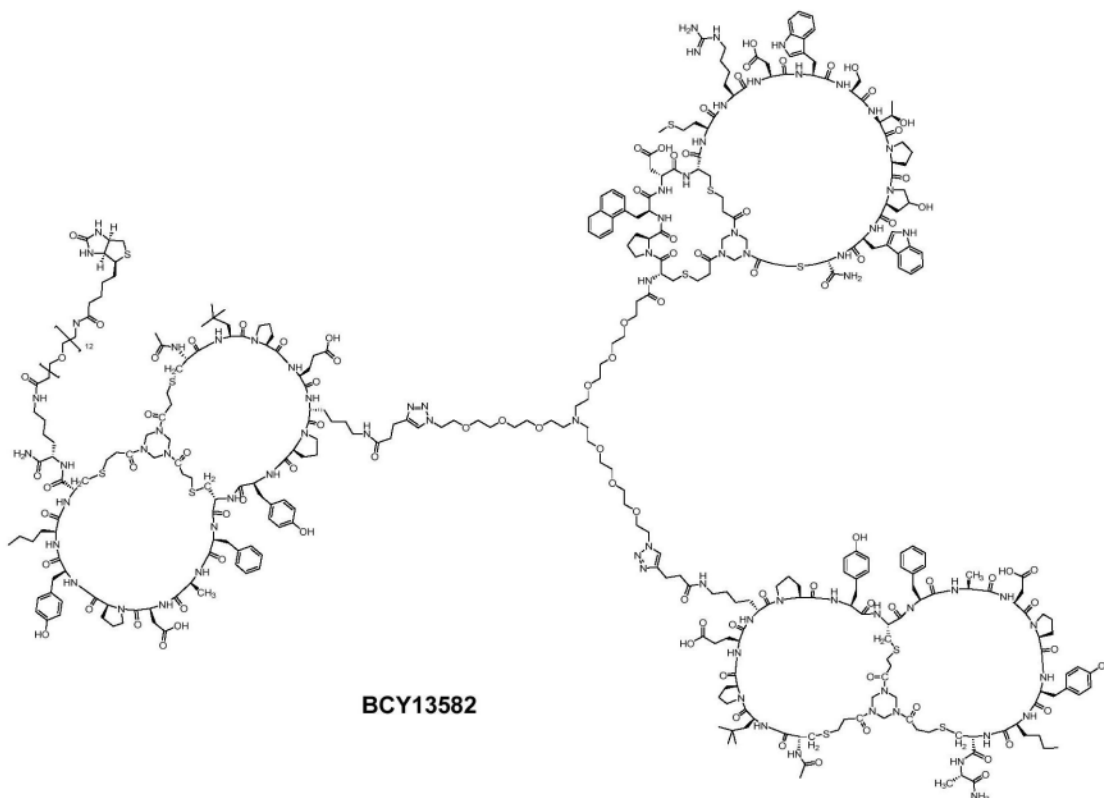
[0378]



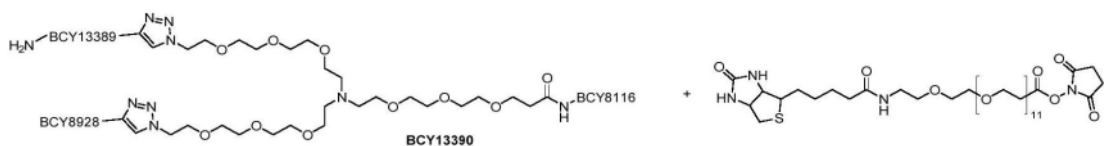
[0379] 将 BCY13689 (43.6mg, 8.73 $\mu$ mol, 1.0eq)、BCY13389 (20.8mg, 9.16 $\mu$ mol, 1.05eq) 和 THPTA (3.8mg, 8.73 $\mu$ mol, 1.0eq) 的混合物溶解于 t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 1mL, 预脱气并用 N<sub>2</sub> 吹扫) 中, 然后在 N<sub>2</sub> 下加入 CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 22.0 $\mu$ L, 1.0eq) 和 VcNa (3.5mg, 17.45 $\mu$ mol, 2.0eq)。通过滴加 0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (在 1:1 t-BuOH/H<sub>2</sub>O 中) 将该溶液的 pH 调节至 8, 溶液变为浅黄色。在 N<sub>2</sub> 气氛下、在 25 $^{\circ}$ C 搅拌反应混合物 2 小时。LC-MS 显示了显著的对应于所需 m/z 的峰。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 BCY13390 (33.8mg, 4.21 $\mu$ mol, 48% 产率, 90% 纯度)。计算 MW: 7270.41, 观测 m/z: 1454.9 ([M+5H]<sup>5+</sup>), 1213.2 ([M+6H]<sup>6+</sup>)。

[0380] BCY13582

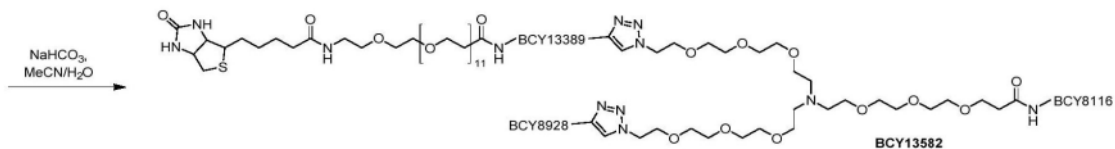
[0381]



[0382] 制备BCY13582的程序



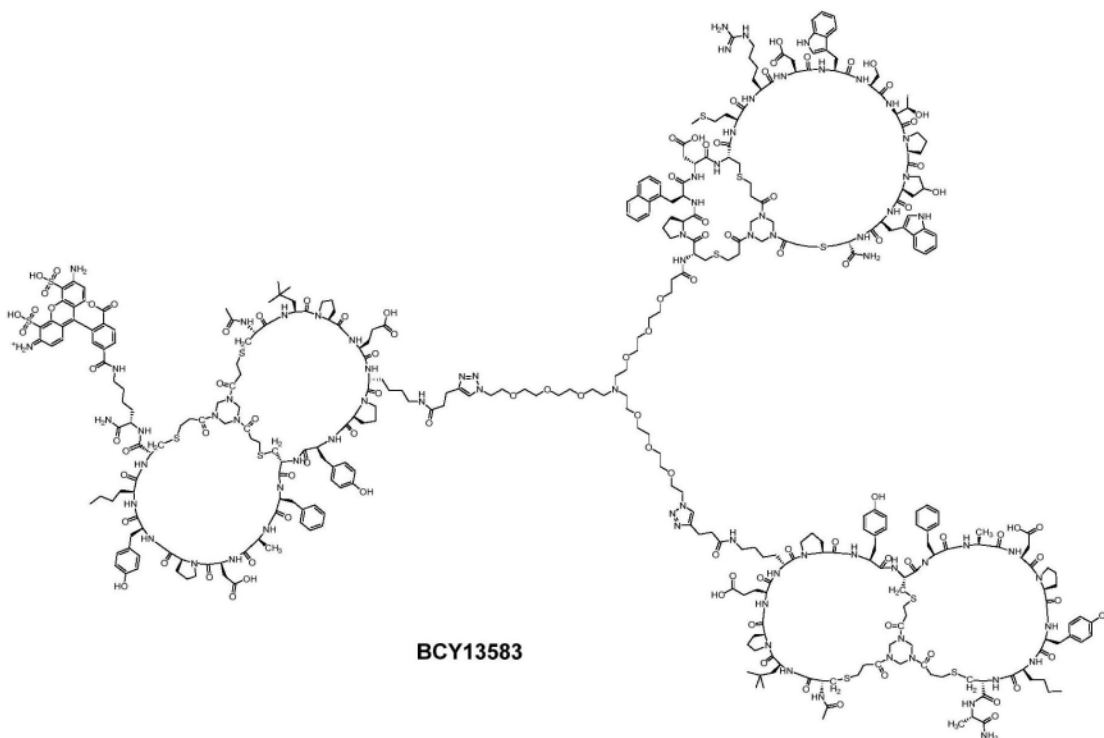
[0383]



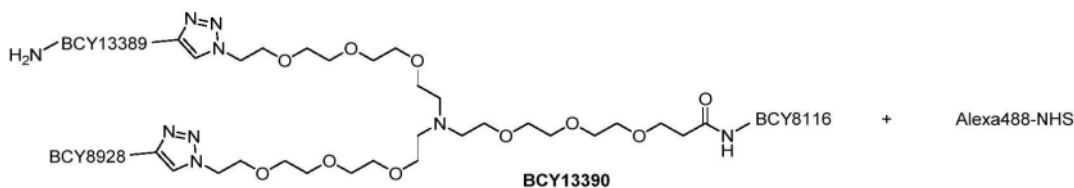
[0384] 将BCY13390 (5.0mg, 0.6 $\mu$ mol, 1.0eq)、生物素-PEG12-NHS酯 (CAS365441-71-0, 0.7mg, 0.72 $\mu$ mol, 1.1eq) 的混合物溶解于MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1, 2mL) 中。通过滴加1.0M NaHCO<sub>3</sub>将该溶液的pH调节至8。在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物0.5小时。LC-MS显示BCY13390完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z的主峰。过滤并减压浓缩反应混合物, 以得到残余物。通过制备型HPLC纯化粗产物, 获得白色固体状的BCY13582 (2.5mg, 0.30 $\mu$ mol, 43%产率, 96%纯度)。计算MW: 8096.43, 观测m/z: 1351.1 ([M+6H]<sup>6+</sup>), 1158.5 ([M+7H]<sup>7+</sup>)。

[0385] BCY13583

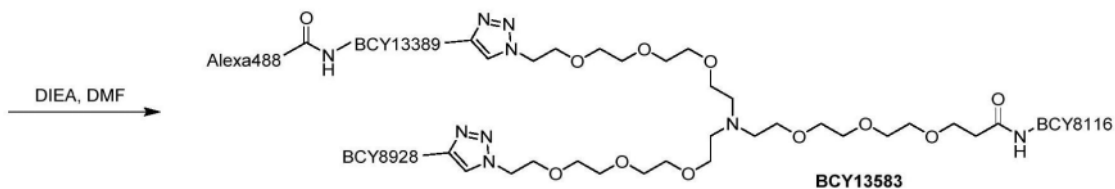
[0386]



[0387] 制备BCY13583的程序

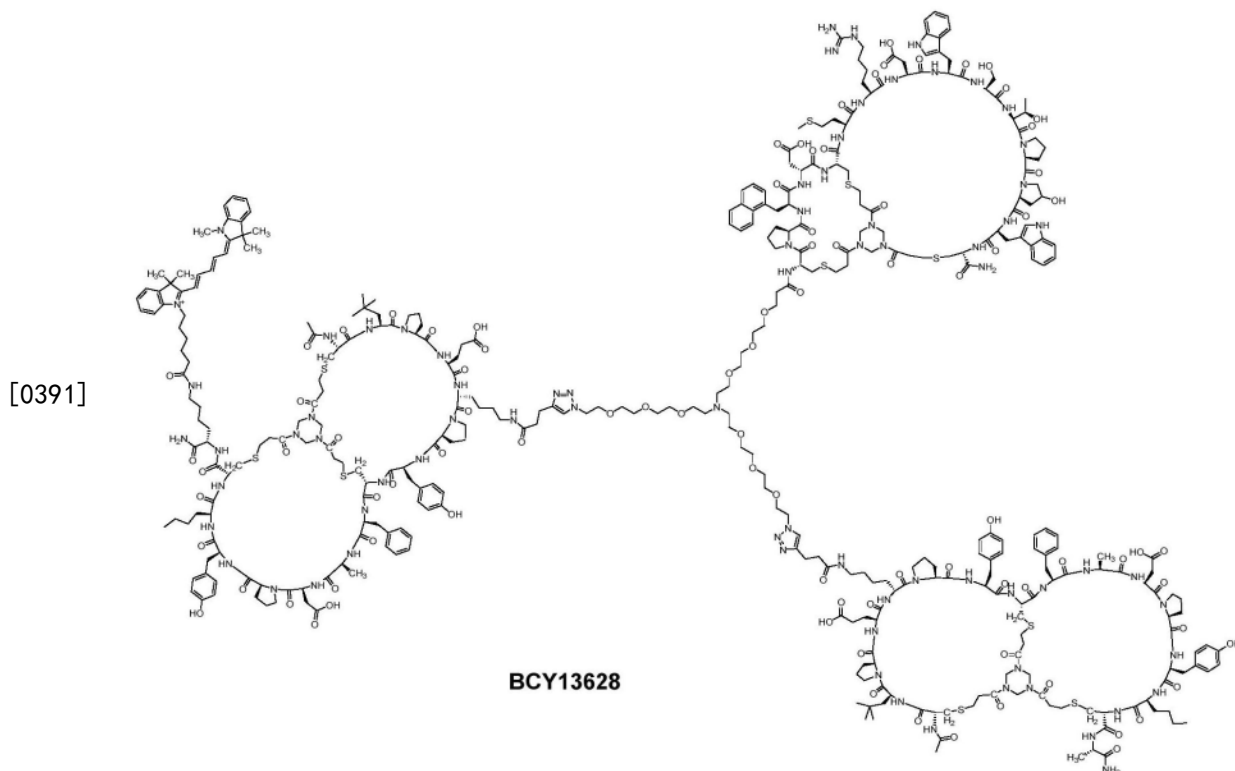


[0388]

