

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7704732号  
(P7704732)

(45)発行日 令和7年7月8日(2025.7.8)

(24)登録日 令和7年6月30日(2025.6.30)

(51)国際特許分類	F I
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/00
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 39 (全195頁)

(21)出願番号	特願2022-505570(P2022-505570)	(73)特許権者	519226757 バイスクルテクス・リミテッド Bicycle Tx Limited イギリス国 シービー21 6ジーエス
(86)(22)出願日	令和2年7月30日(2020.7.30)		ケンブリッジ グレート アビントン グ
(65)公表番号	特表2022-542286(P2022-542286 A)		ランタ パーク ポートウェイ ビルディ
(43)公表日	令和4年9月30日(2022.9.30)		ング ブロックス エーアンドビー
(86)国際出願番号	PCT/GB2020/051831	(74)代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(87)国際公開番号	WO2021/019246	(72)発明者	ケビン マクドネル イギリス国 シービー22 3エイティ一
(87)国際公開日	令和3年2月4日(2021.2.4)		ケンブリッジ ベイブラハム リサーチ
審査請求日	令和5年7月28日(2023.7.28)		キャンパス ビルディング 900 シー
(31)優先権主張番号	62/880,191	(72)発明者	ノオー バイスクルテクス リミテッド
(32)優先日	令和1年7月30日(2019.7.30)		ブニット ウパディヤヤ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	62/910,088		
(32)優先日	令和1年10月3日(2019.10.3)		
	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(a) EphA2、ネクチン-4、及びPD-L1から選択される癌細胞上に存在する構成要素に結合する第一のペプチドリガンド;がリンカーを介して、

(b) CD137又はOX40である免疫細胞上に存在する構成要素に結合する2以上の第二のペプチドリガンド;にコンジュゲートしたもの:

を含む、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体又はその医薬として許容し得る塩であつて、

ここで、該ペプチドリガンドの各々が少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つの反応基を含むポリペプチド及び該ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する分子スキャフォールドを含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子スキャフォールド上に形成され、

(i)該2以上の第二のペプチドリガンドが:

- 以下から選択されるアミノ酸配列:

C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:11);

(配列番号:11)-A (本明細書において、BCY14601と称される);

C<sub>i</sub>IEEGQYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:5);

C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Ala]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:6);

C<sub>i</sub>IEEGQYC<sub>ii</sub>F[D-Ala]DPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:7);

C<sub>i</sub>[tBuAla]PK[D-Ala]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:8);

Ci[tBuAla]PE[D-Lys]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:9);  
 Ci[tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:10);  
 CiIEE[D-Lys(PYA)]QYC<sub>ii</sub>FADPY(Nle)C<sub>iii</sub> (配列番号:12);  
 Ci[tBuAla]PE[dK]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:60);  
 CiIEE[dK(PYA)]QYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:61);  
 Ci[tBuAla]EE(dK)PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:62);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:63);  
 Ci[tBuAla]EE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:64);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:65);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FAEPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:66);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FA[Aad]PY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:67);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FAQPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:68);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle][Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号:69);  
 [MerPro]<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:70;本明細書において、BCY12353と称される);  
 [MerPro]<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle][Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号:71;本明細書において、BCY12354と称される);

Ci[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:72);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:73);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:74;本明細書において、BCY12372と称される);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FAD[NMeAla]Y[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:75);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FAD[NMeDAla]Y[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:76);  
 Ci[tBuAla]P[K(PYA)][dA]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:77);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:78);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(Me, PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:79);  
 Ci[tBuAla]PE[dK(Me, PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:80);及び  
 [MerPro]<sub>i</sub>[tBuAla]EE[dK]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:81;本明細書において、BCY13137と称される);

(ここで、[MerPro]<sub>i</sub>、Ci、C<sub>ii</sub>、C<sub>iii</sub>、及び[Cysam]<sub>iii</sub>は、システイン、MerPro、及びCysamから選択される第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)の反応基を表し、Nleはノルロイシンを表し、tBuAlaはt-ブチル-アラニンを表し、PYAは4-ペンチル酸を表し、Aadは-L-アミノアジビン酸を表し、MerProは3-メルカプトプロピオン酸を表し、Cysamはシステアミンを表し、NMeAlaはN-メチル-アラニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩；を含むポリペプチドを含むCD137結合二環式ペプチドリガンド、

あるいは

- 以下から選択されるアミノ酸配列：

CiILWC<sub>ii</sub>LPEPHDEC<sub>iii</sub> (配列番号:82);  
 CiAK<sup>K</sup>/s<sup>N</sup>/E<sub>ii</sub>DPFWYQFYC<sub>iii</sub> (配列番号:83);  
 CiAKNC<sub>ii</sub>DPFWYQFYC<sub>iii</sub> (配列番号:84);  
 CiASEC<sub>ii</sub>DPFWYQFYC<sub>iii</sub> (配列番号:85);  
 Ci<sup>L</sup>/NYSPC<sub>ii</sub>WHPLND<sup>D</sup>/kC<sub>iii</sub> (配列番号:86);  
 CiLYSPC<sub>ii</sub>WHPLND<sub>iii</sub> (配列番号:87);  
 CiNYSPC<sub>ii</sub>WHPLNK<sub>iii</sub> (配列番号:88);  
 CiWYEYDC<sub>ii</sub>NNWERC<sub>iii</sub> (配列番号:89);  
 CiVIRYSPC<sub>ii</sub>SHYLNC<sub>iii</sub> (配列番号:90);  
 CiDYSPWWHPC<sub>ii</sub>NHIC<sub>iii</sub> (配列番号:91);  
 CiDACP<sub>ii</sub>LYPDYYVC<sub>iii</sub> (配列番号:92);  
 CiRLWC<sub>ii</sub>IPAPTDDC<sub>iii</sub> (配列番号:93);  
 CiTMWC<sub>ii</sub>IPAKGDWC<sub>iii</sub> (配列番号:94);

CiMLWCiiLPAPTDECiii (配列番号:95);  
 CiILWCiiLPEPPDECiii (配列番号:96);  
 CiLLWCiiIPNPDDNCiii (配列番号:97);  
 CiWLWCiiVPNPDTCiii (配列番号:98);  
 CiVLWCiiTPYPGDDCiii (配列番号:99);  
 CiALWCiiIPDPQDECiii (配列番号:100);  
 CiTLWCiiIPDASDSCiii (配列番号:101);  
 CiQLWCiiIPDADDDCiii (配列番号:102);  
 CiQLWCiiVPEPGDSCiii (配列番号:103);  
 CiALWCiiIPEEESDDCiii (配列番号:104);  
 CiVLWCiiIPEPQDKCiii (配列番号:105);  
 CiTLWCiiIPDPDDSCiii (配列番号:106);  
 CiRLWCiiVPKAEDYCiii (配列番号:107);  
 CiTKPCiiIAYYNQSCiii (配列番号:108);  
 CiMNPCCiiIAYYQQECiii (配列番号:109);  
 CiTNACiiVAYYHQACiii (配列番号:110);  
 CiSDPCiiISYYNQACiii (配列番号:111);  
 CiDPPCiiDPFWYAFYCiii (配列番号:112);  
 CiPDDCiiDPFWYNFYCiii (配列番号:113);  
 CiRYSPCiiYHPHNCiii (配列番号:114);  
 CiLYSPCiiNHPLNSCiii (配列番号:115);  
 CiEDNYCiiFMWTPYCiii (配列番号:116);  
 CiLDSPCiiWHPLNDCiii (配列番号:117);  
 CiRFSPCiiSHPLNQCiii (配列番号:118);  
 CiKYSPCiiWHPLNLCiii (配列番号:119);  
 CiRYSPCiiWHPLNNCiii (配列番号:120);  
 CiEWISCiiPGEPHRWWCiii (配列番号:121);  
 CiVWEACiiPEHPDQWWCiii (配列番号:122);  
 CiSTWHCiiFWNLQEGKCiii (配列番号:123);  
 CiEWKACiiEHDREWWCiii (配列番号:124);  
 CiRTWQCiiFYEWQNGHCiii (配列番号:125);  
 CiKTWDCiiFWASQVSECiii (配列番号:126);  
 CiSTWQCiiFYDLQEGHCiii (配列番号:127);  
 CiTTWECiiFYDLQEGHCiii (配列番号:128);  
 CiETWECiiFWRLQAGECiii (配列番号:129);  
 CiRTWQCiiFWDLQEGLCiii (配列番号:130);  
 CiSTWQCiiFWDSQLGACiii (配列番号:131);  
 CiETWECiiFWEWQVGSCiii (配列番号:132);  
 CiTTWECiiFWDLQEGLCiii (配列番号:133);  
 CiHTWDCiiFYQWQDGHCiii (配列番号:134);  
 CiTTWECiiFYSLQDGHCiii (配列番号:135);  
 CiNEDMYCiiFMWMECiii (配列番号:136);  
 CiLYEYDCiiYTWRRCiii (配列番号:137);  
 CiRYEYDCiiHTWQRCiii (配列番号:138);  
 CiWYEYDCiiTTWERCiii (配列番号:139);  
 CiWYEYDCiiRTWTRCiii (配列番号:140);  
 CiLYEYDCiiHTWTRCiii (配列番号:141);  
 CiWYEYDCiiRTWTFCiii (配列番号:142);  
 CiHGGVWCiiIPNINDSCiii (配列番号:143);  
 CiDSPVRCiiYWNTQKGCiii (配列番号:144);  
 Ci  
 10  
 20  
 30  
 40  
 50

C<sub>i</sub>GSPVPC<sub>ii</sub>YWNTRKGC<sub>iii</sub> (配列番号:145);  
 C<sub>i</sub>APFEFNC<sub>ii</sub>YTWRPC<sub>iii</sub> (配列番号:146);  
 C<sub>i</sub>RVLYSPC<sub>ii</sub>YHWLNC<sub>iii</sub> (配列番号:147);  
 C<sub>i</sub>SIMYSPEC<sub>ii</sub>EHPHNHC<sub>iii</sub> (配列番号:148);  
 C<sub>i</sub>DKWEPDHLC<sub>ii</sub>YWWC<sub>iii</sub> (配列番号:149);  
 C<sub>i</sub>DAWPETHVC<sub>ii</sub>YWWC<sub>iii</sub> (配列番号:150);  
 C<sub>i</sub>DEYTPEHLC<sub>ii</sub>YWWC<sub>iii</sub> (配列番号:151);  
 C<sub>i</sub>WINYSISPC<sub>ii</sub>YVGEC<sub>iii</sub> (配列番号:152); 及び  
 C<sub>i</sub>RYEYYPEHLC<sub>ii</sub>YTWC<sub>iii</sub> (配列番号:153);

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステイン残基を表す)、又はその修飾誘導体もしくは医薬として許容し得る塩;  
 を含むポリペプチドを含むOX40結合二環式ペプチドリガンド、を含み、  
 かつ

(ii)該第一のペプチドリガンドが:

- 以下から選択されるアミノ酸配列:

C<sub>i</sub>P[1Nal][dD]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:1;本明細書において、BCY 8116と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dK](Sar<sub>10</sub>-(B-Ala))C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:3);

C<sub>i</sub>PFGC<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:4;本明細書において、BCY11414と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:14);

[MerPro]<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:15;本明細書において、BCY12363と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]W[Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号:16);

[MerPro]<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]W[Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号:17;本明細書において、BCY12365と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]HWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:18);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]EWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:19);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dE]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:20;本明細書において、BC Y12368と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dA]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:21;本明細書において、BC Y12369と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dE]C<sub>ii</sub>L[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:22;本明細書において、BCY 12370と称される); 及び

C<sub>i</sub>P[1Nal][dE]C<sub>ii</sub>M[HArg]EWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:23;本明細書において、BCY 12384と称される);

(ここで、[MerPro]<sub>i</sub>、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、C<sub>iii</sub>、及び[Cysam]<sub>iii</sub>は、システイン、MerPro、及びCysamから選択される第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)の反応基を表し、1Nalは1-ナフチルアラニンを表し、HArgはホモアルギニンを表し、HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、Sar<sub>10</sub>は10個のサルコシン単位を表し、B-Alaは-D-アラニンを表し、MerProは3-メルカブトプロピオン酸を表し、かつCysamはシステアミンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩;

を含むポリペプチドを含むネクチン-4結合二環式ペプチドリガンド、

あるいは

- 以下から選択されるアミノ酸配列:

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[d1Nal]WTC<sub>iii</sub> (配列番号:44);

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:24);

C<sub>i</sub>LWDPTPC<sub>ii</sub>ANLHL[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:25);

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[K(PYA)]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:26);

C<sub>i</sub>[HyP][K(PYA)]VNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:27);

10

20

30

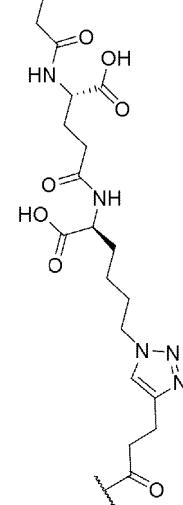
40

50

$C_i[HyP]L VNPLC_{ii}[K(PYA)]HP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:28);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}LKP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:29);  
 $C_i[HyP]K VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:30);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}KHP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:31);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}LHP[dE]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:32);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}LEP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:33);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}LHP[dD]WTC_{iii}$  (配列番号:34);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}LEP[dD]WTC_{iii}$  (配列番号:35);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}LEP[dA]WTC_{iii}$  (配列番号:36);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]WTC_{iii}$  (配列番号:37;本明細書において、BCY12 10  
860と称される);  
 $C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:38);  
 $C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}LEP[dD]WTC_{iii}$  (配列番号:39);  
 $C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]WTC_{iii}$  (配列番号:40);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:41);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}LHP[d1Nal]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:42);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[1Nal]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:43);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[1Nal]P[dD]WTC_{iii}$  (配列番号:45;本明細書において、BCY1311 20  
9と称される);  
 $C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}LEP[dA]WTC_{iii}$  (配列番号:46);  
 $C_i[HyP][hGlu]VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:47);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[hGlu]HP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:48);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[hGlu]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:49);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}LHP[dNle]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:50);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[Nle]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:51);  
 $[MerPro]_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]WTC_{iii}$  (配列番号:154);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg][Cysam]_{iii}$  (配列番号:155);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[His3Me]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:156);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[His1Me]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:157);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[4ThiAz]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:158);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}LFP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:159);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[Thi]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:160);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[3Thi]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:161);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}LNP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:162);  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}LQP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:163);及び  
 $C_i[HyP]L VNPLC_{ii}L[K(PYA-(パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>)]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号:164);  

(ここで、[MerPro]<sub>i</sub>、 $C_i$ 、 $C_{ii}$ 、 $C_{iii}$ 、及び[Cysam]<sub>iii</sub>は、システイン、MerPro、及びCysamから選択される第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)の反応基を表し、HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、HArgはホモアルギニンを表し、PYAは4-ペンチ酸を表し、3,3-DPAは3,3-ジフェニルアラニンを表し、Cbaは-シクロブチルアラニンを表し、1Nalは1-ナフチルアラニンを表し、hGluはホモグルタミン酸を表し、Thiはチエニル-アラニンを表し、4ThiAzは-(4-チアゾリル)-アラニンを表し、His1MeはN1-メチル-L-ヒスチジンを表し、His3MeはN3-メチル-L-ヒスチジンを表し、3Thiは3-チエニルアラニンを表し、パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>[PYA]は、 40

【化 1】

(パルミトイル-Glu-LysN<sub>3</sub>)[PYA]を表し、[K(PYA-(パルミトイル-Glu-LysN<sub>3</sub>)]は

10

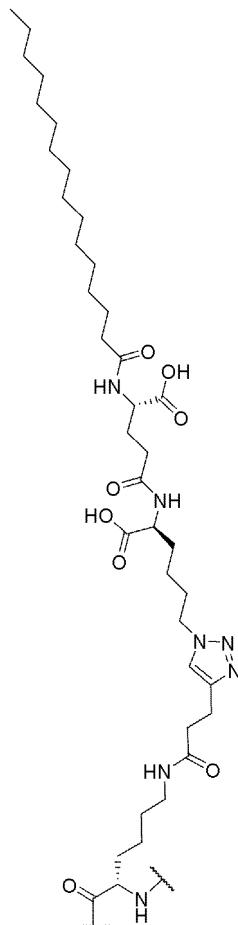
20

30

40

50

## 【化2】



[K(PYA(パルミトイル-Glu-LysN3))]

を表し、Nleはノルロイシンを表し、MerProは3-メルカプトプロピオニ酸を表し、かつ  
Cysamはシステアミンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩；  
を含むポリペプチドを含むEphA2結合二環式ペプチドリガンド、  
あるいは

- 以下から選択されるアミノ酸配列：

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>QKLHLC<sub>iii</sub> (配列番号:52);  
C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[K(PYA)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号:53);  
C<sub>i</sub>SKGWLTMC<sub>ii</sub>Q[K(Ac)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号:54);  
C<sub>i</sub>SAGWLTKC<sub>ii</sub>Q[K(Ac)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号:55);  
C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>K[K(Ac)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号:56);  
C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[K(Ac)]LKLC<sub>iii</sub> (配列番号:57);  
C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[HArg]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号:58);及び  
C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>[HArg]QLNLC<sub>iii</sub> (配列番号:59);

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステイン残基を表し、PYAは4-ペンチン酸を表し、かつHArgはホモアルギニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩；

を含むポリペプチドを含むPD-L1結合二環式ペプチドリガンド、を含む、前記ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体又はその医薬として許容し得る塩。

## 【請求項2】

前記2以上の第二のペプチドリガンドが、以下から選択されるアミノ酸配列：

C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:11);

10

20

30

40

50

(配列番号:11)-A (本明細書において、BCY14601と称される);  
 $C_i$ [IEEGQYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:5);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[D-Ala]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:6);  
 $C_i$ [IEEGQYC<sub>ii</sub>]F[D-Ala]DPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:7);  
 $C_i$ [tBuAla]PK[D-Ala]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:8);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[D-Lys]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:9);  
 $C_i$ [tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:10);  
 $C_i$ [IEE[D-Lys(PYA)]QYC<sub>ii</sub>]FADPY(Nle)C<sub>iii</sub> (配列番号:12);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:60);  
 $C_i$ [IEE[dK(PYA)]QYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:61);  
 $C_i$ [tBuAla]EE(dK)PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:62);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:63);  
 $C_i$ [tBuAla]EE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:64);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FANPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:65);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FAEPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:66);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FA[Aad]PY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:67);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FAQPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:68);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle][Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号:69);  
[MerPro]<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:70;本明細書において、BCY12353と称される);  
[MerPro]<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle][Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号:71;本明細書において、BCY12354と称される);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:72);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:73);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:74;本明細書において、BCY12372と称される);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FAD[NMeAla]Y[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:75);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FAD[NMeAla]Y[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:76);  
 $C_i$ [tBuAla]P[K(PYA)][dA]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:77);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:78);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(Me, PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:79);  
 $C_i$ [tBuAla]PE[dK(Me, PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:80);及び  
[MerPro]<sub>i</sub>[tBuAla]EE[dK]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:81;本明細書において、BCY13137と称される);  
(ここで、[MerPro]<sub>i</sub>、 $C_i$ 、 $C_{ii}$ 、 $C_{iii}$ 、及び[Cysam]<sub>iii</sub>は、システイン、MerPro、及びCysamから選択される第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)の反応基を表し、Nleはノルロイシンを表し、tBuAlaはt-ブチル-アラニンを表し、PYAは4-ペンチル酸を表し、Aadは-L-アミノアジピン酸を表し、MerProは3-メルカプトプロピオン酸を表し、Cysamはシステアミンを表し、NMeAlaはN-メチル-アラニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩を含むCD137結合二環式ペプチドリガンドを含む、請求項1記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

### 【請求項3】

前記CD137結合二環式ペプチドリガンドが、以下であるアミノ酸配列:

$C_i$ [tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号:11);

(ここで、 $C_i$ 、 $C_{ii}$ 、及び $C_{iii}$ は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステイン残基を表し、tBuAlaはt-ブチル-アラニンを表し、PYAは4-ペンチル酸を表し、Nleはノルロイシンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩

を含む、請求項2記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

### 【請求項4】

前記CD137結合二環式ペプチドリガンドが、N-及び/又はC-末端修飾を含むポリペプチ

10

20

30

40

50

ドを含み、かつ該ポリペプチドが：

Ac-(配列番号:11)-A(本明細書において、BCY8928と称される);  
 Ac-A-(配列番号5)-Dap(本明細書において、BCY7732と称される);  
 Ac-A-(配列番号5)-Dap(PYA)(本明細書において、BCY7741と称される);  
 Ac-(配列番号6)-Dap(本明細書において、BCY9172と称される);  
 Ac-(配列番号6)-Dap(PYA)(本明細書において、BCY11014と称される);  
 Ac-A-(配列番号7)-Dap(本明細書において、BCY8045と称される);  
 Ac-(配列番号8)-A(本明細書において、BCY8919と称される);  
 Ac-(配列番号9)-A(本明細書において、BCY8920と称される);  
 Ac-(配列番号10)-A(本明細書において、BCY8927と称される);  
 Ac-A-(配列番号12)-A(本明細書において、BCY7744と称される);  
 Ac-(配列番号60)-Dap(PYA)(本明細書において、BCY11144と称される);  
 Ac-A-(配列番号61)-K(本明細書において、BCY11613と称される);  
 Ac-(配列番号62)-Dap(PYA)(本明細書において、BCY12023と称される);  
 Ac-(配列番号63)(本明細書において、BCY12149と称される);  
 Ac-(配列番号64)(本明細書において、BCY12143と称される);  
 Ac-(配列番号65)(本明細書において、BCY12147と称される);  
 Ac-(配列番号66)(本明細書において、BCY12145と称される);  
 Ac-(配列番号67)(本明細書において、BCY12146と称される);  
 Ac-(配列番号68)(本明細書において、BCY12150と称される);  
 Ac-(配列番号69)(本明細書において、BCY12352と称される);  
 Ac-(配列番号72)-[1,2-ジアミノエタン](本明細書において、BCY12358と称される);  
 [パルミチン酸]-[yGlu]-[yGlu]-(配列番号73)(本明細書において、BCY12360と称される);

Ac-(配列番号75)(本明細書において、BCY12381と称される);

Ac-(配列番号76)(本明細書において、BCY12382と称される);

Ac-(配列番号77)-K(本明細書において、BCY12357と称される);

Ac-(配列番号78)-[dA](本明細書において、BCY13095と称される);

[Ac]-(配列番号78)-K(本明細書において、BCY13389と称される);

Ac-(配列番号79)-[dA](本明細書において、BCY13096と称される);又は

Ac-(配列番号80)(本明細書において、BCY13097と称される);

(ここで、Acはアセチル基を表し、Dapはジアミノプロピオニ酸を表し、PYAは4-ペンチニ酸を表す)、又はその医薬として許容し得る塩

を含む、請求項2又は請求項3記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

#### 【請求項5】

前記CD137結合二環式ペプチドリガンドが、N-及び/又はC-末端修飾を含むポリペプチドを含み、該ポリペプチドが：

Ac-(配列番号11)-A(本明細書において、BCY8928と称される);

(ここで、Acはアセチル基を表す)、又はその医薬として許容し得る塩

である、請求項2~4のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

#### 【請求項6】

前記2以上の第二のペプチドリガンドが、以下から選択されるアミノ酸配列：

C<sub>i</sub>LYSPC<sub>ii</sub>WHPLNDC<sub>iii</sub> (配列番号:87);

C<sub>i</sub>ILWC<sub>ii</sub>LPEPHDEC<sub>iii</sub> (配列番号:82);

C<sub>i</sub>AK<sup>K</sup>/S<sup>N</sup>/E<sub>ii</sub>DPFWYQFYC<sub>iii</sub> (配列番号:83);

C<sub>i</sub>AKNC<sub>ii</sub>DPFWYQFYC<sub>iii</sub> (配列番号:84);

C<sub>i</sub>ASEC<sub>ii</sub>DPFWYQFYC<sub>iii</sub> (配列番号:85);

C<sub>i</sub>L/NYS<sub>ii</sub>SPC<sub>ii</sub>WHPLND/KC<sub>iii</sub> (配列番号:86);

C<sub>i</sub>NYSPC<sub>ii</sub>WHPLNKC<sub>iii</sub> (配列番号:88);

C<sub>i</sub>WYEYDC<sub>ii</sub>NNWERC<sub>iii</sub> (配列番号:89);

10

20

30

40

50

CiVIRYSPCiiSHYLNCiii (配列番号:90);  
 CiDYSPWWHPCiiNHICiii (配列番号:91);  
 CiDACiiLYPDYYVCiii (配列番号:92);  
 CiRLWCiiIPAPTDDCiii (配列番号:93);  
 CiTMWCiiIPAKGDWCiii (配列番号:94);  
 CiMLWCiiLPAPTDECiii (配列番号:95);  
 CiILWCiiLPEPPDECiii (配列番号:96);  
 CiLLWCiiIPNPDDNCiii (配列番号:97);  
 CiWLWCiiVPNPDDTCiii (配列番号:98);  
 CiVLWCiiTPYPGDCCiii (配列番号:99);  
 CiALWCiiIPDPQDECiii (配列番号:100);  
 CiTLWCiiIPDASDSCiii (配列番号:101);  
 CiQLWCiiIPDADDDCiii (配列番号:102);  
 CiQLWCiiVPEPGDSCiii (配列番号:103);  
 CiALWCiiIPEESDDCiii (配列番号:104);  
 CiVLWCiiIPEPQDKCiii (配列番号:105);  
 CiTLWCiiIPDPDDSCiii (配列番号:106);  
 CiRLWCiiVPKAEDYCiii (配列番号:107);  
 CiTKPCiiIAYYNQSCiii (配列番号:108);  
 CiMNPCCiiIAYYQQECiii (配列番号:109);  
 CiTNACiiVAYYHQACiii (配列番号:110);  
 CiSDPCiiISYYNQACiii (配列番号:111);  
 CiDPPCiiDPFWYAFYCiii (配列番号:112);  
 CiPDDCiiDPFWYNFYCiii (配列番号:113);  
 CiRYSPCiiYHPHNCiii (配列番号:114);  
 CiLYSPCiiNHPLNSCiii (配列番号:115);  
 CiEDNYCiiFMWTPYCiii (配列番号:116);  
 CiLDSPCiiWHPLNDCiii (配列番号:117);  
 CiRFSPCiiSHPLNQCiii (配列番号:118);  
 CiKYSPCiiWHPLNLCiii (配列番号:119);  
 CiRYSPCiiWHPLNNCiii (配列番号:120);  
 CiEWISCiiPGEPHRWWCiii (配列番号:121);  
 CiVWEACiiPEHPDQWWCiii (配列番号:122);  
 CiSTWHCiiFWNLQEGKCiii (配列番号:123);  
 CiEWKACiiEHDRERWWCiii (配列番号:124);  
 CiRTWQCiiFYEWQNGHCiii (配列番号:125);  
 CiKTWDCiiFWASQVSECiii (配列番号:126);  
 CiSTWQCiiFYDLQEGHCiii (配列番号:127);  
 CiTTWECiiFYDLQEGHCiii (配列番号:128);  
 CiETWECiiFWRLQAGECiii (配列番号:129);  
 CiRTWQCiiFWDLQEGLCiii (配列番号:130);  
 CiSTWQCiiFWDSQLGACiii (配列番号:131);  
 CiETWECiiFWEWQVGSCiii (配列番号:132);  
 CiTTWECiiFWDLQEGLCiii (配列番号:133);  
 CiHTWDCiiFYQWQDGHCiii (配列番号:134);  
 CiTTWECiiFYSLQDGHCiii (配列番号:135);  
 CiNEDMYCiiFMWMECiii (配列番号:136);  
 CiLYEYDCiiYTWRRCiii (配列番号:137);  
 CiRYEYDCiiHTWQRCiii (配列番号:138);  
 CiWYEYDCiiTTWERCiii (配列番号:139);

10

20

30

40

50

C<sub>i</sub>WYEYDC<sub>ii</sub>RTWTRC<sub>iii</sub> (配列番号:140);  
 C<sub>i</sub>LYEYDC<sub>ii</sub>HTWTRC<sub>iii</sub> (配列番号:141);  
 C<sub>i</sub>WYEYDC<sub>ii</sub>RTWTFC<sub>iii</sub> (配列番号:142);  
 C<sub>i</sub>HGGVWC<sub>ii</sub>IPNINDSC<sub>iii</sub> (配列番号:143);  
 C<sub>i</sub>DSPVRC<sub>ii</sub>YWNTQKGC<sub>iii</sub> (配列番号:144);  
 C<sub>i</sub>GSPVPC<sub>ii</sub>YWNTRKGC<sub>iii</sub> (配列番号:145);  
 C<sub>i</sub>APFEFNC<sub>ii</sub>YTWRPC<sub>iii</sub> (配列番号:146);  
 C<sub>i</sub>RVLYSPC<sub>ii</sub>YHWLNC<sub>iii</sub> (配列番号:147);  
 C<sub>i</sub>SIMYSPEC<sub>ii</sub>EHPHNHC<sub>iii</sub> (配列番号:148);  
 C<sub>i</sub>DKWEPDHLC<sub>ii</sub>YWWC<sub>iii</sub> (配列番号:149);  
 C<sub>i</sub>DAWPETHVC<sub>ii</sub>YWWC<sub>iii</sub> (配列番号:150);  
 C<sub>i</sub>DEYTPEHLC<sub>ii</sub>YWWC<sub>iii</sub> (配列番号:151);  
 C<sub>i</sub>WINYSISPC<sub>ii</sub>YVGEC<sub>iii</sub> (配列番号:152);及び  
 C<sub>i</sub>RYEYYPEHLC<sub>ii</sub>YTWC<sub>iii</sub> (配列番号:153);

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステイン残基を表す)、又はその修飾誘導体もしくは医薬として許容し得る塩

を含むOX40結合二環式ペプチドリガンドを含む、請求項1記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項 7】

前記OX40結合二環式ペプチドリガンドが、N-及び/又はC-末端修飾をさらに含むポリペプチドを含み、該ポリペプチドが:

A-(配列番号:87)-A-K(Pya)(本明細書において、BCY11607と称される);  
 A-(配列番号82)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10551と称される);  
 A-(配列番号82)-A(本明細書において、BCY10371と称される);  
 A-(配列番号84)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10552と称される);  
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(配列番号84)-A(本明細書において、BCY10479と称される);  
 A-(配列番号84)-A(本明細書において、BCY10378と称される);  
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(配列番号85)-A(本明細書において、BCY11371と称される);  
 A-(配列番号85)-A(本明細書において、BCY10743と称される);  
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(配列番号87)-A(本明細書において、BCY10482と称される);  
 A-(配列番号87)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10549と称される);  
 Ac-A-(配列番号87)-A-K(Pya)(本明細書において、BCY12708と称される);  
 A-(配列番号87)-A(本明細書において、BCY10351と称される);  
 A-(配列番号88)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY11501と称される);  
 A-(配列番号88)-A(本明細書において、BCY10729と称される);  
 A-(配列番号89)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10550と称される);  
 A-(配列番号89)-A(本明細書において、BCY10361と称される);  
 A-(配列番号90)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10794と称される);  
 A-(配列番号90)-A(本明細書において、BCY10349と称される);  
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(配列番号91)-A(本明細書において、BCY11369と称される);  
 A-(配列番号91)-A(本明細書において、BCY10331と称される);  
 A-(配列番号92)-A(本明細書において、BCY10375と称される);  
 A-(配列番号93)-A(本明細書において、BCY10364と称される);  
 A-(配列番号94)-A(本明細書において、BCY10365と称される);  
 A-(配列番号95)-A(本明細書において、BCY10366と称される);  
 A-(配列番号96)-A(本明細書において、BCY10367と称される);  
 A-(配列番号97)-A(本明細書において、BCY10368と称される);  
 A-(配列番号98)-A(本明細書において、BCY10369と称される);  
 A-(配列番号99)-A(本明細書において、BCY10374と称される);  
 A-(配列番号100)-A(本明細書において、BCY10376と称される);

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

A-(配列番号151)-A(本明細書において、BCY10718と称される);  
 A-(配列番号152)-A(本明細書において、BCY10334と称される);及び  
 A-(配列番号153)-A(本明細書において、BCY10719と称される);  
 (ここで、Pyaは4-ペンチノイル部分を表す)

から選択される、請求項6記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項8】

前記OX40結合二環式ペプチドリガンドが、N-及び/又はC-末端修飾をさらに含むポリペプチドを含み、該ポリペプチドが:

A-(配列番号:87)-A-K(Pya)(本明細書において、BCY11607と称される);  
 (ここで、Pyaは4-ペンチノイル部分を表す)

である、請求項7記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項9】

前記第一のペプチドリガンドが、以下から選択されるアミノ酸配列:

C<sub>i</sub>P[1Nal][dD]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:1;本明細書において、BCY8116と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dK](Sar<sub>10</sub>-(B-Ala))C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:3);  
 C<sub>i</sub>PFGC<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:4;本明細書において、BCY11414と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:14);  
 [MerPro]<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:15;本明細書において、BCY12363と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]W[Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号:16);  
 [MerPro]<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]W[Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号:17;本明細書において、BCY12365と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]HWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:18);  
 C<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]EWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:19);  
 C<sub>i</sub>P[1Nal][dE]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:20;本明細書において、BCY12368と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dA]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:21;本明細書において、BCY12369と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dE]C<sub>ii</sub>L[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:22;本明細書において、BCY12370と称される);及び

C<sub>i</sub>P[1Nal][dE]C<sub>ii</sub>M[HArg]EWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号:23;本明細書において、BCY12384);

(ここで、[MerPro]<sub>i</sub>、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、C<sub>iii</sub>、及び[Cysam]<sub>iii</sub>は、システイン、MerPro、及びCysamから選択される第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)の反応基を表し、1Nalは1-ナフチルアラニンを表し、HArgはホモアルギニンを表し、HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、Sar<sub>10</sub>は10個のサルコシン単位を表し、B-Alaは-D-アラニンを表し、MerProは3-メルカプトプロピオン酸を表し、かつCysamはシステアミンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩

を含むネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドを含む、請求項1~8のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項10】

前記ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドが、以下:

配列番号1(本明細書において、BCY8116と称される);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-<sub>(配列番号1)</sub>(本明細書において、BCY8846と称される);

[PYA]-<sub>(配列番号1)</sub>(本明細書において、BCY11015と称される);

[PYA]-[B-Ala]-<sub>(配列番号1)</sub>(本明細書において、BCY11016と称される);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-<sub>(配列番号2)</sub>(本明細書において、BCY11942と称される);

Ac-<sub>(配列番号3)</sub>(本明細書において、BCY8831と称される);

10

20

30

40

50

配列番号4(本明細書において、BCY11414と称される);  
 [PYA]-[B-Ala]-(配列番号14)(本明細書において、BCY11143と称される);  
 パルミチン酸-yGlu-yGlu-(配列番号14)(本明細書において、BCY12371と称される);  
 Ac-(配列番号14)(本明細書において、BCY12024と称される);  
 Ac-(配列番号16)(本明細書において、BCY12364と称される);  
 Ac-(配列番号18)(本明細書において、BCY12366と称される);又は  
 Ac-(配列番号19)(本明細書において、BCY12367と称される);  
 (ここで、PYAは4-ペンチン酸を表し、B-Alaは-D-アラニンを表し、Sar<sub>10</sub>は10個のサルコシン単位を表す)、又はその医薬として許容し得る塩  
 を含むポリペプチドを含む、請求項9記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。  
 10

## 【請求項11】

前記ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドが、配列番号1(本明細書において、BCY8116と称される)を含む、請求項9又は請求項10記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項12】

以下:

- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12143リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- N-末端PYAでトリメシン酸-[Peg<sub>10</sub>]<sub>3</sub>リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY11015;
- N-末端PYAでトリメシン酸-[Peg<sub>10</sub>]<sub>3</sub>リンカーを介して2つのBCY11014リガンドにC-末端Dap(PYA)で結合したBCY11015;
- N-末端PYAでTCA-[Peg<sub>10</sub>]<sub>3</sub>リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY11015;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY11014リガンドにC-末端Dap(PYA)で結合したBCY8116;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY7744リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12149リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12147リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12352リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12145リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- dLys3でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY12024;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12353リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12354リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY12371;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY12384;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12381リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY8116;

10

20

30

40

50

- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12382リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介してBCY8928にdLys(PYA)4で及びBCY13389にdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- N-末端でa N-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY14601リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介してBCY14601にdLys(PYA)4で及びBCY8928にdLys(PYA)4で結合したBCY8116;
- N-末端PYAでTet-[Peg<sub>10</sub>]<sub>4</sub>リンカーを介して3つのBCY7744リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY11016;又は
- N-末端PYAでTet-[Peg<sub>10</sub>]<sub>4</sub>リンカーを介して3つのBCY8928リガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY11016;

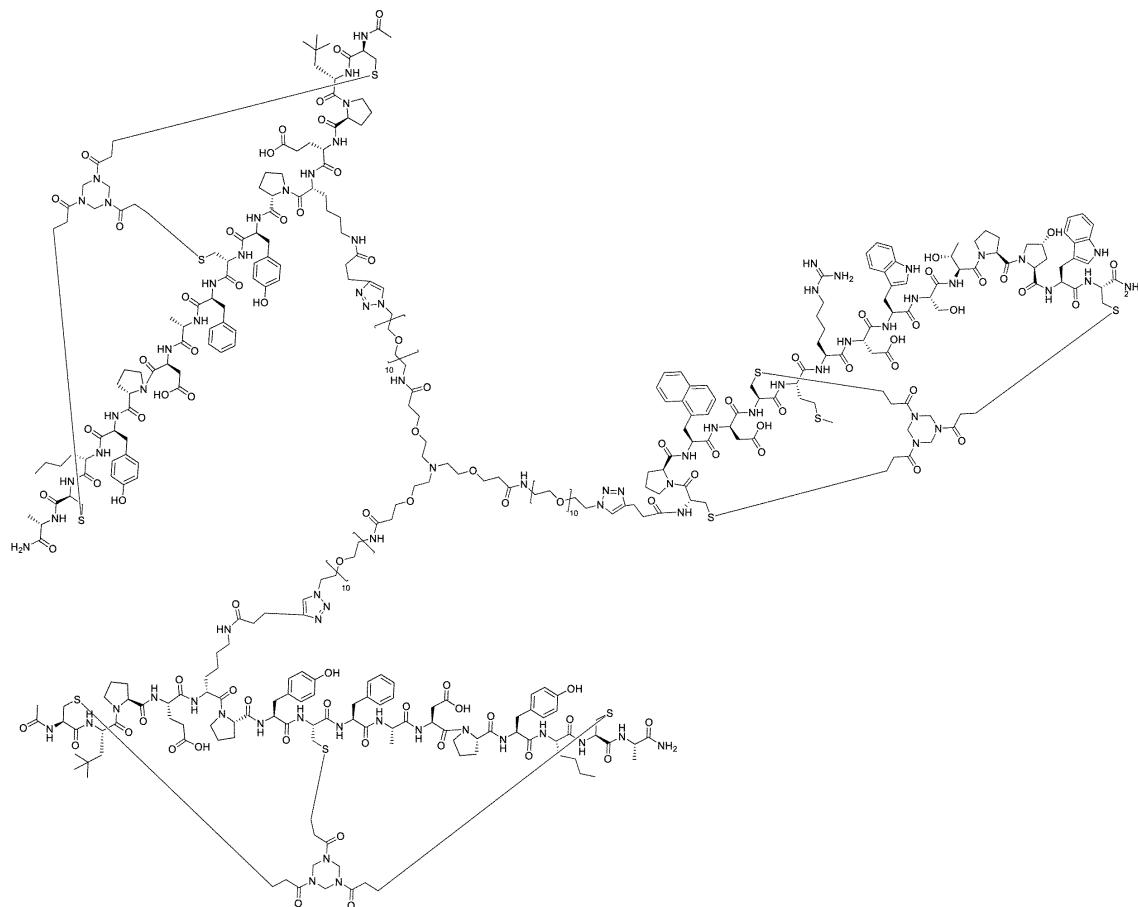
又はその医薬として許容し得る塩

を含む、請求項9～11のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項13】

BCY11027 :

【化3】



、BCY11863 :

10

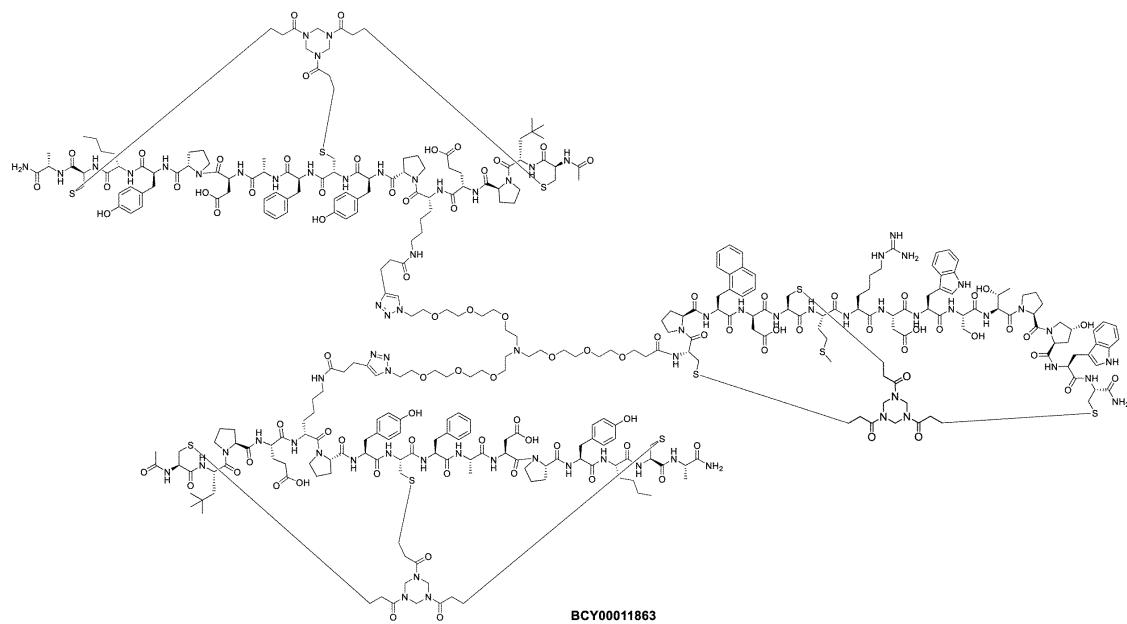
20

30

40

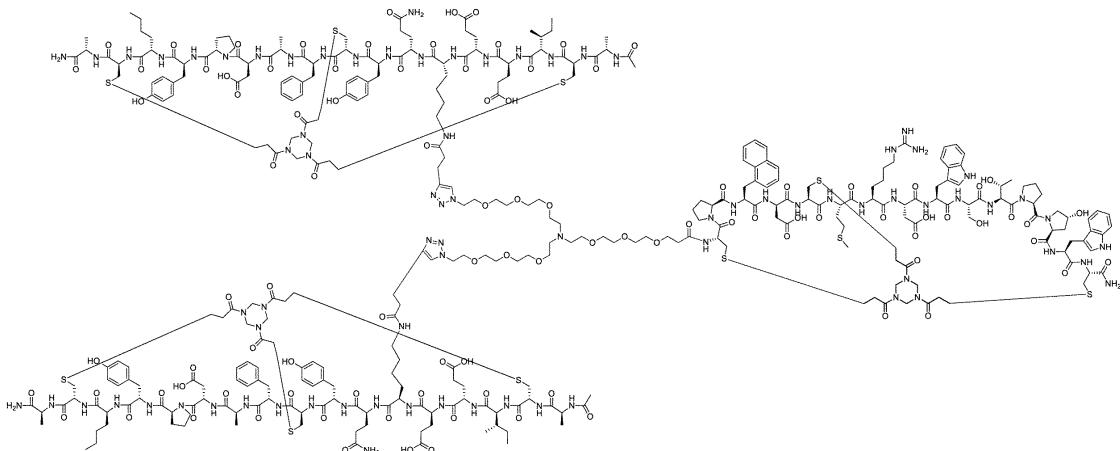
50

## 【化 4】



及びBCY11864 :

## 【化 5】



及びその医薬として許容し得る塩

から選択される、請求項9～12のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項 14】

BCY12967 :

10

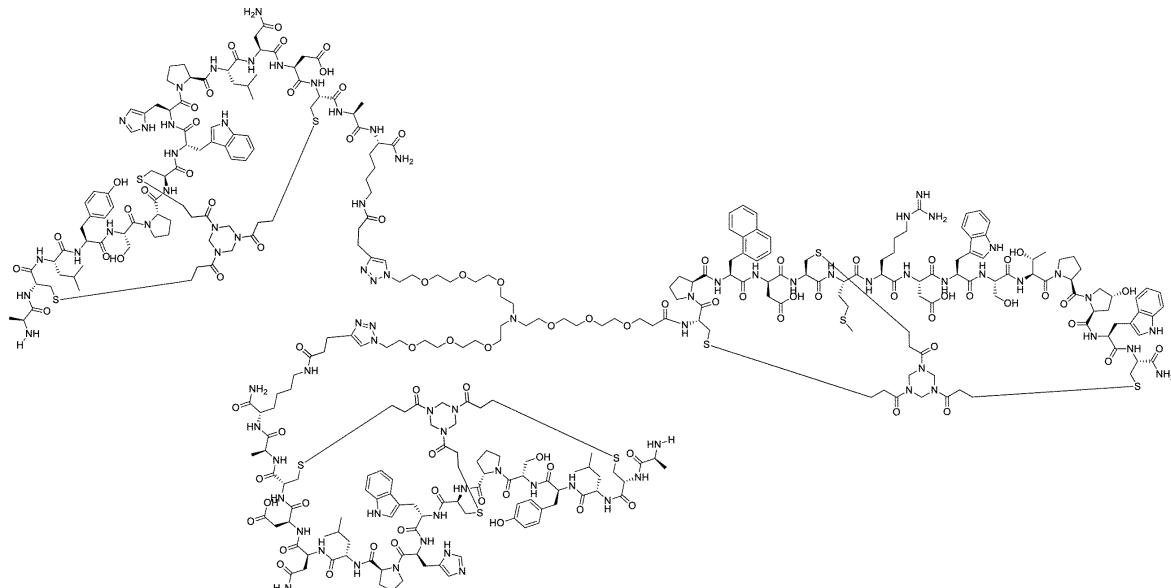
20

30

40

50

## 【化 6】



BCY00012967

又はその医薬として許容し得る塩

10

である、請求項9～11のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

20

## 【請求項 15】

前記第一のペプチドリガンドが、以下から選択されるアミノ酸配列：

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[d1Nal]WTC<sub>iii</sub> (配列番号:44);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:24);C<sub>i</sub>LWDPTPC<sub>ii</sub>ANLHL[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:25);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[K(PYA)]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:26);C<sub>i</sub>[HyP][K(PYA)]VNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:27);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>[K(PYA)]HP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:28);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LKP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:29);

30

C<sub>i</sub>[HyP]KVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:30);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>KHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:31);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dE]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:32);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:33);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号:34);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号:35);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[dA]WTC<sub>iii</sub> (配列番号:36);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[3,3-DPA]P[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号:37;本明細書において、BCY12860と称される);C<sub>i</sub>[HyP][Cba]VNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:38);

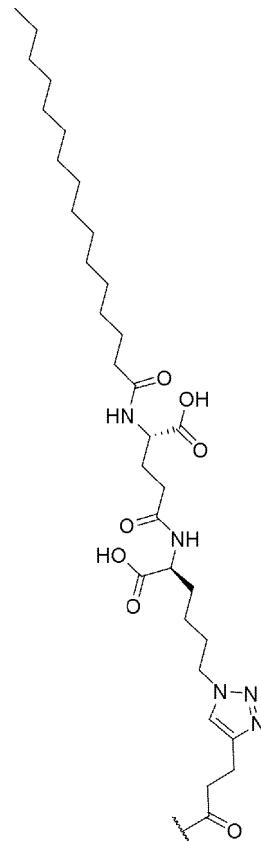
40

C<sub>i</sub>[HyP][Cba]VNPLC<sub>ii</sub>LEP[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号:39);C<sub>i</sub>[HyP][Cba]VNPLC<sub>ii</sub>L[3,3-DPA]P[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号:40);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[3,3-DPA]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:41);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[d1Nal]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:42);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[1Nal]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:43);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[1Nal]P[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号:45;本明細書において、BCY13119と称される);C<sub>i</sub>[HyP][Cba]VNPLC<sub>ii</sub>LEP[dA]WTC<sub>iii</sub> (配列番号:46);C<sub>i</sub>[HyP][hGlu]VNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:47);C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>[hGlu]HP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:48);

50

Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>L[hGlu]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:49);  
 Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>LHP[dNle]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:50);  
 Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>L[Nle]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:51);  
 [MerPro]<sub>i</sub>[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>L[3,3-DPA]P[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号:154);  
 Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg][Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号:155);  
 Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>L[His3Me]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:156);  
 Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>L[His1Me]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:157);  
 Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>L[4ThiAz]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:158);  
 Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>LFP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:159);  
 Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>L[Thi]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:160);  
 Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>L[3Thi]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:161);  
 Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>LNP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:162);  
 Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>LQP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:163);及び  
 Ci[HyP]L VNPLC<sub>ii</sub>L[K(PYA-(Palmitoyl-Glu-LysN<sub>3</sub>)]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:  
 164);  
 (ここで、[MerPro]<sub>i</sub>、Ci、C<sub>ii</sub>、C<sub>iii</sub>、及び[Cysam]<sub>iii</sub>は、システイン、MerPro、及びCysamから選択される第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)の反応基を表し、HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、HArgはホモアルギニンを表し、PYAは4-ペンチル酸を表し、3,3-DPAは3,3-ジフェニルアラニンを表し、Cbaは-シクロブチルアラニンを表し、1Nalは1-ナフチルアラニンを表し、hGluはホモグルタミン酸を表し、Thiはチエニル-アラニンを表し、4ThiAzは-(4-チアゾリル)-アラニンを表し、His1MeはN1-メチル-L-ヒスチジンを表し、His3MeはN3-メチル-L-ヒスチジンを表し、3Thiは3-チエニルアラニンを表し、パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>[PYA]は、

【化7】

(パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>)[PYA]:を表し、[K(PYA-(パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>)]は

10

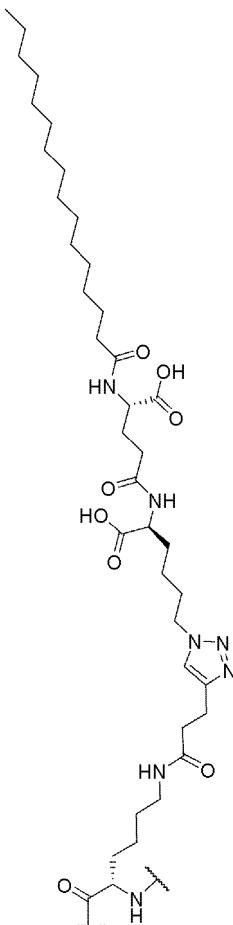
20

30

40

50

## 【化 8】



10

20

[K(PYA(パルミトイル-Glu-LysN3))]

:を表し、Nleはノルロイシンを表し、MerProは3-メルカプトプロピオン酸を表し、かつCysamはシステアミンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩

を含むEphA2結合二環式ペプチドリガンドを含む、請求項1~8のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項 16】

前記EphA2結合二環式ペプチドリガンドが、以下：

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号:24);

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)のシステイン基を表し、HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、HArgはホモアルギニンを表す)

であるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項15記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項 17】

前記EphA2結合二環式ペプチドリガンドが、以下：

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[d1Nal]WTC<sub>iii</sub> (配列番号:44);

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)のシステイン基を表し、HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、1Nalは1-ナフチルアラニンを表す)

であるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項15記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項 18】

前記EphA2結合二環式ペプチドリガンドが、以下：

A-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY9594と称される);

30

40

50

[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-A-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY6099と称される);

[PYA]-A-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY11813と称される);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号24)-[K(PYA)](本明細書において、BCY11814と称される);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号24)-K(本明細書において、BCY12734と称される);  
 [NMeAla]-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY13121と称される);  
 [Ac]-(配列番号24)-L[dH]G[dK](本明細書において、BCY13125と称される);  
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-VGP-(配列番号25)(本明細書において、BCY8941と称される);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号26)(本明細書において、BCY11815と称される);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号27)(本明細書において、BCY11816と称される);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号28)(本明細書において、BCY11817と称される);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号29)(本明細書において、BCY12735と称される);  
 (パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>)[PYA]A[HArg]D-(配列番号29)(以後、BCY14327として知られる);

Ac-A-[HArg]-D-(配列番号30)(本明細書において、BCY12736と称される);

Ac-A-[HArg]-D-(配列番号31)(本明細書において、BCY12737と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号32)(本明細書において、BCY12738と称される);

A-[HArg]-E-(配列番号32)(本明細書において、BCY12739と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号33)(本明細書において、BCY12854と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号34)(本明細書において、BCY12855と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号35)(本明細書において、BCY12856と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号35)-[dA](本明細書において、BCY12857と称される);

(配列番号35)-[dA](本明細書において、BCY12861と称される);

[NMeAla]-[HArg]-D-(配列番号35)(本明細書において、BCY13122と称される);

[dA]-ED-(配列番号35)(本明細書において、BCY13126と称される);

[dA]-[dA]-D-(配列番号35)(本明細書において、BCY13127と称される);

AD-(配列番号35)(本明細書において、BCY13128と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号36)(本明細書において、BCY12858と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号37)(本明細書において、BCY12859と称される);

Ac-(配列番号37)-[dK](本明細書において、BCY13120と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号38)(本明細書において、BCY12862と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号39)(本明細書において、BCY12863と称される);

[dA]-[HArg]-D-(配列番号39)-[dA](本明細書において、BCY12864と称される);

(配列番号40)-[dA](本明細書において、BCY12865と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号41)(本明細書において、BCY12866と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号42)(本明細書において、BCY13116と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号43)(本明細書において、BCY13117と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号44)(本明細書において、BCY13118と称される);

[dA]-[HArg]-D-(配列番号46)-[dA](本明細書において、BCY13123と称される);

[d1Nal]-[HArg]-D-(配列番号46)-[dA](本明細書において、BCY13124と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号47)(本明細書において、BCY13130と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号48)(本明細書において、BCY13131と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号49)(本明細書において、BCY13132と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号50)(本明細書において、BCY13134と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号51)(本明細書において、BCY13135と称される);

(配列番号154)-[dK](本明細書において、BCY13129と称される);

A[HArg]D-(配列番号155)(本明細書において、BCY13133と称される);

A[HArg]D-(配列番号156)(本明細書において、BCY13917と称される);

A[HArg]D-(配列番号157)(本明細書において、BCY13918と称される);

A[HArg]D-(配列番号158)(本明細書において、BCY13919と称される);

10

20

30

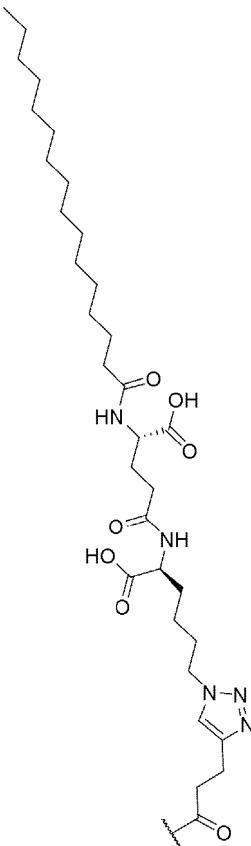
40

50

A[HArg]D-(配列番号159)(本明細書において、BCY13920と称される);  
 A[HArg]D-(配列番号160)(本明細書において、BCY13922と称される);  
 A[HArg]D-(配列番号161)(本明細書において、BCY13923と称される);  
 A[HArg]D-(配列番号162)(本明細書において、BCY14047と称される);  
 A[HArg]D-(配列番号163)(本明細書において、BCY14048と称される);又は  
 A[HArg]D-(配列番号164)(本明細書において、BCY14313と称される);  
 (ここで、PYAは4-ペンチン酸を表し、B-Alaは-D-アラニンを表し、Sar<sub>10</sub>は10個のサルコシン単位を表し、HArgはホモアルギニンを表し、NMeAlaはN-メチル-アラニンを表し、1NaIは1-ナフチルアラニンを表し、パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>[PYA]は、

【化9】

10



20

30

(パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>)[PYA]

:を表す)、又はその医薬として許容し得る塩

を含むポリペプチドを含む、請求項15～17のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項19】

40

前記EphA2結合二環式ペプチドリガンドが、以下:

A-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY9594と称される);  
 (ここで、HArgはホモアルギニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩

を含むポリペプチドを含む、請求項15～18のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項20】

50

前記EphA2結合二環式ペプチドリガンドが、以下:

A-[HArg]-D-(配列番号44)(本明細書において、BCY13118と称される);  
 (ここで、HArgはホモアルギニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩  
 を含むポリペプチドを含む、請求項15～18のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環

式ペプチド複合体。

【請求項 2 1】

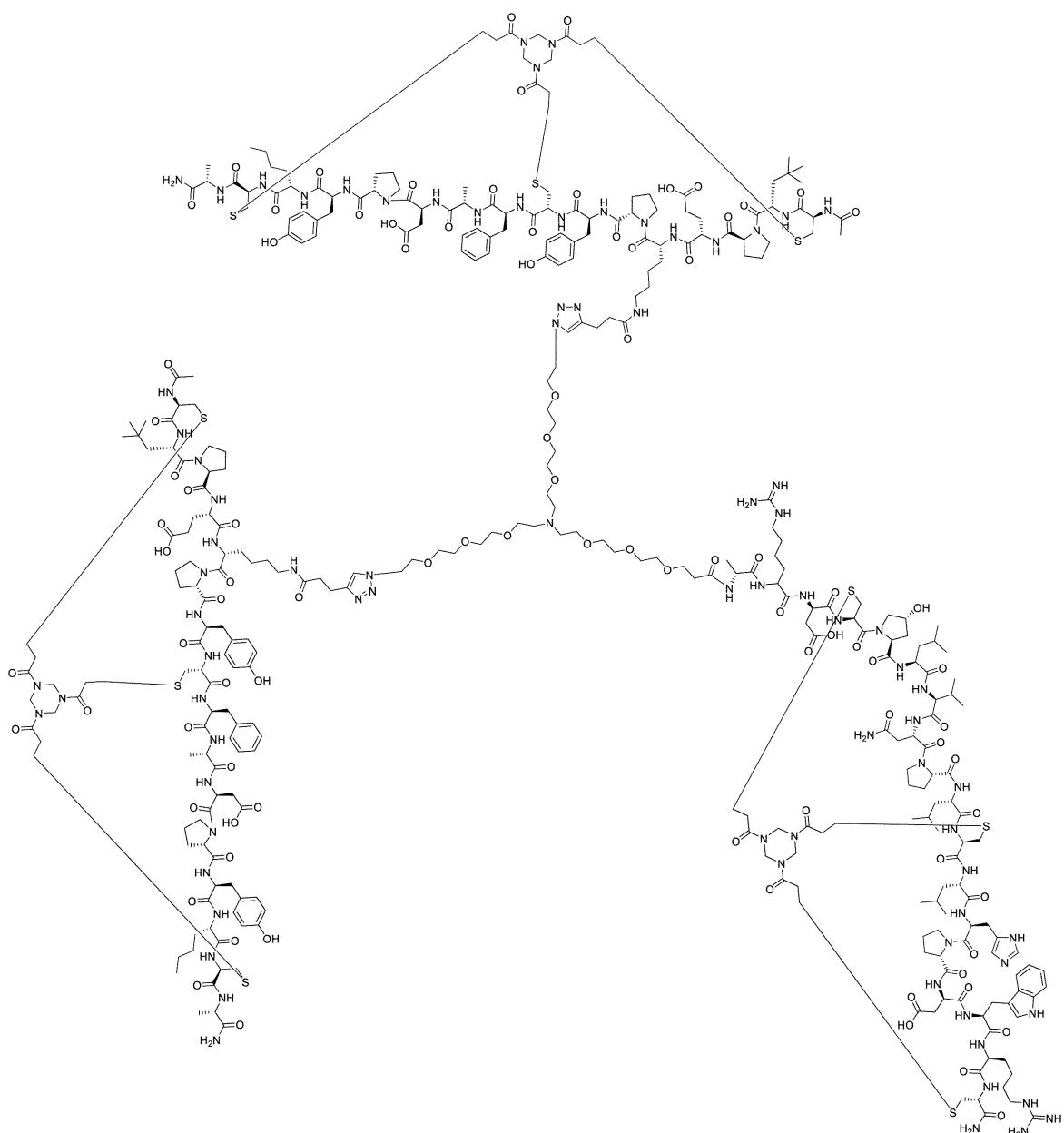
以下：

- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY9594;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12143リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY9594;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12149リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY9594;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12147リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY9594; 10
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12145リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY9594;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12150リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY9594;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12352リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY9594;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12353リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY9594; 20
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12354リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY9594;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12360リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY9594;
- C-末端LysでN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12734;
- Lys8でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12735;
- Lys2でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12736;
- Lys7でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12737; 30
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12738;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12739;
- N-末端でBAPG-(Peg<sub>5</sub>)<sub>2</sub>リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY9594;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12854;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12855; 40
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12856;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12857;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12858;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12859;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12859; 50



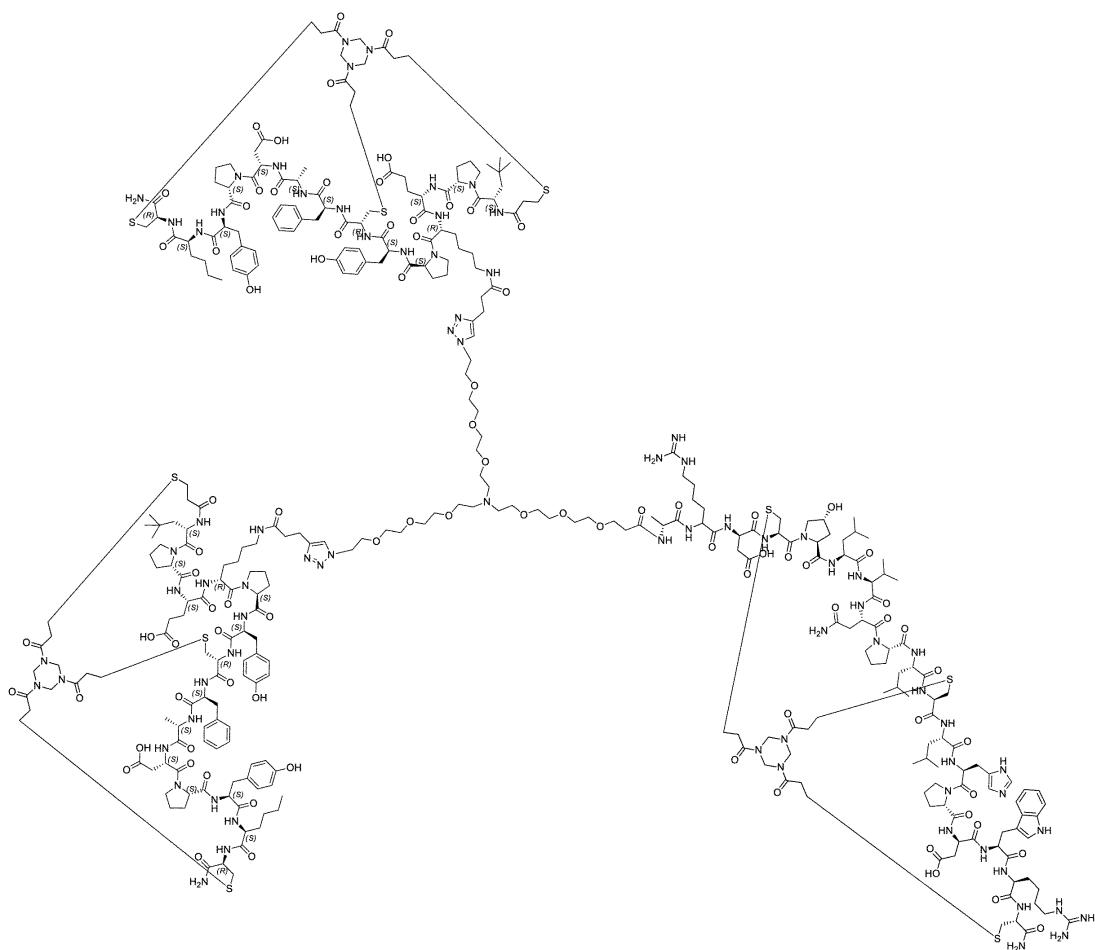
- ンドにdLys (PYA)4で結合したBCY13134;
- N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY13135;
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12353リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12865;
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY12353リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY12860;
  - C-末端dLysでN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY13125;
  - C-末端dLysでN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY13129; 10
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY13133;
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY13917;
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY13918;
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY13919; 20
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY13920;
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY13922;
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY13923;
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY14047; 30
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY14048;
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY14313;
  - Lys 8でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys (PYA)4で結合したBCY14327;
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介してBCY8928にdLys (PYA)4で及びBCY13389にdLys (PYA)4で結合したBCY9594; 40
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介してBCY8928 BCY13389にdLys(PYA)4及びdLys(PYA)4で結合したBCY13118;
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介してBCY14601にdLys(PYA)4で及びBCY14601にdLys(PYA)4で結合したBCY13118;又は
  - N-末端でN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介してBCY8928にdLys(PYA)4で及びBCY14601にdLys(PYA)4で結合したBCY13118;
- 又はその医薬として許容し得る塩、  
を含む、請求項15～20のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。
- 【請求項 22】
- BCY12491 :

【化 1 0】



、BCY12730：

【化 1 1】



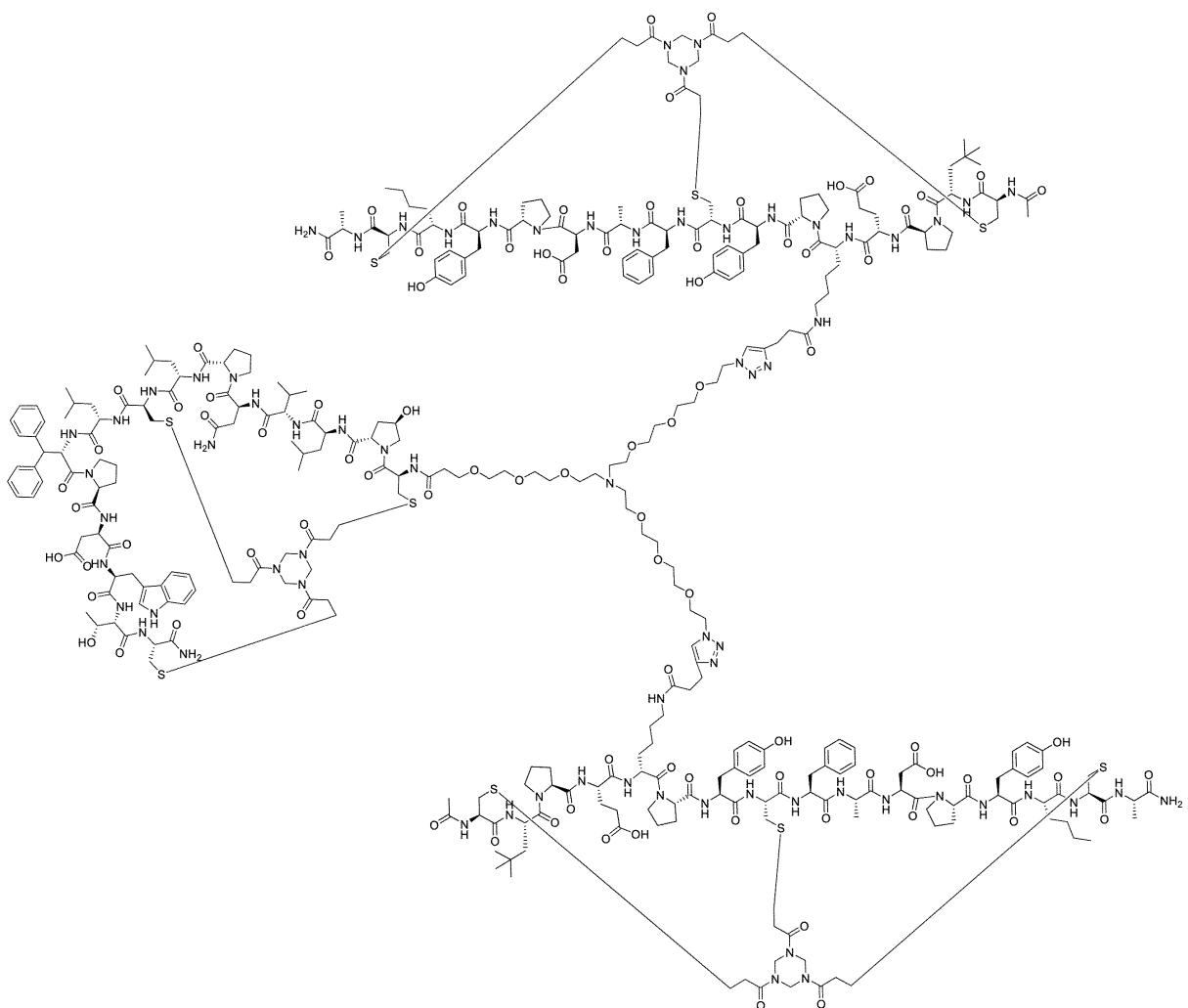
、BCY13048：

30

40

50

【化 1 2】

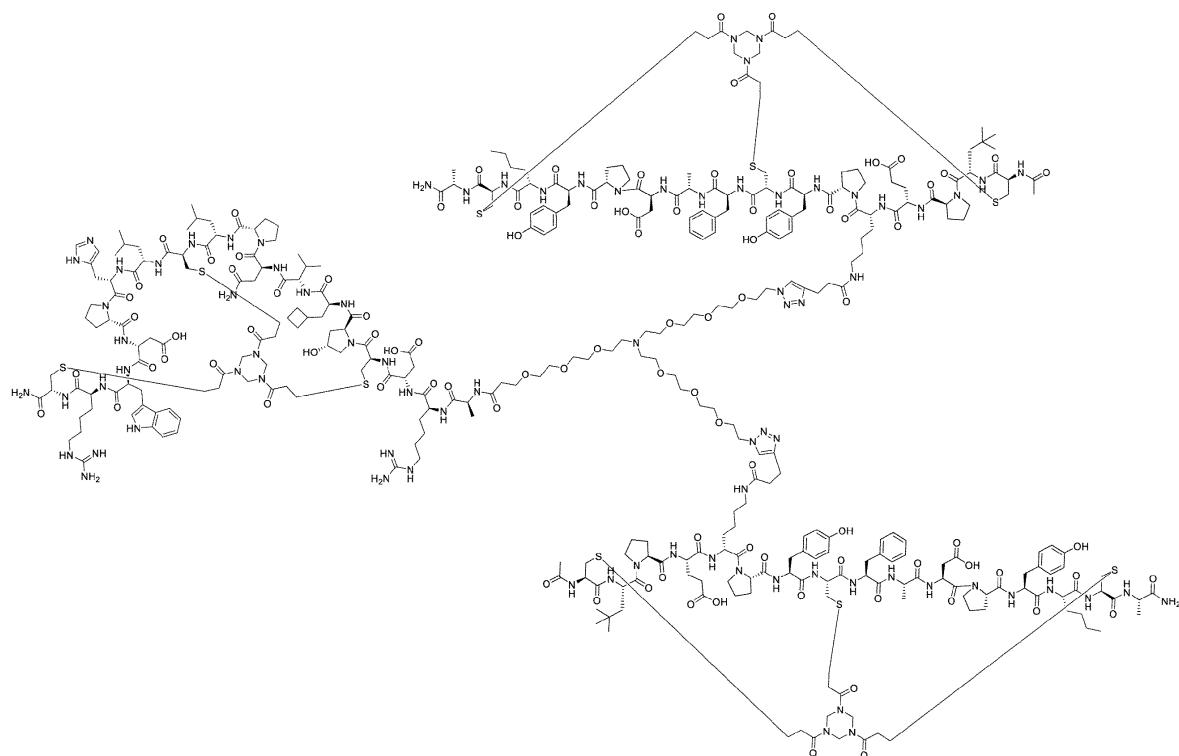


、BCY13050：

40

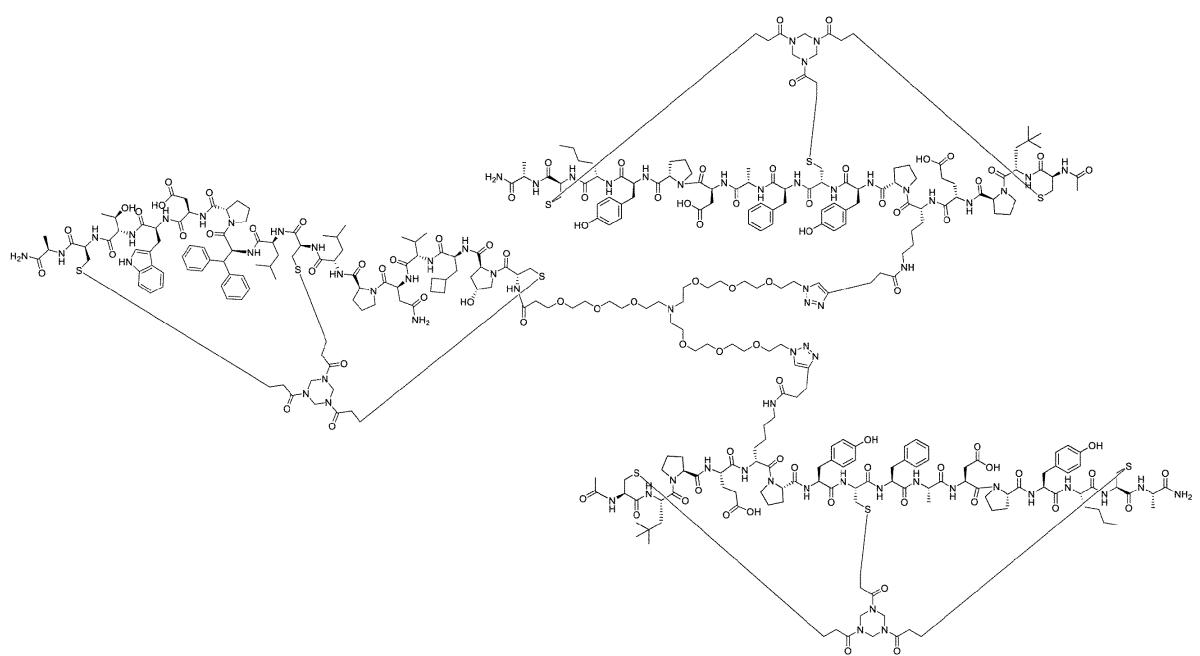
50

【化 1 3】



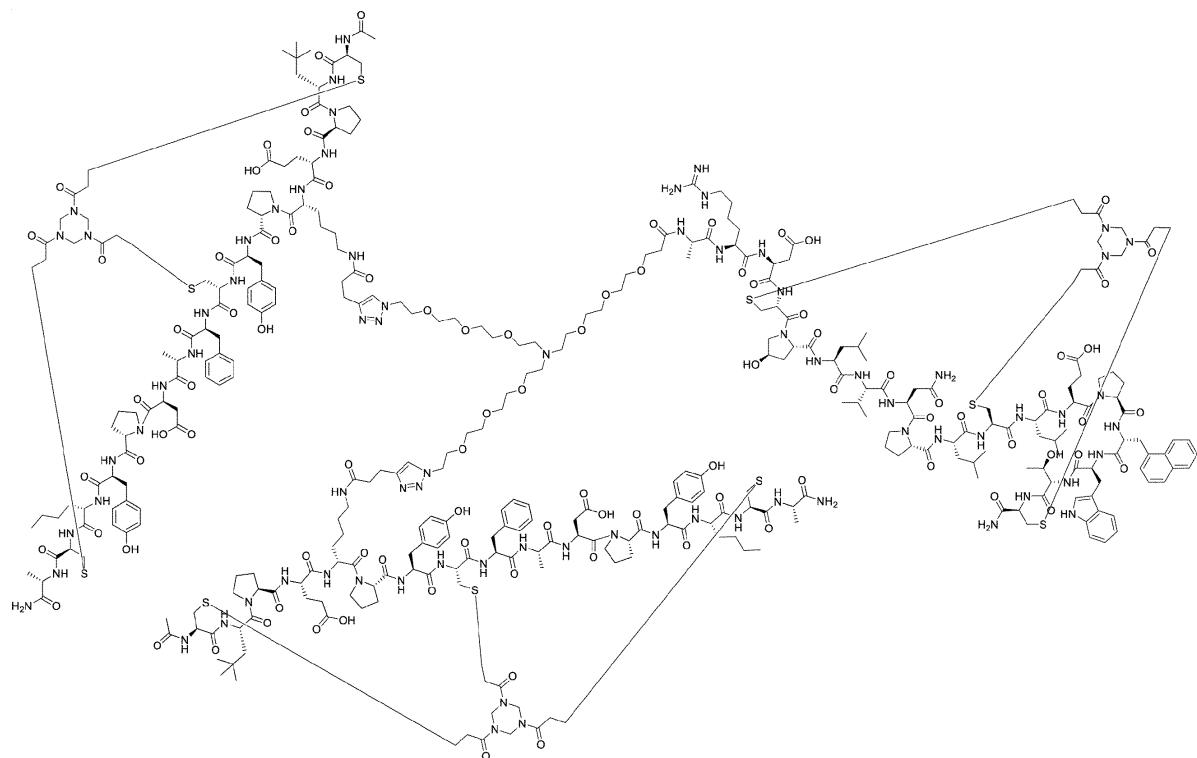
、BCY13053：

【化 1 4】



及 BCY13272：

## 【化 1 5】



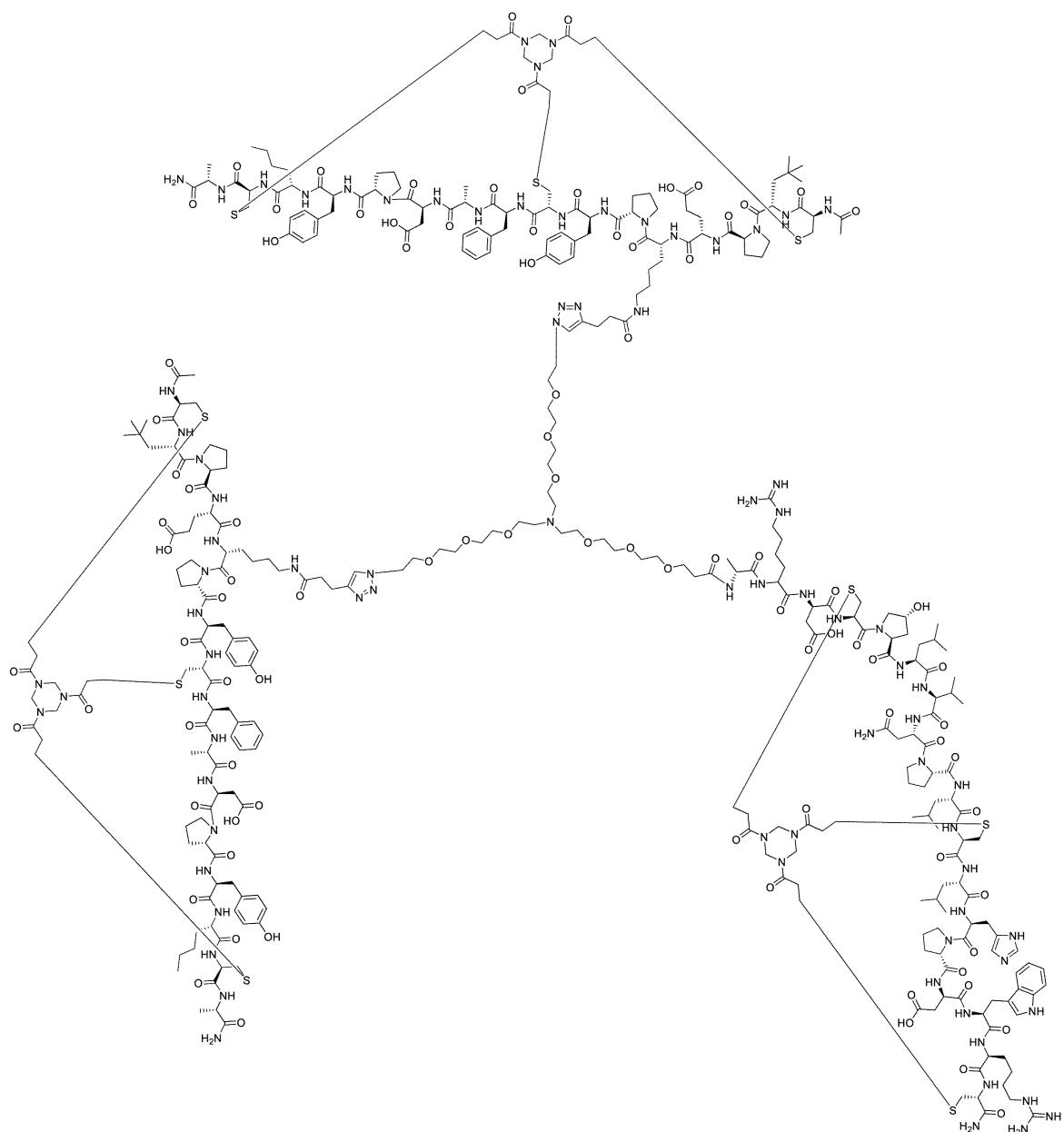
及びその医薬として許容し得る塩、

から選択される、請求項15～21のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項 2 3】

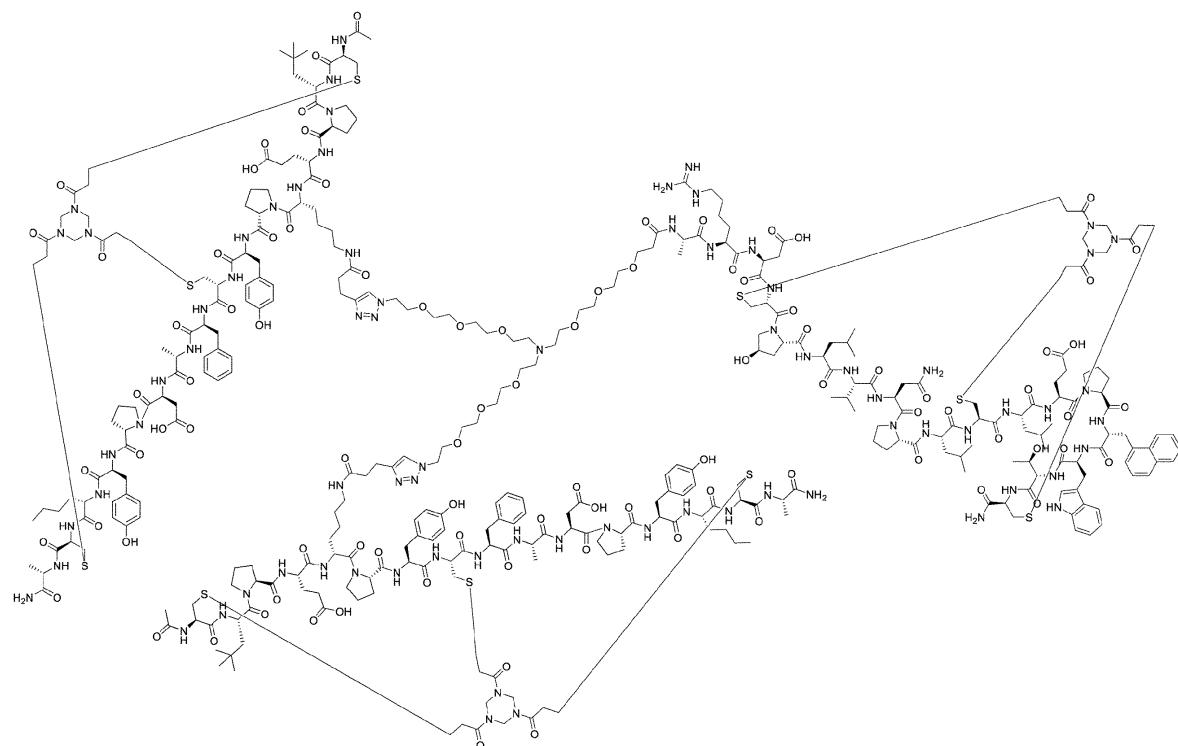
BCY12491 :

