



공개특허 10-2020-0139236



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0139236
(43) 공개일자 2020년12월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C07K 14/78* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7031802
- (22) 출원일자(국제) 2019년04월02일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년11월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2019/050951
- (87) 국제공개번호 WO 2019/193328
국제공개일자 2019년10월10일
- (30) 우선권주장
1805492.4 2018년04월04일 영국(GB)
1820981.7 2018년12월21일 영국(GB)

- (71) 출원인
바이사이클티엑스 리미티드
영국, 씨비22 3에이티, 캠브리지, 바브라햄 리서치 캠퍼스, 빌딩 900
- (72) 발명자
킨 니콜라스
영국, 캠브리지 씨비22 3에이티, 바브라햄 리서치 캠퍼스, 빌딩 비900, 씨/오 바이사이클티엑스 리미티드
맥도넬 케빈
영국, 캠브리지 씨비22 3에이티, 바브라햄 리서치 캠퍼스, 빌딩 비900, 씨/오 바이사이클티엑스 리미티드
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한얼

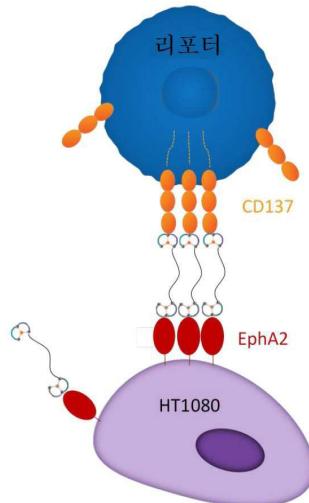
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 헤테로坦덤 비사이클릭 웨პ티드 복합체

(57) 요약

본 발명은 암세포 상에 존재하는 성분에 결합하는 제2 웨პ티드 리간드에 링커를 통해 접합된, 면역세포 상에 존재하는 성분에 결합하는 제1 웨პ티드 리간드를 포함하는 헤테로坦덤 비사이클릭 웨პ티드 복합체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 암을 예방하거나 억제하거나 치료함에 있어서 상기 헤테로坦덤 비사이클릭 웨პ티드 복합체의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/47 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
C07K 14/70575 (2013.01)
C07K 14/78 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

박 피터

영국, 캠브리지 씨비22 3에이티, 바브라함 리서치
캠퍼스, 빌딩 비900, 씨/오 바이사이클티엑스 리미
티드

우파디야야 푸닛

영국, 캠브리지 씨비22 3에이티, 바브라함 리서치
캠퍼스, 빌딩 비900, 씨/오 바이사이클티엑스 리미
티드

퍼드 챔마

영국, 캠브리지 씨비22 3에이티, 바브라함 리서치
캠퍼스, 빌딩 비900, 씨/오 바이사이클티엑스 리미
티드

명세서

청구범위

청구항 1

(b) 면역세포 상에 존재하는 성분에 결합하는 제2 펩티드 리간드;

예 링커를 통해 접합된

(a) 면역세포 상에 존재하는 성분에 결합하는 제1 펩티드 리간드를 포함하는 헤테로坦덤 비사이클릭 펩티드 복합체(heterotandem bicyclic peptide complex)로서, 상기 각각의 펩티드 리간드가, 적어도 2개의 루프 서열(loop sequence)에 의해 분리된 적어도 3개의 시스테인 잔기를 포함하는 폴리펩티드, 및 적어도 2개의 폴리펩티드 루프가 문자 스캐폴드(molecular scaffold) 상에 형성되도록 상기 폴리펩티드의 시스테인 잔기와 공유 결합을 형성하는 문자 스캐폴드를 포함하는 헤테로坦덤 비사이클릭 펩티드 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

면역세포가 백혈구; 림프구(예를 들어, T 림프구 또는 T 세포, B 세포 또는 자연살해세포); CD8 또는 CD4; CD8; 수지상 세포(dendritic cell), 여포수지상 세포 및 과립구 중에서 선택되는 헤테로坦덤 비사이클릭 펩티드 복합체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

면역세포 상에 존재하는 성분이 CD137인 헤테로坦덤 비사이클릭 펩티드 복합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 펩티드 리간드가 CD137 결합 비사이클릭 펩티드 리간드를 포함하는 헤테로坦덤 비사이클릭 펩티드 복합체.

청구항 5

제4항에 있어서,

CD137 결합 비사이클릭 펩티드 리간드가

C_i IEEGQYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii} (서열번호 1);

C_i [tBuAla]PE[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii} (서열번호 3);

C_i IEEGQYC_{ii}F[D-Ala]DPY[N1e]C_{iii} (서열번호 4);

C_i [tBuAla]PK[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii} (서열번호 5);

C_i [tBuAla]PE[D-Lys]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii} (서열번호 6);

C_i [tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii} (서열번호 7);

C_i [tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii} (서열번호 8);

C_i IEE[D-Lys(PYA)]QYC_{ii}FADPY(N1e)C_{iii} (서열번호 9); 및

[dC_i][dI][dE][dE][K(PYA)][dQ][dY][dC_{ii}][dF][dA][dD][dP][dY][dN1e][dC_{iii}] (서열번호 10)

중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 여기에서 C_i , C_{ii} 및 C_{iii} 가 각각 제1, 제2 및 제3 시스테인 잔기를 나타내고, Nle가 노르류신을 나타내고, tBuAla가 t-부틸-알라닌을 나타내고, PYA가 4-펜티노산 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타내는 헤테로텐덤 비사이클릭 웨티드 복합체.

청구항 6

제5항에 있어서,

CD137 결합 비사이클릭 웨티드 리간드가 N- 및 C-말단 변형을 포함하고

Ac-A-(서열번호 1)-Dap (본원에서 이후에 BCY7732로서 지칭함);

Ac-A-(서열번호 1)-Dap(PYA) (본원에서 이후에 BCY7741로서 지칭함);

Ac-(서열번호 3)-Dap (본원에서 이후에 BCY9172로서 지칭함);

Ac-(서열번호 3)-Dap(PYA) (본원에서 이후에 BCY11014로서 지칭함);

Ac-A-(서열번호 4)-Dap (본원에서 이후에 BCY8045로서 지칭함);

Ac-(서열번호 5)-A (본원에서 이후에 BCY8919로서 지칭함);

Ac-(서열번호 6)-A (본원에서 이후에 BCY8920로서 지칭함);

Ac-(서열번호 7)-A (본원에서 이후에 BCY8927로서 지칭함);

Ac-(서열번호 8)-A (본원에서 이후에 BCY8928로서 지칭함);

Ac-A-(서열번호 9)-A (본원에서 이후에 BCY7744로서 지칭함); 및

Ac-[dA]-(서열번호 10)-[dA]-NH₂ (본원에서 이후에 BCY11506로서 지칭함)

을 포함하며, 여기에서 Ac가 아세틸기를 나타내고, Dap가 디아미노프로피온산을 나타내고, PYA가 4-펜티노산 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타내는 헤테로텐덤 비사이클릭 웨티드 복합체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

암세포가 HT1080, SC-OV-3, PC3, H1376, NCI-H292, LnCap, MC38, 및 RKO 종양 세포 중에서 선택되는 헤테로텐덤 비사이클릭 웨티드 복합체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

암세포 상에 존재하는 성분이 EphA2인 헤�테로텐덤 비사이클릭 웨티드 복합체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 웨티드 리간드가 EphA2 결합 비사이클릭 웨티드 리간드를 포함하는 헤�테로텐덤 비사이클릭 웨티드 복합체.

청구항 10

제9항에 있어서,

EphA2 결합 비사이클릭 웨티드 리간드가:

$C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii}$ (서열번호 2); 및

$C_iLWDPTPC_{ii}ANLHL[HArg]C_{iii}$ (서열번호 11)

중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 여기에서 C_i , C_{ii} 및 C_{iii} 가 각각 제1, 제2 및 제3 시스테인 잔기를 나타내고, Nle가 노르류신을 나타내고, tBuAla가 t-부틸-알라닌을 나타내고, PYA가 4-펜티노산 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타내는 헤�테로텐덤 비사이클릭 웨티드 복합체.

타내고, HyP가 하이드록시프롤린을 나타내고, dD가 D-배열의 아스파트산(aspartic acid)을 나타내고, HArg가 호모아르기닌, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타내는 헤테로텐덤 비사이클릭 웨პ티드 복합체.

청구항 11

제10항에 있어서,

EphA2 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드가 N-말단 변형을 포함하고

A-HArg-D-(서열번호 2) (본원에서 이후에 BCY9594로서 지칭함);

[B-Ala]-[Sar₁₀]-A-[HArg]-D-(서열번호 2) (본원에서 이후에 BCY6099로서 지칭함);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-A-[HArg]-D-(서열번호 2) (본원에서 이후에 BCY6169로서 지칭함); 및

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-VGP-(서열번호 11) (본원에서 이후에 BCY8941로서 지칭함)

을 포함하며, 여기에서 HArg가 호모아르기닌을 나타내고, PYA가 4-펜티노산을 나타내고, Sar₁₀이 10개의 사르코신 단위를 나타내고, B-Ala가 베타-알라닌, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타내는 헤�테로텐덤 비사이클릭 웨პ티드 복합체.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

BCY9173, BCY7985, BCY8942, BCY8943, BCY9647, BCY9648, BCY9655, BCY9656, BCY9657, BCY9658, BCY9659, BCY9758, BCY10568, BCY10570, BCY10574, BCY10575, BCY10576 및 BCY10577 중에서 선택된 CD137/EphA2 복합체인 헤�테로텐덤 비사이클릭 웨პ티드 복합체.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

암세포 상에 존재하는 성분이 PD-L1인 헤�테로텐덤 비사이클릭 웨პ티드 복합체.

청구항 14

제1항 내지 제7항 및 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 웨პ티드 리간드가 PD-L1 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드를 포함하는 헤�테로텐덤 비사이클릭 웨პ티드 복합체.

청구항 15

제14항에 있어서,

PD-L1 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드가

C_i[HArg]DWC_{ii}HWTFSHGHP_{iii} (서열번호 12);

C_iSAGWLTMC_{ii}QKLHLC_{iii} (서열번호 13); 및

C_iSAGWLTMC_{ii}Q[K(PYA)]LHLC_{iii} (서열번호 14)

중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 여기에서 C_i, C_{ii} 및 C_{iii}가 각각 제1, 제2 및 제3 시스테인 잔기를 나타내고, HArg가 호모아르기닌을 나타내고, PYA가 4-펜티노산, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타내는 헤�테로텐덤 비사이클릭 웨პ티드 복합체.

청구항 16

제15항에 있어서,

PD-L1 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드가 N-말단 및/또는 C-말단 변형을 포함하고

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-**(서열번호 12)** (본원에서 이후에 BCY8938로서 지칭함);

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-SDK-**(서열번호 13)** (본원에서 이후에 BCY10043로서 지칭함);

NH₂-SDK-**(서열번호 13)-[Sar₁₀]-[K(PYA)]** (본원에서 이후에 BCY10044로서 지칭함);

NH₂-SDK-**(서열번호 14)** (본원에서 이후에 BCY10045로서 지칭함); 및

Ac-SDK-**(서열번호 14)-PSH** (본원에서 이후에 BCY10861로서 지칭함)

를 포함하며, 여기에서 PYA가 4-펜티노산을 나타내고, B-Ala가 베타-알라닌을 나타내고, Sar₁₀이 10개의 사르코신 단위, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타내는 헤테로랜덤 비사이클릭 웨티드 복합체.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

BCY8939, BCY10580, BCY10581, BCY10582, BCY11017, BCY11018, BCY11019, BCY11376, BCY11377, BCY11378, BCY11379, BCY11380 및 BCY11381 중에서 선택된 CD137/PD-L1 복합체인 헤�테로랜덤 비사이클릭 웨티드 복합체.

청구항 18

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

암세포 상에 존재하는 성분이 넥틴-4인 헤�테로랜덤 비사이클릭 웨티드 복합체.

청구항 19

제1항 내지 제7항 및 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 웨티드 리간드가 넥틴-4 결합 비사이클릭 웨티드 리간드를 포함하는 헤�테로랜덤 비사이클릭 웨티드 복합체.

청구항 20

제19항에 있어서,

넥틴-4 결합 비사이클릭 웨티드 리간드가

C_iP[1Na1][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} **(서열번호 15; 본원에서 이후에 BCY8116로서 지칭함);**

C_iP[1Na1][dD]C_{ii}M[HArg]D[dW]STP[HyP][dW]C_{iii} **(서열번호 16; 본원에서 이후에 BCY11415로서 지칭함); 및**

C_iP[1Na1][dK](Sar₁₀-(B-Ala))C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} **(서열번호 17);**

C_iPFGC_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii} **(서열번호 18; 본원에서 이후에 BCY11414로서 지칭함)**

중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 여기에서 C_i, C_{ii} 및 C_{iii}가 각각 제1, 제2 및 제3 시스테인 잔기를 나타내고, 1Na1이 1-나프탈알라닌을 나타내고, HArg가 호모아르기닌을 나타내고, HyP가 하이드록시프롤린을 나타내고, Sar₁₀이 10개의 사르코신 단위를 나타내고, B-Ala가 베타-알라닌, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타내는 헤�테로랜덤 비사이클릭 웨티드 복합체.

청구항 21

제20항에 있어서,

넥틴-4 결합 비사이클릭 웨티드 리간드가 N-말단 변형을 임의로 포함하고

서열번호 15 **(본원에서 이후에 BCY8116로서 지칭함);**

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-**(서열번호 15)** **(본원에서 이후에 BCY8846로서 지칭함);**

서열번호 16 **(본원에서 이후에 BCY11415로서 지칭함);**

[PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-(서열번호 16) (본원에서 이후에 BCY11942로서 지칭함);

Ac-(서열번호 17) (본원에서 이후에 BCY8831로서 지칭함); 및

서열번호 18 (본원에서 이후에 BCY11414로서 지칭함)

을 포함하며, 여기에서 PYA가 4-펜티노산을 나타내고, B-Ala가 베타-알라닌을 나타내고, Sar₁₀이 10개의 사르코신 단위, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타내는 헤테로탠덤 비사이클릭 웨프티드 복합체.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

BCY8854, BCY9350, BCY9351, BCY9399, BCY9400, BCY9401, BCY9403, BCY9405, BCY9406, BCY9407, BCY9408, BCY9409, BCY9410, BCY9411, BCY9759, BCY10000, BCY10567, BCY10569, BCY10571, BCY10572, BCY10573, BCY10578, BCY10917, BCY11020, BCY11373, BCY11374, BCY11375, BCY11616, BCY11617, BCY11857, BCY11858 및 BCY11859 중에서 선택된 CD137/넥틴-4 복합체인 헤�테로탠덤 비사이클릭 웨프티드 복합체.

청구항 23

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

암세포 상에 존재하는 성분이 PSMA인 헤�테로탠덤 비사이클릭 웨프티드 복합체.

청구항 24

제1항 내지 제7항 및 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 웨프티드 리간드가 PSMA 결합 비사이클릭 웨프티드 리간드를 포함하는 헤�테로탠덤 비사이클릭 웨프티드 복합체.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

링커가 -CH₂- , -PEG₅- , -PEG₁₀- , -PEG₁₂- , -PEG₂₃- , -PEG₂₄- , -PEG₁₅-Sar₅- , -PEG₁₀-Sar₁₀- , -PEG₅-Sar₁₅- , -PEG₅-Sar₅- , -B-Ala-Sar₂₀- , -B-Ala-Sar₁₀-PEG₁₀- , -B-Ala-Sar₅-PEG₁₅- 및 -B-Ala-Sar₅-PEG₅- 중에서 선택되는 헤�테로탠덤 비사이클릭 웨프티드 복합체.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

분자 스캐폴드가 1,1',1"-(1,3,5-트리아지난-1,3,5-트리일)트리프로프-2-엔-1-온(TATA) 중에서 선택되는 헤�테로탠덤 비사이클릭 웨프티드 복합체.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

약학적으로 허용 가능한 염이 유리산 또는 나트륨, 칼륨, 칼슘, 암모늄 염 중에서 선택되는 헤�테로탠덤 비사이클릭 웨프티드 복합체.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 헤�테로탠덤 비사이클릭 웨프티드 복합체를 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 포함하는 약학 조성물.