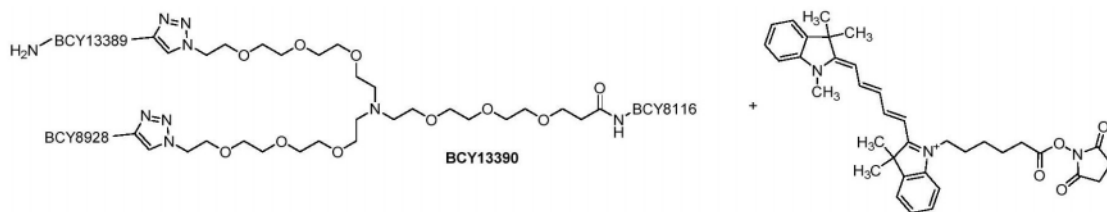


[0389] 将BCY13390 (15.0mg, 2.06 $\mu$ mol, 1.0eq) 和Alexa fluor® 488NHS酯 (2.5mg, 4.12 $\mu$ mol, 2.0eq) 的混合物溶解于DMF (0.5mL) 中。然后滴加DIEA (2.6mg, 20.63 $\mu$ mol, 3.6 $\mu$ L, 10eq)。在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物1小时。LC-MS显示保留了BCY13390, 并检测到一个具有所需m/z的主峰。将另外的Alexa fluor® 488NHS酯 (2.0mg, 3.09 $\mu$ mol, 1.5eq) 加入反应混合物中, 在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物另外1小时。HPLC显示BCY13390完全消耗。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BCY13583 (5mg, 0.61 $\mu$ mol, 29%产率, 95%纯度)。计算MW: 7787.9, 观测m/z: 1948.8 ( $[M+4H+H_2O]^{4+}$ ), 1558.6 ( $[M+5H+H_2O]^{5+}$ ), 1299.1 ( $[M+7H+H_2O]^{7+}$ )。

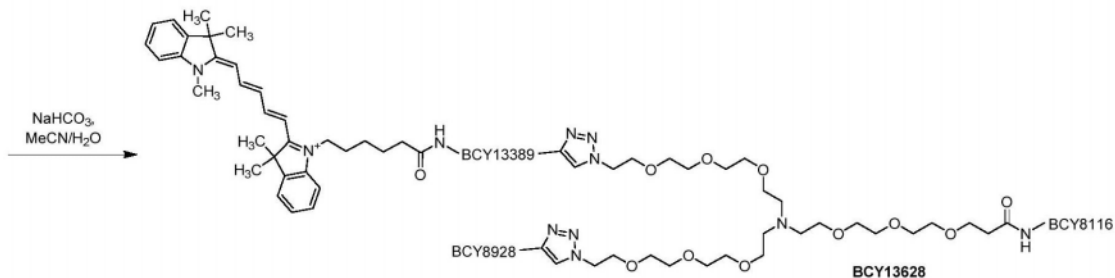
[0390] BCY13628



[0392] 制备BCY13628的程序

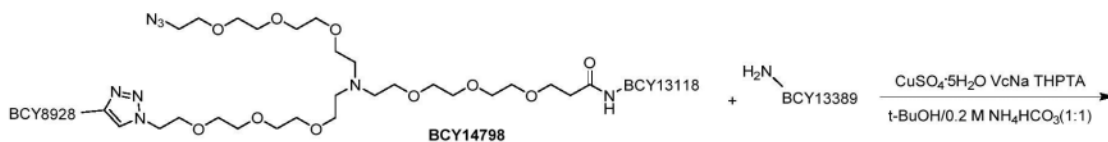


[0393]

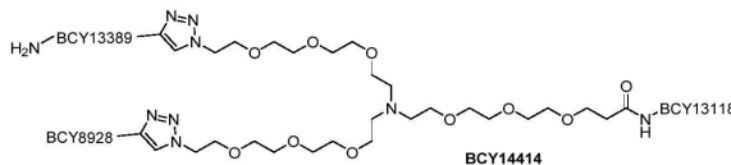


[0394] 将BCY13390 (5.6mg, 0.77 $\mu$ mol, 1.0eq) 和青色素5NHS酯 (0.5mg, 0.85 $\mu$ mol, 1.1eq) 的混合物溶解于MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1, 2mL) 中。通过滴加1.0M NaHCO<sub>3</sub>将该溶液的pH调节至8。在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物0.5小时。LC-MS显示BCY13390完全消耗并检测到一个具有所需m/z的主峰。过滤并减压浓缩反应混合物,以得到残余物。通过制备型HPLC纯化粗产物,获得蓝色固体状的BCY13628 (2.9mg, 0.36 $\mu$ mol, 46%产率, 95%纯度)。计算MW: 7736.06, 观测m/z: 1289.9 ([M+6H]<sup>6+</sup>), 1105.5 ([M+7H]<sup>7+</sup>)。

[0395] 制备BCY14414的程序



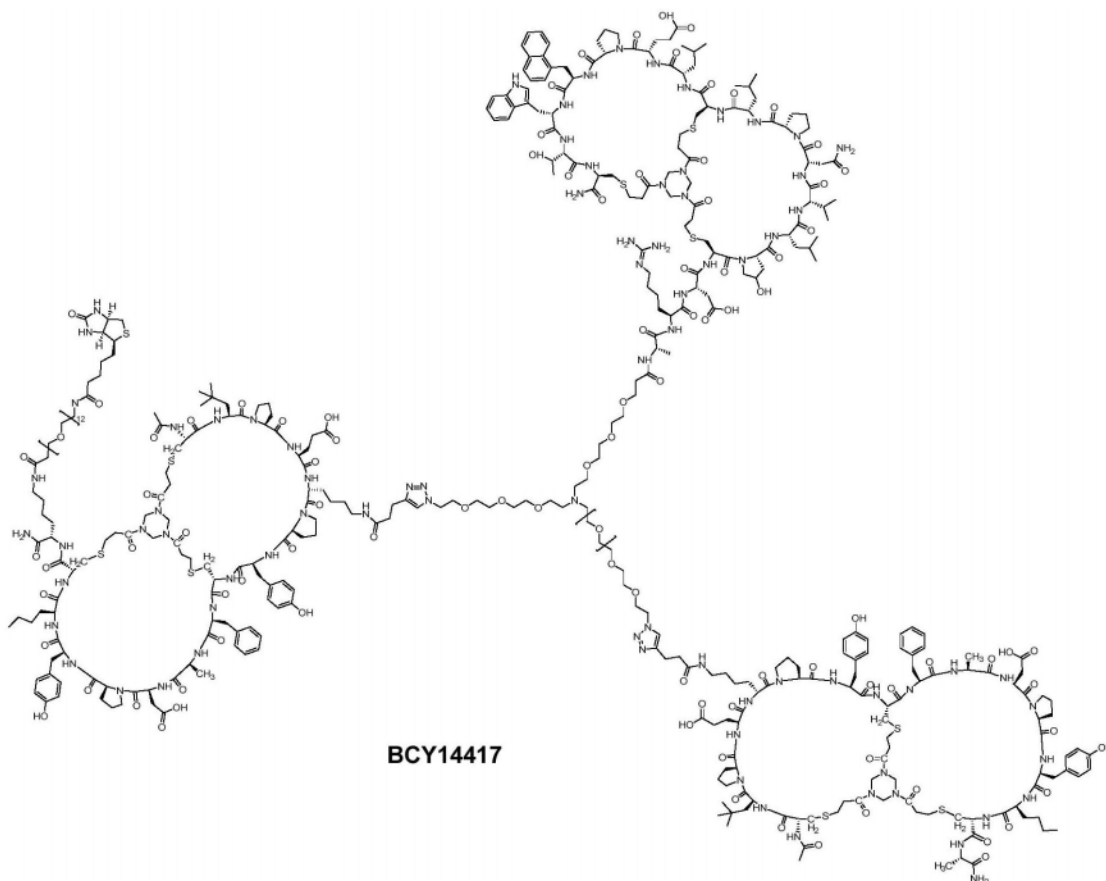
[0396]



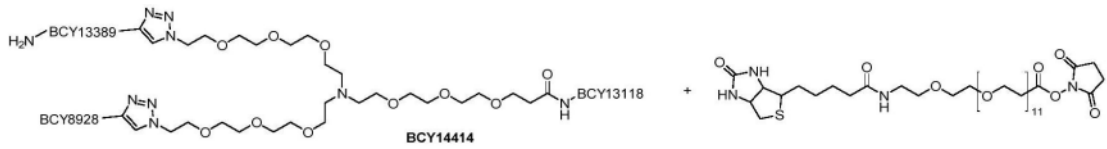
[0397] 将BCY14798 (21.0mg, 4.02 $\mu$ mol, 1.0eq)、BCY13389 (10.0mg, 4.42 $\mu$ mol, 1.1eq) 和 THPTA (1.8mg, 4.02 $\mu$ mol, 1.0eq) 的混合物溶解于t-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1:1, 0.5mL, 预脱气并用N<sub>2</sub>吹扫) 中, 然后在N<sub>2</sub>下加入CuSO<sub>4</sub> (0.4M, 5.0 $\mu$ L, 0.5eq) 和抗坏血酸钠 (2.8mg, 16.06 $\mu$ mol, 4.0eq)。通过滴加0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (在1:1t-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>中) 将该溶液的pH调节至7.5, 溶液变为浅黄色。在N<sub>2</sub>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 $\mu$ mol, 59.73%产率, 90.9%纯度)。计算MW: 7503.74, 观测m/z: 1251.5 ([M+5H]<sup>5+</sup>), 1072.9 ([M+7H]<sup>7+</sup>)。

[0398] BCY14417

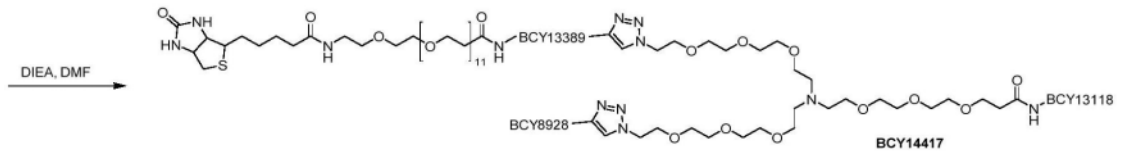
[0399]



[0400] 制备BCY14417的程序



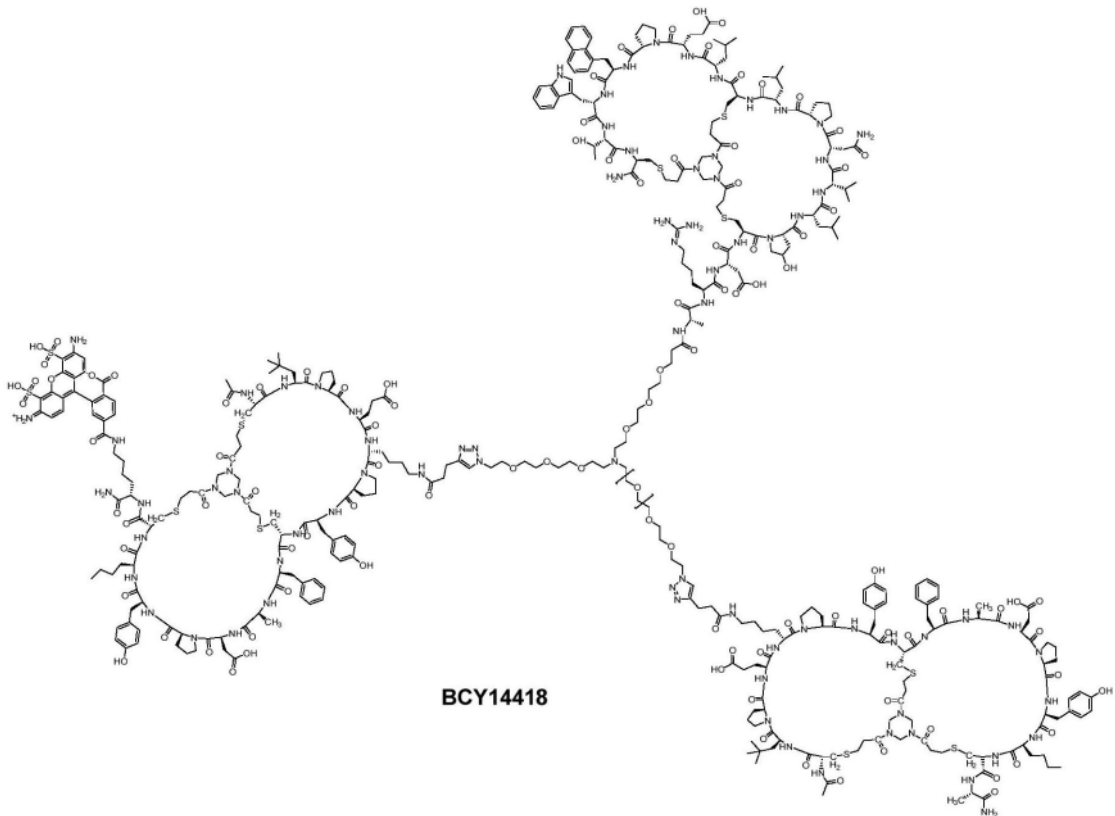
[0401]