【化 1 6】



又はBCY13272 :

## 【化17】



10

20

又はその医薬として許容し得る塩、

である、請求項22記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項24】

前記第一のペプチドリガンドが、以下から選択されるアミノ酸配列：

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>QKLHLC<sub>iii</sub> (配列番号:52);

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[K(PYA)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号:53);

C<sub>i</sub>SKGWLTMC<sub>ii</sub>Q[K(Ac)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号:54);

C<sub>i</sub>SAGWLTKC<sub>ii</sub>Q[K(Ac)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号:55);

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>K[K(Ac)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号:56);

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[K(Ac)]LKLC<sub>iii</sub> (配列番号:57);

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[HArg]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号:58);及び

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>[HArg]QLNLC<sub>iii</sub> (配列番号:59);

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステイン残基を表し、PYAは4-ペンチン酸を表し、かつHArgはホモアルギニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩、

を含むPD-L1結合二環式ペプチドリガンドを含む、請求項1～8のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項25】

前記PD-L1結合二環式ペプチドリガンドが、以下：

[PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-SDK-(配列番号52)(本明細書において、BCY10043と称される);

Ac-D-[HArg]-(配列番号52)-PSH(本明細書において、BCY11865と称される);

Ac-SDK-(配列番号53)(本明細書において、BCY11013と称される);

Ac-SDK-(配列番号53)-PSH(本明細書において、BCY10861と称される);

Ac-D-[HArg]-(配列番号54)-PSH(本明細書において、BCY11866と称される);

Ac-D-[HArg]-(配列番号55)-PSH(本明細書において、BCY11867と称される);

Ac-D-[HArg]-(配列番号56)-PSH(本明細書において、BCY11868と称される);

Ac-D-[HArg]-(配列番号57)-PSH(本明細書において、BCY11869と称される);

30

40

50

Ac-SD-[HArg]-(配列番号58)-PSHK(本明細書において、BCY12479と称される);又は  
Ac-SD-[HArg]-(配列番号59)-PSHK(本明細書において、BCY12477と称される);  
(ここで、PYAは4-ペンチン酸を表し、B-Alaは-D-アラニンを表し、Sar<sub>10</sub>は10個のサル  
コシン単位を表し、かつHArgはホモアルギニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩  
を含むポリペプチドを含む、請求項24記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項26】

以下

- Lys(PYA)9でTCA-[Peg<sub>10</sub>]<sub>3</sub>リンカーを介して2つのBCY8928リガンドにdLys4で結合  
したBCY10861;

- C-末端LysでN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リ  
ガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY12479; 10

- C-末端LysでN-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのBCY8928リ  
ガンドにdLys(PYA)4で結合したBCY12477;

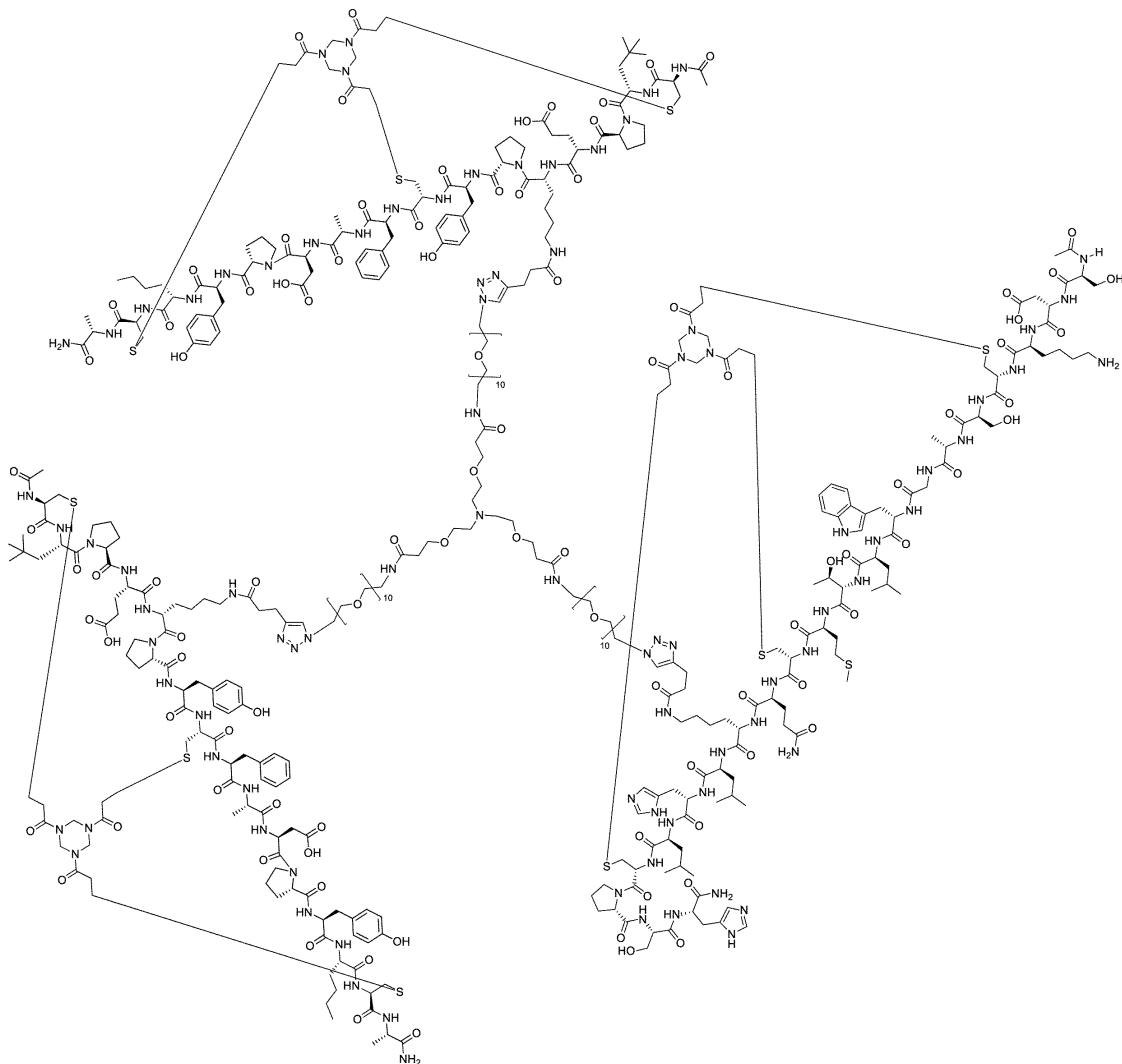
又はその医薬として許容し得る塩、

を含む、請求項24又は25記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項27】

BCY11780:

## 【化18】



BCY00011780

又はその医薬として許容し得る塩である、請求項24～26のいずれか一項記載のヘテロタ

10

20

30

40

50

ンデム二環式ペプチド複合体。

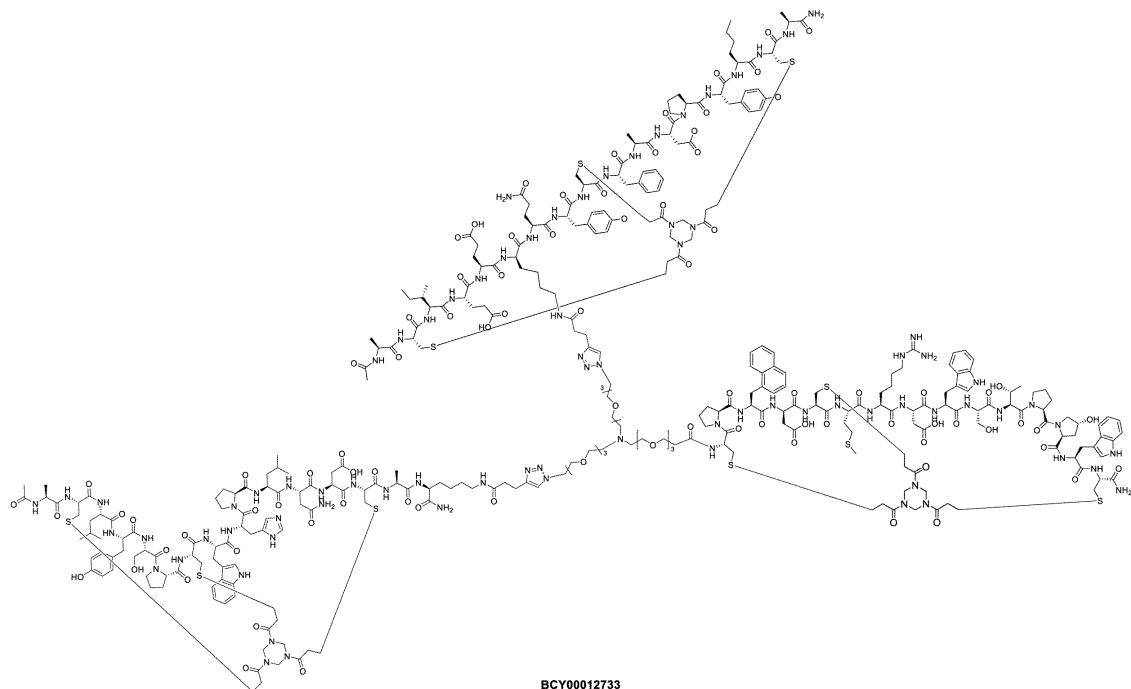
【請求項 28】

前記2以上の第二のペプチドリガンドが1つのCD137結合二環式ペプチドリガンド及び1つのOX40結合二環式ペプチドを含む、請求項1又は2記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項 29】

BCY12733 :

【化 19】



又はその医薬として許容し得る塩である、請求項28記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項 30】

BCY14415 :

10

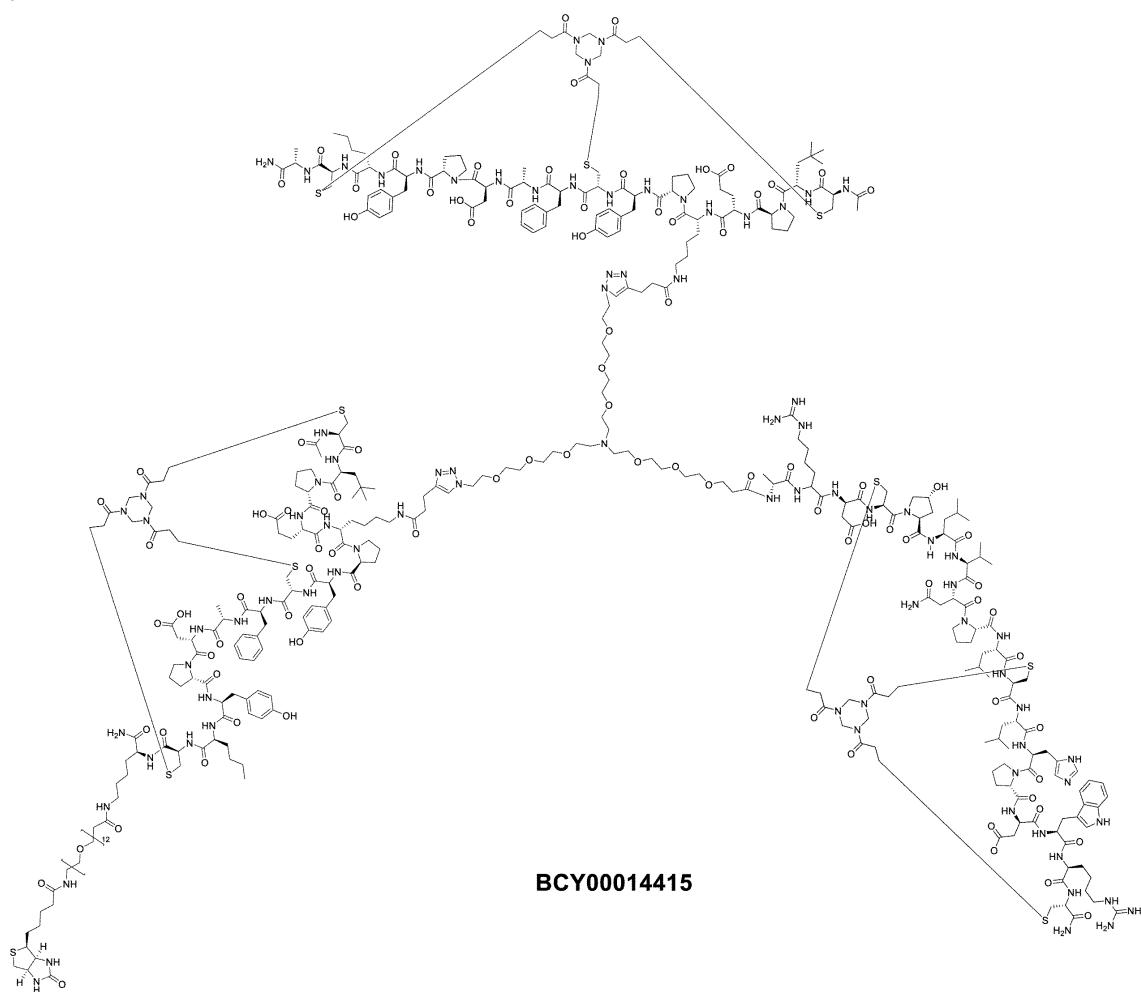
20

30

40

50

【化 2 0】



、 BCY14416：

30

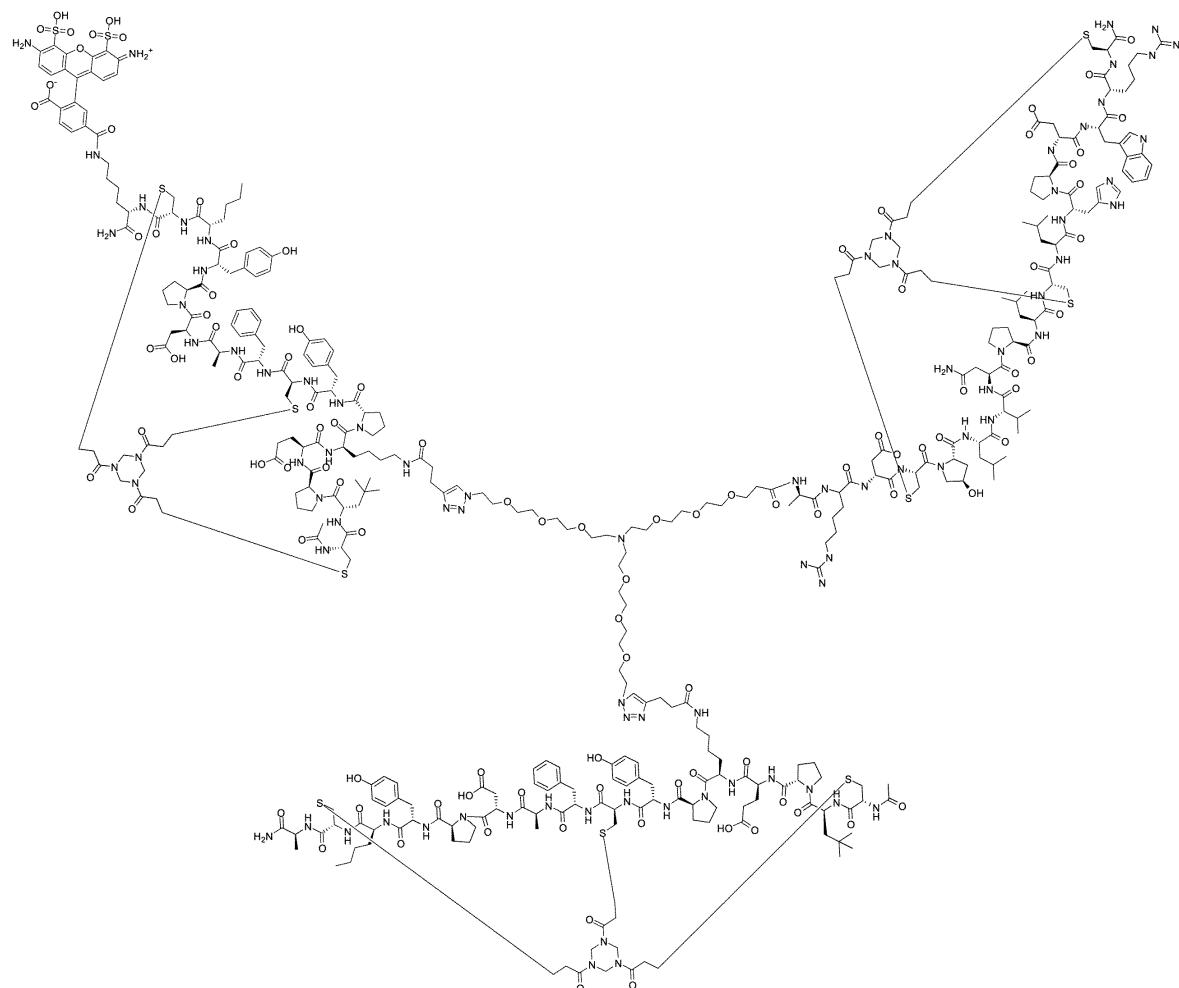
40

50

10

20

## 【化 2 1】



10

20

BCY14416

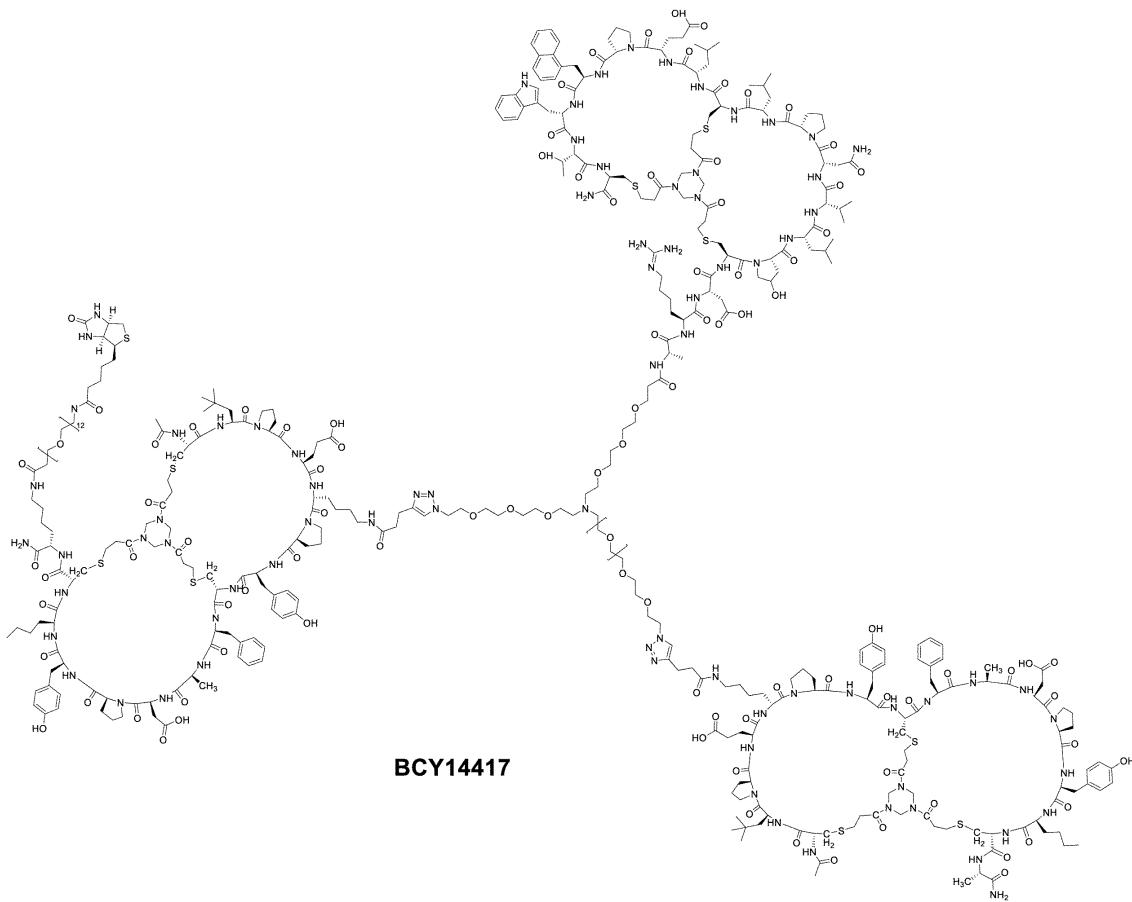
、BCY14417：

30

40

50

【化 2 2】

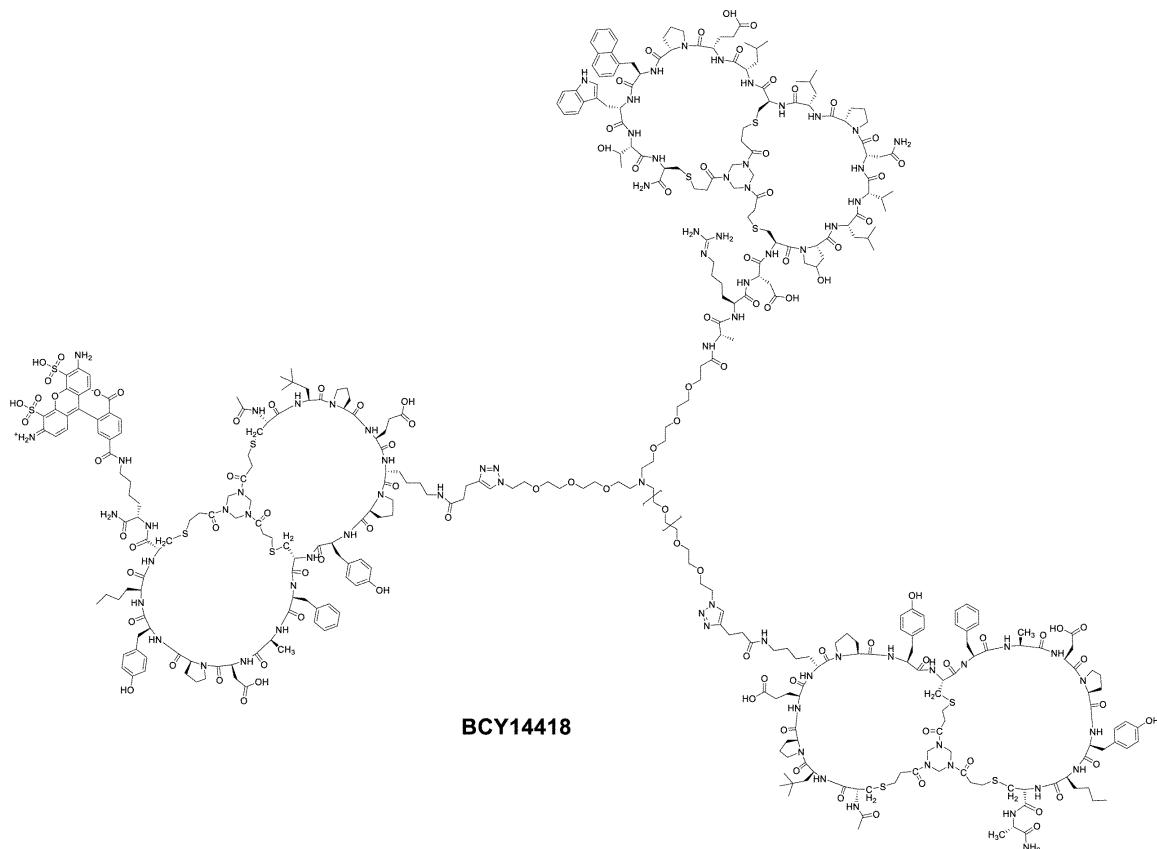


10

20

、BCY14418：

【化 2 3】



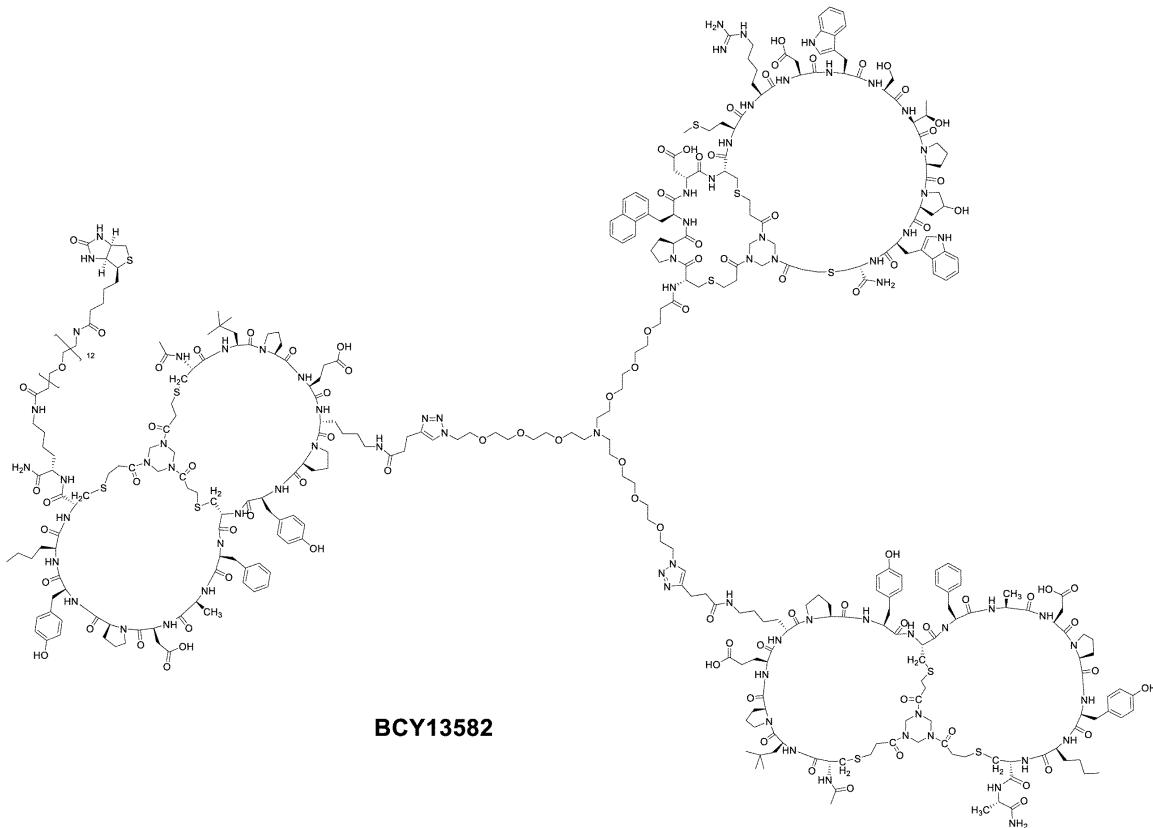
30

40

50

、BCY13582:

【化 2 4】

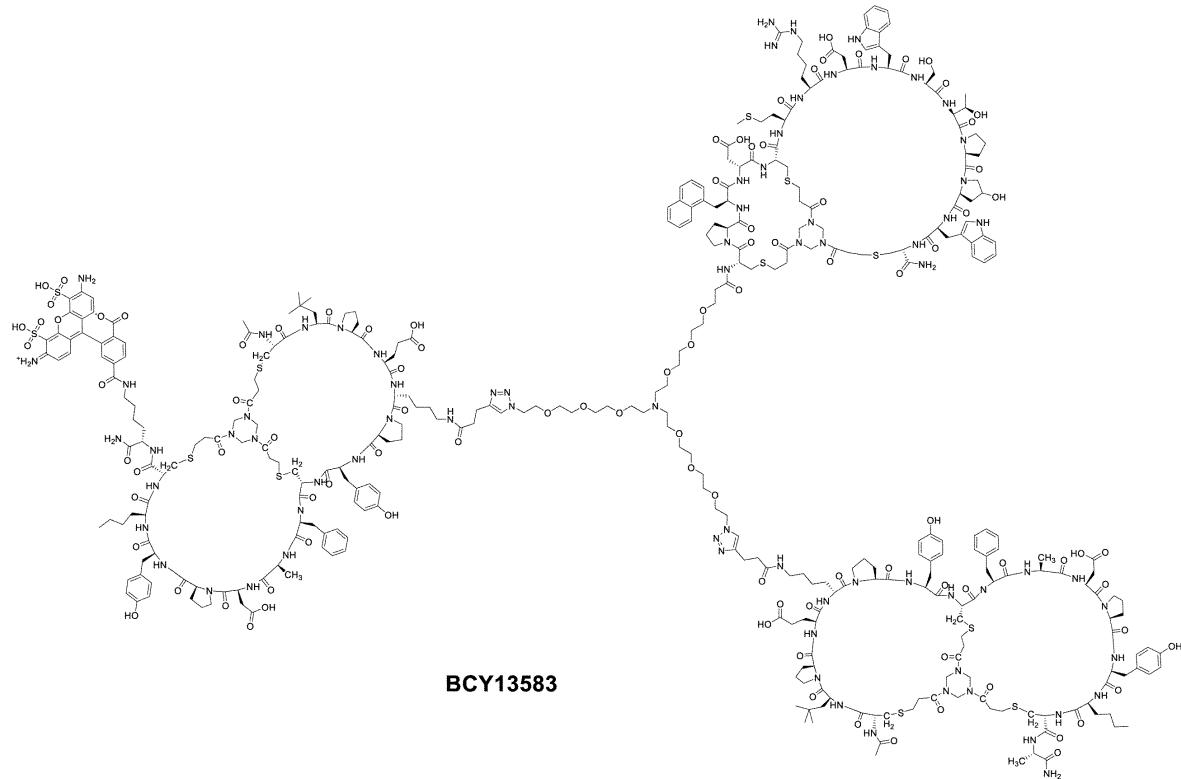


10

20

、BCY13583:

【化 2 5】



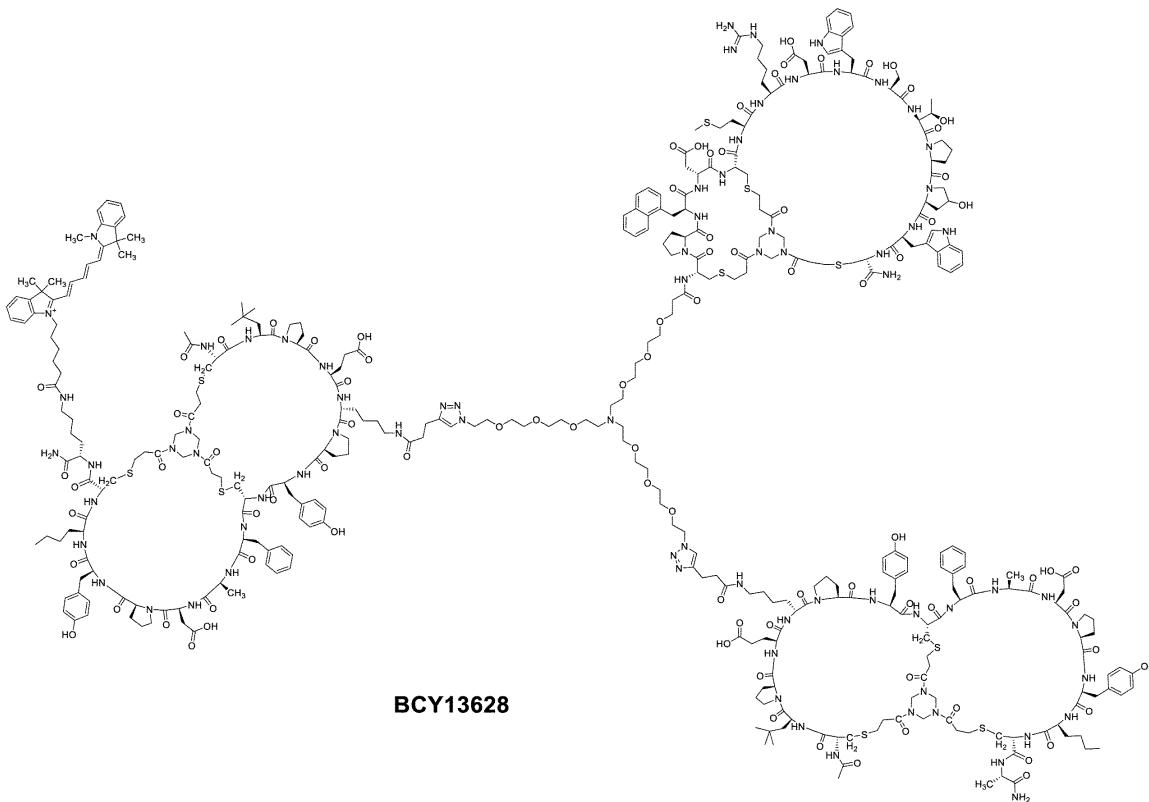
30

40

及 BCY13628:

50

## 【化 2 6】



及びその医薬として許容し得る塩から選択される、請求項1記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項 3 1】

前記免疫細胞が、白血球；リンパ球；CD8もしくはCD4；CD8；樹状細胞、濾胞樹状細胞、及び顆粒球から選択される、請求項1～30のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項 3 2】

前記免疫細胞が、Tリンパ球、T細胞、B細胞、又はナチュラルキラー細胞から選択される、請求項1～31のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項 3 3】

前記癌細胞が、HT1080、A549、SC-OV-3、PC3、HT1376、NCI-H292、LnCap、MC38、MC38 #13、4T1-D02、H322、HT29、T47D、及びRKO腫瘍細胞から選択される、請求項1～32のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項 3 4】

前記分子スキャフォールドが、1,1',1''-(1,3,5-トリアジナン-1,3,5-トリイル)トリプロパ-2-エン-1-オン(TATA)から選択される、請求項1～33のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項 3 5】

前記医薬として許容し得る塩が、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム塩から選択される、請求項1～34のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項 3 6】

細胞毒性剤、放射性キレート剤、及び発色団から選択されるエフェクター基をさらに含む、請求項1～35のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

## 【請求項 3 7】

請求項1～36のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体を含む、医薬組成物。

10

20

30

40

50

**【請求項 3 8】**

癌の予防、抑制、又は治療するための医薬の製造における、請求項1～36のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体の使用。

**【請求項 3 9】**

請求項1～36のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体を含む、癌を治療するための医薬組成物であって、該ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が、インビトロEC<sub>50</sub>を上回る該複合体の血漿濃度を維持しない投薬頻度で投与されるように用いられる、前記医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】**

10

**【0 0 0 1】****(発明の分野)**

本発明は、癌細胞上に存在する構成要素に結合する第一のペプチドリガンドが、リンカーを介して、免疫細胞上に存在する構成要素に結合する2以上の第二のペプチドリガンドにコンジュゲートしたものを含む、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体に関する。本発明はまた、癌の予防、抑制、又は治療における該ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体の使用に関する。

**【背景技術】****【0 0 0 2】**

20

**(発明の背景)**

環状ペプチドは、高い親和性及び標的特異性でタンパク質標的に結合することができ、それゆえ、治療薬の開発のための魅力的な分子クラスである。実際、いくつかの環状ペプチドは、例えば、抗菌ペプチドのバンコマイシン、免疫抑制薬のシクロスボリン、又は抗癌薬のオクトレオチドのように、診療所で使用されるのに既に成功している(Driggersらの文献(2008), Nat Rev Drug Discov 7(7), 608-24)。優れた結合特性は、ペプチドと標的との間で形成される比較的大きな相互作用表面だけでなく、環状構造の立体構造可撓性の低下にも起因する。通常、大環状分子は、環状ペプチドCXCR4アンタゴニストCVX15(400<sup>2</sup>; Wuらの文献(2007), Science 330, 1066-71)、インテグリン Vb3に結合するArg-Gly-Aspモチーフを有する環状ペプチド(355<sup>2</sup>)(Xiongらの文献(2002), Science 296(5565), 151-5)、又はウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子に結合する環状ペプチド阻害剤ウパイン-1(603<sup>2</sup>; Zhaoらの文献(2007), J Struct Biol 160(1), 1-10)のように、数百平方オングストロームの表面に結合する。

**【0 0 0 3】**

その環状立体配置のために、ペプチド大環状分子は、直鎖状ペプチドよりも可撓性が低く、標的に結合したときのエントロピー損失がより小さくなり、結果的に、より高い結合親和性が生じる。可撓性の低下はまた、標的特異的立体構造の固定をもたらし、直鎖状ペプチドと比較して結合特異性を増加させる。この効果は、その環が開いたときに、他のMMPに対するその選択性を失うマトリックスマタロプロテイナーゼ8(MMP-8)の強力かつ選択性的な阻害剤によって例証されている(Cherneyらの文献(1998), J Med Chem 41(11), 1749-51)。大環状化によって達成される有利な結合特性は、例えば、バンコマイシン、ナイシン、及びアクチノマイシンのような、複数のペプチド環を有する多環性ペプチドにおいてさらにより顕著である。

30

**【0 0 0 4】**

様々な研究チームが、以前に、システイン残基を有するポリペプチドを合成分子構造に繋いでいる(Kemp及びMcNamaraの文献(1985), J. Org. Chem; Timmermanらの文献(2005), ChemBioChem)。Meloen及び共同研究者らは、トリス(プロモメチル)ベンゼン及び関連分子をタンパク質表面の構造的模倣用の合成スキャフォールド上での複数のペプチドループの迅速かつ定量的な環化に使用した(Timmermanらの文献(2005), ChemBio Chem)。候補薬物化合物(ここで、該化合物は、システイン含有ポリペプチドを、例えば、トリス(プロモメチル)ベンゼンのような分子スキャフォールドに連結させることにより作

40

50

製される)の作製方法は、WO 2004/077062号及びWO 2006/078161号に開示されている。

【0005】

対象となる標的に対する二環式ペプチドの大型ライプラリーを作製及びスクリーニングするためのファージディスプレイに基づくコンビナトリアルアプローチが開発されている(Heinisらの文献(2009), Nat Chem Biol 5(7), 502-7及びWO 2009/098450号)。簡潔に述べると、3つのシステイン残基及び2つのランダムな6アミノ酸領域を含有する直鎖状ペプチド(Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys)のコンビナトリアルライプラリをファージ上に提示させ、システイン側鎖を低分子(トリス-(プロモメチル)ベンゼン)に共有結合させることにより環化させた。

10

【発明の概要】

【0006】

(発明の概要)

本発明の第一の態様によれば、

- (a)癌細胞上に存在する構成要素に結合する第一のペプチドリガンド;がリンカーを介して、
  - (b)免疫細胞上に存在する構成要素に結合する2以上の第二のペプチドリガンド;
- にコンジュゲートしたもの

を含み、ここで、該ペプチドリガンドの各々が少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つの反応基を含むポリペプチド及び該ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する分子スキャフォールドを含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子スキャフォールド上に形成される、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

20

【0007】

本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義されるヘテロタンデム二環式ペプチド複合体を1以上の医薬として許容し得る賦形剤との組合せで含む医薬組成物が提供される。

【0008】

本発明のさらなる態様によれば、癌の予防、抑制、又は治療において使用するための本明細書で定義されるヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0009】

30

(図面の簡単な説明)

【図1】図1: (A)ネクチン-4発現H292細胞の存在下でのPromega CD137ルシフェラーゼレポーターアッセイにおけるネクチン-4/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体の解析。BCY11617は、BCY11863と同じ親和性でネクチン-4に結合するが、CD137には結合しないヘテロタンデム二環式ペプチド複合体である。(B)内在性にネクチン-4を発現するか又はネクチン-4を過剰発現するように変更されている様々な細胞株との共培養下でのPromega CD137ルシフェラーゼレポーターアッセイにおけるBCY11863のEC50(nM)のまとめ。

【図2】図2: ネクチン-4/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、PBMC-4T1共培養アッセイにおいてIFN- $\gamma$ (図2A)及びIL-2(図2B)サイトカイン分泌を誘導する。4T1細胞を、ネクチン-4を発現するように変更した。BCY11617は、BCY11863と同じ親和性でネクチン-4に結合するが、CD137には結合しないヘテロタンデム二環式ペプチド複合体である。図2Cは、多数のヒトPBMCドナー及び腫瘍細胞株を用いたサイトカイン分泌アッセイにおけるBCY11863のEC50(nM)のまとめを表している。

40

【図3】図3: それぞれ、2mg/kg(n=3)及び1mg/kg(n=2)でIV投与されたSDラット及びカニクイザル(cyno)におけるヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY11863の薬物動態。

【図4】図4: 同系ネクチン-4過剰発現MC38腫瘍モデル(MC38#13)におけるBCY11863のMC38#13抗腫瘍活性。BCY11863処置時及び処置後の腫瘍体積。D69の完全レスポンダー(CR)マウスの数が括弧内に示されている。QD: 毎日の投与; Q3D: 3日毎の投与; ip:

50

腹腔内投与。

【図 5】図5: BCY11863処置は、ネクチン-4過剰発現MC38腫瘍モデルに対する免疫原性記憶をもたらす。未処置C57BL/6J-hCD137マウス又はBCY11863に対する完全応答(CR)を有していたマウスへの接種後のMC38#13腫瘍体積。CRマウスはいずれも観察期間の終了(22日)までに腫瘍を発生させなかつことに留意されたい。

【図 6】図6: BCY11863は、同系ネクチン-4過剰発現CT26腫瘍モデル(CT26#7)において抗腫瘍活性を示す。BCY11863処置時のCT26#7腫瘍体積。Q3D: 3日毎の投与; ip: 腹腔内投与。

【図 7】図7: BCY11863の最後(6回目)のQ3D投与から1時間後のCT26#7腫瘍組織における全T細胞及びCD8+ T細胞の増加。BCY11863の最後のQ3D投与から1時間後のCT26#7腫瘍組織における全T細胞、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、Treg、及びCD8+ T細胞/Treg比の解析。

【図 8】図8: 5mg/kgのBCY11863の単一静脈内(iv)投与後のCT26#7同系腫瘍担持動物の血漿及び腫瘍組織におけるBCY11863の薬物動態プロファイル。

【図 9】図9: 同系MC38腫瘍モデルにおけるBCY12491の抗腫瘍活性。BCY12491処置時及びBCY12491処置後のMC38腫瘍体積。D73の完全レスポンダー(CR)マウスの数が括弧内に示されている。QD: 毎日の投与; Q3D: 3日毎の投与; ip: 腹腔内投与。

【図 10】図10: EphA2/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY12491は、MC38共培養アッセイにおいてIFN- $\gamma$ サイトカイン分泌を誘導する。BCY12762は、BCY12491と同じ親和性でEphA2に結合するが、CD137には結合しないヘテロタンデム二環式ペプチド複合体である。(A)ドナー1=患者228769、EC<sub>50</sub>=34pM。(B)ドナー2=患者228711、EC<sub>50</sub>=85pM。

【図 11】図11: CD-1マウス(n=3)における15mg/kg腹腔内用量から得られたBCY11863及びBCY12491の血漿濃度対時間曲線、並びにBCY11863及びBCY12491の終末相血漿半減期。

【図 12】図12: カニクイザル(n=2)における1mg/kgの15分間のIV注入後のヘテロタンデム二重特異性複合体BCY12491の血漿濃度対時間プロット。

【図 13】図13: BCY11027は、原発性患者由来肺腫瘍のエクスピボ培養物において標的依存的なサイトカイン放出を誘導する。(A)エクスピボの患者由来腫瘍細胞は、培養下で4時間以内に3Dスフェロイドを形成する。光学顕微鏡下の10X画像。(B)患者由来腫瘍試料におけるネクチン-4発現のフロー解析。表は、3つのドナー試料における%CD137+ T細胞及びネクチン-4+細胞を示している。(C)BCY11027による処置に応答した%CD8+ki67+ T細胞。(D)BCY11027の濃度の関数としてのIL-2サイトカイン放出(バックグラウンド減算したもの)。(E)対照/試験化合物による処置に応答した免疫マーカーの%変化(ヒヒクルに対して正規化したもの)を示すヒートマップ。

【図 14】図14: OX40L及び非結合対照ペプチドBCY12968と比較した腫瘍細胞との共培養下でのPromega OX40細胞活性アッセイにおけるBCY12967の結果。

【図 15】図15: マウス腫瘍モデルにおけるBCY12491の結果。BCY12491及び抗CD137処置は、処置開始後D6のMC38同系腫瘍における(A)細胞傷害性細胞スコア、(B)T細胞スコア、並びに(C)マクロファージ細胞スコア及びCD8+細胞浸潤(D)を増大させる。

【図 16】図16: EphA2を発現するA549、PC-3、及びHT29細胞(n=3)の存在下でのPromega CD137ルシフェラーゼレポーターアッセイにおけるEphA2/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY13272の解析。BCY13626は、BCY13272と類似しているが、D-アミノ酸を含み、かつEphA2にもCD137にも結合しないヘテロタンデム二環式ペプチド複合体である。

【図 17】図17: CD1マウス(n=3)における5.5mg/kg IV投与、SDラット(n=3)における3.6mg/kg IV注入(15分)、及びカニクイザル(n=2)における8.9mg/kg IV注入(15分)から得られたBCY13272の血漿濃度対時間プロット。BCY13272の薬物動態プロファイルは、CD-1マウスでは2.9時間、SDラットでは2.5時間、及びカニクイザルでは8.9時間の終末相半減期を有する。

10

20

30

40

50

【図18】図18: 同系MC38腫瘍モデルにおけるBCY13272の抗腫瘍活性。(A)BCY13272処置時及びBCY13272処置後のMC38腫瘍体積。D28の完全レスポンダー(CR)マウスの数(及びD62でCRのままであるマウスの数)が括弧内に示されている。BIW: 週2回の投与; IV: 静脈内投与。(B)MC38腫瘍細胞移植後のBCY13272に対する完全レスポンダー動物及び年齢をマッチさせた未処置対照動物の腫瘍増殖曲線。CR: 完全レスポンダー。

【図19】図19: BCY13272は、(A)PBMC/MC38及び(B)PBMC/HT29共培養アッセイにおいてIFN- $\gamma$ サイトカイン分泌を誘導する。BCY12762は、EphA2に結合するが、CD137には結合しないヘテロタンデム二環式ペプチド複合体である。BCY13692は、CD137に結合するが、EphA2には結合しないヘテロタンデム二環式ペプチド複合体である。(C)MC38(マウス)細胞株と5つのPBMCドナー及びHT1080(ヒト)細胞株と4つのPBMCドナーを用いるPBMC共培養アッセイにおけるBCY13272誘導性IL-2及びIFN- $\gamma$ 分泌のEC50(nM)値のプロット。

【図20】図20: 固定された(A)EphA2及び(B)CD137に対するBCY13272の表面プラズモン共鳴(SPR)結合。

【図21】図21: 固定された(A)ネクチン-4及び(B)CD137に対するBCY11863の表面プラズモン共鳴(SPR)結合試験。(C)CD137及び(D)ネクチン-4をSPRチップ上に固定し、その後、BCY11863を捕捉する二重結合SPRアッセイ。可溶性ヒトネクチン-4(C)又はCD137(D)に対する結合したBCY11863の親和性は、可溶性受容体を様々な濃度でチップ上に流すことにより測定される。(E)ストレプトアビジンSPRチップ上に固定されたBCY13582(ビオチン化BCY11863)の可溶性ヒトCD137への結合。

【図22】図22: BCY13582(ビオチン化BCY11863)の非特異的オフターゲット相互作用を検討するために使用されたRetrogenixの細胞マイクロアレイ技術。ここに示されているのは、11種の異なるタンパク質を発現するマイクロアレイスライドに添加された1  $\mu$ MのBCY13582のみがCD137及びネクチン-4に結合することを示すスクリーニングデータである(AlexaFluor647標識ストレプトアビジンを用いて検出した)。結合シグナルは、BCY11863とともにインキュベートされたときに変位する。

【図23】図23: huCD137 C57Bl/6マウスにおけるMC38#13腫瘍の腫瘍増殖曲線は、様々な用量及び投与間隔の後のBCY11863の抗腫瘍活性を示している。処置開始後15日目の完全レスポンダー動物の数(CR;触診可能な腫瘍なし)が括弧内に示されている。

【図24】図24: huCD137 C57Bl/6マウスにおけるMC38#13腫瘍(n=6/コホート)の腫瘍増殖曲線(平均  $\pm$  SEM)は、様々な用量及び投与スケジュールでのBCY11863の抗腫瘍活性を示している。処置開始後52日での完全レスポンダー動物の数(CR;触診可能な腫瘍なし)が括弧内に示されている。(A)ビヒクル又は3mg/kgの週当たり総用量のBCY11863が投与されたコホート。(B)ビヒクル又は10mg/kgの週当たり総用量のBCY11863が投与されたコホート。(C)ビヒクル又は30mg/kgの週当たり総用量のBCY11863が投与されたコホート。

【図25】図25: 100mg/kgでIV投与されたSDラット(n=3)におけるヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY11863の薬物動態並びに血漿中のBCY11863並びに潜在的代謝産物BCY15155及びBCY14602の濃度の測定。

【図26】図26: EphA2/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、PBMC-MC38共培養アッセイ(A、B、C)においてIFN- $\gamma$ サイトカイン分泌を誘導する。BCY12762及びBCY12759は、1:2及び1:1のヘテロタンデム複合体であり、この場合、CD137二環は、全てのD-アミノ酸非結合対照と置き換えられる。

【図27】図27: A)27日目までのhuCD137 C57Bl/6マウス(n=6/コホート)におけるMC38腫瘍の増殖曲線は、様々な用量及び投与スケジュールでのBCY12491の抗腫瘍活性を示している。B)73日目までのMC38腫瘍の個々の腫瘍増殖測定。完全レスポンダー動物の数(CR;触診可能な腫瘍なし)が括弧内に示されている。C)MC38細胞が移植された完全レスポンダー動物又は未処置対照動物から得られた腫瘍増殖曲線(n=5/コホート)。腫瘍定着率(触診可能な腫瘍増殖を有する動物の%)が括弧内に示されている。

【図28】図28: BCY12491活性はCD8+ T細胞に依存的であるが、NK細胞には依存的で

10

20

30

40

50

ない。(A)CD8+細胞及び/もしくはNK細胞が除去された(D-5、D0、及びD5)又はビヒクルもしくはアイソタイプ対照抗体で処置されたMC38 #13腫瘍担持マウスは、15mg/kg BCY12491又はビヒクルの4回のBIW投与を受容した。(B)グラフ(A)に対応する生存データ(ここで、生存事象は2000mm<sup>3</sup>を超える腫瘍体積である)。処置開始後の生存時間中央値が括弧内に示されている。未確定の生存時間は、28日目(試験の終了)までに生存時間中央値に到達していないことを意味する。

【図29】図29: huCD137 C57Bl/6マウスにおける個々のMC38腫瘍の増殖曲線は、15mg/kgの用量のQ3D投与スケジュールでのBCY12491、BCY12730、及びBCY12723の抗腫瘍活性を示している。処置開始後28日での完全レスポンダー動物の数(CR;触診可能な腫瘍なし)が括弧内に示されている。

【図30】図30: huCD137 C57Bl/6マウス(n=6/コホート)におけるMC38腫瘍の増殖曲線は、5mg/kgの用量のBIW投与スケジュールでのBCY12491、BCY13048、及びBCY13050の抗腫瘍活性を示している。処置開始後28日での完全レスポンダー動物の数(CR;触診可能な腫瘍なし)が括弧内に示されている。

【発明を実施するための形態】

【0010】

(発明の詳細な説明)

本発明の第一の態様によれば、

(a)癌細胞上に存在する構成要素に結合する第一のペプチドリガンド;がリンカーを介して、  
(b)免疫細胞上に存在する構成要素に結合する2以上の第二のペプチドリガンド;  
にコンジュゲートしたもの

を含み、ここで、該ペプチドリガンドの各々が少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つの反応基を含むポリペプチド及び該ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する分子スキャフォールドを含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子スキャフォールド上に形成される、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

【0011】

言及され得る本発明の一態様によれば、

(a)癌細胞上に存在する構成要素に結合する第一のペプチドリガンド;がリンカーを介して、  
(b)免疫細胞上に存在する構成要素に結合する2以上の第二のペプチドリガンド;  
にコンジュゲートしたもの

を含み、ここで、該ペプチドリガンドの各々が少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つのシステイン残基を含むポリペプチド及び該ポリペプチドのシステイン残基と共有結合を形成する分子スキャフォールドを含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子スキャフォールド上に形成される、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

【0012】

(第一のペプチドリガンド)

「癌細胞」という用語への本明細書における言及は、癌に関与することが知られている任意の細胞を含む。癌細胞は、細胞分裂の調節に関与する遺伝子が損傷を受けたときに生み出される。発癌は、増殖と細胞死との間の正常な均衡を壊す正常細胞の遺伝物質の突然変異及びエピ突然変異によって生じる。この結果として、制御されない細胞分裂及び体内での自然淘汰によるこれらの細胞の進化が起こる。制御されない、かつ多くの場合、急速な細胞増殖は、良性又は悪性腫瘍(癌)を生じさせ得る。良性腫瘍は、体の他の部分に拡大することも、他の組織に侵入することもない。悪性腫瘍は、他の器官に侵入し、遠隔部位に拡大し(転移)、生命を脅かすものとなり得る。

【0013】

一実施態様において、癌細胞は、HT1080、A549、SC-OV-3、PC3、HT1376、NCI-H292、LnCap、MC38、MC38 #13、4T1-D02、H322、HT29、T47D、及びRKO腫瘍細胞から選択される。

**【 0 0 1 4 】**

一実施態様において、癌細胞上に存在する構成要素は、ネクチン-4である。

**【 0 0 1 5 】**

ネクチン-4は、4つのメンバーを含むネクチンファミリーのタンパク質に属する表面分子である。ネクチンは、発生及び成体期における上皮、内皮、免疫、及び神経細胞の極性、増殖、分化、及び遊走などの様々な生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たす細胞接着分子である。これらは、ヒトにおけるいくつかの病理学的プロセスに関与する。これらは、ポリオウイルス、単純ヘルペスウイルス、及び麻疹ウイルスの主要な受容体である。ネクチン-1(PVRL1)又はネクチン-4(PVRL4)をコードする遺伝子の突然変異は、他の異常と関連する外胚葉異形成症候群を引き起こす。ネクチン-4は、胎児発生期に発現される。成体組織では、その発現がファミリーの他のメンバーの発現よりも制限される。ネクチン-4は、乳癌、卵巣癌、及び肺癌の、それぞれ、50%、49%、及び86%における、主に、予後不良の腫瘍上の腫瘍関連抗原である。その発現は、対応する正常組織では検出されない。乳房腫瘍において、ネクチン-4は、主に、トリプルネガティブかつERBB2+の癌で発現される。これらの癌を有する患者の血清において、可溶性形態のネクチン-4の検出は、予後不良と関連している。血清ネクチン-4のレベルは、転移進行期に増大し、治療後に減少する。これらの結果は、ネクチン-4が癌の治療のための信頼できる標的となり得ることを示唆している。したがって、いくつかの抗ネクチン-4抗体が従来技術において記載されている。特に、エンホルツマブベドチン(ASG-22ME)は、ネクチン-4を標的とする抗体-薬物コンジュゲート(ADC)であり、固形腫瘍に罹患している患者の治療のために、現在、臨床研究されている。

10

20

**【 0 0 1 6 】**

一実施態様において、第一のペプチドリガンドは、ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドを含む。

**【 0 0 1 7 】**

ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドの好適な例は、そのペプチドが引用により本明細書中に組み込まれるWO 2019/243832号に開示されている。

**【 0 0 1 8 】**

一実施態様において、ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドは、

30

40

50

## 【化1】

$C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号1;本明細書において、BCY8116と称される);

$C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]D[dW]STP[HyP][dW]C_{iii}$  (配列番号2);

$C_iP[1Nal][dK](Sar_{10}-(B-Ala))C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号3);

$C_iPFGC_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号4;本明細書において、BCY11414と称される);

$C_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号14);

$[MerPro]_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号15;本明細書において、BCY12363と称される);

$C_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]W[Cysam]_{iii}$  (配列番号16);

$[MerPro]_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]W[Cysam]_{iii}$  (配列番号17;本明細書において、BCY12365と称される);

$C_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HArg]HWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号18);

$C_iP[1Nal][dK]C_{ii}M[HArg]EWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号19);

$C_iP[1Nal][dE]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号20;本明細書において、BCY12368と称される);

$C_iP[1Nal][dA]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号21;本明細書において、BCY12369と称される);

$C_iP[1Nal][dE]C_{ii}L[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号22;本明細書において、BCY12370と称される);及び

$C_iP[1Nal][dE]C_{ii}M[HArg]EWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号23;本明細書において、BCY12384と称される);

(ここで、 $[MerPro]_i$ 、 $C_i$ 、 $C_{ii}$ 、 $C_{iii}$ 、及び $[Cysam]_{iii}$ は、システイン、MerPro、及びCysamから選択される第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)の反応基を表し、 $1Nal$ は1-ナフチルアラニンを表し、 $HArg$ はホモアルギニンを表し、 $HyP$ はtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、 $Sar_{10}$ は10個のサルコシン単位を表し、 $B-Ala$ は-D-アラニンを表し、MerProは3-メルカプトプロピオン酸を表し、かつCysamはシステアミンを表す)

:から選択されるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む。

## 【0019】

さらなる実施態様において、ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドは、

## 【化2】

$C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号1;本明細書において、BCY8116と称される);

$C_iP[1Nal][dK](Sar_{10}-(B-Ala))C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号3);及び

$C_iPFGC_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (配列番号4;本明細書において、BCY11414と称される);

(ここで、 $C_i$ 、 $C_{ii}$ 、及び $C_{iii}$ は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステイン残基を表し、 $1Nal$ は1-ナフチルアラニンを表し、 $HArg$ はホモアルギニンを表し、 $HyP$ はtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、 $Sar_{10}$ は10個のサルコシン単位を表し、 $B-Ala$ は-D-アラニンを表す)

:から選択されるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む。

## 【0020】

さらなる実施態様において、ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドは、任意にN-末端

10

20

30

40

50

修飾を含み、かつ

配列番号1(本明細書において、BCY8116と称される);  
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-  
 (配列番号1)(本明細書において、BCY8846と称される);  
 [PYA]-  
 (配列番号1)(本明細書において、BCY11015と称される);  
 [PYA]-[B-Ala]-  
 (配列番号1)(本明細書において、BCY11016と称される);  
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-  
 (配列番号2)(本明細書において、BCY11942と称される);  
 Ac-(配列番号3)(本明細書において、BCY8831と称される);  
 配列番号4(本明細書において、BCY11414と称される);  
 [PYA]-[B-Ala]-  
 (配列番号14)(本明細書において、BCY11143と称される);  
 パルミチン酸-γGlu-γGlu-(配列番号14)(本明細書において、BCY12371と称される);  
 10  
 Ac-(配列番号14)(本明細書において、BCY12024と称される);  
 Ac-(配列番号16)(本明細書において、BCY12364と称される);  
 Ac-(配列番号18)(本明細書において、BCY12366と称される);及び  
 Ac-(配列番号19)(本明細書において、BCY12367と称される);  
 (ここで、PYAは4-ペンチン酸を表し、B-Alaは-アラニンを表し、Sar<sub>10</sub>は10個のサルコシン単位を表す)、又はその医薬として許容し得る塩  
 :を含む。

【0021】

またさらなる実施態様において、ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドは、任意にN-末端修飾を含み、かつ

配列番号1(本明細書において、BCY8116と称される);  
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-  
 (配列番号1)(本明細書において、BCY8846と称される);  
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-  
 (配列番号2)(本明細書において、BCY11942と称される);  
 Ac-(配列番号3)(本明細書において、BCY8831と称される);及び  
 配列番号4(本明細書において、BCY11414と称される);  
 (ここで、PYAは4-ペンチン酸を表し、B-Alaは-アラニンを表し、Sar<sub>10</sub>は10個のサルコシン単位を表す)、又はその医薬として許容し得る塩  
 :を含む。

【0022】

またさらなる実施態様において、ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドは、配列番号1(本明細書において、BCY8116と称される)を含む。

【0023】

代わりの実施態様において、癌細胞上に存在する構成要素は、EphA2である。

【0024】

Eph受容体チロシンキナーゼ(Eph)は、タンパク質をチロシン残基上でリン酸化するキナーゼである、巨大な受容体チロシンキナーゼ(RTK)群に属する。Eph及びその膜結合型エフリンリガンド(エフリン)は、細胞配置及び組織構成を制御する(Poliakovらの文献(2004) Dev Cell 7, 465-80)。機能的及び生化学的なEph応答は、より高いリガンドオリゴマー化状態で生じる(Steinらの文献(1998) Genes Dev 12, 667-678)。

【0025】

他のパターン化機能の中で、様々なEph及びエフリンは、血管発生における役割を果たすことが示されている。EphB4及びエフリン-B2のノックアウトは、毛細血管床を再構築して、血管にする能力の欠如(Poliakovらの文献、前記)及び胚性致死をもたらす。いくつかのEph受容体及びエフリンの持続的発現は、新たに形成された成体の微小血管でも観察されている(Brantley-Siedersらの文献(2004) Curr Pharm Des 10, 3431-42; Adams(2003) J Anat 202, 105-12)。

【0026】

成体におけるいくつかのエフリン及びその受容体の脱調節された再出現も、腫瘍浸潤、転移、及び新血管新生に寄与することが観察されている(Nakamotoらの文献(2002) Microsc Res Tech 59, 58-67; Brantley-Siedersらの文献、前記)。さらに、いくつかのEp

10

20

30

40

50

hファミリーメンバーは、種々のヒト腫瘍由来の腫瘍細胞で過剰発現されることが分かっている(Brantley-Siedersらの文献、前記); Marmeの文献(2002) Ann Hematol 81 Suppl 2, S66; Boothらの文献(2002) Nat Med 8, 1360-1)。

【0027】

EPH受容体A2(エフリンタイプ-A受容体2)は、ヒトにおいてEPHA2遺伝子によってコードされるタンパク質である。

【0028】

EphA2は、疾患進行、転移、及び予後不良としばしば相関しているヒトの多数の癌、例えば:乳癌(Zelinskiらの文献(2001) Cancer Res. 61, 2301-2306; Zhuangらの文献(2010) Cancer Res. 70, 299-308; Brantley-Siedersらの文献(2011) PLoS One 6, e 24426)、肺癌(Brannanらの文献(2009) Cancer Prev Res(Phila) 2, 1039-1049; Kinchらの文献(2003) Clin Cancer Res. 9, 613-618; Guoらの文献(2013) J Thorac Oncol. 8, 301-308)、胃癌(Nakamuraらの文献(2005) Cancer Sci. 96, 42-47; Yuanらの文献(2009) Dig Dis Sci 54, 2410-2417)、膵臓癌(Mudaliらの文献(2006) Clin Exp Metastasis 23, 357-365)、前立腺癌(Walker-Danielsらの文献(1999) Prostate 41, 275-280)、肝臓癌(Yangらの文献(2009) Hepatol Res. 39, 1169-1177)、及び膠芽腫(Wykoskyらの文献(2005) Mol Cancer Res. 3, 541-551; Liらの文献(2010) Tumor Biol. 31, 477-488)で上方調節されている。

10

【0029】

癌進行におけるEphA2の完全な役割はまだ明確にされていないが、腫瘍細胞の増殖、生存、浸潤、及び血管新生を含む癌進行の多くの段階における相互作用の証拠が存在する。EphA2発現の下方調節は、腫瘍癌細胞の増殖を抑制し(Bindaらの文献(2012) Cancer Cell 22, 765-780)、一方、EphA2の遮断は、VEGF誘導性細胞遊走(Hessらの文献(2001) Cancer Res. 61, 3250-3255)、出芽及び血管新生(Chengらの文献(2002) Mol Cancer Res. 1, 2-11; Linらの文献(2007) Cancer 109, 332-40)、並びに転移性進行(Brantley-Siedersらの文献(2005) FASEB J. 19, 1884-1886)を阻害する。

20

【0030】

EphA2との抗体薬物コンジュゲートは、ラット及びマウスの異種移植モデルにおいて腫瘍増殖を顕著に減少させることができ(Jacksonらの文献(2008) Cancer Research 68, 9367-9374)、同様の手法がヒトで試みられているが、治療は、治療関連有害事象が原因で中止されなければならなかった(Annunziataらの文献(2013) Invest New drugs 31, 77-84)。

30

【0031】

一実施態様において、第一のペプチドリガンドは、EphA2結合二環式ペプチドリガンドを含む。

【0032】

EphA2結合二環式ペプチドリガンドの好適な例は、そのペプチドが引用により本明細書中に組み込まれる、WO 2019/122860号、WO 2019/122861号、及びWO 2019/122863号に開示されている。

40

【0033】

一実施態様において、EphA2結合二環式ペプチドリガンドは、

【化3】

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 24);

C<sub>i</sub>LWDPTPC<sub>ii</sub>ANLHL[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 25);

40

50

$C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[K(PYA)]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 26);  
 $C_i[HyP][K(PYA)]VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 27);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[K(PYA)]HP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 28);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LKP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 29);  
 $C_i[HyP]KVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 30);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}KHP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 31);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dE]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 32);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 33);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]WTC_{iii}$  (配列番号: 34);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[dD]WTC_{iii}$  (配列番号: 35);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[dA]WTC_{iii}$  (配列番号: 36);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]WTC_{iii}$  (配列番号37; 本明細書において、BCY12860と称される);

$C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 38);  
 $C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}LEP[dD]WTC_{iii}$  (配列番号: 39);  
 $C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]WTC_{iii}$  (配列番号: 40);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 41);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[d1Nal]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 42);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[1Nal]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 43);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LEP[d1Nal]WTC_{iii}$  (配列番号: 44);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[1Nal]P[dD]WTC_{iii}$  (配列番号45; 本明細書において、BCY13119と称される);

$C_i[HyP][Cba]VNPLC_{ii}LEP[dA]WTC_{iii}$  (配列番号: 46);  
 $C_i[HyP][hGlu]VNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 47);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}[hGlu]HP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 48);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[hGlu]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 49);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dNle]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 50);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[Nle]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 51);  
 $[MerPro]_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[3,3-DPA]P[dD]WTC_{iii}$  (配列番号: 154);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg][Cysam]_{iii}$  (配列番号: 155);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[His3Me]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 156);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[His1Me]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 157);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[4ThiAz]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 158);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LFP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 159);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[Thi]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 160);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[3Thi]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 161);  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LNP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 162);

$C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LQP[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 163); 及び  
 $C_i[HyP]LVNPLC_{ii}L[K(PYA-(パルミトイル-Glu-LysN<sub>3</sub>)]P[dD]W[HArg]C_{iii}$  (配列番号: 164);

(ここで、 $[MerPro]_i$ 、 $C_i$ 、 $C_{ii}$ 、 $C_{iii}$ 、及び $[Cysam]_{iii}$ は、システイン、MerPro、及びCysamから選択される第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)の反応基を表し、HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、HArgはホモアルギニンを表し、PYAは4-ペニチ酸を表し、3,3-DPAは3,3-ジフェニルアラニンを表し、Cbaは-シクロブチルアラニンを表し、1Nalは1-ナフチルアラニンを表し、hGluはホモグルタミン酸を表し、Thiは2-チエニル-ア

10

20

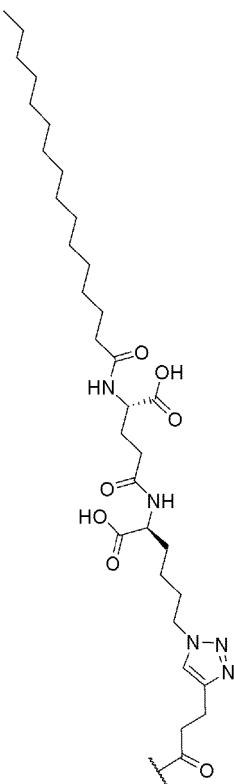
30

40

50

ラニンを表し、4ThiAzは-(4-チアゾリル)-アラニンを表し、His1MeはN1-メチル-L-ヒスチジンを表し、His3MeはN3-メチル-L-ヒスチジンを表し、3Thiは3-チエニルアラニンを表し、パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>[PYA]は、

【化4】



10

(パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>)[PYA]

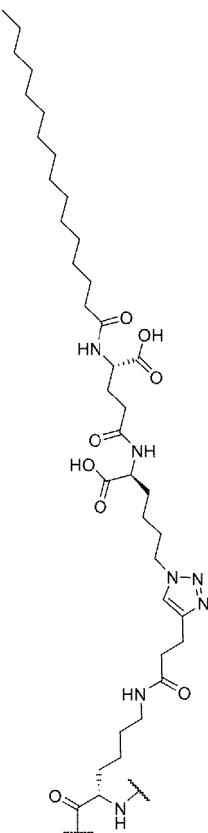
を表し、[K(PYA-(パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>)]は、

30

40

50

## 【化5】



10

[K(PYA(パルミトイル-Glu-LysN3))]

を表し、Nleはノルロイシンを表し、MerProは3-メルカブトプロピオン酸を表し、かつCysamはシステアミンを表す)

から選択されるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む。

## 【0034】

1つの特定の実施態様において、EphA2結合二環式ペプチドリガンドは、

## 【化6】

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 24);

30

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)のシステイン基を表し、HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、HArgはホモアルギニンを表す)

であるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む。

## 【0035】

1つの代わりの特定の実施態様において、EphA2結合二環式ペプチドリガンドは、

## 【化7】

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[d1Nal]WTC<sub>iii</sub> (配列番号: 44);

40

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)のシステイン基を表し、HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、1Nalは1-ナフチルアラニンを表す)

であるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む。

## 【0036】

さらなる実施態様において、EphA2結合二環式ペプチドリガンドは、任意にN-末端及びC-末端修飾を含み、かつ

A-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY9594と称される);

[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-A-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY6099と称される);

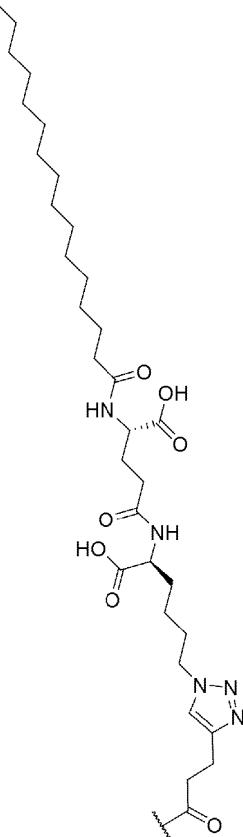
[PYA]-A-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY11813と称される);

50

Ac-A-[HArg]-D-(配列番号24)-[K(PYA)](本明細書において、BCY11814と称される);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号24)-K(本明細書において、BCY12734と称される);  
 [NMeAla]-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY13121と称される);  
 [Ac]-(配列番号24)-L[dH]G[dK](本明細書において、BCY13125と称される);  
 [PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-VGP-(配列番号25)(本明細書において、BCY8941と称される);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号26)(本明細書において、BCY11815と称される);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号27)(本明細書において、BCY11816と称される);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号28)(本明細書において、BCY11817と称される);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号29)(本明細書において、BCY12735と称される);  
 (パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>)[PYA]A[HArg]D-(配列番号29)(以後、BCY14327として知られる);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号30)(本明細書において、BCY12736と称される);  
 Ac-A-[HArg]-D-(配列番号31)(本明細書において、BCY12737と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号32)(本明細書において、BCY12738と称される);  
 A-[HArg]-E-(配列番号32)(本明細書において、BCY12739と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号33)(本明細書において、BCY12854と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号34)(本明細書において、BCY12855と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号35)(本明細書において、BCY12856と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号35)-[dA](本明細書において、BCY12857と称される);  
 (配列番号35)-[dA](本明細書において、BCY12861と称される);  
 [NMeAla]-[HArg]-D-(配列番号35)(本明細書において、BCY13122と称される);  
 [dA]-ED-(配列番号35)(本明細書において、BCY13126と称される);  
 [dA]-[dA]-D-(配列番号35)(本明細書において、BCY13127と称される);  
 AD-(配列番号35)(本明細書において、BCY13128と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号36)(本明細書において、BCY12858と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号37)(本明細書において、BCY12859と称される);  
 Ac-(配列番号37)-[dK](本明細書において、BCY13120と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号38)(本明細書において、BCY12862と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号39)(本明細書において、BCY12863と称される);  
 [dA]-[HArg]-D-(配列番号39)-[dA](本明細書において、BCY12864と称される);  
 (配列番号40)-[dA](本明細書において、BCY12865と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号41)(本明細書において、BCY12866と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号42)(本明細書において、BCY13116と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号43)(本明細書において、BCY13117と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号44)(本明細書において、BCY13118と称される);  
 [dA]-[HArg]-D-(配列番号46)-[dA](本明細書において、BCY13123と称される);  
 [d1Nal]-[HArg]-D-(配列番号46)-[dA](本明細書において、BCY13124と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号47)(本明細書において、BCY13130と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号48)(本明細書において、BCY13131と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号49)(本明細書において、BCY13132と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号50)(本明細書において、BCY13134と称される);  
 A-[HArg]-D-(配列番号51)(本明細書において、BCY13135と称される);  
 (配列番号154)-[dK](本明細書において、BCY13129と称される);  
 A[HArg]D-(配列番号155)(本明細書において、BCY13133と称される);  
 A[HArg]D-(配列番号156)(本明細書において、BCY13917と称される);  
 A[HArg]D-(配列番号157)(本明細書において、BCY13918と称される);  
 A[HArg]D-(配列番号158)(本明細書において、BCY13919と称される);  
 A[HArg]D-(配列番号159)(本明細書において、BCY13920と称される);  
 A[HArg]D-(配列番号160)(本明細書において、BCY13922と称される);  
 A[HArg]D-(配列番号161)(本明細書において、BCY13923と称される);