청구항 29

암을 예방하거나, 억제하거나 또는 치료하는데 사용하기 위한, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 헤�테로탠덤 비사이클릭 웨프티드 복합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 링커를 통해, 암세포 상에 존재하는 성분에 결합하는 제2 펩티드 리간드에 접합된, 면역세포 상에 존재하는 성분에 결합하는 제1 펩티드 리간드를 포함하는 혼테로坦덤 비사이클릭 펩티드 복합체(heterotandem bicyclic peptide complex)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 암을 예방하거나 억제하거나 치료함에 있어서 상기 혼테로坦덤 비사이클릭 펩티드 복합체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

사이클릭 펩티드는 단백질 표적에 높은 친화성과 표적 특이성으로 결합할 수 있으며 따라서 치료제의 개발에 매력적인 분자 부류이다. 실제로, 다수의 사이클릭 펩티드가 이미 임상에 성공적으로 사용되고 있으며, 예로서 항균 펩티드 반코마이신, 면역억제성 약물 사이클로스포린 또는 항암 약물 옥트레오티드가 있다(Driggers *et al.* (2008), *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 608-24). 양호한 결합 성질은 상기 펩티드와 표적간에 형성된 비교적 큰 상호작용 표면뿐만 아니라 사이클릭 구조의 감소된 입체형태적 가요성으로부터 생성된다. 전형적으로, 마크로사이클은 수백 제곱 옹스트롬의 표면에 결합하며, 예로서 사이클릭 펩티드 CXCR4 길항제 CVX15(400 \AA^2 ; Wu *et al.* (2007), *Science* 330, 1066-71), 인테그린 α Vb3에 결합하는 Arg-Gly-Asp 동기를 갖는 사이클릭 펩티드(355 \AA^2)(Xiong *et al.* (2002), *Science* 296 (5565), 151-5) 또는 유로키나제-형 플라스미노겐 활성제에 결합하는 사이클릭 펩티드 억제제 유페인-1(603 \AA^2 ; Zhao *et al.* (2007), *J Struct Biol* 160 (1), 1-10)이 있다.

[0003]

펩티드 마크로사이클은 그의 사이클릭 배열로 인해 선형 펩티드보다 덜 가요성이어서, 표적에 결합시 보다 적은 엔트로피 손실을 도출하며 보다 높은 결합 친화성을 생성시킨다. 상기 감소된 가요성은 또한 표적-특이성 입체 형태의 고정을 유도하여, 선형 펩티드에 비해 결합 특이성을 증가시킨다. 상기 효과는 기질 메탈로프로테이나제 8(MMP-8)의 효능있고 선택적인 억제제에 의해 예시되었으며, 상기 억제제는 개활시 다른 MMP에 비해 그의 선택성을 상실한다(Cherney *et al.* (1998), *J Med Chem* 41 (11), 1749-51). 거대환화(macrocyclization)를 통해 성취된 유리한 결합 성질은 예를 들어 반코마이신, 나신 및 액티노마이신에서와 같이 하나 초파의 펩티드 고리를 갖는 멀티사이클릭 펩티드에서 훨씬 더 현저하다.

[0004]

각양각색의 연구팀들이 앞서 시스테인 잔기를 갖는 폴리펩티드를 합성 분자 구조로 묶었다(Kemp and McNamara (1985), *J. Org. Chem.*; Timmerman *et al.* (2005), *ChemBioChem*). 멜로엔(Meloen)과 동료들은 단백질 표면의 구조적 모방을 위해 합성 스캐폴드상의 다수의 펩티드 루프의 신속하고 정량적인 환화에 트리스(브로모메틸)벤젠 및 관련 분자를 사용하였다(Timmerman *et al.* (2005), *ChemBioChem*). 예를 들어 트리스(브로모메틸)벤젠과 같이 분자 스캐폴드(molecular scaffold)에 시스테인 함유 폴리펩티드를 연결시킴으로써 생성되는 후보 약물 화합물의 생성 방법이 WO 2004/077062 및 WO 2006/078161에 개시되어 있다.

[0005]

관심 표적에 대한 비사이클릭 펩티드의 큰 라이브러리를 생성시키고 선별하기 위한 파지 디스플레이-기반의 조합적 접근법이 개발되었다(Heinis *et al.* (2009), *Nat Chem Biol* 5 (7), 502-7 및 WO 2009/098450). 간단히, 3개의 시스테인 잔기 및 6개 랜덤 아미노산의 2개 영역을 함유하는 선형 펩티드(Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys)의 조합적 라이브러리를 파지상에 디스플레이하고 상기 시스테인 측쇄를 소분자(트리스-(브로모메틸)벤젠)에 공유 결합시킴으로써 환화시켰다.

발명의 내용

[0006]

본 발명의 첫 번째 태양에 따라,

[0007]

(b) 암세포 상에 존재하는 성분에 결합하는 제2 펩티드 리간드;

[0008]

에 링커를 통해 접합된

[0009]

(a) 면역세포 상에 존재하는 성분에 결합하는 제1 펩티드 리간드를 포함하는 혼테로坦덤 비사이클릭 펩티드 복합체를 제공하며, 여기에서 상기 각각의 펩티드 리간드는 적어도 2개의 루프 서열(loop sequence)에 의해 분리된 적어도 3개의 시스테인 잔기를 포함하는 폴리펩티드, 및 적어도 2개의 폴리펩티드 루프가 분자 스캐폴드상에 형성되도록 상기 폴리펩티드의 시스테인 잔기와 공유 결합을 형성하는 분자 스캐폴드를 포함한다.

- [0010] 본 발명의 추가의 태양에 따라, 본원에 정의된 바와 같은 헤테로랜덤 비사이클릭 웨티드 복합체를 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 추가의 태양에 따라, 암을 예방하거나 억제하거나 치료하는데 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 헤�테로랜덤 비사이클릭 웨티드 복합체를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0012] **도 1:** 면역세포와 암세포 모두에 결합하는 EphA2 및 CD137 웨티드 리간드를 포함하는 헤�테로랜덤 비사이클릭 웨티드 복합체의 도식적 표현.
- 도 2:** EphA2-CD137 헤�테로랜덤 비사이클릭 웨티드 복합체 BCY7985의 구조 및 조성.
- 도 3:** EphA2-발현 HT1080 세포 존재하의 프로메가 CD137 루시페라제 리포터 분석(CS196008)에서의 EphA2-CD137 헤�테로랜덤 비사이클릭 웨티드 복합체 BCY7985의 분석.
- 도 4:** EphA2/CD137 헤�테로랜덤은 CD137 리포터 분석에서 활성이며 활성화 유도배수는 공-배양에 사용된 세포주상에서의 종양 표적 발현 수준에 의존한다.
- 도 5:** EphA2/CD137 헤�테로랜덤은 1차 인간 T-세포 및 암세포 공-배양 분석에서 종양세포 사멸을 유도한다. 종양세포 사멸을, 시간에 걸쳐 생존가능한 뉴클라이트(Nuclight) 레드 양성 종양 세포를 카운트하여 평가한다. 세포사멸성 종양 세포를 식별하기 위해 카스파제 3/7 염료를 사용한다.
- 도 6:** 넥틴-4/CD137 헤�테로랜덤은 CD137 리포터 분석에서 활성이며 활성화 유도배수는 공-배양에 사용된 세포주상에서의 종양 표적 발현 수준(HT1376: 넥틴-4 고 및 NCI-H292: 넥틴-4 중간)에 의존한다.
- 도 7:** 넥틴-4/CD137 헤�테로랜덤은 PBMC-4T1 공-배양 분석에서 IL-2 및 IFN- γ 사이토카인 분비를 유도한다. BCY9350 및 BCY9351은 각각 넥틴-4 및 CD137에 대한 비-결합 대조용이다.
- 도 8:** 넥틴-4/CD137 헤�테로랜덤은 1차 환자-유래된 폐 종양의 생체외 배양물에서 표적 의존성 사이토카인 방출을 유도한다. (A) 배양 4h 이내의 생체외 환자 유래된 종양 세포 형태 3D 회전타원체, 광학현미경하에서 10X상. (B) 3명의 공여자로부터의 환자 유래된 종양 샘플에서 넥틴-4 발현의 유식 분석. (C) 표는 3명의 공여자 샘플 중 $\%CD137^+$ T 세포 및 넥틴-4 $^+$ 세포를 나타낸다. (D) 대조용/시험 화합물에 의한 처리에 반응하는 면역 마커의 변화%(비히클에 표준화된)를 나타내는 열지도. (E) 대조용/시험 화합물에 의한 처리에 반응하는 $\%CD8^+ki67^+$ T 세포(비히클은 점선으로 나타내었다).
- 도 9:** PL-L1/CD137 헤�테로랜덤은 PD-L1 발현 세포주 RKO 존재하의 CD137 리포터 분석에서 활성이다.
- 도 10:** SD 래트에서 헤�테로랜덤의 약동학: BCY10572 및 BCY10000을 2 mg/kg으로 IV 투여하였다(n=3).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 첫 번째 태양에 따라,
- [0014] (b) 암세포 상에 존재하는 성분에 결합하는 제2 웨티드
- [0015]에 링커를 통해 접합된
- [0016] (a) 면역세포 상에 존재하는 성분에 결합하는 제1 웨티드 리간드를 포함하는 헤�테로랜덤 비사이클릭 웨티드 복합체를 제공하며, 여기에서 상기 각각의 웨티드 리간드는 적어도 2개의 루프 서열에 의해 분리된 적어도 3개의 시스테인 잔기를 포함하는 폴리웨티드, 및 적어도 2개의 폴리웨티드 루프가 문자 스캐폴드상에 형성되도록 상기 폴리웨티드의 시스테인 잔기와 공유 결합을 형성하는 문자 스캐폴드를 포함한다.
- [0017] 제1 웨티드 리간드
- [0018] 본원에서 "면역세포"란 용어에 대한 언급은 면역계내의 임의의 세포를 포함한다. 적합한 예는 백혈구, 예를 들어 림프구(예를 들어 T 림프구 또는 B 세포, B 세포 또는 자연살해세포)를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 T 세포는 CD8 또는 CD4이다. 추가의 실시태양에서, 상기 T 세포는 CD8이다. 면역세포의 다른 예는 수지상 세포(dendritic cell), 여포수지상 세포 및 과립구를 포함한다.

- [0019] 하나의 실시태양에서, 면역세포 상에 존재하는 성분은 CD137이다.
- [0020] CD137은 종양괴사인자(TNF) 수용체과의 구성원이다. 그의 또 다른 명칭은 종양괴사인자 수용체 상과 구성원 9(TNFRSF9), 4- IBB이며, 림프구 활성화(ILA)에 의해 유도된다. CD137은 활성화된 T 세포에 의해 발현될 수 있지만, CD4+ T 세포 상에서보다는 CD8+상에서 더 큰 정도로 발현될 수 있다. 또한, CD137 발현은 수지상 세포, 여포수지상 세포, 자연살해세포, 과립구 및 염증부위의 혈관벽 세포 상에서 발견된다. CD137의 한 가지 특징적인 활성은 활성화된 T 세포에 대한 그의 공동자극 활성이다. CD137의 교차결합은 T 세포 증식, IL-2 분비, 생존 및 세포용해 활성을 증대시킨다. 더욱이, 상기는 면역활성을 증대시켜 마우스 중의 종양을 제거할 수 있다.
- [0021] CD137은 TCR 활성화시 유도된 T-세포 공동자극 수용체이다(Nam et al., *Curr. Cancer Drug Targets*, 5:357-363 (2005); Waits et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 23:23-68 (2005)). 활성화된 CD4+ 및 CD8+ T 세포 상에서의 발현 외에, CD137은 또한 CD4+CD25+ 조절 T 세포, 자연살해(NK) 및 NK-T 세포, 단핵구, 호중구, 및 수지상 세포 상에서 발현된다. 그의 천연 리간드, CD137L은 B 세포, 단핵구/대식세포, 및 수지상 세포를 포함한 항원-제시 세포 상에서 기재되었다(Watts et al. *Annu. Rev. Immunol.*, 23:23-68 (2005)). CD137은 그의 리간드와 상호작용시, 증가된 TCR-유도된 T-세포 증식, 사이토카인 생성, 기능성 성숙화, 및 연장된 CD8+ T-세포 생존을 도출한다(Nam et al., *Curr. Cancer Drug Targets*, 5:357-363 (2005), Watts et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 23:23-68 (2005)).
- [0022] CD137L 또는 CD137에 대한 작용성 단클론 항체(mAb)에 의한 CD137을 통한 신호전달은 증가된 TCR-유도된 T 세포 증식, 사이토카인 생성 및 기능성 성숙화, 및 연장된 CD8+ T 세포 생존을 도출한다. 이들 효과는 (1) NF- κ B, c-Jun NH2-말단 키나제/스트레스-활성화된 단백질 키나제(JNK/SAPK), 및 p38 미토젠-활성화된 단백질 키나제(MAPK) 신호전달 경로의 활성화, 및 (2) 항-세포사멸 및 세포주기-관련 유전자 발현의 조절로부터 생성된다.
- [0023] CD137 및 CD127L-결합 마우스에서 수행된 실험은 충분한 수용성 T 세포 반응의 생성에서 CD137 공동자극의 중요성을 추가로 입증하였다.
- [0024] IL-2 및 IL-15 활성화된 NK 세포는 CD137을 발현하며, 작용성 mAb에 의한 CD137의 결합은 NK 세포 증식 및 IFN- γ 분비를 자극하지만, 세포용해 활성을 자극하지 않는다.
- [0025] 더욱 또한, CD137-자극된 NK 세포는 시험관내에서 활성화된 T 세포의 확대를 촉진한다.
- [0026] CD137에 대한 작용제 mAb는 그의 공동자극 기능에 따라, 심장 및 피부 동종이식편의 거부를 촉진하고, 확립된 종양을 근절하고, 1차 항바이러스 CD8+ T 세포 반응을 확장시키고, T 세포 세포용해 가능성을 증가시키는 것으로 나타났다. 이들 연구는 CD137 신호전달이 종양 및 감염에 대한 면역성을 증대시킬 수 있는 T 세포 기능을 촉진한다는 견해를 지지한다.
- [0027] 하나의 실시태양에서, 제1 웨პ티드 리간드는 CD137 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드를 포함한다.
- [0028] CD137 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드의 적합한 예는 GB 특허 출원 제 1712589.9 호 및 제 1802934.8 호에 개시되어 있으며, 상기 웨პ티드는 본원에 참고로 인용된다.
- [0029] 하나의 실시태양에서, CD137 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드는 아미노산 서열:
- [0030] C_iIEEGQYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii} (서열번호 1);
- [0031] C_i[tBuAla]PE[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii} (서열번호 3);
- [0032] C_iIEEGQYC_{ii}F[D-Ala]DPY[N1e]C_{iii} (서열번호 4);
- [0033] C_i[tBuAla]PK[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii} (서열번호 5);
- [0034] C_i[tBuAla]PE[D-Lys]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii} (서열번호 6);
- [0035] C_i[tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii} (서열번호 7);
- [0036] C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[N1e]C_{iii} (서열번호 8);
- [0037] C_iIEE[D-Lys(PYA)]QYC_{ii}FADPY(N1e)C_{iii} (서열번호 9); 및