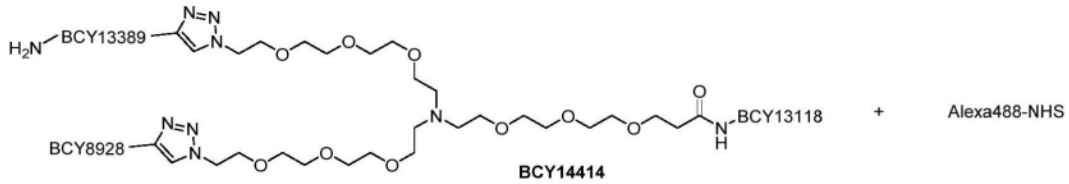


[0402] 将BCY14414 (13.0mg, 1.73 $\mu$ mol, 1.0eq) 和生物素-PEG12-NHS酯 (CAS365441-71-0, 4.2mg, 4.50 $\mu$ mol, 2.6eq) 的混合物溶解于DMF (0.5mL) 中。通过滴加DIEA将该溶液的pH调节至8。在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物0.5小时。LC-MS显示BCY14414完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z的主峰。过滤并减压浓缩反应混合物, 以得到残余物。通过制备型HPLC纯化粗产物, 获得白色固体状的BCY14417 (9.0mg, 1.07 $\mu$ mol, 80.49%产率, 90.8%纯度)。计算MW: 8329.74, 观测m/z: 1389.6 ([M+6H]<sup>6+</sup>), 1191.9 ([M+7H]<sup>7+</sup>)。

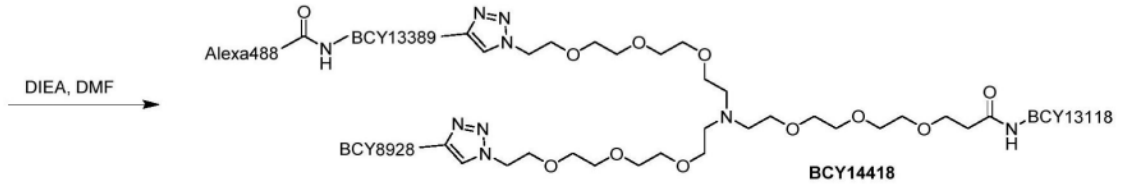
[0403] BCY14418

[0404]

[0405] 制备BCY14418的程序



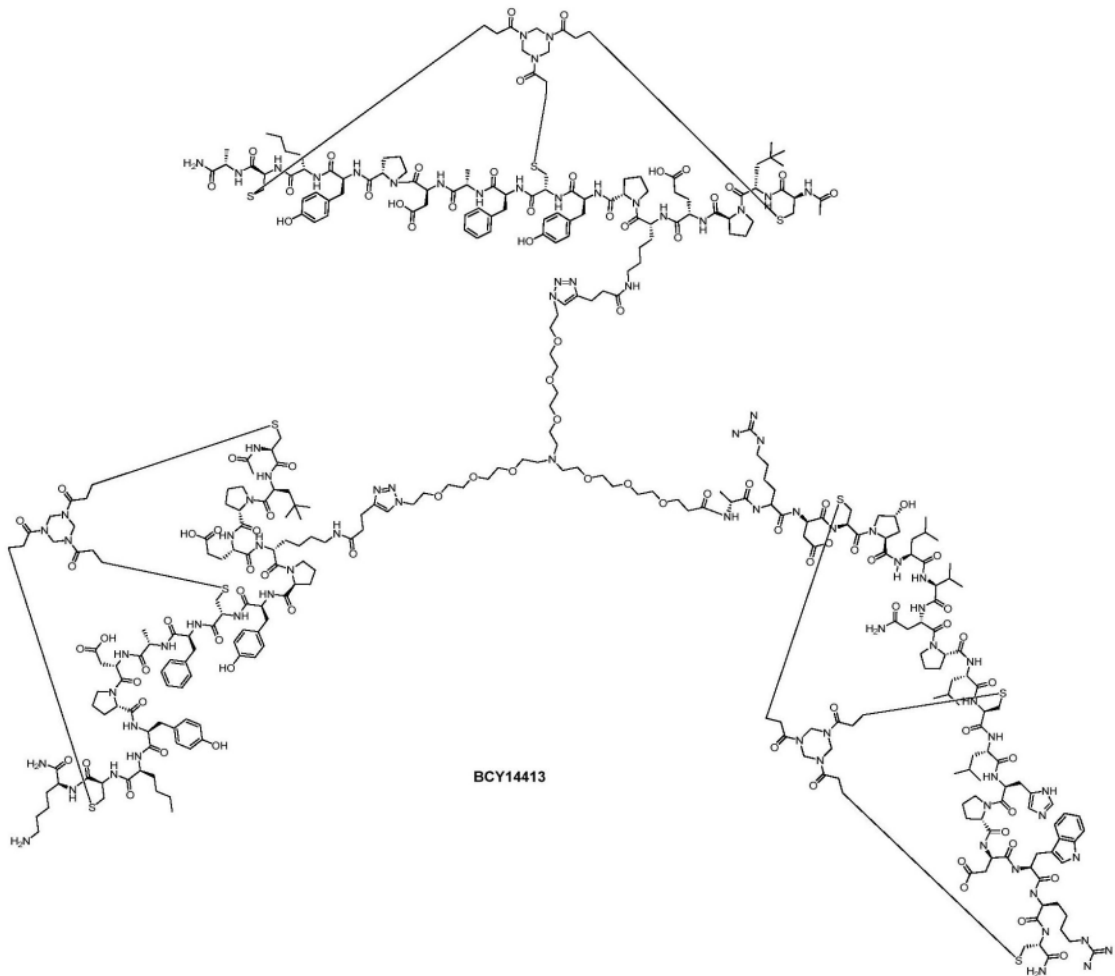
[0406]

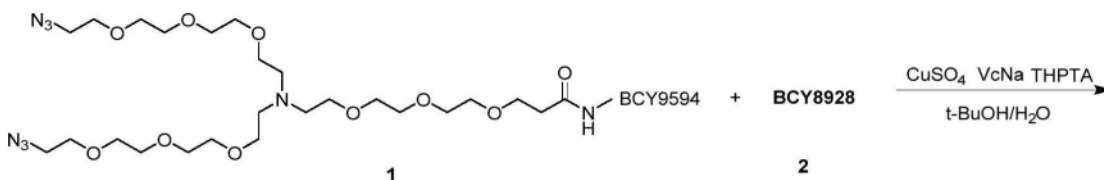


[0407] 将BCY14414 (5.6mg, 0.75 $\mu$ mol, 1.0eq) 和Alexa fluor® 488 (0.9mg, 1.49 $\mu$ mol, 2.0eq) 的混合物溶解于DMF (0.3mL) 中。然后通过滴加DIEA将该溶液的pH调节至8。在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物1.0小时。LC-MS显示BCY14414完全消耗,并检测到一个具有所需m/z的主峰。过滤并减压浓缩反应混合物,以得到残余物。通过制备型HPLC纯化粗产物,获得红色固体状的BCY14418 (2.3mg, 0.25 $\mu$ mol, 32.89%产率, 85.6%纯度)。计算MW: 8020.19, 观测m/z: 1337.2 ( $[M+6H]^{6+}$ )。

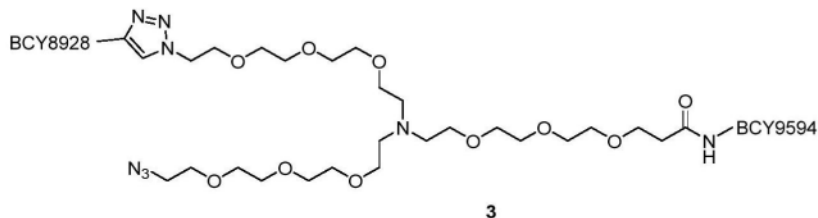
[0408] BCY14413

[0409]

[0410] 制备BCY9594-BP-23825-BCY8928的程序

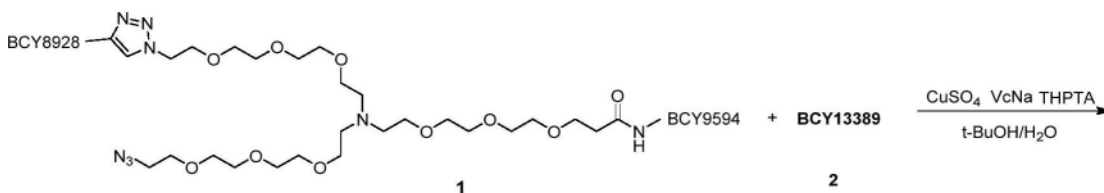


[0411]

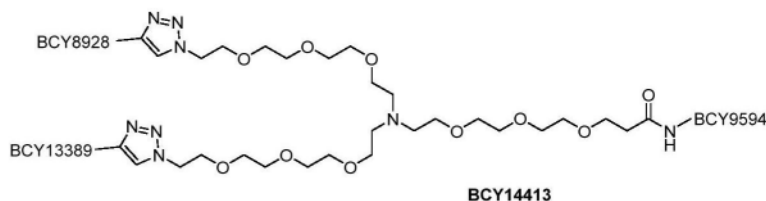


[0412] 将化合物1 (50.0mg, 16.6 $\mu$ mol, 1.0eq.)、化合物2 (29.5mg, 13.3 $\mu$ mol, 0.8eq.) 和 THPTA (36.1mg, 83.1 $\mu$ mol, 5.0eq.) 的混合物溶解于t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 8mL, 脱气并用N<sub>2</sub>吹扫) 中, 然后在N<sub>2</sub>下加入CuSO<sub>4</sub>水溶液 (0.4M, 20.8 $\mu$ L, 0.5eq.) 和VcNa (65.9mg, 332.6 $\mu$ mol, 20.0eq.)。通过滴加0.5mL的0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (在1:1 t-BuOH/H<sub>2</sub>O中) 将该溶液的pH调节至7.5, 溶液变为浅黄色。然后在N<sub>2</sub>气氛下、在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物24小时。平行设置两批该反应。LC-MS显示保留了化合物1和少量的化合物2, 并检测到了所需的m/z。过滤反应混合物以除去不溶性残余物。通过制备型HPLC纯化粗产物, 获得白色固体状的化合物3 (31.5mg, 5.44 $\mu$ mol, 16.36%产率, 90.22%纯度)。计算MW: 5224.07, 观测m/z: 1306.9 ([M+4H]<sup>4+</sup>), 871.6 ([M+6H]<sup>6+</sup>)。

[0413] 制备BCY14413的程序



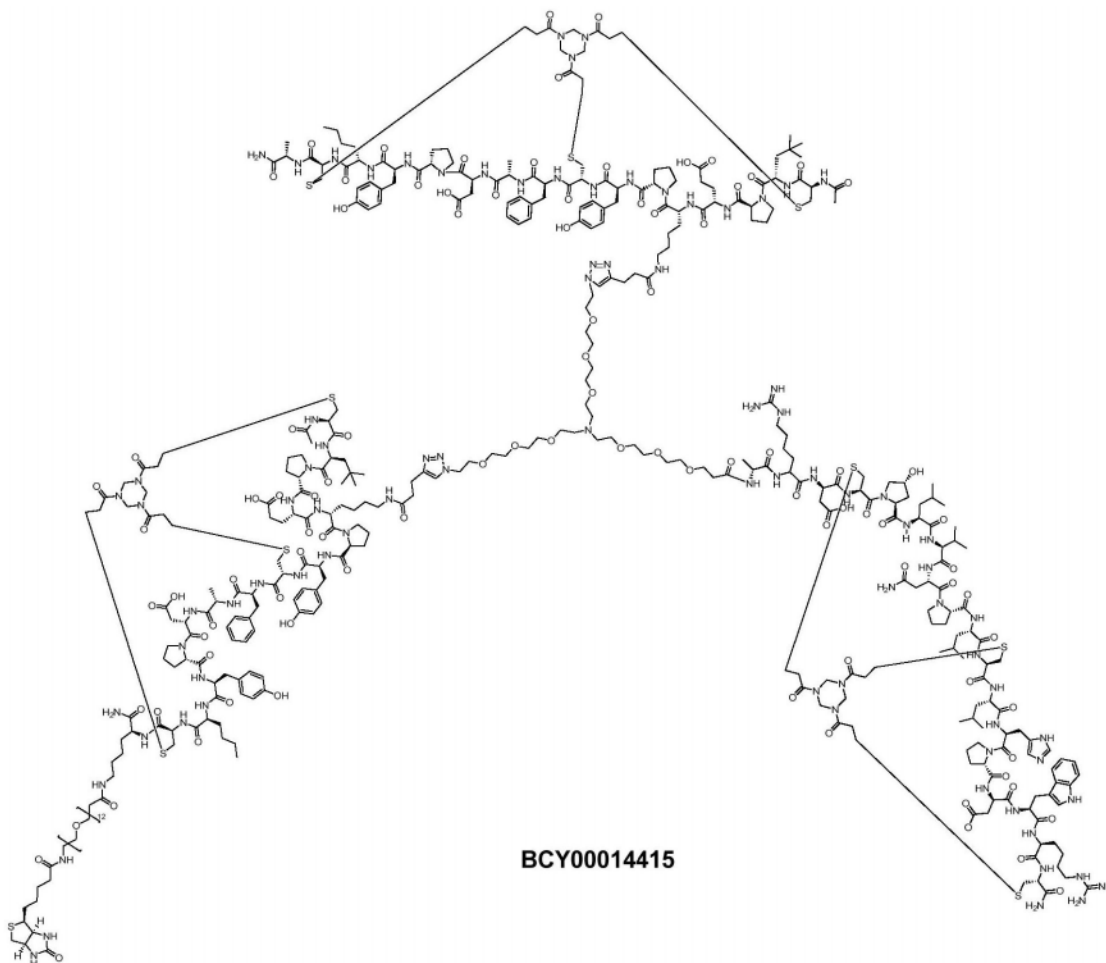
[0414]