A[HArg]D-(配列番号162)(本明細書において、BCY14047と称される);  
 A[HArg]D-(配列番号163)(本明細書において、BCY14048と称される);及び  
 A[HArg]D-(配列番号164)(本明細書において、BCY14313と称される);  
 (ここで、PYAは4-ペンチン酸を表し、B-AlaはD-アラニンを表し、Sar<sub>10</sub>は10個のサルコシン単位を表し、HArgはホモアルギニンを表し、NMeAlaはN-メチル-アラニンを表し、1NaIは1-ナフチルアラニンを表し、パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>[PYA]は、

## 【化8】

(パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>)[PYA]

を表す)、又はその医薬として許容し得る塩  
 を含む。

## 【0037】

1つの特定の実施態様において、EphA2結合二環式ペプチドリガンドは、任意にN-末端及び/又はC-末端修飾を含み、かつ  
 A-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY9594と称される);  
 (ここで、HArgはホモアルギニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩  
 を含む。

## 【0038】

1つの代わりの特定の実施態様において、EphA2結合二環式ペプチドリガンドは、任意にN-末端及び/又はC-末端修飾を含み、かつ  
 A-[HArg]-D-(配列番号44)(本明細書において、BCY13118と称される);  
 (ここで、HArgはホモアルギニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩  
 を含む。

## 【0039】

代わりの実施態様において、癌細胞上に存在する構成要素は、PD-L1である。

## 【0040】

プログラム細胞死1リガンド1(PD-L1)は、マウス第19番染色体及びヒト第9番染色体上

10

20

30

40

50

のCD274遺伝子によってコードされた290アミノ酸のI型膜貫通タンパク質である。PD-L1発現は、慢性感染、例えば、慢性ウイルス感染(例えば、特に、HIV、HBV、HCV、及びHTLVを含む)、慢性細菌感染(例えば、特に、ヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)を含む)、並びに慢性寄生虫感染(例えば、マンソン住血吸虫(*Schistosoma mansoni*)を含む)に関与する免疫応答の回避に関与している。PD-L1発現は、T細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞、並びに内皮細胞、肝細胞、筋細胞、及び胎盤を含む非造血細胞を含む、いくつかの組織及び細胞型で検出されている。

#### 【0041】

PD-L1発現は、抗腫瘍免疫活性の抑制にも関与している。腫瘍は、宿主T細胞によって認識されることができる抗原を発現するが、腫瘍の免疫学的クリアランスは稀である。こうした不具合の一部は、腫瘍微小環境による免疫抑制によるものである。多くの腫瘍におけるPD-L1発現は、この抑制的環境の構成要素であり、他の免疫抑制シグナルと協調して作用する。PD-L1発現は、乳房、肺、結腸、卵巣、黒色腫、膀胱、肝臓、唾液腺、胃、神経膠腫、甲状腺、胸腺上皮、頭部、及び頸部を含む、多種多様な固形腫瘍においてインサイチュで示されている(Brown JAらの文献、2003 *Immunol. 170*:1257-66; Dong Hらの文献、2002 *Nat. Med. 8*:793-800; Hamanishi Jらの文献、2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104*:3360-65; Strome SEらの文献、2003 *Cancer Res. 63*:6501-5; Inman BAらの文献、2007 *Cancer 109*:1499-505; Konishi Jらの文献、2004 *Clin. Cancer Res. 10*:5094-100; Nakanishi Jらの文献、2007 *Cancer Immunol. Immunother. 56*:1173-82; Nomi Tらの文献、2007 *Clin. Cancer Res. 13*:2151-57; Thompson RHらの文献、2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101*: 17174-79; Wu Cらの文献、2006 *Acta Histochem. 108*:19-24)。さらに、PD-L1の受容体であるプログラム細胞死タンパク質1(PD-1及びCD279としても知られる)の発現は、腫瘍浸潤リンパ球で上方調節されており、これも腫瘍免疫抑制に寄与する(Blank Cらの文献、2003 *Immunol. 171*:4574-81)。最も重要なことに、腫瘍でのPD-L1発現を疾患転帰に関連付ける研究により、PD-L1発現が腎臓癌、卵巣癌、膀胱癌、乳癌、胃癌、及び膵臓癌における好ましくない予後と強く相關することが示されている(Hamanishi Jらの文献、2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104*:3360-65; Inman BAらの文献、2007 *Cancer 109*:1499-505; Konishi Jらの文献、2004 *Clin. Cancer Res. 10*:5094-100; Nakanishi Jらの文献、2007 *Cancer Immunol. Immunother. 56*:1173-82; Nomi Tらの文献、2007 *Clin. Cancer Res. 13*:2151-57; Thompson RHらの文献、2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101*:17174-79; Wu Cらの文献、2006 *Acta Histochem. 108*:19-24)。さらに、これらの研究により、腫瘍でのより高いレベルのPD-L1発現が腫瘍ステージの前進及びより深い組織構造への侵入を促進し得ることが示唆されている。

#### 【0042】

PD-1経路は、血液悪性腫瘍において役割を果たすことができる。PD-L1は、多数の骨髄腫細胞で発現されるが、正常な形質細胞では発現されない(Liu Jらの文献、2007 *Blood 110*:296-304)。PD-L1は、一部の原発性T細胞リンパ腫、特に、未分化大細胞Tリンパ腫で発現される(Brown JAらの文献、2003 *Immunol. 170*:1257-66)。PD-1は、血管免疫芽球性リンパ腫のT細胞で高度に発現され、PD-L1は、関連する濾胞樹状細胞ネットワークで発現される(Dorfman DMらの文献、2006 *Am. J. Surg. Pathol. 30*:802-10)。結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫において、リンパ球又は組織球(L&H)細胞と関連するT細胞は、PD-1を発現する。PD-1ライゲーションによって誘導された遺伝子の読み出しを用いるマイクロアレイ解析により、腫瘍関連T細胞がホジキンリンパ腫においてインサイチュでPD-1シグナルに応答することが示唆されている(Chemnitz JMらの文献、2007 *Blood 110*:3226-33)。PD-1及びPD-L1は、HTLV-1媒介性成人T細胞白血病及びリンパ腫のCD4 T細胞で発現される(Shimauchi Tらの文献、2007 *Int. J. Cancer 121*: 2585-90)。これらの腫瘍細胞は、TCRシグナルに低応答性である。

#### 【0043】

動物モデルにおける研究により、腫瘍上のPD-L1がT細胞活性化及び腫瘍細胞の溶解を

10

20

30

40

50

阻害し、場合によって、腫瘍特異的T細胞死の増加をもたらすことが示されている(Dong Hらの文献、2002 Nat. Med. 8:793-800; Hirano Fらの文献、2005 Cancer Res. 65:1089-96)。腫瘍関連APCも、抗腫瘍T細胞応答を制御するために、PD-1:PD-L1経路を利用することができる。腫瘍関連骨髄DCの集団におけるPD-L1発現は、腫瘍環境因子によつて上方調節される(Curiel TJらの文献、2003 Nat. Med. 9:562-67)。B16黒色腫の腫瘍流入領域リンパ節内の形質細胞様樹状細胞(DC)は、調節性T細胞の抑制的活性を強く活性化するIDOを発現する。IDO処理された調節性T細胞の抑制的活性は、IDO発現DCとの細胞接触を必要とした(Sharma MDらの文献、2007 Clin. Invest. 117:2570-82)。

【0044】

一実施態様において、第一のペプチドリガンドは、PD-L1結合二環式ペプチドリガンドを含む。 10

【0045】

PD-L1結合二環式ペプチドリガンドの好適な例は、そのペプチドが引用により本明細書中に組み込まれる、WO 2020/128526号及びWO 2020/128527号に開示されている。 20

【0046】

一実施態様において、PD-L1結合二環式ペプチドリガンドは、

【化9】

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>QKLHLC<sub>iii</sub> (配列番号: 52);  
 C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[K(PYA)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号: 53);  
 C<sub>i</sub>SKGWLTMC<sub>ii</sub>Q[K(Ac)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号: 54);  
 C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[K(Ac)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号: 55);  
 C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>K[K(Ac)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号: 56);  
 C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[K(Ac)]LKLC<sub>iii</sub> (配列番号: 57);  
 C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[HArg]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号: 58); 及び  
 C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>[HArg]QLNLC<sub>iii</sub> (配列番号: 59);

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステイン残基を表し、PYAは4-ペンチン酸を表し、かつHArgはホモアルギニンを表す) 30  
 :から選択されるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む。

【0047】

さらなる実施態様において、PD-L1結合二環式ペプチドリガンドは、任意にN-末端及び/又はC-末端修飾を含み、かつ

[PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-SDK-(配列番号52)(本明細書において、BCY10043と称される);  
 Ac-D-[HArg]-[配列番号52]-PSH(本明細書において、BCY11865と称される);

Ac-SDK-(配列番号53)(本明細書において、BCY11013と称される);

Ac-SDK-(配列番号53)-PSH(本明細書において、BCY10861と称される);

Ac-D-[HArg]-[配列番号54]-PSH(本明細書において、BCY11866と称される);

Ac-D-[HArg]-[配列番号55]-PSH(本明細書において、BCY11867と称される); 40

Ac-D-[HArg]-[配列番号56]-PSH(本明細書において、BCY11868と称される);

Ac-D-[HArg]-[配列番号57]-PSH(本明細書において、BCY11869と称される);

Ac-SD-[HArg]-[配列番号58]-PSHK(本明細書において、BCY12479と称される); 及び

Ac-SD-[HArg]-[配列番号59]-PSHK(本明細書において、BCY12477と称される);

(ここで、PYAは4-ペンチン酸を表し、B-Alaは-アラニンを表し、Sar<sub>10</sub>は10個のサルコシン単位を表し、かつHArgはホモアルギニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩:を含む。

【0048】

代わりの実施態様において、癌細胞上に存在する構成要素は、前立腺特異的膜抗原(PSM A)である。 50

## 【0049】

前立腺特異的膜抗原(PSMA)(グルタミン酸カルボキシペプチダーゼII(GCPII)、N-アセチル-L-アスパルチル-L-グルタミン酸ペプチダーゼI(NAALADアーゼI)、及びNAAGペプチダーゼとしても知られる)は、ヒトにおいて、FOLH1(葉酸ヒドロラーゼ1)遺伝子によってコードされる酵素である。ヒトGCPIIは、750個のアミノ酸を含有し、約84kDaの重量である。

## 【0050】

ヒトPSMAは、他の大部分の組織よりも約100倍多く、前立腺で高度に発現される。いくつかの前立腺癌において、PSMAは、2番目に大きく上方調節される遺伝子産物であり、非癌性前立腺細胞におけるレベルよりも8~12倍増大している。この高発現のため、PSMAは、いくつかの癌の治療及びイメージングのための潜在的バイオマーカーとして開発中である。ヒト前立腺癌において、より高発現している腫瘍は、より速い進行時間及びより大きいパーセンテージの再発に苦しむ患者と関連している。

10

## 【0051】

一実施態様において、第一のペプチドリガンドは、PSMA結合二環式ペプチドリガンドを含む。

## 【0052】

PSMA結合二環式ペプチドリガンドの好適な例は、そのペプチドが引用により本明細書中に組み込まれるWO 2019/243455号及びWO 2020/120980号に開示されている。

20

## 【0053】

(第二のペプチドリガンド)

「免疫細胞」という用語への本明細書における言及は、免疫系内の任意の細胞を含む。好適な例としては、リンパ球(例えば、Tリンパ球もしくはT細胞、B細胞、又はナチュラルキラー細胞)などの白血球が挙げられる。一実施態様において、T細胞は、CD8又はCD4である。さらなる実施態様において、T細胞はCD8である。免疫細胞の他の例としては、樹状細胞、濾胞樹状細胞、及び顆粒球が挙げられる。

## 【0054】

一実施態様において、免疫細胞上に存在する構成要素は、CD137である。

## 【0055】

CD137は、腫瘍壊死因子(TNF)受容体ファミリーのメンバーである。その別名は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9(TNFRSF9)、4-1BB、及びリンパ球活性化により誘導されるもの(ILA)である。CD137は、活性化T細胞によって発現され得るが、大部分は、CD4+ T細胞よりもCD8+ T細胞で発現され得る。さらに、CD137発現は、樹状細胞、濾胞樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、顆粒球、及び炎症部位の血管壁の細胞で見られる。CD137の1つの特徴付けられた活性は、活性化T細胞に対するその共刺激活性である。CD137の架橋は、T細胞増殖、IL-2分泌、生存、及び細胞溶解活性を増強する。さらに、それは、免疫活性を増強して、マウスの腫瘍を消失させることができる。

30

## 【0056】

CD137は、TCR活性化時に誘導されるT細胞共刺激受容体である(Namらの文献、Curr. Cancer Drug Targets, 5:357-363(2005); Waitsらの文献、Annu. Rev. Immunol., 23:23-68(2005))。活性化CD4+及びCD8+ T細胞上でのその発現に加えて、CD137は、CD4+CD25+調節性T細胞、ナチュラルキラー(NK)及びNK-T細胞、単球、好中球、並びに樹状細胞でも発現される。その天然リガンドであるCD137Lは、B細胞、単球/マクロファージ、及び樹状細胞を含む抗原提示細胞に関して記載されている(Wattsらの文献、Annu. Rev. Immunol., 23:23-68(2005))。そのリガンドと相互作用すると、CD137は、TCR誘導性T細胞増殖の増加、サイトカイン産生、機能的成熟、及びCD8+ T細胞生存の延長をもたらす(Namらの文献、Curr. Cancer Drug Targets, 5:357-363(2005)、Wattsらの文献、Annu. Rev. Immunol., 23:23-68(2005))。

40

## 【0057】

CD137L又はCD137に対する作動性モノクローナル抗体(mAb)のいずれかによるCD13

50

7経由のシグナル伝達は、TCR誘導性T細胞増殖の増加、サイトカイン産生、及び機能的成熟、並びにCD8+ T細胞生存の延長をもたらす。これらの効果は、(1)NF- B、c-Jun NH 2-末端キナーゼ/ストレス活性化タンパク質キナーゼ(JNK/SAPK)、及びp38マイトジエン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)シグナル伝達経路の活性化、並びに(2)抗アポトーシス及び細胞周期関連遺伝子発現の制御:の結果として生じる。

【 0 0 5 8 】

CD137欠損マウスとCD137L欠損マウスの両方において実施された実験により、完全に適格なT細胞応答の発生におけるCD137共刺激の重要性がさらに示された。

【 0 0 5 9 】

IL-2及びIL-15活性化NK細胞はCD137を発現し、作動性mAbによるCD137のライゲーションは、NK細胞増殖及びIFN- 分泌を刺激するが、その細胞溶解活性は刺激しない。 10

【 0 0 6 0 】

さらに、CD137刺激NK細胞は、インビトロでの活性化T細胞の増殖を促進する。

【 0 0 6 1 】

その共刺激機能によれば、CD137に対するアゴニストmAbは、心臓及び皮膚の同種移植の拒絶を促進し、定着腫瘍を根絶し、一次抗ウイルスCD8+ T細胞応答を拡大し、かつT細胞細胞溶解能を増大させることができることが示されている。これらの研究は、CD137シグナル伝達が腫瘍及び感染に対する免疫を増強し得るT細胞機能を促進するという見解を支持する。

【 0 0 6 2 】

一実施態様において、2以上の第二のペプチドリガンドは、CD137結合二環式ペプチドリガンドを含む。 20

【 0 0 6 3 】

CD137結合二環式ペプチドリガンドの好適な例は、そのペプチドが引用により本明細書中に組み込まれるWO 2019/025811号に開示されている。

【 0 0 6 4 】

一実施態様において、CD137結合二環式ペプチドリガンドは、アミノ酸配列:

30

40

50

## 【化10】

C<sub>i</sub>[EEGQYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 5);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Ala]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 6);  
 C<sub>i</sub>[EEGQYC<sub>ii</sub>]F[D-Ala]DPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 7);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PK[D-Ala]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 8);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 9);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 10);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 11);  
 C<sub>i</sub>[EE[D-Lys(PYA)]QYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 12);  
 [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>] (配列番号: 13);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 60);  
 C<sub>i</sub>[EE[dK(PYA)]QYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 61);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]EE[dK]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 62);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 63);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]EE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 64);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FANPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 65);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FAEPPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 66);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FA[Aad]PY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 67);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FAQPPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 68);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle][Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号: 69);  
 [MerPro][tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号70; 本明細書において、  
 BCY12353と称される);  
 [MerPro][tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle][Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号71; 本明細書において、  
 BCY12354と称される);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 72);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 73);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号74; 本明細書において、BCY12372と  
 称される);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FAD[NMeAla]Y[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 75);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FAD[NMeDAla]Y[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 76);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]P[K(PYA)][dA]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 77);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 78);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(Me,PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 79);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(Me,PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 80); 及び  
 [MerPro][tBuAla]EE[dK]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号81; 本明細書において、BCY13137と  
 称される);  
 40

(ここで、[MerPro]<sub>i</sub>、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、C<sub>iii</sub>、及び[Cysam]<sub>iii</sub>は、システイン、MerPro、及びCysamから選択され第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)の反応基を表し、Nleはノルロイシンを表し、tBuAlaはt-ブチル-アラニンを表し、PYAは4-ペンチン酸を表し、Aadは-L-アミノアジピン酸を表し、MerProは3-メルカプトプロピオン酸を表し、Cysamはシステアミンを表し、NMeAlaはN-メチル-アラニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩を含む。

## 【0065】

さらなる実施態様において、CD137結合二環式ペプチドリガンドは、アミノ酸配列:

## 【化11】

$C_i|EEGQYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$  (配列番号: 5);  
 $C_i[tBuAla]PE[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$  (配列番号: 6);  
 $C_i|EEGQYC_{ii}F[D-Ala]DPY[Nle]C_{iii}$  (配列番号: 7);  
 $C_i[tBuAla]PK[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$  (配列番号: 8);  
 $C_i[tBuAla]PE[D-Lys]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$  (配列番号: 9);  
 $C_i[tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$  (配列番号: 10);  
 $C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$  (配列番号: 11);  
 $C_i|EE[D-Lys(PYA)]QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}$  (配列番号: 12); 及び  
 $[dC_i][dI][dE][dE][K(PYA)][dQ][dY][dC_{ii}][dF][dA][dD][dP][dY][dNle][dC_{iii}]$  (配列番号: 13);  
10

(ここで、 $C_i$ 、 $C_{ii}$ 、及び $C_{iii}$ は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステイン残基を表し、 $Nle$ はノルロイシンを表し、 $tBuAla$ は $t$ -ブチル-アラニンを表し、 $PYA$ は4-ペンチン酸を表す)、又はその医薬として許容し得る塩を含む。

## 【0066】

一実施態様において、二環式ペプチドリガンドは、CD137に結合しないことが示されているアミノ酸配列

## 【化12】

$[dC_i][dI][dE][dE][K(PYA)][dQ][dY][dC_{ii}][dF][dA][dD][dP][dY][dNle][dC_{iii}]$  (配列番号: 13)

以外のものである。

## 【0067】

言及され得る1つの特定の実施態様において、CD137結合二環式ペプチドリガンドは、アミノ酸配列:

## 【化13】

$C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$  (配列番号: 11)

(ここで、 $C_i$ 、 $C_{ii}$ 、及び $C_{iii}$ は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステイン残基を表し、 $tBuAla$ は $t$ -ブチル-アラニンを表し、 $PYA$ は4-ペンチン酸を表し、 $Nle$ はノルロイシンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩を含む。

## 【0068】

さらなる実施態様において、CD137結合二環式ペプチドリガンドは、N-及び/又はC-末端修飾を含み、かつ

$Ac-A-($ 配列番号5 $)-Dap$ (本明細書において、BCY7732と称される);  
 $Ac-A-($ 配列番号5 $)-Dap(PYA)$ (本明細書において、BCY7741と称される);  
 $Ac-($ 配列番号6 $)-Dap$ (本明細書において、BCY9172と称される);  
 $Ac-($ 配列番号6 $)-Dap(PYA)$ (本明細書において、BCY11014と称される);  
 $Ac-A-($ 配列番号7 $)-Dap$ (本明細書において、BCY8045と称される);  
 $Ac-($ 配列番号8 $)-A$ (本明細書において、BCY8919と称される);  
 $Ac-($ 配列番号9 $)-A$ (本明細書において、BCY8920と称される);  
 $Ac-($ 配列番号10 $)-A$ (本明細書において、BCY8927と称される);  
 $Ac-($ 配列番号11 $)-A$ (本明細書において、BCY8928と称される);  
 $($ 配列番号11 $)-A$ (本明細書において、BCY14601と称される);  
 $Ac-A-($ 配列番号12 $)-A$ (本明細書において、BCY7744と称される);  
 $Ac-[dA]-$ (配列番号13 $)-[dA]-NH_2$ (本明細書において、BCY11506と称される);  
 $Ac-($ 配列番号60 $)-Dap(PYA)$ (本明細書において、BCY11144と称される);  
 $Ac-A-($ 配列番号61 $)-K$ (本明細書において、BCY11613と称される);  
40

50

Ac-(配列番号62)-Dap(PYA)(本明細書において、BCY12023と称される);  
 Ac-(配列番号63)(本明細書において、BCY12149と称される);  
 Ac-(配列番号64)(本明細書において、BCY12143と称される);  
 Ac-(配列番号65)(本明細書において、BCY12147と称される);  
 Ac-(配列番号66)(本明細書において、BCY12145と称される);  
 Ac-(配列番号67)(本明細書において、BCY12146と称される);  
 Ac-(配列番号68)(本明細書において、BCY12150と称される);  
 Ac-(配列番号69)(本明細書において、BCY12352と称される);  
 Ac-(配列番号72)-[1,2-ジアミノエタン](本明細書において、BCY12358と称される);  
 [パルミチン酸]-[yGlu]-[yGlu]-(配列番号73)(本明細書において、BCY12360と称される)  
 );  
 Ac-(配列番号75)(本明細書において、BCY12381と称される);  
 Ac-(配列番号76)(本明細書において、BCY12382と称される);  
 Ac-(配列番号77)-K(本明細書において、BCY12357と称される);  
 Ac-(配列番号78)-[dA](本明細書において、BCY13095と称される);  
 [Ac]-(配列番号78)-K(本明細書において、BCY13389と称される);  
 Ac-(配列番号79)-[dA](本明細書において、BCY13096と称される);及び  
 Ac-(配列番号80)(本明細書において、BCY13097と称される);  
 (ここで、Acはアセチル基を表し、Dapはジアミノプロピオン酸を表し、PYAは4-ペンチ  
 ン酸を表す)、又はその医薬として許容し得る塩  
 :を含む。  
 10

#### 【0069】

またさらなる実施態様において、CD137結合二環式ペプチドリガンドは、N-及び/又はC-末端修飾を含み、かつ

Ac-A-(配列番号5)-Dap(本明細書において、BCY7732と称される);  
 Ac-A-(配列番号5)-Dap(PYA)(本明細書において、BCY7741と称される);  
 Ac-(配列番号6)-Dap(本明細書において、BCY9172と称される);  
 Ac-(配列番号6)-Dap(PYA)(本明細書において、BCY11014と称される);  
 Ac-A-(配列番号7)-Dap(本明細書において、BCY8045と称される);  
 Ac-(配列番号8)-A(本明細書において、BCY8919と称される);  
 Ac-(配列番号9)-A(本明細書において、BCY8920と称される);  
 Ac-(配列番号10)-A(本明細書において、BCY8927と称される);  
 Ac-(配列番号11)-A(本明細書において、BCY8928と称される);  
 Ac-A-(配列番号12)-A(本明細書において、BCY7744と称される);及び  
 Ac-[dA]-(配列番号13)-[dA]-NH<sub>2</sub>(本明細書において、BCY11506と称される);  
 (ここで、Acはアセチル基を表し、Dapはジアミノプロピオン酸を表し、PYAは4-ペンチ  
 ン酸を表す)、又はその医薬として許容し得る塩  
 :を含む。  
 20

#### 【0070】

一実施態様において、二環式ペプチドリガンドは、CD137に結合しないことが示されて  
 いるBCY11506以外のものである。

#### 【0071】

言及され得るさらなる実施態様において、CD137結合二環式ペプチドリガンドは、N-及  
 び/又はC-末端修飾を含み、かつ

Ac-(配列番号11)-A(本明細書において、BCY8928と称される);  
 (ここで、Acはアセチル基を表す)、又はその医薬として許容し得る塩  
 :を含む。

#### 【0072】

代わりの実施態様において、免疫細胞上に存在する構成要素は、OX40である。

#### 【0073】

10

20

30

40

50

OX40受容体(腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリー、メンバー4(TNFRSF4)としても知られ、CD134受容体としても知られる)は、CD28とは異なり、休止期のナイーブT細胞上で構成的には発現されないTNFRスーパーファミリーの受容体のメンバーである。OX40は、活性化から24～72時間後に発現される二次的な共刺激免疫チェックポイント分子であり;そのリガンドOX40Lも、休止期の抗原提示細胞上で発現されるのではなく、その活性化後に発現される。OX40の発現は、T細胞の完全な活性化に依存し; CD28がなければ、OX40の発現は遅延し、4倍低いレベルとなる。

【0074】

OX40は、最初の3日間はCD4+細胞の増殖能力に対して効果がないが、この時間の後、増殖が遅延し始め、高レベルのPKB活性とBcl-2、Bcl-XL、及びサバイビンの発現とを維持することができないために、細胞は、大きい割合で死滅する。OX40Lは、T-細胞上のOX40受容体に結合し、T-細胞が死滅し、その後、サイトカイン産生を増大させるのを妨げる。OX40は、生存を増強するその能力により、最初の数日を過ぎて、メモリー応答に向かう免疫応答の維持において極めて重要な役割を有する。OX40は、インビボでのTh1媒介性反応とTh2媒介性反応の両方においても極めて重要な役割を有する。

10

【0075】

OX40は、未知の機能によってTRAF2、3、及び5並びにPI3Kに結合する。TRAF2は、NF- $\kappa$ Bを介する生存及びメモリー細胞発生に必要とされるが、TRAF5は、ノックアウト体がより高いレベルのサイトカインを有し、Th2媒介性炎症により罹患しやすいので、よりマイナスの又は調節的な役割を有するように思われる。TRAF3は、OX40媒介性シグナル伝達において極めて重要な役割を有し得る。CTLA-4は、インビボでのOX40エンゲージメント後に下方調節され、OX40特異的TRAF3 DN欠損は、インビボでのCTLA-4遮断によって部分的に克服された。TRAF3は、OX40媒介性メモリーT細胞拡大及び生存と関連し、CTLA-4の下方調節がOX40シグナル伝達を介して初期T細胞拡大を増強するための考えられる制御エレメントとなることを提示し得る。

20

【0076】

一実施態様において、OX40は、哺乳動物OX40である。さらなる実施態様において、哺乳動物OX40は、ヒトOX40(hOX40)である。

【0077】

OX40ペプチドは、OX40、及び結果的に、免疫細胞を作動性に活性化して、癌、例えば、非小細胞肺癌(NSCLC)、トリプルネガティブ乳癌(TNBC)を含む乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、尿路上皮癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、頭頸部扁平上皮癌(SCCHN)、黒色腫、膵臓癌、及び免疫抑制が抗腫瘍免疫を遮断する他の進行性固形腫瘍などの固形腫瘍を含む、初期又は末期のヒト悪性腫瘍を予防、抑制、又は治療するために、主に(しかし、排他的にではなく)使用される。OX40ペプチドが治療剤として使用される他の固形及び非固形悪性腫瘍としては、低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫を含むB-細胞リンパ腫及び急性骨髓性白血病(AML)が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0078】

一実施態様において、2以上の第二のペプチドリガンドは、OX40結合二環式ペプチドリガンドを含む。

40

【0079】

OX40結合二環式ペプチドリガンドの好適な例は、そのペプチドが引用により本明細書中に組み込まれる国際特許出願PCT/GB2020/051144号に開示されている。

【0080】

一実施態様において、OX40結合二環式ペプチドリガンドは、

50

【化 1 4】

C<sub>i</sub>ILWC<sub>ii</sub>LPEPHDEC<sub>iii</sub> (配列番号: 82);  
 C<sub>i</sub>A<sup>K</sup>/<sub>S</sub><sup>N</sup>/<sub>E</sub>C<sub>ii</sub>DPFWYQFYC<sub>iii</sub> (配列番号: 83);  
 C<sub>i</sub>AKNC<sub>ii</sub>DPFWYQFYC<sub>iii</sub> (配列番号: 84);  
 C<sub>i</sub>ASEC<sub>ii</sub>DPFWYQFYC<sub>iii</sub> (配列番号: 85);  
 C<sub>i</sub>^/NYSPEC<sub>ii</sub>WHPLN<sup>D</sup>/<sub>K</sub>C<sub>iii</sub> (配列番号: 86);  
 C<sub>i</sub>LYSPC<sub>ii</sub>WHPLNDC<sub>iii</sub> (配列番号: 87);  
 C<sub>i</sub>NYSPC<sub>ii</sub>WHPLNKC<sub>iii</sub> (配列番号: 88);  
 C<sub>i</sub>WYEYDC<sub>ii</sub>NNWERC<sub>iii</sub> (配列番号: 89);  
 C<sub>i</sub>VIRYSPC<sub>ii</sub>SHYLNC<sub>iii</sub> (配列番号: 90);  
 C<sub>i</sub>DYSPWWHPC<sub>ii</sub>NHIC<sub>iii</sub> (配列番号: 91);  
 C<sub>i</sub>DAC<sub>ii</sub>LYPDYYVC<sub>iii</sub> (配列番号: 92);  
 C<sub>i</sub>RLWC<sub>ii</sub>IPAPTDDC<sub>iii</sub> (配列番号: 93);  
 C<sub>i</sub>TMWC<sub>ii</sub>IPAKGDWC<sub>iii</sub> (配列番号: 94);  
 C<sub>i</sub>MLWC<sub>ii</sub>LPAPTDEC<sub>iii</sub> (配列番号: 95);

10

20

30

40

50

C<sub>i</sub>ILWC<sub>ii</sub>LPEPPDEC<sub>iii</sub> (配列番号: 96);  
 C<sub>i</sub>LLWC<sub>ii</sub>IPNPDDNC<sub>iii</sub> (配列番号: 97);  
 C<sub>i</sub>WLWC<sub>ii</sub>VPNPDDTC<sub>iii</sub> (配列番号: 98);  
 C<sub>i</sub>VLWC<sub>ii</sub>TPYPGDDC<sub>iii</sub> (配列番号: 99);  
 C<sub>i</sub>CALWC<sub>ii</sub>IPDPQDEC<sub>iii</sub> (配列番号: 100);  
 C<sub>i</sub>TLWC<sub>ii</sub>IPDASDSC<sub>iii</sub> (配列番号: 101);  
 C<sub>i</sub>QLWC<sub>ii</sub>IPDADDDC<sub>iii</sub> (配列番号: 102);  
 C<sub>i</sub>QLWC<sub>ii</sub>VPEPGDSC<sub>iii</sub> (配列番号: 103);  
 C<sub>i</sub>CALWC<sub>ii</sub>IPEESDDC<sub>iii</sub> (配列番号: 104);  
 C<sub>i</sub>VLWC<sub>ii</sub>IPEPQDKC<sub>iii</sub> (配列番号: 105);  
 C<sub>i</sub>TLWC<sub>ii</sub>IPDPDDSC<sub>iii</sub> (配列番号: 106);  
 C<sub>i</sub>RLWC<sub>ii</sub>VPKAEDYC<sub>iii</sub> (配列番号: 107);  
 C<sub>i</sub>TKPC<sub>ii</sub>IAYYNQSC<sub>iii</sub> (配列番号: 108);  
 C<sub>i</sub>MNPC<sub>ii</sub>IAYYQQEC<sub>iii</sub> (配列番号: 109);  
 C<sub>i</sub>TNAC<sub>ii</sub>VAYYHQAC<sub>iii</sub> (配列番号: 110);  
 C<sub>i</sub>SDPC<sub>ii</sub>ISYYNQAC<sub>iii</sub> (配列番号: 111);  
 C<sub>i</sub>DPPC<sub>ii</sub>DPFWYAFYC<sub>iii</sub> (配列番号: 112);  
 C<sub>i</sub>PDDC<sub>ii</sub>DPFWYNFYC<sub>iii</sub> (配列番号: 113);  
 C<sub>i</sub>RYSPC<sub>ii</sub>YHPHNC<sub>iii</sub> (配列番号: 114);  
 C<sub>i</sub>LYSPC<sub>ii</sub>NHPLNSC<sub>iii</sub> (配列番号: 115);  
 C<sub>i</sub>EDNYC<sub>ii</sub>FMWTPYC<sub>iii</sub> (配列番号: 116);  
 C<sub>i</sub>LDSPC<sub>ii</sub>WHPLNDC<sub>iii</sub> (配列番号: 117);  
 C<sub>i</sub>RFSPC<sub>ii</sub>SHPLNQC<sub>iii</sub> (配列番号: 118);  
 C<sub>i</sub>KYSPC<sub>ii</sub>WHPLNLC<sub>iii</sub> (配列番号: 119);  
 C<sub>i</sub>RYSPC<sub>ii</sub>WHPLNNC<sub>iii</sub> (配列番号: 120);  
 C<sub>i</sub>EWISC<sub>ii</sub>PGEPHRWWC<sub>iii</sub> (配列番号: 121);  
 C<sub>i</sub>VWEAC<sub>ii</sub>PEHPDQWWC<sub>iii</sub> (配列番号: 122);  
 C<sub>i</sub>STWHC<sub>ii</sub>FWNLQEGKC<sub>iii</sub> (配列番号: 123);  
 C<sub>i</sub>EWKAC<sub>ii</sub>EHDRERWWC<sub>iii</sub> (配列番号: 124);  
 C<sub>i</sub>RTWQC<sub>ii</sub>FYEWQNGHC<sub>iii</sub> (配列番号: 125);  
 C<sub>i</sub>KTWDC<sub>ii</sub>FWASQVSEC<sub>iii</sub> (配列番号: 126);  
 C<sub>i</sub>STWQC<sub>ii</sub>FYDLQEGHC<sub>iii</sub> (配列番号: 127);  
 C<sub>i</sub>TTWEC<sub>ii</sub>FYDLQEGHC<sub>iii</sub> (配列番号: 128);  
 C<sub>i</sub>ETWEC<sub>ii</sub>FWRLQAGEC<sub>iii</sub> (配列番号: 129);  
 C<sub>i</sub>RTWQC<sub>ii</sub>FWDLQEGLC<sub>iii</sub> (配列番号: 130);  
 C<sub>i</sub>STWQC<sub>ii</sub>FWDSQLGAC<sub>iii</sub> (配列番号: 131);  
 C<sub>i</sub>ETWEC<sub>ii</sub>FWEWQVGSC<sub>iii</sub> (配列番号: 132);

10

20

30

40

50

C<sub>i</sub>TTWEC<sub>ii</sub>FWDLQEGLC<sub>iii</sub> (配列番号: 133);  
 C<sub>i</sub>HTWDC<sub>ii</sub>FYQWQDGHC<sub>iii</sub> (配列番号: 134);  
 C<sub>i</sub>TTWEC<sub>ii</sub>FYSLQDGHC<sub>iii</sub> (配列番号: 135);  
 C<sub>i</sub>NEDMYC<sub>ii</sub>FMWMEC<sub>iii</sub> (配列番号: 136);  
 C<sub>i</sub>LYEYDC<sub>ii</sub>YTWRRC<sub>iii</sub> (配列番号: 137);  
 C<sub>i</sub>RYEYDC<sub>ii</sub>HTWQRC<sub>iii</sub> (配列番号: 138);  
 C<sub>i</sub>WYEYDC<sub>ii</sub>TTWERC<sub>iii</sub> (配列番号: 139);  
 C<sub>i</sub>WYEYDC<sub>ii</sub>RTWTRC<sub>iii</sub> (配列番号: 140);  
 C<sub>i</sub>LYEYDC<sub>ii</sub>HTWTRC<sub>iii</sub> (配列番号: 141);  
 C<sub>i</sub>WYEYDC<sub>ii</sub>RTWTFC<sub>iii</sub> (配列番号: 142);  
 C<sub>i</sub>HGGVWC<sub>ii</sub>IPNINDSC<sub>iii</sub> (配列番号: 143);  
 C<sub>i</sub>DSPVRC<sub>ii</sub>YWNTQKGC<sub>iii</sub> (配列番号: 144);  
 C<sub>i</sub>GSPVPC<sub>ii</sub>YWNTRKGC<sub>iii</sub> (配列番号: 145);  
 C<sub>i</sub>APFEFNC<sub>ii</sub>YTWRPC<sub>iii</sub> (配列番号: 146);  
 C<sub>i</sub>RVLYSPC<sub>ii</sub>YHWLNC<sub>iii</sub> (配列番号: 147);  
 C<sub>i</sub>SIMYSPEC<sub>ii</sub>EHPHNHC<sub>iii</sub> (配列番号: 148);  
 C<sub>i</sub>DKWEPDHLC<sub>ii</sub>YWWC<sub>iii</sub> (配列番号: 149);  
 C<sub>i</sub>DAWPETHVC<sub>ii</sub>YWWC<sub>iii</sub> (配列番号: 150);  
 C<sub>i</sub>DEYTPEHLC<sub>ii</sub>YWWC<sub>iii</sub> (配列番号: 151);  
 C<sub>i</sub>WINYSISPC<sub>ii</sub>YVGEC<sub>iii</sub> (配列番号: 152); 及び  
 C<sub>i</sub>RYEYPEHLC<sub>ii</sub>YTWC<sub>iii</sub> (配列番号: 153);

例えは :

C<sub>i</sub>LYSPC<sub>ii</sub>WHPLNDC<sub>iii</sub> (配列番号: 87);

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステイン残基を表す) :から選択されるアミノ酸配列、もしくは修飾誘導体、又はその医薬として許容し得る塩を含む。

#### 【 0 0 8 1 】

さらなる実施態様において、OX40結合二環式ペプチドリガンドは、N-及び/又はC-末端修飾をさらに含み、かつ

A-(配列番号82)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10551と称される);  
 A-(配列番号82)-A(本明細書において、BCY10371と称される);  
 A-(配列番号84)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10552と称される);  
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(配列番号84)-A(本明細書において、BCY10479と称される);  
 A-(配列番号84)-A(本明細書において、BCY10378と称される);  
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(配列番号85)-A(本明細書において、BCY11371と称される);  
 A-(配列番号85)-A(本明細書において、BCY10743と称される);  
 [Biot]-G-[Sar5]-A-(配列番号87)-A(本明細書において、BCY10482と称される);  
 A-(配列番号87)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10549と称される);  
 A-(配列番号87)-A-K(Pya)(本明細書において、BCY11607と称される);  
 Ac-A-(配列番号87)-A-K(Pya)(本明細書において、BCY12708と称される);  
 A-(配列番号87)-A(本明細書において、BCY10351と称される);  
 A-(配列番号88)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY11501と称される);  
 A-(配列番号88)-A(本明細書において、BCY10729と称される);

10

20

30

40

50

A-(配列番号89)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10550と称される);  
A-(配列番号89)-A(本明細書において、BCY10361と称される);  
A-(配列番号90)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10794と称される);  
A-(配列番号90)-A(本明細書において、BCY10349と称される);  
[Biot]-G-[Sar5]-A-(配列番号91)-A(本明細書において、BCY11369と称される);  
A-(配列番号91)-A(本明細書において、BCY10331と称される);  
A-(配列番号92)-A(本明細書において、BCY10375と称される);  
A-(配列番号93)-A(本明細書において、BCY10364と称される);  
A-(配列番号94)-A(本明細書において、BCY10365と称される);  
A-(配列番号95)-A(本明細書において、BCY10366と称される);  
A-(配列番号96)-A(本明細書において、BCY10367と称される);  
A-(配列番号97)-A(本明細書において、BCY10368と称される);  
A-(配列番号98)-A(本明細書において、BCY10369と称される);  
A-(配列番号99)-A(本明細書において、BCY10374と称される);  
A-(配列番号100)-A(本明細書において、BCY10376と称される);  
A-(配列番号101)-A(本明細書において、BCY10737と称される);  
A-(配列番号102)-A(本明細書において、BCY10738と称される);  
A-(配列番号103)-A(本明細書において、BCY10739と称される);  
A-(配列番号104)-A(本明細書において、BCY10740と称される);  
A-(配列番号105)-A(本明細書において、BCY10741と称される);  
A-(配列番号106)-A(本明細書において、BCY10742と称される);  
A-(配列番号107)-A(本明細書において、BCY10380と称される);  
A-(配列番号108)-A(本明細書において、BCY10370と称される);  
A-(配列番号109)-A(本明細書において、BCY10372と称される);  
A-(配列番号110)-A(本明細書において、BCY10373と称される);  
A-(配列番号111)-A(本明細書において、BCY10379と称される);  
A-(配列番号112)-A(本明細書において、BCY10377と称される);  
A-(配列番号113)-A(本明細書において、BCY10744と称される);  
A-(配列番号114)-A(本明細書において、BCY10343と称される);  
A-(配列番号115)-A(本明細書において、BCY10350と称される);  
A-(配列番号116)-A(本明細書において、BCY10352と称される);  
A-(配列番号117)-A(本明細書において、BCY10353と称される);  
A-(配列番号118)-A(本明細書において、BCY10354と称される);  
A-(配列番号119)-A(本明細書において、BCY10730と称される);  
A-(配列番号120)-A(本明細書において、BCY10731と称される);  
A-(配列番号121)-A(本明細書において、BCY10339と称される);  
A-(配列番号122)-A(本明細書において、BCY10340と称される);  
A-(配列番号123)-A(本明細書において、BCY10342と称される);  
A-(配列番号124)-A(本明細書において、BCY10345と称される);  
A-(配列番号125)-A(本明細書において、BCY10347と称される);  
A-(配列番号126)-A(本明細書において、BCY10348と称される);  
A-(配列番号127)-A(本明細書において、BCY10720と称される);  
A-(配列番号128)-A(本明細書において、BCY10721と称される);  
A-(配列番号129)-A(本明細書において、BCY10722と称される);  
A-(配列番号130)-A(本明細書において、BCY10723と称される);  
A-(配列番号131)-A(本明細書において、BCY10724と称される);  
A-(配列番号132)-A(本明細書において、BCY10725と称される);  
A-(配列番号133)-A(本明細書において、BCY10726と称される);  
A-(配列番号134)-A(本明細書において、BCY10727と称される);  
A-(配列番号135)-A(本明細書において、BCY10728と称される);

10

20

30

40

50

A-(配列番号136)-A(本明細書において、BCY10360と称される);  
 A-(配列番号137)-A(本明細書において、BCY10363と称される);  
 A-(配列番号138)-A(本明細書において、BCY10732と称される);  
 A-(配列番号139)-A(本明細書において、BCY10733と称される);  
 A-(配列番号140)-A(本明細書において、BCY10734と称される);  
 A-(配列番号141)-A(本明細書において、BCY10735と称される);  
 A-(配列番号142)-A(本明細書において、BCY10736と称される);  
 A-(配列番号143)-A(本明細書において、BCY10336と称される);  
 A-(配列番号144)-A(本明細書において、BCY10337と称される);  
 A-(配列番号145)-A(本明細書において、BCY10338と称される);  
 A-(配列番号146)-A(本明細書において、BCY10346と称される);  
 A-(配列番号147)-A(本明細書において、BCY10357と称される);  
 A-(配列番号148)-A(本明細書において、BCY10362と称される);  
 A-(配列番号149)-A(本明細書において、BCY10332と称される);  
 A-(配列番号150)-A(本明細書において、BCY10717と称される);  
 A-(配列番号151)-A(本明細書において、BCY10718と称される);  
 A-(配列番号152)-A(本明細書において、BCY10334と称される);及び  
 A-(配列番号153)-A(本明細書において、BCY10719と称される);  
 例えは:

A-(配列番号87)-A-K(Pya)(本明細書において、BCY11607と称される);

(ここで、Pyaは4-ベンチノイル部分を表す)

:から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0082】

一実施態様において、2以上の第二のペプチドは、同じ免疫細胞に特異的である。さらなる実施態様において、該2以上の第二のペプチドの各々は、同じ免疫細胞上の同じ結合部位又は標的に特異的である。代わりの実施態様において、該2以上の第二のペプチドの各々は、同じ免疫細胞上の異なる結合部位又は標的に特異的である。代わりの実施態様において、2以上の第二のペプチドは、2つの異なる免疫細胞(すなわち、CD137及びOX40)に特異的である。さらなる実施態様において、該2以上の第二のペプチドの各々は、2つの異なる免疫細胞上の同じ結合部位又は標的に特異的である。代わりの実施態様において、該2以上の第二のペプチドの各々は、2つの異なる免疫細胞上の異なる結合部位又は標的に特異的である。

#### 【0083】

一実施態様において、該2以上の第二のペプチドの各々は、同じペプチド配列を有する。

#### 【0084】

一実施態様において、該ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、2つの第二のペプチドリガンドを含む。したがって、本発明のさらなる態様によれば、  
 (a)癌細胞上に存在する構成要素に結合する第一のペプチドリガンド;がリンカーを介して、  
 (b)免疫細胞上に存在する構成要素に結合する2つの第二のペプチドリガンド;  
 にコンジュゲートしたもの

:を含み、ここで、該ペプチドリガンドの各々が少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つの反応基を含むポリペプチド及び該ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する分子スキャフォールドを含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子スキャフォールド上に形成される、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

#### 【0085】

言及され得る本発明のさらなる態様によれば、

(a)癌細胞上に存在する構成要素に結合する第一のペプチドリガンド;がリンカーを介して、  
 (b)免疫細胞上に存在する構成要素に結合する2つの第二のペプチドリガンド;  
 :を含み、ここで、該ペプチドリガンドが少なくとも2つのループ配列によって隔てられた

10

20

30

40

50

少なくとも3つのシステイン残基を含むポリペプチド及び該ポリペプチドのシステイン残基と共有結合を形成する分子スキャフォールドを含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子スキャフォールド上に形成される、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

【0086】

代わりの実施態様において、該ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、3つの第二のペプチドリガンドを含む。したがって、本発明のさらなる態様によれば、

(a)癌細胞上に存在する構成要素に結合する第一のペプチドリガンド;がリンカーを介して、  
(b)免疫細胞上に存在する構成要素に結合する3つの第二のペプチドリガンド;  
:を含み、ここで、該ペプチドリガンドの各々が少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つの反応基を含むポリペプチド及び該ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する分子スキャフォールドを含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子スキャフォールド上に形成される、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

10

【0087】

言及され得る本発明のさらなる態様によれば、

(a)癌細胞上に存在する構成要素に結合する第一のペプチドリガンド;がリンカーを介して、  
(b)免疫細胞上に存在する構成要素に結合する3つの第二のペプチドリガンド;  
:を含み、ここで、該ペプチドリガンドの各々が少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つのシステイン残基を含むポリペプチド及び該ポリペプチドのシステイン残基と共有結合を形成する分子スキャフォールドを含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子スキャフォールド上に形成される、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

20

【0088】

さらなる実施態様において、該2以上の第二のペプチドの各々は、同じペプチド配列を含み、該ペプチド配列は、

Ac-(配列番号11)-A(本明細書において、BCY8928と称される)

(ここで、Acはアセチル基を表す)、又はその医薬として許容し得る塩を含む。

【0089】

またさらなる実施態様において、該ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、2つの第二のペプチドリガンドを含み、該2つの第二のペプチドは両方とも、

30

Ac-(配列番号11)-A(本明細書において、BCY8928と称される)

(ここで、Acはアセチル基を表す)を含む同じペプチド配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む。

【0090】

(リンカー)

第一のペプチドリガンドは、任意の好適なリンカーを介して、2以上の第二のペプチドリガンドにコンジュゲートすることができる事が理解されるであろう。典型的には、該リンカーの設計は、3つの二環式ペプチドが、単独で、又は両方の標的受容体に同時に結合しながら、そのそれぞれの標的に邪魔されずに結合することができるような形で提示されるようなものとする。さらに、リンカーは、両方の標的に同時に結合することを可能にする一方で、所望の機能的結果をもたらす標的細胞間の適切な距離を維持するべきである。リンカーの性質は、所望の機能的結果を最適化するために、長さ、剛性、又は可溶性を増大させるように調節することができる。リンカーは、同じ標的への複数の二環の結合を可能にするように設計することもできる。いずれかの結合ペプチドの価数を増大させることは、標的細胞に対するヘテロタンデムの親和性を増大させる役割を果たし得るか、又は標的受容体のうちの一方もしくは両方のオリゴマー化を誘導するのに役立ち得る。

40

【0091】

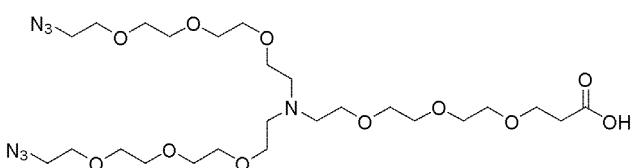
一実施態様において、リンカーは、一方の末端の1つの第一のペプチド及びもう一方の末端の2以上の第二のペプチドを可能にする分岐リンカーである。

50

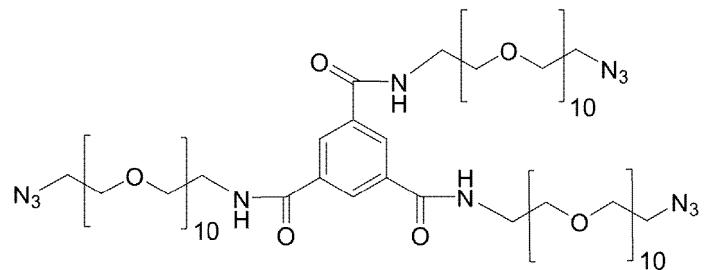
【 0 0 9 2 】

さらなる実施態様において、分岐リンカーは、

【化 1 5】

N-(酸- $\text{PEG}_3$ )- $N$ -bis( $\text{PEG}_3$ -アジド);

10

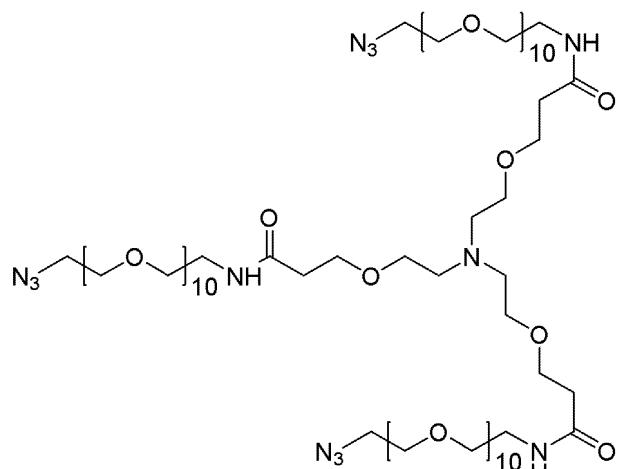
トリメシン酸-[ $\text{Peg}_{10}$ ]<sub>3</sub>;

20

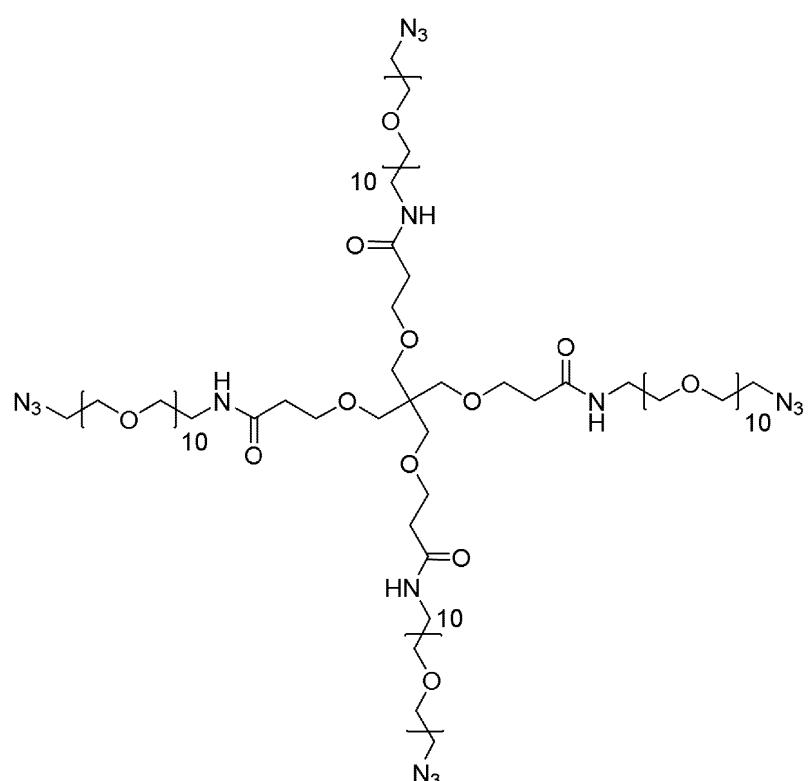
30

40

50



10

TCA-[Peg<sub>10</sub>]<sub>3</sub>;

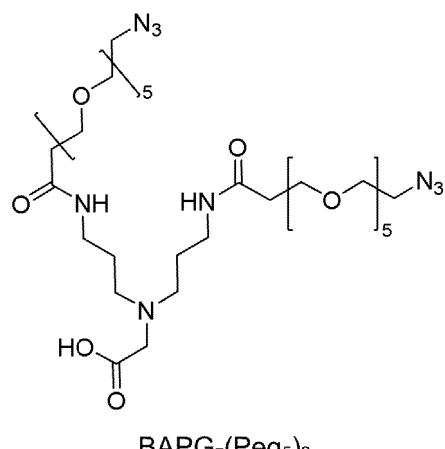
20

30

Tet-[Peg<sub>10</sub>]<sub>4</sub>; 及 U

40

50



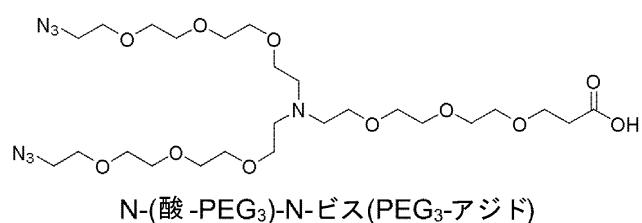
10

:から選択される。

【 0 0 9 3 】

1つの特定の実施態様において、分岐リンカーは、

【化 1 6】



20

:である。

【 0 0 9 4 】

(ヘテロタンデム複合体)

1つの具体的な実施態様において、第一のペプチドリガンドは、TATAスキャフォールドに結合したネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドを含み、2以上の第二のペプチドリガンドは、TATAスキャフォールドに結合した2つのCD137結合二環式ペプチドリガンドを含み、該ヘテロタンデム複合体は、表Aに掲載されている複合体から選択される:

表A(ネクチン-4:CD137;1:2)

【表 1】

複合体番号	ネクチン-4 BCY番号	取付点	リンカー	CD137 BCY 番号	取付点
BCY11863	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY12484	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12143	dLys(PYA)4
BCY10918	BCY11015	N-末端 PYA	トリメシン酸 [Peg <sub>10</sub> ] <sub>3</sub>	BCY8928	dLys(PYA)4

30

40

50

BCY10919	BCY11015	N-末端 PYA	トリメシン酸 [Peg <sub>10</sub> ] <sub>3</sub>	BCY11014	C-末端 Dap(PYA)
BCY11027	BCY11015	N-末端 PYA	TCA-[Peg <sub>10</sub> ] <sub>3</sub>	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY11385	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY11014	C-末端 Dap(PYA)
BCY11864	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY7744	dLys(PYA)4
BCY12485	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY12149	dLys(PYA)4
BCY12486	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY12147	dLys(PYA)4
BCY12586	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY12352	dLys(PYA)4
BCY12487	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY12145	dLys(PYA)4
BCY12490	BCY12024	dLys3	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY12587	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY12353	dLys(PYA)4
BCY12588	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY12354	dLys(PYA)4
BCY12589	BCY12371	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY12590	BCY12384	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY8928	dLys(PYA)4

10

20

30

40

50

BCY12760	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12381	dLys(PYA)4
BCY12761	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12382	dLys(PYA)4
BCY13390	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4
BCY14602	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY14601	dLys(PYA)4
BCY15155	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY14601 BCY8928	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4

10

20

## 【0095】

一実施態様において、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、BCY11027、BCY11863、及びBCY11864:から選択される。さらなる実施態様において、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、BCY11863及びBCY11864:から選択される。

## 【0096】

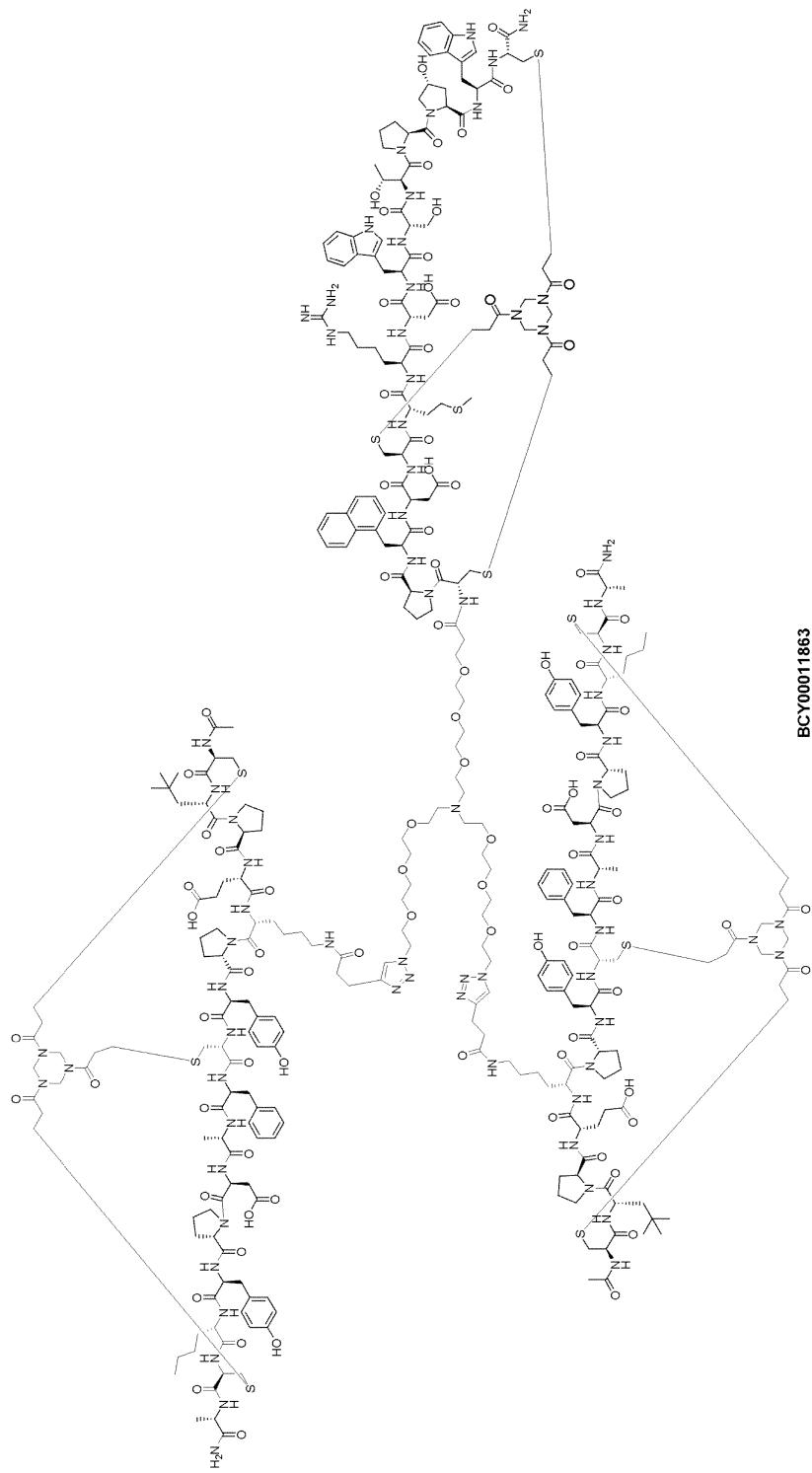
ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY11863は、絵を用いて、

30

40

50

## 【化 17】



のように示される、N-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのCD137特異的ペプチド(どちらもBCY8928である)に連結されたネクチン-4特異的ペプチドBCY8116からなる。

## 【0097】

CD137は、ホモ三量体タンパク質であり、天然リガンドCD137Lは、免疫細胞上に発現されるか又は分泌されるかのいずれかのホモ三量体として存在する。CD137の生態は、免疫細胞でCD137活性を誘導するために、多量体化に大きく依存する。CD137多量体化を生み出す1つの方法は、別の細胞上に存在する特異的受容体との相互作用を通じたCD137特異的アゴニストの細胞架橋によるものである。本発明のヘテロタンデム複合体の利点は

、CD137などの免疫細胞構成要素に特異的な2以上のペプチドリガンドの存在によって、CD137のより効果的なクラスタリングがもたらされることである。例えば、BCY11863がCD137レポーターアッセイにおいて強いCD137活性化を示したことを示すデータが、本明細書中、図1及び表1に示されている。さらに、BCY11863がPBMC-4T1共培養アッセイにおいて強いIL-2及びIFN- $\gamma$ サイトカイン分泌を誘導することを示すデータは、本明細書中、図2及び表5に示されている。さらに、BCY11863がSDラットで4.1時間及びカニクイザルで5.3時間の終末相半減期を有する優れたPKプロファイルを示したことを示すデータは、本明細書中、図3及び表7に示されている。

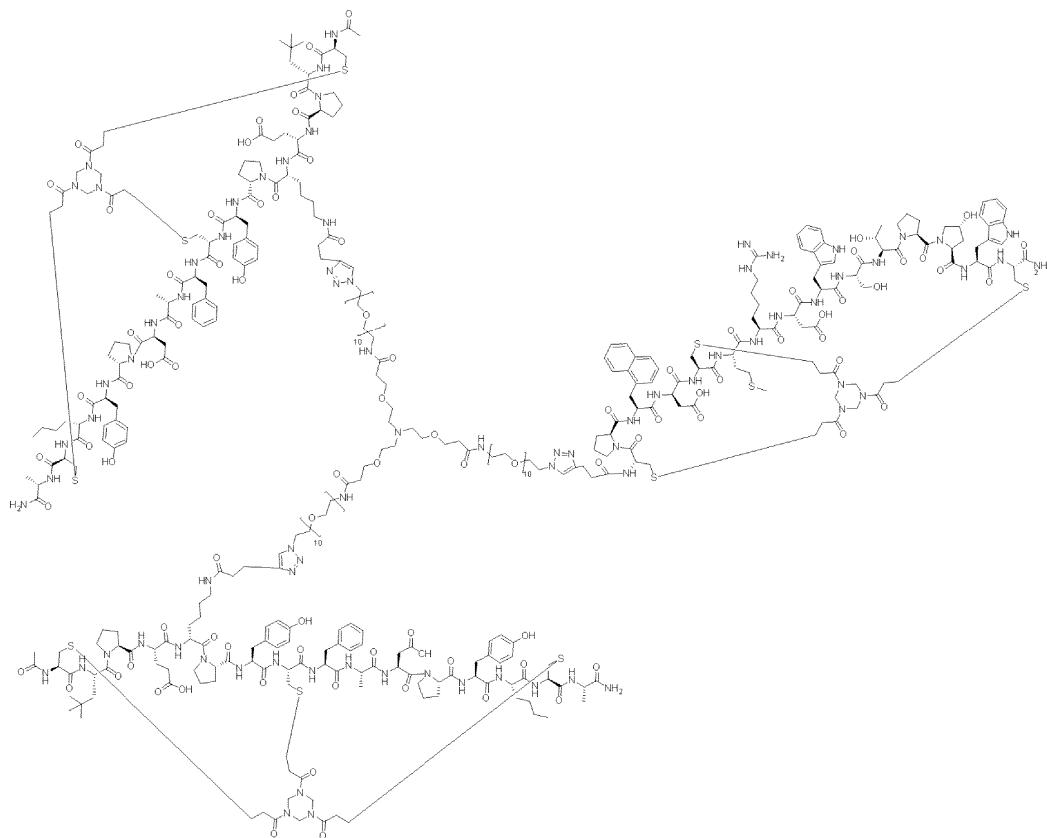
## 【0098】

ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY11027は、

10

絵を用いて、

## 【化18】



20

30

のように示される、TCA-[Peg<sub>10</sub>]<sub>3</sub>リンカーを介して2つのCD137特異的ペプチド(どちらもBCY8928である)に連結されたネクチン特異的ペプチドBCY11015からなる。

## 【0099】

図13に示されているデータは、ネクチン-4/CD137ヘテロタンデムBCY11027が原発性患者由来肺腫瘍のエクスピボ培養物において標的依存的なサイトカイン放出を誘導することを示している。BCY11027による処置は、患者由来試料におけるいくつかの免疫マーカーのネクチン-4依存的な変化(ビヒクルに対して正規化した)及び%CD8+ ki67+ T細胞のネクチン-4依存的な変化を誘導し、これらは、ネクチン-4発現のレベルと相關した。

40

## 【0100】

代わりの具体的な実施態様において、第一のペプチドリガンドは、TATAスキャフォールドに結合したネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドを含み、2以上の第二のペプチドリガンドは、TATAスキャフォールドに結合した2つのCD137結合二環式ペプチドリガンドを含み、該ヘテロタンデム複合体は、表Bに掲載されている複合体から選択される:

表B(ネクチン-4:CD137;1:3)

50

【表 2】

複合体番号	ネクチン-4 BCY番号	取付点	リンカー	CD137 BCY 番号	取付点
BCY11021	BCY11016	N-末端 PYA	Tet-[Peg <sub>10</sub> ] <sub>4</sub>	BCY7744	dLys(PYA)4
BCY11022	BCY11016	N-末端 PYA	Tet-[Peg <sub>10</sub> ] <sub>4</sub>	BCY8928	dLys(PYA)4

【0 1 0 1】

1つの具体的な実施態様において、第一のペプチドリガンドは、TATAスキャフォールドに結合したEphA2結合二環式ペプチドリガンドを含み、2以上の第二のペプチドリガンドは、TATAスキャフォールドに結合した2つのCD137結合二環式ペプチドリガンドを含み、該ヘテロタンデム複合体は、表Cに掲載されている複合体から選択される：

表C(EphA2:CD137;1:2)

【表 3】

複合体番号	EphA2 BCY 番号	取付点	リンカー	CD137 BCY 番号	取付点
BCY12491	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY12723	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12143	dLys (PYA)4
BCY12724	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12149	dLys (PYA)4

10

20

30

40

50

BCY12725	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12147	dLys (PYA)4
BCY12726	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12145	dLys (PYA)4
BCY12728	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12150	dLys (PYA)4
BCY12729	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12352	dLys (PYA)4
BCY12730	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12353	dLys (PYA)4
BCY12731	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12354	dLys (PYA)4
BCY12732	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12360	dLys (PYA)4
BCY12973	BCY12734	C-末端 Lys	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY12974	BCY12735	Lys8	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY12975	BCY12736	Lys2	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY12976	BCY12737	Lys7	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY12977	BCY12738	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4

10

20

30

40

50

BCY12978	BCY12739	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4	10
BCY12979	BCY9594	N-末端	BAPG-(Peg <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	BCY8928	dLys (PYA)4	
BCY13042	BCY12854	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4	
BCY13043	BCY12855	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4	
BCY13044	BCY12856	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4	
BCY13045	BCY12857	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4	20
BCY13046	BCY12858	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4	
BCY13047	BCY12859	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4	
BCY13048	BCY12860	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4	30
BCY13049	BCY12861	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4	
BCY13050	BCY12862	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4	
BCY13051	BCY12863	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4	40

BCY13052	BCY12864	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13053	BCY12865	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13054	BCY12866	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13138	BCY12856	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12353	dLys (PYA)4
BCY13139	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY13137	dLys (PYA)4
BCY13140	BCY12856	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY13137	dLys (PYA)4
BCY13270	BCY13116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13271	BCY13117	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13272	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13273	BCY13119	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13274	BCY13120	C-末端 dLys	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13275	BCY13121	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4

10

20

30

40

50

BCY13276	BCY13122	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13277	BCY13123	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13278	BCY13124	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13280	BCY13126	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13281	BCY13127	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13282	BCY13128	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13284	BCY13130	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13285	BCY13131	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13286	BCY13132	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13288	BCY13134	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13289	BCY13135	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13341	BCY12865	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12353	dLys (PYA)4

10

20

30

40

50

BCY13343	BCY12860	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY12353	dLys (PYA)4
BCY13279	BCY13125	C-末端 dLys	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13283	BCY13129	C-末端 dLys	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY13287	BCY13133	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY14049	BCY13917	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY14050	BCY13918	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY14051	BCY13919	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY14052	BCY13920	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY14053	BCY13922	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4

10

20

30

40

50

BCY14054	BCY13923	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY14055	BCY14047	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY14056	BCY14048	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY14334	BCY14313	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY14335	BCY14327	Lys 8	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY14413	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928 BCY13389	dLys (PYA)4 dLys (PYA)4
BCY14414	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928 BCY13389	dLys (PYA)4 dLys (PYA)4
BCY15217	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY14601 BCY14601	dLys (PYA)4 dLys (PYA)4
BCY15218	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928 BCY14601	dLys (PYA)4 dLys (PYA)4

10

20

30

40

## 【0102】

—実施態様において、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、BCY12491、BCY12730、BCY13048、BCY13050、BCY13053、及びBCY13272:から選択される。

## 【0103】

—実施態様において、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、BCY12491、BCY12730、BCY13048、BCY13050、及びBCY13053:から選択される。

## 【0104】

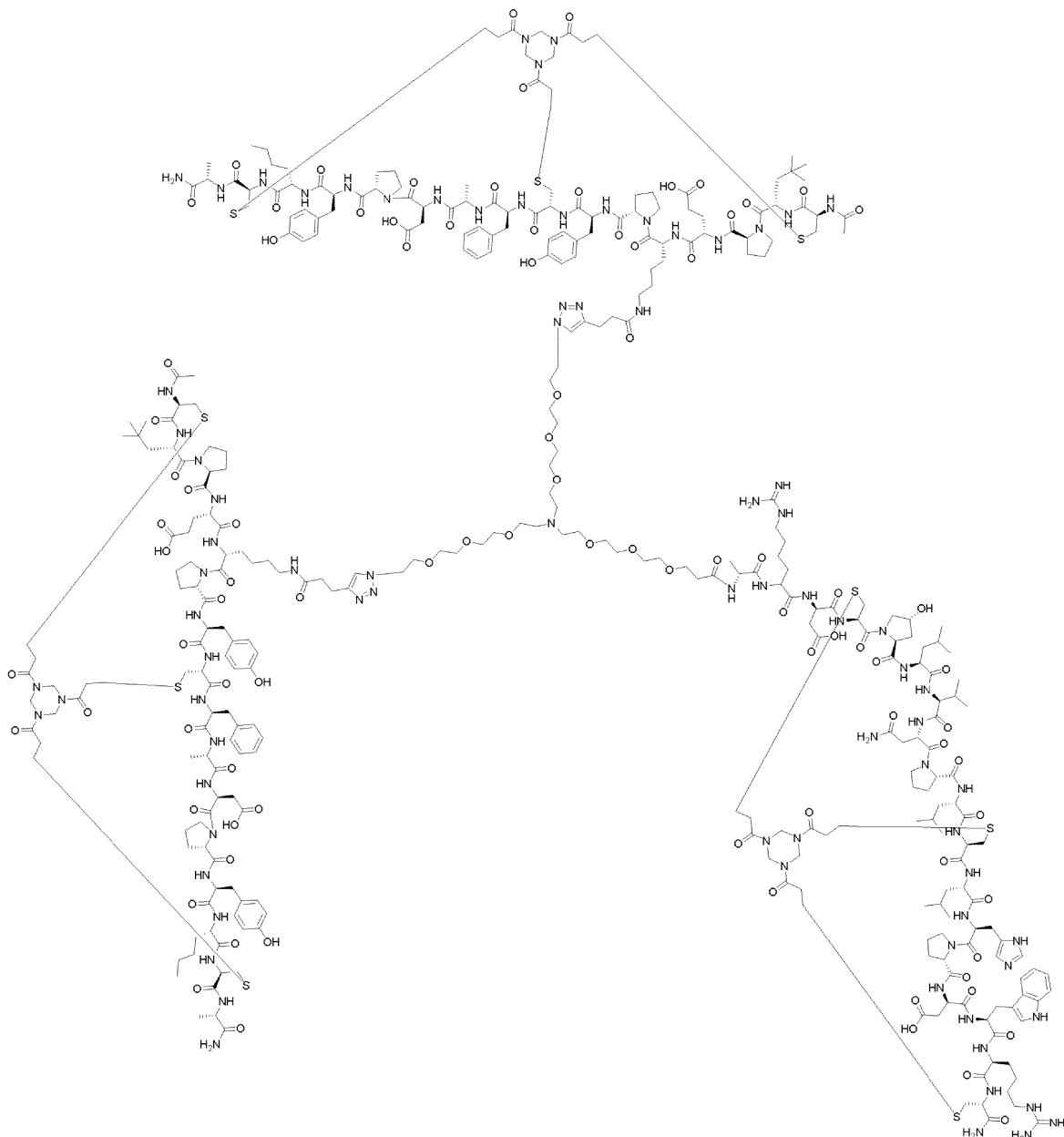
さらなる実施態様において、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、BCY12491である。

50

## 【0105】

ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY12491は、絵を用いて、

## 【化19】



BCY12491

のように示される、N-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのCD137特異的ペプチド(どちらもBCY8928である)に連結されたEphA2特異的ペプチドBCY9594からなる。

## 【0106】

BCY12491が腫瘍浸潤免疫細胞及び免疫応答の顯著な抗腫瘍応答及び調節(増大)をもたらすことを示すデータは、本明細書中、図9及び図15に示されている。

## 【0107】

代わりの実施態様において、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、BCY13272である。

## 【0108】

ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY13272は、絵を用いて、

10

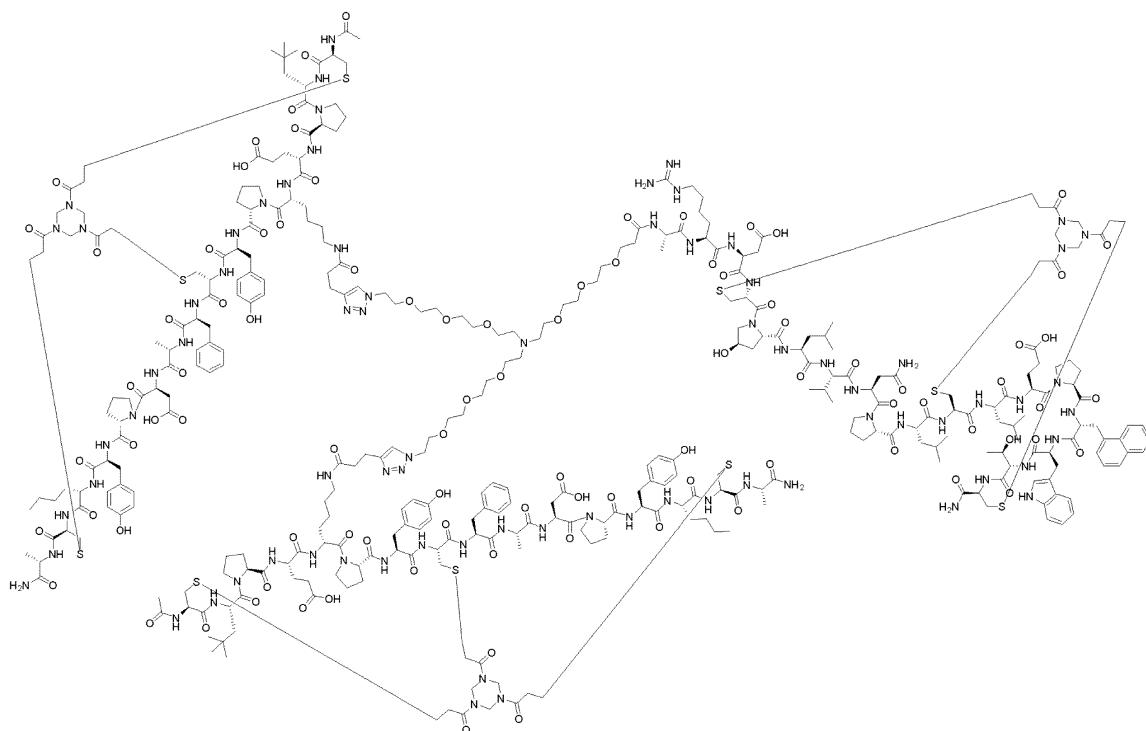
20

30

40

50

## 【化 2 0】



10

20

BCY13272

のように示される、N-(酸-PEG<sub>3</sub>)-N-ビス(PEG<sub>3</sub>-アジド)リンカーを介して2つのCD137特異的ペプチド(どちらもBCY8928である)に連結されたEphA2特異的ペプチドBCY13118からなる。