- [0038] $[dC_i][dI][dE][dE][K(PYA)][dQ][dY][dC_{ii}][dF][dA][dD][dP][dY][dNle][dC_{iii}]$ (서열번호 10)
- [0039] 을 포함하며, 여기에서 C_i , C_{ii} 및 C_{iii} 는 각각 제1, 제2 및 제3 시스테인 잔기를 나타내고, Nle 는 노르류신을 나타내고, $tBuAla$ 는 t -부틸-알라닌을 나타내고, PYA는 4-펜티노산 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다.
- [0040] 언급될 수 있는 하나의 특정한 실시태양에서, CD137 결합 비사이클릭 웨티드 리간드는 아미노산 서열:
- [0041] $C_iIEEGQYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (서열번호 1)
- [0042] 을 포함하며, 여기에서 C_i , C_{ii} 및 C_{iii} 는 각각 제1, 제2 및 제3 시스테인 잔기를 나타내고, Nle 는 노르류신, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다.
- [0043] 추가의 실시태양에서, CD137 결합 비사이클릭 웨티드 리간드는 N- 및 C-말단 변형을 포함하고
- [0044] Ac-A-(서열번호 1)-Dap (본원에서 이후에 BCY7732로서 지칭함);
- [0045] Ac-A-(서열번호 1)-Dap(PYA) (본원에서 이후에 BCY7741로서 지칭함);
- [0046] Ac-(서열번호 3)-Dap (본원에서 이후에 BCY9172로서 지칭함);
- [0047] Ac-(서열번호 3)-Dap(PYA) (본원에서 이후에 BCY11014로서 지칭함);
- [0048] Ac-A-(서열번호 4)-Dap (본원에서 이후에 BCY8045로서 지칭함);
- [0049] Ac-(서열번호 5)-A (본원에서 이후에 BCY8919로서 지칭함);
- [0050] Ac-(서열번호 6)-A (본원에서 이후에 BCY8920로서 지칭함);
- [0051] Ac-(서열번호 7)-A (본원에서 이후에 BCY8927로서 지칭함);
- [0052] Ac-(서열번호 8)-A (본원에서 이후에 BCY8928로서 지칭함);
- [0053] Ac-A-(서열번호 9)-A (본원에서 이후에 BCY7744로서 지칭함); 및
- [0054] Ac-[dA]-(서열번호 10)-[dA]-NH₂ (본원에서 이후에 BCY11506로서 지칭함)
- [0055] 을 포함하며, 여기에서 Ac는 아세틸기를 나타내고, Dap는 디아미노프로피온산을 나타내고, PYA는 4-펜티노산 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다.
- [0056] 언급될 수 있는 추가의 실시태양에서, CD137 결합 비사이클릭 웨티드 리간드는 N- 및 C-말단 변형을 포함하고 아미노산 서열:
- [0057] Ac-A-(서열번호 1)-Dap (본원에서 이후에 BCY7732로서 지칭함)
- [0058] 을 포함하며, 여기에서 Ac는 아세틸기를 나타내고, Dap는 디아미노프로피온산, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다.
- [0059] 제2 웨티드 리간드
- [0060] 본원에서 "암세포"란 용어에 대한 언급은 암에 관련있는 것으로 공지된 임의의 세포를 포함한다. 암세포는 세포 분열 조절을 담당하는 유전자가 손상될 때 생성된다. 발암은 정상세포의 유전물질의 돌연변이 및 상위돌연변이에 의해 야기되며, 증식과 세포사간의 정상적인 균형을 잘못되게 만든다. 이는 통제되지 않는 세포분열 및 신체 중 자연선택에 의한 상기 세포의 진화를 발생시킨다. 상기 세포의 통제되지 않은, 종종 빠른 증식은 양성 또는 악성 종양(암)을 유도할 수 있다. 양성 종양은 신체의 다른 부분으로 확산되지 않거나 다른 조직을 침범하지 않는다. 악성 종양은 다른 장기를 침범하고, 먼 위치로 확산되며(전이), 생명-위협적으로 될 수 있다.
- [0061] 하나의 실시태양에서, 암세포는 HT1080, SC-OV-3, PC3, H1376, NCI-H292, LnCap, MC38, 4T1-D02 및 RKO 종양 세포 중에서 선택된다.
- [0062] 하나의 실시태양에서, 암세포 상에 존재하는 성분은 EphA2이다.
- [0063] Eph 수용체 티로신 키나제(Eph)는 티로신 잔기상의 단백질을 인산화하는 키나제인 수용체 티로신 키나제(RTK)의 큰 그룹에 속한다. Eph 및 그의 막 결합된 에프린 리간드(에프린)는 세포 위치식별 및 조직 구성을 통제한다

(Poliaikov *et al.* (2004) *Dev Cell* 7, 465-80). 기능적 및 생화학적 Eph 반응은 보다 높은 리간드 올리고머화 상태에서 발생한다(Stein *et al.* (1998) *Genes Dev* 12, 667-678).

[0064] 다양한 Eph 및 에프린은 다른 패턴화 기능중에서도, 혈관 발달에 한 역할을 하는 것으로 나타났다. EphB4 및 에프린-B2의 녹아웃은 모세혈관충을 혈관으로 리모델링하는 능력을 결여시키고(상기 Poliaikov *et al.*) 및 배아 치사성을 발생시킨다. 일부 Eph 수용체 및 에프린의 지속적인 발현이 또한 새로-형성된 성인 미세혈관에서 관찰되었다(Brantley-Sieders *et al.* (2004) *Curr Pharm Des* 10, 3431-42; Adams (2003) *J Anat* 202, 105-12).

[0065] 성인에서 일부 에프린 및 그의 수용체의 조절해제된 재-출현이 또한 종양 침범, 전이 및 신생-혈관형성에 기여함이 관찰되었다(Nakamoto *et al.* (2002) *Microsc Res Tech* 59, 58-67; Brantley-Sieders *et al.*, 상기). 더욱 또한, 일부 Eph과 구성원이 다양한 인간 종양으로부터의 종양 세포 상에서 과발현되는 것으로 밝혀졌다(Brantley-Sieders *et al.*, 상기); Marme (2002) *Ann Hematol* 81 Suppl 2, S66; Booth *et al.* (2002) *Nat Med* 8, 1360-1).

[0066] EPH 수용체 A2(에프린 A형 수용체 2)는 인간에서 *EPHA2* 유전자에 의해 암호화되는 단백질이다.

[0067] *EphA2*는 인간의 다수의 암에서 상향조절되며, 종종 질병 진행, 전이 및 불량한 예후와 상관된다, 예를 들어 유방(Zelinski *et al.* (2001) *Cancer Res.* 61, 2301-2306; Zhuang *et al* (2010) *Cancer Res.* 70, 299-308; Brantley-Sieders *et al* (2011) *PLoS One* 6, e24426), 폐(Brannan *et al* (2009) *Cancer Prev Res (Phila)* 2, 1039-1049; Kinch *et al* (2003) *Clin Cancer Res.* 9, 613-618; Guo *et al* (2013) *J Thorac Oncol.* 8, 301-308), 위(Nakamura *et al* (2005) *Cancer Sci.* 96, 42-47; Yuan *et al* (2009) *Dig Dis Sci* 54, 2410-2417), 췌장(Mudali *et al* (2006) *Clin Exp Metastasis* 23, 357-365), 전립선(Walker-Daniels *et al* (1999) *Prostate* 41, 275-280), 간(Yang *et al* (2009) *Hepatol Res.* 39, 1169-1177) 및 교모세포종(Wykosky *et al* (2005) *Mol Cancer Res.* 3, 541-551; Li *et al* (2010) *Tumour Biol.* 31, 477-488).

[0068] 암의 진행에서 *EphA2*의 완전한 역할은 여전히 규명되지 않고 있지만, 종양 세포 성장, 생존, 침범 및 혈관형성을 포함한 다수의 암 진행 단계에서의 상호작용에 대한 증거가 존재한다. *EphA2* 발현의 하향조절은 종양암세포 전파를 억제하는 반면(Binda *et al* (2012) *Cancer Cell* 22, 765-780), *EphA2* 봉쇄는 VEGF 유도된 세포이동(Hess *et al* (2001) *Cancer Res.* 61, 3250-3255), 발아 및 혈관형성(Cheng *et al* (2002) *Mol Cancer Res.* 1, 2-11; Lin *et al* (2007) *Cancer* 109, 332-40) 및 전이성 진행(Brantley-Sieders *et al* (2005) *FASEB J.* 19, 1884-1886)을 억제한다.

[0069] *EphA2*에 대한 항체 약물 접합체가 래트 및 마우스 이종이식편 모델에서 종양 성장을 현저하게 감소시키는 것으로 나타났으며(Jackson *et al* (2008) *Cancer Research* 68, 9367-9374) 유사한 접근법이 인간에서 시도되었지만 치료 관련 부작용으로 인해 치료를 중단해야 했다(Annunziata *et al* (2013) *Invest New drugs* 31, 77-84).

[0070] 하나의 실시태양에서, 제2 웨티드 리간드는 *EphA2* 결합 비사이클릭 웨티드 리간드를 포함한다.

[0071] *EphA2* 결합 비사이클릭 웨티드 리간드의 적합한 예는 GB 특허 출원 제 1721259.8 호 및 제 1804102.0 호에 개시되어 있으며, 상기 웨티드는 본원에 참고로 인용된다.

[0072] 하나의 실시태양에서, *EphA2* 결합 비사이클릭 웨티드 리간드는 아미노산 서열:

C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (서열번호 2); 및

C_iLWDPTPC_{ii}ANLHL[HArg]C_{iii} (서열번호 11)

[0075] 을 포함하며, 여기에서 C_i, C_{ii} 및 C_{iii}는 각각 제1, 제2 및 제3 시스테인 잔기를 나타내고, HyP는 하이드록시프롤린을 나타내고, dD는 D-배열의 아스파트산(aspartic acid)을 나타내고, HArg는 호모아르기닌, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다.

[0076] 언급될 수 있는 하나의 실시태양에서, *EphA2* 결합 비사이클릭 웨티드 리간드는 아미노산 서열:

C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii} (서열번호 2)

[0078] 을 포함하며, 여기에서 C_i, C_{ii} 및 C_{iii}는 각각 제1, 제2 및 제3 시스테인 잔기를 나타내고, HyP는 하이드록시프롤린을 나타내고, dD는 D-배열의 아스파트산을 나타내고, HArg는 호모아르기닌, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다.

- [0079] 추가의 실시태양에서, EphA2 결합 비사이클릭 웨티드 리간드는 N-말단 변형을 포함하고
- [0080] A-HArg-D-(서열번호 2) (본원에서 이후에 BCY9594로서 지칭함);
- [0081] [B-Ala]-[Sar₁₀]-A-[HArg]-D-(서열번호 2) (본원에서 이후에 BCY6099로서 지칭함);
- [0082] [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-A-[HArg]-D-(서열번호 2) (본원에서 이후에 BCY6169로서 지칭함); 및
- [0083] [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-VGP-(서열번호 11) (본원에서 이후에 BCY8941로서 지칭함)
- [0084] 을 포함하며, 여기에서 HArg는 호모아르기닌을 나타내고, PYA는 4-펜티노산을 나타내고, Sar₁₀은 10개의 사르코신 단위를 나타내고, B-Ala는 베타-알라닌, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다.
- [0085] 언급될 수 있는 추가의 실시태양에서, EphA2 결합 비사이클릭 웨티드 리간드는 N-말단 변형을 포함하고
- [0086] A-HArg-D-(서열번호 2) (본원에서 이후에 BCY9594로서 지칭함)
- [0087] 을 포함하며, 여기에서 HArg는 호모아르기닌, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다.
- [0088] 또 다른 실시태양에서, 암세포 상에 존재하는 성분은 PD-L1이다.
- [0089] 예정세포사 1 리간드 1(PD-L1)은 마우스 염색체 19 및 인간 염색체 9상의 CD274 유전자에 의해 암호화된 290 아미노산 I형 막관통 단백질이다. PD-L1 발현은 만성 감염, 예를 들어 만성 바이러스 감염(예를 들어, 다른 것들 중에서도 HIV, HBV, HCV 및 HTLV 포함), 만성 세균 감염(예를 들어 다른 것들 중에서도 헬리코박터 파이로리 포함), 및 만성 기생충 감염(예를 들어 스키스토소마 만소니 포함)에 관련된 면역반응의 회피와 관련된다. PD-L1 발현은 다수의 조직 및 T-세포, B-세포, 대식세포, 수지상 세포, 및 내피세포, 간세포, 근육세포를 포함한 비조혈성 세포를 포함한 세포 유형, 및 태반에서 검출되었다.
- [0090] PD-L1 발현은 또한 항-종양 면역활성의 억제에 관련된다. 종양은 숙주 T-세포에 의해 인식될 수 있는 항원을 발현하지만, 종양의 면역학적 제거는 드물다. 이러한 실패의 부분은 종양 미세환경에 의한 면역억제에 기인한다. 다수의 종양상에서의 PD-L1 발현은 이러한 억제성 환경의 성분이며 다른 면역억제성 신호와 협력하여 작용한다. PD-L1 발현은 유방, 폐, 결장, 난소, 흑색종, 방광, 간, 타액, 위, 신경교종, 갑상선, 흉선 상피, 두경부를 포함한 광범위하게 다양한 고형 종양상의 원위치에서 입증되었다(Brown JA *et al.* 2003 *Immunol.* 170:1257-66; Dong H *et al.* 2002 *Nat. Med.* 8:793-800; Hamanishi J, *et al.* 2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:3360-65; Strome SE *et al.* 2003 *Cancer Res.* 63:6501-5; Inman BA *et al.* 2007 *Cancer* 109:1499-505; Konishi J *et al.* 2004 *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100; Nakanishi J *et al.* 2007 *Cancer Immunol. Immunother.* 56:1173-82; Nomi T *et al.* 2007 *Clin. Cancer Res.* 13:2151-57; Thompson RH *et al.* 2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 17174-79; Wu C *et al.* 2006 *Acta Histochem.* 108:19-24). 또한, PD-L1에 대한 수용체, 예정세포사 단백질 1(또한 PD-1 및 CD279로서 공지됨)의 발현은 종양 침윤성 림프구상에서 상향조절되며, 이는 또한 종양 면역억제에 기여한다(Blank C *et al.* 2003 *Immunol.* 171:4574-81). 가장 중요하게, 종양상의 PD-L1 발현을 질병 결과에 관련시키는 연구는 PD-L1 발현이 신장, 난소, 방광, 유방, 위, 및 췌장암에서 불리한 예후와 강하게 상관됨을 입증한다(Hamanishi J *et al.* 2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:3360-65; Inman BA *et al.* 2007 *Cancer* 109:1499-505; Konishi J *et al.* 2004 *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100; Nakanishi J *et al.* 2007 *Cancer Immunol. Immunother.* 56:1173-82; Nomi T *et al.* 2007 *Clin. Cancer Res.* 13:2151-57; Thompson RH *et al.* 2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17174-79; Wu C *et al.* 2006 *Acta Histochem.* 108:19-24). 또한, 상기 연구는 종양상에서의 보다 높은 수준의 PD-L1 발현이 종양 단계의 진행 및 더 깊은 조직 구조내로의 침범을 촉진할 수 있음을 제시한다.
- [0091] PD-1 경로는 또한 혈액암에서 한 역할을 할 수 있다. PD-L1은 다수의 골수종 세포 상에서 발현되지만 정상 혈질세포 상에서는 발현되지 않는다(Liu J *et al.* 2007 *Blood* 110:296-304). PD-L1은 일부 1차 T-세포 림프종, 특히 역형성 대세포 T 림프종상에서 발현된다(Brown JA *et al.*, 2003 *Immunol.* 170:1257-66). PD-1은 혈관면역모구성 림프종의 T-세포 상에서 고도로 발현되며 PD-L1은 관련된 여포수지상 세포 네트워크상에서 발현된다(Dorfman DM *et al.* 2006 *Am. J. Surg. Pathol.* 30:802-10). 결절성 림프구-우세 호지킨 림프종에서, 림프구 또는 조직구(L&H) 세포와 관련된 T-세포는 PD-1을 발현한다. PD-1 결찰에 의해 유도된 유전자의 판독을 사용하는 미세배열 분석은 종양-관련된 T-세포가 호지킨 림프종에서 원위치에서 PD-1 신호에 반응함을 제시한다(Chemnitz JM *et al.* 2007 *Blood* 110:3226-33). PD-1 및 PD-L1은 HTLV-1-매개된 성인 T-세포 백혈병 및 림프종에서 CD4 T-세포 상에서 발현된다(Shimauchi T *et al.* 2007 *Int. J. Cancer* 121: 2585-90). 이러한 종양 세포

들은 TCR 신호에 저반응성이다.