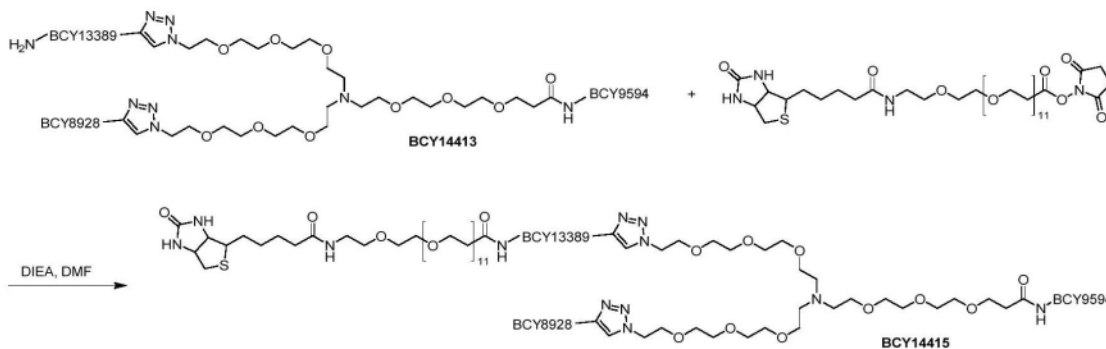
[0415] 将化合物1 (31.5mg, 6.03 $\mu$ mol, 1.0eq.)、化合物2 (14.4mg, 6.33 $\mu$ mol, 1.05eq.) 和 THPTA (2.62mg, 6.03 $\mu$ mol, 1.0eq.) 的混合物溶解于t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 1.0mL, 脱气并用N<sub>2</sub>吹扫) 中, 然后在N<sub>2</sub>下加入CuSO<sub>4</sub>水溶液 (0.4M, 15.07 $\mu$ L, 1.0eq.) 和VcNa (4.78mg, 24.12 $\mu$ mol, 4.0eq.)。通过滴加0.5mL的0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (在1:1 t-BuOH/H<sub>2</sub>O中) 将该溶液的pH调节至7.5, 溶液变为浅黄色。然后在N<sub>2</sub>气氛下、在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物3小时。LC-MS显示保留了少量的化合物2, 化合物1完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z的主峰。过滤反应混合物以除去不溶性残余物。通过制备型HPLC纯化粗产物, 获得白色固体状的BCY14413 (22.5mg, 3.00 $\mu$ mol, 43.10%产率, 86.63%纯度)。计算MW: 7498.75, 观测m/z: 938.3 ([M+8H]<sup>8+</sup>), 1072.2 ([M+7H]<sup>7+</sup>), 1250.9 ([M+6H]<sup>6+</sup>), 1500.8 ([M+5H]<sup>5+</sup>)。

[0416] BCY14415

[0417]



[0418] 制备BCY14415的程序

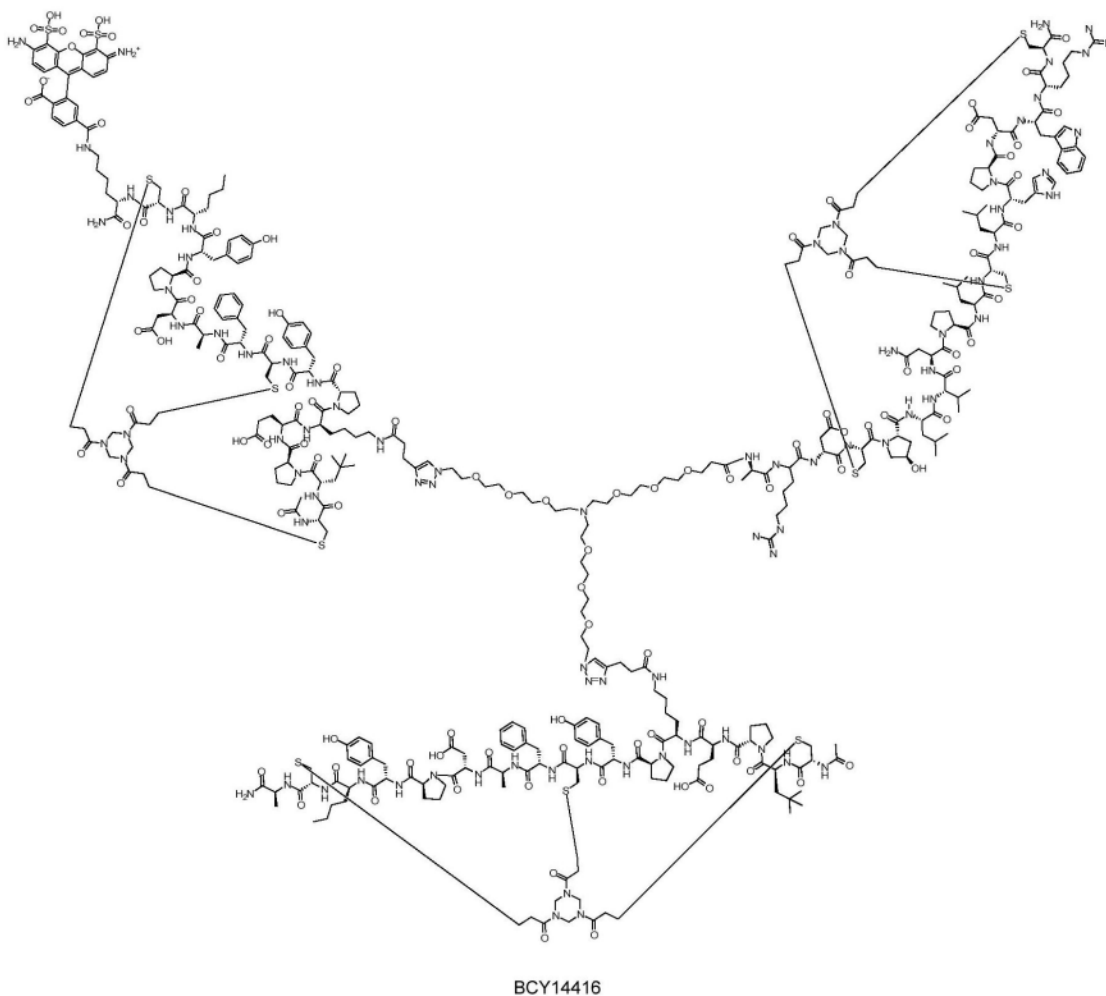


[0419]

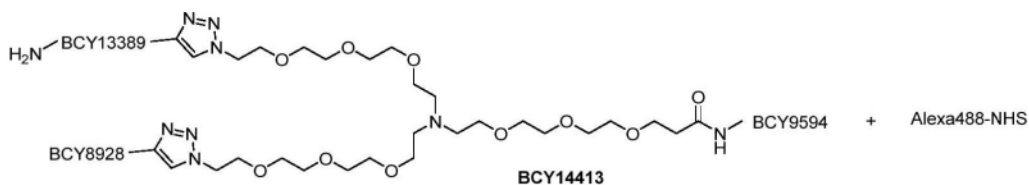
[0420] 将BCY14413 (10.0mg, 1.33 $\mu$ mol, 1.0eq.) 和生物素-Peg12-NHS (2.6mg, 2.80 $\mu$ mol, 2.6eq.) 的混合物溶解于DMF (0.3mL) 中。通过滴加DIEA将该溶液的pH调节至8。在25 $^{\circ}$ C搅拌反应混合物0.5小时。LC-MS显示BCY14413完全消耗, 并检测到一个具有所需m/z的主峰。过滤并减压浓缩反应混合物, 以得到残余物。通过制备型HPLC纯化粗产物, 获得白色固体状的BCY14415 (10mg, 1.07 $\mu$ mol, 80.49%产率, 90.2%纯度)。计算MW: 8324.73, 观测m/z: 1388.4 ( $[M+6H]^{6+}$ ), 1190.2 ( $[M+7H]^{7+}$ ), 1041.5 ( $[M+8H]^{8+}$ ), 926.0 ( $[M+9H]^{9+}$ )

[0421] BCY14416

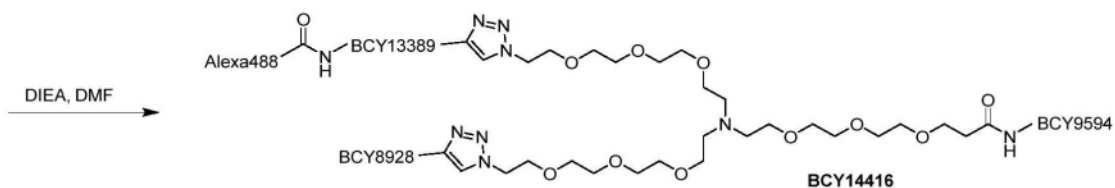
[0422]



[0423] 制备BCY14416的程序



[0424]



[0425] 将化合物BCY14413 (5.1mg, 0.68 $\mu$ mol, 1.0eq.) 和Alexa Fluor 488NHS酯 (0.5mg, 8.16e-1 $\mu$ mol, 1.2eq.) 的混合物溶解于DMF (0.3mL) 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显示保留了一些BCY14413, 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, 将主峰分为两个不同纯度的级分收集, 获得红色固体状的BCY14416 (0.7mg, 0.065 $\mu$ mol, 9.84%产率, 96.4%纯度) 和 (0.5mg, 0.047 $\mu$ mol, 7.03%产率, 91.2%纯度)。计算MW: 8015, 观测m/z: 1336.5 ( $[M+7H]^{7+}$ )。

[0426] 未修饰的多聚结合复合物的制备

[0427] 完全如PCT/GB2019/050485中所述,制备了以下未修饰的多聚结合复合物:

[0428] 表4:未修饰的多聚结合复合物

多聚体化合物编号	对应单体	单体数量	中央铰链部分	间隔子分子	连接点
BCY7839	BCY7744	3	B	$S_A:n=10$	D-Lys (PYA) <sub>4</sub>
BCY7842	BCY7744	4	A	$S_A:n=23$	D-Lys (PYA) <sub>4</sub>
BCY8945	BCY8927	4	A	$S_A:n=23$	Lys (PYA) <sub>3</sub>
BCY11451	BCY11506	4	A	$S_A:n=23$	L-Lys (PYA) <sub>4</sub>

[0430] 如PCT/GB2020/051831的实施例2中所述,制备了BCY12491。

[0431] 生物数据

[0432] 1. CD137报告基因细胞活性冲洗测定

[0433] 经工程改造以过表达CD137、并在NF- $\kappa$ B启动子下表达荧光素酶基因的Jurkat细胞购自Promega。在37°C、在含有1%FBS的RPMI1640培养基中将报告基因细胞与10nM的CD137激动剂孵育指定的时间。在30、60或120分钟后,在过量培养基中洗涤细胞并重悬于75 $\mu$ L新鲜培养基中,或不进行洗涤(无冲洗)。所有冲洗条件重复两次进行。然后继续孵育细胞总共6小时(根据暴露时间分别再孵育5.5、5或4小时)。孵育后,将75 $\mu$ L Bio-Glo试剂(Promega)加入每孔中,并允许在室温下平衡10分钟。在Clariostar酶标仪(BMG LabTech)上读取发光值。通过将发光值信号除以背景孔(未添加激动剂的报告基因细胞)来计算诱导倍数。在Prism中对数据绘图,并显示为平均值或带有标准误差条的重复数据的条形图。

[0434] 图2所示的数据表明,荧光CD137多聚体(BCY9931和BCY9932)在冲洗后保持CD137激动活性,这与以高活力结合三聚CD137受体复合物一致。图1中的数据显示,荧光CD137多聚体BCY9931和BCY9932在CD137报告基因细胞测定中显示出剂量响应性诱导NF $\kappa$ B-荧光素酶的活性。显示了它们与CD137配体的活性相比较。