## 【0109】

BCY13272がマウスのMC38腫瘍モデルにおいて顕著な抗腫瘍効果をもたらすことを示すデータは、本明細書中、図18に示されている。

30

## 【0110】

1つの具体的な実施態様において、第一のペプチドリガンドは、TATAスキャフォールドに結合したPD-L1結合二環式ペプチドリガンドを含み、2以上の第二のペプチドリガンドは、TATAスキャフォールドに結合した2つのCD137結合二環式ペプチドリガンドを含み、該ヘテロタンデム複合体は、表Dに掲載されている複合体から選択される：

表D(PD-L1:CD137;1:2)

## 【表4】

複合体番号	PD-L1 BCY 番号	取付点	リンカー	CD137 BCY番号	取付点
BCY11780	BCY10861	Lys(PYA)9	TCA-[Peg <sub>10</sub> ] <sub>3</sub>	BCY8928	dLys4
BCY12662	BCY12479	C-末端 Lys	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY8928	dLys(PYA)4
BCY12722	BCY12477	C-末端 Lys	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY8928	dLys(PYA)4

40

## 【0111】

50

1つの具体的な実施態様において、第一のペプチドリガンドは、TATAスキャフォールドに結合したネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドを含み、2以上の第二のペプチドリガンドは、TATAスキャフォールドに結合した2つのOX40結合二環式ペプチドリガンドを含み、該ヘテロタンデム複合体は、表Eに掲載されている複合体から選択される：

表E(ネクチン-4:OX40;1:2)

【表5】

複合体番号	ネクチン-4 BCY番号	取付点	リンカー	OX40 BCY番号	取付点
BCY12967	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BC11607	C-末端 Lys(PYA)

【0112】

1つの具体的な実施態様において、第一のペプチドリガンドは、TATAスキャフォールドに結合したネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドを含み、2以上の第二のペプチドリガンドのうちの1つは、TATAスキャフォールドに結合したOX40結合二環式ペプチドリガンドを含み、2以上の第二のペプチドリガンドのうちの他のものは、TATAスキャフォールドに結合したCD137結合二環式ペプチドリガンドを含み、該ヘテロタンデム複合体は、表Fに掲載されている複合体から選択される：

表F(ネクチン-4:OX40:CD137;1:1:1)

【表6】

複合体 番号	ネクチン-4 BCY番号	取付点	リンカー	OX40 BCY 番号	取付点	CD137 BCY番号	取付点
BCY12733	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )- N-ビス(PEG <sub>3</sub> - アジド)	BCY12708	C-末端 dLys	BCY7744	dLys (PYA)4

【0113】

別途定義されない限り、本明細書で使用される技術的及び科学的用語は全て、当該分野、例えば、ペプチド化学、細胞培養、及びファージディスプレイ、核酸化学、並びに生化学の分野の専門家によって一般に理解されているものと同じ意味を有する。標準的な技法が、分子生物学、遺伝学、及び生化学の方法に使用される(引用により本明細書中に組み込まれる、Sambrookらの文献、分子クローニング:実験室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第3版、2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubelらの文献、分子生物学のショートプロトコル(Short Protocols in Molecular Biology)(1999) 第4版、John Wiley & Sons社を参照)。

【0114】

(命名法)

(付番)

本発明の化合物内のアミノ酸残基位置に言及する場合、システイン残基(C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>)は不变であるので、これらは付番から省略され、それゆえ、配列番号1内のアミノ酸残基の付番は、以下のように言及される：

C<sub>i</sub>-P<sub>1</sub>-1Nal<sub>2</sub>-dD<sub>3</sub>-C<sub>ii</sub>-M<sub>4</sub>-HArg<sub>5</sub>-D<sub>6</sub>-W<sub>7</sub>-S<sub>8</sub>-T<sub>9</sub>-P<sub>10</sub>-HyP<sub>11</sub>-W<sub>12</sub>-C<sub>iii</sub>(配列番号1)。

【0115】

この説明のために、全ての二環式ペプチドは、TBMB(1,3,5-トリス(プロモメチル)ベンゼン)又は1,1',1''-(1,3,5-トリアジナン-1,3,5-トリイル)トリプロパ-2-エン-1-オン(TATA)で環化され、三置換構造を生じると考えられる。TBMB及びTATAによる環化は、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>上で生じる。

10

20

30

40

50

## 【0116】

(分子フォーマット)

二環コア配列へのN-又はC-末端伸長は、ハイフンによって隔てられた、配列の左側又は右側に付加される。例えば、N-末端 Ala-Sar10-Alaテールは:

Ala-Sar10-A-(配列番号X)

と表される。

## 【0117】

(逆向きのペプチド配列)

Nairらの文献(2003) *J Immunol* 170(3), 1362-1373における開示を考慮して、本明細書に開示されるペプチド配列は、そのレトロ-インベルソ(retro-inverso)形態でも有用性を見出すことが想定される。例えば、配列が逆転し(すなわち、N-末端がC-末端になり、C-末端がN-末端になる)、その立体化学も同様に逆転する(すなわち、D-アミノ酸がL-アミノ酸になり、L-アミノ酸がD-アミノ酸になる)。誤解を避けるために、その正式名としてか又はそのアミノ酸の1文字もしくは3文字表記としてかのいずれかでのアミノ酸への言及は、別途明記されない限り、本明細書において、L-アミノ酸として表されることが意図される。そのようなアミノ酸がD-アミノ酸として表されることが意図される場合、アミノ酸に、例えば、[dA]、[dD]、[dE]、[dK]、[d1Nal]、[dN1e]など、角括弧内に小文字のdが前置される。

10

## 【0118】

(ペプチドリガンドの利点)

本発明の特定のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、それを注射、吸入、経鼻、眼球、経口、又は局所投与のための好適な薬物様分子とみなすことができるいくつかの有利な特性を有する。そのような有利な特性としては、以下のもの挙げられる:

20

- 種交差反応性。これは、前臨床的な薬力学及び薬物動態評価の典型的な必要条件である;
- プロテアーゼ安定性。ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、理想的には、血漿プロテアーゼ、上皮(「膜固定型」)プロテアーゼ、胃腸プロテアーゼ、肺表面プロテアーゼ、細胞内プロテアーゼなどに対する安定性を示すべきである。プロテアーゼ安定性は、ヘテロタンデム二環式ペプチドリード候補を動物モデルで開発するだけでなく、自信を持ってヒトに投与することもできるように、異なる種の間で維持されるべきである;
- 望ましい溶解度プロファイル。これは、製剤化及び吸収目的で重要である、荷電残基及び親水性残基と疎水性残基の比率並びに分子内/分子間H-結合の関数である;
- 選択性。本発明の特定のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、他の標的よりも良好な選択性を示す;
- 循環中の最適な血漿半減期。臨床的適応及び治療レジメンに応じて、急性疾患管理設定で短期曝露用のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体を開発するか又は循環中の保持が増強されたヘテロタンデム二環式ペプチド複合体を開発する必要があり得るため、より慢性的な疾患状態の管理に最適である。望ましい血漿半減期を推進する他の要因は、最大治療効率のための持続的曝露の要求と薬剤の持続的曝露による随伴毒性である。

30

## 【0119】

重要なことに、選択されたヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が該化合物のインピトロEC<sub>50</sub>を上回る血漿濃度を維持しない頻度で投与されたときに抗腫瘍抗力を示すデータが本明細書で示されている。これは、CD137アゴニズム又は二重特異性CD137アゴニズムへのより大きい組換え生物製剤による(すなわち、抗体ベースの)アプローチとは対照的である(Segalらの文献、*Clin Cancer Res.*, 23(8):1929-1936(2017)、Clausらの文献、*Sci Trans Med.*, 11(496): eaav5989, 1-12(2019)、Hinnerらの文献、*Clin Cancer Res.*, 25(19):5878-5889(2019))。理論に束縛されるものではないが、この観察結果の理由は、ヘテロタンデム二環式複合体が比較的低い分子量(通常、<15kDa)を有し、これが完全合成のものであり、かつこれがCD137の腫瘍標的化アゴニストであるという事実によるものであると考えられる。したがって、これは、比較的短い血漿半減期を有するが、良好な腫瘍透過性及び保持を有する。これらの利点を完全に裏付けるデータが本明細書で

40

50

示されている。例えば、ヒト化CD137を有するマウスの同系齧歯類モデルにおける抗腫瘍抗力が毎日又は3日毎のいずれかで示されている。さらに、腹腔内薬物動態データは、血漿半減期が3時間未満であることを示し、これにより、該複合体の循環濃度が投与間でインピトロEC<sub>50</sub>を常に下回ることが予測される。さらに、腫瘍薬物動態データは、腫瘍組織におけるヘテロタンデム二環式複合体のレベルが、血漿レベルと比較して、より高くかつより持続的であり得ることを示している。

#### 【0120】

この観察結果は、本発明の重要なさらなる態様を形成することが理解されるであろう。したがって、本発明のさらなる態様によれば、癌を治療する方法であって、本明細書で定義されるヘテロタンデム二環式ペプチド複合体のインピトロEC<sub>50</sub>を上回る該複合体の血漿濃度を維持しない投薬頻度での該複合体の投与することを含む、方法が提供される。

10

#### 【0121】

- 免疫記憶。癌細胞に結合する二環式ペプチドリガンドを免疫細胞に結合する二環式ペプチドリガンドとカップリングさせると、免疫記憶の相乗的利点がもたらされる。本発明の選択されたヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が腫瘍を根絶するだけでなく、腫瘍原性薬剤を再投与したときに、接種を受けた完全レスポンダーマウスがいずれも腫瘍を発生させなかつたことを示すデータが本明細書で示されている(図5を参照)。これは、本発明の選択されたヘテロタンデム二環式ペプチド複合体による処置が完全レスポンダーマウスで免疫原性記憶を誘導したことを示している。これは、一旦、最初に該腫瘍が制御され、根絶されると、その再発を予防するために重要な臨床的利点を有する。

20

#### 【0122】

##### (ペプチドリガンド)

本明細書において言及されるペプチドリガンドは、分子スキャフォールドに共有結合したペプチドを指す。典型的には、そのようなペプチドは、スキャフォールドとの共有結合を形成することができる2以上の反応基(すなわち、システイン残基)と、ペプチドがスキャフォールドに結合するときにループを形成するのでループ配列と呼ばれる、該反応基間に内在する配列とを含む。この場合、ペプチドは、システイン、3-メルカプトプロピオン酸、及び/又はシステアミンから選択される少なくとも3つの反応基を含み、かつスキャフォールド上に少なくとも2つのループを形成する。

#### 【0123】

30

##### (反応基)

本発明の分子スキャフォールドは、ポリペプチド上の官能基又は反応基を介してポリペプチドに結合していてもよい。これらは、典型的には、ポリペプチドポリマー中に見られる特定のアミノ酸の側鎖から形成される。そのような反応基は、システイン側鎖、リジン側鎖、もしくはN-末端アミノ基、又は任意の他の好適な反応基、例えば、ペニシラミンであってもよい。好適な反応基の詳細は、WO 2009/098450号に見出すことができる。

#### 【0124】

天然アミノ酸の反応基の例は、システインのチオール基、リジンのアミノ基、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸のカルボキシル基、アルギニンのグアニジウム基、チロシンのフェノール基、又はセリンのヒドロキシル基である。非天然アミノ酸は、アジド、ケトカルボニル、アルキン、ビニル、又はアリールハライド基を含む広範な反応基を提供することができる。ポリペプチドの末端のアミノ及びカルボキシル基も、分子スキャフォールド/分子コアとの共有結合を形成する反応基としての役割を果たすことができる。

40

#### 【0125】

本発明のポリペプチドは、少なくとも3つの反応基を含有する。該ポリペプチドは、4以上の反応基を含有することもできる。反応基をより多く使用すればするほど、より多くのループを分子スキャフォールド中に形成することができる。

#### 【0126】

好ましい実施態様において、3つの反応基を有するポリペプチドが生成される。該ポリペプチドと3回転対称を有する分子スキャフォールド/分子コアとの反応により、单一生成

50

物異性体が生成される。单一生成物異性体の生成は、いくつかの理由によって好ましい。化合物ライブラリーの核酸は、ポリペプチドの一次配列のみをコードするが、ポリペプチドと分子コアとの反応時に形成される異性状態の分子をコードしない。ただ1つの生成物異性体が形成されることができる場合、生成物異性体への核酸の帰属は、明確に規定される。多数の生成物異性体が形成される場合、核酸は、スクリーニング又は選択プロセスで単離された生成物異性体の性質に関する情報を与えることができない。单一生成物異性体の情報は、本発明のライブラリーの特定のメンバーが合成される場合にも有利である。この場合、ポリペプチドと分子スキャフォールドとの化学反応により、異性体の混合物ではなく、单一生成物異性体が産出される。

## 【0127】

10

別の実施態様において、4つの反応基を有するポリペプチドが生成される。該ポリペプチドと4面体対称を有する分子スキャフォールド/分子コアとの反応により、2つの生成物異性体が生成される。2つの異なる生成物異性体が1つの同じ核酸によってコードされるとしても、両方の異性体を化学合成し、2つの異性体を分離し、両方の異性体を標的リガンドとの結合について試験することにより、単離された異性体の性質を決定することができる。

## 【0128】

本発明の一実施態様において、ポリペプチドの反応基の少なくとも1つは、残りの反応基に対して直交性である。直交性反応基の使用は、該直交性反応基を分子コアの特定の部位に向けることを可能にする。直交性反応基が関係する連結戦略を用いて、形成される生成物異性体の数を制限することができる。言い換えると、少なくとも3つの結合のうちの残りのものに対して選択された反応基と別個の又は異なる反応基を少なくとも3つの結合のうちの1つ又は複数に対して選択することにより、分子スキャフォールド上の特定の位置へのポリペプチドの特定の反応基の特定の順序の結合又は方向付けを有効に達成することができる。

20

## 【0129】

別の実施態様において、本発明のポリペプチドの反応基は、分子リンカーと反応し、その場合、該リンカーは、該リンカーが最終的な結合状態の分子スキャフォールドとポリペプチドの間に入るよう、分子スキャフォールドと反応することができる。

## 【0130】

30

いくつかの実施態様において、ポリペプチドのライブラリー又はセットのメンバーのアミノ酸は、任意の天然又は非天然アミノ酸に交換することができる。ループ配列のみが交換可能となるように、ポリペプチドを分子コアに架橋するための官能基を有するものが、これらの交換可能なアミノ酸から除外される。交換可能なポリペプチド配列は、ランダムな配列、一定の配列、又はランダムなアミノ酸と一定のアミノ酸を有する配列のいずれかを有する。これらのアミノ酸の位置がループサイズを決定するので、反応基を有するアミノ酸はいずれも、ポリペプチド内の規定の位置にある。

## 【0131】

一実施態様において、3つの反応基を有するポリペプチドは、配列(X)<sub>1</sub>Y(X)<sub>m</sub>Y(X)<sub>n</sub>Y(X)<sub>o</sub>を有し、ここで、Yは、反応基を有するアミノ酸を表し、Xは、ランダムなアミノ酸を表し、m及びnは、介在するポリペプチドセグメント(これは、同じであっても異なっていてもよい)の長さを規定する3~6の数を表し、1及びoは、隣接するポリペプチドセグメントの長さを規定する0~20の数を表す。

40

## 【0132】

チオール媒介性コンジュゲーションに代わるもの用いて、共有結合的相互作用を介して、分子スキャフォールドをペプチドに結合させることができる。或いは、これらの技法は、さらなる部分(例えば、分子スキャフォールドと異なる対象となる低分子)が本発明に従って選択又は単離された後、ポリペプチドへの該さらなる部分の修飾又は結合において使用することができ - この実施態様においては、明らかに、該結合は、共有結合的である必要はなく、非共有結合的な結合を包含し得る。これらの方法は、相補的反応基を有する

50

低分子と組み合わせて必要な化学反応基を有する非天然アミノ酸を有するタンパク質及びペプチドを提示するファージを产生することによるか、又は分子が選択/単離段階の後に作製されているときに、非天然アミノ酸を化学的にもしくは組換えにより合成されたポリペプチドに組み入れることにより、チオール媒介法の代わりに(又はそれと組み合わせて)使用することができる。さらなる詳細は、WO 2009/098450号又はHeinisらの文献、Nat Chem Biol 2009, 5(7), 502-7において見出すことができる。

【0133】

一実施態様において、反応基は、システイン、3-メルカプトプロピオン酸、及び/又はシステアミン残基から選択される。

【0134】

(医薬として許容し得る塩)

塩形態は本発明の範囲内であり、ペプチドリガンドへの言及が該リガンドの塩形態を含むことが理解されるであろう。

【0135】

本発明の塩は、従来の化学的方法、例えば、医薬塩:特性、選択、及び使用(Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use)、P. Heinrich Stahl(編者)、Camille G. Wermuth(編者)、ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388頁、August 2002に記載されている方法によって、塩基性又は酸性部分を含有する親化合物から合成することができる。通常、そのような塩は、これらの化合物の遊離酸又は塩基形態を、適切な塩基又は酸と、水中もしくは有機溶媒中で、又はこれら2つの混合物中で反応させることにより調製することができる。

【0136】

酸付加塩(モノ塩又はジ塩)は、無機と有機の両方の多種多様な酸で形成することができる。酸付加塩の例としては、酢酸、2,2-ジクロロ酢酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸(例えば、L-アスコルビン酸)、L-アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、4-アセトアミド安息香酸、ブタン酸、(+)カンファー酸、カンファースルホン酸、(+)-(1S)-カンファー-10-スルホン酸、カプリン酸、カプロン酸、カプリル酸、ケイ皮酸、クエン酸、シクラミン酸、ドデシル硫酸、エタン-1,2-ジスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ギ酸、マル酸、粘液酸、ゲンチジン酸、グルコヘプトン酸、D-グルコン酸、グルクロン酸(例えば、D-グルクロン酸など)、グルタミン酸(例えば、L-グルタミン酸など)、-オキソグルタル酸、グリコール酸、馬尿酸、ハロゲン化水素酸(例えば、臭化水素酸、塩酸、ヨウ化水素酸)、イセチオン酸、乳酸(例えば、(+)-L-乳酸、(±)-DL-乳酸)、ラクトビオン酸、マレイン酸、リンゴ酸、(-)-L-リンゴ酸、マロン酸、(±)-DL-マンデル酸、メタンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ナフタレン-1,5-ジスルホン酸、1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、ニコチン酸、硝酸、オレイン酸、オロト酸、シウ酸、パルミチン酸、パモ酸、リン酸、プロピオン酸、ピルビン酸、L-ピログルタミン酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、硫酸、タンニン酸、(+)-L-酒石酸、チオシアノ酸、p-トルエンスルホン酸、ウンデシレン酸、及び吉草酸、並びにアシル化アミノ酸及び陽イオン交換樹脂からなる群から選択される酸で形成されるモノ塩又はジ塩が挙げられる。

【0137】

塩の1つの特定の群は、酢酸、塩酸、ヨウ化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸、クエン酸、乳酸、コハク酸、マレイン酸、リンゴ酸、イセチオン酸、マル酸、ベンゼンスルホン酸、トルエンスルホン酸、硫酸、メタンスルホン酸(メシル酸)、エタンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、吉草酸、プロパン酸、ブタン酸、マロン酸、グルクロン酸、及びラクトビオン酸から形成される塩からなる。1つの特定の塩は、塩酸塩である。別の特定の塩は、酢酸塩である。

【0138】

化合物がアニオン性であるか、又はアニオン性であり得る官能基を有する(例えば、-COOHが-COO<sup>-</sup>であり得る)場合、塩を有機又は無機塩基で形成させ、好適なカチオンを生成

10

20

30

40

50

させることができる。好適な無機カチオンの例としては、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、及び $\text{K}^+$ などのアルカリ金属イオン、 $\text{Ca}^{2+}$ 及び $\text{Mg}^{2+}$ などのアルカリ土類金属カチオン、及び $\text{Al}^{3+}$ 又は $\text{Zn}^{2+}$ などの他のカチオンが挙げられるが、これらに限定されない。適切な有機カチオンの例としては、アンモニウムイオン(すなわち、 $\text{NH}_4^+$ )及び置換アンモニウムイオン(例えば、 $\text{NH}_3\text{R}^+$ 、 $\text{NH}_2\text{R}_2^+$ 、 $\text{NHR}_3^+$ 、 $\text{NR}_4^+$ )が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの好適な置換アンモニウムイオンの例としては、メチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、プロピルアミン、ジシクロヘキシルアミン、トリエチルアミン、ブチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジン、ベンジルアミン、フェニルベンジルアミン、コリン、メグルミン、及びトロメタミン、並びにリジン及びアルギニンなどのアミノ酸に由来するものが挙げられる。一般的な第四級アンモニウムイオンの例は、 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ である。

## 【0139】

本発明の化合物がアミン機能を含有する場合、これらは、例えば、当業者に周知の方法によるアルキル化剤との反応によって、第四級アンモニウム塩を形成し得る。そのような第四級アンモニウム化合物は、本発明の範囲内である。

## 【0140】

(修飾誘導体)

本明細書で定義されるペプチドリガンドの修飾誘導体は、本発明の範囲内であることが理解されるであろう。そのような好適な修飾誘導体の例としては、N-末端及び/又はC-末端修飾; 1以上のアミノ酸残基の1以上の非天然アミノ酸残基による置換(例えば、1以上の極性アミノ酸残基の1以上の等配電子又は等電子アミノ酸による置換; 1以上の非極性アミノ酸残基の他の非天然等配電子又は等電子アミノ酸による置換);スペーサー基の付加; 1以上の酸化感受性アミノ酸残基の1以上の酸化抵抗性アミノ酸残基による置換; 1以上のアミノ酸残基のアラニンによる置換、1以上のL-アミノ酸残基の1以上のD-アミノ酸残基による置換;二環式ペプチドリガンド内の1以上のアミド結合のN-アルキル化; 1以上のペプチド結合の代用結合による置換;ペプチド骨格長の修飾; 1以上のアミノ酸残基の -炭素上の水素の別の化学基による置換、システイン、リジン、グルタミン酸/アスパラギン酸、及びチロシンなどのアミノ酸を官能基化するような、該アミノ酸の好適なアミン、チオール、カルボン酸、及びフェノール反応性試薬による修飾、並びに官能基化に好適である直交反応性を導入するアミノ酸、例えば、それぞれ、アルキン又はアジドを有する部分による官能基化を可能にするアジド又はアルキン基を有するアミノ酸の導入又は置換;から選択される1以上の修飾が挙げられる。

## 【0141】

一実施態様において、修飾誘導体は、N-末端及び/又はC-末端修飾を含む。さらなる実施態様において、ここで、修飾誘導体は、好適なアミノ反応化学を用いるN-末端修飾、及び/又は好適なカルボキシ反応化学を用いるC-末端修飾を含む。さらなる実施態様において、該N-末端又はC-末端修飾は、限定されないが、細胞毒性剤、放射性キレート剤、又は発色団を含む、エフェクター基の付加を含む。

## 【0142】

さらなる実施態様において、修飾誘導体は、N-末端修飾を含む。さらなる実施態様において、N-末端修飾は、N-末端アセチル基を含む。この実施態様において、N-末端システイン基(本明細書においてC<sub>i</sub>と呼ばれる基)は、ペプチド合成の間に無水酢酸又は他の適切な試薬でキャッピングされ、N-末端がアセチル化された分子をもたらす。この実施態様は、アミノペプチダーゼの潜在的な認識点を除去するという利点を提供し、二環式ペプチドの分解の可能性を回避する。

## 【0143】

代わりの実施態様において、N-末端修飾は、エフェクター基のコンジュゲーション及びその標的に対する二環式ペプチドの効力の保持を促進する分子スペーサー基の付加を含む。

## 【0144】

さらなる実施態様において、修飾誘導体は、C-末端修飾を含む。さらなる実施態様にお

10

20

30

40

50

いて、C-末端修飾は、アミド基を含む。この実施態様において、C-末端システイン基(本明細書において、C<sub>iii</sub>と呼ばれる基)は、ペプチド合成の間にアミドとして合成され、C-末端がアミド化された分子をもたらす。この実施態様は、カルボキシペプチダーゼの潜在的な認識点を除去するという利点を提供し、二環式ペプチドのタンパク質分解の可能性を低下させる。

【0145】

一実施態様において、修飾誘導体は、1以上のアミノ酸残基の1以上の非天然アミノ酸残基による置換を含む。この実施態様においては、分解性プロテアーゼによって認識されることも、標的効力に何らかの有害作用を有することもない等配電子/等電子側鎖を有する非天然アミノ酸を選択してもよい。

10

【0146】

或いは、近くのペプチド結合のタンパク質分解性加水分解が立体構造的に及び立体的に妨害されるように、拘束されたアミノ酸側鎖を有する非天然アミノ酸を使用してもよい。特に、これらは、プロリン類似体、嵩高い側鎖、C-二置換誘導体(例えば、アミノイソ酪酸、Aib)、及びアミノ-シクロプロピルカルボン酸の単純な誘導体であるシクロアミノ酸に関する。

【0147】

一実施態様において、修飾誘導体は、スペーサー基の付加を含む。さらなる実施態様において、修飾誘導体は、N-末端システイン(C<sub>i</sub>)及び/又はC-末端システイン(C<sub>iii</sub>)へのスペーサー基の付加を含む。

20

【0148】

一実施態様において、修飾誘導体は、1以上の酸化感受性アミノ酸残基の1以上の酸化抵抗性アミノ酸残基による置換を含む。さらなる実施態様において、修飾誘導体は、トリプトファン残基のナフチルアラニン又はアラニン残基による置換を含む。この実施態様は、得られる二環式ペプチドリガンドの医薬安定性プロファイルを改善するという利点を提供する。

【0149】

一実施態様において、修飾誘導体は、1以上の荷電アミノ酸残基の1以上の疎水性アミノ酸残基による置換を含む。代わりの実施態様において、修飾誘導体は、1以上の疎水性アミノ酸残基の1以上の荷電アミノ酸残基による置換を含む。荷電アミノ酸残基と疎水性アミノ酸残基の正しいバランスは、二環式ペプチドリガンドの重要な特徴である。例えば、疎水性アミノ酸残基は、血漿タンパク質結合の程度、したがって、血漿中の利用可能な遊離画分の濃度に影響を及ぼし、一方、荷電アミノ酸残基(特に、アルギニン)は、ペプチドと細胞表面のリン脂質膜との相互作用に影響を及ぼす可能性がある。この2つの組合せは、ペプチド薬の半減期、分布容積、及び曝露に影響を及ぼす可能性があり、臨床的なエンドポイントに応じて調整することができる。さらに、荷電アミノ酸残基と疎水性アミノ酸残基の正しい組合せ及び数は、注射部位(ペプチド薬が皮下投与された場合)での刺激を軽減することができる。

30

【0150】

一実施態様において、修飾誘導体は、1以上のL-アミノ酸残基の1以上のD-アミノ酸残基による置換を含む。この実施態様は、立体障害により及び-ターン立体構造を安定化させるD-アミノ酸の傾向により、タンパク質分解の安定性を高めると考えられる(Tugyiらの文献(2005) PNAS, 102(2), 413-418)。

40

【0151】

一実施態様において、修飾誘導体は、任意のアミノ酸残基の除去及びアラニンによる置換を含む。この実施態様は、潜在的なタンパク質分解攻撃部位を除去するという利点を有する。

【0152】

上述の修飾の各々は、ペプチドの効力又は安定性を意図的に向上させる役割を果たすことに留意すべきである。修飾に基づくさらなる効力向上は、以下の機序によって達成する

50

ことができる:

- より高い親和性が達成されるように、疎水性効果を利用し、より低い解離速度をもたらす疎水性部位を組み込むこと;
- 長距離イオン相互作用を利用し、より速い会合速度をもたらし、より高い親和性をもたらす荷電基を組み込むこと(例えば、Schreiberらの文献、タンパク質の急速静電アシスト会合(Rapid, electrostatically assisted association of proteins)(1996)、Nature Struct. Biol. 3, 427-31を参照);並びに
  - 例えば、エントロピーの損失が標的結合時に最小になるように、アミノ酸の側鎖を正しく拘束すること、エントロピーの損失が標的結合時に最小になるように、骨格のねじれ角度を拘束すること、及び同一の理由で分子内にさらなる環化を導入することにより、さらなる拘束性をペプチドに組み込むこと

(総説については、Gentilucciらの文献、Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203、及びNestorらの文献、Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418を参照)。

【0153】

本発明の修飾されたヘテロタンデム二環式ペプチド複合体の例としては、下の表G及びHに掲載されているものが挙げられる:

表G:(EphA2:CD137;1:2)

【表7】

複合体番号	EphA2 BCY番号	取付点	リンカー	CD137 BCY番号	取付点	修飾因子
BCY14415	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928 BCY13389	dLys (PYA)4 dLys (PYA)4	Peg12-ビオチン
BCY14416	BCY9594	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928 BCY13389	dLys (PYA)4 dLys (PYA)4	Alexa Fluor (登録商標) 488
BCY14417	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Peg12-ビオチン
BCY14418	BCY13118	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928 BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Alexa Fluor (登録商標) 488

表H:(ネクチン-4:CD137;1:2)

10

20

30

40

50

【表8】

複合体 番号	ネクチン-4 BCY番号	取付点	リンカー	CD137 BCY番号	取付点	修飾因子
BCY13582	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928, BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	ビオチン-Peg12
BCY13583	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928, BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	Alexa Fluor 488
BCY13628	BCY8116	N-末端	N-(酸-PEG <sub>3</sub> )-N-ビス(PEG <sub>3</sub> -アジド)	BCY8928, BCY13389	dLys(PYA)4 dLys(PYA)4	シアニン5

## 【0154】

(同位体バリエーション)

本発明は、1以上の原子が、同じ原子番号を有するが、天然に通常見られる原子質量又は質量数とは異なる原子質量又は質量数を有する原子によって置き換えられている、本発明の医薬として許容し得る全ての(放射性)同位体標識ペプチドリガンド、並びに関連する(放射性)同位体を保持することができる金属キレート基が取り付けられている本発明のペプチドリガンド(「エフェクター」と呼ばれる)、並びに特定の官能基が関連する(放射性)同位体又は同位体標識された官能基で共有結合的に置き換えられている本発明のペプチドリガンドを含む。

## 【0155】

本発明のペプチドリガンドに含めるために好適な同位体の例は、水素の同位体、例えば、<sup>2</sup>H(D)及び<sup>3</sup>H(T)、炭素の同位体、例えば、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>C及び<sup>14</sup>C、塩素の同位体、例えば、<sup>36</sup>Cl、フッ素の同位体、例えば、<sup>18</sup>F、ヨウ素の同位体、例えば、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、及び<sup>131</sup>I、窒素の同位体、例えば、<sup>13</sup>N及び<sup>15</sup>N、酸素の同位体、例えば、<sup>15</sup>O、<sup>17</sup>O、及び<sup>18</sup>O、リンの同位体、例えば、<sup>32</sup>P、硫黄の同位体、例えば、<sup>35</sup>S、銅の同位体、例えば、<sup>64</sup>Cu、ガリウムの同位体、例えば、<sup>67</sup>Ga又は<sup>68</sup>Ga、イットリウムの同位体、例えば、<sup>90</sup>Y、並びにルテチウムの同位体、例えば、<sup>177</sup>Lu、並びにビスマスの同位体、例えば、<sup>213</sup>Biを含む。

## 【0156】

本発明の特定の同位体標識ペプチドリガンド、例えば、放射性同位体を組み込んでいるものは、薬物及び/又は基質の組織分布研究において、並びに罹患組織上のネクチン-4標的の存在及び/又は不在を臨床的に評価するために有用である。本発明のペプチドリガンドは、標識化合物と他の分子、ペプチド、タンパク質、酵素、又は受容体との間の複合体の形成を検出又は同定するために使用することができるという点で、価値ある診断特性をさらに有することができる。検出又は同定方法は、例えば、放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質(例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、イクオリン、及びルシフェラーゼ)などの標識剤で標識されている化合物を使用することができる。放射性同位体のトリチウム、すなわち、<sup>3</sup>H(T)及び炭素-14、すなわち、<sup>14</sup>Cは、その組込みの容易さ及び検出の手段が用意されていることを考慮して、この目的のために特に有用である。

## 【0157】

重水素、すなわち、<sup>2</sup>H(D)などのより重い同位体による置換は、より大きい代謝安定性、例えば、増加したインビオ半減期又は低下した必要投薬量の結果として得られる、特定の治療的利点をもたらす場合があり、それゆえ、いくつかの状況では、好ましい場合がある。

## 【0158】

<sup>11</sup>C、<sup>18</sup>F、<sup>15</sup>O、及び<sup>13</sup>Nなどの陽電子放出同位体による置換は、標的占有率を調べるための陽電子放出トエグラフィー(PET)試験において有用であり得る。

## 【0159】

本発明のペプチドリガンドの同位体標識化合物は、通常、当業者に公知の従来の技法によるか、又は以前に利用されていた非標識試薬の代わりに適切な同位体標識試薬を使用する添付の実施例に記載されているものと類似のプロセスによって調製することができる。

## 【0160】

(分子スキャフォールド)

分子スキャフォールドは、例えば、WO 2009/098450号及びその中で引用されている参考文献、特に、WO 2004/077062号及びWO 2006/078161号に記載されている。

## 【0161】

前述の文書に記載されているように、分子スキャフォールドは、低有機分子などの低分子であってもよい。

10

## 【0162】

一実施態様において、分子スキャフォールドは、高分子であってもよい。一実施態様において、分子スキャフォールドは、アミノ酸、ヌクレオチド、又は炭水化物から構成される高分子である。

## 【0163】

一実施態様において、分子スキャフォールドは、ポリペプチドの官能基と反応して、共有結合を形成することができる反応基を含む。

## 【0164】

分子スキャフォールドは、ペプチドとの結合を形成する化学基、例えば、アミン、チオール、アルコール、ケトン、アルデヒド、ニトリル、カルボン酸、エステル、アルケン、アルキン、アジド、無水物、スクシンイミド、マレイミド、ハロゲン化アルキル、及びハロゲン化アシルを含み得る。

20

## 【0165】

一実施態様において、分子スキャフォールドは、ヘキサヒドロ-1,3,5-トリアジン、特に、1,3,5-トリアクリロイルヘキサヒドロ-1,3,5-トリアジン(「TATA」)、もしくはその誘導体を含み得るか、又はこれらからなり得る。

## 【0166】

本発明の分子スキャフォールドは、本発明のコードされたライブラリーのポリペプチドの官能基が分子スキャフォールドとの共有結合を形成するのを可能にする化学基を含有する。該化学基は、アミン、チオール、アルコール、ケトン、アルデヒド、ニトリル、カルボン酸、エステル、アルケン、アルキン、無水物、スクシンイミド、マレイミド、アジド、ハロゲン化アルキル、及びハロゲン化アシルを含む広範な官能基から選択される。

30

## 【0167】

システインのチオール基と反応させるために分子スキャフォールド上で使用することができるスキャフォールド反応基は、ハロゲン化アルキル(又はハロゲノアルカンもしくはハロアルカンとも命名されている)である。

## 【0168】

例としては、プロモメチルベンゼン(TBMBによって例示されるスキャフォールド反応基)又はヨードアセトアミドが挙げられる。化合物をタンパク質中のシステインに選択的にカップリングするために使用される他のスキャフォールド反応基は、マレイミド、-不飽和カルボニル含有化合物、及び-ハロメチルカルボニル含有化合物である。本発明において分子スキャフォールドとして使用し得るマレイミドの例としては:トリス-(2-マレイミドエチル)アミン、トリス-(2-マレイミドエチル)ベンゼン、トリス-(マレイミド)ベンゼンが挙げられる。不飽和カルボニル含有化合物の例は、1,1',1''-(1,3,5-トリアジナン-1,3,5-トリイル)トリプロパ-2-エン-1-オン(TATA)である(Angewandte Chemie, International Edition(2014), 53(6), 1602-1606)。-ハロメチルカルボニル含有化合物の例は、N,N',N''-(ベンゼン-1,3,5-トリイル)トリス(2-プロモアセトアミド)である。セレノシステインも、システインと同様の反応性を有する天然アミノ酸であり、同じ反応に使用することができる。したがって、システインが言及されている場合はいつでも、文脈上、別

40

50

のことが示唆されない限り、一般に、セレノシステインを代わりに用いることが許される。

【0169】

(合成)

本発明のペプチドは、標準的な技法によって合成的に製造した後、インピトロで分子スキャフォールドと反応させることができる。これを実施する場合、標準的な化学を使用することができる。これにより、さらなる下流での実験又は検証のための可溶性材料の迅速な大規模調製が可能になる。そのような方法は、Timmermanらの文献(上記)に開示されているもののような従来の化学を用いて達成され得る。

【0170】

したがって、本発明はまた、本明細書に記載されているように選択されるポリペプチド又はコンジュゲートの製造に関するものであり、ここで、該製造は、以下に説明されるような任意のさらなる工程を含む。一実施態様において、これらの工程は、化学合成によって作られた最終生成物のポリペプチドコンジュゲートに対して実施される。

10

【0171】

任意に、対象となるポリペプチド中のアミノ酸残基は、コンジュゲート又は複合体を製造するときに置換されてもよい。

【0172】

ペプチドを伸長させて、例えば、別のループを組み込み、それゆえ、複数の特異性を導入することもできる。

【0173】

20

ペプチドを伸長させるために、それは、単純に、標準的な固相又は液相化学を用いて、直交保護されたリジン(及び類似体)を用いて、そのN-末端もしくはC-末端で又はループ内で化学的に伸長されてもよい。標準的な(バイオ)コンジュゲーション技法を用いて、活性化された又は活性化可能なN-又はC-末端を導入してもよい。或いは、付加は、例えば、(Dawsonらの文献、1994、ネイティブケミカルライゲーションによるタンパク質の合成(Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation). Science 266:776-779)に記載されている断片縮合もしくはネイティブケミカルライゲーションによるか、又は例えば(Changらの文献、Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 20; 91(26):12544-8もしくはHikariらの文献、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters、第18巻、第22号、2008年11月15日、6000~6003頁)に記載されているサブチリガーゼを用いて、酵素により行われてもよい。

30

【0174】

或いは、ペプチドは、ジスルフィド結合を介するさらなるコンジュゲーションによって伸長又は修飾されてもよい。これは、第一及び第二のペプチドが細胞の還元環境内で互いに解離することを可能にするという追加の利点を有する。この場合、分子スキャフォールド(例えば、TATA)は、3つのシステイン基と反応するように第一のペプチドの化学合成の間に付加されることができ;その後、さらなるシステイン又はチオールが第一のペプチドのN又はC-末端に付加されることができ、その結果、このシステイン又はチオールが第二のペプチドの遊離のシステイン又はチオールとのみ反応して、ジスルフィド結合した二環式ペプチド-ペプチドコンジュゲートを形成した。

40

【0175】

同様の技法は、四重特異性分子を潜在的に生じさせる、2つの二環式二重特異性大環状分子の合成/カップリングに等しく適用される。

【0176】

さらに、他の官能基又はエフェクター基の付加は、適切な化学を用いて、N-もしくはC-末端で、又は側鎖を介してカップリングさせて、同じ方法で達成されてもよい。一実施態様において、カップリングは、いずれかの実体の活性を遮断しないような方法で実行される。

【0177】

(医薬組成物)

50

本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義されるペプチドリガンドを1以上の医薬として許容し得る賦形剤との組合せで含む医薬組成物が提供される。

【0178】

通常、本ペプチドリガンドは、薬理学的に適切な賦形剤又は担体と一緒に精製された形態で利用される。典型的には、これらの賦形剤又は担体は、生理食塩水及び/又は緩衝化媒体を含む、水性もしくはアルコール/水性溶液、エマルジョン、又は懸濁液を含む。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロース、及び塩化ナトリウム、並びに乳酸加リンガーが挙げられる。生理的に許容し得る好適なアジュvantは、ポリペプチド複合体を懸濁状態に保つために必要な場合、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、及びアルギネートなどの増粘剤から選択されてもよい。

10

【0179】

静脈内ビヒクルとしては、流体及び栄養補充液及び電解質補充液、例えば、リンガーデキストロースに基づくものが挙げられる。また、防腐剤並びに他の添加物、例えば、抗微生物薬、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガスが存在してもよい(Mackの文献(1982)、レミントンの医薬品科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)、第16版)。

【0180】

本発明のペプチドリガンドは、別々に投与される組成物として、又は他の薬剤と併せて使用されてもよい。これらとしては、抗体、抗体断片、並びに様々な免疫療法薬、例えば、シクロスボリン、メトトレキサート、アドリアマイシン、又はシスプラチニン、及び免疫毒素を挙げることができる。医薬組成物は、本発明のタンパク質リガンドと併せた様々な細胞毒性剤もしくは他の薬剤の「カクテル」、又は投与前にプールされているか、プールされていないかを問わず、異なる標的リガンドを用いて選択されたポリペプチドなどの、異なる特異性を有する本発明による選択されたポリペプチドの組合せさえも含むことができる。

20

【0181】

本発明による医薬組成物の投与の経路は、当業者に一般的に公知の任意のものであってもよい。療法のために、本発明のペプチドリガンドは、標準的な技法に従って任意の患者に投与することができる。投与は、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮的、肺経路を介するもの、又は同じく適切に、カテーテルを用いる直接注入によるものを含め、任意の適切な様式によるものであることができる。好ましくは、本発明による医薬組成物は、吸入によって投与される。投薬量及び投与の頻度は、患者の年齢、性別、及び状態、他の薬物の同時的な投与、禁忌、並びに臨床医によって考慮される他のパラメータによって決まる。

30

【0182】

本発明のペプチドリガンドは、保存前に凍結乾燥し、使用前に好適な担体中で再構成することができる。この技法は、効果的であることが示されており、当技術分野で公知の凍結乾燥及び再構成技法を利用することができる。凍結乾燥及び再構成は様々な程度の活性損失をもたらし得ること、及び補償するために、レベルを上方に調整する必要があり得ることが当業者によって理解されるであろう。

40

【0183】

本発明のペプチドリガンド又はそのカクテルを含有する組成物は、予防的及び/又は治療的処置のために投与することができる。特定の治療用途において、選択される細胞の集団の少なくとも部分的な阻害、抑制、調節、死滅化、又は何らかの他の測定可能なパラメータを達成するために十分な量は、「治療有効用量」として定義される。この投薬量を達成するために必要とされる量は、疾患の重症度及び患者自身の免疫系の全般的な状態によって決まるが、概ね、体重1キログラム当たり0.005~5.0mgの選択されるペプチドリガンドの範囲であり、0.05~2.0mg/kgの用量がより一般的に使用される。予防用途のために、本ペプチドリガンド又はそのカクテルを含有する組成物はまた、同様の又はわずかに少ない投薬量で投与されてもよい。

50

## 【0184】

本発明によるペプチドリガンドを含有する組成物を予防的及び治療的な設定で利用して、哺乳動物における選択標的細胞集団の変化、不活性化、死滅化、又は除去を助けることができる。さらに、本明細書に記載されるペプチドリガンドを体外で又はインビトロで選択的に用いて、細胞の異成分集合体から標的細胞集団を選択的に死滅させるか、枯渇させるか、又は他の形で効果的に除去することができる。哺乳動物由来の血液を選択されたペプチドリガンドと体外で組み合わせることができ、それにより、標準的な技法に従って哺乳動物に戻すために、望ましくない細胞を死滅させるか、又は別の形で血液から除去する。

## 【0185】

(治療的使用)

10

本発明のさらなる態様によれば、癌の予防、抑制、又は治療において使用するための本明細書で定義されるヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

## 【0186】

治療(又は抑制)され得る癌(及びその良性対応物)の例としては、上皮起源の腫瘍(腺癌、扁平上皮癌、移行細胞癌、及び他の癌腫を含む、様々なタイプの腺腫及び癌腫)、例えば、膀胱及び尿路、乳房、消化管(食道、胃(stomach)(胃(gastric)))、小腸、結腸、直腸、並びに肛門を含む)、肝臓(肝細胞癌)、胆嚢及び胆管系、外分泌胰臓、腎臓、肺(例えば、腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、気管支肺胞上皮癌、及び中皮腫)、頭頸部(例えば、舌、口腔、喉頭、咽頭、上咽頭、扁桃、唾液腺、鼻腔、及び副鼻腔の癌)、卵巣、卵管、腹膜、膣、外陰部、陰茎、子宮頸部、子宮筋層、子宮内膜、甲状腺(例えば、甲状腺濾胞癌)、副腎、前立腺、皮膚、及び付属器の癌(黒色腫、基底細胞癌、扁平上皮細胞癌、角化棘細胞腫、異形成母斑);血液悪性腫瘍(すなわち、白血病、リンパ腫)並びに前悪性血液障害及びリンパ系譜の血液悪性腫瘍及び関連疾患を含む境界領域悪性腫瘍(例えば、急性リンパ性白血病[ALL]、慢性リンパ性白血病[CLL]、B細胞リンパ腫、例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫[DLBCL]、濾胞性リンパ腫、バーキットリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫及び白血病、ナチュラルキラー[NK]細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、有毛細胞白血病、意義不明の単クローニングガンマグロブリン血症、形質細胞腫、多発性骨髄腫、及び移植後リンパ増殖性障害)、並びに骨髄系譜の血液悪性腫瘍及び関連疾患(例えば、急性骨髄性白血病[AML]、慢性骨髄性白血病[CML]、慢性骨髄単球性白血病[CMMI]、好酸球增多症候群、骨髄増殖性障害、例えば、真性多血症、本態性血小板血症、及び原発性骨髄線維症、骨髄増殖性症候群、骨髄異形成症候群、並びに前骨髄細胞性白血病);間葉起源の腫瘍、例えば、軟部組織、骨、もしくは軟骨の肉腫、例えば、骨肉腫、線維肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、血管肉腫、カポジ肉腫、ユーイング肉腫、滑膜肉腫、類上皮性肉腫、消化管間質性腫瘍、良性及び悪性の組織球腫、並びに隆起性皮膚線維肉腫;中枢もしくは末梢神経系の腫瘍(例えば、星細胞腫、神経膠腫、及び膠芽細胞腫、髓膜腫、上衣腫、松果体腫瘍、及びシュワン細胞腫);内分泌腫瘍(例えば、下垂体腫瘍、副腎腫瘍、膵島細胞腫瘍、副甲状腺腫瘍、カルチノイド腫瘍、及び甲状腺の髓様癌);眼球及び付属器腫瘍(例えば、網膜芽腫);生殖細胞及び栄養膜腫瘍(例えば、奇形腫、精上皮腫、未分化胚細胞腫、胞状奇胎、及び絨毛癌);並びに小児性及び胎児性腫瘍(例えば、髓芽腫、神経芽腫、ウィルムス腫瘍、および未分化神経外胚葉性腫瘍);又は患者を悪性腫瘍に罹りやすい状態にしておく先天性もしくはその他の症候群(例えば、色素性乾皮症)が挙げられるが、これらに限定されない。

20

## 【0187】

さらなる実施態様において、癌は、例えば、非ホジキンリンパ腫(NHL)、バーキットリンパ腫(BL)、多発性骨髄腫(MM)、B慢性リンパ球性白血病(B-CLL)、B及びT急性リンパ球性白血病(ALL)、T細胞リンパ腫(TCL)、急性骨髄性白血病(AML)、有毛細胞白血病(HCL)、ホジキンリンパ腫(HL)、並びに慢性骨髄性白血病(CML):から選択される造血器悪性腫瘍から選択される。

30

## 【0188】

「予防」という用語への本明細書における言及は、疾患の誘導前の防御的な組成物の投

40

50

与を含む。「抑制」は、誘導性事象の後であるが、疾患の臨床的出現の前の組成物の投与を指す。「治療」は、疾患症状が顕在化した後の防御的な組成物の投与を含む。

【0189】

疾患からの防御又は疾患の治療におけるペプチドリガンドの有効性をスクリーニングするために使用することができる動物モデル系が利用可能である。動物モデル系の使用は、ヒト及び動物の標的と交差反応することができるポリペプチドリガンドの開発を可能にする本発明によって促進される。

【0190】

本発明を、以下の実施例を参照して、以下でさらに説明する。

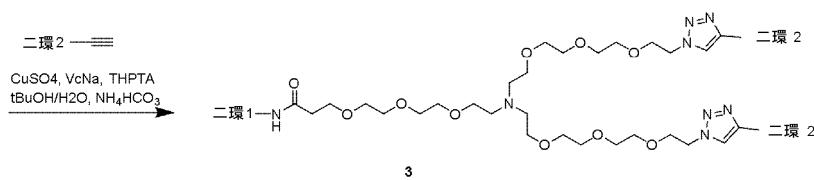
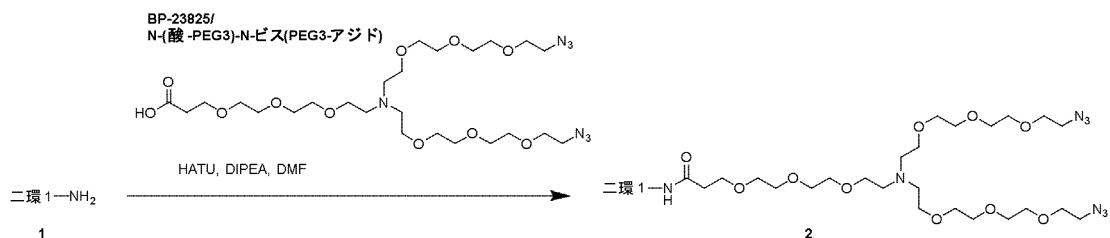
【実施例】

【0191】

(実施例)

一般に、本発明のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体のいくつかは、以下の一般的な方法に従って調製することができる:

【化21】



【0192】

全ての溶媒を脱気し、N<sub>2</sub>で3回バージした。BP-23825(1.0当量)、HATU(1.2当量)、及びDIPEA(2.0当量)のDMF溶液を5分間混合し、その後、二環1(1.2当量)を添加する。反応混合物を40℃で16時間攪拌する。その後、反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去し、分取HPLCにより精製すると、中間体2が得られる。

【0193】

中間体2(1.0当量)及び二環2(2.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(1.0当量)、VcNa(4.0当量)、及びTHPTA(2.0当量)を添加する。最後に、0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を添加して、pHを8に調整する。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40℃で16時間攪拌する。反応混合物を分取HPLCにより直接精製した。

【0194】

この方法を用いて調製されたヘテロタンデム二環式ペプチド複合体は、以下に掲載されている:

10

20

30

40

50

【表 9】

EphA2/CD137	ネクチン/CD137	PDL1/CD137
BCY12491	BCY11385	BCY12662
BCY12723	BCY11864	BCY12722
BCY12724	BCY11863	
BCY12725	BCY12484	<b>OX40</b>
BCY12726	BCY12485	BCY12967
BCY12728	BCY12486	
BCY12729	BCY12487	
BCY12730	BCY12490	

10

20

30

40

50

BCY12731	BCY12586	
BCY12732	BCY12587	
BCY12973	BCY12589	
BCY12974	BCY12590	
BCY12975	BCY12588	
BCY12976	BCY12760	
BCY12977	BCY12761	
BCY12978	BCY14602	
BCY13042		
BCY13043		
BCY13044		
BCY13045		
BCY13046		
BCY13047		
BCY13048		
BCY13049		
BCY13050		20
BCY13051		
BCY13052		
BCY13053		
BCY13054		
BCY13138		
BCY13139		
BCY13140		
BCY13270		
BCY13271		
BCY13272		30
BCY13273		
BCY13274		
BCY13275		
BCY13276		
BCY13277		
BCY13278		
BCY13279		
BCY13280		40

BCY13281		
BCY13282		
BCY13283		
BCY13284		
BCY13285		
BCY13286		
BCY13287		
BCY13288		
BCY13289		
BCY13341		
BCY13343		
BCY14049		
BCY14050		
BCY14051		
BCY14052		
BCY14053		
BCY14054		
BCY14055		
BCY14056		
BCY14334		
BCY14335		
BCY15217		

10

20

30

## 【0195】

本発明の選択されたヘテロタンデム二環式ペプチド複合体のより詳細な実験は、本明細書中、以下に提供されている：

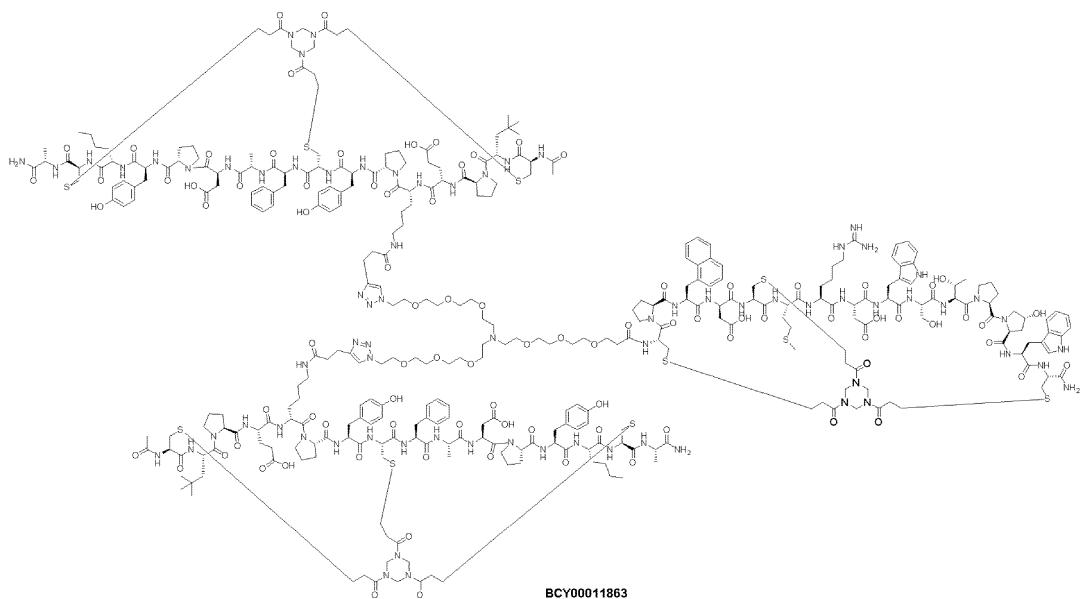
## 【0196】

(実施例1: BCY11863の合成)

40

50

## 【化22】



(化合物2の調製)

## 【化23】



N-(酸-PEG3)-N-ビス(PEG3-アジド)(70.0mg、112.2 μmol、1.0当量)、HATU(51.2 mg、134.7 μmol、1.2当量)、及びDIEA(29.0mg、224.4 μmol、40 μL、2.0当量)の混合物をDMF(2mL)に溶解させ、5分間混合した。その後、BCY8116(294.0mg、135.3 μmol、1.2当量)を添加した。反応混合物を40 °Cで16時間攪拌した。LC-MSにより、ごく一部の化合物2が残存し(MW: 2172.49、観測されたm/z: 1087.1)、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(MW: 2778.17、観測されたm/z: 1389.3([M/2+H<sup>+</sup>])、926.7([M/3+H<sup>+</sup>]))が検出されることが示された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去すると、残渣が生じた。その後、残渣を分取HPLC(中性条件)により精製した。化合物2(194.5mg、66.02 μmol、29.41%収率、94.3%純度)が白色の固体として得られた。

## 【0197】

(BCY11863の調製)

## 【化24】



化合物2(100.0mg、36.0 μmol、1.0当量)、BCY8928(160.0mg、72.0 μmol、2.0当量)の混合物をまず2mLのt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、180 μL、1.0当量)及びVcNa(28.5mg、143.8 μmol、4.0当量)、THPTA(31.2mg、71.8 μmol、2.0当量)を添加した。最後に、0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を添加して、pHを8に調整した。この全ての溶媒を脱気し、N<sub>2</sub>で3回バージした。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40 °Cで16時間攪拌した。LC-MSにより、BCY8928が残存し、所望のm/z(計算されたMW: 7213.32、観測されたm/z: 1444.0([M/5+H<sup>+</sup>]))も検出されることが示された。反応混合物を分取HPLCにより直接精製した。最初の精製により、BCY11863(117.7mg、15.22 μmol、42.29%収率、93.29%純度)がTFA塩として得られ、一方、あまり純粋でない画分を分取HPLC(TFA条件)により再び精製すると、BCY11863(33.2mg、4.3 μmol、11.92%収率、95.55%純度)がTFA塩として得られた。

10

20

30

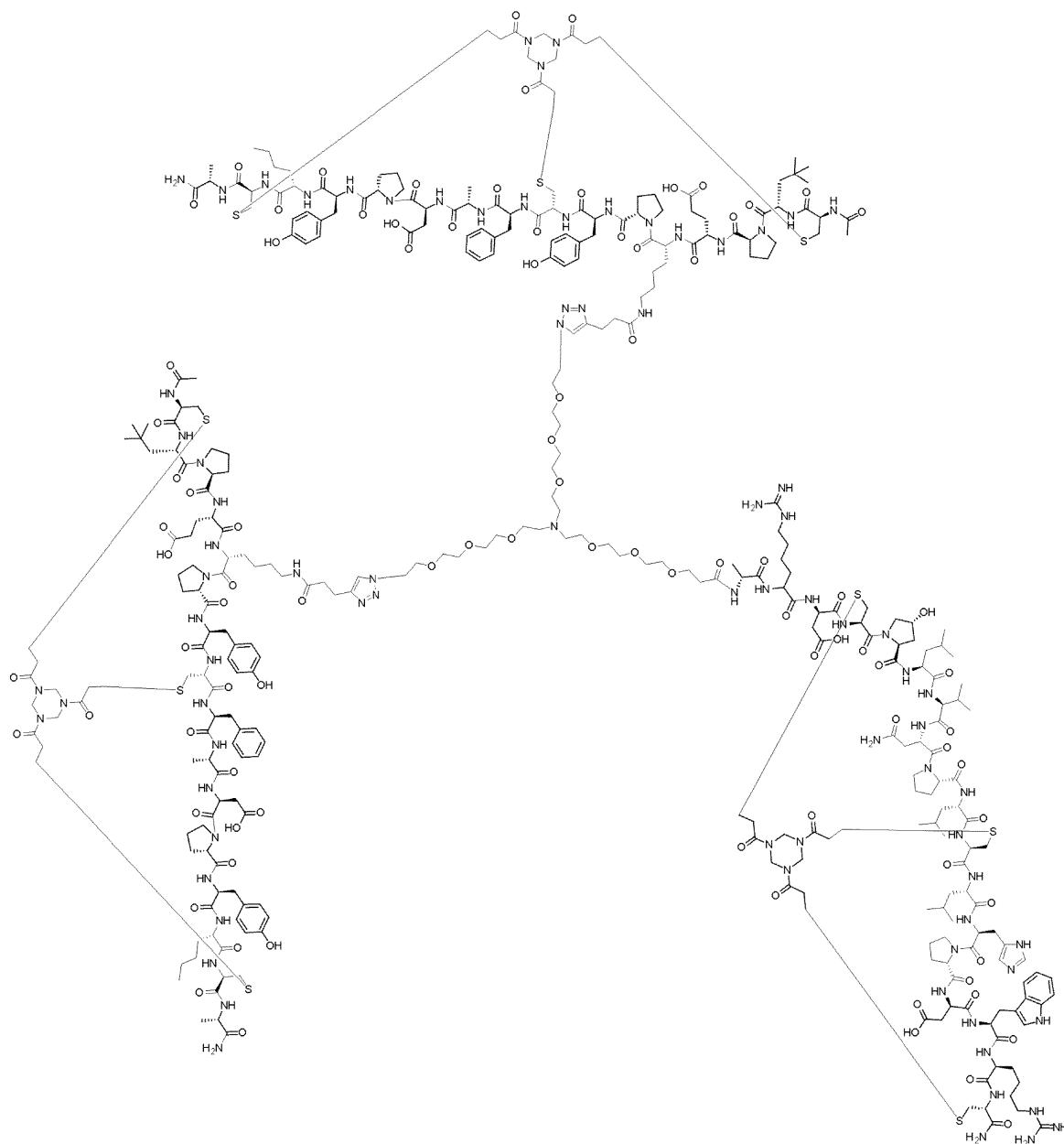
40

50

【0198】

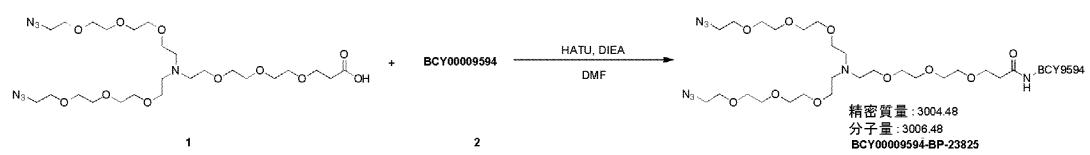
(実施例2: BCY12491の合成)

【化25】



(BP-23825-BCY9594の調製のための一般的手順)

【化26】



DMF(3mL)中の化合物1(BP-23825、60.0mg、96.2μmol、1.0当量)の混合物に、DIEA(12.4mg、96.2μmol、16.8μL、1.0当量)及びHATU(38.4mg、101μmol、1.05当量)を添加し、混合物を5分間攪拌した。その後、BCY9594(243mg、101μmol、1.05当量)を混合物に添加し、N<sub>2</sub>で3回ページし、その後、N<sub>2</sub>雰囲気下、40℃で16時間攪拌した。LC-MSにより、化合物1が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出された。反応混合物を分取HPLCにより精製すると、(BP-23825)-

10

20

30

40

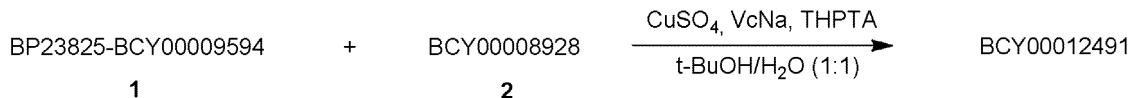
50

BCY9594(154mg、48.1 μmol、50.0% 収率、94.0% 純度)が白色の固体物として得られた。計算されたMW: 3006.48、観測されたm/z: 1002.8 [M/3+H]<sup>+</sup>、1504.4 [M/2+H]<sup>+</sup>

【0199】

(化合物BCY12491の調製のための一般的手順)

【化27】



10

化合物1(56.0mg、18.6 μmol、1.0当量)、BCY8928(83.0mg、37.2 μmol、2.0当量)、及びTHPTA(17.0mg、39.1 μmol、2.1当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、1mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>で3回バージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、94.0 μL、2.0当量)及びVcNa(15.0mg、74.5 μmol、4.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40℃で3時間攪拌した。LC-MSにより、化合物3が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLC(TFA条件)により精製すると、BCY12491(59.2mg、7.79 μmol、41.81% 収率、97.9% 純度)が白色の固体物として得られた。計算されたMW: 7441.63、観測されたm/z: 1861.1([M/4+H]<sup>+</sup>)、1489.0([M/5+H]<sup>+</sup>)。

20

【0200】

(実施例3: BCY12730の合成)

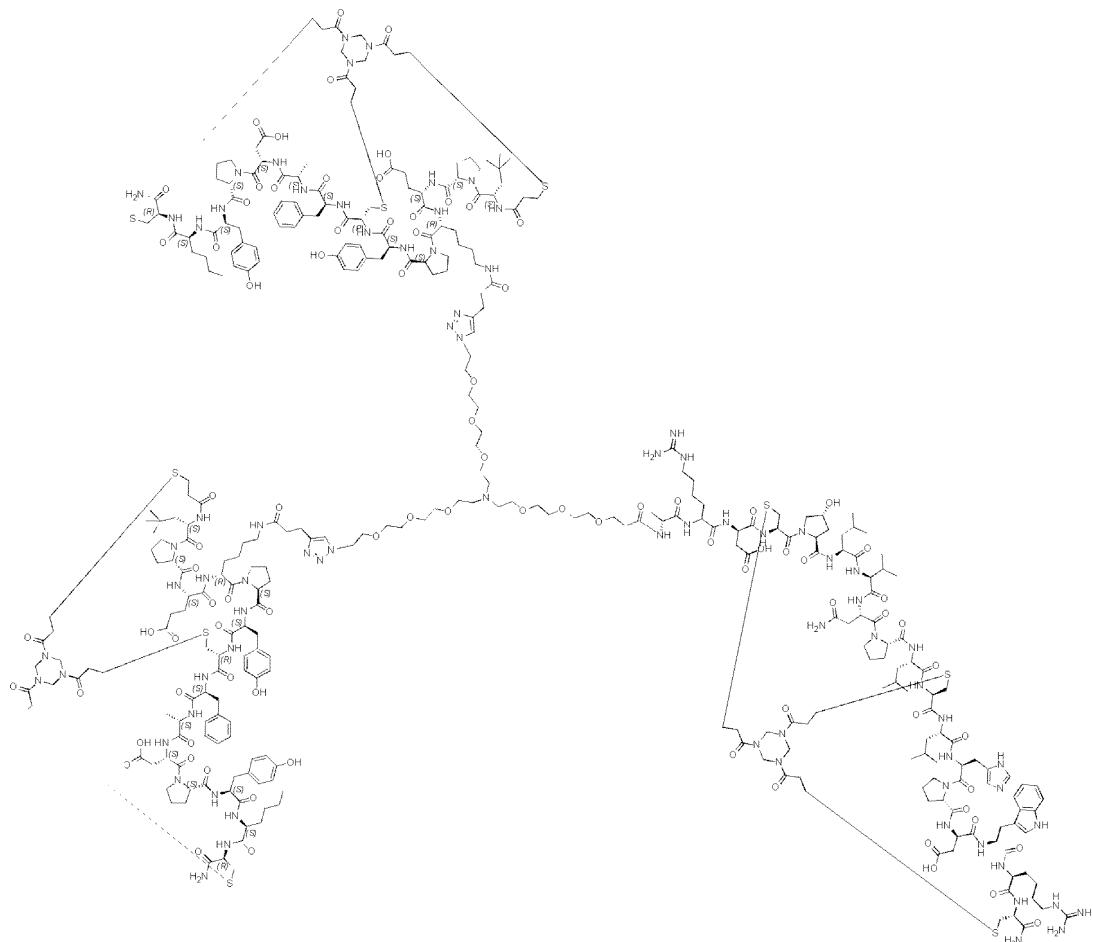
20

30

40

50

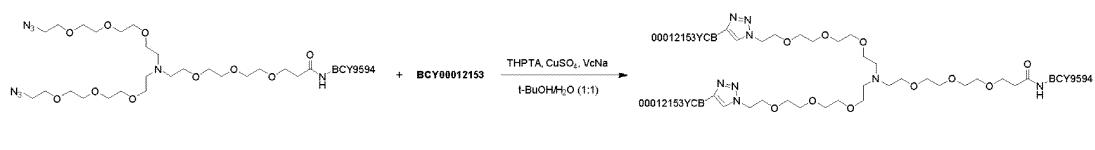
## 【化28】



10

20

## 【化29】



30

(化合物BCY12730の調製のための一般的手順)

(BP-23825)-BCY9594(20.0mg、6.65  $\mu$ mol、1.0当量)、BCY12153(27.8mg、13.3  $\mu$ mol、2.0当量)、及びTHPTA(5.8mg、13.3  $\mu$ mol、2.0当量)の混合物をt-BuOH(0.5mL)及びH<sub>2</sub>O(0.5mL)(溶媒は全て予め脱気し、N<sub>2</sub>で3回バージした)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、33.3  $\mu$ L、13.3  $\mu$ mol、2.0当量)、VcNa(0.4M、66.5  $\mu$ L、26.6  $\mu$ mol、4.0当量)をN<sub>2</sub>雰囲気下で混合物に添加した。その後、pHが8となるまで、NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を混合物に添加した。混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25℃で2時間攪拌した。LC-MSにより、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を分取HPLCにより2回精製すると、化合物BCY12730(7.50mg、0.84  $\mu$ mol、12.7%収率、96.3%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 7185.39、観測されたm/z: 1197.5[M/6+H]<sup>+</sup>、1438.4[M/5+H]<sup>+</sup>。

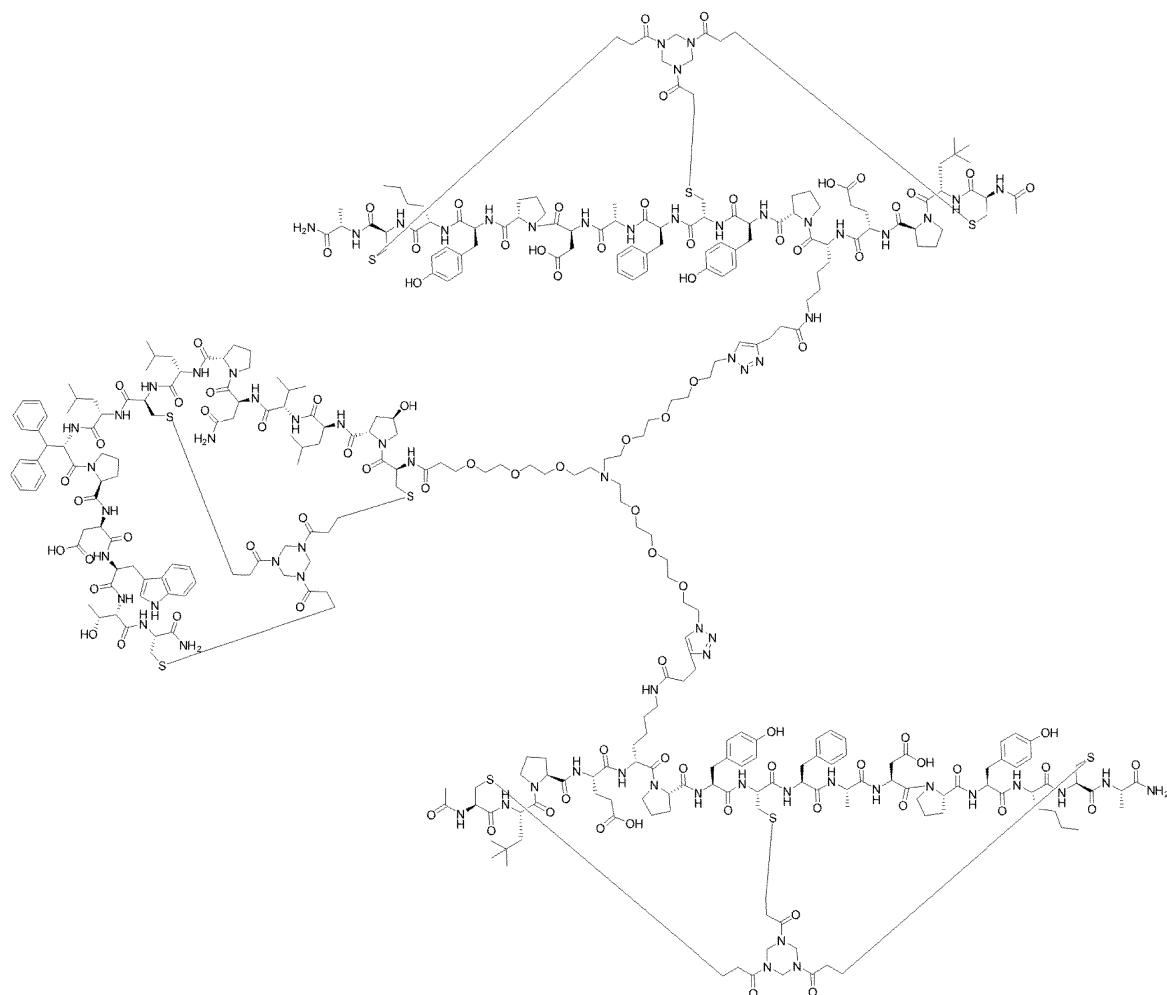
## 【0201】

(実施例4: BCY13048の合成)

40

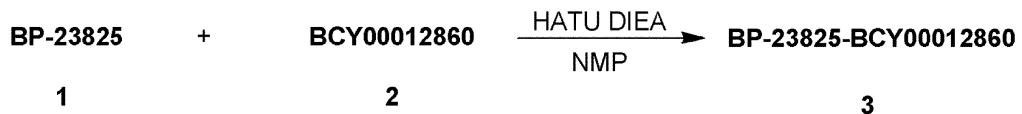
50

## 【化30】



(BP-23825-BCY12860の調製のための手順)

## 【化31】



BP-23825(12.0mg、19.24  $\mu\text{mol}$ 、1.2当量)及びHATU(7.32mg、19.24  $\mu\text{mol}$ 、1.2当量)の混合物をNMP(0.3mL)に溶解させ、その後、この溶液のpHをDIEA(5.12mg、40.26  $\mu\text{mol}$ 、7  $\mu\text{L}$ 、2.4当量)の滴加により8に調整し、その後、溶液を40℃で5分間活性化させた。化合物2(33.0mg、16.03  $\mu\text{mol}$ 、1.0当量)をNMP(0.5mL)に溶解させ、その後、活性化した溶液に滴下し、この溶液のpHをDIEAの滴加により8に調整した。反応混合物を40℃で0.5時間攪拌した。LC-MSにより、BCY12860が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(MW: 2667.12、観測されたm/z: 1334.2([(M/2+H<sup>+</sup>])], 889.8([(M/3+H<sup>+</sup>)]))が検出されることが示された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去すると、残渣が生じた。その後、残渣を分取HPLC(中性条件)により精製した。BP-23825-BCY12860(26.5mg、7.88  $\mu\text{mol}$ 、49.12%収率、79.26%純度)が白色の固体として得られた。

## 【0202】

(BCY13048の調製のための手順)

## 【化 3 2】

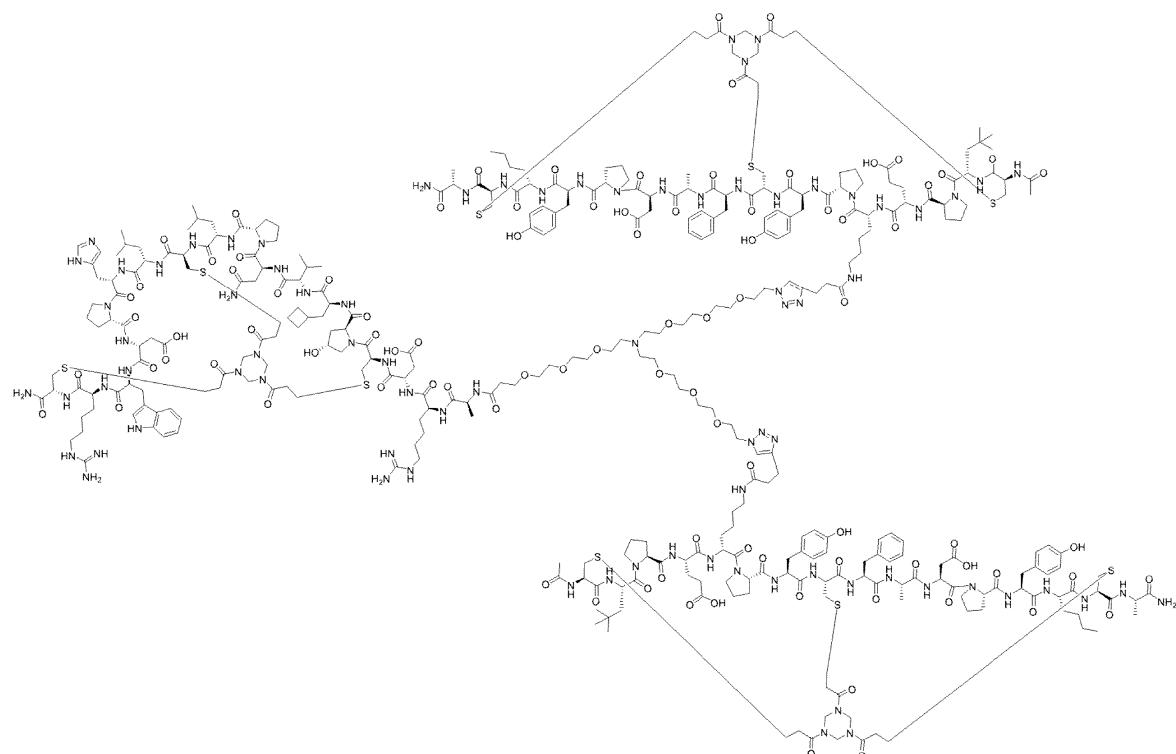


化合物3(26.5mg、9.94  $\mu\text{mol}$ 、1.0当量)、化合物4(47.0mg、20.87  $\mu\text{mol}$ 、2.1当量)、及びTHPTA(0.4M、58  $\mu\text{L}$ 、2.3当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、1mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>で3回バージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、58  $\mu\text{L}$ 、2.3当量)及びVcNa(0.4M、115  $\mu\text{L}$ 、4.6当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により、8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40℃で1時間攪拌した。LC-MSにより、化合物4が残存し、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(計算されたMW: 7102.28、観測されたm/z: 1776.4([M/4+H]<sup>+</sup>)、1421.3([M/3+H]<sup>+</sup>))が検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLC(TFA条件)により精製すると、BCY13048(14.1mg、1.91  $\mu\text{mol}$ 、19.00%収率、96.2%純度)が白色の固体として得られた。

## 【0203】

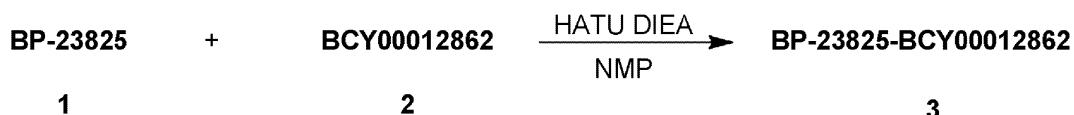
(実施例5: BCY13050の合成)

## 【化 3 3】



(BP-23825-BCY12862の調製のための手順)