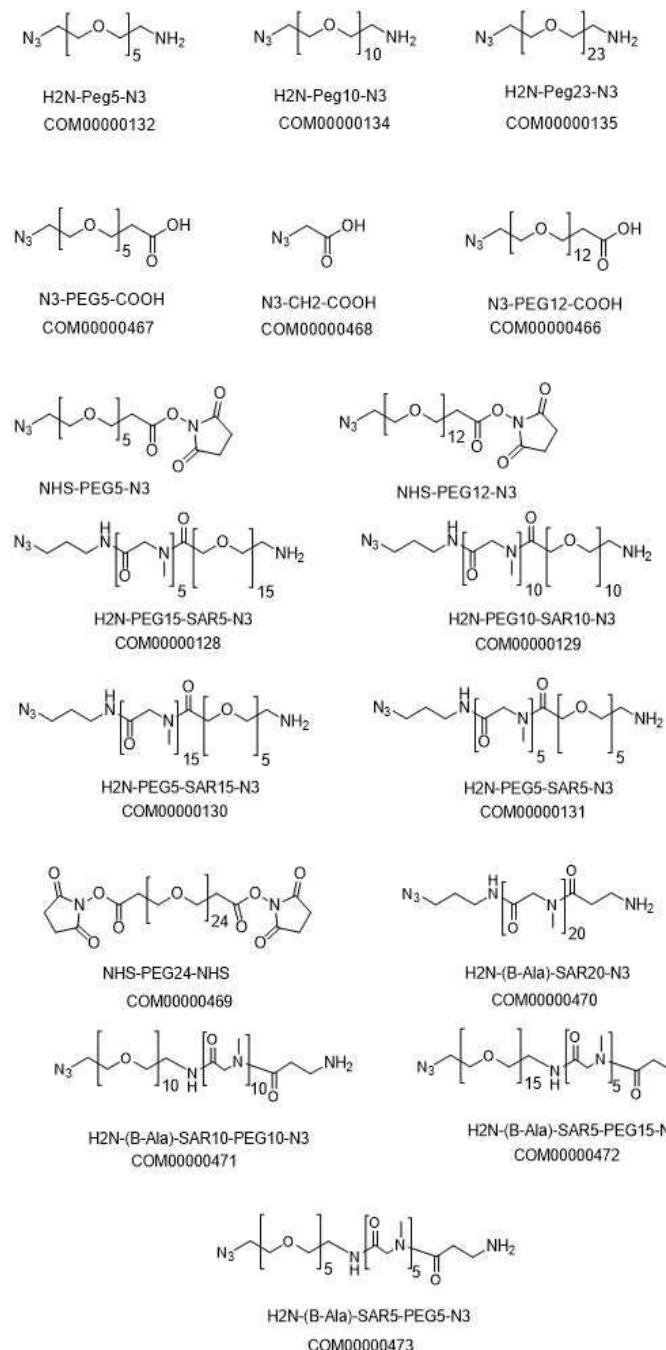
- [0092] 동물 모델에서의 연구는 종양상의 PD-L1이 T-세포 활성화 및 종양 세포의 용해를 억제하며 일부의 경우에 증가된 종양-특이성 T-세포사를 유도함을 입증한다(Dong H *et al.* 2002 Nat. Med. 8:793-800; Hirano F *et al.* 2005 Cancer Res. 65:1089-96). 종양-관련된 APC는 또한 항종양 T-세포 반응을 조절하기 위해서 PD-1:PD-L1 경로를 사용할 수 있다. 종양-관련된 골수성 DC 집단상에서의 PD-L1 발현은 종양 환경 인자들에 의해 상향조절된다(Curiel TJ *et al.* 2003 Nat. Med. 9:562-67). B16 흑색종의 종양-배액 림프절 중의 형질세포양 수지상 세포(DC)는 IDO를 발현하며, 상기는 조절성 T-세포의 억제 활성을 강하게 활성화시킨다. IDO-처리된 조절성 T-세포의 억제 활성은 IDO-발현 DC와의 세포 접촉을 요구하였다(Sharma MD *et al.* 2007 Clin. Invest. 117:2570-82).
- [0093] 하나의 실시태양에서, 제2 웨პ티드 리간드는 PD-L1 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드를 포함한다.
- [0094] PD-L1 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드의 적합한 예는 GB 특히 출원 제 1820956.9 호 및 제 1820969.2 호에 개시되어 있으며, 상기 웨პ티드는 본원에 참고로 인용된다.
- [0095] 하나의 실시태양에서, PD-L1 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드는
- [0096] $C_i[HArg]DWC_{ii}HWTFSHGHP_{iii}$ (서열번호 12);
- [0097] $C_iSAGWLTMC_{ii}QKLHLC_{iii}$ (서열번호 13); 및
- [0098] $C_iSAGWLTMC_{ii}Q[K(PYA)]LHLC_{iii}$ (서열번호 14)
- [0099] 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 여기에서 C_i , C_{ii} 및 C_{iii} 는 각각 제1, 제2 및 제3 시스테인 잔기를 나타내고, HArg는 호모아르기닌을 나타내고, PYA는 4-펜티노산, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다.
- [0100] 추가의 실시태양에서, PD-L1 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드는 N-말단 및/또는 C-말단 변형을 포함하고
- [0101] [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]- (서열번호 12) (본원에서 이후에 BCY8938로서 지칭함);
- [0102] [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-SDK- (서열번호 13) (본원에서 이후에 BCY10043로서 지칭함);
- [0103] NH₂-SDK- (서열번호 13)-[Sar₁₀]-[K(PYA)] (본원에서 이후에 BCY10044로서 지칭함);
- [0104] NH₂-SDK- (서열번호 14) (본원에서 이후에 BCY10045로서 지칭함); 및
- [0105] Ac-SDK- (서열번호 14)-PSH (본원에서 이후에 BCY10861로서 지칭함)
- [0106] 를 포함하며, 여기에서 PYA는 4-펜티노산을 나타내고, B-Ala는 베타-알라닌을 나타내고, Sar₁₀은 10개의 사르코신 단위, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다.
- [0107] 또 다른 실시태양에서, 암세포 상에 존재하는 성분은 넥틴-4이다.
- [0108] 넥틴-4는 4개의 구성원을 포함하는 단백질의 넥틴파에 속하는 표면 분자이다. 넥틴류는 발생기 및 성인기 동안, 상피, 내피, 면역 및 신경세포의 경우, 다양한 생물학적 과정, 예를 들어 극성, 증식, 분화 및 이동에 한 역할을 하는 세포부착 분자이다. 상기는 인간에서 다수의 병적인 과정에 관련된다. 상기는 폴리오바이러스, 헤르페스 단순 바이러스 및 홍역 바이러스에 대한 주요 수용체이다. 넥틴-1(PVRL1) 또는 넥틴-4(PVRL4)를 암호화하는 유전자의 돌연변이는 다른 이상과 관련된 외배엽 이형성 증후군을 야기한다. 넥틴-4는 태아 발생 중에 발현된다. 성인 조직에서 그의 발현은 상기 과의 다른 구성원들의 경우보다 더 제한된다. 넥틴-4는 각각 유방, 난소 및 폐 암종의 50%, 49% 및 86%에서, 대개는 나쁜 예후의 종양상의 종양-관련된 항원이다. 그의 발현은 상응하는 정상 조직에서는 검출되지 않는다. 유방 종양에서, 넥틴-4는 주로 3중-음성 및 ERBB2+ 암종에서 발현된다. 이를 암이 있는 환자의 혈청에서, 용해성 형태의 넥틴-4의 검출은 불량한 예후와 관련된다. 혈청 넥틴-4의 수준은 전이성 진행 중에 증가하며 치료 후 감소한다. 이러한 결과는 넥틴-4가 암 치료에 신뢰할만한 표적일 수 있음을 암시한다. 상응하게, 다수의 항-넥틴-4 항체가 종래 기술에서 기재되었다. 특히, 엔포르투맙 베도틴(ASG-22ME)은 넥틴-4를 표적화하는 항체-약물 접합체(ADC)이며 현재 고형 종양을 앓고 있는 환자의 치료를 위해 임상적으로 연구되고 있다.

- [0109] 하나의 실시태양에서, 제2 웨티드 리간드는 넥틴-4 결합 비사이클릭 웨티드 리간드를 포함한다.
- [0110] 넥틴-4 결합 비사이클릭 웨티드 리간드의 적합한 예는 GB 특허 출원 제 1810250.9 호, 제 1815684.4 호 및 제 1818499.4 호에 개시되어 있으며, 상기 웨티드는 본원에 참고로 인용된다.
- [0111] 하나의 실시태양에서, 넥틴-4 결합 비사이클릭 웨티드 리간드는
- [0112] $C_iP[1Na1][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (서열번호 15; 본원에서 이후에 BCY8116로서 지칭함);
- [0113] $C_iP[1Na1][dD]C_{ii}M[HArg]D[dW]STP[HyP][dW]C_{iii}$ (서열번호 16; 본원에서 이후에 BCY11415로서 지칭함); 및
- [0114] $C_iP[1Na1][dK](Sar_{10}-(B-Ala))C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (서열번호 17);
- [0115] $C_iPFGC_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (서열번호 18; 본원에서 이후에 BCY11414로서 지칭함)
- [0116] 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 여기에서 C_i , C_{ii} 및 C_{iii} 는 각각 제1, 제2 및 제3 시스테인 잔기를 나타내고, $1Na1$ 은 1-나프틸알라닌을 나타내고, $HArg$ 는 호모아르기닌을 나타내고, HyP 는 하이드록시프롤린을 나타내고, Sar_{10} 은 10개의 사르코신 단위를 나타내고, $B-Ala$ 는 베타-알라닌, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다.
- [0117] 추가의 실시태양에서, 넥틴-4 결합 비사이클릭 웨티드 리간드는 N-말단 변형을 포함하고
- [0118] 서열번호 15 (본원에서 이후에 BCY8116로서 지칭함);
- [0119] [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-(서열번호 15) (본원에서 이후에 BCY8846로서 지칭함);
- [0120] 서열번호 16 (본원에서 이후에 BCY11415로서 지칭함);
- [0121] [PYA]-[B-Ala]-[Sar₁₀]-(서열번호 16) (본원에서 이후에 BCY11942로서 지칭함);
- [0122] Ac-(서열번호 17) (본원에서 이후에 BCY8831로서 지칭함); 및
- [0123] 서열번호 18 (본원에서 이후에 BCY11414로서 지칭함)
- [0124] 을 포함하며, 여기에서 PYA는 4-펜티노산을 나타내고, B-Ala는 베타-알라닌을 나타내고, Sar₁₀은 10개의 사르코신 단위, 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다.
- [0125] 또 다른 실시태양에서, 암세포 상에 존재하는 성분은 전립선-특이성 막 항원(PSMA)이다.
- [0126] 전립선-특이성 막 항원(PSMA)(또한 글루타메이트 카복시펩티다제 II(GCPII), N-아세틸-L-아스파틸-L-글루타메이트 웨티다제 I(NAALADase I) 및 NAAG 웨티다제로서 공지됨)은 인간에서 *FOLH1*(폴레이트 하이드롤라제 1) 유전자에 의해 암호화되는 효소이다. 인간 GCPII는 750 아미노산을 함유하며 무게가 대략 84 kDa이다.
- [0127] 인간 PSMA는 전립선에서 고도로 발현되며, 대부분의 다른 조직에서보다 대략 100배 더 많이 발현된다. 일부 전립선암에서, PSMA는 두 번째로 가장 상향조절되는 유전자 생성물이며, 비암성 전립선 세포에서의 수준에 비해 8- 내지 12-배 증가된다. 이러한 높은 발현으로 인해, PSMA는 일부 암의 치료법 및 영상화를 위한 잠재적인 생물마커로서 개발 중에 있다. 인간 전립선암에서, 상기 보다 많이 발현되는 종양은 보다 빠른, 진행까지의 시간 및 보다 큰 재발 환자 백분율과 관련된다.
- [0128] 하나의 실시태양에서, 제2 웨티드 리간드는 PSMA 결합 비사이클릭 웨티드 리간드를 포함한다.
- [0129] PSMA 결합 비사이클릭 웨티드 리간드의 적합한 예는 GB 특허 출원 제 1810318.4 호, 제 1810325.9 호 및 제 1820325.7 호에 개시되어 있으며, 상기 웨티드는 본원에 참고로 인용된다.
- [0130] 링커
- [0131] 제1 웨티드 리간드를 임의의 적합한 링커를 통해 제2 웨티드 리간드에 접합시킬 수 있음을 알 것이다. 전형적으로 상기 링커의 설계는 2개의 비사이클릭 웨티드가 그들의 각각의 표적에 단독으로 방해되지 않게 결합하거나 또는 2개의 표적 수용체에 동시에 결합할 수 있도록 하는 방식으로 제공되게 하는 것일 것이다. 추가로, 상기 링커는 목적하는 기능적 결과를 도출하는 표적 세포간의 적합한 거리를 유지시키면서 2개의 표적에의 동시 결합을 허용해야 한다. 상기 링커의 성질을 상기 목적하는 기능적 결과가 최적화되도록 길이, 강성 또는 용해도를

증가시키기 위해 조절할 수 있다. 상기 링커를 또한 하나 초과의 비사이클릭의, 동일한 표적에의 부착을 허용하도록 설계할 수 있다. 어느 한 결합 웨티드의 결합가의 증가는 표적 세포에 대한 상기 헤테로랜덤의 친화성을 증가시키는 작용을 하거나 또는 표적 수용체 중 하나 또는 2개 모두의 올리고머화를 유도하는데 일조할 수 있다.

[0132] 하나의 실시태양에서, 링커는 하기의 서열 중에서 선택된다: $-\text{CH}_2-$, $-\text{PEG}_5-$, $-\text{PEG}_{10}-$, $-\text{PEG}_{12}-$, $-\text{PEG}_{23}-$, $-\text{PEG}_{24}-$, $-\text{PEG}_{15}-\text{Sar}_5-$, $-\text{PEG}_{10}-\text{Sar}_{10}-$, $-\text{PEG}_5-\text{Sar}_{15}-$, $-\text{PEG}_5-\text{Sar}_5-$, $-\text{B-Ala}-\text{Sar}_{20}-$, $-\text{B-Ala}-\text{Sar}_{10}-\text{PEG}_{10}-$, $-\text{B-Ala}-\text{Sar}_5-\text{PEG}_{15}-$ 및 $-\text{B-Ala}-\text{Sar}_5-\text{PEG}_5-$.

[0133] 적합한 링커의 구조적 표현을 하기에 상세히 나타낸다:



[0134]

[0135] 헤테로랜덤 복합체

[0136] 하나의 구체적인 실시태양에서, 제1 웨티드 리간드는 TATA 스캐폴드에 부착된 CD137 결합 비사이클릭 웨티드 리간드를 포함하고, 제2 웨티드 리간드는 TATA 스캐폴드에 부착된 EphA2 결합 비사이클릭 웨티드 리간드를 포함하

며, 상기 혜테로텐덤 복합체는 하기 중에서 선택된다:

복합체 No.	EphA2 BCY No.	부착 지점	링커	CD137 BCY No.	부착 지점
BCY9173	BCY6169	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C-말단 Dap
BCY7985	BCY6169	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C-말단 Dap
BCY8942	BCY6169	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8045	C-말단 Dap
BCY8943	BCY8941	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C-말단 Dap
BCY9647	BCY6099	N-말단	-PEG ₁₀ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9648	BCY6099	N-말단	-PEG ₂₃ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9655	BCY6099	N-말단	-PEG ₁₅ - Sar ₅ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9656	BCY6099	N-말단	-PEG ₁₀ - Sar ₁₀ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9657	BCY6099	N-말단	-PEG ₅ - Sar ₁₅ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9658	BCY6099	N-말단	-PEG ₅ - Sar ₅ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9659	BCY6099	N-말단	-PEG ₅ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9758	BCY6099	N-말단	-PEG ₂₄ -	BCY7732	C-말단 Dap
BCY10568	BCY6169	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8919	Lys3
BCY10570	BCY6169	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8920	dLys4
BCY10574	BCY9594	N-말단	-PEG ₅ -	BCY8927	Lys (PYA)3
BCY10575	BCY9594	N-말단	-PEG ₅ -	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY10576	BCY9594	N-말단	-PEG ₅ -	BCY11014	C-말단 Dap(PYA)
BCY10577	BCY6169	N-말단	-CH ₂ -	BCY9172	C-말단 Dap

[0137]

[0138] 혜테로텐덤 비사이클릭 웨პ티드 복합체 BCY7985는 PEG₁₂를 통해 EphA2-특이성 웨პ티드 BCY6169의 N-말단 PYA 기에 연결된 CD137-특이성 웨პ티드 BCY7859로 이루어진다(도 2에 그림으로 도시된다).