[0435] 2. 荧光多聚体人免疫细胞直接结合测定

[0436] 根据标准方案,从两个供体的血沉棕黄层中分离出人外周血单个核细胞(PBMC)。PBMC用于下一步,或者可选地,然后根据制造商的方案(Miltenyi Biotec)使用MACS CD8+T细胞分离试剂盒(阴性珠子选择)从PBMC中分离CD8+T细胞。然后在包被CD3抗体的组织培养瓶中、在R10培养基(RPMI1640+10%FBS+1x青霉素-链霉素)中激活PBMC或纯化的CD8+T细胞24小时。可选地,在含有1 $\mu$ g/ml可溶性CD3抗体(OKT3)的R10培养基中孵育细胞24小时。然后将细胞转移到包被CD3的96孔平底板中,并在R10培养基中、在荧光CD137多聚体或荧光EphA2双环肽单体(BCY0215,该单体用作阴性对照)存在下、在不同浓度下、在37°C孵育细胞1小时。1小时后,将细胞转移到V形底的板上,洗涤并染色,用于FACS分析。简要地,细胞在1x活/死BV510中染色15分钟,洗涤,然后用以下抗体进行表面染色:CD8-BV785(或CD3-BV605)和CD137-PECy5(1:100稀释)。然后洗涤细胞并在2%多聚甲醛(PFA)中固定。在BD FACSCelesta上运行细胞,并在FlowJo中分析FCS文件。以单细胞/活细胞/淋巴细胞/CD8+(或CD3+)/CD137+或CD137-对细胞设门。显示了CD137+群体的FITC几何平均值。

[0437] 图3A所示的数据显示,荧光CD137多聚体(BCY7340、BCY9931和BCY9932)以剂量响应方式与人CD137+T细胞结合,而荧光EphA2单体(BCY0215)不结合。荧光CD137二聚体(BCY7340)显示出略低于荧光三聚体(BCY9932)和四聚体(BCY9931)的结合力。图3B中的数

据表明荧光CD137多聚体 (BCY12239) 剂量响应性结合人CD137+T细胞。荧光CD137多聚体的非结合版本 (BCY11856) 不结合。

#### [0438] 3. 荧光多聚体食蟹猴免疫细胞直接结合测定

[0439] 冷冻保存的PBMC购自Worldwide Primates,并根据标准方案解冻。然后根据制造商的方案 (Miltenyi Biotec) 使用MACS CD8+T细胞分离试剂盒 (阴性珠子选择) 从PBMC中分离CD8+T细胞。然后在包被CD3抗体 (1 $\mu$ g/ml) 的96孔板中、在R10培养基 (RPMI1640+10%FBS+1x青霉素-链霉素) 中激活纯化的CD8+T细胞48小时。然后在R10培养基中、在荧光CD137多聚体或荧光EphA2双环肽单体 (BCY0215, 该单体用作阴性对照) 存在下、在不同浓度下、在37 $^{\circ}$ C孵育细胞1小时。1小时后,将细胞转移到V形底的板上,洗涤并染色,用于FACS分析。简要地,细胞在1x活/死BV510中染色15分钟,洗涤,然后用以下抗体进行表面染色:CD8-BV785和CD137-PECy5 (在2%FBS/PBS中1:100稀释)。然后洗涤细胞并在2%多聚甲醛 (PFA) 中固定。在BD FACSCelesta上运行细胞,并在FlowJo中分析FCS文件。以单细胞/活细胞/淋巴细胞/CD8+/CD137+或CD137-对细胞设门。显示了CD137+群体的FITC几何平均值。

[0440] 图4所示的数据显示,荧光CD137多聚体 (BCY7340、BCY9931和BCY9932) 以剂量响应方式与食蟹猴CD137+T细胞结合,而荧光EphA2单体 (BCY0215) 不结合。荧光CD137二聚体 (BCY7340) 显示出低于荧光三聚体 (BCY9932) 和四聚体 (BCY9931) 的结合力。

#### [0441] 4. 使用未修饰的多聚双环肽BCY8945和BCY7842进行荧光多聚体人T细胞竞争测定

[0442] 根据标准方案,从两个供体的新鲜的血沉棕黄层中分离出人PBMC。然后根据制造商的方案 (Miltenyi Biotec),通过阴性磁珠选择、使用MACS CD8+T细胞分离试剂盒 (阴性珠子选择) 从PBMC中分离CD8+T细胞。然后在包被CD3抗体 (1 $\mu$ g/ml) 的板中、在R10培养基 (RPMI1640+10%FBS+1x青霉素-链霉素) 中刺激纯化的CD8+T细胞72小时。然后在室温、在2%FBS中将细胞与一系列浓度的未标记的CD137多聚体孵育30分钟。然后洗涤并染色细胞,用于FACS分析。简要地,细胞在1x活/死BV510中染色15分钟,洗涤,然后用包含饱和浓度 (10nM) BCY7340的一抗混合物 (CD8-BV785、CD3-BV605和CD137-PECy5) 进行表面染色。细胞在室温孵育30分钟,洗涤,并在2%PFA中固定。在BD FACSCelesta上运行细胞,并在FlowJo中分析FCS文件。在单细胞/活细胞/淋巴细胞/CD8+ (或CD3+) /CD137+或CD137-上对细胞设门。显示了CD137+群体的Alexa Fluor 488几何平均值。

[0443] 在图5中,荧光CD137多聚体 (BCY7340) 用作标记试剂来测量人T细胞上游离/未结合的CD137受体的水平。随着滴定未标记的CD137多聚体 (BCY7839、BCY7842和BCY8945),未结合的CD137受体 (和BCY7340结合) 出现剂量响应性降低。BCY11451是非结合CD137多聚体,因此CD137受体保持未结合,荧光CD137多聚体结合保持高水平。

#### [0444] 5. BCY15416直接结合CD4和CD8阳性T细胞

[0445] 为了评估与AlexaFluor<sup>®</sup> 488偶联的CD137二聚体Bicycle<sup>®</sup>肽 (本文称为BCY15416) 的亲合力,实施了利用CD3刺激的原代外周血单个核细胞 (PBMC) 的结合测定。

[0446] 在实验当天,通过向RPMI-1640 (Gibco<sup>™</sup> 11875-093;含L-谷氨酰胺) 补充10%热灭活胎牛血清 (FBS; Corning<sup>®</sup> 35-011-CV)、10mM HEPES (Gibco<sup>™</sup> 15-630-080) 和1%青霉素链霉素 (Corning<sup>™</sup> 30-002-CI) 来制备培养基,本文称为工作培养基。在水浴中快速解冻先前从全血中分离的人外周血单个核细胞 (PBMC),并在10mL预加温的工作培养基中以500rpm、5分钟洗涤一次。然后在工作培养基中以3x10<sup>6</sup>个细胞/mL的浓度重悬PBMC沉淀。随后,将100 $\mu$

L细胞悬液置于平底组织培养包被96孔板 (Greiner CellStar® 655180) 中。将抗人CD3 (200ng/mL; BioLegend® 317347; 克隆OKT3) 加入细胞板中 (100μL/孔), 终浓度为100ng/mL。而对于未刺激的对照, 加入100μL工作培养基。在37°C、5%CO<sub>2</sub>下孵育细胞过夜 (12-24小时)。

[0447] 过夜孵育后, 将在工作培养基中稀释的BCY15416加入PBMC细胞板中, 建议起始浓度300nM, 滴定为1/4系列稀释液, 以进行12个点的系列稀释。然后在37°C、5%CO<sub>2</sub>下孵育板1小时。孵育后, 将板以500rpm离心5分钟并弃去上清液。然后在200μL 1X磷酸盐缓冲液 (PBS; Gibco™ 10-010-023) 中, 以500rpm、5分钟洗涤样品一次。在200μL PBS中重悬细胞并转移到96孔V底聚丙烯板 (Greiner Bio-One 651201)。然后500rpm离心样品5分钟, 弃去上清液。

[0448] 流式细胞仪样品的制备: 制备Zombie Violet™可固定活力染料 (BioLegend® 423113) 的1:1000的PBS稀释液, 向每个孔中加入100μL活性染料, 并在4°C避光孵育30分钟。随后, 用100μL PBS以500rpm、5分钟洗涤孔, 弃去上清液。接下来, 通过在25μL染色缓冲液 (1X PBS补充2%FBS) 中稀释1.5μL FcX来制备人TruStain FcX™封闭液 (BioLegend® 422302)。在室温 (RT) 避光孵育Fc封闭液 (25μL/孔) 10分钟。通过每100μL染色缓冲液稀释1.5μL以下抗体来制备抗体预混液: Brilliant Violet 605™抗人CD4 (BD Horizon™ 563875; 克隆SK3)、Brilliant Violet 785™抗人CD8a (BioLegend® 301046; 克隆RPA-T8) 和PE/青色素5抗人CD137 (BioLegend® 309808; 克隆4B4-1)。在预混液 (100μL) 中重悬细胞, 并在4°C避光孵育30分钟。随后, 用100μL染色缓冲液以500rpm、5分钟洗涤细胞3次并弃去上清液。将重悬于200μL染色缓冲液中的细胞在4°C避光保存, 直到通过BD FACSCelesta™流式细胞仪读数, 并在FlowJo™中分析FCS文件。

[0449] 以淋巴细胞→单个 (singlet) →活→CD4+或CD8+→CD137+/-对细胞设门, 并由如下所示的CD137+和CD137-群体计算Alexa Fluor® 488 (与BCY15416偶联) 的几何平均值。图6显示了在三个人类PBMC供体中, BCY15416以剂量依赖性方式排他地与CD137+CD4+T细胞和CD137+CD8+T细胞结合。每个供体的计算结合亲和力 (kd, app) 示于表5。阐明了BCY15416对CD137+CD4+和CD137+CD8+群体的结合亲和力在亚纳摩尔范围内。然而, 在CD4+和CD8+的CD137-群体中, 无法计算结合亲和力。

[0450] 表5: 使用所有供体的CD4+CD137+和CD8+CD137+群体中log (激动剂) 对响应 (四参数可变斜率) 计算CD137二聚体 (BCY15416) 的kd, app值

供体	结合亲和力 kd,app (nM)			
	CD4+ CD137+	CD4+ CD137-	CD8+ CD137+	CD8+ CD137-
[0451] 214047	0.1445	n/a	0.1183	n/a
214026	0.8754	n/a	0.1143	n/a
217071	0.1303	n/a	0.1297	n/a

[0452] 图6A和6B表明BCY15416能够特异性结合CD137+CD4和CD8 T细胞, 但不结合CD137-CD4和CD8 T细胞。因此, 它可以用作测量与BCY15416结合同一位点的其他CD137结合物的受体占有率的工具。

[0453] 6. 使用BCY15416作为探针测量BCY12491的受体占有率

[0454] 通过利用与Alexa Fluor® 488偶联的竞争性CD137二聚体Bicycle®肽(本文称为BCY15416或CD137二聚体),开发了一种受体占有率测定,以评估结合CD137的Bicycles®与免疫细胞群体上存在的受体的结合。

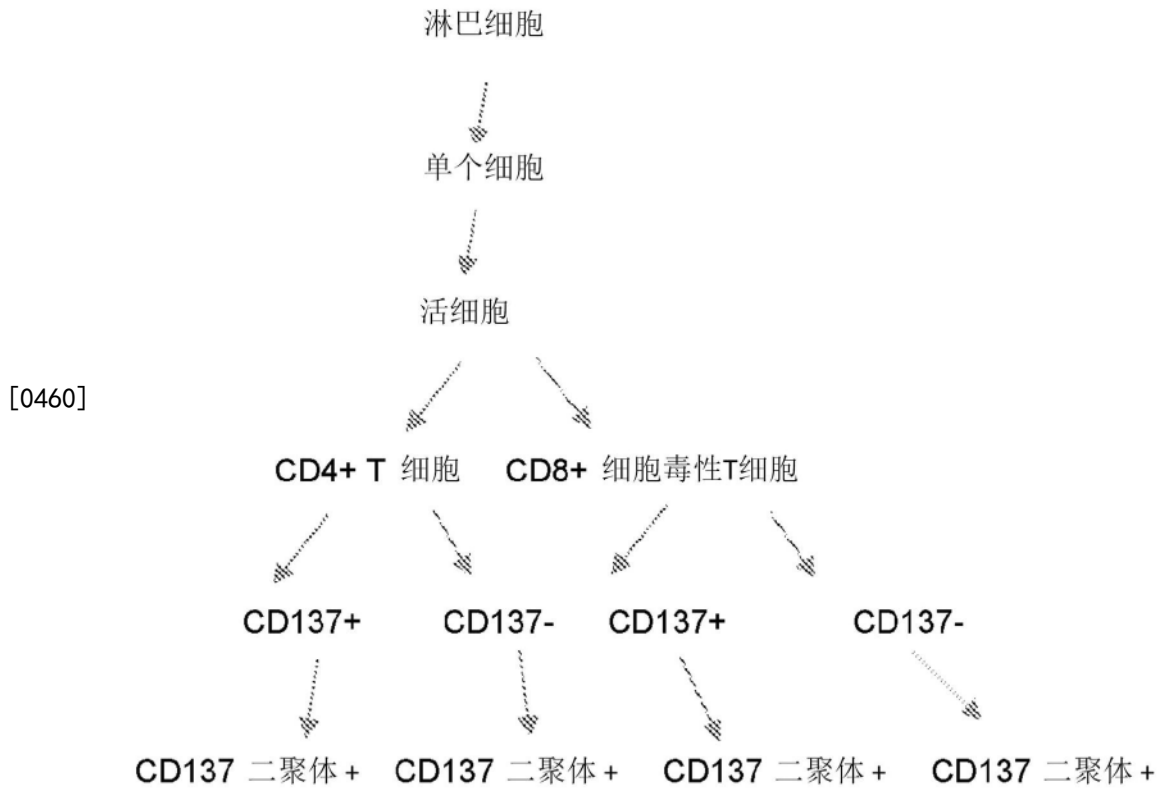
[0455] 在实验当天,通过向RPMI-1640(Gibco™ 11875-093;含L-谷氨酰胺)补充10%热灭活胎牛血清(FBS; Corning® 35-011-CV)、10mM HEPES(Gibco™ 15-630-080)和1%青霉素链霉素(Corning™ 30-002-CI)来制备培养基,本文称为工作培养基。在水浴中快速解冻先前从全血中分离的人外周血单个核细胞(PBMC),并在10mL预加温的工作培养基中500rpm、5分钟洗涤一次。然后在工作培养基中以 $3 \times 10^6$ 个细胞/mL的浓度重悬PBMC沉淀。随后,将100 $\mu$ L细胞悬液置于平底组织培养包被96孔板(Greiner CellStar® 655180)中。将抗人CD3(200ng/mL; BioLegend® 317347;克隆OKT3)加入细胞板中(100 $\mu$ L/孔),终浓度为100ng/mL。而对于未刺激的对照,加入100 $\mu$ L工作培养基。在37°C、5%CO<sub>2</sub>下孵育细胞过夜(12-24小时)。