## 【化 3 4】



BP-23825(10.0mg、16.03  $\mu\text{mol}$ 、1.2当量)及びHATU(6.10mg、16.03  $\mu\text{mol}$ 、1.2当量)の混合物をNMP(0.3mL)に溶解させ、その後、この溶液のpHをDIEA(4.45mg、34.37  $\mu\text{mol}$ 、6  $\mu\text{L}$ 、2.6当量)の滴加により8に調整し、その後、溶液を25℃で6分間攪拌した。化合物2(33.0mg、13.36  $\mu\text{mol}$ 、1.0当量)をNMP(0.5mL)に溶解させ、その後、

10

20

30

40

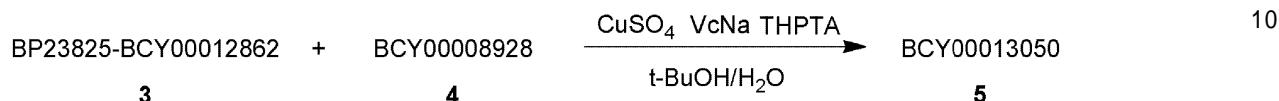
50

活性化した溶液に滴加した。この溶液のpHをDIEAの滴加により8に調整した。反応混合物を40℃で0.5時間攪拌した。LC-MSにより、BCY12862が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(MW: 3018.49、観測されたm/z: 1007.0([(M/3+H<sup>+</sup>)]))が検出されることが示された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去すると、残渣が生じた。その後、残渣を分取HPLC(中性条件)により精製した。BP-23825-BCY12862(20.9 mg、6.92 μmol、51.82% 収率、94.9% 純度)が白色の固体として得られた。

【 0 2 0 4 】

### (BCY13050の調製のための手順)

【化 3 5】

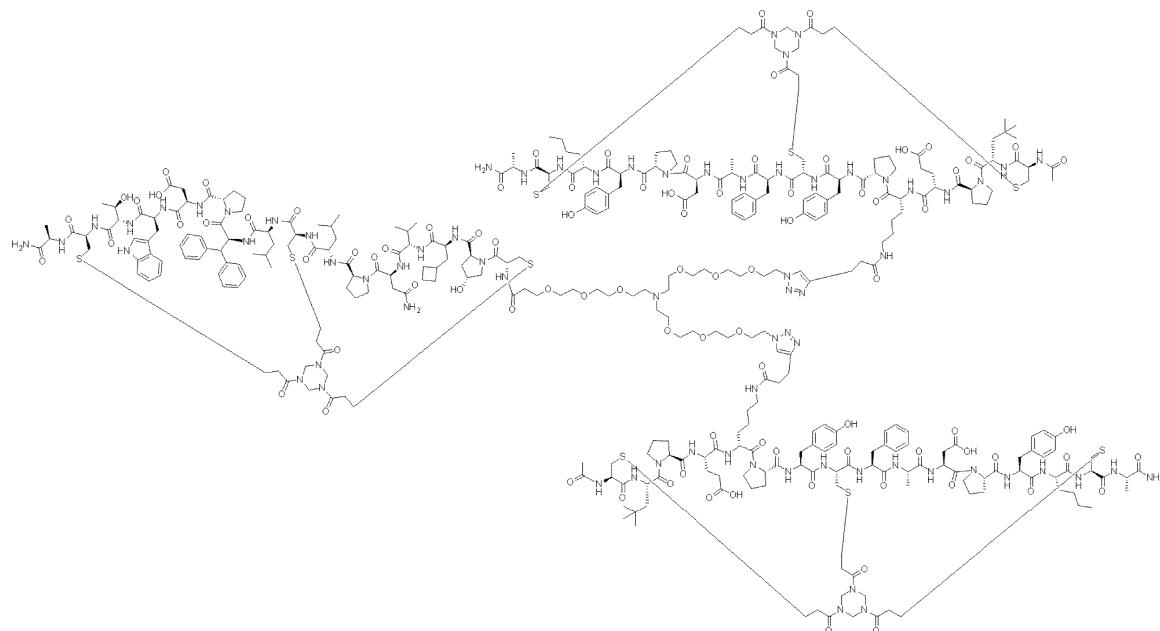


化合物3(20.9 mg、6.92  $\mu$ mol、1.0当量)、化合物4(32.2 mg、14.54  $\mu$ mol、2.1当量)、及びTHPTA(7.0 mg、15.93  $\mu$ mol、2.3当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、1 mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>で3回バージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4 M、39  $\mu$ L、2.3当量)及びVcNa(6.3 mg、31.85  $\mu$ mol、4.6当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40 °Cで1時間搅拌した。LC-MSにより、化合物4が残存し、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(計算されたMW: 7453.66、観測されたm/z: 1864.2([M/4+H]<sup>+</sup>))が検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLC(TFA条件)により精製すると、BCY13050(6.0 mg、0.77  $\mu$ mol、11.24 %收率、96.7 %純度)が白色の固体物として得られた。

【 0 2 0 5 】

(実施例6: BCY13053の合成)

【化 3 6】



### (BCY12865-BP23825の調製のための手順)

【化 3 7】



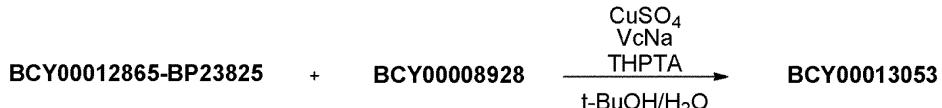
BP-23825(14.0mg、22.45  $\mu$  mol、1.2当量)及びHATU(8.5mg、22.35  $\mu$  mol、1.2当量)をまず0.5mLのNMPに溶解させ、その後、DIEA(7.8  $\mu$  L、44.77  $\mu$  mol、2.4当量)を添加し、混合物を25℃で6分間攪拌し、その後、BCY12865(40.0mg、18.65  $\mu$  mol、1.0当量)を添加した。反応混合物を25℃で0.5時間攪拌した。LC-MSにより、所望のm/zを有する1つのピーク(計算されたMW: 2750.21、観測されたm/z: 1375.5([M/2+H]<sup>+</sup>))が示された。反応混合物を分取HPLC(TFA条件)により精製すると、化合物1(15.9mg、5.78  $\mu$  mol、31.0%収率、96.69%純度)が白色の固体として得られた。

## 【0206】

(BCY13053の調製のための手順)

## 【化38】

10



1

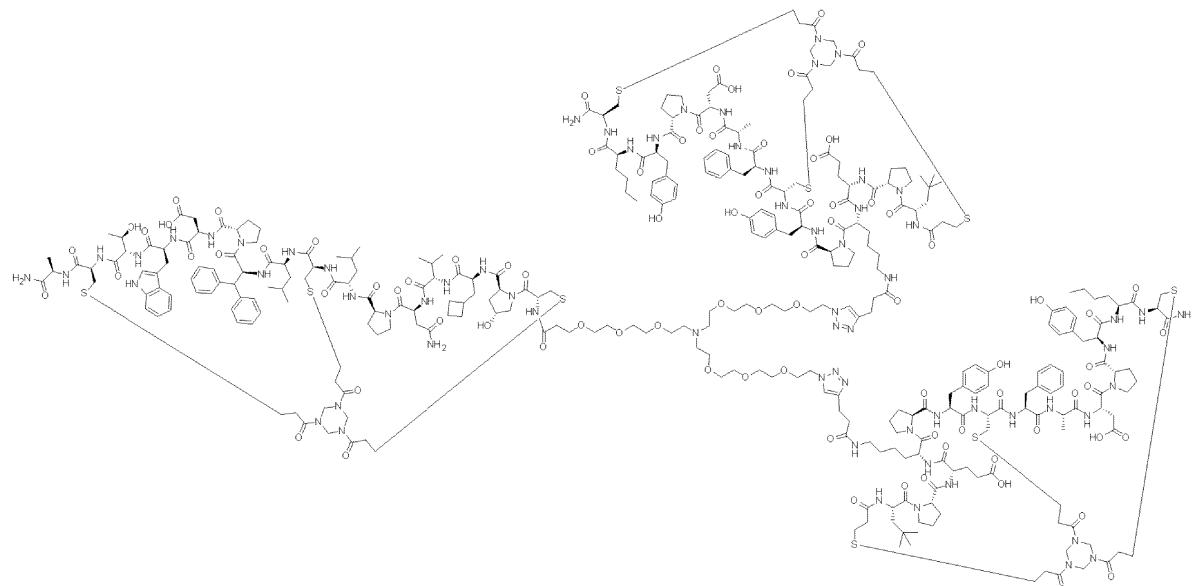
化合物1(15.9mg、5.78  $\mu$  mol、1.0当量)及びBCY8928(26.0mg、11.72  $\mu$  mol、2.1当量)をまず2mLのt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、29.0  $\mu$  L、2.0当量)、VcNa(4.6mg、23.2  $\mu$  mol、4.0当量)、及びTHPTA(5.1mg、11.7  $\mu$  mol、2.0当量)を添加した。最後に、0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を添加して、pHを8に調整した。全ての溶媒を脱気し、N<sub>2</sub>で3回バージした。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40℃で16時間攪拌した。LC-MSにより、化合物1が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(計算されたMW: 7185.38、観測されたm/z: 1796.7([M/4+H]<sup>+</sup>))が検出されることが示された。反応混合物を分取HPLC(TFA条件)により精製すると、BCY13053(21.8mg、3.03  $\mu$  mol、52.84%収率、98.01%純度)が白色の固体として得られた。

20

## 【0207】

(実施例7: BCY13341の合成)

## 【化39】



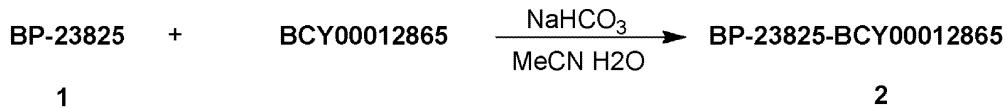
30

(BP-23825-BCY12865の調製のための手順)

40

50

## 【化40】



化合物1(14.0mg、22.45  $\mu\text{mol}$ 、1.20当量)及びHATU(8.5mg、22.37  $\mu\text{mol}$ 、1.20当量)の混合物をNMP(0.3mL)に溶解させ、その後、この溶液のpHをDIEAの滴加により8に調整し(5.8mg、44.86  $\mu\text{mol}$ 、7.8  $\mu\text{L}$ 、2.40当量)、その後、溶液を25℃で6分間活性化させた。BCY12865(40.0mg、18.65  $\mu\text{mol}$ 、1.00当量)をNMP(0.2mL)に溶解させ、その後、活性化した溶液に滴加した。この溶液のpHをDIEAの滴加により8に調整した。反応混合物を25℃で0.5時間攪拌した。LC-MSにより、BCY12865が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(MW: 2750.21、観測されたm/z: 1375.5([(M/2+H<sup>+</sup>)]))及び917.3([(M/3+H<sup>+</sup>)]))が検出されることが示された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去すると、残渣が生じた。その後、残渣を分取HPLC(中性条件)により精製した。化合物2(20.6mg、7.24  $\mu\text{mol}$ 、38.83%収率、95.51%純度)が白色の固体として得られた。

## 【0208】

(BCY13341の調製のための手順)

## 【化41】



化合物2(20.6mg、7.49  $\mu\text{mol}$ 、1.00当量)、BCY12353(31.5mg、15.08  $\mu\text{mol}$ 、2.01当量)、及びTHPTA(7.0mg、16.11  $\mu\text{mol}$ 、2.15当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、1mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>で3回パージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、37.5  $\mu\text{L}$ 、2.00当量)及びVcNa(6.0mg、30.29  $\mu\text{mol}$ 、4.04当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40℃で1時間攪拌した。LC-MSにより、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(計算されたMW: 6929.13、観測されたm/z: 1386.5([(M/5+H)<sup>+</sup>])及び1155.8([(M/6+H)<sup>+</sup>]))が示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLC(1回目はTFA条件で実施し、2回目はAcOH条件で実施する)により精製すると、BCY13341(10.3mg、1.49  $\mu\text{mol}$ 、19.85%収率、93.48%純度)が白色の固体として得られた。

## 【0209】

(実施例8: BCY13343の合成)

10

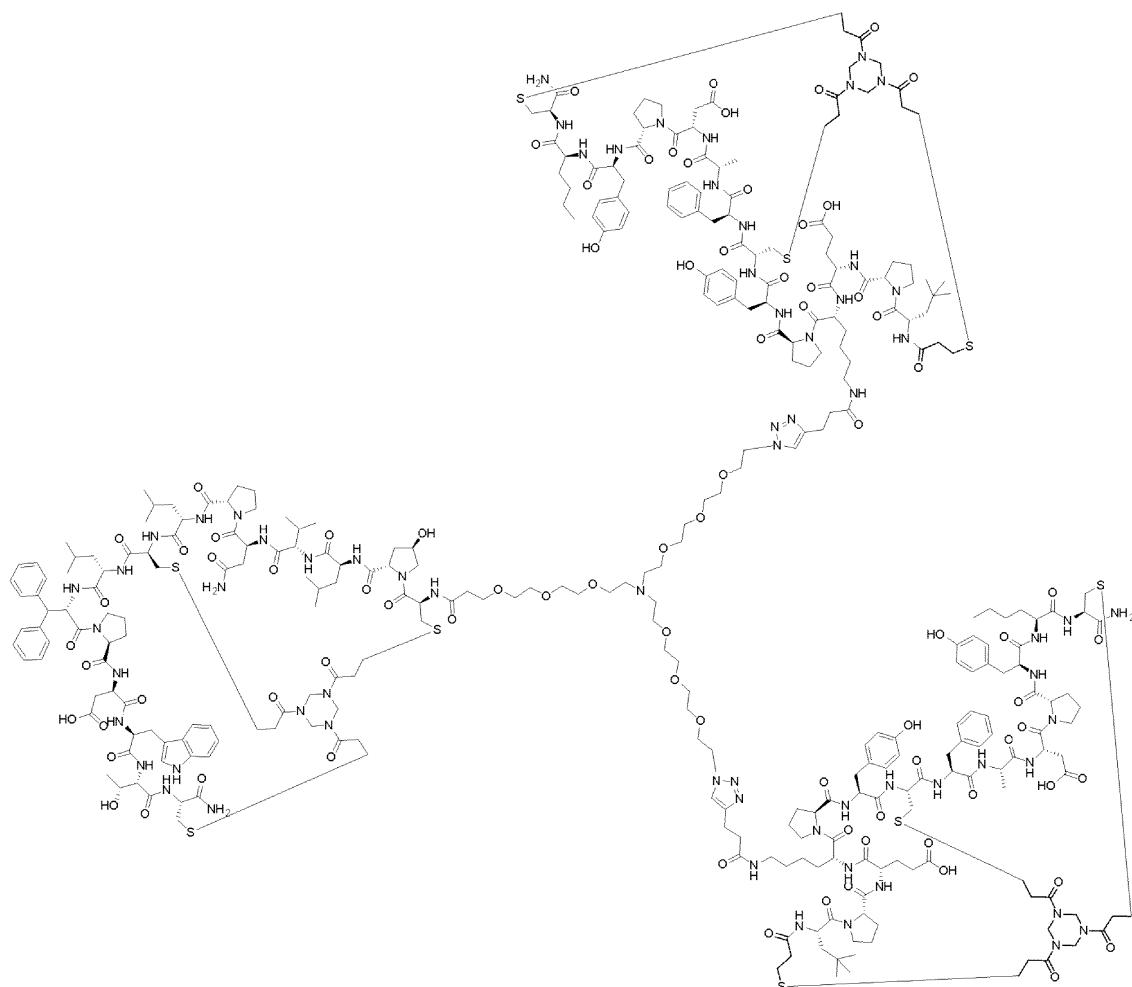
20

30

40

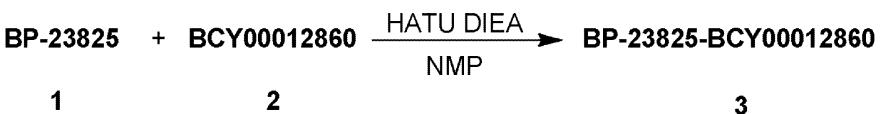
50

## 【化42】



(BP-23825-BCY12860の調製のための手順)

## 【化43】



BP-23825(13.0mg、20.84 μmol、1.2当量)及びHATU(8.0mg、20.84 μmol、1.2当量)の混合物をNMP(0.3mL)に溶解させ、その後、この溶液のpHをDIEAの滴加により8に調整し(5.4mg、41.69 μmol、7.3 μL、2.4当量)、その後、溶液を25℃で5分間活性化させた。化合物2(35.8mg、17.37 μmol、1.0当量)をNMP(0.5mL)に溶解させ、その後、活性化した溶液に滴下し、この溶液のpHをDIEAの滴加により8に調整した。反応混合物を25℃で0.5時間攪拌した。LC-MSにより、BCY12860が完全に消費されたこと、及び所望のm/zを有する1つの主要なピーク(MW: 2667.12、観測されたm/z: 1334.4([(M+2H<sup>+</sup>)]))が示された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去すると、残渣が生じた。その後、残渣を分取HPLC(中性条件)により精製した。BP-23825-BCY12860(25.2mg、9.16 μmol、52.76%収率、97.0%純度)が白色の固体として得られた。

## 【0210】

(BCY13343の調製のための手順)

10

20

30

40

50

## 【化44】

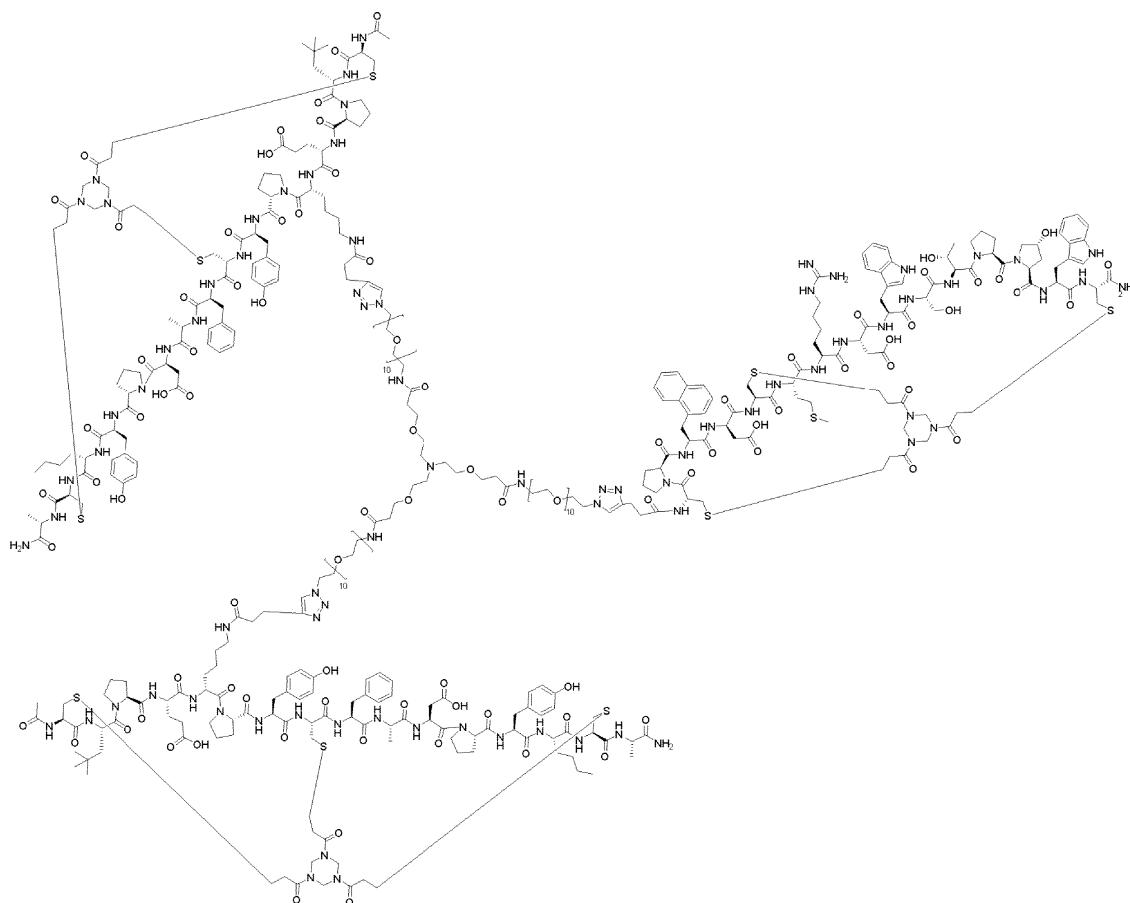


化合物3(25.2mg、9.45  $\mu\text{mol}$ 、1.0当量)、化合物4(40.4mg、19.37  $\mu\text{mol}$ 、2.05当量)、及びTHPTA(9.5mg、21.73  $\mu\text{mol}$ 、2.3当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、1mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>で3回バージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、54.3  $\mu\text{L}$ 、2.3当量)及びVcNa(8.7mg、43.51  $\mu\text{mol}$ 、2.5当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25℃で1時間攪拌した。LC-MSにより、化合物3も完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(計算されたMW: 6846.04、観測されたm/z: 1370.3([M/5+H<sup>+</sup>]))が検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLC(TFA条件)により精製すると、BCY13343(28.2mg、3.61  $\mu\text{mol}$ 、38.23%収率、87.7%純度)が白色の固体物として得られた。

## 【0211】

(実施例9: BCY11027の合成)

## 【化45】



(TCA-PEG10-BCY11015の調製のための手順)

10

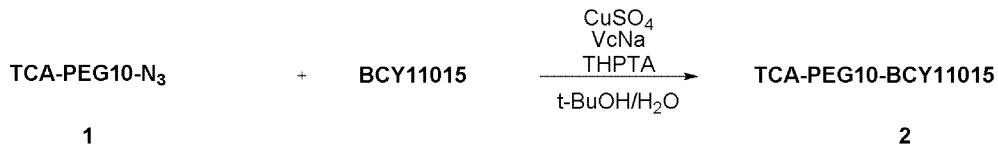
20

30

40

50

## 【化46】



TCA-PEG10-N<sub>3</sub>(22.0mg、10.58 μmol、1.0当量)及びBCY11015(26.0mg、34.72 μmol、1.1当量)をまず2mLのt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、26.4 μL、1.0当量)、VcNa(4.2mg、21.2 μmol、2.0当量)、及びTHPTA(4.6mg、10.58 μmol、1.0当量)を添加した。最後に、1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を添加して、pHを8に調整した。この全ての溶媒を脱気し、N<sub>2</sub>で3回バージした。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、30で16時間攪拌した。LC-MSにより、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(計算されたMW: 4143.75、観測されたm/z: 1040.50([(M+18)/4+H]<sup>+</sup>)及び1381.27([M/3+H]<sup>+</sup>))が示された。反応混合物を分取HPLC(TFA条件)により精製すると、TCA-PEG10-BCY11015(11.0mg、2.50 μmol、23.66%収率、94.26%純度)が白色の固体物として得られた。

## 【0212】

(BCY11027の調製のための手順)

## 【化47】



化合物2(5.5mg、1.33 μmol、1.0当量)及びBCY8928(5.9mg、2.66 μmol、2.0当量)をまず2mLのt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、10.0 μL、3.0当量)、VcNa(1.0mg、5.05 μmol、3.8当量)、及びTHPTA(1.0mg、2.30 μmol、1.7当量)を添加した。最後に、1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を添加して、pHを8に調整した。この全ての溶媒を脱気し、N<sub>2</sub>で3回バージした。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、35で16時間攪拌した。LC-MSにより、化合物2が完全に消費されたこと、及び所望のm/zを有する1つの主要なピーク(計算されたMW: 8578.91、観測されたm/z: 1430.6([M/6+H]<sup>+</sup>))が示された。反応混合物を分取HPLC(TFA条件)により精製すると、BCY11027(2.8mg、0.32 μmol、24.5%収率、91.71%純度)が白色の固体物として得られた。

## 【0213】

(実施例10: BCY12967の合成)

10

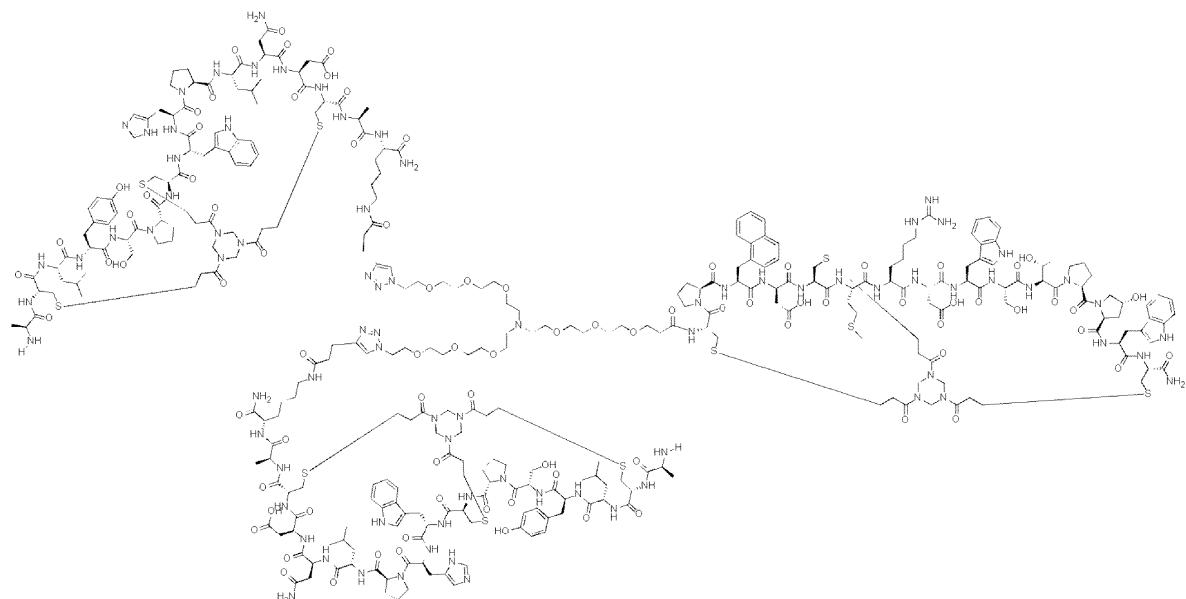
20

30

40

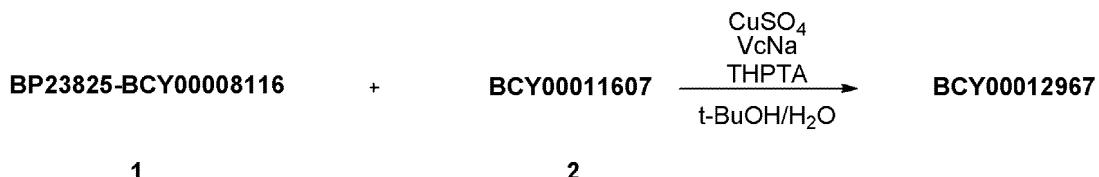
50

【化 4 8】



BCY00012967

### 【化 4 9】



化合物1(20.0 mg、7.20  $\mu$  mol、1.0当量)及びBCY11607(32.0 mg、14.9  $\mu$  mol、2.1当量)をまず2mLのt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4 M、36.0  $\mu$  L、2.0当量)、VcNa(6.0 mg、30.3  $\mu$  mol、4.2当量)、及びTHPTA(6.4 mg、14.7  $\mu$  mol、2.0当量)を添加した。最後に、1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を添加して、pHを8に調整した。この全ての溶媒を脱気し、N<sub>2</sub>で3回バージした。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40 °Cで16時間攪拌した。LC-MSにより、化合物2が完全に消費されたこと、及び所望のm/zを有する1つの主要なピーク(計算されたMW: 7077.7、観測されたm/z: 1416.3([M/5+H]<sup>+</sup>)、1180.4([M/6+H]<sup>+</sup>)、1011.9([M/7+H]<sup>+</sup>))が示された。反応混合物を分取HPLC(TFA条件)により精製すると、BCY12967(20.6 mg、2.82  $\mu$  mol、39.17% 収率、96.82% 純度)が白色の固形物として得られた。

【 0 2 1 4 】

### (実施例11: BCY13272の合成)

10

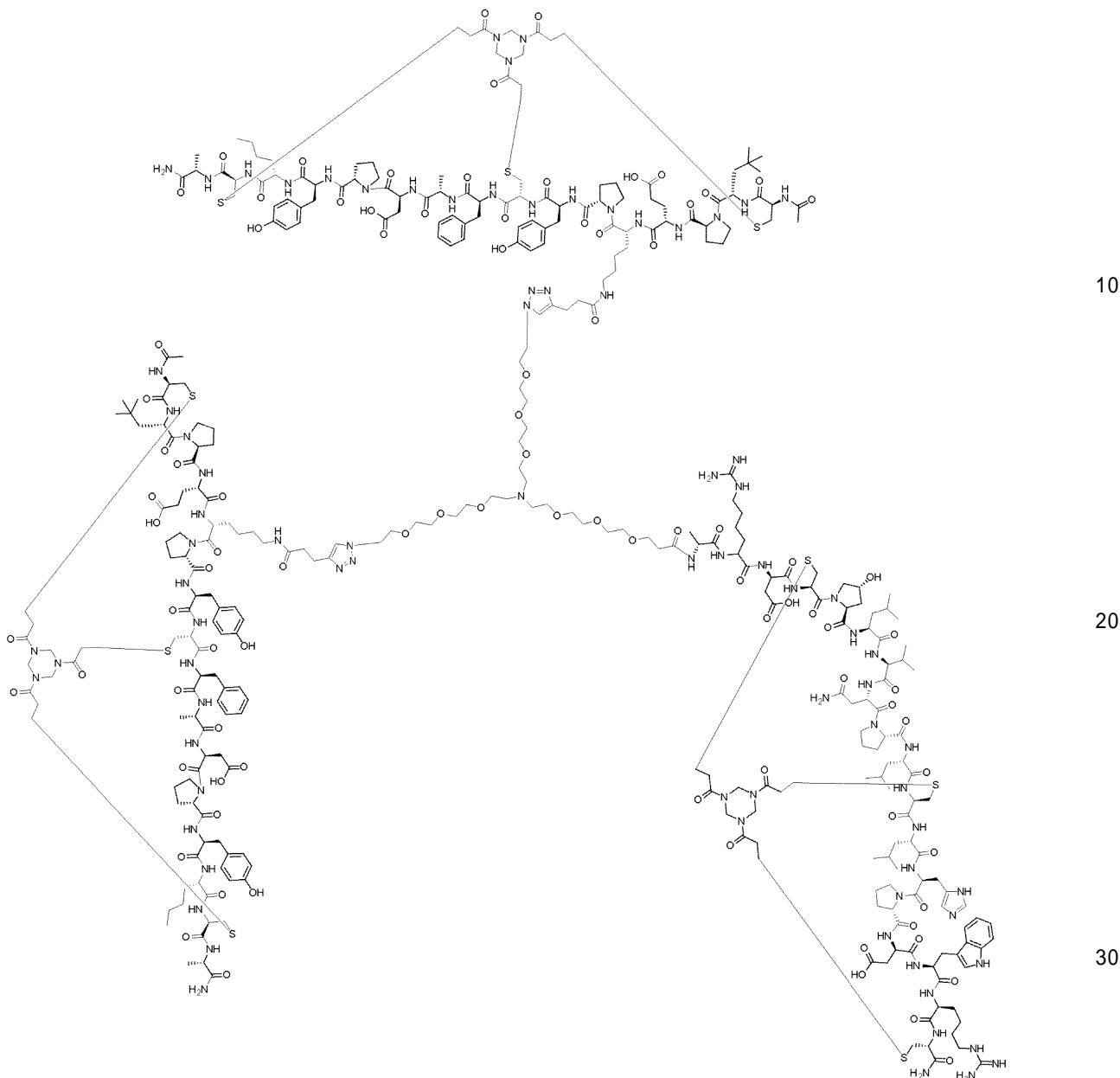
20

30

40

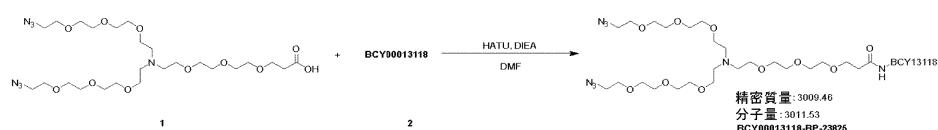
50

## 【化 5 0】



(BP-23825-BCY13118の調製のための一般的手順)

## 【化 5 1】



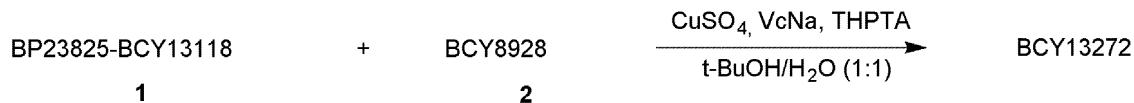
1(BP-23825、155.5mg、249.40  $\mu$  mol、1.2当量)及びHATU(95.0mg、249.92  $\mu$  mol、1.2当量)の混合物をNMP(1.0mL)に溶解させ、その後、この溶液のpHをDIEA(64.6mg、499.83  $\mu$  mol、87.0  $\mu$  L、2.4当量)の滴加により8に調整し、その後、溶液を25度5分間攪拌しておいた。化合物2(BCY13118、500.0mg、207.83  $\mu$  mol、1.0当量)をNMP(5.0mL)に溶解させ、その後、反応溶液に添加し、得られた溶液のpHをDIEAの滴加により8に調整した。反応混合物を25度45分間攪拌した。LC-MSにより、BCY13118が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去すると、残渣が生じた。その後、残渣を分取HPLCにより精製すると、BP-23825-BCY13118(1.35g、403.46  $\mu$  mol、64.71%収

率、90%純度)が白色の固体物として得られた。計算されたMW: 3011.53、観測されたm/z: 1506.8([M/2+H]+)、1005.0([M/3+H]+)。

〔 0 2 1 5 〕

### (化合物BCY13272の調製のための一般的手順)

## 【化 5 2】

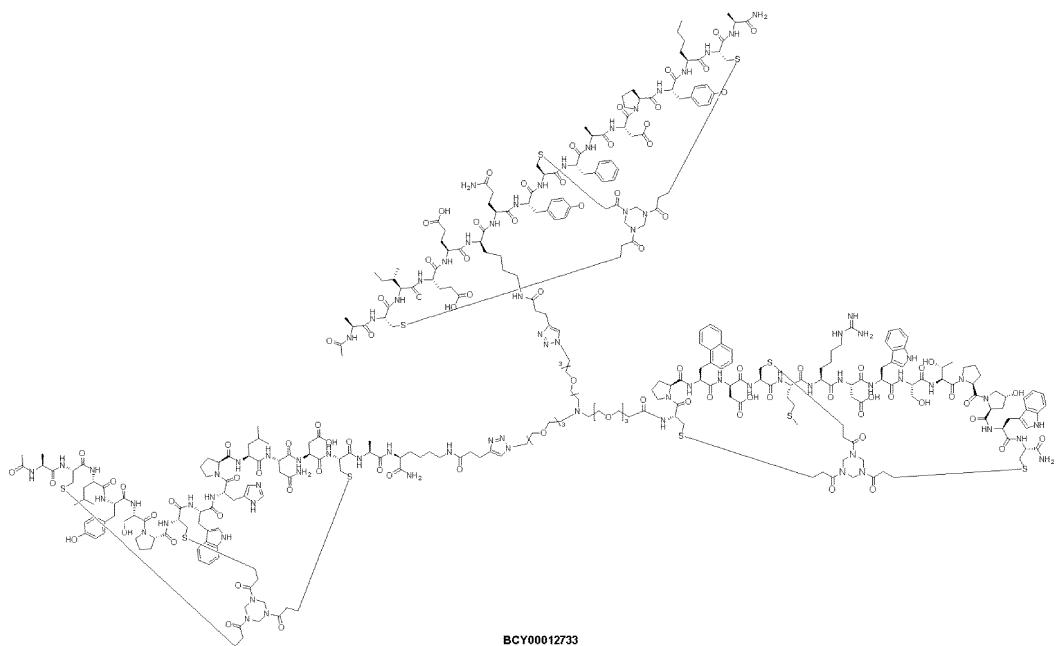


BCY8928(644.0mg、290.55 μmol、2.5当量)、THPTA(50.5mg、116.22 μmol、1.0当量)、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、145.0 μL、0.5当量)、及びVc(82.0mg、464.89 μmol、4.0当量)の混合物をt-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1、6.0mL)に溶解させ、この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>中)の滴加により7.5に調整し、その後、溶液を25 °Cで3分間攪拌した。BP-23825-BCY13118(350.0mg、116.22 μmol、1.0当量)をt-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1、11.0mL)に溶解させ、その後、攪拌溶液に滴下した。ここの全ての溶媒を予め脱気し、N<sub>2</sub>で3回バージした。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>中)の滴加により7.5に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25 °Cで6時間攪拌した。LC-MSにより、所望のm/zを有する1つの主要な生成物ピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLC(TFA条件)により精製すると、BCY13272(1.75g、235.01 μmol、67.40% 収率、94% 純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 7446.64、観測されたm/z: 1242.0([M/6+H]<sup>+</sup>)、1491.0([M/5+H]<sup>+</sup>)。

〔 0 2 1 6 〕

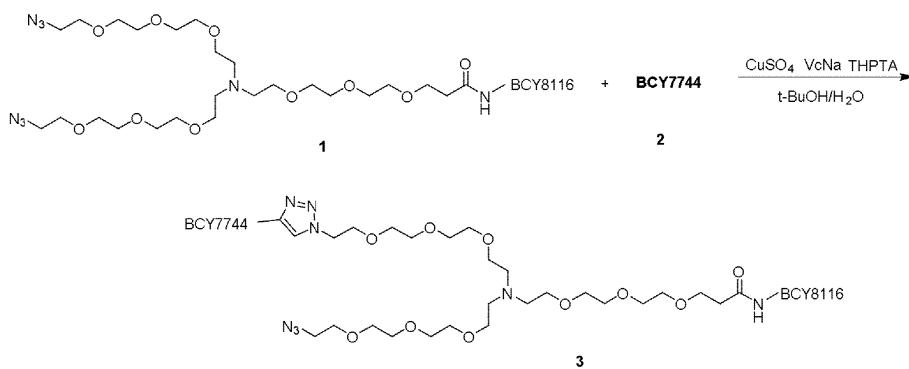
### (実施例12: BCY12733の合成)

### 【化 5 3】



(BP23825-BCY8116-BCY7744の調製のための手順)

## 【化 5 4】

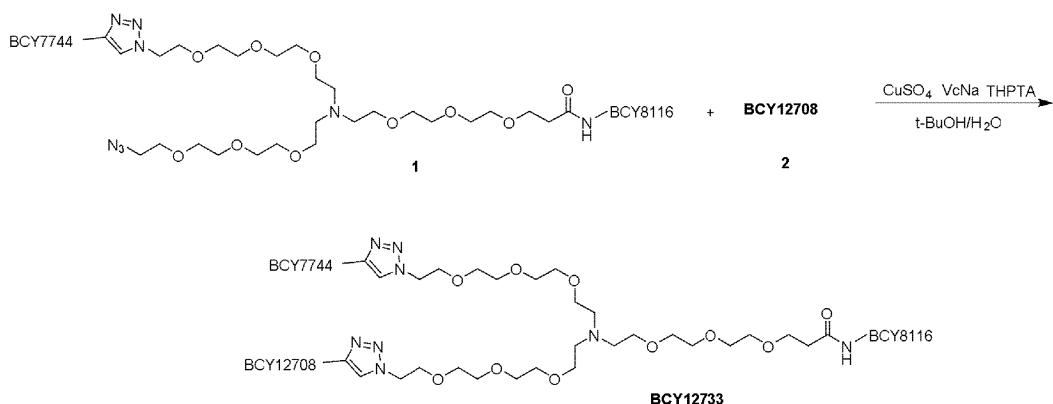


化合物1(10.0mg、3.60  $\mu$  mol、1.0当量)、化合物2(6.73mg、2.88  $\mu$  mol、0.8当量)、及びTHPTA(3.0mg、6.90  $\mu$  mol、2.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、0.5mL、脱気し、N<sub>2</sub>でパージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、9  $\mu$ L、1.0当量)及びVcNa(2.0mg、10.10  $\mu$  mol、2.8当量)の水性溶液をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40℃で1時間攪拌した。LC-MSにより、化合物2が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、化合物3(5.0mg、0.93  $\mu$  mol、25.88% 収率、95.33% 純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 5115.80、観測されたm/z: 1278.95([M+4H]<sup>4+</sup>)。

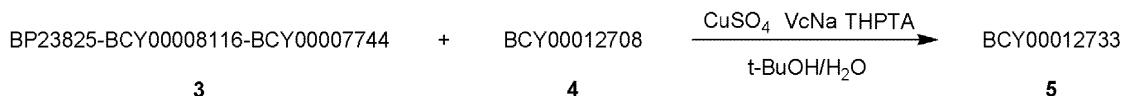
## 【0217】

(BCY12733の調製のための手順)

## 【化 5 5】



## 【化 5 6】



化合物1(5.0mg、9.77  $\mu$  mol、1.0当量)、化合物2(2.4mg、1.08  $\mu$  mol、1.1当量)、及びTHPTA(0.4M、3  $\mu$ L、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、0.5mL、脱気し、N<sub>2</sub>でパージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、3  $\mu$ L、1.0当量)及びVcNa(0.4M、3  $\mu$ L、1.0当量)の水性溶液をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40℃で1時間攪拌した。LC-MSにより、化合物3及び化合物4も残存し、所望のm/zが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY12733(3.3mg、0.41  $\mu$  mol)

10

20

30

40

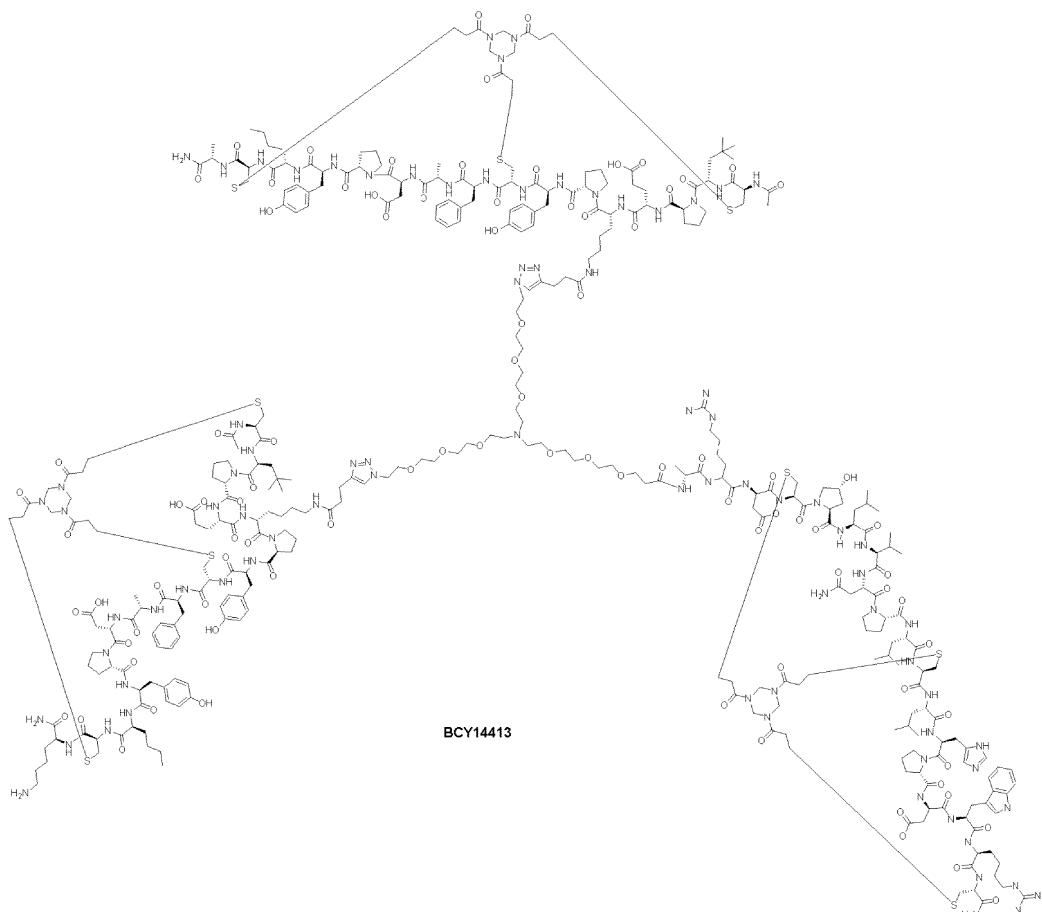
50

1、42.42%收率、94.60%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 7307.33、観測されたm/z: 1827.1([M+4H]<sup>4+</sup>)、1462.1([M+5H]<sup>5+</sup>)。

[ 0 2 1 8 ]

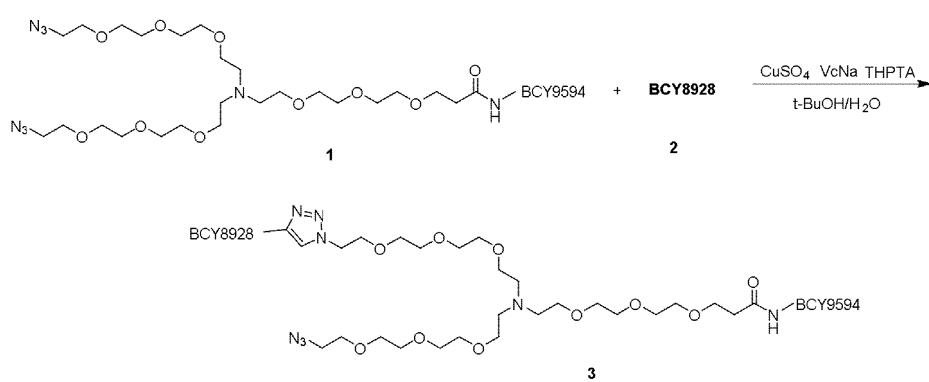
### (実施例 13: BCY14413 の合成)

【化 5 7】



(BCY9594-BP-23825-BCY8928の調製のための手順)

【化 5.8】



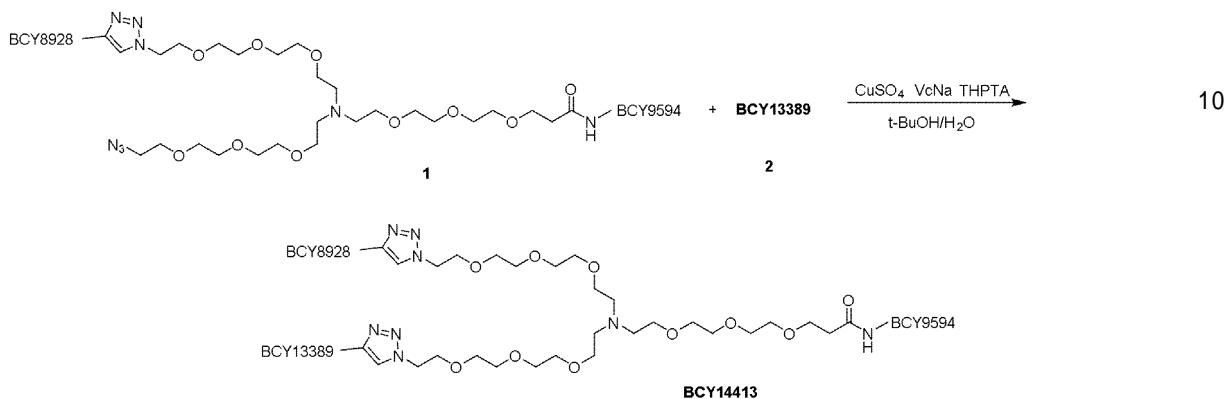
化合物1(50.0 mg、16.6  $\mu$  mol、1.0当量)、化合物2(29.5 mg、13.3  $\mu$  mol、0.8当量)、及びTHPTA(36.1 mg、83.1  $\mu$  mol、5.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、8 mL、脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4 M、20.8  $\mu$  L、0.5当量)及びVcNa(65.9 mg、332.6  $\mu$  mol、20.0当量)の水性溶液をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.5 mLの0.2 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により7.5に調整すると、溶液は薄黄色になった。その後、反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25 °Cで24時間攪拌した。反応液を2つのバッチ用に並行して準備した。LC-MSにより、化合物1及び少量の化合物2が

残存し、所望のm/zが検出されることが示された。反応混合物を濾過して、不溶性残渣を除去した。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、化合物3(31.5mg、5.44 μmol、16.36% 収率、90.22% 純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 5224.07、観測されたm/z: 1306.9([M+4H]<sup>4+</sup>)、871.6([M+6H]<sup>6+</sup>)。

## 【0219】

(BCY14413の調製のための手順)

## 【化59】

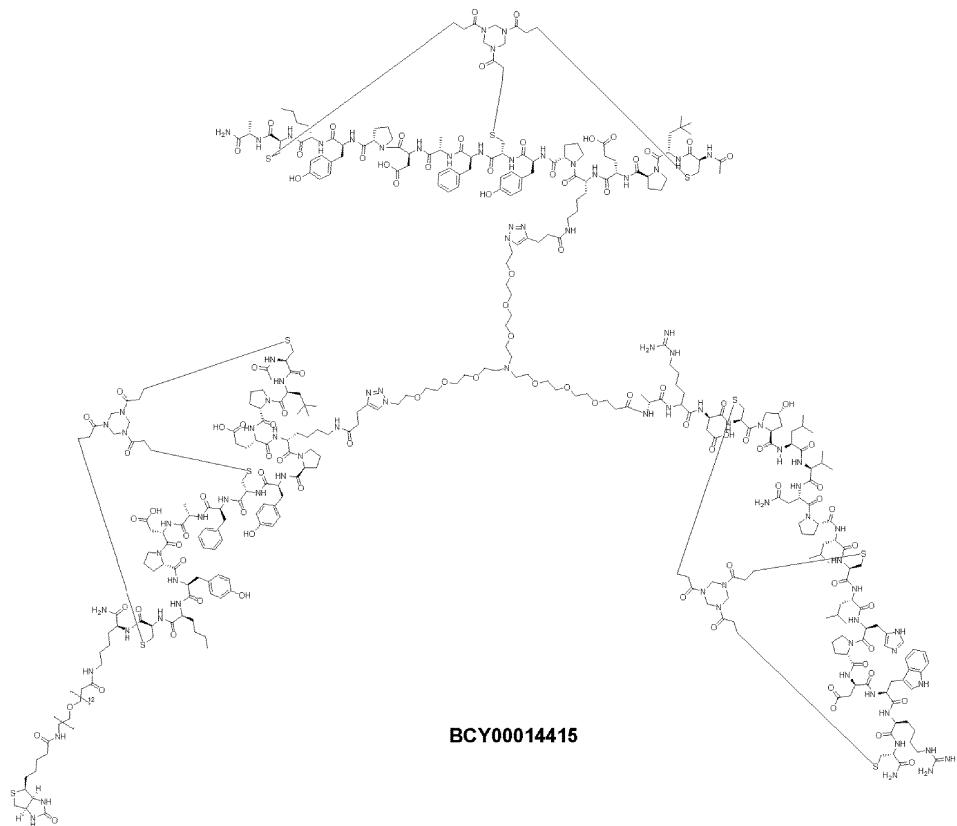


化合物1(31.5mg、6.03 μmol、1.0当量)、化合物2(14.4mg、6.33 μmol、1.05当量)、及びTHPTA(2.62mg、6.03 μmol、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、1.0mL、脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、15.07 μL、1.0当量)及びVcNa(4.78mg、24.12 μmol、4.0当量)の水性溶液をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.5mLの0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により7.5に調整すると、溶液は薄黄色になった。その後、反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25℃で3時間攪拌した。LC-MSにより、少量の化合物2が残存し、化合物1が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過して、不溶性残渣を除去した。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY14413(22.5mg、3.00 μmol、43.10% 収率、86.63% 純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 7498.75、観測された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>)。

## 【0220】

(実施例14: BCY14415の合成)

## 【化 6 0】



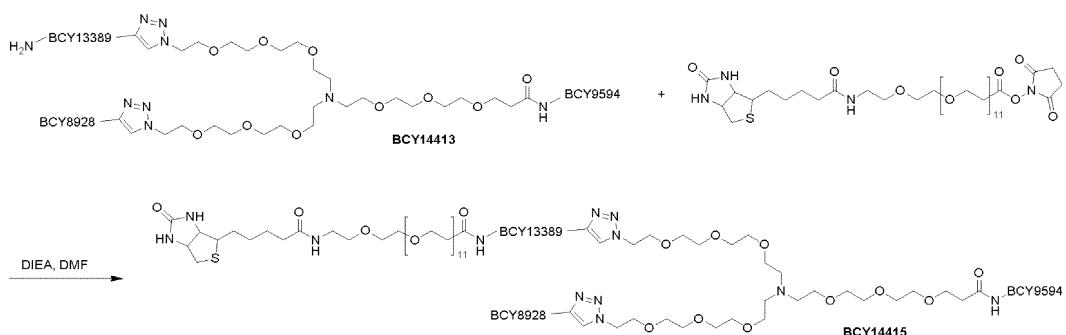
10

20

30

## (BCY14415の調製のための手順)

## 【化 6 1】



40

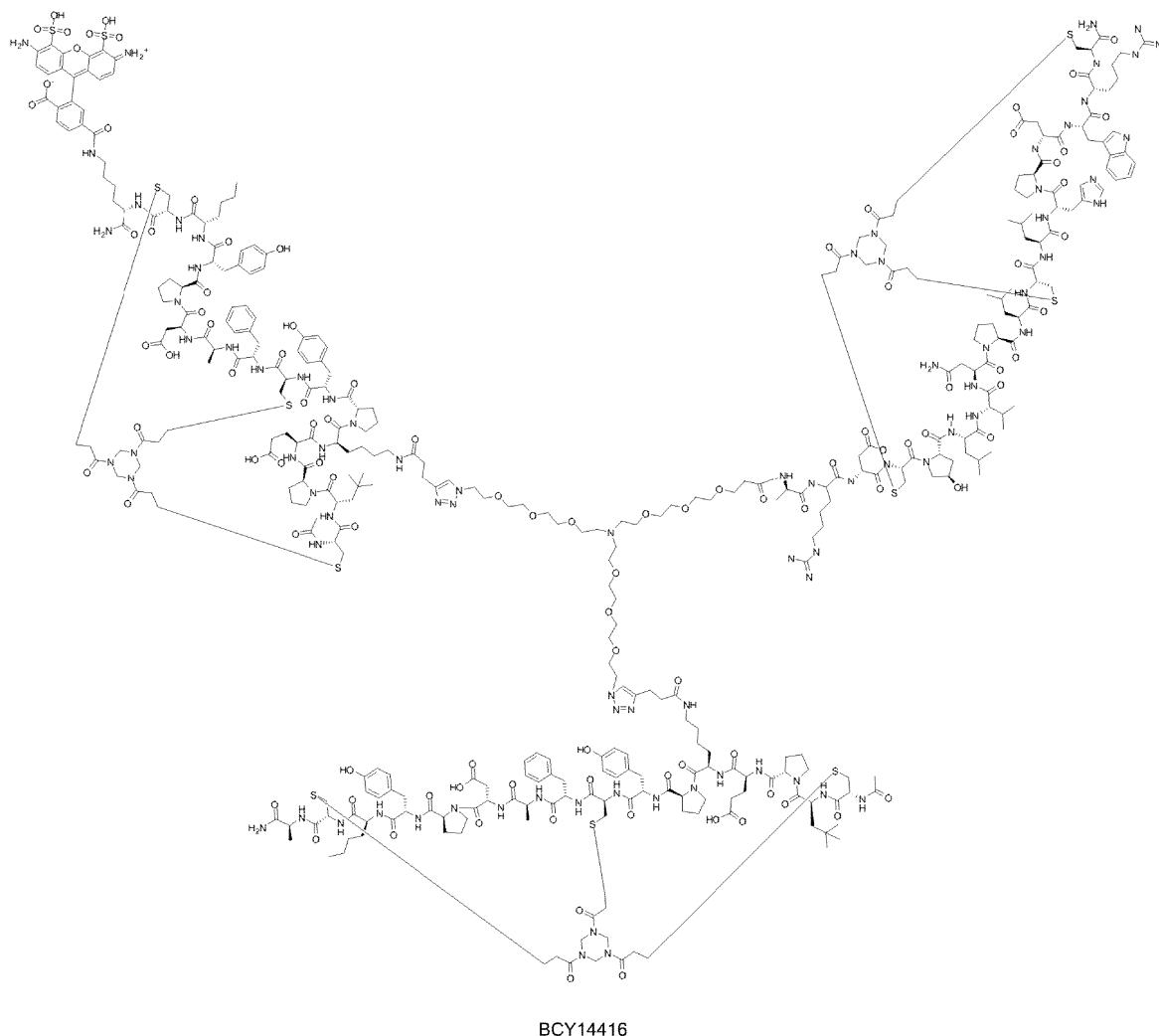
BCY14413(10.0 mg、1.33  $\mu$ mol、1.0当量)及びビオチン-Peg12-NHS(2.6 mg、2.80  $\mu$ mol、2.6当量)の混合物をDMF(0.3 mL)に溶解させた。この溶液のpHをDIEAの滴加により8に調整した。反応混合物を25℃で0.5時間攪拌した。LC-MSにより、BCY14413が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY14415(10 mg、1.07  $\mu$ mol、80.49% 収率、90.2% 純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 8324.73、観測されたm/z: 1388.4([M+6H] $^{6+}$ )、1190.2([M+7H] $^{7+}$ )、1041.5([M+8H] $^{8+}$ )、926.0([M+9H] $^{9+}$ )

## 【0221】

## (実施例15: BCY14416の合成)

50

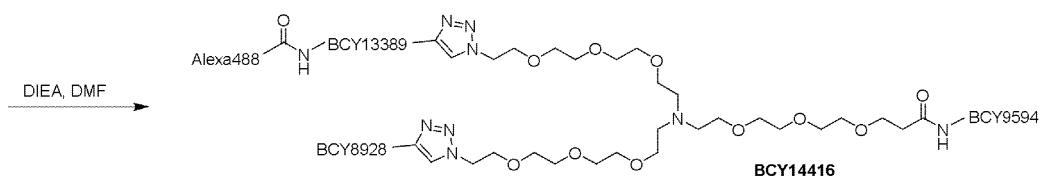
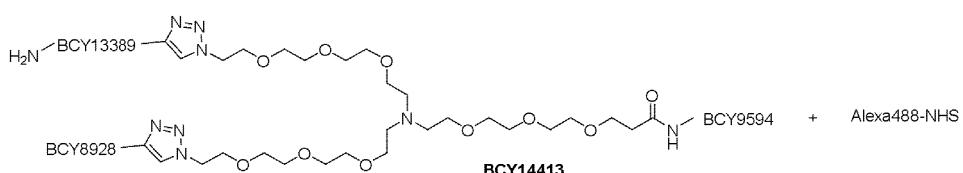
## 【化62】



(BCY14416の調製のための手順)

30

## 【化63】



化合物BCY14413(5.1mg、0.68  $\mu$ mol、1.0当量)及びAlexa Fluor 488 NHSエヌカル(0.5mg、8.16e-1  $\mu$ mol、1.2当量)の混合物をDMF(0.3mL)に溶解させた。この溶液のpHをDIEAの滴加により8に調整した。反応混合物を25℃で0.5時間攪拌した。LC-MSにより、一部のBCY14413が残存し、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、主要なピークが異なる純度を有する2つの画分として回収され、BCY14416(0.7mg、0.065  $\mu$ mol、9.84%収率、96.4%純度)及び(0.5mg、0.

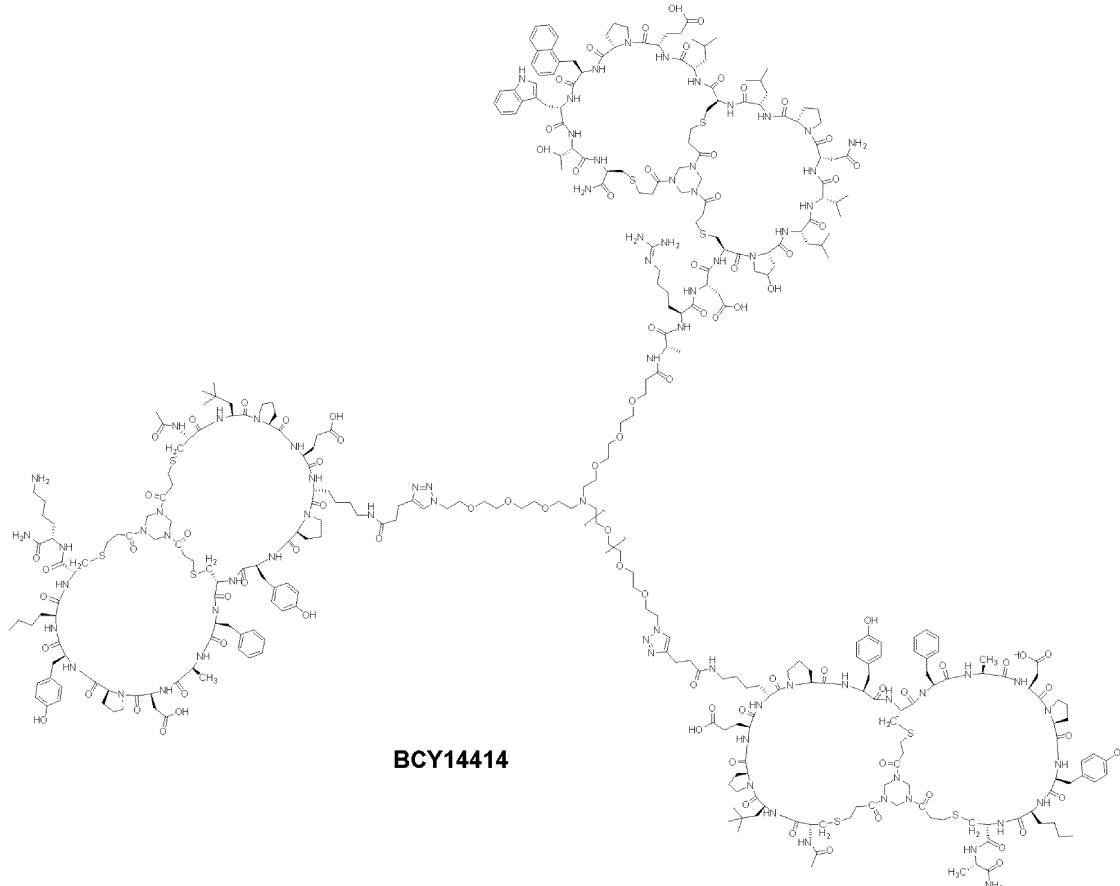
50

047  $\mu$  mol、7.03% 収率、91.2% 純度)が赤色の固体として得られた。計算されたMW: 8015、観測されたm/z: 1336.5([M+7H] $^{7+}$ )。

【0222】

(実施例16: BCY14414の合成)

【化64】



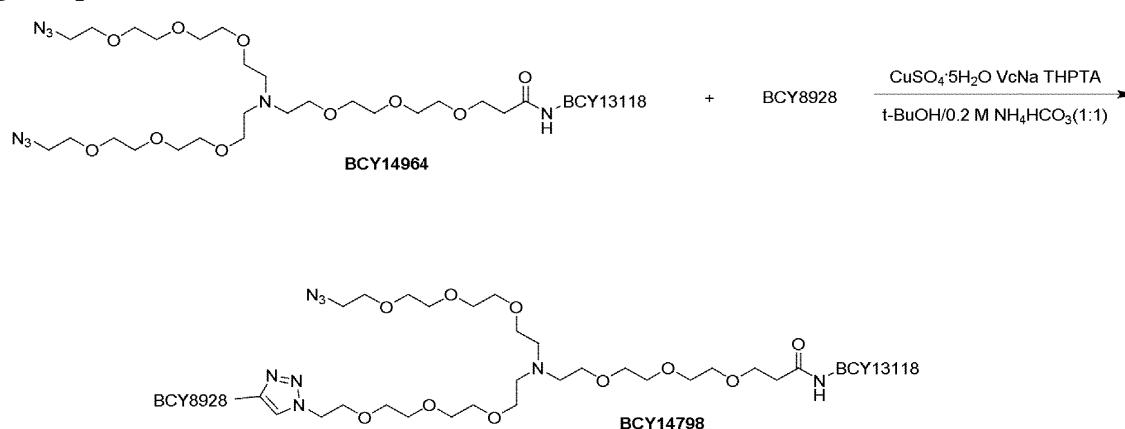
10

20

30

(BCY14798の調製のための手順)

【化65】



40

BCY14964(55.0mg、18.26  $\mu$  mol、1.0当量)、BCY8928(32.4mg、14.61  $\mu$  mol、0.8当量)、及びTHPTA(39.8mg、91.32  $\mu$  mol、5.0当量)の混合物をt-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1、0.5mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、23.0  $\mu$ L、0.5当量)及びアスコルビン酸ナトリウム(72.0mg、365.27  $\mu$  mol、2.0.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>中)の滴加により7.5に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25℃で1.5時間攪拌した。LC-MSにより、BCY14964が残存し、化合物BCY892

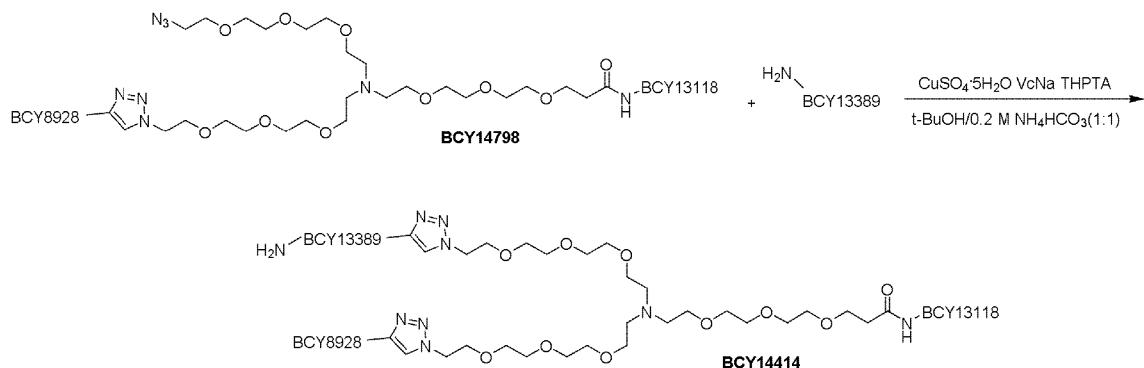
50

8が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY14798(51mg、9.17 μ mol、33.37% 収率、94% 純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 5229.07、観測されたm/z: 1308.3([M+4H]<sup>4+</sup>)、1046.7([M+5H]<sup>5+</sup>)。

## 【0223】

(BCY14414の調製のための手順)

## 【化66】



BCY14798(21.0mg、4.02 μ mol、1.0当量)、BCY13389(10.0mg、4.42 μ mol、1.1当量)、及びTHPTA(1.8mg、4.02 μ mol、1.0当量)の混合物をt-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HC<sub>O</sub><sub>3</sub>(1:1、0.5mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でページしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、5.0 μ L、0.5当量)及びアスコルビン酸ナトリウム(2.8mg、16.06 μ mol、4.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>中)の滴加により7.5に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25で2時間攪拌した。LC-MSにより、BCY14798が完全に消費され、一部のBCY13389が残存し、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取により精製すると、BCY14414(20mg、2.40 μ mol、59.73% 収率、90.9% 純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 7503.74、観測されたm/z: 1251.5([M+5H]<sup>5+</sup>)、1072.9([M+7H]<sup>7+</sup>)。

## 【0224】

(実施例17: BCY14417の合成)

20

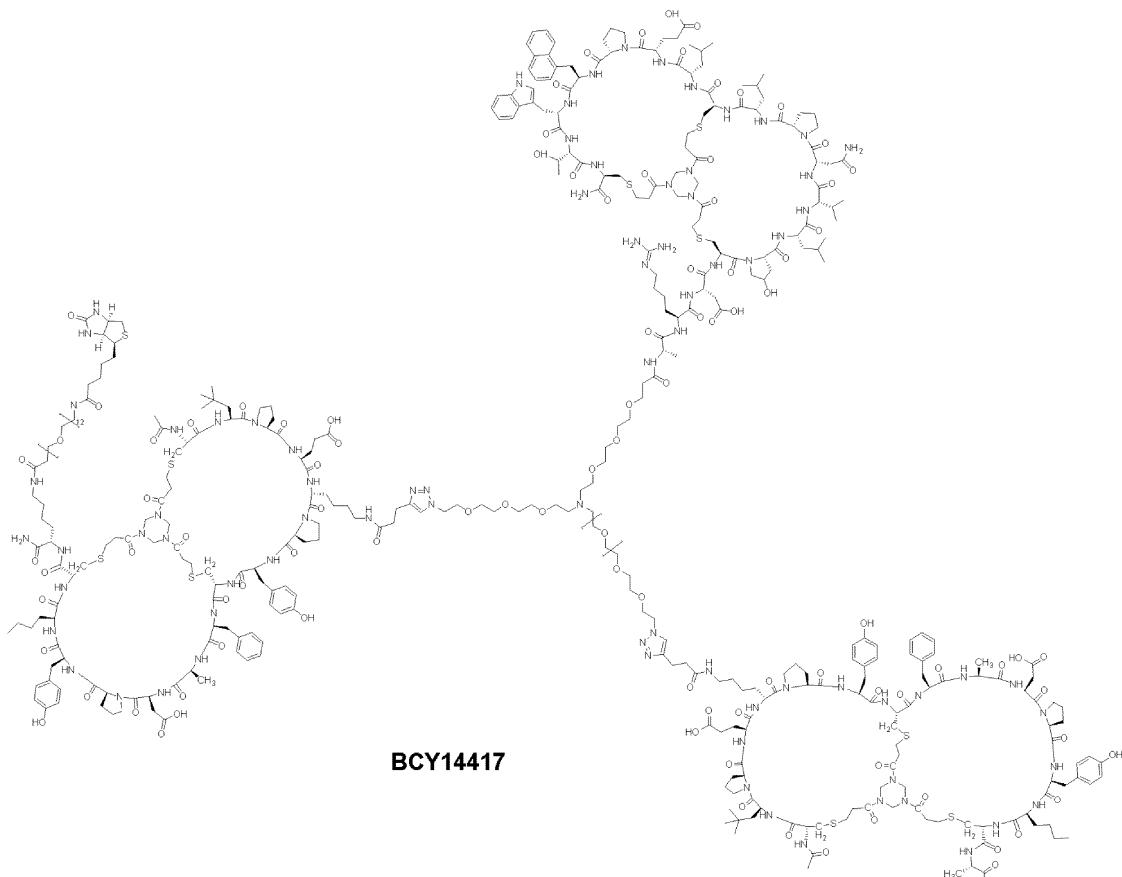
20

30

40

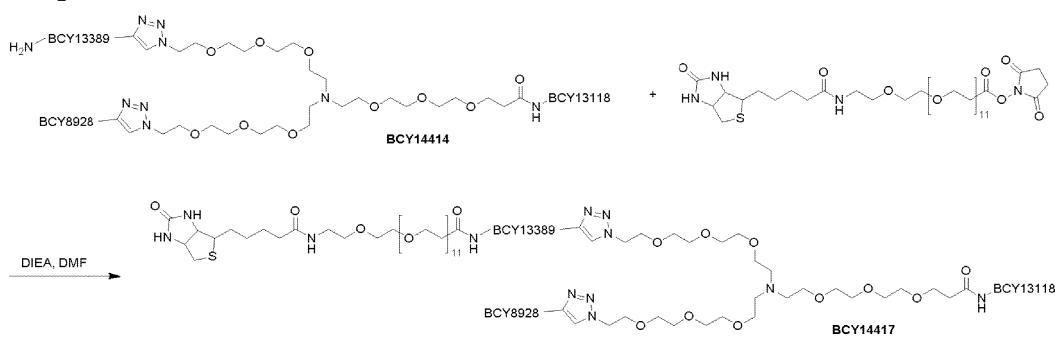
50

## 【化67】



(BCY14417の調製のための手順)

## 【化68】



BCY14414(13.0 mg、1.73  $\mu$  mol、1.0当量)及びビオチン-PEG12-NHSエステル(CAS 365441-71-0、4.2 mg、4.50  $\mu$  mol、2.6当量)の混合物をDMF(0.5 mL)に溶解させた。この溶液のpHをDIEAの滴加により8に調整した。反応混合物を25℃で0.5時間攪拌した。LC-MSにより、BCY14414が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY14417(9.0 mg、1.07  $\mu$  mol、80.49%収率、90.8%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 8329.74、観測されたm/z: 1389.6([M+6H]<sup>6+</sup>)、1191.9([M+7H]<sup>7+</sup>)。

## 【0225】

(実施例18: BCY14418の合成)

10

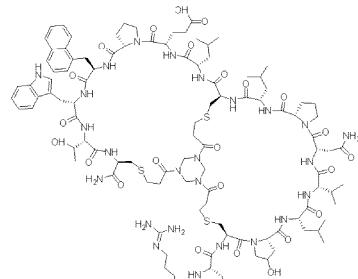
20

30

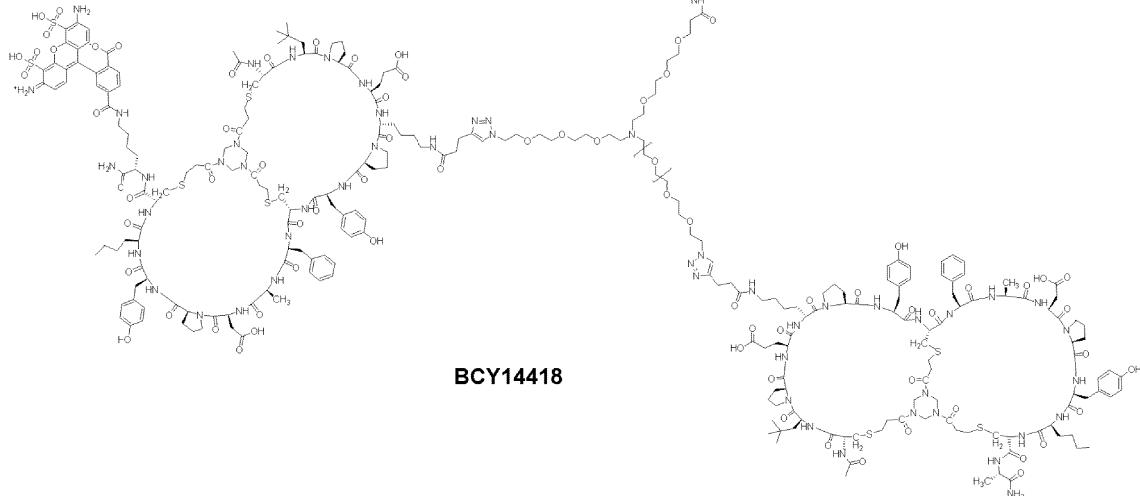
40

50

## 【化69】



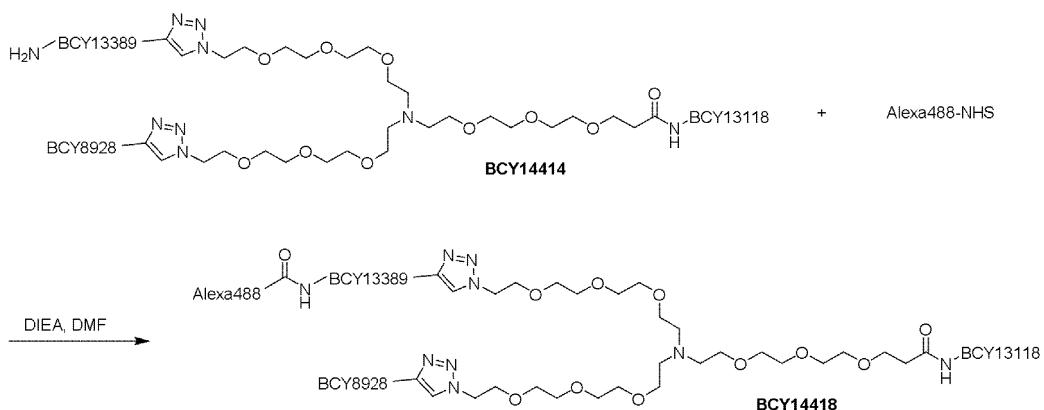
10



20

(BCY14418の調製のための手順)

## 【化70】



30

BCY14414(5.6mg、0.75 μ mol、1.0当量)及びAlexa fluor(登録商標) 488(0.9mg、1.49 μ mol、2.0当量)の混合物をDMF(0.3mL)に溶解させた。その後、この溶液のpHをDIEAの滴加により8に調整した。反応混合物を25℃で1.0時間攪拌した。LC-MSにより、BCY14414が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY14418(2.3mg、0.25 μ mol、32.89%収率、85.6%純度)が赤色の固体として得られた。計算されたMW: 8020.19、観測されたm/z: 1337.2([M+6H]<sup>6+</sup>)。

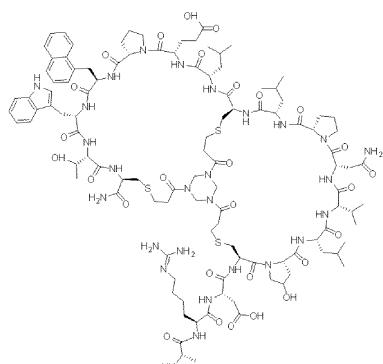
## 【0226】

(実施例19: BCY15217の合成)