[0139]

CD137은 동종삼량체성 단백질이며 천연 리간드 CD137L은 면역세포 상에서 발현되거나 또는 분비된 동종삼량체로서 존재한다. CD137의 생물학은 면역세포에서 CD137 활성을 유도하기 위해 다양체화에 대단히 의존적이다. CD137 다양체화를 생성시키는 한 가지 방식은 또 다른 세포 상에 존재하는 특정 수용체와의 상호작용을 통한 CD137 특이성 작용제의 세포성 교차-결합을 통해서이다.

[0140]

EphA2는 종양 세포 상에서 고도로 발현되며 에프린-A 리간드에 의한 상기 수용체 티로신 키나제의 올리고머화는 그의 활성화를 구동한다. 이론에 얹매이고자 하는 것은 아니지만, 발명자들은 하나의 CD137-특이성 웨პ티드에 결합된 하나의 EphA2-특이성 웨პ티드로 이루어지는 EphA2-CD137 혜테로텐덤이 CD137을 교차 결합시키는 작용을 하는 것으로 여긴다. 상기 함의는 CD137이 종양 세포와 같은 세포 상에서 EphA2의 존재하에 다양체화되고 활성화될 것이라는 것이다. 이는 국소 종양 환경에서 CD137 면역세포 활성화를 구동할 것이다(도 1).

[0141]

이러한 가설은 본원에 기재된 CD137 세포 활성 리포터 분석에서 시험되었고 그 결과를 본 명세서의 도 3에 나타내며, 여기에서 BCY7985가 EphA2-발현 HT1080 세포의 존재하에 프로메가 CD137 루시페라제 리포터 분석 (CS196008)에서 CD137 세포 활성의 강한 유도를 보였음을 알 수 있다.

[0142]

하나의 또 다른 구체적인 실시태양에서, 제1 웨პ티드 리간드는 TATA 스캐폴드에 부착된 CD137 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드를 포함하고, 제2 웨პ티드 리간드는 TATA 스캐폴드에 부착된 벡틴-4 결합 비사이클릭 웨პ티드 리간드를 포함하며, 상기 혜테로텐덤 복합체는 하기 중에서 선택된다:

복합체 No.	넥틴-4 BCY No.	부착 지점	링커	CD137 BCY No.	부착 지점
BCY8854	BCY8846	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C-말단 Dap
BCY9350	BCY11942	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C-말단 Dap
BCY9351	BCY8846	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8045	C-말단 Dap
BCY9399	BCY8116	N-말단	-PEG ₁₀ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9400	BCY8116	N-말단	-PEG ₂₃ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9401	BCY8116	N-말단	-B-Ala-Sar ₂₀ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9403	BCY8116	N-말단	-B-Ala-Sar ₁₀ -PEG ₁₀ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9405	BCY8116	N-말단	-B-Ala-Sar ₅ -PEG ₁₅ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9406	BCY8116	N-말단	-B-Ala-Sar ₅ -PEG ₅ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9407	BCY8116	N-말단	-PEG ₁₈ -Sar ₅ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9408	BCY8116	N-말단	-PEG ₁₀ -Sar ₁₀ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9409	BCY8116	N-말단	-PEG ₅ -Sar ₁₅ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9410	BCY8116	N-말단	-PEG ₅ -Sar ₅ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9411	BCY8116	N-말단	-PEG ₅ -	BCY7741	C-말단 Dap(PYA)
BCY9759	BCY8116	N-말단	-PEG ₂₄ -	BCY7732	C-말단 Dap
BCY10000	BCY8846	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C-말단 Dap
BCY10567	BCY8846	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8919	Lys3
BCY10569	BCY8846	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8920	dLys4
BCY10571	BCY8116	N-말단	-PEG ₅ -	BCY8927	Lys(PYA)3
BCY10572	BCY8116	N-말단	-PEG ₅ -	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY10573	BCY8116	N-말단	-PEG ₅ -	BCY11014	C-말단 Dap(PYA)
BCY10578	BCY8846	N-말단 PYA	-CH ₂ -	BCY9172	C-말단 Dap
BCY10917	BCY8831	dLys(Sar ₁₀)-(B-Ala) ₄	-PEG ₁₂ -	BCY11014	C-말단 Dap(PYA)
BCY11020	BCY8831	dLys(Sar ₁₀)-(B-Ala) ₄	-PEG ₅ -	BCY11014	C-말단 Dap(PYA)
BCY11373	BCY8116	N-말단	-CH ₂ -	BCY8927	Lys(PYA)3
BCY11374	BCY8116	N-말단	-CH ₂ -	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY11375	BCY8116	N-말단	-CH ₂ -	BCY11014	C-말단 Dap(PYA)
BCY11616	BCY8116	N-말단	-PEG ₅ -	BCY7744	dLys (PYA)4
BCY11617	BCY8116	N-말단	-PEG ₅ -	BCY11506	Lys(PYA)4
BCY11857	BCY11414	N-말단	-PEG ₅ -	BCY7744	dLys (PYA)4
BCY11858	BCY11414	N-말단	-PEG ₅ -	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY11859	BCY11415	N-말단	-PEG ₅ -	BCY8928	dLys (PYA)4

[0143]

이론에 얹매이고자 하는 것은 아니지만, 발명자들은 하나의 CD137-특이성 웹티드에 결합된 하나의 넥틴-4-특이성 웹티드로 이루어지는 넥틴-4-CD137 혼테로텐덤이 본원에서 이전에 EphA2에 대해 기재된 바와 동일한 방식으로 CD137을 교차결합시키는 작용을 하는 것으로 여긴다.

[0144]

하나의 실시태양에서, 넥틴-4-CD137 혼테로텐덤은 BCY11857, BCY11858 및/또는 BCY11859 중 임의의 하나 이상 이외의 것이다.

[0145]

하나의 또 다른 구체적인 실시태양에서, 제1 웹티드 리간드는 TATA 스캐폴드에 부착된 CD137 결합 비사이클릭 웹티드 리간드를 포함하고, 제2 웹티드 리간드는 TATA 스캐폴드에 부착된 PD-L1 결합 비사이클릭 웹티드 리간드를 포함하며, 상기 혼테로텐덤 복합체는 하기 중에서 선택된다:

복합체 번호	PD-L1 BCY No.	부착 지점	링커	CD137 BCY No.	부착 지점
BCY8939	BCY8938	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C-말단 Dap
BCY10580	BCY10043	N-말단 PYA	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C-말단 Dap
BCY10581	BCY10044	C-말단 Lys(PYA)	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C-말단 Dap
BCY10582	BCY10045	Lys(PYA)9	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C-말단 Dap
BCY11017	BCY10861	Lys(PYA)9	-PEG ₁₂ -	BCY8919	Lys3
BCY11018	BCY10861	Lys(PYA)9	-PEG ₁₂ -	BCY8920	dLys4
BCY11019	BCY10861	Lys(PYA)9	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C-말단 Dap
BCY11376	BCY10861	Lys(PYA)9	-CH ₂ -	BCY8919	Lys3
BCY11377	BCY10861	Lys(PYA)9	-CH ₂ -	BCY8920	dLys4
BCY11378	BCY10861	Lys(PYA)9	-CH ₂ -	BCY9172	C-말단 Dap
BCY11379	BCY10861	Lys(PYA)9	-PEG ₅ -	BCY8919	Lys3
BCY11380	BCY10861	Lys(PYA)9	-PEG ₅ -	BCY8920	dLys4
BCY11381	BCY10861	Lys(PYA)9	-PEG ₅ -	BCY9172	C-말단 Dap

[0147]

이론에 얹매이고자 하는 것은 아니지만, 발명자들은 하나의 CD137-특이성 웨프티드에 결합된 하나의 PD-L1-특이성 웨프티드로 이루어지는 PD-L1-CD137 혼테로텐덤이 본원에서 이전에 EphA2에 대해 기재된 바와 동일한 방식으로 CD137을 교차결합시키는 작용을 하는 것으로 여긴다.

[0148]

달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 과학기술 용어는 당해 분야, 예를 들어 웨프티드 화학, 세포 배양 및 과자 디스플레이, 핵산 화학 및 생화학의 통상적인 숙련가들에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 표준 기법이 문자 생물학, 유전학 및 생화학 방법에 사용된다(본원에 참고로 인용되는 하기의 문헌들을 참조하시오: Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999 4th ed., John Wiley & Sons, Inc.).

[0150]

명명법

[0151]

넘버링

[0152]

본 발명의 화합물 내 아미노산 잔기 위치를 언급하는 경우, 시스테인 잔기(C_i, C_{ii} 및 C_{iii})는 변하지 않으므로 넘버링에서 생략하며, 따라서 서열번호 1 내 아미노산 잔기의 넘버링을 하기와 같이 지칭한다:

[0153]

C_i-I₁-E₂-E₃-G₄-Q₅-Y₆-C_{ii}-F₇-A₈-D₉-P₁₀-Y₁₁-[N1e]₁₂-C_{iii} (서열번호 1)

[0154]

상기 기재의 목적을 위해서, 모든 비사이클릭 웨프티드는 TBMB(1,3,5-트리스(브로모메틸)벤젠) 또는 1,1',1"- (1,3,5-트리아지닌-1,3,5-트리일)트리프로프-2-엔-1-온(TATA)과 환화되며 3-치환된 구조를 생성시키는 것으로 추정된다. TBMB 및 TATA에 의한 환화는 C_i, C_{ii} 및 C_{iii} 상에서 일어난다.

[0155]

분자 포맷

[0156]

비사이클릭 코어 서열로의 N- 또는 C-말단 연장을 상기 서열의 좌측 또는 우측에 하이픈에 의해 분리하여 추가 한다. 예를 들어, N-말단 β Ala-Sar10-Ala 꼬리는 하기와 같이 나타낼 것이다:

[0157]

β Ala-Sar10-A-(서열번호 X).

[0158]

역 웨프티드 서열

[0159]

문헌[Nair *et al* (2003) J Immunol 170(3), 1362-1373]의 개시에 비추어, 본원에 개시된 웨프티드 서열을 또한 그의 레트로-인버스 형태로 사용할 수 있음이 예상된다. 예를 들어, 상기 서열은 역전되며(즉 N-말단이 C-말단으로 되고 이와 역으로도 된다) 그의 입체화학도 마찬가지로 또한 역전된다(즉 D-아미노산이 L-아미노산으로 되고 이와 역으로도 된다).

[0160]

웨프티드 리간드

[0161]

본원에서 지칭되는 바와 같은 웨프티드 리간드는 문자 스캐폴드에 공유 결합된 웨프티드를 지칭한다. 전형적으로, 상기와 같은 웨프티드는 상기 스캐폴드에 공유 결합을 형성할 수 있는 2개 이상의 반응성 그룹(즉 시스테인 잔기), 및 루프 서열로서 지칭되는, 상기 반응성 그룹 사이에 대향된 서열을 포함하며, 따라서 상기는 상기 웨프

드가 상기 스캐폴드에 결합될 때 루프를 형성한다. 본 발명의 경우에, 상기 펩티드는 적어도 3개의 시스테인 잔기(본원에서 C_i, C_{ii} 및 C_{iii}로서 지칭된다)를 포함하며 상기 스캐폴드 상에서 적어도 2개의 루프를 형성한다.

[0162] 약학적으로 허용 가능한 염

[0163] 염 형태는 본 발명의 범위내에 있으며, 펩티드 리간드에 대한 언급은 상기 리간드의 염 형태를 포함함을 알 것이다.

[0164] 본 발명의 염을 통상적인 화학적 방법, 예를 들어 문헌[*Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002]에 기재된 방법에 의해 염기성 또는 산성 부분을 함유하는 모 화합물로부터 합성할 수 있다. 일반적으로, 상기와 같은 염은 상기 화합물의 유리산 또는 염기 형태를 수 또는 유기 용매, 또는 상기 둘의 혼합물 중에서 적합한 염기 또는 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있다.

[0165] 산 부가염(일- 또는 이-염)을 광범위하게 다양한 산(무기 및 유기 모두)으로 형성시킬 수 있다. 산 부가염의 예는 아세트산, 2,2-디클로로아세트산, 아디프산, 알긴산, 아스코르브산(예를 들어 L-아스코르브산), L-아스파트산, 벤젠설폰산, 벤조산, 4-아세트아미도벤조산, 부탄산, (+) 캄포르산, 캄포르-설폰산, (+)-(1S)-캄포르-10-설폰산, 카프르산, 카프로산, 카프릴산, 신남산, 시트르산, 사이클람산, 도데실황산, 에탄-1,2-디설폰산, 에탄설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 포름산, 푸마르산, 갈락타르산, 젠티스산, 글루코헵تون산, D-글루콘산, 글루쿠론산(예를 들어 D-글루쿠론산), 글루탐산(예를 들어 L-글루탐산), α -옥소글루타르산, 글리콜산, 히푸르산, 하이드로할산(예를 들어 브롬화수소산, 염산, 요오드화수소산), 이세티온산, 락트산(예를 들어 (+)-L-락트산, (土)-DL-락트산), 락토비온산, 말레산, 말산, (-)-L-말산, 말론산, (土)-DL-만델산, 메탄설폰산, 나프탈렌-2-설폰산, 나프탈렌-1,5-디설폰산, 1-하이드록시-2-나프토산, 니코틴산, 질산, 올레산, 오로트산, 옥살산, 팔미트산, 파모산, 인산, 프로피온산, 피루브산, L-피로글루탐산, 살리실산, 4-아미노-살리실산, 세바크산, 스테아르산, 숙신산, 황산, 탄닌산, (+)-L-타르타르산, 티오시안산, p-톨루엔설폰산, 운데실렌산 및 발레르산뿐만 아니라 아실화된 아미노산 및 양이온 교환 수지로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 산과 형성된 일- 또는 이-염을 포함한다.

[0166] 염의 하나의 특정한 그룹은 아세트산, 염산, 요오드화수소산, 인산, 질산, 황산, 시트르산, 락트산, 숙신산, 말레산, 말산, 이세티온산, 푸마르산, 벤젠설폰산, 톨루엔설폰산, 황산, 메탄설폰산(메실레이트), 에탄설폰산, 나프탈렌설폰산, 발레르산, 프로판산, 부탄산, 말론산, 글루쿠론산 및 락토비온산으로부터 형성된 염으로 이루어진다. 하나의 특정한 염은 하이드로클로라이드 염이다. 또 다른 특정한 염은 아세테이트 염이다.

[0167] 화합물이 음이온성이거나 또는 음이온성이 수 있는 작용기를 갖는 경우(예를 들어 -COOH는 -COO⁻일 수 있다), 염은 유기 또는 무기 염기와 형성되어 적합한 양이온을 생성시킬 수 있다. 적합한 무기 양이온의 예는 비제한적으로 알칼리 금속 이온, 예를 들어 Li⁺, Na⁺ 및 K⁺, 알칼리토 금속 양이온, 예를 들어 Ca²⁺ 및 Mg²⁺, 및 다른 양이온, 예를 들어 Al³⁺ 또는 Zn²⁺을 포함한다. 적합한 유기 양이온의 예는 비제한적으로 암모늄 이온(즉, NH₄⁺) 및 치환된 암모늄 이온(예를 들어 NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺)을 포함한다. 일부 적합한 치환된 암모늄 이온의 예는 메틸아민, 에틸아민, 디에틸아민, 프로필아민, 디사이클로헥실아민, 트리에틸아민, 부틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진, 벤질아민, 폐닐벤질아민, 콜린, 메글루민, 및 트로메타민뿐만 아니라, 아미노산, 예를 들어 리신 및 아르기닌으로부터 유도된 것들이다. 통상적인 4급 암모늄 이온의 예는 N(CH₃)₄⁺이다.