[0456] 过夜孵育后,将在工作培养基中稀释的测试物加入PBMC细胞板中,建议起始浓度300nM,滴定为1/4系列稀释液,以进行12个点的系列稀释。然后在37°C、5%CO<sub>2</sub>下孵育板1小时。孵育后,将板以500rpm离心5分钟并弃去上清液。然后在200 $\mu$ L 1X磷酸盐缓冲液(PBS; Gibco™ 10-010-023)中,以500rpm、5分钟洗涤样品一次。在200 $\mu$ L PBS中重悬细胞并转移到96孔V底聚丙烯板(Greiner Bio-One 651201)。

[0457] 然后500rpm离心样品5分钟,弃去上清液。

[0458] 流式细胞仪样品的制备:制备Zombie Violet™可固定活力染料(BioLegend® 423113)的1:1000PBS稀释液,向每个孔中加入100 $\mu$ L活性染料,并在4°C避光孵育30分钟。随后,用100 $\mu$ L PBS以500rpm、5分钟洗涤孔,弃去上清液。接下来,通过在25 $\mu$ L染色缓冲液(1X PBS补充2%FBS)中稀释1.5 $\mu$ L FcX来制备人TruStain FcX™封闭液(BioLegend® 422302)。在室温(RT)避光孵育Fc封闭液(25 $\mu$ L/孔)10分钟。通过每100 $\mu$ L染色缓冲液稀释1.5 $\mu$ L以下抗体来制备抗体预混液:Brilliant Violet 605™抗人CD4(BD Horizon™ 563875;克隆SK3)、Brilliant Violet 785™抗人CD8a(BioLegend® 301046;克隆RPA-T8)和PE/青色素5抗人CD137(BioLegend® 309808;克隆4B4-1)。额外地,将终浓度1nM的BCY15416或CD137二聚体加入预混液中。在预混液(100 $\mu$ L)中重悬细胞,并在4°C避光孵育30分钟。随后,用100 $\mu$ L染色缓冲液以500rpm、5分钟洗涤细胞3次并弃去上清液。将重悬于200 $\mu$ L染色缓冲液中的细胞在4°C避光保存,直到通过BD FACSCelesta™流式细胞仪读数,并在FlowJo™中分析FCS文件。

[0459] 获得的流式数据为.fcs格式文件。每个.fcs文件表示96孔板上的一个独特样品或孔。使用软件FlowJo™分析流式细胞术数据。下面显示的流式分析表示了该测定中使用的小组的流式数据分析:



[0460]

[0461] 对来自总CD137 (PE CY5)+和总CD137 (PE CY5)-细胞亚群的CD137二聚体-AF488阳性(高)细胞,取其平均荧光强度(MFI)对BCY12491浓度作图。图7表明了BCY15416作为探针确定结合CD137的异串联物(如BCY12491)的受体占有率的能力。





Cys	Ile	Glu	Glu	Xaa	Gln	Tyr	Cys	Phe	Ala	Asp	Pro	Tyr	Xaa	Cys
1				5					10					15
<210>	6													
<211>	15													
<212>	PRT													
<213>	人工序列													
<220>														
<223>	合成肽													
<220>														
<221>	Xaa													
<222>	(2) .. (2)													
<223>	Xaa是tBuAla													
<220>														
<221>	Xaa													
<222>	(4) .. (4)													
<223>	Xaa是K (PYA)													
<220>														
<221>	Xaa													
<222>	(14) .. (14)													
<223>	Xaa是Nle													
<400>	6													
Cys	Xaa	Pro	Xaa	Ala	Pro	Tyr	Cys	Phe	Ala	Asp	Pro	Tyr	Xaa	Cys
1				5					10					15
<210>	7													
<211>	15													
<212>	PRT													
<213>	人工序列													
<220>														
<223>	合成肽													
<220>														
<221>	Xaa													
<222>	(2) .. (2)													
<223>	Xaa是tBuAla													
<220>														
<221>	Xaa													
<222>	(5) .. (5)													
<223>	Xaa是D-Lys (PYA)													
<220>														
<221>	Xaa													





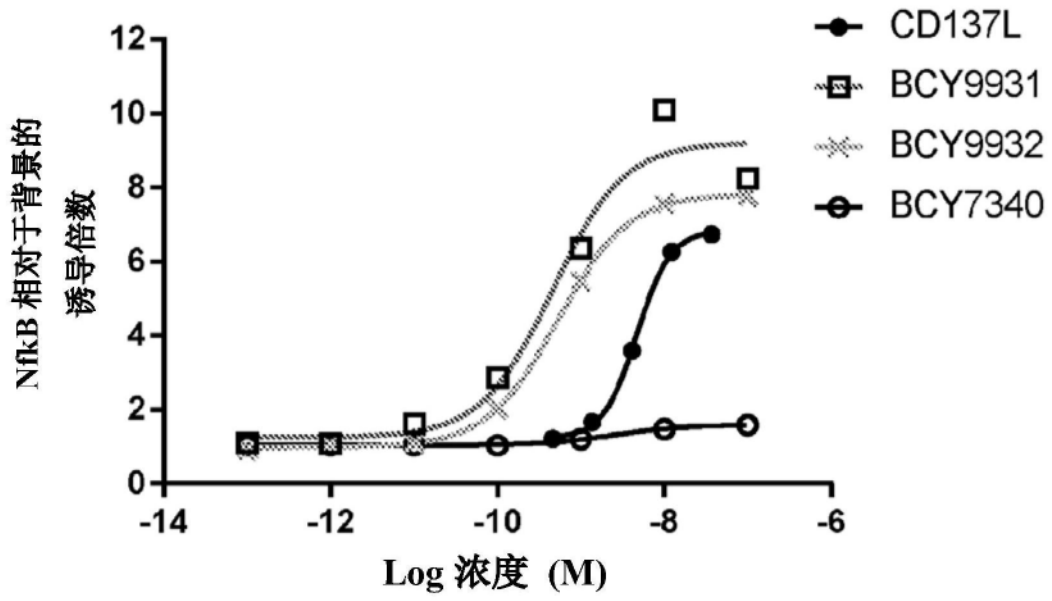


图1

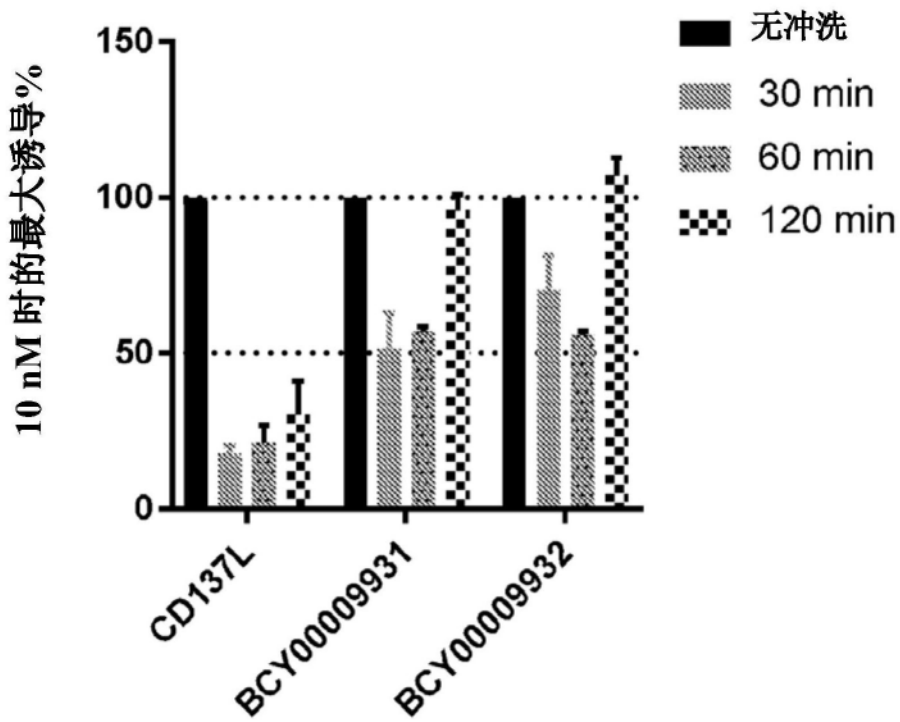


图2

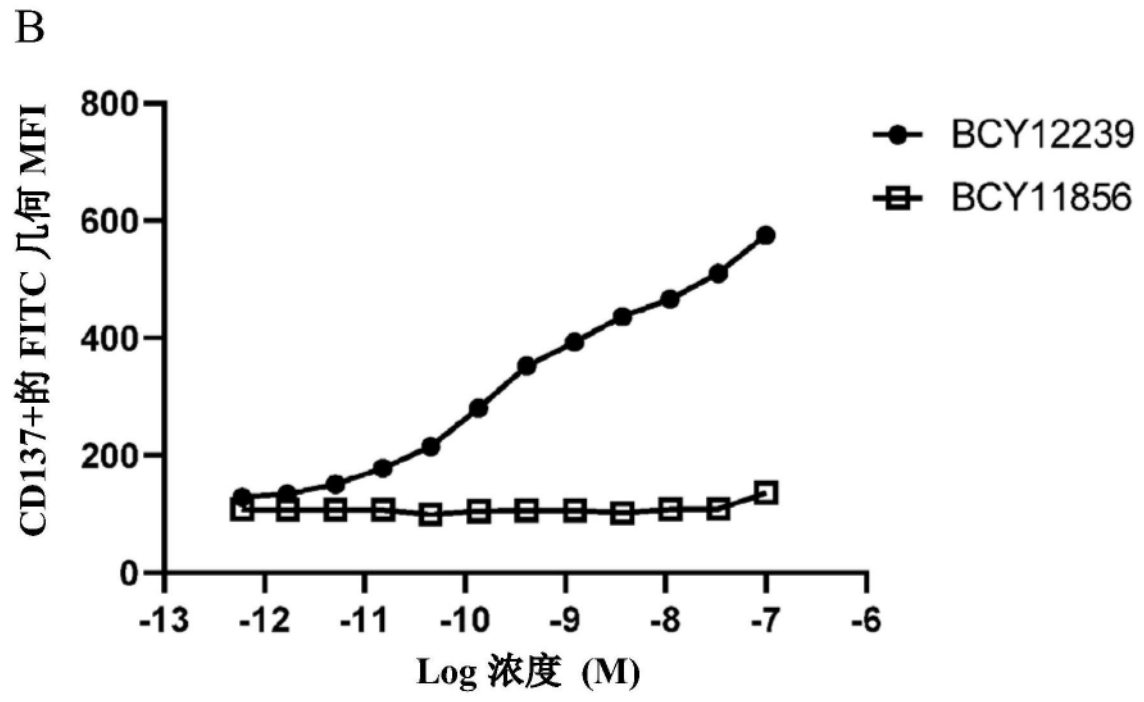
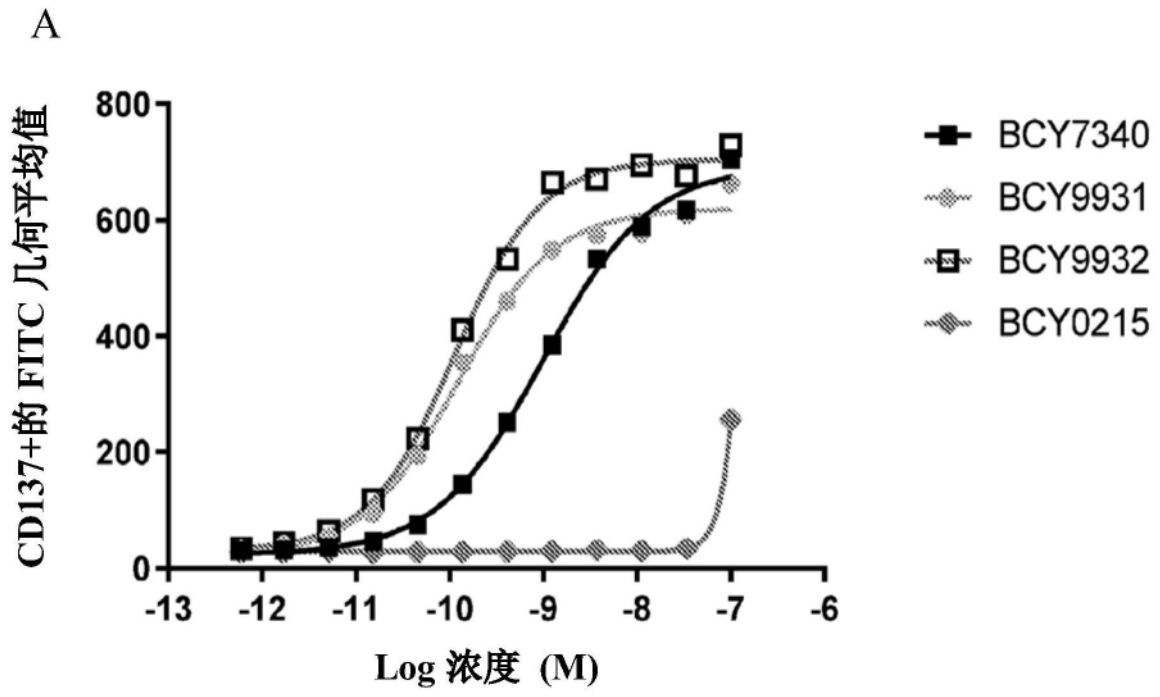