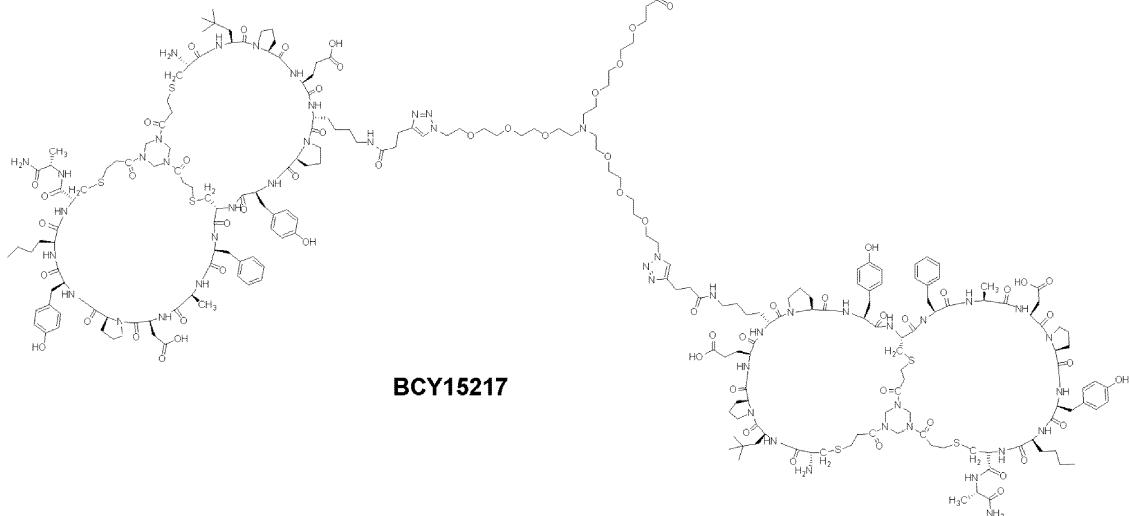
40

50

## 【化71】



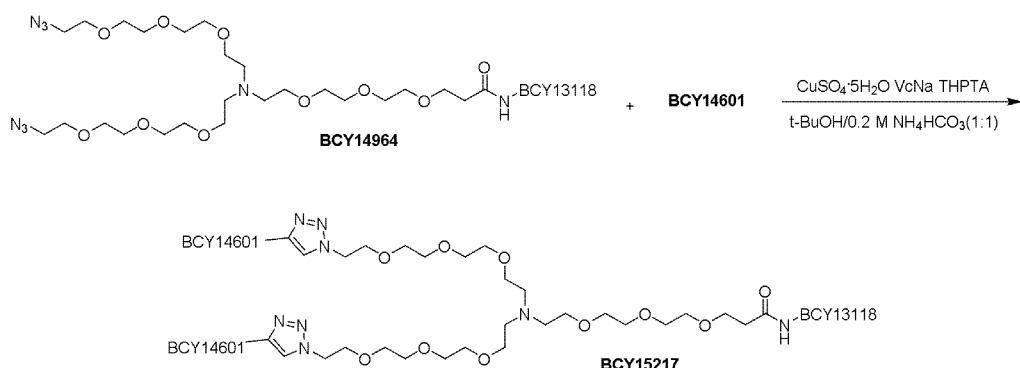
10



20

(BCY15217の調製のための手順)

## 【化72】



BCY14964(20.0mg、6.64  $\mu$ mol、1.0当量)、BCY14601(30.5mg、13.95  $\mu$ mol、2.1当量)、及びTHPTA(2.9mg、6.64  $\mu$ mol、1.0当量)の混合物をt-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>(1:1、0.5mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、16.6  $\mu$ L、1.0当量)及びアスコルビン酸ナトリウム(4.7mg、26.56  $\mu$ mol、4.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25℃で2時間攪拌した。LC-MSにより、BCY14964が残存し、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY15217(19.7mg、2.41  $\mu$ mol、36.26%収率、96.2%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 7362.5、観測されたm/z: 1473.5([M+5H]<sup>5+</sup>)、1228.2([M+6H]<sup>6+</sup>)、1052.8([M+7H]<sup>7+</sup>)。

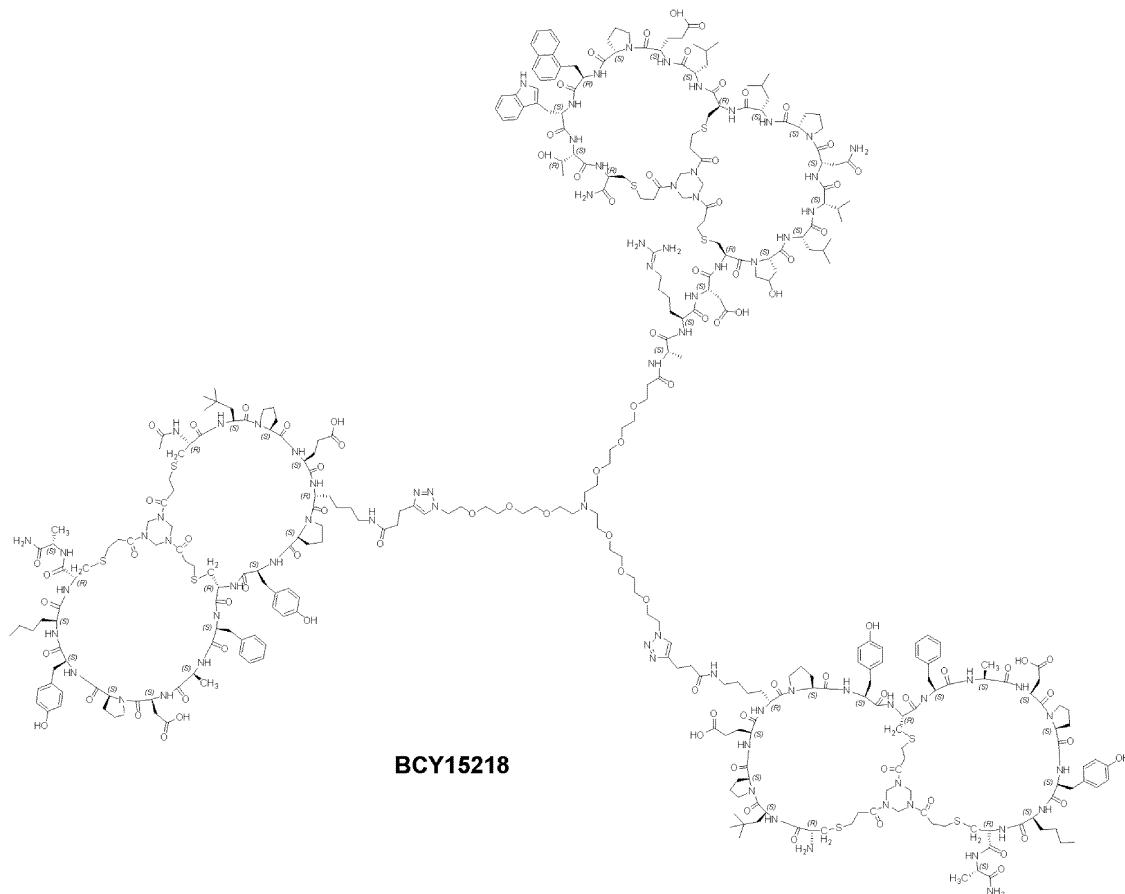
40

50

【0227】

(実施例20: BCY15218の合成)

【化73】



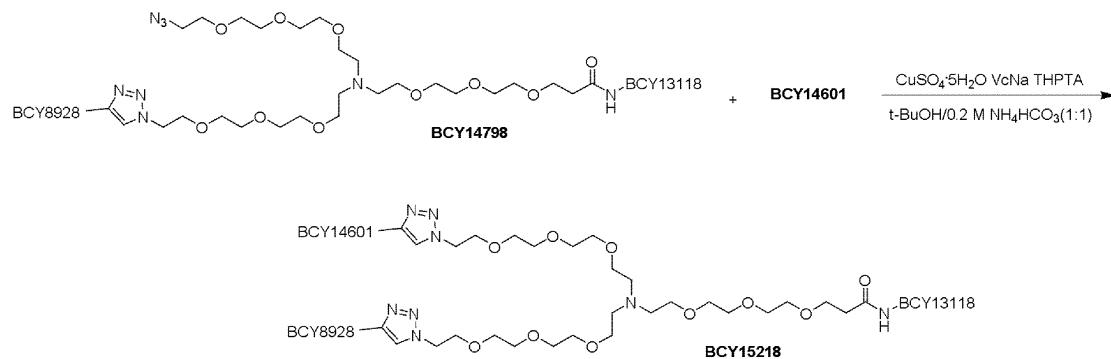
10

20

30

(BCY15218の調製のための手順)

【化74】



40

BCY14798(30.0mg、5.74 μmol、1.0当量)、BCY14601(15.0mg、6.88 μmol、1.2当量)、及びTHPTA(2.5mg、5.74 μmol、1.0当量)の混合物をt-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1、0.5mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、14.0 μL、1.0当量)及びアスコルビン酸ナトリウム(4.0mg、22.95 μmol、4.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>中)の滴加により7.5に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25度2時間攪拌した。LC-MSにより、BCY14798が完全に消費され、BCY14601が残存し、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BC

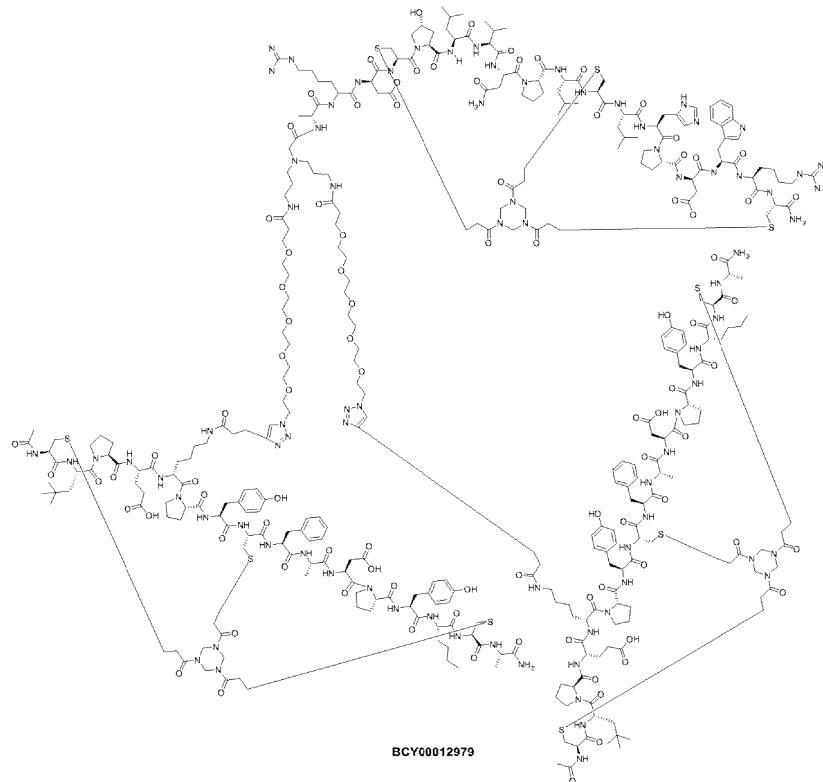
50

Y15218(22mg、2.67 μmol、46.61%収率、95.0%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 7404.6、観測されたm/z: 1234.8([M+6H]<sup>6+</sup>)。

【 0 2 2 8 】

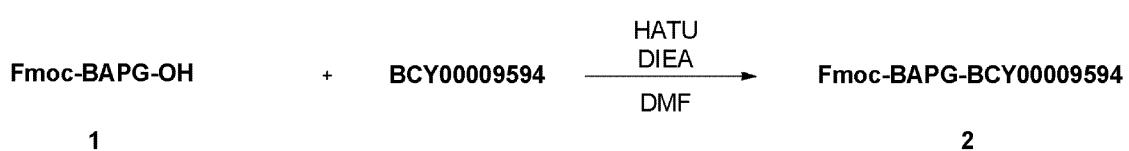
### (実施例21: BCY12979の合成)

【化 7 5 】



### (Fmoc-BAPG- BCY9594の調製のための手順)

## 【化 7 6 】



化合物1(N,N-ビス[3-(Fmoc-アミノ)プロピル]グリシン硫酸カリウム、10.0 mg、15.78  $\mu$  mol、1.0当量)及びHATU(7.2 mg、18.94  $\mu$  mol、1.2当量)をまず1 mLのDMFに溶解させ、その後、DIEA(11.0  $\mu$  L、63.15  $\mu$  mol、4.0当量)を添加した。混合物を30 分間攪拌し、その後、BCY9594(80.0 mg、30.09  $\mu$  mol、1.0当量)を添加した。反応混合物を25 °Cで2時間攪拌した。LC-MSにより、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(計算されたMW: 3016.51、観測されたm/z: 1006.4([M+3H]<sup>3+</sup>)が示された。反応混合物を、精製することなく、次の工程で使用した。

【 0 2 2 9 】

### (BAPG-BCY9594の調製のための手順)

【化 7 7】

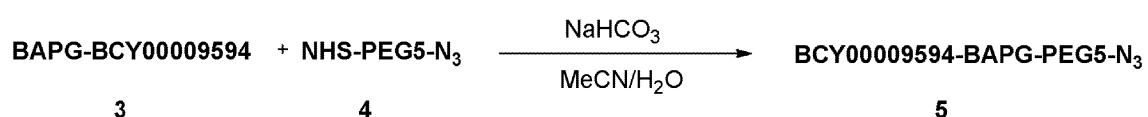


化合物2(47.6mg、15.78  $\mu$  mol、1.0当量)をまず1mLのDMFに溶解させ、その後、ビペリジン(0.2mL、2.03mmol、128.0当量)を添加した。混合物を30  $^{\circ}$ で30分間攪拌した。LC-MSにより、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(計算されたMW: 2572.04、観測されたm/z: 1286.8([M+2H] $^{2+}$ )、858.1([M+3H] $^{3+}$ )が示された。反応混合物を分取HPLCにより精製すると、化合物3(24.4mg、9.06  $\mu$  mol、57%収率、95%純度)が白色の固体として得られた。

## 【0230】

(BCY9594-BAPG-PEG5-N<sub>3</sub>の調製のための手順)

## 【化78】

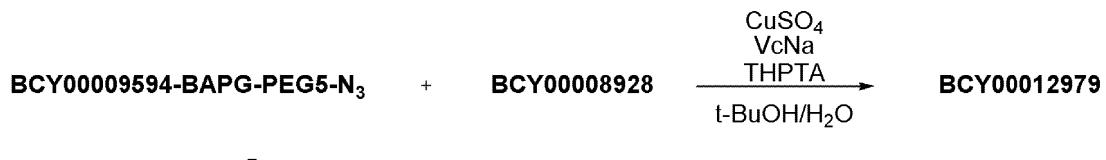


化合物3(24.4mg、9.06  $\mu$  mol、1.0当量)及び化合物4(10.0mg、23.13  $\mu$  mol、2.4当量)を2mLのMeCN/H<sub>2</sub>O(1:1)に溶解させ、1M NaHCO<sub>3</sub>を添加して、pHを8に調整した。混合物を25  $^{\circ}$ で2時間攪拌した。LC-MSにより、化合物3が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピーク(計算されたMW: 3206.71、観測されたm/z: 1069.7([M+3H] $^{3+}$ )が検出されることが示された。反応混合物を分取HPLCにより精製すると、化合物5(12.8mg、3.99  $\mu$  mol、42.08%収率、88.62%純度)が白色の固体として得られた。

## 【0231】

(BCY12979の調製のための手順)

## 【化79】



化合物5(12.8mg、3.99  $\mu$  mol、1.0当量)及びBCY8928(18.0mg、8.12  $\mu$  mol、2.0当量)をまず2mLのt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、20.0  $\mu$  L、2.0当量)、VcNa(3.2mg、16.1  $\mu$  mol、4.0当量)、及びTHPTA(3.5mg、8.0  $\mu$  mol、2.0当量)を添加した。最後に、1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>を添加して、pHを8に調整した。ここでの全ての溶媒を脱気し、N<sub>2</sub>でバージした。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40  $^{\circ}$ で16時間攪拌した。LC-MSにより、化合物5が完全に消費されたこと及び所望のm/zを有する1つの主要なピークが示された。反応混合物を分取HPLCにより精製すると、BCY12979(16.0mg、2.02  $\mu$  mol、51%収率、96.6%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 7641.87、観測されたm/z: 1911.2([M+4H] $^{4+}$ )、1528.3([M+5H] $^{5+}$ )、1247.5([M+6H] $^{6+}$ )、1092.2([M+7H] $^{7+}$ )。

## 【0232】

(実施例22: BCY10918の合成)

30

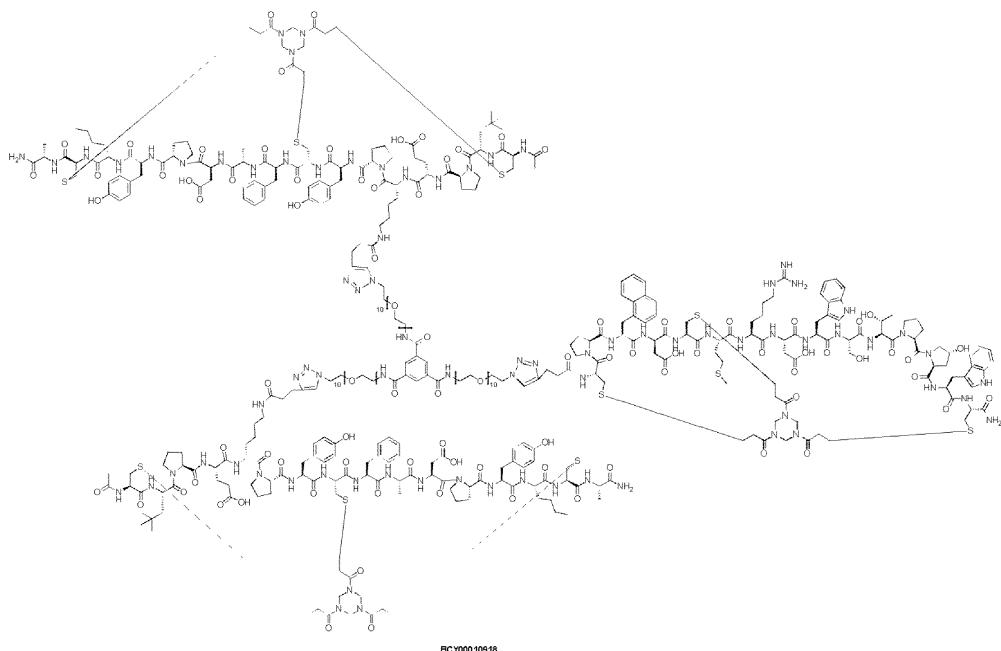
20

30

40

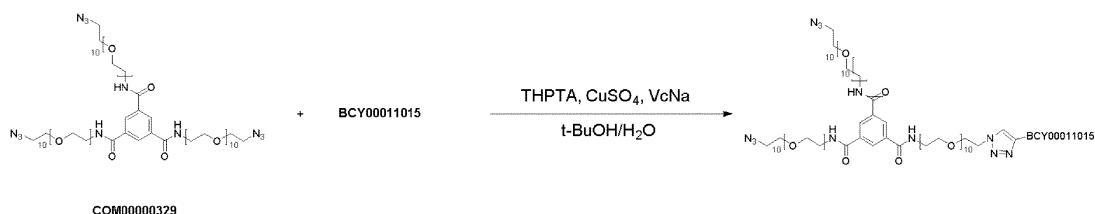
50

## 【化 8 0】



(化合物1の調製のための手順)

## 【化 8 1】



COM00000329(102mg、58.76  $\mu$  mol、1.0当量)、BCY11015(92.6mg、41.13  $\mu$  mol、0.7当量)、及びTHPTA(0.4M、146.9  $\mu$  L、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、2mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、146.9  $\mu$  L、1.0当量)及びVcNa(0.4M、293.8  $\mu$  L、2.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25~30℃で12時間攪拌した。LC-MSにより、COM00000329が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を分取HPLCにより直接精製した。化合物1(60mg、13.61  $\mu$  mol、23.16%収率、90.45%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 3988.52、観測されたm/z: 1329.97([M+3H]<sup>3+</sup>)、990.56([M+4H]<sup>4+</sup>)。

## 【0233】

(BCY10918の調製のための手順)

## 【化 8 2】



化合物1(60mg、15.04  $\mu$  mol、1.0当量)、BCY8928(72.0mg、32.47  $\mu$  mol、2.2当量)、及びTHPTA(0.4M、37.6  $\mu$  L、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、2mL、予め

10

20

30

40

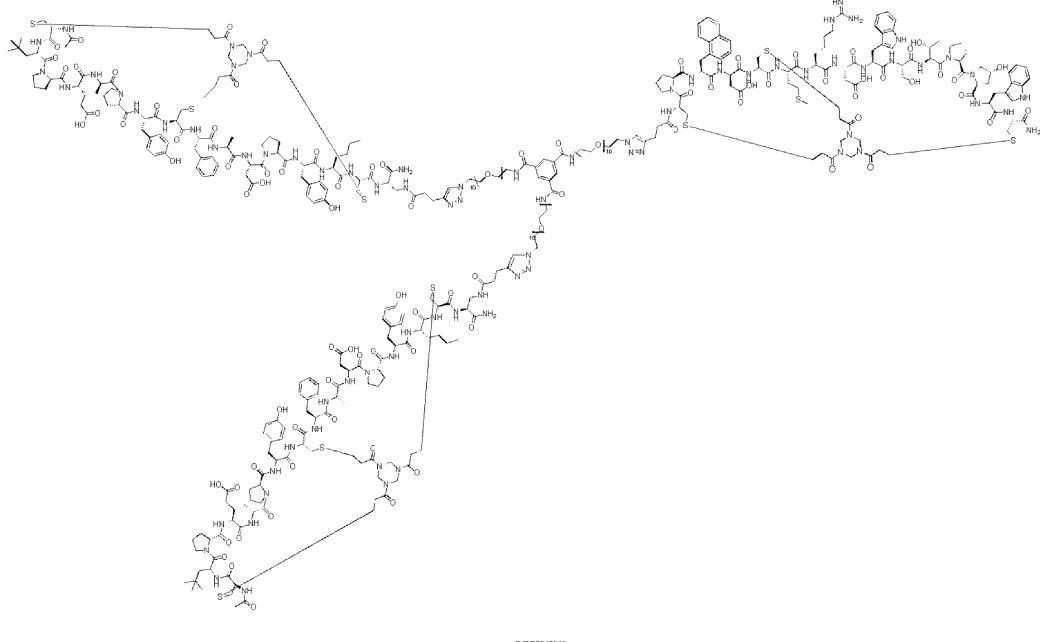
50

脱気し、 $N_2$ でパージしたもの)に溶解させ、その後、 $CuSO_4$ (0.4M、37.6  $\mu L$ 、1.0当量)及び $VcNa$ (0.4M、75.2  $\mu L$ 、2.0当量)を $N_2$ 下で添加した。この溶液のpHを0.2M  $NH_4HCO_3$ (1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、 $N_2$ 雰囲気下、25～30℃で12時間攪拌した。LC-MSにより、化合物1が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を分取HPLCにより直接精製した。BCY10918(48mg、5.47  $\mu mol$ 、36%収率、96%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 8423.67、観測されたm/z: 1404.27([M+6H]<sup>6+</sup>)、1203.73([M+7H]<sup>7+</sup>)。

## 【0234】

(実施例23: BCY10919の合成)

## 【化83】



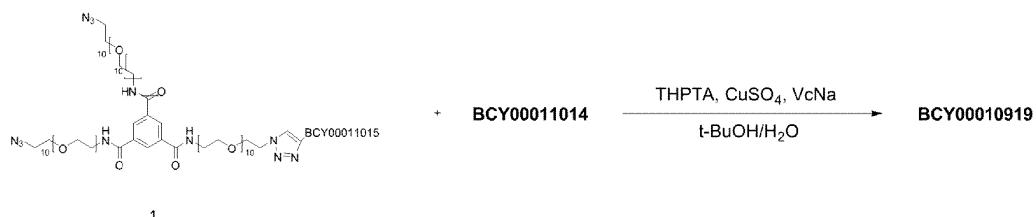
10

20

30

(BCY10919の調製のための手順)

## 【化84】



40

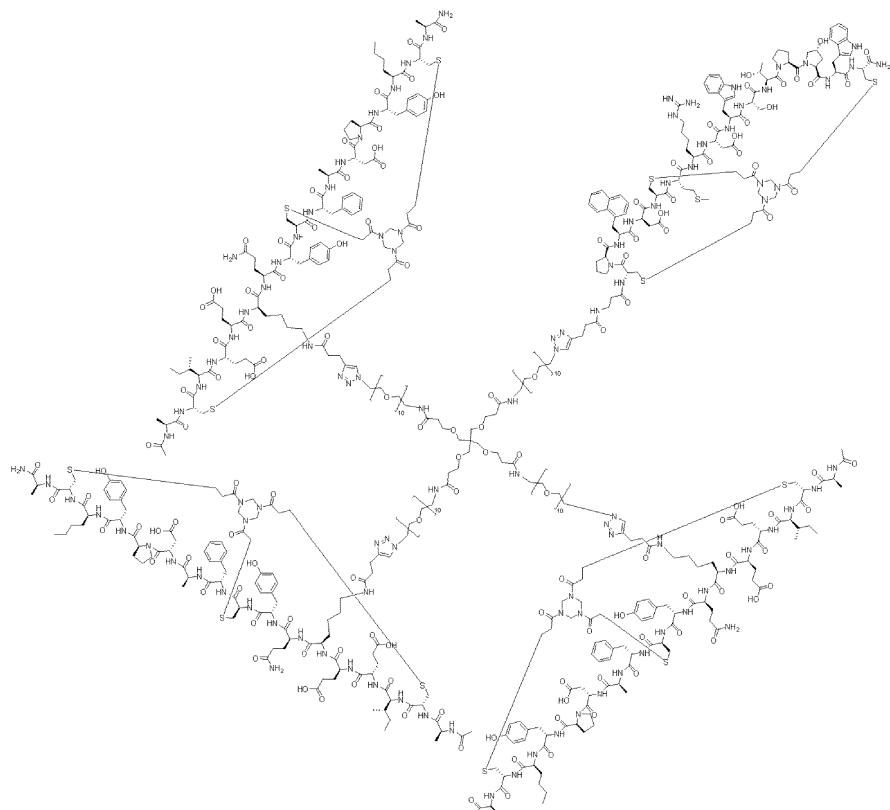
化合物1(75mg、18.8  $\mu mol$ 、1.0当量)、BCY11014(93.75mg、43.1  $\mu mol$ 、2.3当量)、及びTHPTA(0.4M、47.0  $\mu L$ 、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、2mL、予め脱気し、 $N_2$ でパージしたもの)に溶解させ、その後、 $CuSO_4$ (0.4M、47.0  $\mu L$ 、1.0当量)及び $VcNa$ (0.4M、94.0  $\mu L$ 、2.0当量)を $N_2$ 下で添加した。この溶液のpHを0.2M  $NH_4HCO_3$ (1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、 $N_2$ 雰囲気下、25～30℃で12時間攪拌した。LC-MSにより、化合物1が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を分取HPLCにより直接精製した。BCY10919(96mg、11.39  $\mu mol$ 、60.59%収率、96.12%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 8339.54、観測されたm/z: 1391.3([M+6H]<sup>6+</sup>)、1192.5([M+7H]<sup>7+</sup>)。

50

【0235】

(実施例24: BCY11021の合成)

【化85】



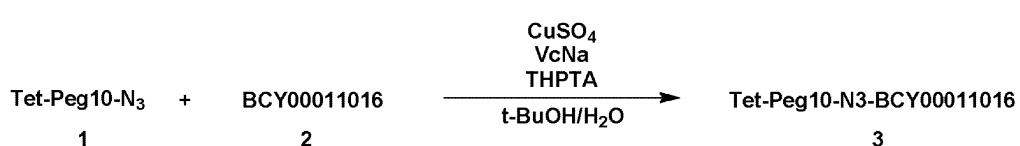
10

20

BCY00011021

(化合物3の調製のための手順)

【化86】



30

化合物1(15.0mg、6.10  $\mu\text{mol}$ 、1.0当量)、BCY11016(18.4mg、7.93  $\mu\text{mol}$ 、1.3当量)、及びTHPTA(2.65mg、6.10  $\mu\text{mol}$ 、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、1mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(30.0  $\mu\text{L}$ 、0.4M、2.0当量)及びVcNa(0.4M、30.0  $\mu\text{L}$ 、2.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を40℃で4時間攪拌した。LC-MSにより、化合物1が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。その後、反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去すると、残渣が生じ、その後、分取HPLCにより精製した。化合物3(2.89mg、0.514  $\mu\text{mol}$ 、8.42%収率、83.4%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 4782.46、観測されたm/z: 963.9([M+3H+2H<sub>2</sub>O]<sup>5+</sup>)。

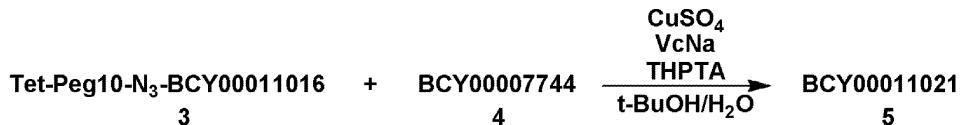
40

【0236】

(BCY11021の調製のための手順)

50

## 【化 8 7】

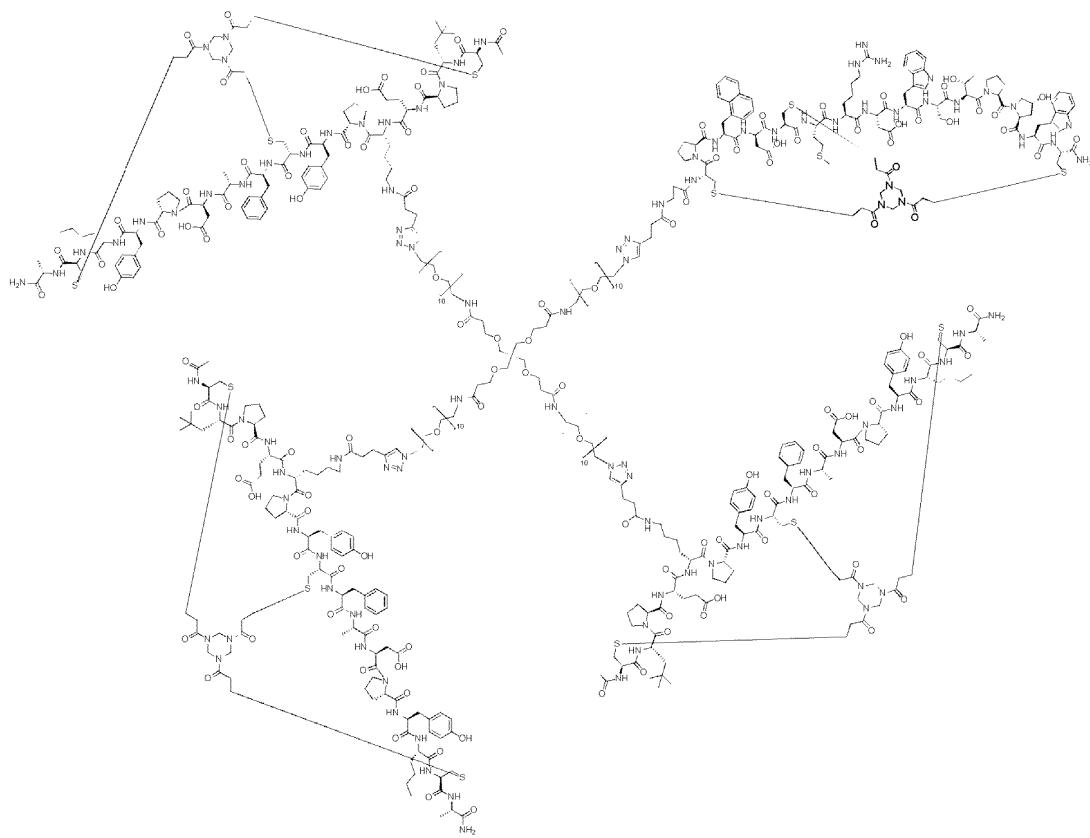


化合物3(2.89mg、0.60 μmol、1.0当量)、BCY7744(4.38mg、1.87 μmol、3.1当量)、及びTHPTA(0.9mg、2.1 μmol、3.5当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、1mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、3.0 μL、2.0当量)及びVcNa(0.4M、6.0 μL、4.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40℃で4時間攪拌した。LC-MSにより、化合物3が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY11021(2.8mg、0.229 μmol、37%収率、96.4%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 11795.38、観測されたm/z: 1310.6([M+9H]<sup>9+</sup>)、786.6([M+15H]<sup>15+</sup>)。

## 【0237】

(実施例25: BCY11022の合成)

## 【化 8 8】



(BCY11022の調製のための手順)

10

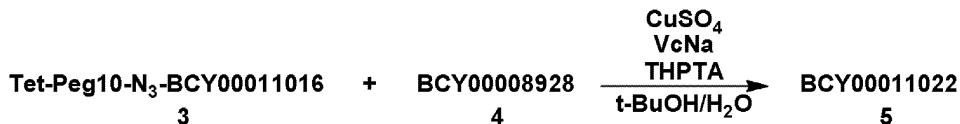
20

30

40

50

## 【化 8 9】

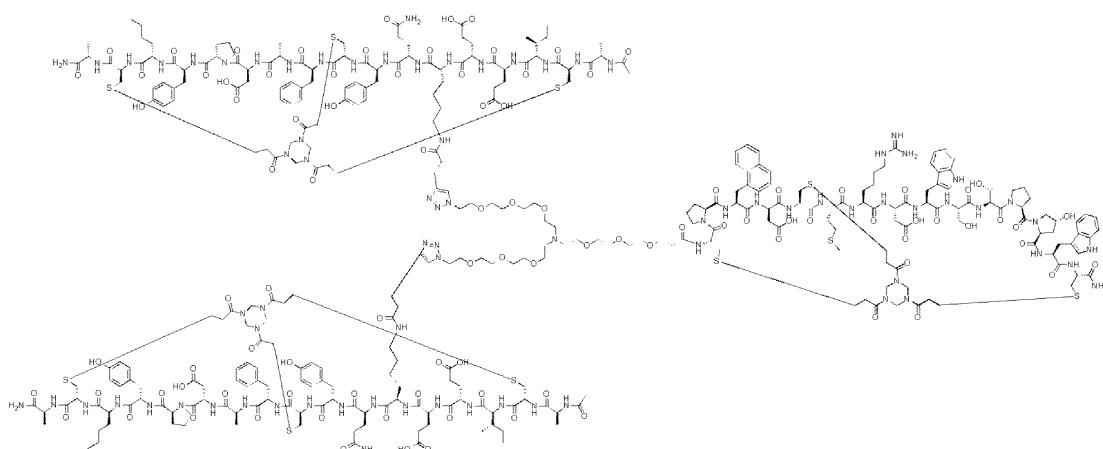


化合物3(2.7 mg、0.6  $\mu\text{mol}$ 、1.0当量)、BCY8928(5.3 mg、2.38  $\mu\text{mol}$ 、4.0当量)、及びTHPTA(0.9 mg、2.1  $\mu\text{mol}$ 、3.5当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、1mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でパージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4 M、6.0  $\mu\text{L}$ 、4.0当量)及びVcNa(0.4 M、6.0  $\mu\text{L}$ 、4.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40℃で4時間搅拌した。LC-MSにより、化合物3が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY11022(1.9 mg、1.0  $\mu\text{mol}$ 、23.2%収率、94.6%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 11435.19、観測されたm/z: 1143.2([M+10H]<sup>10+</sup>)。

## 【0238】

(実施例26: BCY11864の合成)

## 【化 9 0】



(BCY11864の調製のための手順)

## 【化 9 1】



化合物2(5 mg、1.80  $\mu\text{mol}$ 、1.0当量)、BCY7744(9 mg、3.85  $\mu\text{mol}$ 、2.1当量)、THPTA(0.4 M、9  $\mu\text{L}$ 、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、2mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でパージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4 M、9  $\mu\text{L}$ 、2.0当量)及びVcNa(0.4 M、18  $\mu\text{L}$ 、4.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40℃で16時間搅拌した。LC-MSにより、BCY7744が残存し、所望のm/zが検出されることが示された。反応混合物を分取HPLCにより直接精製した。BCY11864(5.2 mg、0.62

10

20

30

40

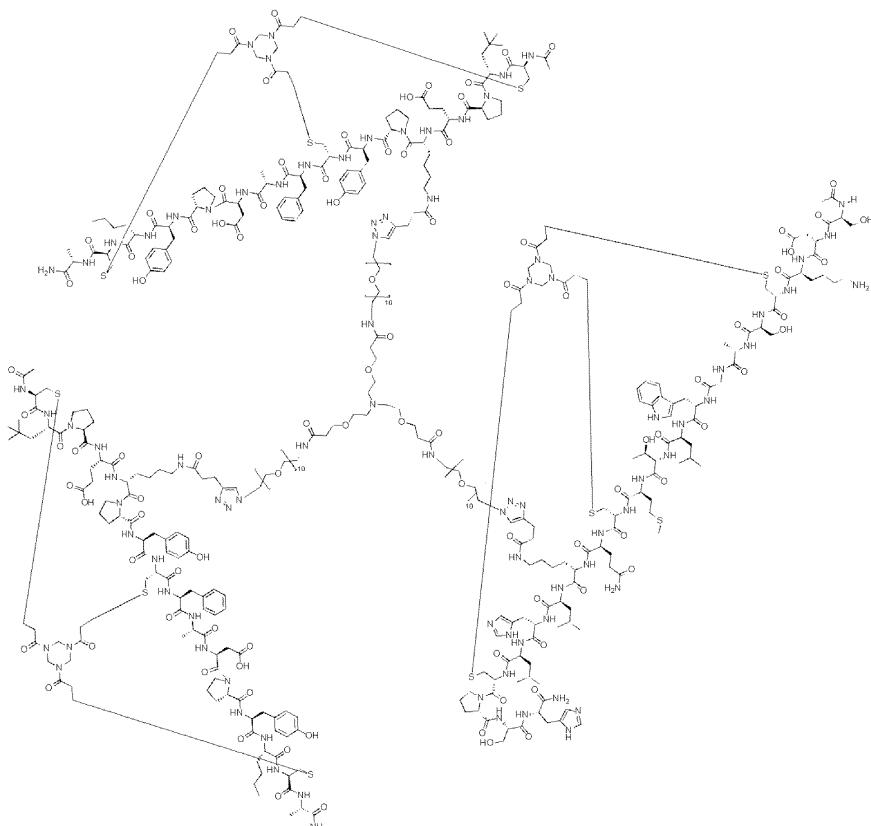
50

$\mu\text{mol}$ 、34% 収率、89% 純度)が白色の固体物として得られた。計算された MW: 7453.4  
4、観測された  $m/z$ : 1490.70([ $\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ )。

【0239】

(実施例27: BCY11780の合成)

【化92】



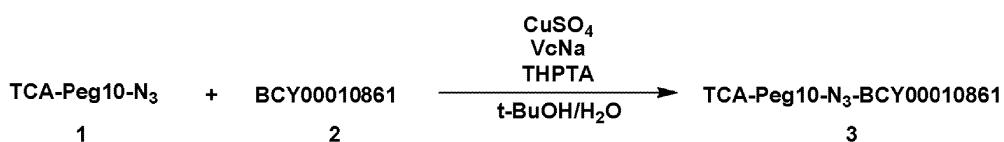
10

20

30

(化合物3の調製のための手順)

【化93】



化合物1(40.0mg、 $21.15\mu\text{mol}$ 、1.0当量)、化合物2(43.0mg、 $15.86\mu\text{mol}$ 、0.75当量)、及びTHPTA(10.0mg、 $21.20\mu\text{mol}$ 、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、1mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(53.0 $\mu\text{L}$ 、0.4M、1.0当量)及びVcNa(0.4M、53.0 $\mu\text{L}$ 、1.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を40℃で4時間攪拌し、LC-MSにより、化合物2が完全に消費され、所望の  $m/z$  を有する1つの主要なピークが検出されることが示された。その後、反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去すると、残渣が生じた。これを分取HPLCにより精製した。化合物3(11.7mg、 $2.44\mu\text{mol}$ 、11% 収率、96.2% 純度)が白色の固体物として得られた。計算された MW: 4607.33、観測された  $m/z$ : 1152.36([ $\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ )。

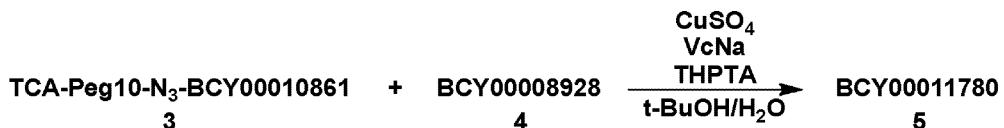
【0240】

(BCY11780の調製のための手順)

40

50

【化 9 4】

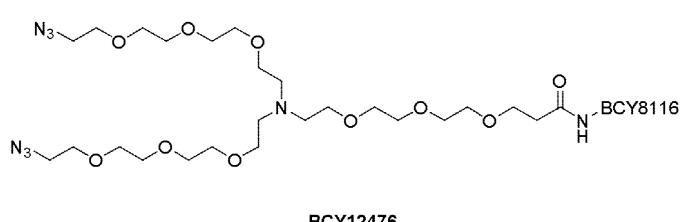
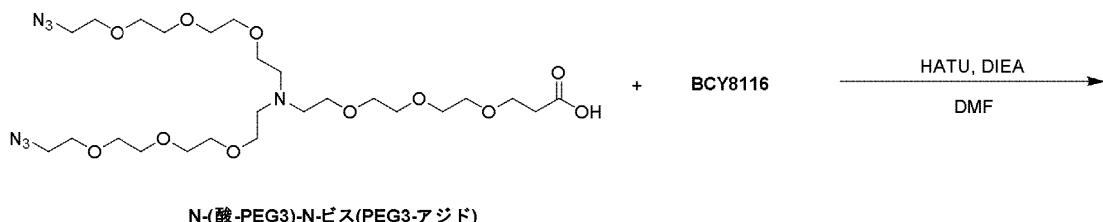


化合物3(11.7 mg、2.54  $\mu$  mol、1.0当量)、BCY8928(11.8 mg、5.33  $\mu$  mol、2.1当量)、及びTHPTA(2.3 mg、5.3  $\mu$  mol、2.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、1mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4 M、12.7  $\mu$  L、2.0当量)及びVcNa(0.4 M、25.4  $\mu$  L、4.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、40 °Cで4時間攪拌した。LC-MSにより、化合物3が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されたことが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY11780(5.0 mg、0.509  $\mu$  mol、20.03% 収率、92.0% 純度)が白色の固体物として得られた。計算されたMW: 9042.48、観測されたm/z: 1292.8([M+7H]<sup>7+</sup>)、1130.96([M+8H]<sup>8+</sup>)。

〔 0 2 4 1 〕

(実施例28: BCY13390の合成)  
(BCY12476の調製のための手順)

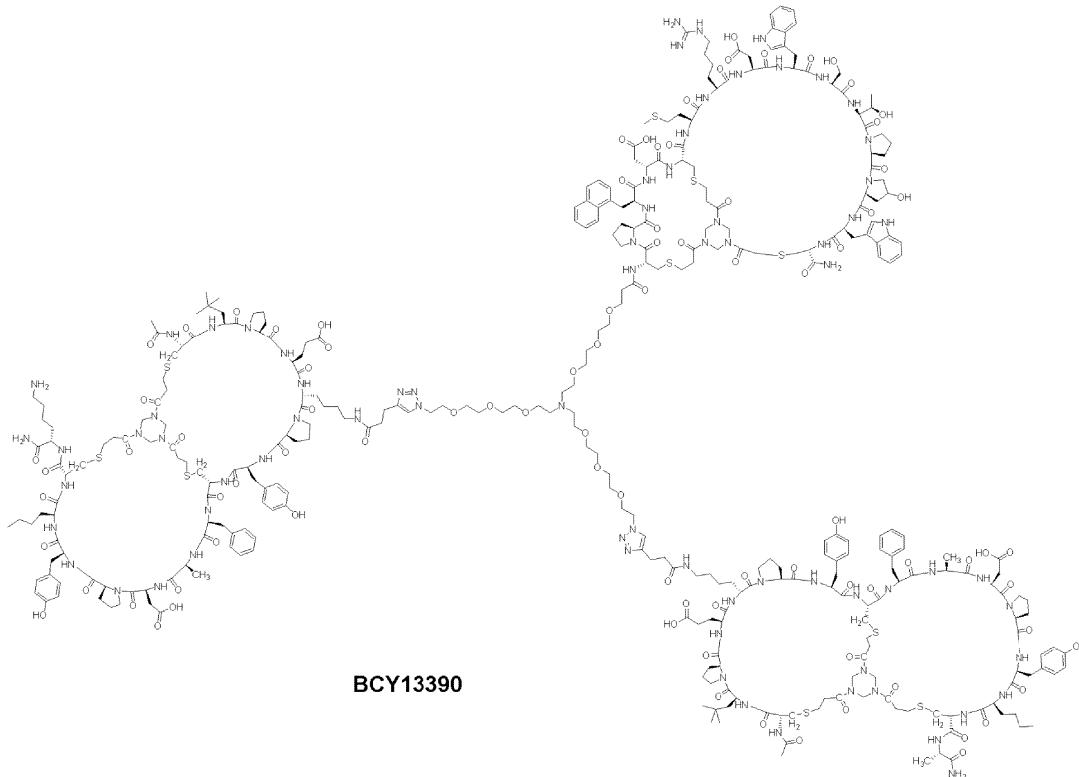
【化 9 5】



N-(酸-PEG3)-N-ビス(PEG3-アジド)(70.0 mg、112.2  $\mu$ mol、1.0当量)、HATU(51.2 mg、134.7  $\mu$ mol、1.2当量)、及びDIEA(29.0 mg、224.4  $\mu$ mol、40  $\mu$ L、2.0当量)の混合物をDMF(2 mL)に溶解させ、5分間混合した。その後、BCY8116(294.0 mg、135.3  $\mu$ mol、1.2当量)を添加した。反応混合物を40 °Cで16時間攪拌した。LC-MSにより、所望のm/zを有する1つの主要なピークが示された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去すると、残渣が生じた。その後、残渣を分取HPLCにより精製した。BCY12476(194.5 mg、66.02  $\mu$ mol、29%収率、94%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 2778.17、観測されたm/z: 1389.3([M+2H] $^{2+}$ )、926.7([M+3H] $^{3+}$ )。

[ 0 2 4 2 ]

## 【化96】

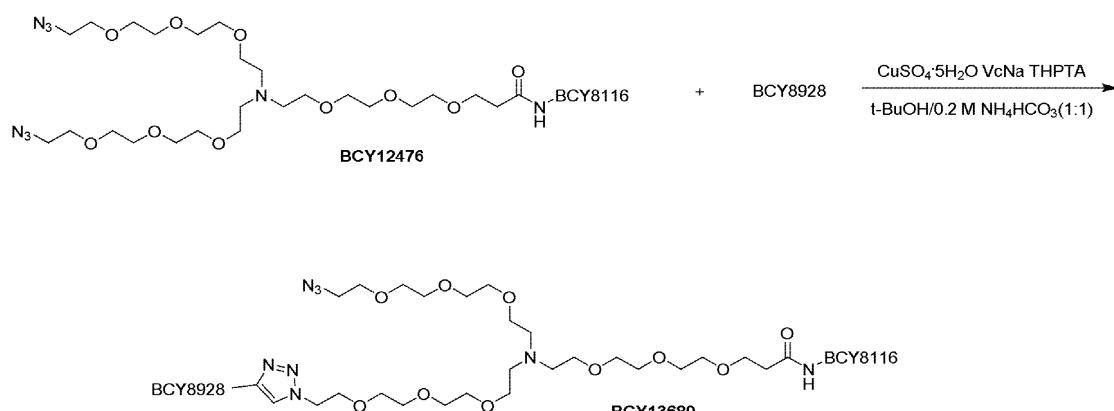


10

20

(BCY13689の調製のための手順)

## 【化97】



30

BCY12476(47.0mg、16.91  $\mu\text{mol}$ 、1.0当量)、BCY8928(30.0mg、13.53  $\mu\text{mol}$ 、0.8当量)、及びTHPTA(36.7mg、84.55  $\mu\text{mol}$ 、5.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、8mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、21.0  $\mu\text{L}$ 、0.5当量)及びVcNa(67.0mg、338.21  $\mu\text{mol}$ 、20.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25℃で1.5時間攪拌した。LC-MSにより、一部のBCY12476が残存し、BCY8928が完全に消費され、所望のm/zを有するピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY13689(25.3mg、4.56  $\mu\text{mol}$ 、27%収率、90%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 4995.74、観測されたm/z: 1249.4([M+4H]<sup>4+</sup>)、999.9([M+5H]<sup>5+</sup>)。

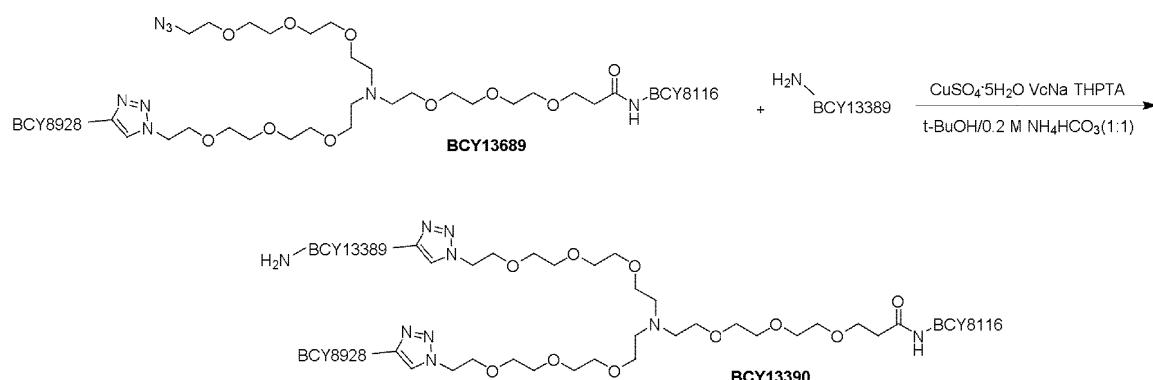
【0243】

40

50

(BCY13390の調製のための手順)

## 【化98】

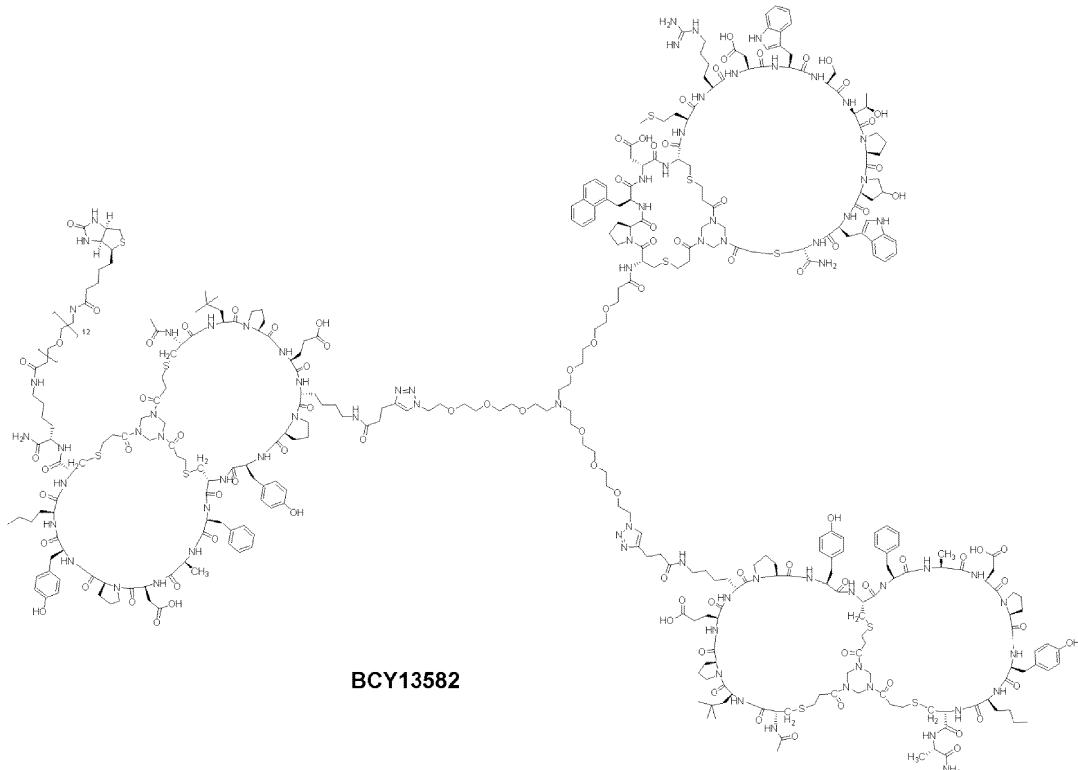


BCY13689(43.6 mg、8.73  $\mu$  mol、1.0当量)、BCY13389(20.8 mg、9.16  $\mu$  mol、1.05当量)、及びTHPTA(3.8 mg、8.73  $\mu$  mol、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1、1 mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4 M、22.0  $\mu$  L、1.0当量)及びVcNa(3.5 mg、17.45  $\mu$  mol、2.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを0.2 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1のt-BuOH/H<sub>2</sub>O中)の滴加により8に調整すると、溶液は薄黄色になつた。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25℃で2時間攪拌した。LC-MSにより、所望のm/zに対応する顕著なピークが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY13390(33.8 mg、4.21  $\mu$  mol、48%収率、90%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 7270.41、観測されたm/z: 1454.9([M+5H]<sup>5+</sup>)、1213.2([M+6H]<sup>6+</sup>)。

## 【0244】

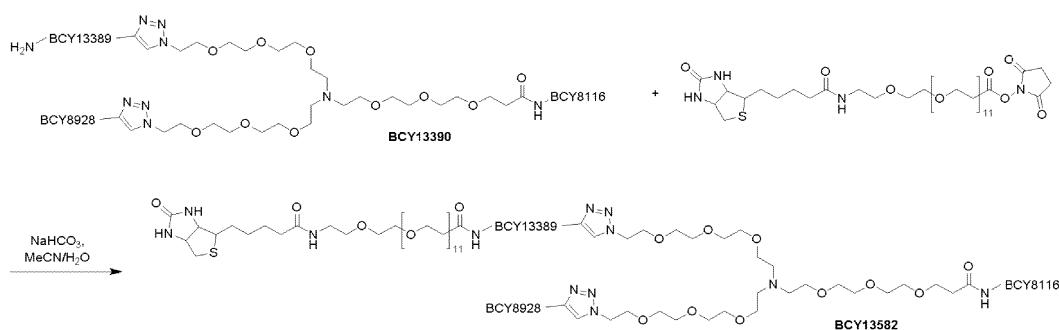
(実施例29: BCY13582の合成)

## 【化99】



(BCY13582の調製のための手順)

## 【化100】

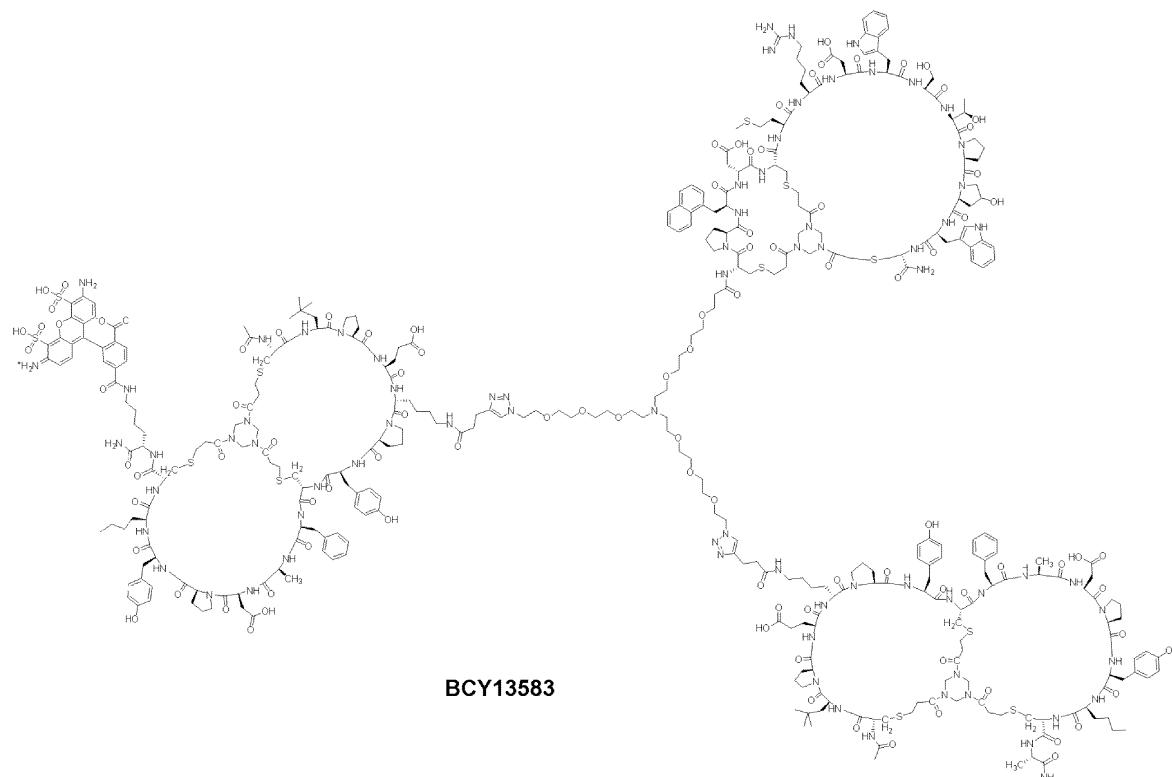


BCY13390(5.0mg、0.6μmol、1.0当量)、ビオチン-PEG12-NHSエステル(CAS 365 441-71-0、0.7mg、0.72μmol、1.1当量)の混合物をMeCN/H<sub>2</sub>O(1:1、2mL)に溶解させた。この溶液のpHを1.0M NaHCO<sub>3</sub>の滴加により8に調整した。反応混合物を25℃で0.5時間攪拌した。LC-MSにより、BCY13390が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY13582(2.5mg、0.30μmol、43%収率、96%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 8096.43、観測されたm/z: 1351.1([M+6H]<sup>6+</sup>)、1158.5([M+7H]<sup>7+</sup>)。

## 【0245】

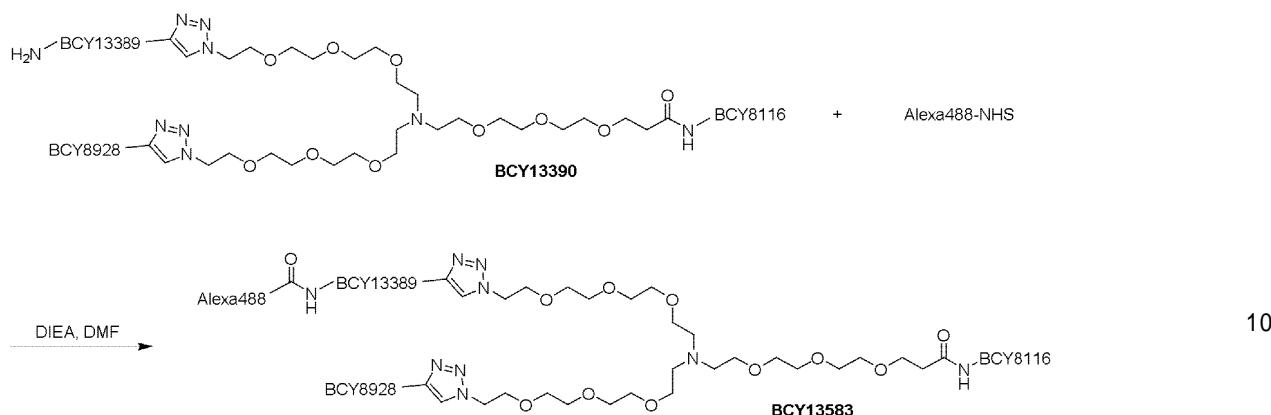
(実施例30: BCY13583の合成)

## 【化101】



(BCY13583の調製のための手順)

## 【化102】

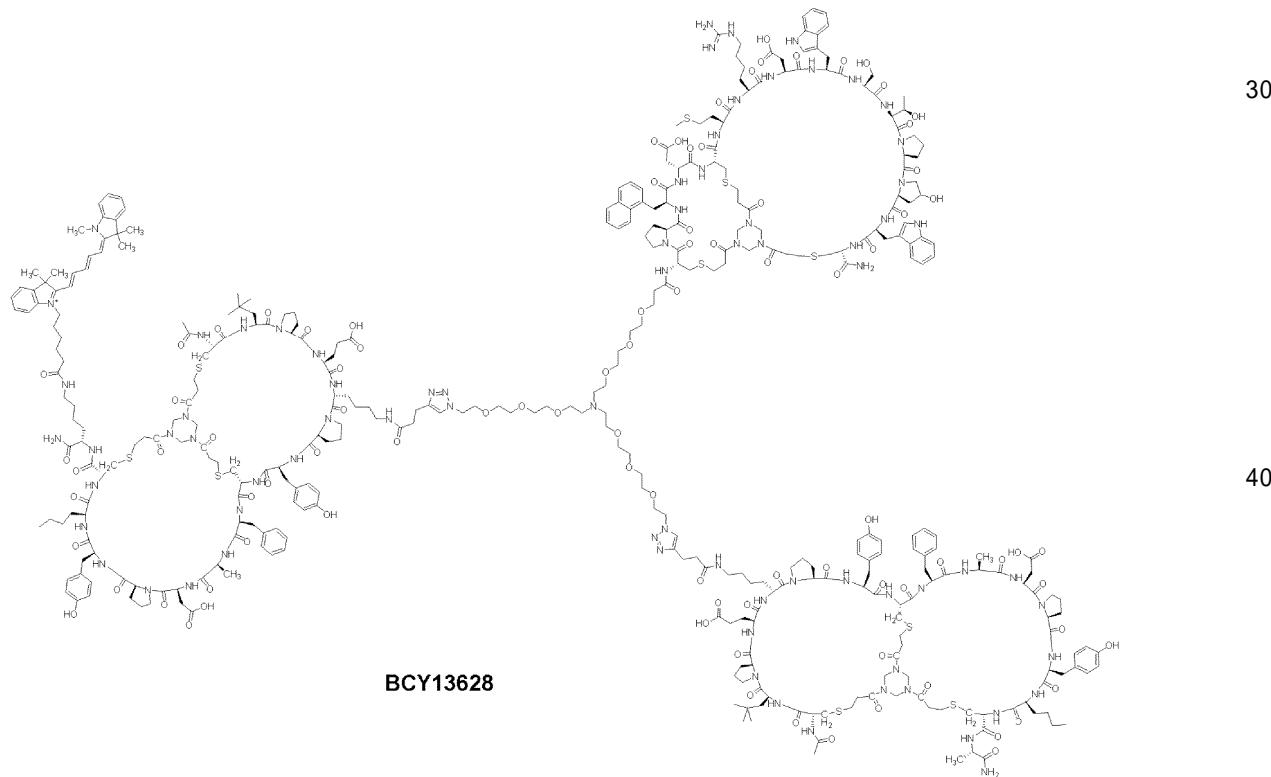


BCY13390(15.0mg、2.06 μmol、1.0当量)及びAlexa fluor(登録商標) 488 NHSエステル(2.5mg、4.12 μmol、2.0当量)の混合物をDMF(0.5mL)に溶解させた。その後、DIEA(2.6mg、20.63 μmol、3.6 μL、10当量)を滴加した。反応混合物を25℃で1時間攪拌した。LC-MSにより、BCY13390が残存し、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。追加のAlexa fluor(登録商標) 488 NHSエステル(2.0mg、3.09 μmol、1.5当量)を反応混合物に添加し、反応混合物を25℃でさらに1時間攪拌した。HPLCにより、BCY13390が完全に消費されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY13583(5mg、0.61 μmol、29%収率、95%純度)が赤色の固体として得られた。計算されたMW: 7787.9、観測されたm/z: 1948.8([M+4H+H<sub>2</sub>O]<sup>4+</sup>)、1558.6([M+5H+H<sub>2</sub>O]<sup>5+</sup>)、1299.1([M+7H+H<sub>2</sub>O]<sup>7+</sup>)。

## 【0246】

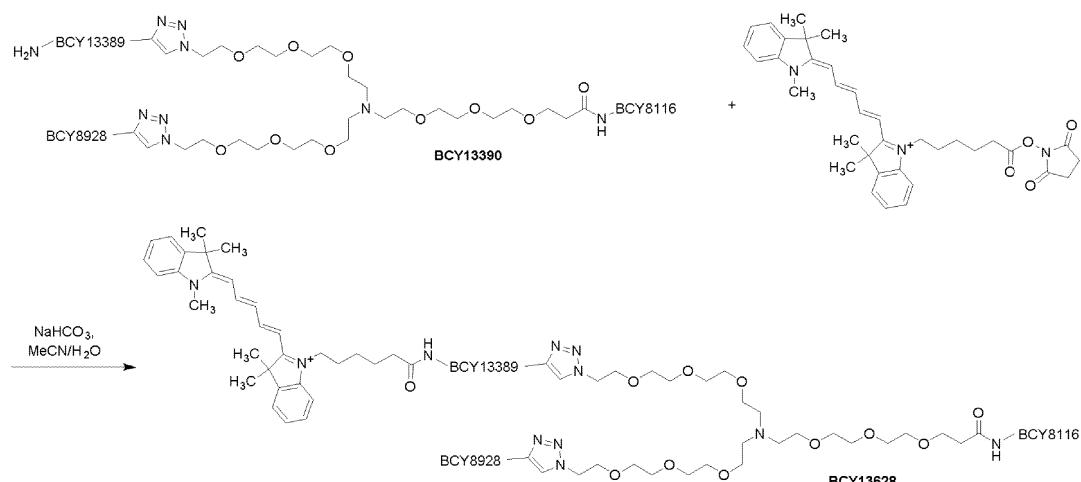
(実施例31: BCY13628の合成)

## 【化103】



(BCY13628の調製のための手順)

## 【化104】

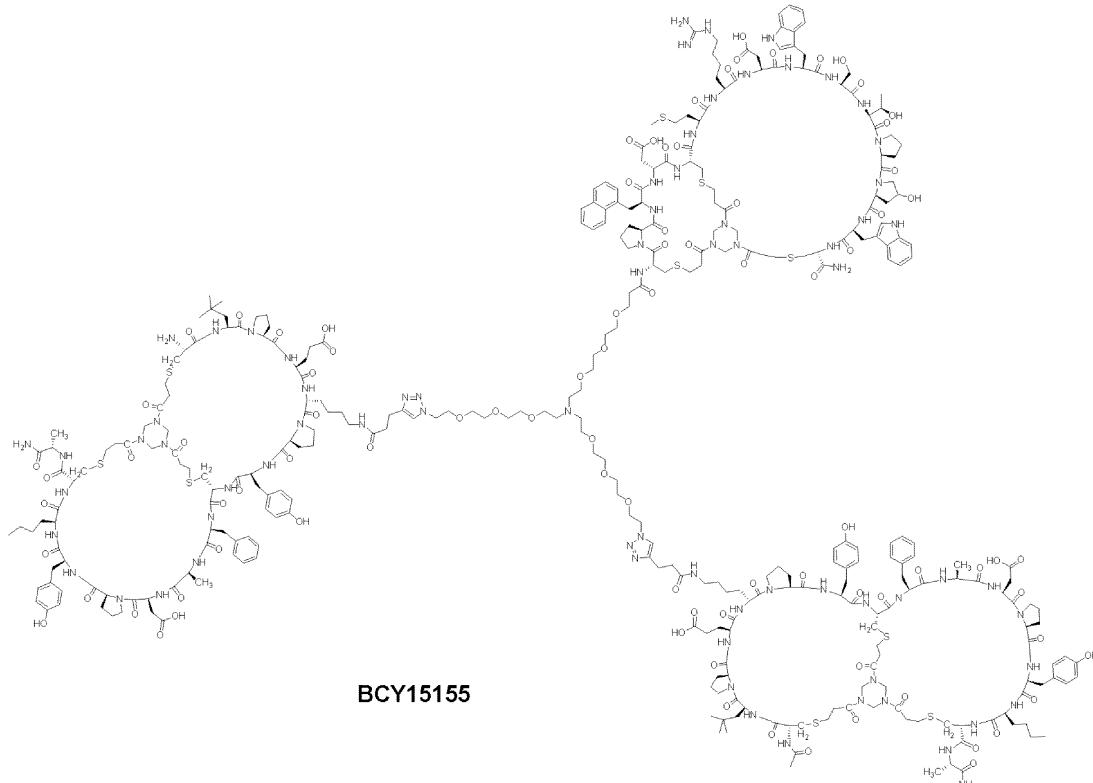


BCY13390(5.6mg、0.77  $\mu$  mol、1.0当量)及びシアニン5 NHSエステル(0.5mg、0.8  $\mu$  mol、1.1当量)の混合物をMeCN/H<sub>2</sub>O(1:1、2mL)に溶解させた。この溶液のpHを1.0M NaHCO<sub>3</sub>の滴加により8に調整した。反応混合物を25℃で0.5時間攪拌した。LC-MSにより、BCY13390が完全に消費され、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY13628(2.9mg、0.36  $\mu$  mol、46%収率、95%純度)が青色の固体として得られた。計算されたMW: 7736.06、観測されたm/z: 1289.9([M+6H]<sup>6+</sup>)、1105.5([M+7H]<sup>7+</sup>)。

## 【0247】

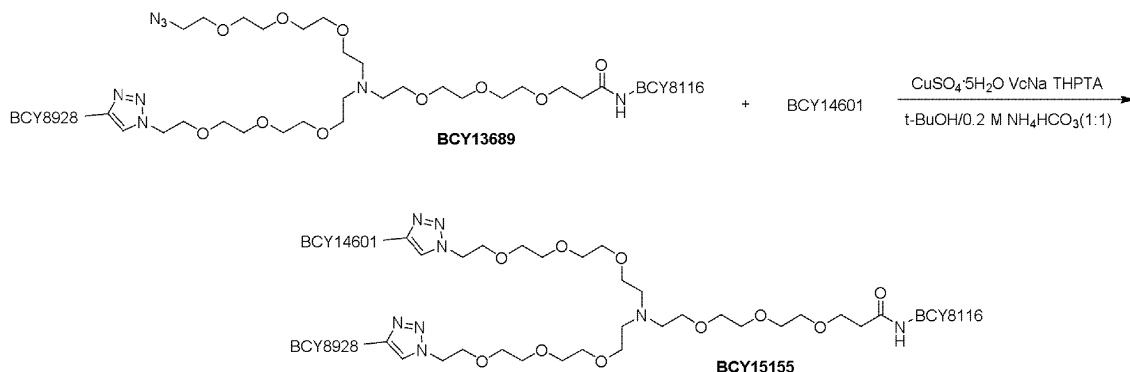
(実施例32: BCY15155の合成)

## 【化105】



(BCY15155の調製のための手順)

## 【化106】



BCY13689(25.0mg、5.00  $\mu$ mol、1.0当量)、BCY14601(13.0mg、6.01  $\mu$ mol、1.2当量)、及びTHPTA(2.0mg、5.00  $\mu$ mol、1.0当量)の混合物をt-BuOH/0.2M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(1:1、0.5mL、予め脱気し、N<sub>2</sub>でバージしたもの)に溶解させ、その後、CuSO<sub>4</sub>(0.4M、12.5  $\mu$ L、1.0当量)及びVc(3.5mg、20.02  $\mu$ mol、4.0当量)をN<sub>2</sub>下で添加した。この溶液のpHを8に調整すると、溶液は薄黄色になった。反応混合物を、N<sub>2</sub>雰囲気下、25で2時間攪拌した。LC-MSにより、BCY13689が完全に消費され、一部のBCY14601が残存し、所望のm/zを有する1つの主要なピークが検出されることが示された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮すると、残渣が得られた。粗生成物を分取HPLCにより精製すると、BCY15155(19.7mg、2.41  $\mu$ mol、36%収率、97%純度)が白色の固体として得られた。計算されたMW: 7171.3、観測されたm/z: 1434.7([M+5H]<sup>5+</sup>)、1196.2([M+6H]<sup>6+</sup>)。

## 【0248】

(分析データ)

本発明の以下のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体を、質量分析及びHPLCを用いて分析した。下の分析方法A～CについてのHPLC設定は、次の通りであった：

移動相: A: H<sub>2</sub>O中の0.1%TFA B: ACN中の0.1%TFA

流量: 1.0mL/分

カラム: Gemini-NX C18 5um 110A 150\*4.6mm

装置: Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)

## 【0249】

下の分析方法DについてのHPLC設定は、次の通りであった：

移動相: A: H<sub>2</sub>O中の0.1%TFA B: ACN中の0.1%TFA

流量: 1.0mL/分

カラム: Kintex 1.7um C18 100A 2.1mm\*150mm

装置: Agilent UPLC 1290

## 【0250】

使用された勾配は、下の表：

20

30

40

50

【表 10】

分析方法	勾配の説明
A	20分かけて25~55% B
B	20分かけて30~60% B
C	20分かけて45~75% B
D	10分かけて30~60% B

に記載されており、データは、次のように作成した：

10

20

30

40

50

【表 1 1】

複合体ID	分析データー質量分析	HPLC 保持 時間(分)	分析方法
BCY11027	MW: 8578.91, 観測されたm/z: 1430.6 ([M+6H] <sup>6+</sup> )	13.423	A
BCY11863	MW: 7213.32, 観測されたm/z: 1444.0 ([M+5H] <sup>5+</sup> )	10.649	B
BCY12486	計算された MW: 7069.21, 観測されたm/z: 1768.2([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1415.0([M+5H] <sup>5+</sup> )	15.799	A
BCY12487	計算された MW: 7099.21, 観測されたm/z: 1775.8([M+4H] <sup>4+</sup> )	10.936	B
BCY12586	計算された MW: 6985.11, 観測されたm/z: 1746.5([M+4H] <sup>4+</sup> )	11.512	B
BCY12588	計算された MW: 6871.01, 観測されたm/z: 1718.5([M+4H] <sup>4+</sup> )	12.44	B
BCY12491	計算された MW: 7441.63, 観測されたm/z: 1861.1 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1489.0 ([M+5H] <sup>5+</sup> )	12.274	A
BCY12723	計算された MW: 7363.49, 観測されたm/z: 1473.3 [M+5H] <sup>5+</sup> , 1841.5 [M+4H] <sup>4+</sup>	13.33	A
BCY12724	計算された MW: 7299.50, 観測されたm/z: 1217.5 [M+6H] <sup>6+</sup> , 1460.8 [M+5H] <sup>5+</sup> , 1825.5 [M+4H] <sup>4+</sup>	12.411	A
BCY12725	計算された MW: 7295.51, 観測されたm/z: 1460.7 [M+5H] <sup>5+</sup> , 1825.4 [M+4H] <sup>4+</sup>	8.704	B
BCY12726	計算された MW: 7327.55, 観測されたm/z: 1466.7 [M+5H] <sup>5+</sup> , 1832.2 [M+4H] <sup>4+</sup>	8.679	B
BCY12728	計算された MW: 7325.58, 観測されたm/z: 1466.3 [M+5H] <sup>5+</sup> , 1831.9 [M+4H] <sup>4+</sup>	11.81	A
BCY12729	計算された MW: 7213.44, 観測されたm/z: 1443.4 [M+5H] <sup>5+</sup> , 1803.9 [M+4H] <sup>4+</sup>	13.066	A
BCY12730	計算された MW: 7185.39, 観測されたm/z: 1197.5 [M+6H] <sup>6+</sup> , 1438.4 [M+5H] <sup>5+</sup>	9.81	B
BCY12731	計算された MW: 7099.34, 観測されたm/z: 1184.5 [M+6H] <sup>6+</sup> , 1421.3 [M+5H] <sup>5+</sup>	10.583	B
BCY12732	計算された MW: 8208.70, 観測されたm/z: 1173.4 [M+7H] <sup>7+</sup>	11.117	C
BCY13272	計算された MW: 7102.28, 観測されたm/z: 1776.4 [M+4H] <sup>4+</sup> , 1421.3 [M+5H] <sup>5+</sup>	7.07	D

【0 2 5 1】

さらなる分析データは、次のように作成した:

【表 1 2】

複合体ID	分析データー質量分析
BCY13279	MW: 7562.83 観測された m/z: 2521.9 ( $[M+3H]^{3+}$ ), 1891.4 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1513.5 ( $[M+5H]^{5+}$ )
BCY13283	MW: 7215.45 観測された m/z: 2406.1 ( $[M+3H]^{3+}$ ), 1804.8 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1444.1 ( $[M+5H]^{5+}$ )
BCY13287	MW: 7397.64 観測された m/z: 2467.1 ( $[M+3H]^{3+}$ ), 1850.6 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1480.7 ( $[M+5H]^{5+}$ )
BCY14049	MW: 7455.68 観測された m/z: 2486.2 ( $[M+3H]^{3+}$ ), 1864.9 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1492.1 ( $[M+5H]^{5+}$ )
BCY14050	MW: 7455.68 観測された m/z: 2486.2 ( $[M+3H]^{3+}$ ), 1864.9 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1492.1 ( $[M+5H]^{5+}$ )
BCY14051	MW: 7458.7 観測された m/z: 2487.2 ( $[M+3H]^{3+}$ ), 1865.6 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1492.7 ( $[M+5H]^{5+}$ )
BCY14052	MW: 7451.69 観測された m/z: 2484.9 ( $[M+3H]^{3+}$ ), 1863.9 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1491.3 ( $[M+5H]^{5+}$ )
BCY14053	MW: 7457.71 観測された m/z: 2486.8 ( $[M+3H]^{3+}$ ), 1865.4 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1492.5 ( $[M+5H]^{5+}$ )
BCY14054	MW: 7457.71 観測された m/z: 2486.8 ( $[M+3H]^{3+}$ ), 1865.4 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1492.5 ( $[M+5H]^{5+}$ )
BCY14055	MW: 7418.62 観測された m/z: 2473.8 ( $[M+3H]^{3+}$ ), 1855.6 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1484.7 ( $[M+5H]^{5+}$ )
BCY14056	MW: 7432.64 観測された m/z: 2478.5 ( $[M+3H]^{3+}$ ), 1859.1 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1487.5 ( $[M+5H]^{5+}$ )
BCY14334	MW: 8052.48 観測された m/z: 1611.4 ( $[M+5H]^{5+}$ ), 1343.0 ( $[M+6H]^{6+}$ ), 1151.2 ( $[M+7H]^{7+}$ )
BCY14335	MW: 8052.48 観測された m/z: 1611.4 ( $[M+5H]^{5+}$ ), 1342.8 ( $[M+6H]^{6+}$ ), 1151.1 ( $[M+7H]^{7+}$ )
BCY14413	MW: 7498.75 観測された m/z: 938.3 ( $[M+8H]^{8+}$ ), 1072.2 ( $[M+7H]^{7+}$ ), 1250.9 ( $[M+6H]^{6+}$ )
BCY14415	MW: 8324.75 観測された m/z: 1388.4 ( $[M+6H]^{6+}$ ), 1190.2 ( $[M+7H]^{7+}$ ), 1041.5 ( $[M+8H]^{8+}$ )