[0168] 본 발명의 화합물이 아민 작용기를 함유하는 경우, 상기는 예를 들어 속련가에게 주지된 방법에 따른 알킬화제와의 반응에 의해 4급 암모늄 염을 형성할 수 있다. 상기와 같은 4급 암모늄 화합물은 본 발명의 범위내에 있다.

[0169] 변형된 유도체

[0170] 본원에 정의된 바와 같은 펩티드 리간드의 변형된 유도체는 본 발명의 범위내에 있음을 알 것이다. 상기와 같은 적합한 변형된 유도체의 예는 N-말단 및/또는 C-말단 변형; 하나 이상의 아미노산 잔기의 하나 이상의 비-천연 아미노산 잔기에 의한 교체(예를 들어 하나 이상의 극성 아미노산 잔기의 하나 이상의 등배전자 또는 등전자 아미노산에 의한 교체; 하나 이상의 비-극성 아미노산 잔기의 다른 비-천연 등배전자 또는 등전자 아미노산에 의한 교체); 이격자 그룹의 첨가; 하나 이상의 산화 민감성 아미노산 잔기의 하나 이상의 산화 내성 아미노산 잔기에 의한 교체; 하나 이상의 아미노산 잔기의 알라닌에 의한 교체, 하나 이상의 L-아미노산 잔기의 하나 이상

의 D-아미노산 잔기에 의한 교체; 비사이클릭 펩티드 리간드내 하나 이상의 아미드 결합의 N-알킬화; 하나 이상의 펩티드 결합의 대용 결합에 의한 교체; 펩티드 주쇄 길이 변형; 하나 이상의 아미노산 잔기의 알파-탄소상 수소의 또 다른 화학기에 의한 치환, 시스테인, 리신, 글루타메이트/아스파테이트 및 티로신과 같은 아미노산의 작용화를 위한 상기 아미노산의 적합한 아민, 티올, 카복실산 및 폐놀-반응성 시약에 의한 변형, 및 작용화에 적합한 적교 반응성을 도입시키는 아미노산, 예를 들어 각각 알킨 또는 아지드-함유 부분에 의한 작용화를 허용하는 아지드 또는 알킨-기 함유 아미노산의 도입 또는 교체 중에서 선택된 하나 이상의 변형을 포함한다.

[0171] 하나의 실시태양에서, 변형된 유도체는 N-말단 및/또는 C-말단 변형을 포함한다. 추가의 실시태양에서, 상기 변형된 유도체는 적합한 아미노-반응성 화학을 사용하는 N-말단 변형, 및/또는 적합한 카복시-반응성 화학을 사용하는 C-말단 변형을 포함한다. 추가의 실시태양에서, 상기 N-말단 또는 C-말단 변형은 효과기, 예를 들어 비제한적으로 세포독성제, 방사성킬레이트제 또는 발색단의 첨가를 포함한다.

[0172] 추가의 실시태양에서, 변형된 유도체는 N-말단 변형을 포함한다. 추가의 실시태양에서, 상기 N-말단 변형은 N-말단 아세틸기를 포함한다. 상기 실시태양에서, N-말단 시스테인기(본원에서 C_i로서 지칭되는 기)를 펩티드 합성 중에 아세트산 무수물 또는 다른 적합한 시약으로 캡핑하여 N-말단 아세틸화된 분자를 유도한다. 상기 실시태양은 아미노펩티다제에 대한 잠재적인 인식점을 제거하는 장점을 제공하며 비사이클릭 펩티드의 분해 가능성을 없앤다.

[0173] 또 다른 실시태양에서, N-말단 변형은 효과기 그룹의 접합 및 비사이클릭 펩티드의 그의 표적에 대한 효능의 유지를 촉진하는 분자 이격자 그룹의 첨가를 포함한다.

[0174] 추가의 실시태양에서, 변형된 유도체는 C-말단 변형을 포함한다. 추가의 실시태양에서, 상기 C-말단 변형은 아미드기를 포함한다. 상기 실시태양에서, C-말단 시스테인기(본원에서 C_{iii}로서 지칭되는 기)를 펩티드 합성 중에 아미드로서 합성하여 C-말단 아미드화된 분자를 유도한다. 상기 실시태양은 카복시펩티다제에 대한 잠재적인 인식점을 제거하는 장점을 제공하며 비사이클릭 펩티드의 단백질분해적 분해 가능성을 감소시킨다.

[0175] 하나의 실시태양에서, 변형된 유도체는 하나 이상의 아미노산 잔기의 하나 이상의 비-천연 아미노산 잔기에 의한 교체를 포함한다. 상기 실시태양에서, 분해성 프로테아제에 의해서도 인식되지 않고 표적 효능에 대해 어떠한 불리한 영향도 미치지 않는 등배전자/등전자 측쇄를 갖는 비-천연 아미노산을 선택할 수 있다.

[0176] 한편으로, 인근의 펩티드 결합의 단백질분해적 가수분해가 입체형태적으로 및 입체적으로 방해되도록, 제한된 아미노산 측쇄를 갖는 비-천연 아미노산을 사용할 수 있다. 특히, 상기는 프롤린 유사체, 별기 측쇄, C_a-이치환된 유도체(예를 들어 아미노이소부티르산, Aib), 및 사이클로 아미노산, 아미노-사이클로프로필카복실산인 간단한 유도체와 관련된다.

[0177] 하나의 실시태양에서, 변형된 유도체는 이격자 그룹의 첨가를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 상기 변형된 유도체는 N-말단 시스테인(C_i) 및/또는 C-말단 시스테인(C_{iii})에의 이격자 그룹의 첨가를 포함한다.

[0178] 하나의 실시태양에서, 변형된 유도체는 하나 이상의 산화 민감성 아미노산 잔기의 하나 이상의 산화 내성 아미노산 잔기에 의한 교체를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 상기 변형된 유도체는 트립토판 잔기의 나프틸알라닌 또는 알라닌 잔기에 의한 교체를 포함한다. 상기 실시태양은 생성된 비사이클릭 펩티드 리간드의 약학적 안정성 프로파일을 개선시키는 장점을 제공한다.

[0179] 하나의 실시태양에서, 변형된 유도체는 하나 이상의 하전된 아미노산 잔기의 하나 이상의 소수성 아미노산 잔기에 의한 교체를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 변형된 유도체는 하나 이상의 소수성 아미노산 잔기의 하나 이상의 하전된 아미노산 잔기에 의한 교체를 포함한다. 하전된 대 소수성 아미노산 잔기의 정확한 균형은 상기 비사이클릭 펩티드 리간드의 중요한 특징이다. 예를 들어, 소수성 아미노산 잔기는 혈장 단백질 결합도 및 따라서 혈장 중 이용 가능한 자유 분획의 농도에 영향을 미치는 반면, 하전된 아미노산 잔기(특히 아르기닌)는 상기 펩티드와 세포 표면상의 인지질 막과의 상호작용에 영향을 미칠 수 있다. 상기 둘은 함께 펩티드 약물의 반감기, 분배 부피 및 노출에 영향을 미칠 수 있으며, 이를 임상적 종점에 따라 맞출 수 있다. 또한, 하전된 대 소수성 아미노산 잔기의 정확한 조합 및 수는 주사 부위의 자극을 감소시킬 수 있다(상기 펩티드 약물이 괴하로 투여되는 경우).

[0180] 하나의 실시태양에서, 변형된 유도체는 하나 이상의 L-아미노산 잔기의 하나 이상의 D-아미노산 잔기에 의한 교체를 포함한다. 상기 실시태양은 입체 장애, 및 D-아미노산의 β -턴 입체형태를 안정화시키는 성향에 의해 단백

질분해 안정성을 증가시키는 것으로 여겨진다(Tugyi *et al* (2005) PNAS, 102(2), 413-418).

[0181] 하나의 실시태양에서, 변형된 유도체는 임의의 아미노산 잔기의 제거 및 알라닌에 의한 치환을 포함한다. 상기 실시태양은 잠재적인 단백질분해 공격 부위(들) 제거의 장점을 제공한다.

[0182] 상기 언급한 각각의 변형은 웨티드의 효능 또는 안정성을 의도적으로 개선시키는 작용을 함을 알아야 한다. 변형에 기반한 추가적인 효능 개선을 하기의 기전을 통해 성취할 수 있다:

[0183] - 소수성 효과를 이용하고 보다 낮은 분리속도(off rate)를 유도하는 소수성 부분의 통합, 따라서 보다 높은 친화성이 성취된다;

[0184] - 긴-범위의 이온성 상호작용을 이용하여, 보다 빠른 결합 속도(on rate) 및 보다 높은 친화성을 유도하는 하전된 그룹의 통합(예를 들어 문헌[Schreiber *et al*, *Rapid, electrostatically assisted association of proteins* (1996), *Nature Struct. Biol.* 3, 427-31]을 참조하시오); 및

[0185] - 예를 들어 표적 결합시 엔트로피의 손실이 최소화되도록 아미노산의 측쇄를 정확하게 제한하고, 표적 결합시 엔트로피의 손실이 최소화되도록 주체의 비틀림각을 제한하고, 동일한 이유로 분자 중에 추가적인 환화를 도입시킴으로써, 상기 웨티드내에 추가적인 제한을 통합시킨다.

[0186] (리뷰를 위해서, 문헌[Gentilucci *et al*, *Curr. Pharmaceutical Design*, (2010), 16, 3185-203], 및 문헌[Nestor *et al*, *Curr. Medicinal Chem* (2009), 16, 4399-418]을 참조하시오).

동위원소 변화

[0188] 본 발명은 하나 이상의 원자가, 동일한 원자수를 갖지만 자연에서 통상적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량수와 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자에 의해 교체된 본 발명의 모든 약학적으로 허용 가능한 (방사성)동위원소-표지된 웨티드 리간드, 및 금속 칼레이트화기가 관련된 (방사성)동위원소를 유지할 수 있도록 부착된 본 발명의 웨티드 리간드("효과기"라 칭한다), 및 몇몇 작용기가 관련된 (방사성)동위원소 또는 동위원소 표지된 작용기로 공유적으로 교체된 본 발명의 웨티드 리간드를 포함한다.

[0189] 본 발명의 웨티드 리간드에 포함시키기에 적합한 동위원소의 예는 수소, 예를 들어 $^2\text{H(D)}$ 및 $^3\text{H(T)}$, 탄소, 예를 들어 ^{11}C , ^{13}C 및 ^{14}C , 염소, 예를 들어 ^{36}Cl , 불소, 예를 들어 ^{18}F , 요오드, 예를 들어 ^{123}I , ^{125}I 및 ^{131}I , 질소, 예를 들어, ^{13}N 및 ^{15}N , 산소, 예를 들어 ^{15}O , ^{17}O 및 ^{18}O , 인, 예를 들어 ^{32}P , 황, 예를 들어 ^{35}S , 구리, 예를 들어 ^{64}Cu , 갈륨, 예를 들어 ^{67}Ga 또는 ^{68}Ga , 이트륨, 예를 들어 ^{90}Y 및 루테슘, 예를 들어 ^{177}Lu , 및 비스무스, 예를 들어 ^{213}Bi 의 동위원소들을 포함한다.

[0190] 본 발명의 몇몇 동위원소-표지된 웨티드 리간드, 예를 들어 방사성 동위원소를 포함하는 것들이 약물 및/또는 기질 조직 분포 연구, 및 병든 조직상의 넥틴-4 표적의 존재 및/또는 부재를 임상적으로 평가하는데 유용하다. 본 발명의 웨티드 리간드는 표지된 화합물과 다른 분자, 웨티드, 단백질, 효소 또는 수용체간의 복합체의 형성을 검출하거나 식별하는데 사용될 수 있다는 점에서 또한 귀중한 진단학적 성질을 가질 수 있다. 상기 검출 또는 식별 방법은 표지제, 예를 들어 방사성동위원소, 효소, 형광 물질, 발광 물질(예를 들어 루미놀, 루미놀 유도체, 루시페린, 아쿠오린 및 루시페라제) 등으로 표지된 화합물을 사용할 수 있다. 방사성 동위원소 삼중수소, 즉 $^3\text{H(T)}$ 및 탄소-14, 즉 ^{14}C 가 그의 통합 용이성 및 즉시 검출 수단에 비추어 상기 목적에 특히 유용하다.

[0191] 보다 무거운 동위원소, 예를 들어 중수소, 즉 $^2\text{H(D)}$ 에 의한 치환은 보다 큰 대사 안정성, 예를 들어 증가된 생체내 반감기 또는 감소된 투여량 요구로부터 생성되는 몇몇 치료학적 장점을 제공할 수 있으며, 따라서 일부 상황에서 바람직할 수 있다.

[0192] 양전자 방출 동위원소, 예를 들어 ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O 및 ^{13}N 에 의한 치환은 표적 점유를 검사하기 위한 양전자 방출 단층촬영(PET) 연구에 유용할 수 있다.

[0193] 본 발명의 웨티드 리간드의 동위원소 표지된 화합물을 일반적으로 당해 분야의 숙련가에게 공지된 통상적인 기법에 의해 또는 앞서 사용된 표지되지 않은 시약 대신에 적합한 동위원소 표지된 시약을 사용하는 첨부된 실시 예에 기재된 바와 유사한 공정에 의해 제조할 수 있다.