图3

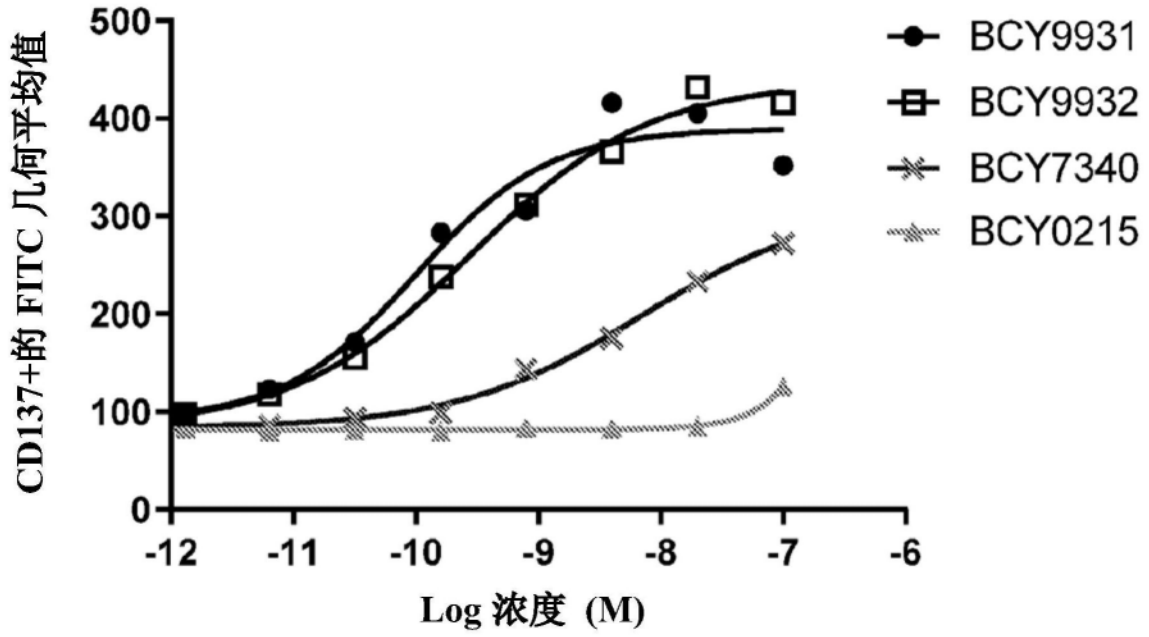


图4

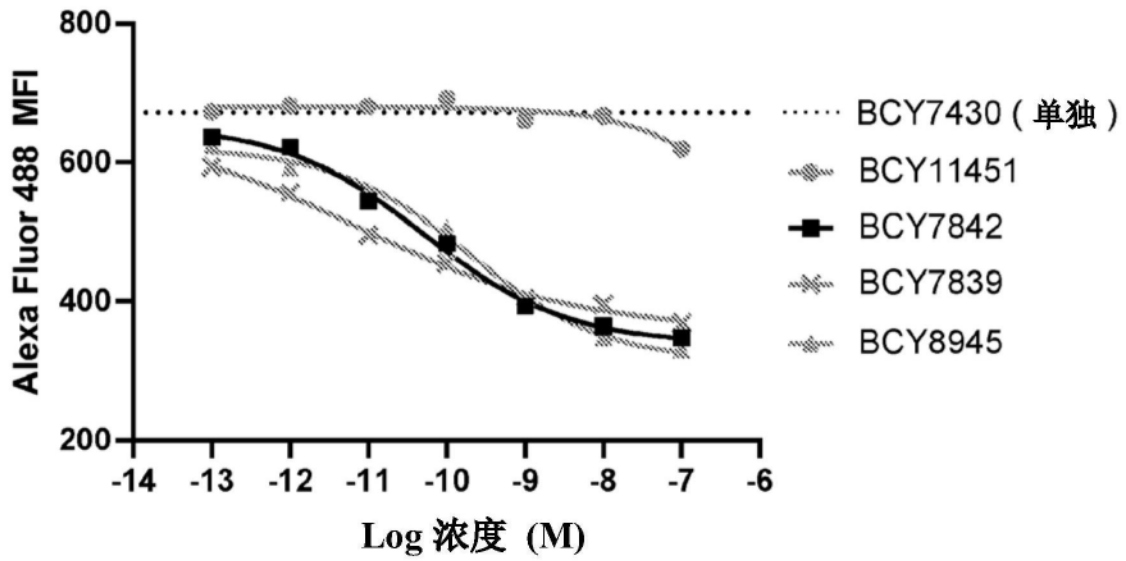


图5

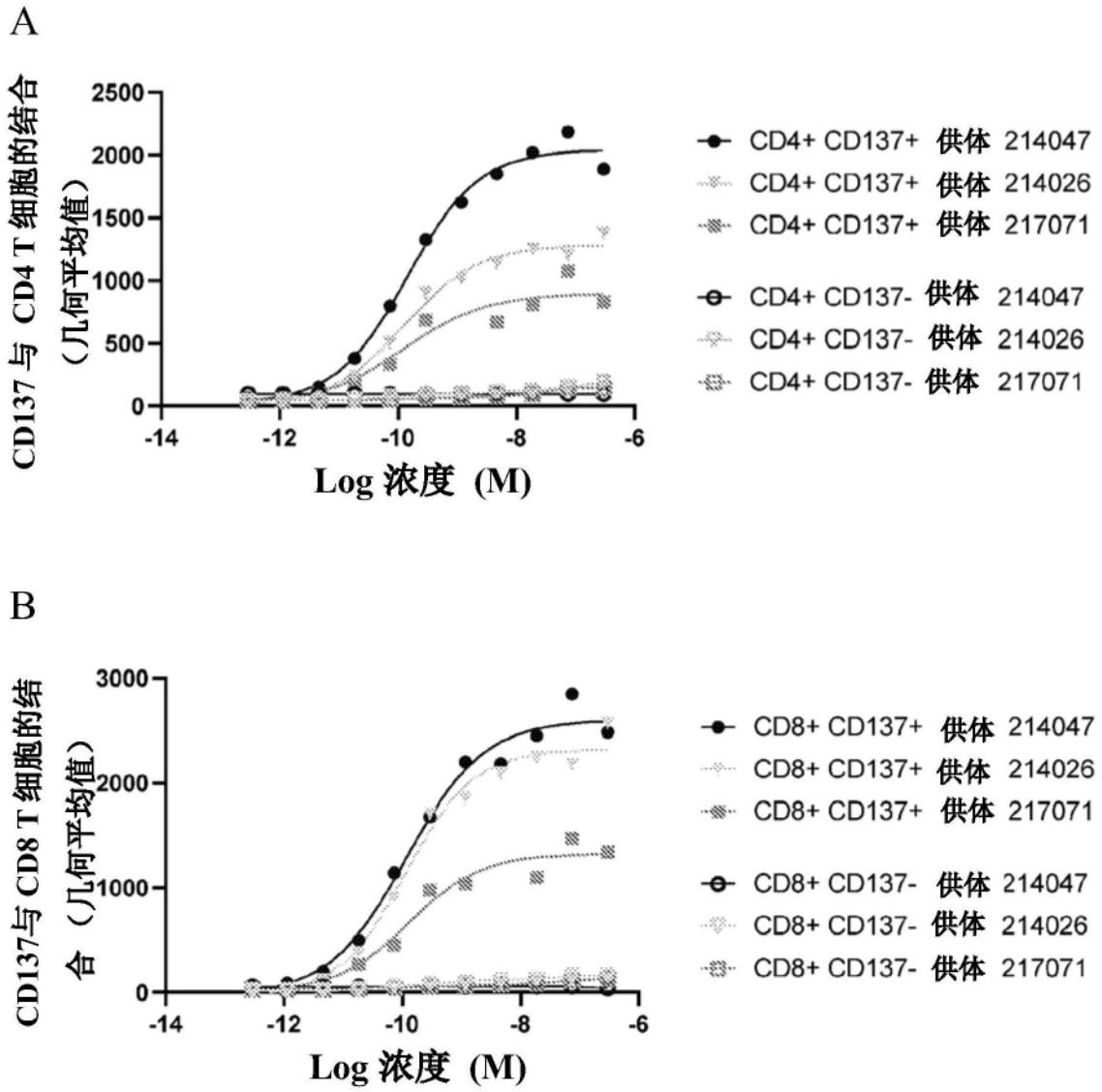


图6

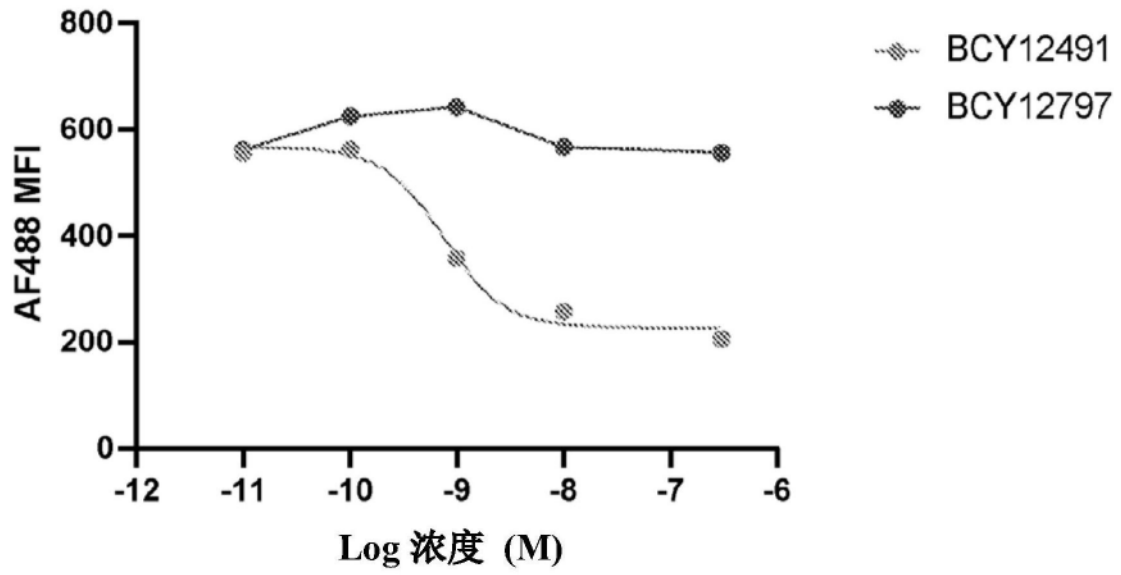


图7

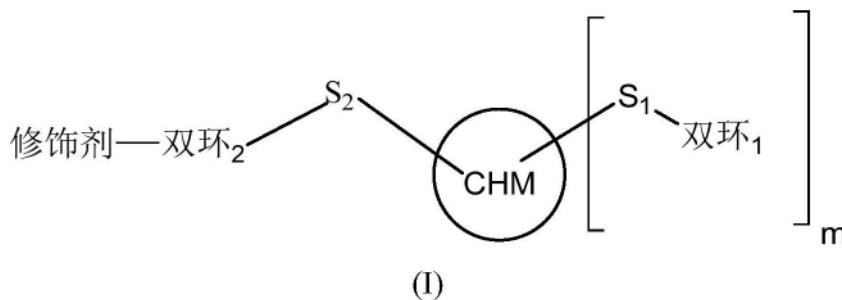
1. 一种多聚结合复合物,其包含至少两个双环肽配体和分子支架,其中所述肽配体可以是相同的或不同的,其各自包含多肽,所述多肽包含被至少两个环序列隔开的至少三个半胱氨酸残基,并且所述分子支架与所述多肽的反应性基团形成共价键,使得在分子支架上形成至少两个多肽环,其特征在于所述多聚结合复合物另外包含与其偶联的修饰基团,其中所述修饰基团包括示踪分子、可检测部分或脂质。

2. 根据权利要求1所述的多聚结合复合物,其中所述示踪分子是选自荧光素、Alexa Fluor™ 488、青色素-5和BODIPY™ FL的荧光团。

3. 根据权利要求1所述的多聚结合复合物,其中所述可检测部分是结合的可检测部分,如含有生物素的部分,特别是含有生物素并且聚乙二醇化的部分,例如生物素-Peg4和生物素-Peg12。