10

20

30

40

50

BCY14416	MW: 8015.2 観測されたm/z: 1336.5 ( $[M+6H]^{6+}$ )	
BCY12733	MW: 7307.33 観測されたm/z: 1827.1 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1462.1 ( $[M+5H]^{5+}$ )	
BCY12973	MW: 7611.86 観測されたm/z: 1269.9 ( $[M+6H]^{6+}$ )	
BCY12974	MW: 7474.70 観測されたm/z: 1869.3 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1246.1 ( $[M+5H]^{5+}$ )	
BCY12975	MW: 7498.70 観測されたm/z: 1249.8 ( $[M+6H]^{6+}$ )	
BCY12976	MW: 7498.70 観測されたm/z: 1249.8 ( $[M+6H]^{6+}$ )	
BCY12977	MW: 7455.68 観測されたm/z: 1242.7 ( $[M+6H]^{6+}$ )	10
BCY12978	MW: 7469.68 観測されたm/z: 1067.1 ( $[M+7H]^{7+}$ )	
BCY12979	MW: 7641.87 観測されたm/z: 1911.2 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1528.3 ( $[M+5H]^{5+}$ ), 1247.5 ( $[M+6H]^{6+}$ )	
BCY13042	MW: 7433.62 観測されたm/z: 1859.8 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1487.1 ( $[M+5H]^{5+}$ )	
BCY13043	MW: 7372.54 観測されたm/z: 1843.5 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1474.8 ( $[M+5H]^{5+}$ )	
BCY13044	MW: 7364.50 観測されたm/z: 1842.0 ( $[M+4H]^{4+}$ )	
BCY13045	MW: 7435.60 観測されたm/z: 1859.4 ( $[M+4H]^{4+}$ )	
BCY13046	MW: 7320.51 観測されたm/z: 1831.1 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1464.6 ( $[M+5H]^{5+}$ )	
BCY13047	MW: 7458.67 観測されたm/z: 1865.7 ( $[M+4H]^{4+}$ )	
BCY13049	MW: 7079.22 観測されたm/z: 1770.9 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1416.7 ( $[M+5H]^{5+}$ )	20
BCY13051	MW: 7376.53 観測されたm/z: 1844.5 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1476.1 ( $[M+5H]^{5+}$ )	
BCY13052	MW: 7447.61 観測されたm/z: 1862.6 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1490.2 ( $[M+5H]^{5+}$ )	
BCY13054	MW: 7527.78 観測されたm/z: 1882.6 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1506.7 ( $[M+5H]^{5+}$ )	
BCY13138	MW: 7108.24 観測されたm/z: 1422.5 ( $[M+5H]^{5+}$ ), 1185.6 ( $[M+6H]^{6+}$ )	
BCY13139	MW: 7249.37 観測されたm/z: 1449.8 ( $[M+5H]^{5+}$ )	
BCY13140	MW: 7172.24 観測されたm/z: 1435.4 ( $[M+5H]^{5+}$ ), 1196.2 ( $[M+6H]^{6+}$ )	
BCY13270	MW: 7523.8 観測されたm/z: 1881.87 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1505.70 ( $[M+5H]^{5+}$ )	
BCY13271	MW: 7501.75 観測されたm/z: 1876.4 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1501.3 ( $[M+5H]^{5+}$ )	30
BCY13273	MW: 7076.26 観測されたm/z: 1770.1 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1416.2 ( $[M+5H]^{5+}$ )	
BCY13274	MW: 7272.51 観測されたm/z: 1819.1 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1455.5 ( $[M+5H]^{5+}$ )	
BCY13275	MW: 7455.66 観測されたm/z: 1865.5 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1492.2 ( $[M+5H]^{5+}$ ), 1243.5 ( $[M+6H]^{6+}$ )	
BCY13276	MW: 7378.52 観測されたm/z: 1845.7 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1476.7 ( $[M+5H]^{5+}$ ), 1230.6 ( $[M+6H]^{6+}$ )	
BCY13277	MW: 7403.58 観測されたm/z: 1850.9 ( $[M+4H]^{4+}$ ), 1481.4 ( $[M+5H]^{5+}$ ), 1234.8 ( $[M+6H]^{6+}$ )	
BCY13278	MW: 7529.73 観測されたm/z: 1506.4 ( $[M+5H]^{5+}$ ), 1255.2 ( $[M+6H]^{6+}$ )	40

BCY13280	MW: 7323.4 観測されたm/z: 1831.0 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1465.4 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1221.1 ([M+6H] <sup>6+</sup> )	
BCY13281	MW: 7265.36 観測されたm/z: 1817.0 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1453.6 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1211.3 ([M+6H] <sup>6+</sup> )	
BCY13282	MW: 7194.29 観測されたm/z: 1439.6 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1199.9 ([M+6H] <sup>6+</sup> )	
BCY13284	MW: 7471.61 観測されたm/z: 1245.5 ([M+6H] <sup>6+</sup> ), 1068.1 ([M+7H] <sup>7+</sup> )	
BCY13285	MW: 7471.61 観測されたm/z: 1246.4 ([M+6H] <sup>6+</sup> )	
BCY13286	MW: 7447.63 観測されたm/z: 1241.7 ([M+6H] <sup>6+</sup> )	10
BCY13288	MW: 7439.7 観測されたm/z: 1860.8 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1240.6 ([M+6H] <sup>6+</sup> )	
BCY13289	MW: 7417.65 観測されたm/z: 1854.8 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1484.4 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1237.0 ([M+6H] <sup>6+</sup> )	
BCY10918	MW: 8423.67 観測されたm/z: 1404.27 ([M+6H] <sup>6+</sup> ), 1203.73 ([M+7H] <sup>7+</sup> )	
BCY10919	MW: 8339.54 観測されたm/z: 1391.3 ([M+6H] <sup>6+</sup> ), 1192.5 ([M+7H] <sup>7+</sup> )	
BCY11021	MW: 11795.38 観測されたm/z: 1310.6 ([M+9H] <sup>9+</sup> ), 786.6 ([M+15H] <sup>15+</sup> )	
BCY11022	MW: 11435.19 観測されたm/z: 1143.2 ([M+10H] <sup>10+</sup> )	
BCY11385	MW: 7129.18 観測されたm/z: 1782.2 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1426.3 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1188.9 ([M+6H] <sup>6+</sup> )	20
BCY11864	MW: 7453.44 観測されたm/z: 1864.31 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1490.70 ([M+5H] <sup>5+</sup> )	
BCY12484	MW: 7135.17 観測されたm/z: 1784.8 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1427.8 ([M+5H] <sup>5+</sup> )	
BCY12485	MW: 7071.18 観測されたm/z: 1768.7 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1416.4 ([M+5H] <sup>5+</sup> )	
BCY12490	MW: 7268.46 観測されたm/z: 1818.0 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1453.9 ([M+5H] <sup>5+</sup> )	
BCY12587	MW: 6957.08 観測されたm/z: 1740.2 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1392.6 ([M+5H] <sup>5+</sup> )	
BCY12589	MW: 7724.06 観測されたm/z: 1931.4 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1545.1 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1288.3 ([M+6H] <sup>6+</sup> )	
BCY12590	MW: 7241.39 観測されたm/z: 1810.7 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1448.6 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1208.4 ([M+6H] <sup>6+</sup> )	30
BCY11780	MW: 9042.48 観測されたm/z: 1292.8 ([M+7H] <sup>7+</sup> ), 1130.96 ([M+8H] <sup>8+</sup> )	
BCY12662	MW: 7889.16 観測されたm/z: 1578.8 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1315.6 ([M+6H] <sup>6+</sup> ), 1128.3 ([M+7H] <sup>7+</sup> )	
BCY12722	MW: 7866.12 観測されたm/z: 1967.0 ([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1574.0 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1312.0 ([M+6H] <sup>6+</sup> )	
BCY12760	MW: 7047.16, 観測されたm/z: 1762.5[M+4H] <sup>4+</sup>	
BCY12761	MW: 7047.16, 観測されたm/z: 1411.5[M+5H] <sup>5+</sup> , 1762.7[M+4H] <sup>4+</sup>	
BCY13390	MW: 7270.41, 観測されたm/z: 1454.9([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1213.2([M+6H] <sup>6+</sup> )	
BCY13582	MW: 8096.43, 観測されたm/z: 1351.1 ([M+6H] <sup>6+</sup> ), 1158.5 ([M+7H] <sup>7+</sup> )	40

BCY13583	MW: 7787.9, 観測されたm/z: 1948.8 ([M+4H+H <sub>2</sub> O] <sup>4+</sup> ), 1558.6 ([M+5H+H <sub>2</sub> O] <sup>5+</sup> ), 1299.1 ([M+7H+H <sub>2</sub> O] <sup>7+</sup> )
BCY13628	MW: 7736.06, 観測されたm/z: 1289.9 ([M+6H] <sup>6+</sup> ), 1105.5 ([M+7H] <sup>7+</sup> )
BCY14602	MW: 7129.2, 観測されたm/z: 1426.6 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1189.1 ([M+6H] <sup>6+</sup> )
BCY15155	MW: 7171.3, 観測されたm/z: 1434.7 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1196.2 ([M+6H] <sup>6+</sup> )
BCY13048	MW: 7102.28, 観測されたm/z: 1776.4([M+4H] <sup>4+</sup> ), 1421.3([M+3H] <sup>3+</sup> )
BCY13050	MW: 7453.66, 観測されたm/z: 1864.2([M+4H] <sup>4+</sup> )
BCY13053	MW: 7185.38, 観測されたm/z: 1796.7 ([M+4H] <sup>4+</sup> )
BCY13341	MW: 6929.13, 観測されたm/z: 1386.5([M+5H] <sup>5+</sup> ) 及び 1155.8([M+6H] <sup>6+</sup> )
BCY13343	MW: 6846.04, 観測されたm/z: 1370.3 ([M+5H] <sup>5+</sup> )
BCY14414	MW: 7503.74, 観測されたm/z: 1251.5 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1072.9 ([M+7H] <sup>7+</sup> )
BCY14417	MW: 8329.74, 観測されたm/z: 1389.6 ([M+6H] <sup>6+</sup> ), 1191.9 ([M+7H] <sup>7+</sup> )
BCY14418	MW: 8020.19, 観測されたm/z: 1337.2 ([M+6H] <sup>6+</sup> )
BCY15217	MW: 7362.5, 観測されたm/z: 1473.5 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1228.2 ([M+6H] <sup>6+</sup> ), 1052.8 ([M+7H] <sup>7+</sup> )
BCY15218	MW: 7404.6, 観測されたm/z: 1234.8 ([M+6H] <sup>6+</sup> )
BCY12967	MW: 7077.7 観測されたm/z: 1416.3 ([M+5H] <sup>5+</sup> ), 1180.4 ([M+6H] <sup>6+</sup> ), 1011.9 ([M+7H] <sup>7+</sup> )

10

20

30

40

## 【0252】

(生物学的データ)

## (1.腫瘍細胞とのCD137レポーターアッセイ共培養)

1%FBSをRPMI-1640(PromegaキットCS196005の構成要素)に添加することにより、R1培地と呼ばれる培養培地を調製する。R1中の試験品の連続希釈物を滅菌96ウェルプレート中に調製する。ウェル当たり25μLの試験品又はR1(バックグラウンド対照として)を白色の細胞培養プレート中の指定のウェルに添加する。腫瘍細胞<sup>\*</sup>を回収し、400,000細胞/mLの濃度でR1培地に再懸濁させる。25(25)μL/ウェルの腫瘍細胞を白色の細胞培養プレートに添加する。Jurkat細胞(PromegaキットCS196005、0.5mL)を水浴中で解凍し、その後、5mLの予め温めたR1培地に添加する。その後、25(25)μL/ウェルのJurkat細胞を白色の細胞培養プレートに添加する。細胞及び試験品を37℃、5%CO<sub>2</sub>で6時間インキュベートする。6時間の最後に、75μL/ウェルのBio-Glo(商標)試薬(Promega)を添加し、10分間インキュベートした後、プレートリーダー(Clariostar, BMG)で発光を読み取る。細胞のみ(Jurkat細胞+共培養で使用した細胞株)と比べた変化倍率を計算し、GraphPad Prismでlog(アゴニスト)対応答としてプロットして、EC<sub>50</sub>(nM)及びバックグラウンドに対する誘導倍率(Max)を決定する。

## 【0253】

共培養で使用される腫瘍細胞型は、ネクチン-4を発現することが示されているNCI-H292及びHT1376である。EphA2についての共培養で使用される腫瘍細胞型は、A549、PC3、及びHT29である。PD-L1についての共培養で使用される腫瘍細胞型は、RKOである。

## 【0254】

図1Aに示されているデータは、ネクチン-4/CD137ヘテロタンデム(BCY11863)がCD137レポーターアッセイにおいて強いCD137活性化を誘導し、この活性化が該ヘテロタンデムとCD137との結合に依存していることを示している。CD137二環式ペプチドが結合を無効にする全てのD-アミノ酸から構成される分子であるBCY11617は、CD137アゴニ

50

ズムを誘導しない。

【0255】

ネクチン-4発現腫瘍細胞株との共培養下でのCD137レポーターアッセイにおいてヘテロタンデム二環式ペプチド複合体によって導かれるEC<sub>50</sub>(nM)及び誘導倍率のまとめが下の表1Aで報告されている:

表1A: CD137レポーターアッセイにおいてネクチン-4/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体によって導かれる誘導倍率

【表13】

複合体 ID	腫瘍標的	共培養で使用された細胞株	EC <sub>50</sub> (nM)	バックグラウンドに対する誘導倍率
BCY11863	ネクチン-4	NCI-H292	0.168 ± 0.049	81±29

【0256】

ネクチン-4発現腫瘍細胞株との共培養下でのCD137レポーターアッセイにおいてヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY11863及びクローニング類似体によって導かれるEC<sub>50</sub>(nM)のまとめが下の表1Bで報告され、図1Bで視覚化されている。このデータは、様々なネクチン-4発現を有する細胞株との共培養下でCD137アゴニズムを誘導するBCY11863の能力を示している。

表1B: CD137レポーターアッセイにおいてネクチン-4/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体によって導かれるバックグラウンドに対する誘導倍率のEC<sub>50</sub>(nM)

【表14】

複合体 ID	腫瘍細胞株の種	共培養で使用された細胞株	算術平均 EC <sub>50</sub> (nM)
BCY11863	マウス	CT26#7	0.14 ± 0.07
BCY11863	マウス	MC38#13	0.31 ± 0.26
BCY11863	ヒト	NCI-H292	0.28 ± 0.20
BCY11863	ヒト	HT1376	0.52 ± 0.30
BCY11863	ヒト	NCI-H322	0.33 ± 0.21
BCY11863	ヒト	T47D	0.42 ± 0.24
BCY11863	ヒト	MDA-MB-468	0.23 ± 0.01
BCY13582	ヒト	HT1376	0.58 ± 0.27
BCY13582	ヒト	MDA-MB-468	0.34 ± 0.02
BCY13583	ヒト	HT1376	1.7 ± 0.9
BCY13583	ヒト	MDA-MB-468	0.84 ± 0.07

【0257】

NCI-H292細胞を用いるCD137レポーター共培養アッセイにおいてネクチン-4/CD137ヘテロタンデムペプチドによって導かれる誘導倍率のまとめが下の表2に示されている。全ての化合物を1.1 ± 0.5nMの平均EC<sub>50</sub>及びバックグラウンドに対する28 ± 11倍のEmaxを有するプレート対照BCY10000と比較する。

表2: CD137レポーターアッセイにおいてネクチン-4/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体によって導かれる誘導倍率

10

20

30

40

50

【表 15】

複合体 ID	同じプレート上のBCY10000に対するEC <sub>50</sub> の向上倍率	同じプレート上のBCY10000に対するEmaxの向上倍率
BCY12484	5.46	1.86
BCY11385	9.35	1.28
BCY11863	4.56	2.16
BCY11864	1.54	2.43
BCY12485	3.82	2.18
BCY12486	0.25	1.73
BCY12586	1.9	3.79
BCY12587	4.2	2.90
BCY12588	0.72	3.20
BCY12590	5.5	2.73
BCY11021	9.63	4.42

【0258】

HT1376腫瘍細胞を用いるCD137レポーター共培養アッセイにおいてネクチン-4/CD137ヘテロタンデムペプチドによって導かれる誘導倍率のまとめが下の表2Aに示され、EC<sub>50</sub>(nM)及びEmax(バックグラウンドに対する誘導倍率)が報告されている。ほとんどのネクチン-4/CD137ヘテロタンデムは、1nM未満のEC<sub>50</sub>を有する。

表2A:ネクチン-4レポーターアッセイのEC<sub>50</sub>及びEmax

【表 16】

複合体 ID	ネクチン-4 細胞株	複製物の数 (n)	EC <sub>50</sub> (nM)	SD EC <sub>50</sub> (nM)	Emax	SD Emax
BCY10918	HT1376	6	0.16	0.08	63	12
BCY10919	HT1376	6	0.19	0.12	62	11
BCY11022	HT1376	10	0.20	0.12	66	28
BCY11027	HT1376	4	0.18	0.08	45	13
BCY12487	HT1376	3	13	6	12	6
BCY12490	HT1376	3	0.23	0.07	70	16
BCY12589	HT1376	6	0.44	0.12	79	6
BCY12760	HT1376	6	1.8	0.4	76	12
BCY12761	HT1376	6	0.37	0.08	76	10
BCY13582	HT1376	3	0.58	0.27	57	16
BCY13583	HT1376	3	1.7	0.9	63	17

【0259】

図16に示されているデータは、EphA2/CD137ヘテロタンデムBCY13272が、EphA2発現細胞株(PC3、A549、及びHT29)の存在下でのCD137レポーターアッセイにおいて強いCD137活性化を誘導するが、非結合対照分子(BCY13626)はCD137の活性化を示さないことを示している。

【0260】

PC3細胞を用いるCD137レポーター共培養アッセイにおいてEphA2/CD137ヘテロタンデムペプチドによって導かれる誘導倍率のまとめが下の表3Aに示されている。全ての化合物を0.54nMの平均EC<sub>50</sub>及びバックグラウンドに対する42倍のEmaxを有するプレート対照BCY9173と比較する。

表3A: CD137レポーターアッセイにおいてEphA2/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体によって導かれる誘導倍率

【表17】

複合体 ID	EphA2 細胞株	BCY9173に対する向上倍率、EC <sub>50</sub> (nM)	Emaxに対する向上倍率
BCY12723	PC3	2.2	1.8
BCY12724	PC3	1.1	1.9
BCY12725	PC3	0.1	0.7
BCY12726	PC3	0.2	0.9
BCY12729	PC3	0.5	1.6
BCY12731	PC3	0.2	1.5
BCY12732	PC3	0.5	0.4
BCY12491	PC3	2.3	1.8
BCY13279	PC3	4.74	2.08
BCY13283	PC3	1.80	2.06
BCY13287	PC3	3.26	1.98
BCY14049	PC3	2.65	1.82
BCY14050	PC3	2.05	1.91
BCY14051	PC3	3.15	1.88
BCY14052	PC3	4.16	1.89
BCY14053	PC3	4.83	1.84
BCY14054	PC3	2.44	1.88
BCY14055	PC3	3.28	1.87
BCY14056	PC3	4.02	1.80
BCY14334	PC3	7.21	1.62
BCY14335	PC3	7.14	0.94

【0261】

EphA2発現腫瘍細胞株との共培養下でのCD137レポーターアッセイにおいてBCY1327 2によって導かれるEC<sub>50</sub>(nM)及び誘導倍率のまとめが下の表3Bに報告されている:

表3B: CD137レポーターアッセイにおけるEphA2/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体の活性

10

20

30

40

50

【表18】

複合体 ID	EphA2 細胞株	EC50 (nM)	Emax	幾何平均 EC50/ 細胞株
BCY13272	PC-3	0.245	44.5	0.117
		0.0805	44.2	
		0.0898	53	
	A549	0.1468	25.7	0.127
		0.107	23.6	
		0.132	30.2	
	HT-29	0.567	36.5	0.279
		0.187	26	
		0.205	36.4	

【0262】

PC3腫瘍細胞を用いるCD137レポーター共培養アッセイにおいてEphA2/CD137ヘテロタンデムペプチドによって導かれる誘導倍率のまとめが下の表3Cに示され、EC50(nM)及びEmax(バックグラウンドに対する誘導倍率)が報告されている。ほとんどのEphA2/CD137ヘテロタンデムは、1nM未満のEC50を有する。

表3C: EphA2レポーターアッセイのEC50及びEmax

10

20

30

40

50

【表 19】

複合体 ID	EphA2-4 細胞株	反復試行の数(n)	EC50 (nM)	SD EC50 (nM)	Emax	SD Emax
BCY12730	PC3	4	0.25	0.31	61.73	25.80
BCY12973	PC3	3	0.16	0.01	48.57	6.24
BCY12974	PC3	3	0.18	0.05	59.60	21.23
BCY12975	PC3	3	0.16	0.13	68.80	18.37
BCY12976	PC3	3	0.18	0.16	73.20	23.93
BCY12977	PC3	3	0.08	0.07	67.17	20.03
BCY12978	PC3	3	0.05	0.04	78.10	11.62
BCY12979	PC3	2	0.08		71.60	
BCY13042	PC3	3	0.08	0.03	58.27	12.43
BCY13043	PC3	4	0.11	0.02	52.70	6.04
BCY13044	PC3	3	0.21	0.06	49.53	16.53
BCY13045	PC3	3	0.23	0.09	49.87	15.25
BCY13046	PC3	2	0.17		57.60	
BCY13047	PC3	4	0.07	0.02	46.43	5.56
BCY13048	PC3	2	0.09		48.35	
BCY13049	PC3	3	0.30	0.19	46.03	14.81
BCY13050	PC3	5	0.09	0.01	42.46	3.84
BCY13051	PC3	2	0.21		37.05	
BCY13052	PC3	2	0.21		32.90	
BCY13053	PC3	3	0.10	0.04	40.33	8.56
BCY13054	PC3	3	0.07	0.03	36.53	6.01
BCY13138	PC3	1	0.17		32.60	
BCY13139	PC3	2	0.16		43.75	
BCY13140	PC3	1	0.12		46.70	
BCY13270	PC3	4	0.10	0.04	42.50	3.45
BCY13271	PC3	3	0.09	0.03	44.20	4.61
BCY13273	PC3	3	0.13	0.08	51.27	5.37

10

20

30

40

50

BCY13274	PC3	3	0.19	0.10	47.43	7.50
BCY13275	PC3	2	0.08		47.50	
BCY13276	PC3	2	0.10		50.55	
BCY13277	PC3	2	0.08		51.10	
BCY13278	PC3	2	0.14		37.90	
BCY13280	PC3	3	0.19	0.03	38.13	8.29
BCY13281	PC3	3	0.17	0.06	35.60	5.89
BCY13282	PC3	3	0.22	0.05	40.03	11.87
BCY13284	PC3	3	0.25	0.12	34.73	6.18
BCY13285	PC3	3	0.26	0.10	36.53	8.56
BCY13286	PC3	3	0.11	0.02	34.13	12.00
BCY13288	PC3	4	0.09	0.02	43.28	5.69
BCY13289	PC3	4	0.08	0.04	45.78	5.15
BCY13341	PC3	2	0.19		49.15	
BCY13343	PC3	2	0.11		44.00	

10

20

## 【0263】

RKO細胞を用いるCD137レポーター共培養アッセイにおいてPD-L1/CD137ヘテロタンデムペプチドによって導かれる誘導倍率のまとめが下の表4に示されている。

表4: CD137レポーターアッセイにおいてPD-L1/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体によって導かれる誘導倍率

## 【表20】

複合体 ID	EC <sub>50</sub> (nM)	バックグラウンドに対する誘導倍率
BCY11780	1.9	13

30

## 【0264】

## (2.ヒトPBMC-腫瘍細胞共培養(サイトカイン刺激アッセイ)アッセイ)

腫瘍細胞株を供給元によって推奨されるプロトコルに従って培養した。健康なヒトドナーユ来の凍結PBMCを解凍し、室温のPBS中で1回洗浄し、その後、R10培地に再懸濁させた。100 μlのPBMC(1,000,000 PBMC/ml)及び100 μlの腫瘍細胞(100,000腫瘍細胞/ml)(エフェクター:標的細胞比(E:T) 10:1)を共培養アッセイ用の96ウェル平底プレートの各々のウェルにプレーティングした。100ng/mlの可溶性抗CD3 mAb(クローンOKT3)を0日目に培養物に添加して、ヒトPBMCを刺激した。試験物、対照化合物、又はビヒクル対照をR10培地に希釈し、50 μLをそれぞれのウェルに添加して、ウェル当たりの最終容量を250 μLにした。プレートを通気性のあるフィルムで覆い、5%CO<sub>2</sub>を含む37 °Cの加湿チャンバー中で3日間インキュベートした。刺激から48時間後に上清を回収し、ヒトIL-2及びIFN-γをLuminexにより検出した。簡潔に述べると、標準品及び試料を黒色の96ウェルプレートに添加した。微粒子カクテル(Luminexキット、R&D Systems中に提供されている)を添加し、室温で2時間振盪させた。磁気ホルダーを用いて、プレートを3回洗浄した。その後、ビオチンカクテルをプレートに添加し、RTで1時間振盪させた。磁気ホルダーを用いて、プレートを3回洗浄した。ストレプトアビジンカクテルをプレートに添加し、RTで30分間振盪させた。磁気ホルダーを用いて、プレートを3回洗浄し、100 μLの

40

50

洗浄バッファーに再懸濁させ、RTで2分間振盪させ、Luminex 2000を用いて読み取った。生データを内蔵Luminexソフトウェアを用いて解析して、標準曲線を作成し、タンパク質濃度を内挿し、他の全てのデータ解析及びグラフ作成をExcel及びPrismソフトウェアを用いて行った。データは、実験的二連反復で検討した3つの独立したドナーPBMCを用いた1つの試験を表している。

【0265】

図2A及び2Bに示されているデータは、ネクチン-4/CD137ヘテロタンデム(BCY11863)がPBMC-4T1共培養アッセイにおいて強いIL-2及びIFN- $\gamma$ サイトカイン分泌を誘導することを示している。BCY11617は、ネクチン-4に結合するが、CD137に結合しない陰性対照である。

10

【0266】

ヒトPBMC共培養(サイトカイン放出)アッセイにおいて選択されたネクチン-4/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体によって導かれるEC<sub>50</sub>(nM)及び最大IFN- $\gamma$ サイトカイン分泌(pg/ml)のまとめが下の表4Aで報告され、図2Cで視覚化されている。これは、ネクチン-4を発現するいくつかの異なる腫瘍細胞株の存在下でサイトカイン分泌を誘導するBCY11863の能力を示している。

表4A:ヒトPBMC-4T1共培養(サイトカイン放出)アッセイにおいて選択されたネクチン-4/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体によって誘導されるIFN- $\gamma$ サイトカイン分泌のEC<sub>50</sub>

【表21】

20

細胞株	IL-2 (nM)	IFNy (nM)	ドナーの数
MC38 # 13 (マウス)	0.25 ± 0.08	0.17 ± 0.11	4
4T1-D02 (マウス)	0.16 ± 0.22	0.04 ± 0.04	4
HT1376 (ヒト)	0.39 ± 0.29	0.23 ± 0.15	5
T-47D (ヒト)	0.20 ± 0.07	0.08 ± 0.06	3
H322 (ヒト)	0.84 ± 0.15	0.85 ± 0.66	3
4T1- 親(ネクチン 4-)	最大100 nMまで誘導なし		

30

【0267】

(3. SDラットにおけるCD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体の薬物動態)

雄SDラットに、25mMヒスチジンHCl、10%スクロースpH 7中に製剤化された各々のヘテロタンデム二環ペプチド複合体をIVボーラス又はIV注入(15分間)によって投与した。連続採血(約80  $\mu$ L血液/時点)を各々の時点で顎下又は伏在静脈から行った。血液試料を全て、2  $\mu$ L K2-EDTA(0.5M)を抗凝固薬として含有する予冷マイクロ遠心分離チューブにすぐに移し、濡れた氷の上に置いた。血液試料を、約4000gでの遠心分離によって、血漿用にすぐに処理した。内部標準を含む沈殿剤を血漿にすぐに添加し、十分に混合し、12,000rpm、40°Cで10分間遠心分離した。上清を予めラベルが貼られたポリプロピレンマイクロ遠心分離チューブに移し、その後、ドライアイス上で急速凍結させた。試料を必要に応じて分析まで70°C以下で保存した。7.5  $\mu$ Lの上清試料を、ポジティブイオンモードでOrbitrap Q Exactiveを用いるLC-MS/MS分析用にそのまま注入して、分析物の濃度を決定した。血漿濃度対時間データを、Phoenix WinNonlin 6.3ソフトウェアプログラムを用いるノンコンパートメントアプローチによって分析した。C<sub>0</sub>、Cl、V<sub>dss</sub>、T<sub>1/2</sub>、AUC(0-last)、AUC(0-inf)、MRT(0-last)、MRT(0-inf)、及び血漿濃度対時間プロファ

40

50

イルのグラフを報告した。実験の薬物動態パラメータは、表6Aに示されている通りである:  
表6A: SDラットにおける薬物動態パラメータ

【表22】

化合物	投与経路	T1/2(時間)	Vdss (L/kg)	Clp (ml/分/kg)
BCY12491	IVボーラス	1.3	1.6	20
BCY12730	IV注入	2.0	2.6	18
BCY12724	IV注入	1.5	1.2	13
BCY13050	IV注入	3.3	1.4	11
BCY13048	IV注入	3.8	1.2	11
BCY13272	IV注入	2.5	1.0	7.4

10

【0268】

特に、BCY11863の薬物動態パラメータは、表6Bに示されている通りである:  
表6B: SDラットにおける薬物動態パラメータ

【表23】

20

化合物	用量 (mg/kg)	投与経路	T1/2(時間)	Vdss (L/kg)	Clp (ml/分/kg)	% F
BCY11863	1.9	IVボーラス	4.1	1.6	7.7	-
	3.2	IV注入 (15分)	3.1	1.3	9.3	-
	6.3	SC	2.5	-	-	95%

30

【0269】

上の表6B及び図5のデータは、BCY11863が血漿容積よりも大きい分布容積を有する低クリアランス分子であることを示している。さらに、BCY11863のSC投与から得られるバイオアベイラビリティは、ラットで高い。

表6C: 100mg/kg用量がIV投与によって投与された後のSDラットPK試験におけるBCY11863及び潜在的代謝産物の薬物動態パラメータ

【表24】

40

分析物	Cmax (ng/mL)	AUC (ng・時間/mL)	T1/2(時間)	Vdss (L/kg)	Clp (ml/分/kg)
BCY11863	279540	129863	5.4	2.3	13
BCY15155	2854	1296	3.1	-	-
BCY14602	-	-	-	-	-

【0270】

表6C及び図25のデータは、SDラットにBCY11863をIV投与したとき、BCY11863の1%未満がBCY15155に代謝されることを示している。BCY14602への有意な変換は、試験の最初の24時間で認められない。

【0271】

(4.カニクイザルにおけるCD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体の薬物動態)

50

処置歴のあるカニクイザルの橈側皮静脈に、静脈内注入(15又は30分間)を介して、25 mMヒスチジンHCl、10%スクロースpH 7中に製剤化された1mg/kgの各々のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体を投与した。連続採血(約1.2mL血液/時点)を、各々の時点で、拘束された非鎮静動物の末梢血管から行って、濡れた氷の上のカリウム(K2) EDTA<sup>\*</sup>2H<sub>2</sub>O (0.85~1.15mg)を含有する市販のチューブに入れ、血漿用に処理した。試料を回収後すぐに遠心分離した(3,000×g、2~8 で10分間)。0.1mLの血漿をラベルが貼られたポリプロピレンマイクロ遠心分離チューブに移した。内部標準である100ng/mLラベタロール及び100ng/mLデキサメタゾン及び100ng/mLトルブタミド及び100ng/mLベラパミル及び100ng/mLグリブリド及び100ng/mLセレコキシブをMeOH中に含む5倍の沈殿剤を血漿にすぐに添加し、十分に混合し、12,000rpmで、2~8 で10分間遠心分離した。上清の試料を予めラベルが貼られたポリプロピレンマイクロ遠心分離チューブに移し、ドライアイス上で凍結させた。試料をLC-MS/MS分析まで-60 以下で保存した。40 μLの校正標準試料、品質管理試料、単一プランク試料、及び二重プランク試料のアリコートを1.5mLチューブに添加した。各々の試料(二重プランクを除く)をそれぞれ200 μL IS1でクエンチし(二重プランク試料は0.5%tritonX-100を含む200 μL MeOHでクエンチした)、その後、混合物をボルテクサーで十分に(少なくとも15秒間)ボルテックス混合し、12000g、4 で15分間遠心分離した。10 μLの上清を、ポジティブイオンモードでOrbitrap Q Exactiveを用いるLC-MS/MS分析用に注入して、分析物の濃度を決定した。血漿濃度対時間データを、Phoenix WinNonlin 6.3ソフトウェアプログラムを用いるノンコンパートメントアプローチによって分析した。C<sub>0</sub>、Cl、V<sub>dss</sub>、T<sup>1/2</sup>、AUC(0-last)、AUC(0-inf)、MRT(0-last)、MRT(0-inf)、及び血漿濃度対時間プロファイルのグラフを報告した。3つの二重特異性化合物の薬物動態パラメータは、表7に示されている通りである。

表7:カニクイザルにおける薬物動態パラメータ

【表25】

化合物	経路	T <sub>1/2</sub> (時間)	Cl <sub>p</sub> (mL/分/kg)	V <sub>dss</sub> (L/kg)
BCY11863 (0.93 mg/kg)	IV注入 (30分)	5.3	3.3	0.62
BCY11863 (0.97 mg/kg)	IV注入 (15分)	4.5	4.8	0.91
BCY11863 (9.4 mg/kg)	IV注入 (15分)	8.9	3.9	1.1
BCY12491	IV注入 (15分)	3.2	3.0	0.36
BCY13272	IV注入 (15分)	8.9	4.1	0.82

【0272】

図3は、SDラット(n=3)での2mg/kg IV投与及びカニクイザル(n=2)での1mg/kg IV注入から得られたBCY11863の血漿濃度対時間曲線を示している。BCY11863は、ラットにおいて1.6L/kgの定常状態分布容積(V<sub>dss</sub>)及び結果として4.1時間の終末相半減期が得られる7.7mL/分/kgのクリアランスを有する。BCY11863は、カニクイザルにおいて0.62L/kgの定常状態分布容積(V<sub>dss</sub>)及び結果として5.3時間の終末相半減期が得られる3.3mL/分/kgのクリアランスを有する。

10

20

30

40

50

## 【0273】

図12は、カニクイザル(n=2)における15分間の1mg/kg IV注入から得られたBCY12491の血漿濃度対時間曲線を示している。

## 【0274】

図17は、SDラット(n=3)における3.6mg/kg IV注入(15分)及びカニクイザル(n=3)における9.2mg/kg IV注入(15分)から得られたBCY13272の血漿濃度対時間曲線を示している。BCY13272は、ラットにおいて1.0L/kgの定常状態分布容積(Vdss)及び結果として2.9時間の終末相半減期が得られる7.5mL/分/kgのクリアランスを有する。BCY13272は、カニクイザルにおいて0.82L/kgの定常状態分布容積(Vdss)及び結果として8.9時間の終末相半減期が得られる4.1mL/分/kgのクリアランスを有する。

10

## 【0275】

(5. CD1マウスにおけるCD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体の薬物動態)

6匹の雄CD-1マウスに、25mMヒスチジンHCl、10%スクロースpH 7中に製剤化された15mg/kgの各々のヘテロタンデム二環ペプチド複合体を腹腔内又は静脈内投与によって投与した。連続採血(約80μL血液/時点)を各々の時点で頸下又は伏在静脈から行った。血液試料を全て、2μL K2-EDTA(0.5M)を抗凝固薬として含有する予冷マイクロ遠心分離チューブにすぐに移し、濡れた氷の上に置いた。血液試料を、約4、3000gでの遠心分離によって、血漿用にすぐに処理した。内部標準を含む沈殿剤を血漿にすぐに添加し、十分に混合し、12,000rpm、4で10分間遠心分離した。上清を予めラベルが貼られたポリプロピレンマイクロ遠心分離チューブに移し、その後、ドライアイス上で急速凍結させた。試料を必要に応じて分析まで70以下で保存した。7.5μLの上清試料を、ポジティブイオンモードでOrbitrap Q Exactiveを用いるLC-MS/MS分析用にそのまま注入して、分析物の濃度を決定した。血漿濃度対時間データを、Phoenix WinNonlin 6.3ソフトウェアプログラムを用いるノンコンパートメントアプローチによって分析した。C0、Cl、Vdss、T<sup>1/2</sup>、AUC(0-last)、AUC(0-inf)、MRT(0-last)、MRT(0-inf)、及び血漿濃度対時間プロファイルのグラフを報告した。

20

## 【0276】

図11は、CD1マウス(n=3)における15mg/kg IP投与から得られたBCY11863及びBCY12491の血漿濃度対時間曲線並びにBCY11863及びBCY12491の終末相血漿半減期を示している。

30

表7A: CD-1マウスにおける薬物動態パラメータ

## 【表26】

化合物	用量 (mg/kg)	投与経路	T1/2(時間)	Vdss (L/kg)	Cl <sub>p</sub> (ml/分/kg)	% F
BCY11863	5.6	IVボーラス	2.6	1.6	9.7	
	0.96	IVボーラス	1.7	2.9	21	
	12	IVボーラス	2.6	2.5	17	
	32	IVボーラス	2.4	2.1	16	
	15.5	IP	2.5	-	-	100

40

## 【0277】

上の図11及び表7Aのデータは、BCY11863をマウスにおけるIVボーラス及びIPとして投与することができることを示している。BCY11863のIP投与から得られたバイオアベイラビリティは、マウスで高い。IV試験から得られたPKパラメータは、これが血漿容積よりも大きい分布容積を有する低クリアランス分子であることを示している。

## 【0278】

図17は、CD1マウス(n=3)における5.5mg/kg IV投与から得られたBCY13272の血漿濃度対時間曲線を示しており；BCY13272の分布容積(Vdss)は1.1L/kgであり、クリアラ

50

ンスは、結果として2.9時間の終末相半減期が得られる7.5mL/分/kgである。

【0279】

(6.同系ネクチン-4過剰発現MC38腫瘍モデル(MC38#13)におけるBCY11863の抗腫瘍活性)

6~8週齢のC57BL/6J-hCD137雌マウスの脇腹に、 $1 \times 10^6$ 個の同系ネクチン-4過剰発現MC38細胞(MC38#13)を接種した。腫瘍が平均 $72\text{mm}^3$ の大きさに達したとき、ビヒクル又はBCY11863(腹腔内投与)を受容するように、マウスを無作為に割り付けた。BCY11863を、毎日(QD)又は3日毎に(Q3D)、1mg/kg又は10mg/kgのいずれかで投与した(n=6マウス/処置コホート)。QD投与されたマウスは、16用量のBCY11863を受容し、Q3D投与されたマウスは、10用量のBCY11863を受容した。腫瘍増殖をキャリパー測定により処置開始後69日目までモニタリングした。この実験の結果は、図4に見ることができる。この実験では、腫瘍増殖の有意な低下( $p < 0.05$ 、ダネットの多重比較検定を伴う2元配置ANOVA)が7日目までに2つの処置コホートで観察され、14日目までに、全ての処置群がビヒクル群と有意に異なっていた。48日目までに、24匹のBCY11863処置動物のうちの22匹が処置に完全に応答し、触診可能な腫瘍は残存していなかった。

10

【0280】

IP注射(2.5時間)後のマウスにおけるBCY11863の循環血漿半減期に基づくと、血漿トラフレベルは、両方のBCY11863用量(1及び10mg/kg)並びに投与間隔(QD及びQ3D)の後で0に近く、したがって、間欠的投与によるBCY11863の決して連続的とは言えない血漿曝露が永続的な完全応答をもたらす顕著な抗腫瘍活性をもたらすのに十分であることを示している。

20

【0281】

(7.BCY11863処置はネクチン-4過剰発現MC38腫瘍モデルに対する免疫原性記憶をもたらす)

69日目に、BCY11863処置に完全に応答した5匹の動物に、 $1 \times 10^6$ 個のMC38#13細胞を再接種した。5匹の未処置C57BL/6J-hCD137雌マウスのコホートに、 $1 \times 10^6$ 個のMC38#13細胞を対照として接種した。この実験の結果は、図5に見ることができる。この実験では、接種を受けた5匹の未処置C57BL/6J-hCD137雌マウスは全て、接種後13日目までに腫瘍を増殖させたのに対し、接種を受けた完全レスポンダーマウスはいずれも腫瘍を発生させなかった。これは、BCY11863処置の結果として完全な抗腫瘍応答を達成した動物が免疫原性記憶を発達させたことを示している。

30

【0282】

(8.BCY11863は同系ネクチン-4過剰発現CT26腫瘍モデル(CT26#7)において抗腫瘍活性を示す)

6~8週齢のBALB/c-hCD137雌マウスの脇腹に、 $3 \times 10^5$ 個の同系ネクチン-4過剰発現CT26細胞(CT26#7)を接種した。腫瘍が平均 $70\text{mm}^3$ の大きさに達したとき、ビヒクル又は5mg/kg BCY11863を3日毎に(合計6用量)腹腔内に受容するように、マウスを無作為に割り付けた。腫瘍増殖をキャリパー測定により処置開始後14日目までモニタリングした。この実験の結果は、図6に見ることができる。この実験では、BCY11863処置は、7日目以降、腫瘍増殖を有意に( $p < 0.0001$ 、スチューデントのt-検定)軽減した。

40

【0283】

IP注射(2.5時間)時のマウスにおけるBCY11863の循環血漿半減期に基づくと、血漿曝露は、投与期間の全体を通じて連続的ではなく、BCY11863の決して連続的とは言えない血漿曝露が顕著な抗腫瘍活性をもたらすのに十分であることを示している。

【0284】

(9.全T細胞及びCD8+ T細胞はBCY11863の最後の(6回目の)Q3D投与から1時間後にCT26#7腫瘍組織を増加させる)

最後のビヒクル又はBCY11863投与から1時間後、CD26#7担持マウスを殺し、腫瘍を摘出し、単一細胞懸濁液用に処理し、全T細胞(CD45+CD3+)、CD8+ T細胞(CD45+CD3+CD8+)、CD4+ T細胞(CD45+CD3+CD4+)、及び調節性T細胞(Treg; CD45+CD3+CD25+CD137+)を計数した。

50

4+Foxp3+)のフローサイトメトリー解析用に染色した。この実験の結果は、図7に見ることができる。この実験では、BCY11863処置が全T細胞の有意な増加( $p < 0.0001$ 、スチューデントのt-検定)及びCD8+ T細胞の有意な増加( $p < 0.0001$ 、スチューデントのt-検定)、並びにCD8+ T細胞/Treg比( $p < 0.05$ 、スチューデントのt-検定)の有意な増加をもたらしたことが分かる。

#### 【0285】

これは、BCY11863による処置が、間欠的投与後、腫瘍組織で局所的にT細胞のレベルの増加をもたらすことができる事を示している。

#### 【0286】

(10. 5mg/kgのBCY11863の単一静脈内(iv)投与後のCT26#7同系腫瘍担持動物の血漿及び腫瘍組織におけるBCY11863の薬物動態プロファイル) 10

6~8週齢のBALB/c雌マウスの脇腹に、 $3 \times 10^5$ 個の同系ネクチン-4過剰発現CT26細胞(CT26#7)を接種した。腫瘍が平均約 $400\text{mm}^3$ の大きさに達したとき、ビヒクル又は5mg/kg BCY11863の単一静脈内投与を受容するように、マウスを無作為に割り付けた。マウスのコホート( $n=3$ /時点)を、0.25、0.5、1、2、4、8、及び24時間の時点で殺し、血漿を採取し、腫瘍組織をBCY11863について解析した。腫瘍BCY11863含有量解析のために、腫瘍組織を10容量(w:v)の均質化溶液(MeOH/15mM PBS(1:2, v:v))で均質化することにより、腫瘍ホモジネートを調製した。40 $\mu\text{L}$ の試料を200 $\mu\text{L}$  IS1でクエンチし、混合物を800rpmで10分間ボルテックス処理することにより混合し、3220g、4で15分間遠心分離した。上清を別の清潔な96ウェルプレートに移し、3220g、4で5分間遠心分離し、その後、10.0 $\mu\text{L}$ の上清を、ポジティブイオンモードでOrbitrap Q Exactiveを用いるLC-MS/MS分析用に注入して、分析物の濃度を決定した。血漿BCY11863含有量解析のために、血液試料をK2-EDTAチューブに回収し、約4、3000gでの遠心分離によって、血漿へとすぐに処理した。40 $\mu\text{L}$ の血漿試料を200 $\mu\text{L}$  IS1でクエンチし、800rpmで10分間ボルテックス処理することにより混合物を混合し、3220g、4で15分間遠心分離した。上清を別の清潔な96ウェルプレートに移し、3220g、4で5分間遠心分離し、その後、10.0 $\mu\text{L}$ の上清を、ポジティブイオンモードでOrbitrap Q Exactiveを用いるLC-MS/MS分析用に注入して、分析物の濃度を決定した。 20

#### 【0287】

この実験の結果は、図8に見ることができる。この実験では、BCY11863の血漿 $T_{1/2}$ (1.65時間)と腫瘍 $T_{1/2}$ (13.4時間)の違いによって示されるように、血漿BCY11863が循環から排除された後、BCY11863が腫瘍組織に保持されたことが分かる。 30

#### 【0288】

(11.同系MC38腫瘍モデルにおけるBCY12491の抗腫瘍活性)

6~8週齢のC57BL/6J-hCD137雌マウスの脇腹に、 $1 \times 10^6$ 個の同系MC38細胞を接種した。腫瘍が平均 $76\text{mm}^3$ の大きさに達したとき、ビヒクル又はBCY12491(腹腔内投与)を受容するように、マウスを無作為に割り付けた。BCY12491を、毎日(QD)又は3日毎に(Q3D)、5mg/kg又は15mg/kgのいずれかで投与した( $n=6$ マウス/処置コホート)。QD投与されたマウスは、22用量のBCY12491を受容し、Q3D投与されたマウスは、8用量のBCY12491を受容した。腫瘍増殖をキャリパー測定により処置開始後73日目までモニタリングした。この実験の結果は、図9に見ることができる。この実験では、腫瘍増殖に対するBCY12491の効果が投与期間の最初の2週間で明らかになり、腫瘍増殖が低下し、処置された腫瘍の多くの体積の低下がもたらされることが分かる。41日目までに、24匹のBCY12491処置動物のうちの15匹が処置に完全に応答し、触診可能な腫瘍は残存していなかった。 40

#### 【0289】

IP注射(2.5時間)後のマウスにおける循環血漿半減期BCY12491に基づくと、血漿トラフレベルは、両方のBCY12491用量(5及び15mg/kg)並びに投与間隔(QD及びQ3D)の後で0に近く、したがって、間欠的投与によるBCY12491の決して連続的とは言えない血漿曝露が永続的な完全応答をもたらす顕著な抗腫瘍活性をもたらすのに十分であることを示

10

20

30

40

50

している。

【0290】

(12. EphA2/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY12491、BCY13272、BCY12723、BCY13050、BCY13048、及びBCY13047はMC38共培養アッセイにおいてIFN- サイトカイン分泌を誘導する)

マウス乳腺腫瘍細胞株MC38を、10%熱非働化胎仔ウシ血清(FBS)、1×ペニシリン/ストレプトマイシン、10mM HEPES、及び2mM L-グルタミンが補充されたダルベッコの改変イーグル培地(R10培地と呼ばれる)中で培養した。健康なヒトドナー由来の凍結PBMCを解凍し、ベンゾナーゼを含む室温のPBS中で1回洗浄し、その後、10%熱非働化胎仔ウシ血清(FBS)、1×ペニシリン/ストレプトマイシン、10mM HEPES、及び2mM L-グルタミンが補充されたRPMI(本明細書において、R10培地と呼ばれる)に再懸濁させた。100  $\mu$ lのPBMC(1,000,000 PBMC/ml)及び100  $\mu$ lの腫瘍細胞(100,000腫瘍細胞/ml)(エフェクター:標的細胞比(E:T) 10:1)を共培養アッセイ用の96ウェル平底プレートの各々のウェルにプレーティングした。100ng/mlの可溶性抗CD3 mAb(クローンOKT3)を0日目に培養物に添加して、ヒトPBMCを刺激した。試験物、対照化合物、又はビヒクル対照をR10培地に希釈し、50  $\mu$ Lをそれぞれのウェルに添加して、ウェル当たりの最終容量を250  $\mu$ Lにした。プレートを通気性のあるフィルムで覆い、5%CO<sub>2</sub>を含む37 °Cの加湿チャンバー中で2日間インキュベートした。上清を刺激から24及び48時間後に回収し、ヒトIFN- をLuminexにより検出した。簡潔に述べると、標準品及び試料を黒色の96ウェルプレートに添加した。微粒子カクテル(Luminexキット、R&D Systems中に提供されている)を添加し、室温で2時間振盪させた。磁気ホルダーを用いて、プレートを3回洗浄した。その後、ビオチンカクテルをプレートに添加し、RTで1時間振盪させた。磁気ホルダーを用いて、プレートを3回洗浄した。ストレプトアビジンカクテルをプレートに添加し、RTで30分間振盪させた。磁気ホルダーを用いて、プレートを3回洗浄し、100  $\mu$ Lの洗浄バッファーに再懸濁させ、RTで2分間振盪させ、Luminex 2000を用いて読み取った。生データを内蔵Luminexソフトウェアを用いて解析して、標準曲線を作成し、タンパク質濃度を内挿し、他の全てのデータ解析及びグラフ作成をExcel及びPrismソフトウェアを用いて行った。データは、実験的重複で検討した3つの独立したドナーPBMCを用いた1つの試験を表している。

【0291】

図10に示されているデータは、EphA2/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY12491が、2人の異なるヒトドナー由来のPBMCを用いて、MC38共培養アッセイにおいて、34pM(図10A = ドナー228769)又は85pM(図10B = ドナー228711)のEC<sub>50</sub>でIFN- サイトカイン分泌を誘導することを示している。BCY12762は、BCY12491と同じ親和性でEphA2に結合するが、CD137には結合しないヘテロタンデム二環式ペプチド複合体である。

【0292】

同様に、健康なドナー由来のPBMCを、抗CD3及びBCY13272の存在下、5:1の比でEphA2発現癌細胞(MC38及びHT-1080)と共に培養した。上清をサイトカイン(IL-2及びIFN)についてLuminexにより48時間後に解析した。データは、表8に示されており、1人のドナー由来の(合計n=4又は5回の個々の実験からの)PBMCを代表するものである。

表8:ヒトPBMC-MC38/HT-1080共培養アッセイにおいてEphA2/CD137ヘテロタンデム二環式複合体によって誘導されるIL-2サイトカイン分泌のEC<sub>50</sub>

【表27】

複合体 ID	細胞株	EC <sub>50</sub> (nM)	N =
BCY13272	MC38	0.79± 0.24	5
BCY13272	HT-1080	0.55± 0.47	4

【0293】

10

20

30

40

50

図26に示され、表8Aで表形式にされているデータは、EphA2/CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体がMC38共培養アッセイにおいてナノモル未満の効力でIFN- サイトカイン分泌を誘導することを示している。

表8A:ヒトPBMC-MC38共培養アッセイにおいてEphA2/CD137ヘテロタンデム二環式複合体によって誘導されるIFNy分泌のEC50及びEmax

【表28】

複合体 ID	インキュベーションの時間(時間)	ドナー1 EC50 (nM)	ドナー2 EC50 (nM)
BCY12491	48	0.034	0.085
BCY12730	48	0.13	0.19
BCY12723	72	0.13	0.095
BCY13050	72	0.38	0.19
BCY13048	48	0.30	0.24
BCY13047	48	0.31	0.30

【0294】

(13.原発性患者由来肺腫瘍のエクスピボ培養物における標的依存的なサイトカイン放出)

Discovery Life Sciences(DLS)製の原発性患者由来腫瘍細胞を、10mLのベンゾナーゼが新たに添加された予め温めた洗浄培地で徐々に解凍した。Greiner製の3Dスフェロイドキット(cat# 655840)を用いて、細胞を培養下で2日間維持する。簡潔に述べると、腫瘍細胞を、血球計算盤を用いてトリパンブルーでカウントした。細胞を1500rpmで5分間遠心分離して、洗浄し、ペレットを $1 \times 10^6$ 細胞当たり100 $\mu$ LのN3Dナノシャッフルに再懸濁させる。それらに磁気を帯びさせるために、細胞を1500rpmで5分間スピンドラウンド、再懸濁させ;このプロセスを合計4回繰り返す。最後のスピンドラウンド後、細胞を適量の新鮮な肺DTC培地(DLS)に再懸濁させて、ウェル当たり50,000~100,000個の細胞を100 $\mu$ L/ウェルで得た。Greiner製のセルリペレント96ウェルプレート(cat #655976)をこの実験に使用した。目に見える細胞塊又は細胞残屑が存在していた場合、プレーティングする前に、試料を70~100 $\mu$ mフィルターにかける。試料当たり少なくとも50,000個の細胞を0日目のフローサイトメトリーパネル用に取っておき、これらの細胞を、その後のフロー解析用に染色し、固定し、4℃で保存した。対照/試験化合物希釈物をLung DTC培地中に2×で別々のプレートで調製し、100 $\mu$ L/ウェルのこれらの2×薬物溶液をプレートマップによって記載されている通りにウェルに添加した。その後、アッセイプレートを、37℃、5%CO<sub>2</sub>の加湿チャンバー中の96ウェル磁気スフェロイドドライブ上に置いた。24時間で、磁気スフェロイドドライブを取り出した。48時間で、培地をサイトカイン解析用に回収し、細胞を2日目のフローサイトメトリーパネル用に回収した。サイトカインを、R&D systems製の特注のサイトカイン/ケモカインパネル(IP-10、グランザイムB、IFN-γ、IL-2、IL-6、TNF-α、IL-8、MIP-1a、MIP-1b、MCP-1、IL-10、MIG)を用いて、Luminexリーダーで定量した。フローパネル: 0日目=生/死、CD45、EpCAM、ネクチン4、CD3、CD4、CD8、CD137; 2日目=生/死、CD45、EpCAM、ネクチン4、CD3、CD8、Ki-67、及びカウント用ビーズ。フローデータは、Flowjoソフトウェアで解析する。

【0295】

図13に示されているデータは、ネクチン-4/CD137ヘテロタンデムBCY11027が原発性患者由来肺腫瘍のエクスピボ培養物において標的依存的なサイトカイン放出を誘導することを示している。BCY11027による処理は、患者由来試料におけるいくつかの免疫マーカーのネクチン-4依存的な変化(ビヒクルに対して正規化した)及び%CD8+ Ki67+ T細胞のネクチン-4依存的な変化を誘導し、これらは、ネクチン-4発現のレベルと相關した。

【0296】

(14.腫瘍細胞との共培養下でのPromega OX40細胞活性アッセイ)

10

20

30

40

50

Promegaは、NF- Bルシフェラーゼ発光をJurkat細胞におけるOX40活性化の読み出として使用するOX40細胞活性アッセイを開発した(Promega CS197704)。実験当日、FBSを解凍し、5%FBSをRPMI-1640に添加することにより、培地を調製する。OX40 Jurkat細胞を水浴中で解凍し、その後、500  $\mu$ lの細胞を11.5mlの予め温めた5%FBS RPMI-1640培地に添加する。ウェル当たり55  $\mu$ lの細胞を白色の細胞培養プレートに添加する。腫瘍細胞を培養物から回収する。4T1は、ネクチン-4陰性マウス乳腺上皮癌細胞である。これを遺伝的に改変して、マウスネクチン-4を細胞表面にを発現させた(4T1ネクチン-4陽性;クローン4T1-D02)。腫瘍細胞を、10%熱非働化FBS、1×ペニシリン/ストレプトマイシン、1×L-グルタミン、20mM HEPES、及び1×NEAAが補充されたRPMI1640培地(RPMI作業培地)中、インビトロで80%コンフルエンシーまで培養した。腫瘍細胞をトリプシン処理し、37℃に予め温めたRPMI1640作業培地中、1500rpmで5分間、2回洗浄した。細胞をカウントし、2,000,000細胞/mLでR5培地に再懸濁させる(10,000細胞/ウェルの場合)。ウェル当たり5  $\mu$ Lの腫瘍細胞を添加する。

#### 【0297】

次に、最大誘導倍率を与える濃度でアゴニストを希釈し、その後、その量を滅菌96ウェルプレート中で漸減させる。2連の試料に十分な試薬を調製し、その後、1/3希釈系列又は1/10希釈系列を行う。陽性対照のOX40L三量体(AcroBiosystems, R&D systems)及び陰性対照の単量体もしくは非結合ペプチドを含める。20  $\mu$ lのアゴニストを2連の試料として又は5%FBS RPMI-1640のみをバックグラウンド対照として添加する。

#### 【0298】

細胞を、アゴニストと一緒に、37℃、5%CO<sub>2</sub>で6時間共インキュベートする。6時間後、Bio-Glo(商標)を解凍し、室温でアッセイを発色させる。ウェル当たり80  $\mu$ lのBio-Glo(商標)を添加し、5~10分間インキュベートする。CLARIOStarプレートリーダーでMARSプログラムを用いてルシフェラーゼシグナルを読み取り、誘導倍率をバックグラウンド(培地のみ)に対して正規化する。データを $x=\log(X)$ に転換することによりデータを解析し、その後、 $\log(\text{アゴニスト})$ 対応答変数勾配(4パラメータ)をプロットして、EC<sub>50</sub>値を計算する。

#### 【0299】

このアッセイの結果は、表9及び図14に示されている。このアッセイでは、BCY12967ネクチン-4:OX40化合物が、ネクチン-4陽性4T1-D02細胞との共培養下にあるとき、OX40L及び非結合対照ペプチドBCY12968と比較して強力なOX40アゴニズムを示したことが分かる。

表9:腫瘍細胞との共培養下でのPromega OX40細胞活性アッセイから得られたEC<sub>50</sub>値

#### 【表29】

ペプチド番号	EC <sub>50</sub> (nM)
BCY12967	0.83

#### 【0300】

(15. EphA2:CD137の1:2ヘテロタンデム複合体の投与はマウス腫瘍モデルにおいて劇的な免疫応答を誘導する)

6~8週齢の雌C57BL/6J-hCD137マウス[B-hTNFRSF9(CD137)マウス; Biocytogen]に、 $1 \times 10^6$ 個のMC38細胞を皮下移植した。平均腫瘍体積が約240mm<sup>3</sup>に達したとき、マウスを処置群に無作為に割り付け、静脈内(IV)へのビヒクル(25mMヒスチジン、10%スクロース、pH7)、IVへの15mg/kgのBCY12491(EphA2:CD137の1:2ヘテロタンデム複合体)、IVへの15mg/kgのBCY13626(EphA2の非結合対照)、又は腹腔内への2mg/kgの抗CD137(ウレルマブ類似体)で処置した(n=6/処置コホート)。全ての処置を3つの用量についてQ3Dで施し、最後の用量から1時間後に、腫瘍組織を採取した。腫瘍組織の一部を転写解析のためのRNA単離用に使用し、腫瘍組織の一部を免疫組織化学(IHC)解析のためのホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料調製用に使用した。RNAeasyキット[Qi

10

20

30

40

50

agen]を用いて、RNAを腫瘍組織から単離し、nCounter Mouse PanCancer IO 360パネル(Nanostring)を用いて、100ng RNA/腫瘍から転写解析を行った。nSolver解析ソフトウェア(Nanostring)を用いて、データを解析した。抗マウスCD8抗体(Abcam, # ab217344)及びVentana Discovery OmniMap抗ウサギHRPキット(Ventana #760 4310)を用いて、CD8+腫瘍浸潤細胞をFFPE組織切片で染色した。

#### 【0301】

この試験の結果は、図15A～Dに示されている。この試験では、転写解析により、ビヒクル処置マウス由来の腫瘍と比較して、EphA2 BCY12491処置したときの腫瘍組織における細胞傷害性細胞スコア(図15A)、マクロファージ細胞(図15B)及びT細胞スコア(図15C)などの免疫細胞スコアの有意な増加が明らかにされたことが観察できる。抗CD137抗体処置も腫瘍組織における細胞傷害性細胞スコア及びT細胞スコアを有意に増加させたが、BCY12491よりも程度が低かった。非結合対照(BCY13626)処置動物由来の腫瘍組織では、免疫細胞スコアに変化が見られなかった。腫瘍組織内のCD8+細胞のIHC解析により、ビヒクル又は非バインダーBCY13626処置マウス由来の腫瘍と比較したときのBCY12491処置マウス由来の腫瘍におけるCD8+細胞の強い浸潤が示された(図15D)。CD8+細胞浸潤のある程度の増加は、抗CD137抗体処置マウス由来の腫瘍でも観察された。腫瘍組織におけるこれらの免疫細胞スコア及びCD8+細胞の変化は、EphA2:CD137の1:2ヘテロタンデム複合体BCY12491による腫瘍組織におけるCD137のアゴニズムが腫瘍浸潤免疫細胞及び免疫応答の顕著な調節(増加)をもたらすことを示している。

10

#### 【0302】

##### (16. 同系MC38腫瘍モデルにおけるBCY13272の抗腫瘍活性)

20

6～8週齢の雌C57BL/6J-hCD137マウス[B-hTNFRSF9(CD137)マウス; Biocytogen]に、 $1 \times 10^6$ 個のMC38細胞を皮下移植した。平均腫瘍体積が約80mm<sup>3</sup>に達したとき、マウスを処置群(n=6/コホート)に無作為に割り付け、静脈内(IV)へのビヒクル(25mMヒスチジン、10%スクロース、pH7)、IVへの8mg/kgのBCY13272、0.9mg/kgのBCY13272、及び0.1mg/kgのBCY13272で処置した。全ての処置を合計6つの用量について週2回(BIW)施した。腫瘍増殖を処置開始から28日目までモニタリングした。完全レスポンダーモルヒカル(n=7)を処置開始後62日目まで経過観察し、 $2 \times 10^6$ 個のMC38腫瘍細胞の移植で再抗原投与を行い、腫瘍増殖を28日間モニタリングした。同時に、年齢をマッチさせた未処置対照huCD137 C57BL/6マウス(n=5)に、 $2 \times 10^6$ 個のMC38腫瘍細胞を移植し、28日間モニタリングした。

30

#### 【0303】

この実験の結果は、図18に見ることができる。この実験では、BCY13272が顕著な抗腫瘍活性をもたらし、完全応答が0.9mg/kg(6匹の完全レスポンダーのうちの2匹)及び8mg/kg(6匹の完全レスポンダーのうちの5匹)の用量レベルで観察されることが分かる(図18A)。年齢をマッチさせた未処置対照huCD137 C57BL/6マウス(腫瘍生着率100%)とは異なり、BCY13272完全レスポンダー動物では腫瘍再増殖が観察されなかった(図18B)。これらのデータは、BCY13272が顕著な抗腫瘍活性を有すること及びBCY13272処置が完全レスポンダー動物において免疫原性記憶をもたらすことを示している。

40

#### 【0304】

##### (17. SPRによって測定されるBCY13272とEphA2及びCD137との結合)

###### (a)CD137

Biacore実験を行って、ヒトCD137タンパク質に対するヘテロタンデムペプチド結合の $k_a$ (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)、 $k_d$ (s<sup>-1</sup>)、 $K_D$ (nM)値を決定した。組換えヒトCD137(R&D systems)をPBSに再懸濁させ、製造元によって提案されているプロトコルの通りにEZ-Link(商標)スルホ-NHS-LC-LC-ビオチン試薬(Thermo Fisher)を用いてビオチン化した。タンパク質をスピンカラムを用いて脱塩して、カップリングされていないビオチンを除去し、PBS中に取った。

#### 【0305】

ペプチド結合の解析のために、Biacore T200又はBiacore 3000装置をXanTec CMD

50

500Dチップとともに使用した。HBS-N(10mM HEPES、0.15M NaCl、pH 7.4)を泳動バッファーとして用いる25 での標準的なアミンカップリング化学反応を用いて、ストレプトアビジンをチップ上に固定した。簡潔に述べると、カルボキシメチルデキストラン硫酸を、10  $\mu$ l/分の流量での1:1の比の0.4M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)/0.1M N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)の7分間の注入により活性化させた。ストレプトアビジンの捕捉のために、タンパク質を0.2mg/mlまで10mM酢酸ナトリウム(pH 4.5)に希釈し、活性化したチップ表面に120  $\mu$ lを注入することにより捕捉した。残りの活性化基を1Mエタノールアミン(pH 8.5)の7分間の注入によりプロッキングし、ビオチン化CD137を270 ~ 1500RUのレベルまで捕捉した。バッファーをPBS/0.05%Tween 20に変更し、0.5%の最終DMSO濃度を含むこのバッファー中で、ペプチドの希釈系列を調製した。最大のペプチド濃度を500nMとし、6回のさらなる2倍又は3倍希釈を行った。SPR解析を、60秒間の会合及び900秒間の解離にして、90  $\mu$ l/分の流量で、25 で実施した。各々のサイクルの後、再生工程(10  $\mu$ lの10mMグリシンpH 2)を利用した。データを、必要に応じて、DMSOを除いた体積効果に対して補正した。全てのデータを、標準的な処理手順を用いて、プランク注入及び基準面について二重参照し、データ処理及び動力学的フィッティングを、Scrubberソフトウェア、バージョン2.0c(BioLogic Software)を用いて実施した。データを、単純な1:1結合モデルを用いてフィッティングし、適宜、質量移動効果を考慮に入れた。

### 【0306】

#### (b)EphA2

Biacore実験を行って、ヒトEphA2タンパク質に対するBCY13272結合の $k_a$ (M $^{-1}$ s $^{-1}$ )、 $k_d$ (s $^{-1}$ )、 $K_D$ (nM)値を決定した。

### 【0307】

EphA2を、タンパク質に対して3 × モル過剰のビオチンを含む4mM酢酸ナトリウム、100mM NaCl、pH 5.4中、EZ-Link(商標)スルホ-NHS-LC-ビオチンで1時間ビオチン化した。反応混合物をPBS中に透析した後、蛍光ビオチン定量キット(Thermo)を用いて、標識の程度を決定した。ペプチド結合の解析のために、Biacore T200装置をXanTec CMD500Dチップとともに使用した。HBS-N(10mM HEPES、0.15M NaCl、pH 7.4)を泳動バッファーとして用いる25 での標準的なアミンカップリング化学反応を用いて、ストレプトアビジンをチップ上に固定した。簡潔に述べると、カルボキシメチルデキストラン硫酸を、10  $\mu$ l/分の流量での1:1の比の0.4M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)/0.1M N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)の7分間の注入により活性化させた。ストレプトアビジンの捕捉のために、タンパク質を0.2mg/mlまで10mM酢酸ナトリウム(pH 4.5)に希釈し、活性化したチップ表面に120  $\mu$ lを注入することにより捕捉した。残りの活性化基を1Mエタノールアミン(pH 8.5):HBS-N(1:1)の7分間の注入によりプロッキングした。バッファーをPBS/0.05%Tween 20に変更し、バッファー中0.2  $\mu$ Mへのタンパク質の希釈を用いて、ビオチン化EphA2を500 ~ 1500RUのレベルまで捕捉した。0.5%の最終DMSO濃度を含むこのバッファー中で、ペプチドの希釈系列を調製し、最大ペプチド濃度を50又は100nMとし、6回のさらなる2倍希釈を行った。SPR解析を、60秒間の会合及び900 ~ 1200秒間の解離にして、90  $\mu$ l/分の流量で、25 で実施した。データをDMSOを除いた体積効果に対して補正した。全てのデータを、標準的な処理手順を用いて、プランク注入及び基準面について二重参照し、データ処理及び動力学的フィッティングを、Scrubberソフトウェア、バージョン2.0c(BioLogic Software)を用いて実施した。データを、単純な1:1結合モデルを用いてフィッティングし、適宜、質量移動効果を考慮に入れた。

### 【0308】

図20Aは、BCY13272が2.0nMの親和性でEphA2(ヒト)に結合することを示すセンサーグラムを示している。図20Bは、BCY13272が高い親和性でCD137(ヒト)に結合するセンサーグラムを示している。BCY13272中の2つのCD137結合二環の存在のために、固定されたCD137タンパク質の解離速度は非常に遅く、報告されている $K_D$ は、過大評価であ

10

20

30

40

50

る可能性がある(図19B)。

【0309】

(18. 4つの前臨床種にわたるネクチン-4及びCD137に対するBCY11863の結合)

その一次標的であるネクチン-4及びCD137に対するBCY11863の結合を表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて特徴付けた。

【0310】

(a)ネクチン-4

BCY11863は、ビオチン化され、かつストレプトアビジンセンサーチップ表面上に捕捉されている細胞外ドメインへの直接結合によって測定したとき、5~27nMの $K_D$ でカニクイザル、ラット、マウス、及びヒトネクチン-4に結合する。

表10:ビオチン化ネクチン-4細胞外ドメインに対するBCY11863の結合親和性: SPRデータ

【表30】

SPR $K_D$ (nM)	アッセイ タイプ	ヒト (25 °C)	ヒト (37 °C)	NHP (25 °C)	ラット (25 °C)	マウス (25 °C)
BCY11863	直接結合	5.0 ± 2.1 n = 7	5.2 ± 1.1 n = 9	27 ± 15 n = 9	15 ± 1 n = 6	4.6 ± 2.1 n = 9

【0311】

ネクチン-4に対するBCY11863の結合が、三成分複合体の状況において、すなわち、CD137にも結合しているときに変化したかどうかを理解するために、多成分SPR結合アッセイを開発した。まず、SPRチップ表面に固定されたヒトCD137にBCY11863を捕捉させ、その後、チップの上に異なる種由来のネクチン-4を通過させ、捕捉されたBCY11863に対するその親和性を決定した(図21Cを参照)。ネクチン-4に対する親和性は、下に示されているように、全般的に、CD137結合の存在下で維持された:

表11:ビオチン化ヒトCD137を捕捉試薬として用いたネクチン-4細胞外ドメインに対するBCY11863の結合親和性

【表31】

SPR $K_D$ (nM)	アッセイ タイプ	ヒト	NHP	ラット	マウス
BCY11863	サンドイッチ アッセイ	12 ± 2 n = 4	28 ± 5 n = 3	25 ± 2 n = 3	6.7 ± 1.7 n = 3

【0312】

(b)CD137

表面結合CD137に対するBCY11863の直接結合は、極めて遅い $k_{off}$ をもたらすBCY11863中の2つのCD137結合二環に起因する結合力のために、SPRによって正確に測定することができない(図21Bを参照)。さらに、カニクイザルCD137のビオチン化は、おそらくは、BCY11863結合に重要であるカニクイザルタンパク質上のリジンの修飾のために、BCY11863の結合を無効にする。したがって、C-末端ビオチン化リジンを含有するBCY11863類似体(BCY13582)をSPRで試験して、BCY11863の交差種特異性を決定した。可逆的ビオチン捕捉キットを用いて、BCY13582をセンサーチップに捕捉させ、異なる種由来のネクチン-4に対する親和性を決定した。両方の戦略により、これらのBCY11863類似体が、<10nMの $K_D$ でヒト及びカニクイザルCD137に結合し、かつマウスCD137とラットCD137の両方には無視できる程度しか結合しないことが示された。

表12: CD137細胞外ドメインに対するビオチン化BCY11863類似体の結合親和性: SPRデータ

10

20

30

40

50

【表32】

SPR $K_D$ (nM)	アッセイ タイプ	ヒト	NHP	ラット	マウス
BCY13582	直接結合	8.4 ± 4.2 n = 3	4.23 n = 1	NB n = 1	NB n = 1

【0313】

CD137に対するBCY11863の結合が、三成分複合体の状況において、すなわち、ネクチン-4にも結合しているときに変化したかどうかを理解するために、二重結合SPR結合アッセイを開発した。まず、SPRチップ表面に固定されたヒトネクチン-4にBCY11863を捕捉させ、その後、チップの上に異なる種由来の可溶性CD137を通過させ、捕捉されたBCY11863に対するその親和性を決定した(図21Dを参照)。CD137に対する親和性は、下に示されているように、全般的に、ネクチン-4結合の存在下で維持された:

表13: ビオチン化ヒトネクチン-4を捕捉試薬として用いたCD137 ECDに対するBCY11863の結合親和性

【表33】

SPR $K_D$ (nM)	アッセイ タイプ	ヒト	NHP	ラット	マウス
BCY11863	二重結合	6.3 ± 0.7 n = 4	18 ± 6 n = 3	NB n = 2	NB n = 2

【0314】

図21Aは、BCY11863が4.1nMの親和性でネクチン-4(ヒト)に結合することを示すセンサーグラムの1つの例を示している。図21Bは、BCY11863が高い親和性でCD137(ヒト)に結合するセンサーグラムを示している。BCY11863中の2つのCD137結合二環の存在のために、固定されたCD137タンパク質の解離速度は非常に遅く、報告されている $K_D$ は、過大評価である可能性がある(図21B)。図21Cは、BCY11863がネクチン-4に結合する一方、CD137アームは、チップ上に固定されたCD137タンパク質に結合して、三成分複合体を形成することを示している。図21Dは、BCY11863がCD137に結合する一方、ネクチン-4結合アームは、チップ上に固定されたネクチン-4タンパク質に結合して、三成分複合体を形成することを示している。図21Eは、ヒトCD137に結合するSPRチップ上に固定されたBCY13582の能力を示している。

【0315】

(19.ネクチン-4及びCD137に対するBCY11863の選択性)

ネクチン-4パラログスクリーニング:ネクチン-1(2880-N1、R&D Systems)、ネクチン-2(2229-N2、R&D Systems)、ネクチン-3(3064-N3、R&D Systems)、ネクチン様-1(3678-S4-050、R&D Systems)、ネクチン様-2(3519-S4-050、R&D Systems)、ネクチン様-3(4290-S4-050、R&D Systems)、ネクチン様-4(4164-S4、R&D Systems)、及びネクチン様-5(2530-CD-050、R&D Systems)をビオチンで標識し、これらをストレプトアビジン表面に固定することにより、これらに対するSPRを用いて、BCY11863の結合を評価した。BCY11863は、これらの標的にに対する結合を最大5000nMの濃度まで示さなかった。

【0316】

CD137パラログスクリーニング:可溶性TNFファミリー受容体OX40及びCD40に対するSPRを用いて、ストレプトアビジン捕捉BCY13582(ビオチン化BCY11863)の結合を評価した。BCY13582は、これらの標的に最大100nMの濃度まで結合しなかった。

【0317】

Retrogenixマイクロアレイスクリーニング:Retrogenixの細胞マイクロアレイ技術を

10

20

30

40

50

用いて、BCY13582として知られるビオチン化BCY11863の特異的オフターゲット結合相互作用をスクリーニングした。

【0318】

固定されたトランスフェクトされていないHEK293細胞、並びにネクチン-4及びCD137を過剰発現する細胞(TNFRSF9)に対する試験ペプチドの結合のレベルの検討により、1 μMの試験ペプチドが好適なスクリーニング濃度であることが示された。これらの条件下で、試験ペプチドを、5484の全長ヒト血漿膜タンパク質及び分泌タンパク質を個々に発現するヒトHEK293細胞に対する結合についてスクリーニングした。これにより、ネクチン-4及びCD137を含む9つの一次ヒットが明らかになった。

【0319】

各々の一次ヒットを2つの対照受容体(TGFRB2及びEGFR)とともに再発現させ、1 μM BCY13582試験ペプチド、100 μM BCY11863の存在下の1 μM BCY13582試験ペプチド、並びに他の陽性対照及び陰性対照処理を用いて、再試験した(図4)。非特異的で、再現性がなく、かつ顕著でないヒットを除去した後、試験ペプチドについての3つの特異的な相互作用が残った。これらは、非テザー及びテザー形態のネクチン-4とCD137 - 一次標的であった。

【0320】

BCY13582についての特異的なオフターゲット相互作用は同定されず、その一次標的に対する高い特異性が示された。

【0321】

(20. 0、24hで5mg/kg及び0hで10mg/kgを週2回投与したときの同系ネクチン-4過剰発現MC38腫瘍モデル(MC38#13)におけるBCY11863の抗腫瘍活性)

6 ~ 8週齢の雌C57BL/6J-hCD137マウス[B-hTNFRSF9(CD137)マウス; Biocytogen]に、 $1 \times 10^6$ 個のMC38#13細胞(マウスネクチン-4を過剰発現するように改変されたMC38細胞)を皮下移植した。平均腫瘍体積が約95mm<sup>3</sup>に達したとき、マウスを処置群(n=6/コホート)に無作為に割り付け、週1回の用量のビヒクル(25mMヒスチジン、10%スクロース、pH7)又は2つの投与サイクルについて2つの異なる投与スケジュールの10mg/kgのBCY11863(D0及びD7に0h及び24hで5mg/kg又はD0及びD7に0hで10mg/kgのBCY11863)で処置した。処置は全て、静脈内(IV)投与した。腫瘍増殖を処置開始から15日目までモニタリングした。