분자 스캐폴드

- [0195] 문자 스캐폴드는 예를 들어 WO 2009/098450 및 상기 중에 인용된 참고문헌, 특히 WO 2004/077062 및 WO 2006/078161에 기재되어 있다.
- [0196] 상기 문서에 기록된 바와 같이, 문자 스캐폴드는 소문자, 예를 들어 작은 유기 문자일 수 있다.
- [0197] 하나의 실시태양에서, 문자 스캐폴드는 거대분자일 수도 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 문자 스캐폴드는 아미노산, 뉴클레오티드 또는 탄수화물로 구성된 거대분자이다.
- [0198] 하나의 실시태양에서, 문자 스캐폴드는 폴리펩티드의 작용기(들)와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 반응기를 포함한다.
- [0199] 문자 스캐폴드는 펩티드와 결합을 형성하는 화학기, 예를 들어 아민, 티올, 알콜, 케톤, 알데히드, 니트릴, 카복실산, 에스테르, 알켄, 알킨, 아지드, 무수물, 숙신이미드, 말레이이미드, 알킬 할라이드 및 아실 할라이드를 포함할 수 있다.
- [0200] 하나의 실시태양에서, 문자 스캐폴드는 헥사하이드로-1,3,5-트리아진, 특히 1,3,5-트리아크릴로일헥사하이드로-1,3,5-트리아진('TATA'), 또는 그의 유도체를 포함하거나 또는 이들로 이루어질 수 있다.
- [0201] 하나의 실시태양에서, 문자 스캐폴드는 2,4,6-트리스(브로모메틸)메시틸렌이다. 상기 문자는 1,3,5-트리스(브로모메틸)벤젠(TBMB)과 유사하지만 벤젠 고리에 부착된 3개의 추가적인 메틸기를 함유한다. 이는 상기 추가적인 메틸기가 폴리펩티드와 추가적인 접촉을 형성할 수 있고 따라서 추가적인 구조 제한을 부가할 수 있다는 장점을 갖는다.
- [0202] 본 발명의 문자 스캐폴드는 본 발명의 암호화된 라이브러리의 폴리펩티드의 작용기가 상기 문자 스캐폴드와 공유결합을 형성할 수 있게 하는 화학기를 함유한다. 상기 화학기는 아민, 티올, 알콜, 케톤, 알데히드, 니트릴, 카복실산, 에스테르, 알켄, 알킨, 무수물, 숙신이미드, 말레이이미드, 아지드, 알킬 할라이드 및 아실 할라이드를 포함한 광범위하게 다양한 작용기 중에서 선택된다.
- [0203] 시스테인의 티올기와의 반응을 위해 문자 스캐폴드상에 사용될 수 있는 스캐폴드 반응기는 알킬 할라이드(또는 또한 할로게노알칸 또는 할로알칸이라 명명된다)이다.
- [0204] 예로는 브로모메틸벤젠(TBMB에 의해 예시되는 스캐폴드 반응기) 또는 요오도아세트아미드가 있다. 화합물을 단백질 중의 시스테인에 선택적으로 결합시키는데 사용되는 다른 스캐폴드 반응기는 말레이이미드, $\alpha\beta$ 불포화된 카보닐 함유 화합물 및 α -할로메틸카보닐 함유 화합물이다. 본 발명에서 문자 스캐폴드로서 사용될 수 있는 말레이이미드의 예는 트리스-(2-말레이이미도에틸)아민, 트리스-(2-말레이이미도에틸)벤젠, 트리스-(말레이이미도)벤젠을 포함한다. $\alpha\beta$ 불포화된 카보닐 함유 화합물의 일례는 1,1',1"--(1,3,5-트리아지난-1,3,5-트리일)트리프로프-2-엔-1-온(TATA)이다(*Angewandte Chemie, International Edition* (2014), 53(6), 1602-1606). α -할로메틸카보닐 함유 화합물의 일례는 N,N',N"-(벤젠-1,3,5-트리일)트리스(2-브로모아세트아미드)이다. 셀레노시스테인은 또한 시스테인과 유사한 반응성을 갖는 천연 아미노산이며 동일한 반응에 사용될 수 있다. 따라서, 시스테인이 언급될 때마다, 문맥상 달리 제시되지 않는 한 셀레노시스테인을 대용하는 것이 전형적으로 허용될 수 있다.
- [0205] **합성**
- [0206] 본 발명의 펩티드를 표준 기법에 의해 합성적으로 제조한 다음 시험관내에서 문자 스캐폴드와 반응시킬 수 있다. 이를 수행할 때, 표준 화학을 사용할 수 있다. 이는 추가의 하류 실험 또는 입증을 위한 용해성 물질의 신속한 대규모 제조를 가능하게 한다. 상기와 같은 방법을 통상적인 화학, 예를 들어 문헌[Timmerman et al] (상기)에 개시된 것을 사용하여 수행할 수 있었다.
- [0207] 따라서, 본 발명은 또한 본원에 제시된 바와 같이 선택된 폴리펩티드 또는 접합체의 제조에 관한 것이며, 여기에서 상기 제조는 하기에 설명하는 바와 같은 임의의 추가적인 단계들을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 이들 단계를 화학 합성에 의해 제조된 최종 생성물 폴리펩티드/접합체상에서 수행한다.
- [0208] 임의로 관심 폴리펩티드 중의 아미노산 잔기를 접합체 또는 복합체 제조시 치환시킬 수 있다.
- [0209] 펩티드를, 예를 들어 또 다른 루프를 통합시키고 따라서 다중 특이성을 도입시키기 위해 연장시킬 수 있다.
- [0210] 펩티드를 연장시키기 위해서, 상기를 단순히 그의 N-말단 또는 C-말단에서 또는 루프 내에서 표준 고상 또는 용액상 화학을 사용하여 직교 보호된 리신(및 유사체)을 사용하여 화학적으로 연장시킬 수 있다. 표준 (생물)접합 기법을 사용하여 활성화된 또는 활성화 가능한 N- 또는 C-말단을 도입시킬 수 있다. 달리 부가를, 예를 들어 문

현[Dawson *et al.* 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science* 266:776-779]에 기재된 바와 같이 단편 축합 또는 고유의 화학적 결합에 의해, 또는 효소에 의해, 예를 들어 문헌[Chang *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 20; 91(26):12544-8] 또는 문헌[Hikari *et al* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003]에 기재된 바와 같이 서브틸리 가제를 사용하여 수행할 수 있다.

[0211] 한편으로, 웨티드를 디설파이드 결합을 통해 추가의 접합에 의해 연장시키거나 변형시킬 수 있다. 이는 제1 및 제2 웨티드가, 일단 세포의 환원성 환경내에 있으면 서로로부터 분리되게 한다는 추가적인 장점을 갖는다. 이 경우에, 분자 스캐폴드(예를 들어 TBMB)를, 3개의 시스테인기와의 반응을 위해 제1 웨티드의 화학 합성 중에 가할 수 있었으며; 이어서 추가의 시스테인 또는 티올을 상기 제1 웨티드의 N 또는 C-말단에 첨부할 수 있었고, 따라서 상기 시스테인 또는 티올은 오직 제2 웨티드의 유리 시스테인 또는 티올과만 반응하여, 디설파이드-연결된 비사이클릭 웨티드-웨티드 접합체를 형성할 수 있었다.

[0212] 유사한 기법을 2개의 비사이클릭 및 이중특이성 마크로사이클의 합성/결합에 균등하게 적용하여, 잠재적으로 사중특이성 분자를 생성시킨다.

[0213] 더욱 또한, 다른 작용기 또는 효과기 그룹의 첨가를, 적합한 화학을 사용하여 동일한 방식으로 수행하여, N- 또는 C-말단에 또는 측쇄를 통해 수행할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 결합을 어느 한 존재의 활성을 차단하지 않도록 하는 바와 같은 방식으로 수행한다.

약학 조성물

[0215] 본 발명의 추가의 태양에 따라, 본원에 정의된 바와 같은 웨티드 리간드를 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0216] 일반적으로, 본 발명의 웨티드 리간드를 약물학적으로 적합한 부형제 또는 담체와 함께 정제된 형태로 사용할 수 있다. 전형적으로, 이들 부형제 또는 담체는 염수 및/또는 완충된 매질을 포함한 수성 또는 알콜/수용액, 유화액 또는 혼탁액을 포함한다. 비경구 비히클은 염화 나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화 나트륨 및 락테이트화된 링거액을 포함한다. 적합한 생리학적으로-허용 가능한 보조제는, 혼탁액 중에 폴리웨티드 복합체를 유지시키기 위해 필요한 경우, 중첨제, 예를 들어 카복시메틸셀룰로스, 폴리비닐파리돈, 젤라틴 및 알기네이트 중에서 선택될 수 있다.

[0217] 정맥내 비히클은 유체 및 영양 보충제 및 전해질 보충제, 예를 들어 링거 텍스트로스계 보충제를 포함한다. 보존제 및 다른 첨가제, 예를 들어 항균제, 항산화제, 퀼레이트제 및 불활성 기체가 또한 존재할 수 있다(Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition).

[0218] 본 발명의 웨티드 리간드를 별도로 투여되는 조성물로서 또는 다른 작용제와 함께 사용할 수 있다. 상기는 항체, 항체 단편 및 다양한 면역치료 약물, 예를 들어 사이클로스포린, 메토트렉세이트, 아드리아마이신 또는 시스플라티늄 및 면역독소를 포함할 수 있다. 약학 조성물은, 투여 전에 합하는 지의 여부와 관계없이, 다양한 세포독성 또는 다른 작용제와 본 발명의 단백질 리간드, 또는 심지어 상이한 특이성을 갖는 본 발명에 따른 선택된 폴리웨티드, 예를 들어 상이한 표적 리간드를 사용하여 선택된 폴리웨티드의 조합과의 "칵테일"을 포함할 수 있다.

[0219] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 경로는 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 공지된 경로 중 임의의 경로일 수 있다. 치료법을 위해서, 본 발명의 웨티드 리간드를 임의의 환자에게 표준 기법에 따라 투여할 수 있다. 상기 투여는 임의의 적합한 방식에 의해, 예를 들어 비경구, 정맥내, 근육내, 복강내, 경피로, 폐 경로를 통해, 또는 또한 적합하게는 카테터에 의한 직접적인 주입에 의할 수 있다. 바람직하게, 본 발명에 따른 약학 조성물은 흡입에 의해 투여될 것이다. 투여량 및 투여 빈도는 환자의 연령, 성별 및 조건, 다른 약물의 동반 투여, 금기 및 의사가 고려해야 하는 다른 매개변수에 따라 변할 것이다.

[0220] 본 발명의 웨티드 리간드를 보관을 위해 동결건조시키고 사용 전에 적합한 담체 중에서 환원(reconstitution)시킬 수 있다. 상기 기법은 유효하고 당해분야-공지된 동결건조인 것으로 입증되었으며 환원 기법을 사용할 수 있다. 당해 분야의 숙련가들은 동결건조 및 환원이 다양한 정도의 활성 손실을 도출할 수 있고 보상을 향해 수준을 조절해야 할 수도 있음을 알 것이다.

[0221] 본 발명의 웨티드 리간드 또는 그의 칵테일을 함유하는 조성물을 예방학적 및/또는 치료학적 치료를 위해 투여할 수 있다. 몇몇 치료학적 용도에서, 선택된 세포 집단의 적어도 부분적인 저해, 억제, 조절, 사멸, 또는 일부

다른 측정 가능한 매개변수를 수행하기에 적합한 양을 "치료 유효 용량"으로서 정의한다. 상기 투여량을 성취하는데 필요한 양은 질병의 중증도, 환자 자신의 면역계의 일반적인 상태에 따라 변할 것이나, 일반적인 범위는 체중 킬로그램당 0.005 내지 5.0 mg의 선택된 펩티드 리간드이며, 0.05 내지 2.0 mg/kg/용량의 용량이 보다 통상적으로 사용된다. 예방학적 용도를 위해서, 본 발명의 펩티드 리간드 또는 그의 각테일을 함유하는 조성물을 또한 유사하거나 또는 약간 더 낮은 투여량으로 투여할 수 있다.

[0222] 본 발명에 따른 펩티드 리간드를 함유하는 조성물을 예방학적 및 치료학적 상황에 사용하여 포유동물에서 선택된 표적 세포 집단의 변경, 불활성화, 사멸 또는 제거를 도울 수 있다. 또한, 본원에 기재된 펩티드 리간드를 체외에서 또는 시험관내에서 선택적으로 사용하여 세포의 이종 콜렉션으로부터 표적 세포 집단을 사멸, 고갈 또는 달리 유효하게 제거할 수 있다. 포유동물로부터의 혈액을 체외에서 상기 선택된 펩티드 리간드와 합할 수 있으며, 이에 의해 표준 기법에 따라 목적하지 않는 세포를 사멸시키거나 또는 달리 상기 포유동물의 혈액으로부터 제거한다.

치료학적 용도

[0224] 본 발명의 추가의 태양에 따라, 임을 예방하거나 억제하거나 치료하는데 사용하기 위해 본원에 정의된 바와 같은 헤테로타임 비사이클리 펩티드 복합체를 제공한다.

[0225] 치료(또는 억제)될 수 있는 암(및 그의 양성 상대)의 예는 비제한적으로 상피 기원의 종양(다양한 유형의 선종 및 암종, 예를 들어 선암종, 편편세포암종, 이행세포 암종 및 다른 암종), 예를 들어 방광 및 요로, 유방, 위장관(식도, 위(위장), 소장, 결장, 직장 및 항문 포함), 간(간세포 암종), 담낭 및 담도계, 외분비 췌장, 신장, 폐(예를 들어 선암종, 소세포 폐암종, 비-소세포 폐암종, 기관지폐포 암종 및 중피종), 두경부(예를 들어 혀, 구강, 후두, 인두, 비인두, 편도, 침샘, 비강 및 부비동), 난소, 나팔관, 복막, 질, 음문, 고환, 자궁경부, 자궁근, 자궁내막, 갑상선(예를 들어 갑상선 여포암종), 부신, 전립선, 피부 및 부속기(예를 들어 흑색종, 기저세포 암종, 편평세포 암종, 각질가시세포종(keratoacanthoma), 형성이상 모반(dysplastic naevus))의 암종; 혈액암(즉 백혈병, 림프종) 및 전암성 혈액 질환 및 경계성암의 질환, 림프 계통의 혈액암 및 관련 상태 포함(예를 들어 급성 림프구성 백혈병[ALL], 만성 림프구성 백혈병[CLL], B-세포 림프종, 예를 들어 미만성 큰 B-세포 림프종[DLBCL], 여포성 림프종, 베켓 림프종, 외투세포 림프종, T-세포 림프종 및 백혈병, 자연살해[NK]세포 림프종, 호지킨 림프종, 텔세포 백혈병, 정체불명의 단클론성 감마글로불린증(monoclonal gammopathy of uncertain significance), 형질세포종(plasmacytoma), 다발성 골수종(multiple myeloma), 및 이식-후 림프증식성 질환(post-transplant lymphoproliferative disorders)), 및 골수 계통의 혈액암 및 관련 상태(예를 들어 급성 골수성 백혈병[AML], 만성 골수성 백혈병[CML], 만성 골수단핵구성백혈병[CMML], 과다호산구증후군(hypereosinophilic syndrome), 골수증식성 질환, 예를 들어 진성적혈구증가증(polycythaemia vera), 본태성 혈소판증가증(essential thrombocythaemia) 및 원발성 골수섬유증(primary myelofibrosis), 골수증식성 증후군, 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome) 및 전골수구성백혈병(promyelocytic leukaemia)); 간엽기원의 종양, 예를 들어 연조직, 골 또는 연골의 육종, 예를 들어 골육종, 섬유육종, 연골육종, 횡문근육종, 평활근육종, 지방육종, 혈관육종, 카포시육종, 유잉육종, 활막육종, 상피양 육종, 위장기질 종양, 양성 및 악성 조직구증(benign and malignant histiocytomas), 및 용기성피부섬유육종(dermatofibrosarcomaprotuberans); 중추 또는 말초 신경계의 종양(예를 들어 성상세포종(astrocytomas), 신경교종(gliomas) 및 교모세포종(glioblastomas), 수막종(meningiomas), 상의세포종(ependymomas), 송파체 종양(pineal tumour) 및 슈반종(schwannomas)); 내분비 종양(예를 들어 뇌하수체 종양, 부신 종양, 섬세포 종양, 부갑상선 종양, 카르시노이드 종양(carcinoid tumour) 및 갑상선의 수질 암종(medullary carcinoma of the thyroid)); 눈 및 부속기 종양(예를 들어 망막모세포종(retinoblastoma); 생식세포 및 영양막 종양(예를 들어 기형종(teratomas), 정상피종(seminomas), 난소고환종(dysgerminomas), 포상기태(hydatidiform moles) 및 융모막암종(choriocarcinomas)); 및 소아과 및 배아 종양(예를 들어 수모세포종(medulloblastoma), 신경모세포종(neuroblastoma), 윌름 종양(Wilms tumour) 및 원시신경 외배엽 종양(primitive neuroectodermal tumours)); 또는 환자를 암에 민감하게 하는 선천적인 또는 다른 증후군(예를 들어 색소성 건피증(Xeroderma Pigmentosum))을 포함한다.

[0226] 추가의 실시태양에서, 암은 비호지킨 림프종(NHL), 베켓 림프종(BL), 다발성 골수종(MM), B 만성 림프구성 백혈병(B-CLL), B 및 T 급성 림프구성 백혈병(ALL), T 세포 림프종(TCL), 급성 골수성 백혈병(AML), 텔세포 백혈병(HCL), 호지킨 림프종(HL), 및 만성 골수성 백혈병(CML) 중에서 선택된 바와 같은 혈액암 중에서 선택된다.

[0227] 본원에서 "예방"이란 용어에 대한 언급은 질병의 유발 전에 보호성 조성물의 투여를 수반한다. "억제"는 유발성 사건 후에, 그러나 질병의 임상적 출현에 앞서 조성물의 투여를 지칭한다. "치료"는 질병 증상이 표출된 후에

보호성 조성물의 투여를 수반한다.