4. 根据权利要求1所述的多聚结合复合物,其中所述脂质是含有棕榈酰基的部分。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的多聚结合复合物,其包含式(I)的化合物:



其中CHM表示中央铰链部分;

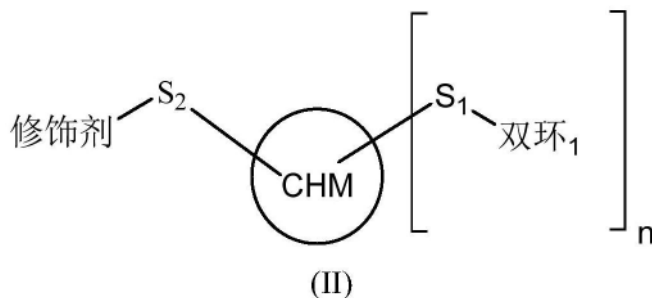
$S_1$ 和 $S_2$ 表示间隔子基团;

双环<sub>1</sub>和双环<sub>2</sub>表示如权利要求1所定义的双环肽配体;

$m$ 表示选自1至9的整数;和

修饰剂表示如权利要求1至4中任一项所定义的修饰基团。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的多聚结合复合物,其包含式(II)的化合物:



其中CHM表示中央铰链部分;

$S_1$ 和 $S_2$ 表示间隔子基团;

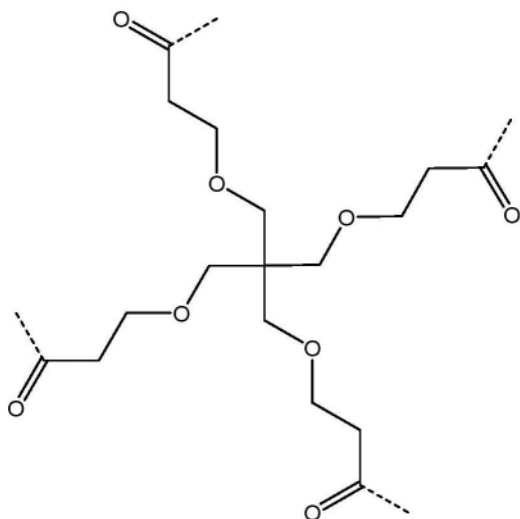
双环<sub>1</sub>表示如权利要求1所定义的双环肽配体;

$n$ 表示选自2至10的整数;和

修饰剂表示如权利要求1至4中任一项所定义的修饰基团。

7. 根据权利要求5或6所述的多聚结合复合物,其中, $m$ 和 $n$ 表示选自2至9的整数,如2或3。

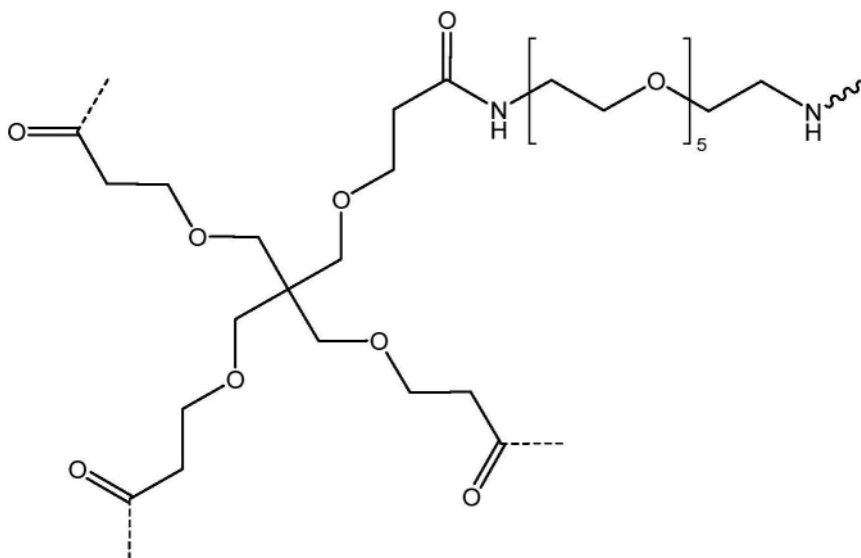
8. 根据权利要求7所述的多聚结合复合物,其中 $m$ 和 $n$ 表示3,CHM是式(A)的基序:



(A)

其中“-----”表示与每个间隔子基团 ( $S_1$ 或 $S_2$ ) 的连接点。

9. 根据权利要求7所述的多聚结合复合物, 其中n表示3, CHM是式(B)的基序:

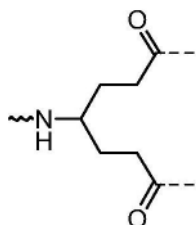


(B)

其中“-----”表示与间隔子基团的连接点; 和

“~~~~~”表示与修饰基团的连接点。

10. 根据权利要求7所述的多聚结合复合物, 其中n表示2, CHM是式(C)的基序:

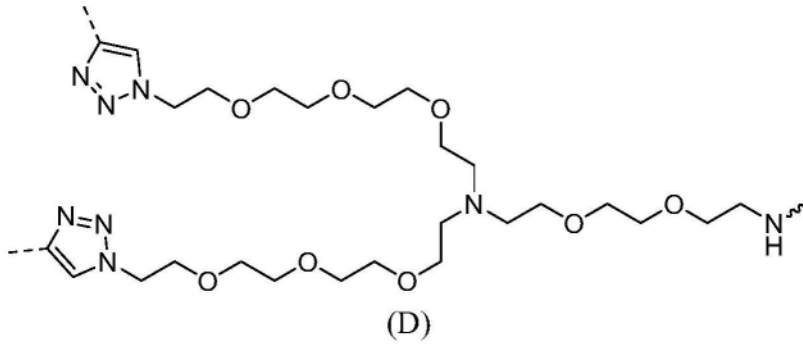


(C)

其中“-----”表示与间隔子基团的连接点; 和

“~~~~~”表示与修饰基团的连接点。

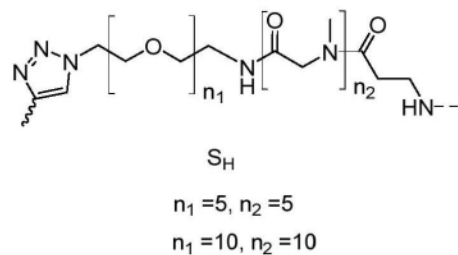
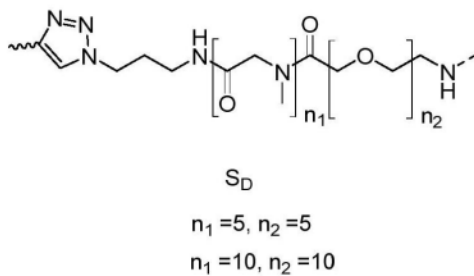
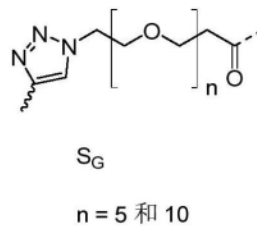
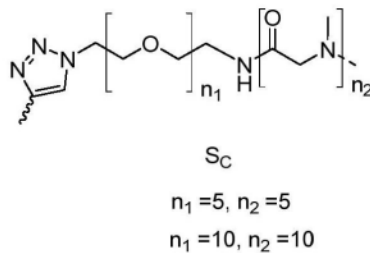
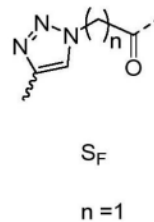
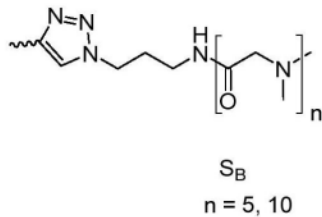
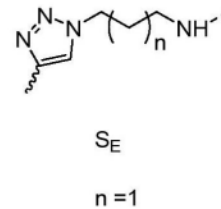
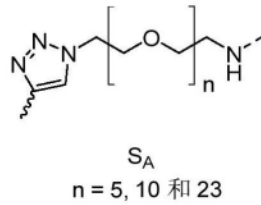
11. 根据权利要求7所述的多聚结合复合物,其中n表示2,CHM是式(D)的基序:



其中“-----”表示与间隔子基团的连接点;和

“~~~~~”表示与修饰基团的连接点。

12. 根据权利要求5至11中任一项所述的多聚结合复合物,其中所述间隔子 ( $S_1$  和  $S_2$ ) 选自间隔子  $S_A$ 、 $S_B$ 、 $S_C$ 、 $S_D$ 、 $S_E$ 、 $S_F$ 、 $S_G$  和  $S_H$  中的任一种:



其中“-----”表示与CHM基团的连接点;和

“~~~~~”表示与双环或修饰基团的连接点,如 $S_A$ ,其中n是5、10或23,如10或23。

13. 根据权利要求5至11中任一项所述的多聚结合复合物,其中所述间隔子(S<sub>1</sub>和S<sub>2</sub>)缺失。

14. 根据权利要求1至13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CD137具有特异性,如每种所述肽配体均对CD137具有特异性。

15. 根据权利要求1至14中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述环序列包含6个氨基酸。

16. 根据权利要求1至15中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述肽配体包含选自以下的核心氨基酸序列:

C<sub>i</sub>IEEGQYC<sub>ii</sub>FADPY[N1e]C<sub>iii</sub> (SEQ ID NO:1);

C<sub>i</sub>IEEGQYC<sub>ii</sub>FADPYMC<sub>iii</sub> (SEQ ID NO:2);

C<sub>i</sub>IEE[dK(PYA)]QYC<sub>ii</sub>FADPY[N1e]C<sub>iii</sub> (SEQ ID NO:3);

[dC<sub>i</sub>][dI][dE][dE]K[dQ][dY][dC<sub>ii</sub>][dF][dA][dD][dP][dY][dN1e][dC<sub>iii</sub>] (SEQ ID NO:4);

[dC<sub>i</sub>][dI][dE][dE]K(PYA)[dQ][dY][dC<sub>ii</sub>][dF][dA][dD][dP][dY][dN1e][dC<sub>iii</sub>] (SEQ ID NO:5);

C<sub>i</sub>[tBuAla]PK(PYA)[dA]PYC<sub>ii</sub>FADPY[N1e]C<sub>iii</sub> (SEQ ID NO:6);和

C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[N1e]C<sub>iii</sub> (SEQ ID NO:7);

其中C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>和C<sub>iii</sub>分别表示第一、第二和第三半胱氨酸残基,N1e表示正亮氨酸,PYA表示炔丙氨酸,tBuAla表示叔丁基丙氨酸,或其药学上可接受的盐。

17. 根据权利要求16所定义的多聚结合复合物,其中所述肽配体包含N和C末端添加,并包含选自以下的氨基酸序列:

Ac-A- (SEQ ID NO:1) -[Dap(PYA)]-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY7741);

Ac-A- (SEQ ID NO:1) -[Dap(Lys(PYA))]-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY12799);

Ac- (SEQ ID NO:2) -A-Pra-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY7077);

Ac-A- (SEQ ID NO:3) -A-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY7744);

Ac-A- (SEQ ID NO:3) -K-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY11613);

Ac-[dA]- (SEQ ID NO:4) -[dA]-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY11506);

Ac-[dA]- (SEQ ID NO:5) -[dK]-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY12144);

Ac- (SEQ ID NO:6) -A-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY8927);

Ac- (SEQ ID NO:6) -K-CONH<sub>2</sub> (在下文中称为BCY12357);

Ac- (SEQ ID NO:7) -A (在本文中称为BCY8928);和

Ac- (SEQ ID NO:7) -K (在本文中称为BCY13389);

其中Dap表示二氨基丙酸,PYA表示炔丙氨酸,Pra表示炔丙基甘氨酸,或其药学上可接受的盐。

18. 根据权利要求1至17中任一项所定义的多聚结合复合物,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)。

19. 根据权利要求1至18中任一项所定义的多聚结合复合物,其列于表1中,但非结合对照BCY12374除外。

20. 根据权利要求1至13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

(如两种)对CD137具有特异性,并且至少一种所述肽配体(如一种)对粘连蛋白-4具有特异性,如表2中所列出的那些。

21.根据权利要求1至13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(如两种)对CD137具有特异性,并且至少一种所述肽配体(如一种)对EphA2具有特异性,如表3中所列出的那些。

22.根据权利要求1至21中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述药学上可接受的盐选自游离酸或钠、钾、钙、铵盐。

23.根据权利要求12至22中任一项所定义的多聚结合复合物,其中所述CD137为人CD137。

24.一种药物偶联物,其包含如权利要求1至23中任一项所定义的多聚结合复合物,所述多聚结合复合物与一个或多个效应基团和/或官能团偶联。

25.一种药物组合物,其包含权利要求1至23中任一项的多聚结合复合物或权利要求24的药物偶联物,与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

26.根据权利要求1至23中任一项所定义的多聚结合复合物或如权利要求24中所定义的药物偶联物,其用于预防、抑制或治疗CD137介导的疾病或疾患。

27.根据权利要求1至23中任一项所定义的多聚结合复合物的用途,用于分析方法中(例如作为示踪物或标签)。