【0322】

BCY11863は、両方の投与スケジュールで顕著な抗腫瘍活性をもたらすが、完全応答を処置開始後15日目に解析したとき、0h及び24hでの5mg/kg投与の投与スケジュールは、0hでの10mg/kg投与よりも優れていた(図23)。D0及びD7における0h及び24hでの5mg/kgのBCY11863投与が6つのうち4つの完全腫瘍応答をもたらしたのに対し、D0及びD7における0hでの10mg/kgのBCY11863投与は、6つのうち1つの完全腫瘍応答をもたらした。BCY11863マウス血漿PKデータと合わせたこれらのデータは、BCY11863血漿曝露を週1回のサイクルの0h及び24hでの5mg/kgの投与によってもたらされるレベルで維持すると、MC38#13腫瘍モデルでほぼ完全な抗腫瘍応答がもたらされることを示している。

【0323】

(21.同系ネクチン-4過剰発現MC38腫瘍モデル(MC38#13)におけるBCY11863の抗腫瘍活性)

週1回、2週間に1回、及び1日1回に用量を分割した、3、10、及び30mg/kgという3つの週間用量で、6 ~ 8週齢の雌C57BL/6J-hCD137マウス[B-hTNFRSF9(CD137)マウス; Biocytogen]に、 $1 \times 10^6$ 個のMC38#13細胞(マウスネクチン-4を過剰発現するように改変されたMC38細胞)を皮下移植した。平均腫瘍体積が約107mm<sup>3</sup>に達したとき、マウスを処置群(n=6/コホート)に無作為に割り付け、21回の1日1回用量のビヒクル(25mMヒスチジン、10%スクロース、pH7)で処置した。3つの異なるスケジュール(QD:毎日; BIW:週2回、又はQW:週1回)で分割した3つの異なる全用量レベル(3、10、及び30mg/kgの全週用量)でBCY11863処置を行った。異なるBCY11863処置コホートは、21回の1日1回

10

20

30

40

50

用量(0.43、1.4、もしくは4.3mg/kg)、6回の週2回用量(1.5、5、もしくは15mg/kg)、又は3回の週1回用量(3、10、もしくは30mg/kg)のいずれかを受容した。処置は全て、静脈内(IV)投与した。腫瘍が2000mm<sup>3</sup>を超える体積に達するまで又は処置開始後31日まで、腫瘍増殖をモニタリングした。完全レスポンダー(触診可能な腫瘍を有さない動物)をD52まで経過観察した。

【0324】

BCY11863は、多くの投与スケジュールで顕著な抗腫瘍活性をもたらし、BIW投与スケジュール、特に、5mg/kgのBIW投与が最も効果的なスケジュールである。これは、52日目の完全レスポンダー動物の数によって示される。処置開始後52日目に、BCY11863でBIW処置した15/18のマウスが完全レスポンダーであり、BCY11863でQD処置した12/18のマウスが完全レスポンダーであり、BCY11863でQW処置した6/18のマウスが完全レスポンダーであった。5mg/kgのBIW投与は、6/6のCRで、100%の完全応答率をもたらす(図24)。BCY11863マウス血漿PKデータと合わせたこれらのデータは、連続的なBCY11863血漿曝露が、MC38#13腫瘍モデルにおいて、BCY11863に対する抗腫瘍応答に必要でないことを示している。

10

【0325】

(22. EphA2ヘテロタンデム二環式複合体についてのインビボ効力試験)

6~8週齢の雌C57BL/6J-hCD137マウス[B-hTNFRSF9(CD137)マウス; Biocytogen]に、 $1 \times 10^6$ 個のMC38細胞を皮下移植した。平均腫瘍体積が約76mm<sup>3</sup>に達したとき、マウスを処置群(n=6/コホート)に無作為に割り付け、1日1回用量のビヒクル(25mMヒスチジン、10%スクロース、pH7)で処置した。BCY12491処置を2つの異なる用量レベル(5及び15mg/kg)並びに2つの異なる投与スケジュール(QD: 1日1回; Q3D: 3日毎に1回)で行った。動物は、22 QD用量又は8 Q3D用量のいずれかを腹腔内(ip)に受容した。腫瘍が2000mm<sup>3</sup>を超える体積に達するまで又は処置開始後73日まで、腫瘍増殖をモニタリングした。73日後、5匹の完全レスポンダー動物に、5匹の未処置C57BL/6J-hCD137マウスとともに、MC38腫瘍細胞移植で再抗原投与を行った。腫瘍増殖を20日間モニタリングした。

20

【0326】

BCY12491は、試験で使用された全ての用量及び投与スケジュールで顕著な抗腫瘍活性をもたらした。処置開始後41日目までに、6匹のBCY12491 5mg/kg Q3D処置動物のうちの2匹が完全レスポンダーになり(CR;触診可能な腫瘍が残っていない)、6匹のBCY12491 5mg/kg QD処置動物のうちの3匹がCRになり、6匹のBCY12491 15mg/kg Q3D処置動物のうちの4匹がCRになり、BCY12491 15mg/kg QD処置動物は全て(6/6)、CRになっていた。BCY12491マウス血漿PKデータと合わせたこれらのデータは、連続的なBCY12491血漿曝露が、MC38腫瘍モデルにおいて、BCY12491に対する最大の抗腫瘍応答に必要でないことを示している。さらに、完全レスポンダー動物がMC38腫瘍細胞移植による再抗原投与に拒絶反応を示し、腫瘍増殖を示さなかったのに対し、同時に同じ腫瘍細胞を移植した未処置マウスは、腫瘍細胞の移植後22日目までに、100%の生着率で腫瘍増殖を確立した。これは、完全な腫瘍応答をもたらすBCY12491処置による免疫原性記憶の発生を示している(図27)。

30

【0327】

CD8+ T細胞又はNK 1.1+ NK細胞が除去されたMC38腫瘍担持C57BL/6J-hCD137マウスをBCY12491で処置する際の様々な免疫細胞集団のBCY12491活性の依存性を決定した。6~8週齢の雌C57BL/6J-hCD137マウス[B-hTNFRSF9(CD137)マウス; Biocytogen]に、 $1 \times 10^6$ 個のMC38#13細胞(ネクチン-4を過剰発現するように改変されているMC38のクローン)を皮下移植した。細胞移植から3日後、マウスは、ビヒクル(PBS)、100μgの抗CD8除去抗体(ラットIgG2b、クローン2.42)もしくは抗NK除去抗体(マウスIgG2a、クローンPK136)(又はこれらの組合せ)或いは対応するアイソタイプ対照抗体(ラットIgG2bアイソタイプ対照又はマウスIgG2aアイソタイプ対照)のip注射を受容した。マウスは、最初の抗体投与から5及び10日後に、除去抗体(又はアイソタイプ対照)の追加投与を

40

50

受容した。細胞除去は、最初の除去抗体投与から4及び12日後に、フローサイトメトリーによって確認した。腫瘍体積が約111mm<sup>3</sup>に達したとき(最初の除去抗体投与から5日後)、マウスは、15mg/kgで、週2回(BIW)、ビヒクル又はBCY12491を静脈内(iv)に受容し始めた。マウスは、合計4用量のBCY12491を受容した。28日目まで又は腫瘍体積が200mm<sup>3</sup>を超えるまで、腫瘍増殖をモニタリングした。

【0328】

BCY12491処置は、ビヒクル又はアイソタイプ対照抗体で処置されたMC38#13腫瘍担持マウスにおける腫瘍増殖速度の顕著な減少及び生存の増加をもたらした。腫瘍増殖速度の減少及び生存に対するBCY12491処置の恩恵は、CD8除去マウスで失われた。NK1.1+細胞の除去は、BCY12491処置の抗腫瘍活性及びその後の生存利益に影響を及ぼさなかつた。このデータは、MC38#13腫瘍モデルにおけるBCY12491の活性がCD8+ T細胞に依存するが、NK1.1+ NK細胞には依存しないことを示している(図28)。

10

【0329】

BCY12730及びBCY12723の抗腫瘍活性をBCY12491活性とともに示した。6~8週齢の雌C57BL/6J-hCD137マウス[B-hTNFRSF9(CD137)マウス; Biocytogen]に、 $1 \times 10^6$ 個のMC38細胞を皮下移植した。平均腫瘍体積が約92mm<sup>3</sup>に達したとき、マウスを処置群(n=6/コホート)に無作為に割り付け、Q3D用量のビヒクル(25mMヒスチジン、10%スクロース、pH7)、15mg/kgのBCY12730、BCY12723、又はBCY12491(7 Q3D用量)で静脈内処置した。28日間又は腫瘍が2000mm<sup>3</sup>を超えるまで、腫瘍増殖をモニタリングした。BCY12491、BCY12730、及びBCY12723は、6匹のBCY12491処置動物のうちの4匹、6匹のBCY12730処置動物のうちの3匹、及び6匹のBCY12723処置動物のうちの2匹で完全応答をもたらす顕著な抗腫瘍活性を示した(図29)。

20

【0330】

BCY13048及びBCY13050の抗腫瘍活性をBCY12491活性とともに示した。6~8週齢の雌C57BL/6J-hCD137マウス[B-hTNFRSF9(CD137)マウス; Biocytogen]に、 $1 \times 10^6$ 個のMC38細胞を皮下移植した。平均腫瘍体積が約76mm<sup>3</sup>に達したとき、マウスを処置群(n=6/コホート)に無作為に割り付け、週2回(BIW)用量のビヒクル(25mMヒスチジン、10%スクロース、pH7)、5mg/kgのBCY13048、BCY13050、又はBCY12491(6 BIW用量)で静脈内処置した。28日間又は腫瘍が2000mm<sup>3</sup>を超えるまで、腫瘍増殖をモニタリングした。BCY12491、BCY13048、及びBCY13050は、6匹のBCY12491処置動物のうちの2匹、6匹のBCY13048処置動物のうちの5匹、及び6匹のBCY13050処置動物のうちの3匹で完全応答をもたらす顕著な抗腫瘍活性を示した(図30)。

30

本件出願は、以下の態様の発明を提供する。

(態様1)

(a)癌細胞上に存在する構成要素に結合する第一のペプチドリガンド;ガリンカーを介して、  
(b)免疫細胞上に存在する構成要素に結合する2以上の第二のペプチドリガンド;  
にコンジュゲートしたもの:

を含み、ここで、該ペプチドリガンドの各々が少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つの反応基を含むポリペプチド及び該ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する分子スキャフォールドを含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子スキャフォールド上に形成される、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

40

(態様2)

前記免疫細胞が、白血球;リンパ球(例えば、Tリンパ球もしくはT細胞、B細胞、又はナチュラルキラー細胞); CD8又はCD4; CD8;樹状細胞、漿胞樹状細胞、及び顆粒球:から選択される、態様1記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様3)

前記反応基が、システイン、3-メルカプトプロピオン酸、及び/又はシステアミン残基から選択される、態様1又は態様2記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様4)

前記免疫細胞上に存在する構成要素がCD137である、態様1~3のいずれか一項記載のヘ

50

テロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様 5 )

前記2以上の第二のペプチドリガンドがCD137結合二環式ペプチドリガンドを含む、態様1～4のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様 6 )

前記CD137結合二環式ペプチドリガンドが、

(化 1 )

C<sub>i</sub>[EEGQYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 5);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Ala]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 6);  
 C<sub>i</sub>[EEGQYC<sub>ii</sub>]F[D-Ala]DPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 7);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PK[D-Ala]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 8);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 9);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 10);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 11);  
 (配列番号: 11)-A (本明細書において、BCY14601と称される);  
 C<sub>i</sub>[EE[D-Lys(PYA)]QYC<sub>ii</sub>]FADPY(Nle)C<sub>iii</sub> (配列番号: 12);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 60);  
 C<sub>i</sub>[EE[dK(PYA)]QYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 61);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]EE(dK)PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 62);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 63);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]EE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 64);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FANPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 65);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FAE PY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 66);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FA[Aad]PY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 67);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FAQPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 68);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle][Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号: 69);  
 [MerPro][tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号70; 本明細書において、  
 BCY12353と称される);  
 [MerPro][tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle][Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号71; 本明細書に  
 おいて、BCY12354と称される);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 72);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 73);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号74; 本明細書において、BCY12372と  
 称される);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FAD[NMeAla]Y[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 75);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FAD[NMeDAla]Y[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 76);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]P[K(PYA)][dA]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 77);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 78);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(Me,PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 79);  
 C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[dK(Me,PYA)]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 80); 及び  
 [MerPro][tBuAla]EE[dK]PYC<sub>ii</sub>]FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号81; 本明細書において、  
 BCY13137と称される);

(ここで、[MerPro]<sub>i</sub>、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、C<sub>iii</sub>、及び[Cysam]<sub>iii</sub>は、システイン、MerPro、及びCysamから選択される第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)の反応基を表し、Nleはノルロイシン

10

20

30

40

50

を表し、tBuAlaはt-ブチル-アラニンを表し、PYAは4-ペンチン酸を表し、Aadは-L-アミノアジピン酸を表し、MerProは3-メルカプトプロピオン酸を表し、Cysamはシステアミンを表し、NMeAlaはN-メチル-アラニンを表す)

から選択されるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む、態様5記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様7)

前記CD137結合二環式ペプチドリガンドが、

(化2)

C<sub>i</sub>[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC<sub>ii</sub>FADPY[Nle]C<sub>iii</sub> (配列番号: 11);

10

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステイン残基を表し、tBuAlaはt-ブチル-アラニンを表し、PYAは4-ペンチン酸を表し、Nleはノルロイシンを表す)

であるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む、態様5又は態様6記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様8)

前記CD137結合二環式ペプチドリガンドがN-及び/又はC-末端修飾を含み、かつ

Ac-A-(配列番号5)-Dap(本明細書において、BCY7732と称される);

Ac-A-(配列番号5)-Dap(PYA)(本明細書において、BCY7741と称される);

20

Ac-(配列番号6)-Dap(本明細書において、BCY9172と称される);

Ac-(配列番号6)-Dap(PYA)(本明細書において、BCY11014と称される);

Ac-A-(配列番号7)-Dap(本明細書において、BCY8045と称される);

Ac-(配列番号8)-A(本明細書において、BCY8919と称される);

Ac-(配列番号9)-A(本明細書において、BCY8920と称される);

Ac-(配列番号10)-A(本明細書において、BCY8927と称される);

Ac-(配列番号11)-A(本明細書において、BCY8928と称される);

Ac-A-(配列番号12)-A(本明細書において、BCY7744と称される);

Ac-(配列番号60)-Dap(PYA)(本明細書において、BCY11144と称される);

Ac-A-(配列番号61)-K(本明細書において、BCY11613と称される);

30

Ac-(配列番号62)-Dap(PYA)(本明細書において、BCY12023と称される);

Ac-(配列番号63)(本明細書において、BCY12149と称される);

Ac-(配列番号64)(本明細書において、BCY12143と称される);

Ac-(配列番号65)(本明細書において、BCY12147と称される);

Ac-(配列番号66)(本明細書において、BCY12145と称される);

Ac-(配列番号67)(本明細書において、BCY12146と称される);

Ac-(配列番号68)(本明細書において、BCY12150と称される);

Ac-(配列番号69)(本明細書において、BCY12352と称される);

Ac-(配列番号72)-[1,2-ジアミノエタン](本明細書において、BCY12358と称される);

[パルミチン酸]-[yGlu]-[yGlu]-(配列番号73)(本明細書において、BCY12360と称される);

40

Ac-(配列番号75)(本明細書において、BCY12381と称される);

Ac-(配列番号76)(本明細書において、BCY12382と称される);

Ac-(配列番号77)-K(本明細書において、BCY12357と称される);

Ac-(配列番号78)-[dA](本明細書において、BCY13095と称される);

[Ac]-(配列番号78)-K(本明細書において、BCY13389と称される);

Ac-(配列番号79)-[dA](本明細書において、BCY13096と称される);及び

Ac-(配列番号80)(本明細書において、BCY13097と称される);

(ここで、Acはアセチル基を表し、Dapはジアミノプロピオン酸を表し、PYAは4-ペンチ

50

ン酸を表す)、又はその医薬として許容し得る塩

:を含む、態様6又は態様7記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様9)

前記CD137結合二環式ペプチドリガンドがN-及び/又はC-末端修飾を含み、かつ

Ac-(配列番号11)-A(本明細書において、BCY8928と称される):

(ここで、Acはアセチル基を表す)、又はその医薬として許容し得る塩

:を含む、態様6~8のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様10)

前記免疫細胞上に存在する構成要素がOX40である、態様1~3のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様11)

前記2以上の第二のペプチドリガンドがOX40結合二環式ペプチドリガンドを含む、態様1~3及び10のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様12)

前記OX40結合二環式ペプチドリガンドが、アミノ酸配列:

(化3)

C<sub>i</sub>ILWC<sub>ii</sub>LPEPHDEC<sub>iii</sub> (配列番号: 82);

C<sub>i</sub>A<sup>K</sup>/<sub>S</sub><sup>N</sup>/<sub>E</sub>C<sub>ii</sub>DPFWYQFYC<sub>iii</sub> (配列番号: 83);

C<sub>i</sub>AKNC<sub>ii</sub>DPFWYQFYC<sub>iii</sub> (配列番号: 84);

C<sub>i</sub>ASEC<sub>ii</sub>DPFWYQFYC<sub>iii</sub> (配列番号: 85);

C<sub>i</sub><sup>L</sup>/<sub>N</sub>YSPC<sub>ii</sub>WHPLN<sup>D</sup>/<sub>K</sub>C<sub>iii</sub> (配列番号: 86);

C<sub>i</sub>LYSPC<sub>ii</sub>WHPLNDC<sub>iii</sub> (配列番号: 87);

C<sub>i</sub>NYSPC<sub>ii</sub>WHPLNKC<sub>iii</sub> (配列番号: 88);

C<sub>i</sub>WYEYDC<sub>ii</sub>NNWERC<sub>iii</sub> (配列番号: 89);

C<sub>i</sub>VIRYSPC<sub>ii</sub>SHYLNC<sub>iii</sub> (配列番号: 90);

C<sub>i</sub>DYSPWWHPC<sub>ii</sub>NHIC<sub>iii</sub> (配列番号: 91);

C<sub>i</sub>DAC<sub>ii</sub>LYPDYYVC<sub>iii</sub> (配列番号: 92);

C<sub>i</sub>R<sub>L</sub>WC<sub>ii</sub>IPAPTDDC<sub>iii</sub> (配列番号: 93);

C<sub>i</sub>TMWC<sub>ii</sub>IPAKGDWC<sub>iii</sub> (配列番号: 94);

C<sub>i</sub>MLWC<sub>ii</sub>LPAPTDEC<sub>iii</sub> (配列番号: 95);

C<sub>i</sub>ILWC<sub>ii</sub>LPEPPDEC<sub>iii</sub> (配列番号: 96);

C<sub>i</sub>LLWC<sub>ii</sub>IPNPDDNC<sub>iii</sub> (配列番号: 97);

C<sub>i</sub>WLWC<sub>ii</sub>VPNPDDTC<sub>iii</sub> (配列番号: 98);

C<sub>i</sub>VLWC<sub>ii</sub>TPYPGDDC<sub>iii</sub> (配列番号: 99);

C<sub>i</sub>ALWC<sub>ii</sub>IPDPQDEC<sub>iii</sub> (配列番号: 100);

10

20

30

40

50

C<sub>i</sub>TLWC<sub>ii</sub>IPDASDSC<sub>iii</sub> (配列番号: 101);  
 C<sub>i</sub>QLWC<sub>ii</sub>IPDADDDC<sub>iii</sub> (配列番号: 102);  
 C<sub>i</sub>QLWC<sub>ii</sub>VPEPGDSC<sub>iii</sub> (配列番号: 103);  
 C<sub>i</sub>ALWC<sub>ii</sub>IPEESDDC<sub>iii</sub> (配列番号: 104);  
 C<sub>i</sub>VLWC<sub>ii</sub>IPEPQDKC<sub>iii</sub> (配列番号: 105);  
 C<sub>i</sub>TLWC<sub>ii</sub>IPDPDDSC<sub>iii</sub> (配列番号: 106);  
 C<sub>i</sub>RLWC<sub>ii</sub>VPKAEDYC<sub>iii</sub> (配列番号: 107);  
 C<sub>i</sub>TKPC<sub>ii</sub>IAYYNQSC<sub>iii</sub> (配列番号: 108);  
 C<sub>i</sub>MNPC<sub>ii</sub>IAYYQQEC<sub>iii</sub> (配列番号: 109);  
 C<sub>i</sub>TNAC<sub>ii</sub>VAYYHQAC<sub>iii</sub> (配列番号: 110);  
 C<sub>i</sub>SDPC<sub>ii</sub>ISYYNQAC<sub>iii</sub> (配列番号: 111);  
 C<sub>i</sub>DPPC<sub>ii</sub>DPFWYAFYC<sub>iii</sub> (配列番号: 112);  
 C<sub>i</sub>PDDC<sub>ii</sub>DPFWYNFYC<sub>iii</sub> (配列番号: 113);  
 C<sub>i</sub>RYSPC<sub>ii</sub>YHPHNC<sub>iii</sub> (配列番号: 114);  
 C<sub>i</sub>LYSPC<sub>ii</sub>NHPLNSC<sub>iii</sub> (配列番号: 115);  
 C<sub>i</sub>EDNYC<sub>ii</sub>FMWTPY<sub>iii</sub> (配列番号: 116);  
 C<sub>i</sub>LDSPC<sub>ii</sub>WHPLNDC<sub>iii</sub> (配列番号: 117);  
 C<sub>i</sub>RFSPC<sub>ii</sub>SHPLNQC<sub>iii</sub> (配列番号: 118);  
 C<sub>i</sub>KYSPC<sub>ii</sub>WHPLNLC<sub>iii</sub> (配列番号: 119);  
 C<sub>i</sub>RYSPC<sub>ii</sub>WHPLNNC<sub>iii</sub> (配列番号: 120);  
 C<sub>i</sub>EWISC<sub>ii</sub>PGEPHRWWC<sub>iii</sub> (配列番号: 121);  
 C<sub>i</sub>VWEAC<sub>ii</sub>PEHPDQWWC<sub>iii</sub> (配列番号: 122);  
 C<sub>i</sub>STWHC<sub>ii</sub>FWNLQEGKC<sub>iii</sub> (配列番号: 123);  
 C<sub>i</sub>EWKAC<sub>ii</sub>EHDRERWWC<sub>iii</sub> (配列番号: 124);  
 C<sub>i</sub>RTWQC<sub>ii</sub>FYEWQNGHC<sub>iii</sub> (配列番号: 125);  
 C<sub>i</sub>KTWDC<sub>ii</sub>FWASQVSEC<sub>iii</sub> (配列番号: 126);  
 C<sub>i</sub>STWQC<sub>ii</sub>FYDLQEGHC<sub>iii</sub> (配列番号: 127);  
 C<sub>i</sub>TTWEC<sub>ii</sub>FYDLQEGHC<sub>iii</sub> (配列番号: 128);  
 C<sub>i</sub>ETWEC<sub>ii</sub>FWRLQAGEC<sub>iii</sub> (配列番号: 129);  
 C<sub>i</sub>RTWQC<sub>ii</sub>FWDLQEGLC<sub>iii</sub> (配列番号: 130);  
 C<sub>i</sub>STWQC<sub>ii</sub>FWDSQLGAC<sub>iii</sub> (配列番号: 131);  
 C<sub>i</sub>ETWEC<sub>ii</sub>FWEWQVGSC<sub>iii</sub> (配列番号: 132);  
 C<sub>i</sub>TTWEC<sub>ii</sub>FWDLQEGLC<sub>iii</sub> (配列番号: 133);  
 C<sub>i</sub>HTWDC<sub>ii</sub>FYQWQDGHC<sub>iii</sub> (配列番号: 134);  
 C<sub>i</sub>TTWEC<sub>ii</sub>FYSLQDGHC<sub>iii</sub> (配列番号: 135);  
 C<sub>i</sub>NEDMYC<sub>ii</sub>FMWMEC<sub>iii</sub> (配列番号: 136);  
 C<sub>i</sub>LYEYDC<sub>ii</sub>YTWRRC<sub>iii</sub> (配列番号: 137);

10

20

30

40

50

C<sub>i</sub>RYEYDC<sub>ii</sub>HTWQRC<sub>iii</sub> (配列番号: 138);  
 C<sub>i</sub>WYEYDC<sub>ii</sub>TTWERC<sub>iii</sub> (配列番号: 139);  
 C<sub>i</sub>WYEYDC<sub>ii</sub>RTWTRC<sub>iii</sub> (配列番号: 140);  
 C<sub>i</sub>LYEYDC<sub>ii</sub>HTWTRC<sub>iii</sub> (配列番号: 141);  
 C<sub>i</sub>WYEYDC<sub>ii</sub>RTWTFC<sub>iii</sub> (配列番号: 142);  
 C<sub>i</sub>HGGVWC<sub>ii</sub>IPNINDSC<sub>iii</sub> (配列番号: 143);  
 C<sub>i</sub>DSPVRC<sub>ii</sub>YWNTQKGC<sub>iii</sub> (配列番号: 144);  
 C<sub>i</sub>GSPVPC<sub>ii</sub>YWNTRKGC<sub>iii</sub> (配列番号: 145);  
 C<sub>i</sub>CAPFEFNC<sub>ii</sub>YTWRPC<sub>iii</sub> (配列番号: 146);  
 C<sub>i</sub>RVLYSPC<sub>ii</sub>YHWLNC<sub>iii</sub> (配列番号: 147);  
 C<sub>i</sub>SiMYSPC<sub>ii</sub>EHPHNHC<sub>iii</sub> (配列番号: 148);  
 C<sub>i</sub>DKWEPDHLC<sub>ii</sub>YWWC<sub>iii</sub> (配列番号: 149);  
 C<sub>i</sub>DAWPETHVC<sub>ii</sub>YWWC<sub>iii</sub> (配列番号: 150);  
 C<sub>i</sub>DEYTPEHLC<sub>ii</sub>YWWC<sub>iii</sub> (配列番号: 151);  
 C<sub>i</sub>WINYSISPC<sub>ii</sub>YVGEC<sub>iii</sub> (配列番号: 152); 及び  
 C<sub>i</sub>RYEYPEHLC<sub>ii</sub>YTWC<sub>iii</sub> (配列番号: 153);  
10  
20

例えば:

(化4)

C<sub>i</sub>LYSPC<sub>ii</sub>WHPLNDC<sub>iii</sub> (配列番号: 87);

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステム残基を表す)、もしくは修飾誘導体、又はその医薬として許容し得る塩:を含む、態様11記載のヘテロ  
タンデム二環式ペプチド複合体。

(態様13)

前記OX40結合二環式ペプチドリガンドがN-及び/C-末端修飾をさらに含み、かつ  
A-(配列番号82)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10551と称される):

A-(配列番号82)-A(本明細書において、BCY10371と称される):

A-(配列番号84)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10552と称される):

[Biot]-G-[Sar5]-A-(配列番号84)-A(本明細書において、BCY10479と称される):

A-(配列番号84)-A(本明細書において、BCY10378と称される):

[Biot]-G-[Sar5]-A-(配列番号85)-A(本明細書において、BCY11371と称される):

A-(配列番号85)-A(本明細書において、BCY10743と称される):

[Biot]-G-[Sar5]-A-(配列番号87)-A(本明細書において、BCY10482と称される):

A-(配列番号87)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10549と称される):

A-(配列番号87)-A-K(Pya)(本明細書において、BCY11607と称される):

Ac-A-(配列番号87)-A-K(Pya)(本明細書において、BCY12708と称される):

A-(配列番号87)-A(本明細書において、BCY10351と称される):

A-(配列番号88)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY11501と称される):

A-(配列番号88)-A(本明細書において、BCY10729と称される):

A-(配列番号89)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10550と称される):

A-(配列番号89)-A(本明細書において、BCY10361と称される):

A-(配列番号90)-A-[Sar6]-[KBiot](本明細書において、BCY10794と称される):

A-(配列番号90)-A(本明細書において、BCY10349と称される):

30

40

50



A-(配列番号140)-A(本明細書において、BCY10734と称される):  
A-(配列番号141)-A(本明細書において、BCY10735と称される):  
A-(配列番号142)-A(本明細書において、BCY10736と称される):  
A-(配列番号143)-A(本明細書において、BCY10336と称される):  
A-(配列番号144)-A(本明細書において、BCY10337と称される):  
A-(配列番号145)-A(本明細書において、BCY10338と称される):  
A-(配列番号146)-A(本明細書において、BCY10346と称される):  
A-(配列番号147)-A(本明細書において、BCY10357と称される):  
A-(配列番号148)-A(本明細書において、BCY10362と称される):  
A-(配列番号149)-A(本明細書において、BCY10332と称される):  
A-(配列番号150)-A(本明細書において、BCY10717と称される):  
A-(配列番号151)-A(本明細書において、BCY10718と称される):  
A-(配列番号152)-A(本明細書において、BCY10334と称される):及び  
A-(配列番号153)-A(本明細書において、BCY10719と称される):

例えば:

A-(配列番号87)-A-K(Pya)(本明細書において、BCY11607と称される):  
(ここで、Pyaは4-ペンチノイル部分を表す)

:から選択されるアミノ酸配列を含む、態様12記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様14)

前記癌細胞が、HT1080、A549、SC-OV-3、PC3、HT1376、NCI-H292、LnCap、MC38、MC38 #13、4T1-D02、H322、HT29、T47D、及びRKO腫瘍細胞から選択される、態様1～13のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様15)

前記癌細胞上に存在する構成要素がネクチン-4である、態様1～14のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様16)

前記第一のペプチドリガンドがネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドを含む、態様1～15のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様17)

前記ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドが、

(化5)

10

20

30

40

50

C<sub>i</sub>P[1Nal][dD]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号1; 本明細書において、BCY8116と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dK](Sar<sub>10</sub>-(B-Ala))C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号3);  
 C<sub>i</sub>PF<sub>GC</sub><sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号4; 本明細書において、BCY11414と称される);  
 C<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号14);  
 [MerPro]P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号15; 本明細書において、BCY12363と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]W[Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号16);

[MerPro]P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]W[Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号17; 本明細書において、BCY12365と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]HWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号18);  
 C<sub>i</sub>P[1Nal][dK]C<sub>ii</sub>M[HArg]EWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号19);  
 C<sub>i</sub>P[1Nal][dE]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号20; 本明細書において、BCY12368と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dA]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号21; 本明細書において、BCY12369と称される);

C<sub>i</sub>P[1Nal][dE]C<sub>ii</sub>L[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号22; 本明細書において、BCY12370と称される); 及び

C<sub>i</sub>P[1Nal][dE]C<sub>ii</sub>M[HArg]EWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (配列番号23; 本明細書において、BCY12384と称される);

(ここで、[MerPro]<sub>i</sub>、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、C<sub>iii</sub>、及び[Cysam]<sub>iii</sub>は、システイン、MerPro、及びCysamから選択される第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)の反応基を表し、1Nalは1-ナフチルアラニンを表し、HArgはホモアルギニンを表し、HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、Sar<sub>10</sub>は10個のサルコシン単位を表し、B-Alaは-D-アラニンを表し、MerProは3-メルカプトプロピオン酸を表し、かつCysamはシステアミンを表す)  
 :から選択されるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む、態様16記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様18)

前記ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドが、任意にN-末端修飾を含み、かつ配列番号1(本明細書において、BCY8116と称される);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]- (配列番号1)(本明細書において、BCY8846と称される);

[PYA]- (配列番号1)(本明細書において、BCY11015と称される);

[PYA]-[B-Ala]- (配列番号1)(本明細書において、BCY11016と称される);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]- (配列番号2)(本明細書において、BCY11942と称される);

Ac- (配列番号3)(本明細書において、BCY8831と称される);

配列番号4(本明細書において、BCY11414と称される);

[PYA]-[B-Ala]- (配列番号14)(本明細書において、BCY11143と称される);

パルミチン酸-yGlu-yGlu- (配列番号14)(本明細書において、BCY12371と称される);

Ac- (配列番号14)(本明細書において、BCY12024と称される);

Ac- (配列番号16)(本明細書において、BCY12364と称される);

Ac- (配列番号18)(本明細書において、BCY12366と称される); 及び

Ac- (配列番号19)(本明細書において、BCY12367と称される);

(ここで、PYAは4-ペンチン酸を表し、B-Alaは-D-アラニンを表し、Sar<sub>10</sub>は10個のサル

10

20

30

40

50

コシン単位を表す)、又はその医薬として許容し得る塩  
を含む、態様17記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様19)

前記ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドが配列番号1(本明細書において、BCY811  
6と称される)を含む、態様17又は態様18記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様20)

BCY11027、BCY11863、及びBCY11864などの、表A及びBに掲載されている複合体  
のいずれか1つから選択される、態様15～19のいずれか一項記載の記載ヘテロタンデム二  
環式ペプチド複合体。

(態様21)

BCY12967などの、表Eに掲載されている複合体のいずれか1つから選択される、態様1  
5～19のいずれか一項記載の記載ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様22)

前記癌細胞上に存在する構成要素がEphA2である、態様1～14のいずれか一項記載のヘ  
テロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様23)

前記EphA2結合二環式ペプチドリガンドが、

(化6)

10

20

30

40

50

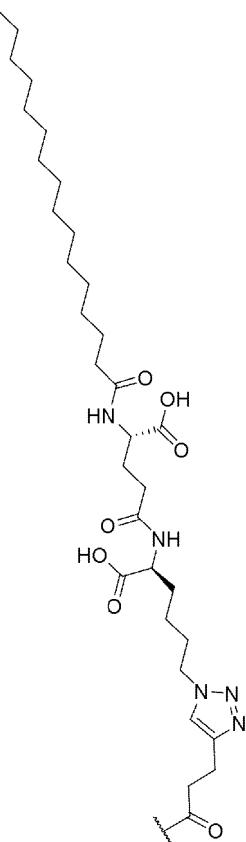
C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 24);  
 C<sub>i</sub>LWDPTPC<sub>ii</sub>ANLHL[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 25);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[K(PYA)]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 26);  
 C<sub>i</sub>[HyP][K(PYA)]VNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 27);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>[K(PYA)]HP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 28);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LKP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 29);  
 C<sub>i</sub>[HyP]KVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 30);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>KHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 31);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dE]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 32);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 33);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号: 34);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号: 35);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[dA]WTC<sub>iii</sub> (配列番号: 36);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[3,3-DPA]P[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号37; 本明細書において、BCY12860と称される);  
 C<sub>i</sub>[HyP][Cba]VNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 38);  
 C<sub>i</sub>[HyP][Cba]VNPLC<sub>ii</sub>LEP[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号: 39);  
 C<sub>i</sub>[HyP][Cba]VNPLC<sub>ii</sub>L[3,3-DPA]P[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号: 40);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[3,3-DPA]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 41);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[d1Nal]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 42);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[1Nal]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 43);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[d1Nal]WTC<sub>iii</sub> (配列番号: 44);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[1Nal]P[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号45; 本明細書において、BCY13119と称される);  
 C<sub>i</sub>[HyP][Cba]VNPLC<sub>ii</sub>LEP[dA]WTC<sub>iii</sub> (配列番号: 46);  
 C<sub>i</sub>[HyP][hGlu]VNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 47);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>[hGlu]HP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 48);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[hGlu]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 49);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dNle]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 50);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[Nle]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 51);  
 [MerPro]<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[3,3-DPA]P[dD]WTC<sub>iii</sub> (配列番号: 154);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg][Cysam]<sub>iii</sub> (配列番号: 155);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[His3Me]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 156);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[His1Me]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 157);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[4ThiAz]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 158);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LFP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 159);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[Thi]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 160);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[3Thi]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 161);  
 C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LNP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 162);  
 10  
 20  
 30  
 40

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LQP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 163); 及び

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>L[K(PYA-(パルミトイル-Glu-LysN<sub>3</sub>)]P[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 164);

(ここで、[MerPro]<sub>i</sub>、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、C<sub>iii</sub>、及び[Cysam]<sub>iii</sub>は、システイン、MerPro、及びCysamから選択される第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)の反応基を表し、HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、HArgはホモアルギニンを表し、PYAは4-ペンチ酸を表し、3,3-DPAは3,3-ジフェニルアラニンを表し、Cbaは-シクロブチルアラニンを表し、1-Nalは1-ナフチルアラニンを表し、hGluはホモグルタミン酸を表し、Thiはチエニル-アラ

ニンを表し、4ThiAzは-(4-チアゾリル)-アラニンを表し、His1MeはN1-メチル-L-ヒスチジンを表し、His3MeはN3-メチル-L-ヒスチジンを表し、3Thiはを表し、パルミトイ<sub>ル</sub>-Glu-LysN<sub>3</sub>[PYA]は、  
(化7)



10

20

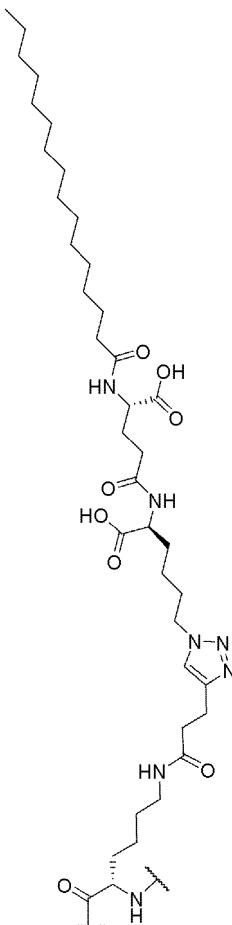
(パルミトイ<sub>ル</sub>-Glu-LysN<sub>3</sub>)[PYA]

30

を表し、[K(PYA-(パルミトイ<sub>ル</sub>-Glu-LysN<sub>3</sub>)]は  
(化8)

40

50



[K(PYA(パルミトイル-Glu-LysN3))]

:を表し、Nleはノルロイシンを表し、MerProは3-メルカプトプロピオン酸を表し、かつCysamはシステアミンを表す)

:から選択されるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む、態様22記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様24)

前記EphA2結合二環式ペプチドリガンドが、  
(化9)

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LHP[dD]W[HArg]C<sub>iii</sub> (配列番号: 24)

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)のシステイン基を表し、HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、HArgはホモアルギニンを表す)

:であるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む、態様23記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様25)

前記EphA2結合二環式ペプチドリガンドが、  
(化10)

C<sub>i</sub>[HyP]LVNPLC<sub>ii</sub>LEP[d1NaI]WTC<sub>iii</sub> (配列番号: 44)

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、第一(i)、第二(ii)、及び第三(iii)のシステイン基を表し、

10

20

30

40

50

HyPはtrans-4-ヒドロキシ-L-プロリンを表し、1Nalは1-ナフチルアラニンを表す)  
であるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む、態様23記載のヘテロタ  
ンデム二環式ペプチド複合体。

(態様26)

前記EphA2結合二環式ペプチドリガンドが任意にN-末端修飾を含み、かつ

A-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY9594と称される);

[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-A-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY6099と称される);

[PYA]-A-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY11813と称される);

Ac-A-[HArg]-D-(配列番号24)-[K(PYA)](本明細書において、BCY11814と称される);

Ac-A-[HArg]-D-(配列番号24)-K(本明細書において、BCY12734と称される);

[NMeAla]-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY13121と称される);

[Ac]-[配列番号24]-L[dH]G[dK](本明細書において、BCY13125と称される);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-VGP-(配列番号25)(本明細書において、BCY8941と称される);

Ac-A-[HArg]-D-(配列番号26)(本明細書において、BCY11815と称される);

Ac-A-[HArg]-D-(配列番号27)(本明細書において、BCY11816と称される);

Ac-A-[HArg]-D-(配列番号28)(本明細書において、BCY11817と称される);

Ac-A-[HArg]-D-(配列番号29)(本明細書において、BCY12735と称される);

(パルミトイール-Glu-LysN<sub>3</sub>)[PYA]A[HArg]D-(配列番号29)(以後、BCY14327として知られる);

Ac-A-[HArg]-D-(配列番号30)(本明細書において、BCY12736と称される);

Ac-A-[HArg]-D-(配列番号31)(本明細書において、BCY12737と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号32)(本明細書において、BCY12738と称される);

A-[HArg]-E-(配列番号32)(本明細書において、BCY12739と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号33)(本明細書において、BCY12854と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号34)(本明細書において、BCY12855と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号35)(本明細書において、BCY12856と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号35)-[dA](本明細書において、BCY12857と称される);

(配列番号35)-[dA](本明細書において、BCY12861と称される);

[NMeAla]-[HArg]-D-(配列番号35)(本明細書において、BCY13122と称される);

[dA]-ED-(配列番号35)(本明細書において、BCY13126と称される);

[dA]-[dA]-D-(配列番号35)(本明細書において、BCY13127と称される);

AD-(配列番号35)(本明細書において、BCY13128と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号36)(本明細書において、BCY12858と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号37)(本明細書において、BCY12859と称される);

Ac-(配列番号37)-[dK](本明細書において、BCY13120と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号38)(本明細書において、BCY12862と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号39)(本明細書において、BCY12863と称される);

[dA]-[HArg]-D-(配列番号39)-[dA](本明細書において、BCY12864と称される);

(配列番号40)-[dA](本明細書において、BCY12865と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号41)(本明細書において、BCY12866と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号42)(本明細書において、BCY13116と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号43)(本明細書において、BCY13117と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号44)(本明細書において、BCY13118と称される);

[dA]-[HArg]-D-(配列番号46)-[dA](本明細書において、BCY13123と称される);

[d1Nal]-[HArg]-D-(配列番号46)-[dA](本明細書において、BCY13124と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号47)(本明細書において、BCY13130と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号48)(本明細書において、BCY13131と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号49)(本明細書において、BCY13132と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号50)(本明細書において、BCY13134と称される);

A-[HArg]-D-(配列番号51)(本明細書において、BCY13135と称される);

10

20

30

40

50

(配列番号154)-[dK](本明細書において、BCY13129と称される):

A[HArg]D-(配列番号155)(本明細書において、BCY13133と称される):

A[HArg]D-(配列番号156)(本明細書において、BCY13917と称される):

A[HArg]D-(配列番号157)(本明細書において、BCY13918と称される):

A[HArg]D-(配列番号158)(本明細書において、BCY13919と称される):

A[HArg]D-(配列番号159)(本明細書において、BCY13920と称される);

A[HArg]D-(配列番号160)(本明細書において、BCY13922と称される):

A[HArg]D-(配列番号161)(本明細書において、BCY13923と称される);

A[HArg]D-(配列番号162)(本明細書において、BCY14047と称される):

A[HArg]D-(配列番号163)(本明細書において、BCY14048と称される):

A[HArg]D-(配列番号164)(本明細書において、BCY14313と称される):

(ここで、PYAは4-ペンチン酸を表し、B-Alaはβ-アラニンを表し、Sar<sub>1</sub>

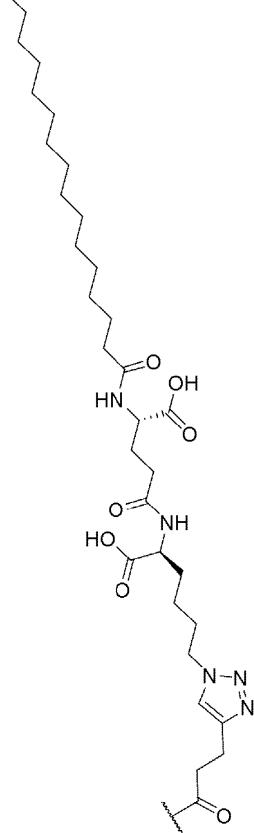
コシン単位を表し、HArgはホモアルギニンを表し、NMeAlaはN-メチル-アラニンを表し

、 $\text{NaI}$ は1-ナフチルアラニンを表し、パルミトイル-Glu-LysN<sub>3</sub>[PYA]は、

( 化 1.1 )

\_\_\_\_\_

10



### (パルミトイール-Glu-LysN3)[PYA]

20

を表す)、又はその医薬として許容し得る塩

を含む、態様23～25のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

( 態 樣 2 7 )

前記EphA2結合二環式ペプチドリガンドが任意にN-末端修飾を含み、かつ

A-[HArg]-D-(配列番号24)(本明細書において、BCY9594と称される):

(ここで、HArgはホモアルギニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩

を含む、熊様23~26のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

( 態 樣 2 8 )

30

40

(熊様 2.8.)

前記EphA2結合二環式ペプチドリガンドが任意にN-末端修飾を含み、かつA-[HArg]-D-(配列番号44)(本明細書において、BCY13118と称される):  
(ここで、HArgはホモアルギニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩を含む、態様23~26のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。  
(態様29)

BCY12491、BCY12730、BCY13048、BCY13050、BCY13053、及びBCY13272などの、表Cに掲載されている複合体のいずれか1つから選択される、態様22~28のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様30)

BCY12491である、態様29記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様31)

BCY13272である、態様29記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様32)

前記癌細胞上に存在する構成要素がPD-L1である、態様1~13のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様33)

前記PD-L1結合二環式ペプチドリガンドが、

(化12)

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>QKLHLC<sub>iii</sub> (配列番号: 52);

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[K(PYA)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号: 53);

C<sub>i</sub>SKGWLTM<sub>ii</sub>Q[K(Ac)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号: 54);

C<sub>i</sub>SAGWLT<sub>ii</sub>K[K(Ac)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号: 55);

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>K[K(Ac)]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号: 56);

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[K(Ac)]LKLC<sub>iii</sub> (配列番号: 57);

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>Q[HArg]LHLC<sub>iii</sub> (配列番号: 58); 及び

C<sub>i</sub>SAGWLTMC<sub>ii</sub>[HArg]QLNLC<sub>iii</sub> (配列番号: 59)

10

20

(ここで、C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、及びC<sub>iii</sub>は、それぞれ、第一、第二、及び第三のシステイン残基を表し、PYAは4-ペンチン酸を表し、かつHArgはホモアルギニンを表す)  
から選択されるアミノ酸配列、又はその医薬として許容し得る塩を含む、態様32記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様34)

前記PD-L1結合二環式ペプチドリガンドが任意にN-末端及び/又はC-末端修飾を含み、かつ

[PYA]-[B-Ala]-[Sar<sub>10</sub>]-SDK-(配列番号52)(本明細書において、BCY10043と称される):

Ac-D-[HArg]-(配列番号52)-PSH(本明細書において、BCY11865と称される):

Ac-SDK-(配列番号53)(本明細書において、BCY11013と称される):

Ac-SDK-(配列番号53)-PSH(本明細書において、BCY10861と称される):

Ac-D-[HArg]-(配列番号54)-PSH(本明細書において、BCY11866と称される):

Ac-D-[HArg]-(配列番号55)-PSH(本明細書において、BCY11867と称される):

Ac-D-[HArg]-(配列番号56)-PSH(本明細書において、BCY11868と称される):

Ac-D-[HArg]-(配列番号57)-PSH(本明細書において、BCY11869と称される):

Ac-SD-[HArg]-(配列番号58)-PSHK(本明細書において、BCY12479と称される):及び

Ac-SD-[HArg]-(配列番号59)-PSHK(本明細書において、BCY12477と称される):

(ここで、PYAは4-ペンチン酸を表し、B-Alaは-アラニンを表し、Sar<sub>10</sub>は10個のサルコシン単位を表し、かつHArgはホモアルギニンを表す)、又はその医薬として許容し得る塩を含む、態様33記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

30

40

50

(態様 3 5 )

表Dに掲載されている複合体のいずれか1つから選択される、態様32～34のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様 3 6 )

前記2以上の第二のペプチドリガンドが1つのCD137結合二環式ペプチドリガンド及び1つのOX40結合二環式ペプチドを含む、態様1～5のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様 3 7 )

表Fに掲載されている複合体である、態様36記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

10

(態様 3 8 )

表G及びHに掲載されている複合体のいずれか1つから選択される、態様1記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様 3 9 )

前記分子スキャフォールドが1,1',1''-(1,3,5-トリアジナン-1,3,5-トリイル)トリプロパ-2-エン-1-オン(TATA)から選択される、態様1～38のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様 4 0 )

前記医薬として許容し得る塩が、遊離酸又はナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム塩から選択される、態様1～39のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

20

(態様 4 1 )

態様1～40のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体を1以上の医薬として許容し得る賦形剤との組合せで含む、医薬組成物。

(態様 4 2 )

癌の予防、抑制、又は治療において使用するための、態様1～40のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

(態様 4 3 )

癌を治療する方法であって、態様1～40のいずれか一項記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体のインピトロEC<sub>50</sub>を上回る該複合体の血漿濃度を維持しない投薬頻度での該複合体の投与を含む、前記方法。

30

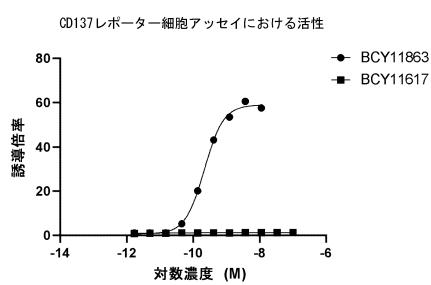
40

50

## 【図面】

## 【図 1】

A



B

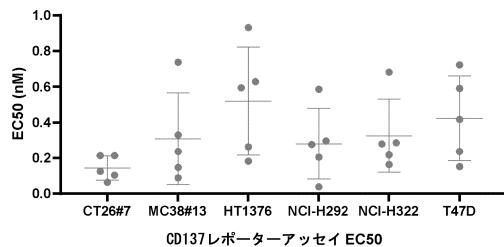
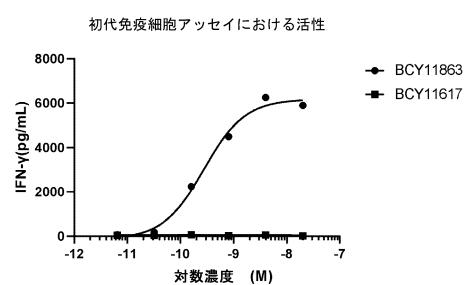


図 1

## 【図 2 A - B】

A



B

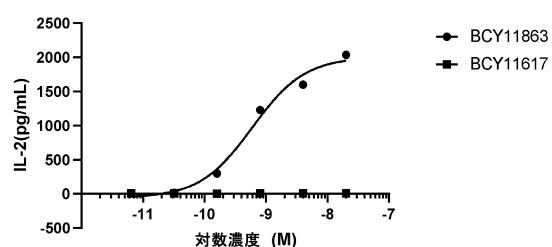


図 2

10

20

## 【図 2 C】

C

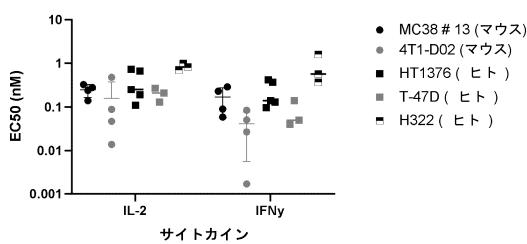


図 2 (続き)

## 【図 3】

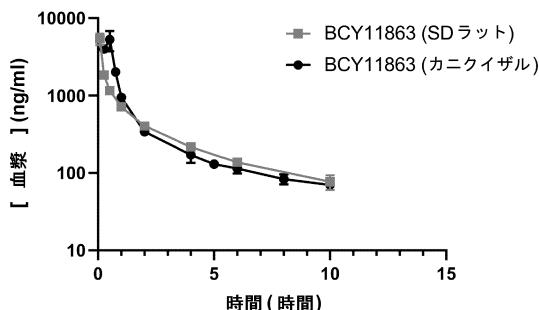


図 3

30

40

50

【図 4】

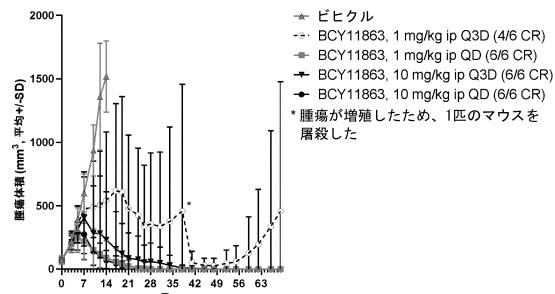


図 4

【図 5】

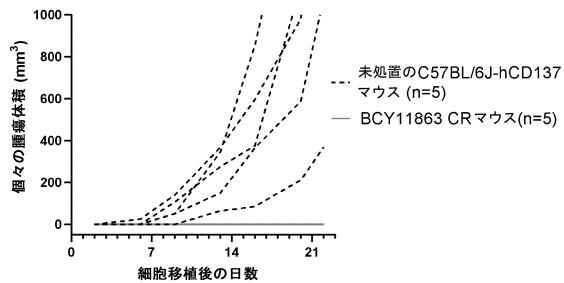


図 5

10

【図 6】

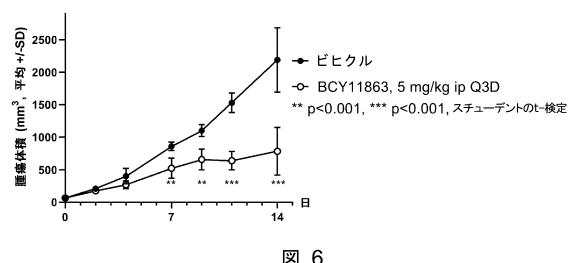
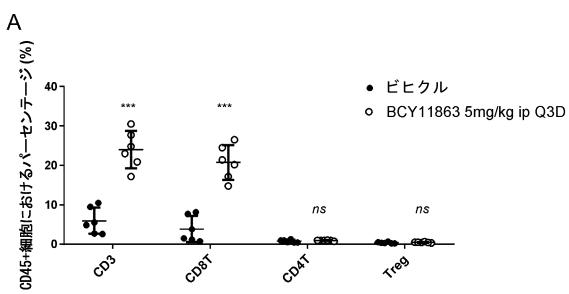


図 6

【図 7】



B

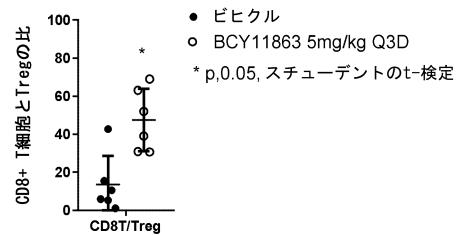


図 7

20

30

40

50

【図 8】

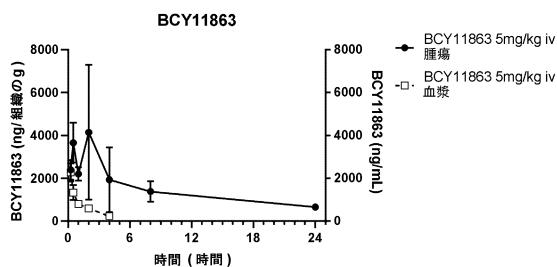


図 8

【図 9】

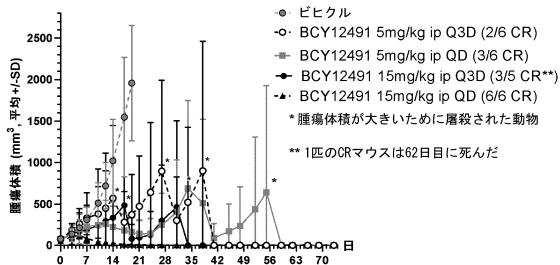
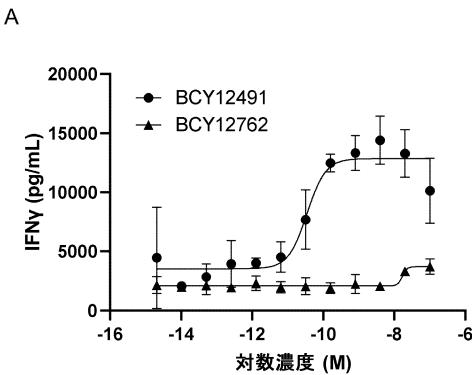


図 9

10

【図 10】



B

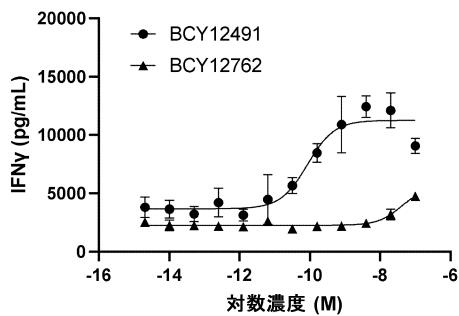


図 10

【図 11】

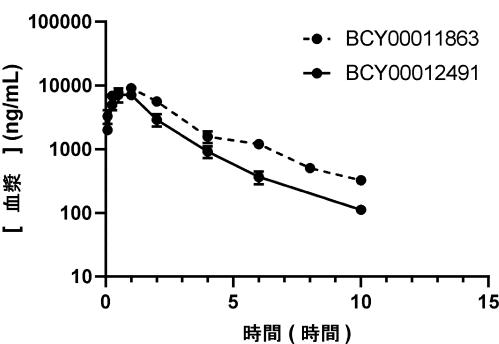


図 11

20

30

40

50

化合物	終末相半減期, $T_{1/2}$ (時間)
BCY11863	2.5
BCY12491	2.0

【図 1 2】

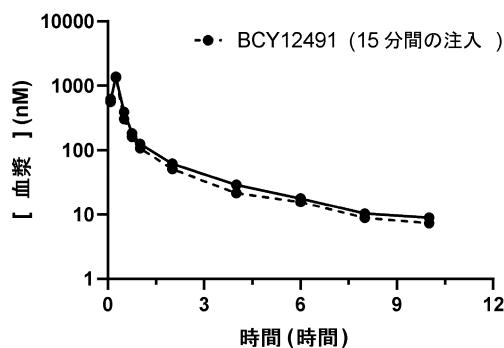
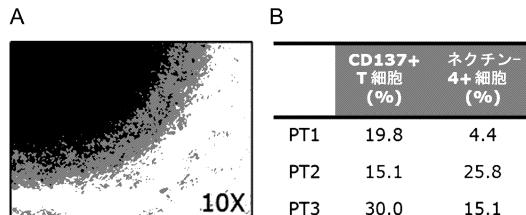


図 12

【図 1 3 A - C】



C

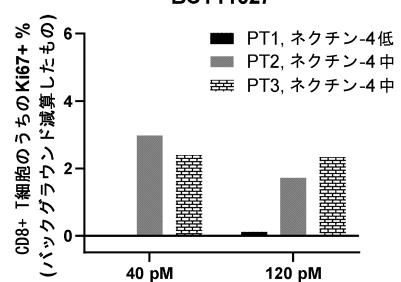


図 13

10

20

【図 1 3 D - E】

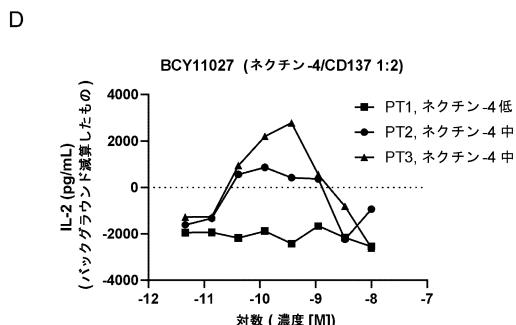


図 13 (続き)

【図 1 4】

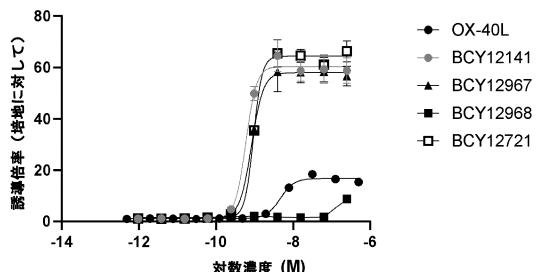


図 14

30

40

50

【図 15 A】

A

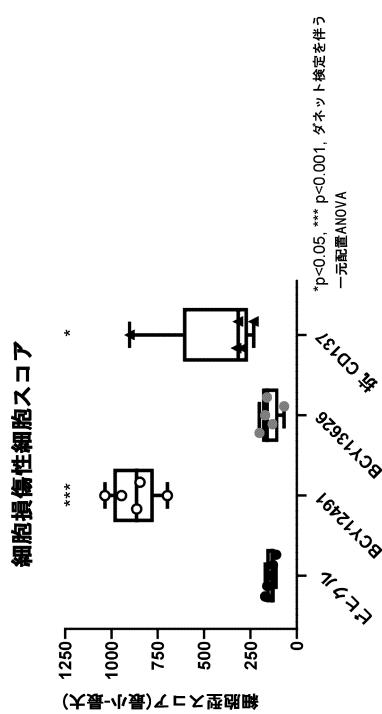


図 15

【図 15 B】

B

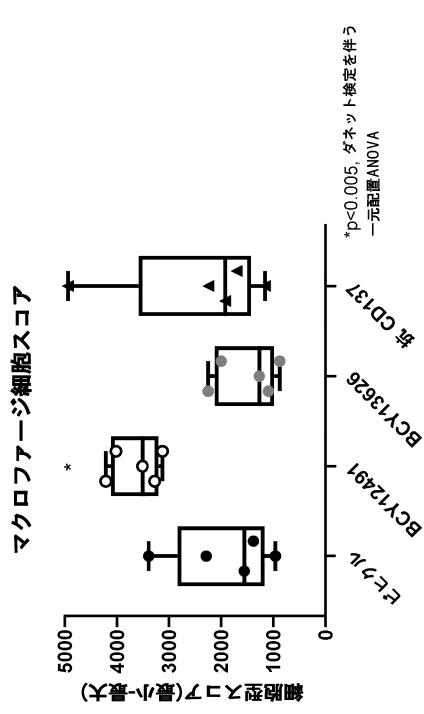


図 15 (続き)

【図 15 C】

C

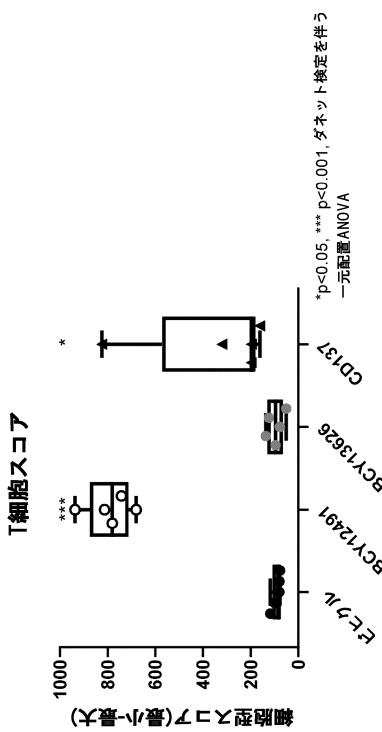


図 15 (続き)

【図 15 D】

D

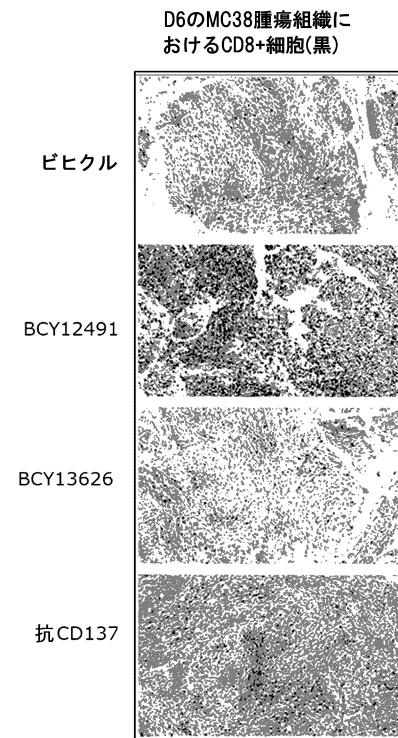


図 15 (続き)

10

20

30

40

50

【図 16】

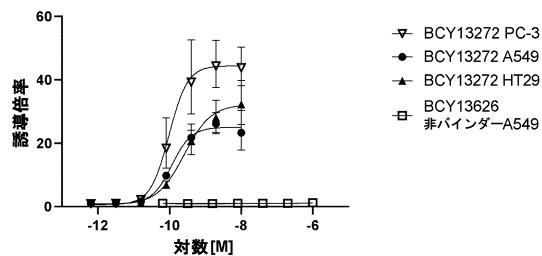


図 16

【図 17】

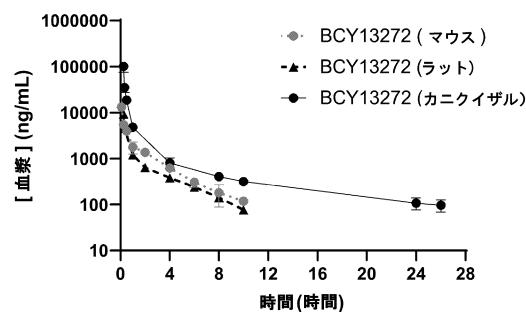


図 17

10

【図 18 A】

A

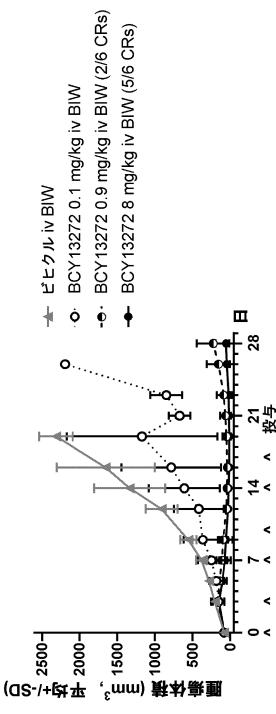


図 18

【図 18 B】

B

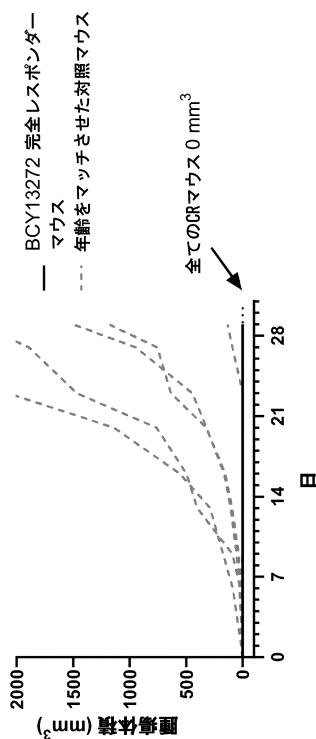


図 18 (続き)

20

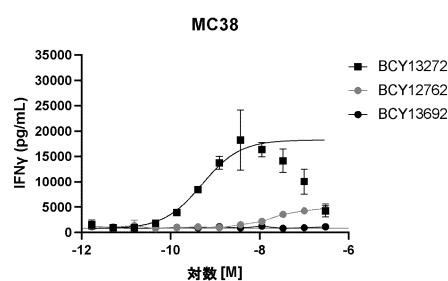
30

40

50

【図 19 A - B】

A



B

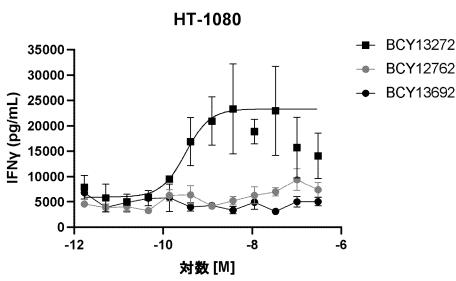


図 19

10

【図 19 C】

C

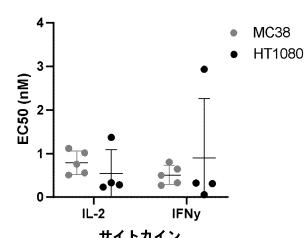
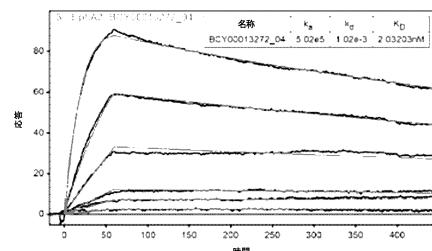


図 19(続き)

20

【図 20】

A



B

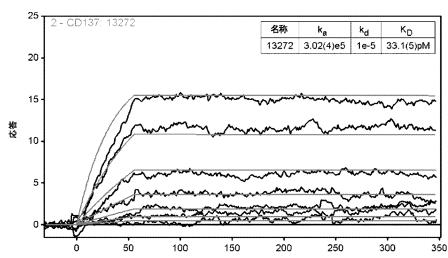
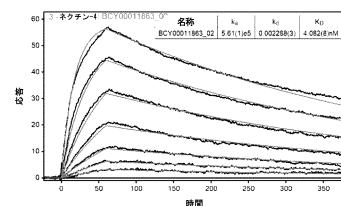


図 20

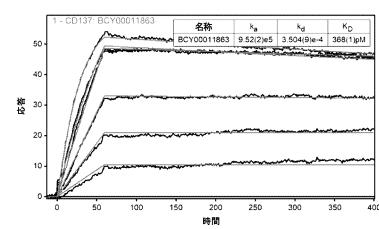
30

【図 21 A - C】

A



B



C

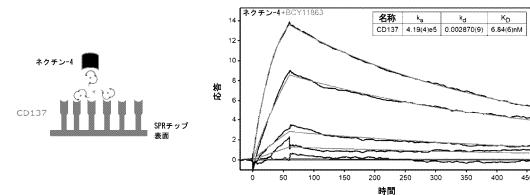


図 21

40

50

【図 21 D - E】

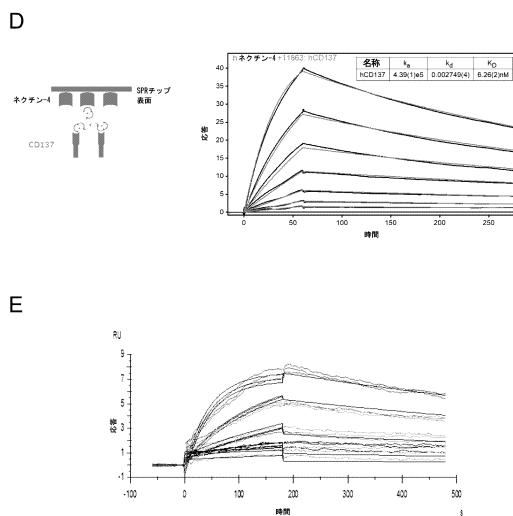


図 21 (続き)

【図 23】

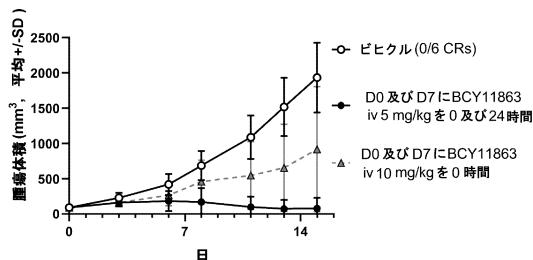


図 23

【図 22】

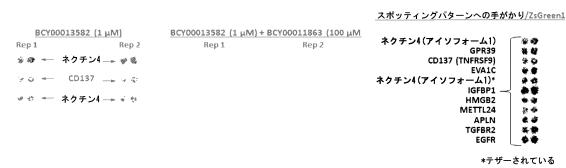


図 22

10

【図 24】

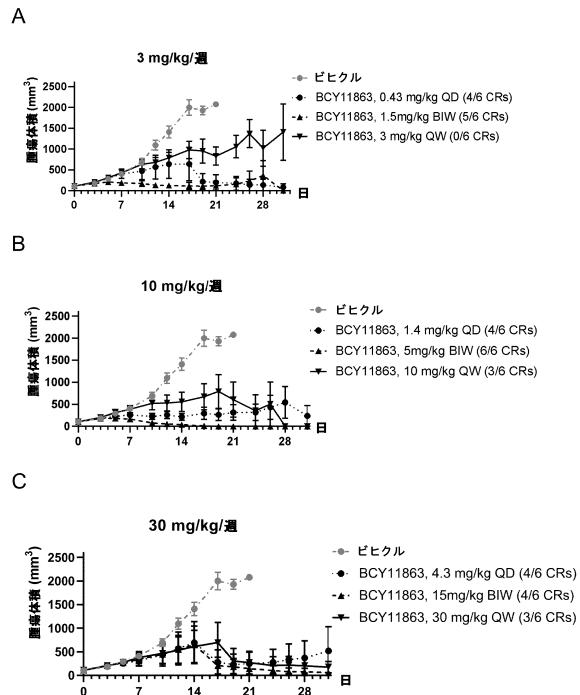


図 24

20

30

40

50

【図 25】

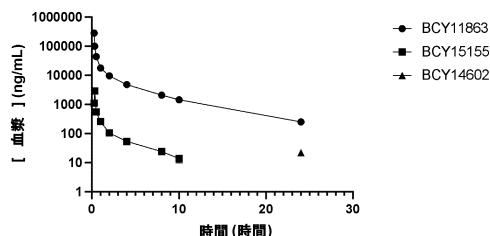


図 25

【図 26】

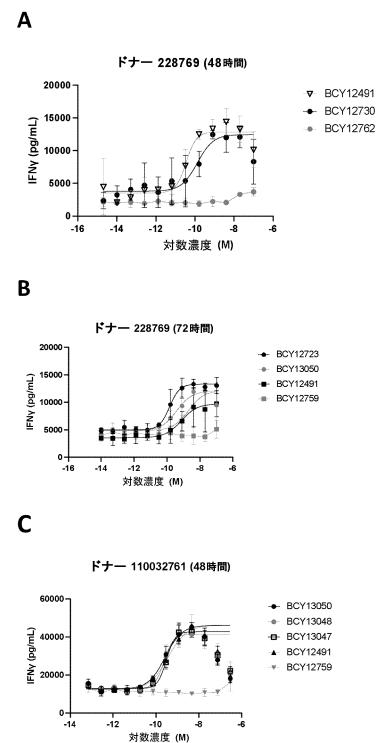


図 26

【図 27】

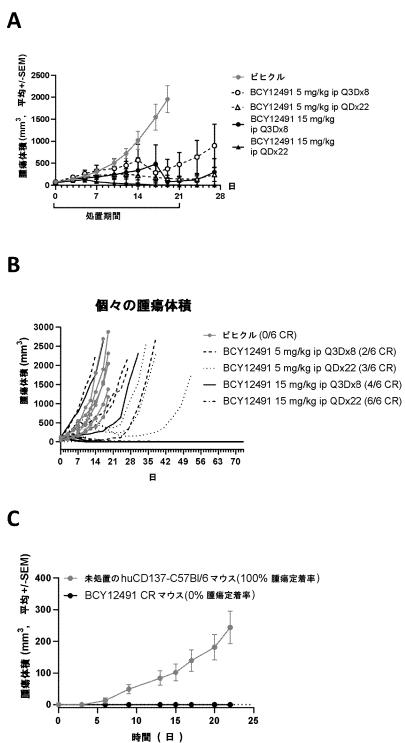


図 27

【図 28】

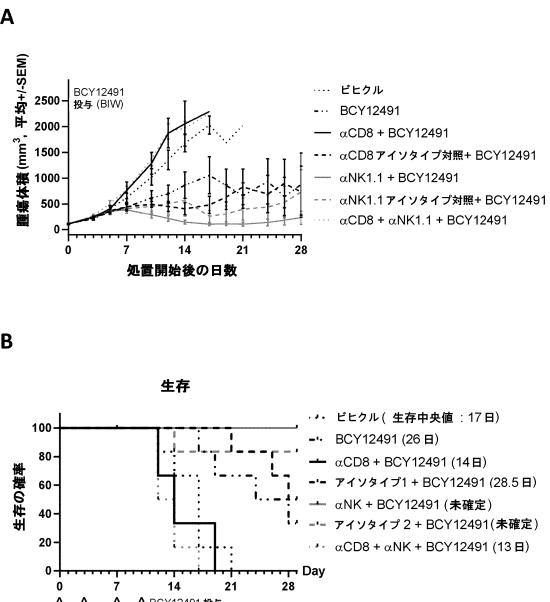


図 28

【図 29】

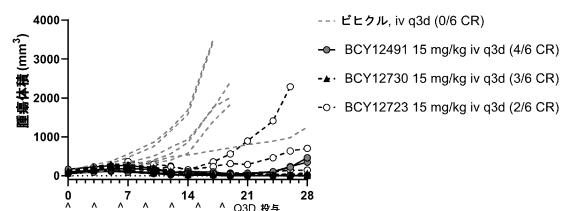


図 29

【図 30】

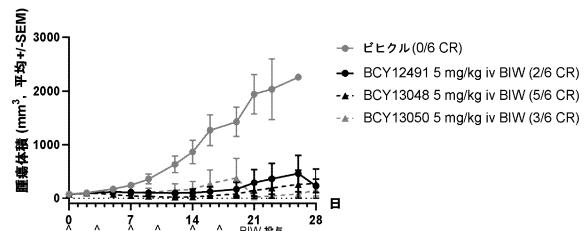


図 30

10

【配列表】

0007704732000001.app

20

30

40

50

## フロントページの続き

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 62/931,442

(32) 優先日 令和1年11月6日(2019.11.6)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 63/022,667

(32) 優先日 令和2年5月11日(2020.5.11)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 63/024,715

(32) 優先日 令和2年5月14日(2020.5.14)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

イギリス国 シービー 22 3 エイティー ケンブリッジ ベイブラハム リサーチ キャンパス ビル  
ディング 900 シー／オー バイスクリテクス リミテッド

(72) 発明者 ジョハンナ ラーデンランタ

イギリス国 シービー 22 3 エイティー ケンブリッジ ベイブラハム リサーチ キャンパス ビル  
ディング 900 シー／オー バイスクリテクス リミテッド

(72) 発明者 ジェマ マッド

イギリス国 シービー 22 3 エイティー ケンブリッジ ベイブラハム リサーチ キャンパス ビル  
ディング 900 シー／オー バイスクリテクス リミテッド

審査官 坂井田 京

(56) 参考文献 特表 2013-518807 (JP, A)

特表 2016-527180 (JP, A)

特表 2018-502825 (JP, A)

国際公開第 2017/182672 (WO, A1)

Bicycle Therapeutics to Present New BT1718 Data in the "New Drugs on the Horizon" Session at the 2018, Businesswire, 2018年04月03日, インターネット: <URL: <https://www.businesswire.com/news/home/20180403005152/en/Bicycle-Therapeutics-to-Present-New-BT1718-Data-in-the-New-Drugs-on-the-Horizon-Session-at-the-2018-American-Association-for-Cancer-Research-Meeting> >

Activation of CD137 using multivalent and tumor targeted Bicyclic peptides, Poster Presentations at the 2019 American Association for Cancer Research Meeting, 2019年07月01日, インターネット: <URL: [https://aacrjournals.org/cancerres/article/79/13\\_Supplement/3257/635439/Abstract-3257-Activation-of-CD137-using](https://aacrjournals.org/cancerres/article/79/13_Supplement/3257/635439/Abstract-3257-Activation-of-CD137-using) >

(58) 調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)