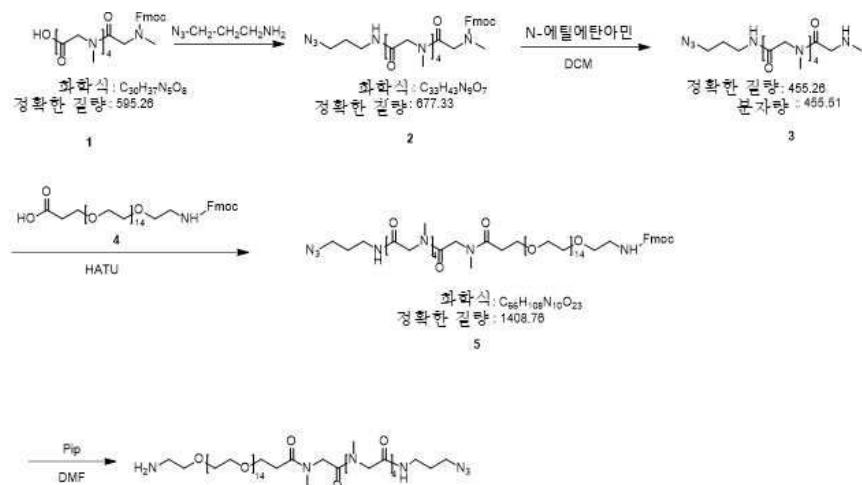
[0228] 질병에 대한 보호 또는 질병의 치료에서 패티드 리간드의 유효성을 선별하는데 사용될 수 있는 동물 모델 시스템을 입수할 수 있다. 상기 동물 모델 시스템의 사용은 본 발명에 의해 용이해지며, 본 발명은 동물 모델의 사용을 허용하기 위해서, 인간 및 동물 표적과 교차 반응할 수 있는 폴리펩티드 리간드의 개발을 허용한다.

[0229] 본 발명을 하기의 실시예를 참조하여 하기에 추가로 기재한다.

실시예

실시예 1: 링커의 합성

[0231] COM128



[0233]

[0234] 화합물 1(700.0 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq), 3-아지도프로판-1-아민(117.66 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq), EDCI(270.4 mg, 1.41 mmol, 1.2 eq), HOBT(190.6 mg, 1.41 mmol, 1.2 eq)의 혼합물을 DCM(20 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 혼합물을 N_2 분위기하에 1시간 동안 20-25°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 677.33, 관측된 m/z: 678.2($[M+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 용매를 증발시켜 화합물 2(600 mg, 조 물질)를 생성시켰으며 백색 고체로서 수득하였다.

[0235]

화합물 2(600.0 mg, 885.3 μ mol, 1.0 eq), N-에틸에탄아민(1.29 g, 15.19 mmol, 1.50 mL, 17.2 eq)의 혼합물을 DCM(3 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 혼합물을 N_2 분위기하에 2시간 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 455.51, 관측된 m/z: 456.3($[M+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 용매를 증발시켜 화합물 3(400 mg, 조 물질)를 생성시켰으며 무색 오일로서 수득하였다.

[0236]

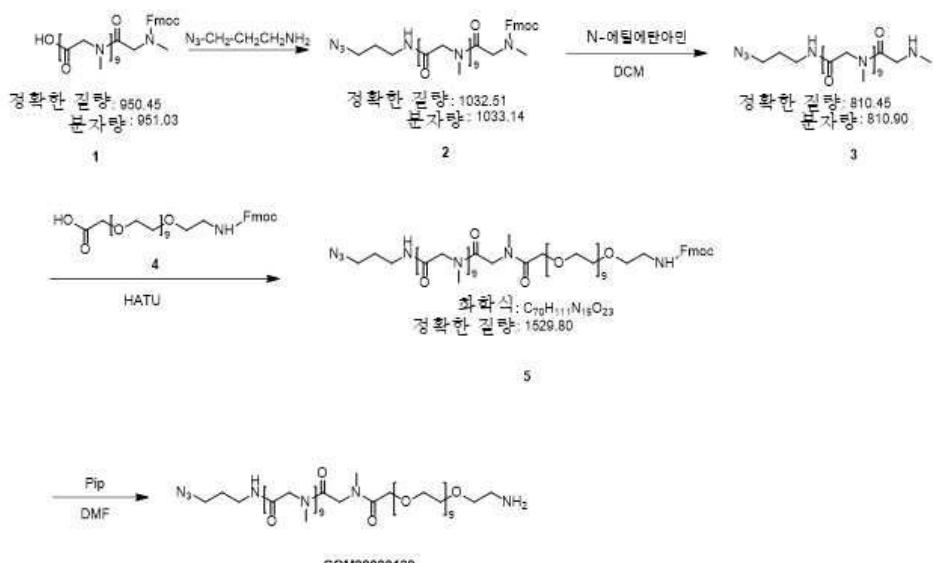
화합물 3(150.0 mg, 329.3 μ mol, 1.0 eq), 화합물 4(320.1 mg, 329.3 μ mol, 1.0 eq), HATU(125.2 mg, 329.3 μ mol, 1.0 eq), DIEA(42.6 mg, 329.3 μ mol, 57.4 μ L, 1.0 eq)의 혼합물을 DMF(2 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 혼합물을 N_2 분위기하에 2시간 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 1408.76, 관측된 m/z: 705.3($[M/2+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 용매를 증발시켜 화합물 5(400 mg, 조 물질)를 생성시켰으며 황색 오일로서 수득하였다.

[0237]

화합물 5(400 mg, 283.77 μ mol, 1.0 eq)를 DMF(4 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 페징됨)에 용해시킨 다음, 피페리딘(862.2 mg, 10.13 mmol, 1 mL, 35.7 eq)을 가하고, 이어서 혼합물을 N_2 분위기하에 15분 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 5가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 1187.37, 관측된 m/z: 594.4($[M/2+H]^+$), 1187.4($[M+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 용매를 증발시켜 COM128(250

mg, 조 물질)를 생성시켰으며 무색 오일로서 수득하였다.

COM129



[0239]

[0240]

화합물 1(1.4 g, 1.47 mmol, 1.0 eq), 3-아지도프로판-1-아민(162.1 mg, 1.62 mmol, 1.1 eq), EDCI(338.6 mg, 1.77 mmol, 1.2 eq), HOBr(238.7 mg, 1.77 mmol, 1.2 eq)의 혼합물을 DCM(5 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 혼합물을 N_2 분위기하에 1시간 동안 20-25°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 1033.14, 관측된 m/z : 1033.2($[M+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 몇 방울의 1M HCl로 처리하고, 유기층을 감압하에서 증발시켜 용매를 제거하였다. 화합물 2(1.1 g, 조 물질)를 황색 오일로서 수득하였다.

[0241]

화합물 2(1.1 g, 1.06 mmol, 1 eq), N-에틸에탄아민(3.89 g, 53.24 mmol, 5.48 mL, 50 eq)의 혼합물을 DCM(5 mL, 사전-탈기되고 N₂로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 혼합물을 N₂ 분위기하에 1시간 동안 20–25°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 810.90, 관측된 m/z: 810.9([M+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 침압하에서 증발시키고 화합물 3(810 mg, 조 물질)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0242]

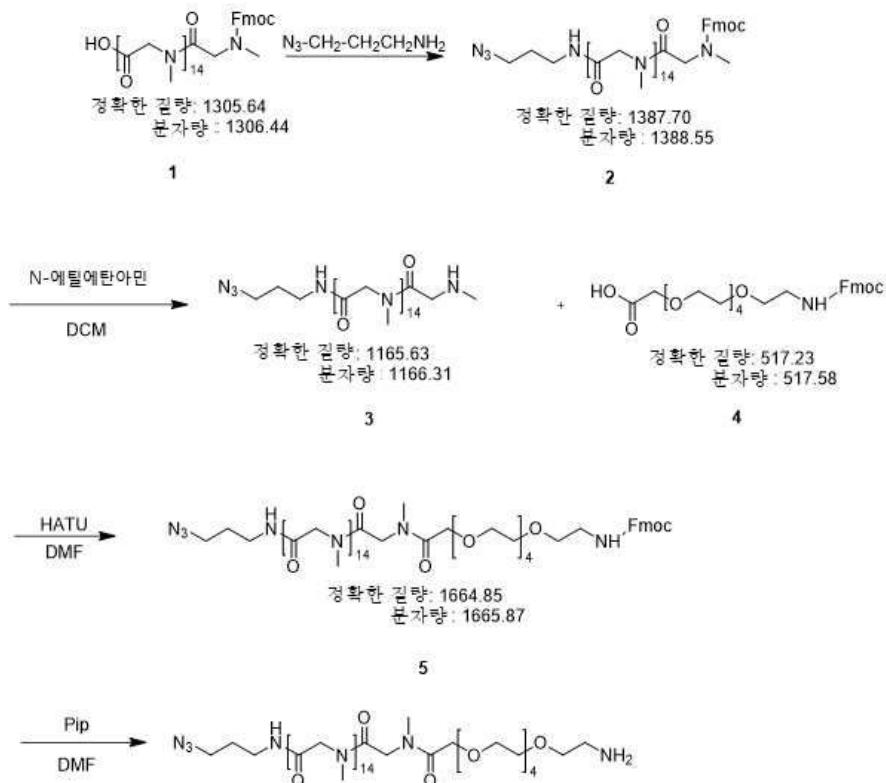
화합물 3(810.0 mg, 998.9 μmol, 1.0 eq), 화합물 4(810.7 mg, 1.10 mmol, 1.1 eq), HATU(455.8 mg, 1.20 mmol, 1.2 eq), DIPE(258.2 mg, 2.00 mmol, 348.0 μl, 2.0 eq)의 혼합물을 DMF(2 ml, 사전-탈기되고 N₂로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 혼합물을 N₂ 분위기하에 2시간 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 1530.72, 관측된 m/z: 765.5([M/2H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 몇 방울의 1M HCl로 처리하고, 유기층을 수집하고, 감압하에서 증발시켜 용매를 제거하였다. 화합물 5(1.1 g, 조물질)를 황색 오일로서 수득하였다.

[0243]

화합물 5(1 g, 653.29 μmol , 1 eq)를 DCM(10 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 페징됨)에 용해시킨 다음, 피페리딘(2.39 g, 32.66 mmol, 3.36 mL, 50 eq)을 가하고, 이어서 혼합물을 N_2 분위기하에 2시간 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 5가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 1308.47, 관측된 m/z : 1308.4 [$\text{M}+\text{H}^+$])를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건: 상 A: H_2O 중의 0.075% TFA, 상 B: MeCN, 컬럼: Luna 200*25 mm 10 μm , C18, 110A 및 Gemini 150*30 mm, C18, 5 μm , 110A, 연결, 50°C)에 의해 정제시켰다. COM129(700 mg, 463.72 μmol , 70.98% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다.

[0244]

COM130



[0245]

[0246]

화합물 1(291 mg, 222.75 μmol , 1.0 eq), 3-아지도프로판-1-아민(24.53 mg, 245.02 μmol , 1.1 eq), EDCI(51.24 mg, 267.30 μmol , 1.2 eq), HOBr(36.12 mg, 267.30 μmol , 1.2 eq)의 혼합물을 DCM(3 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 혼합물을 N_2 분위기하에 1시간 동안 20–25°C에서 교반하였다.

LC-MS는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 1388.53, 관측된 m/z : 694.7($[M+2H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(200 mg, 144.04 μ mol, 64.66% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0247]

화합물 2(200 mg, 144.04 μ mol, 1.0 eq), N-에틸에탄아민(210.7 mg, 2.88 mmol, 297 μ l, 20.0 eq)의 혼합물을 DCM(3 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 퍼징됨)에 용해시키고, 이어서 혼합물을 N_2 분위기하에 1시간 동안 20-25°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 1166.29, 관측된 m/z : 1166.3($[M+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 증발시키고 화합물 3(150 mg, 조 물질)을 황색 오일로서 수득하였다.

[0248]

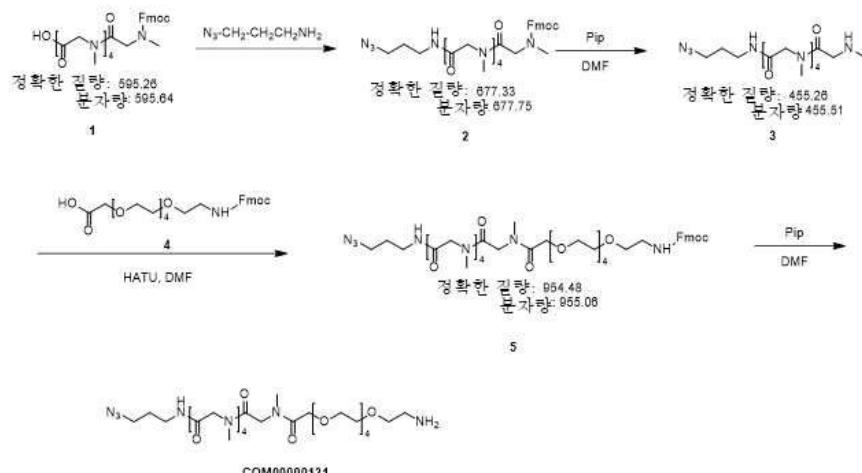
화합물 3(150 mg, 128.61 μ mol, 1.0 eq), 화합물 4(75 mg, 144.91 μ mol, 1.13 eq), HATU(58.7 mg, 154.34 μ mol, 1.2 eq), 및 DIEA(33.24 mg, 257.23 μ mol, 44.80 μ L, 2.0 eq)의 혼합물을 DMF(5 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 혼합물을 N_2 분위기하에 2시간 동안 20-25°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 1665.84, 관측된 m/z : 833.2($[M/2+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 제거하고 화합물 5(300 mg, 조 물질)를 황색 오일로서 수득하였다.

[0249]

조 화합물 5(300 mg, 10 mL DMF에 용해됨)를 피페리딘(2 mL)에 가하고 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LCMS는 목적하는 m/z (MW: 1443.60 관측된 m/z : 722.7[M/2+H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정체시켰다. COM130(140 mg, 58.19 μ mol, 32.31% 수율, 60% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0250]

COM131



[0251]

[0252]

화합물 1(700.0 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq), 3-아지도프로판-1-아민(117.7 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq), HOEt(190.6 mg, 1.41 mmol, 1.2 eq), EDCI(270.4 mg, 1.41 mmol, 1.2 eq)의 혼합물을 DCM(20 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 혼합물을 N_2 분위기하에 2시간 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 677.75, 관측된 m/z: 678.2([M+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 몇 방울의 1M HCl로 처리하고, 유기층을 수집하고 감압하에서 증발시켰다. 화합물 2(600.0 mg, 조 물질)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0253]

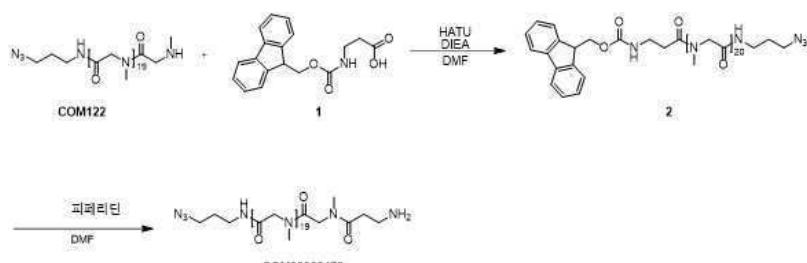
화합물 2(600.0 mg, 885.2 μ mol, 1.0 eq)를 DMF(3 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 피페리딘(1.29 g, 15.19 mmol, 1.50 mL, 17.2 eq)을 가하고 혼합물을 N_2 분위기하에 2시간 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 455.51, 관측된 m/z: 456.3([M+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고, 화합물 3(400.0 mg, 879.1 μ mol)을 무색 오일로서 수득하였다.

[0254]

화합물 3(250.0 mg, 548.83 μ mol, 1.0 eq), 화합물 4(284.1 mg, 548.83 μ mol, 1.0 eq), HATU(229.6 mg, 603.72 μ mol, 1.1 eq), DIEA(141.9 mg, 1.10 mmol, 191.19 μ L, 2.0 eq)의 혼합물을 DCM(20 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 혼합물을 N_2 분위기하에 2시간 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 955.06, 관측된 m/z: 955.6([M+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 5(400.0 mg, 419.1 μ mol)를 백색 고체로서 수득하였다. 화합물 5(400.0 mg, 418.82 μ mol, 1.0 eq)를 DMF(4 mL, 사전-탈기되고 N_2 로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 피페리딘(862.2 mg, 10.13 mmol, 1 mL, 24.2 eq)을 가하고, 혼합물을 N_2 분위기하에 2시간 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 5가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 732.83, 관측된 m/z: 733.3([M+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. COM131(200 mg, 272.9 μ mol)을 무색 오일로서 수득하였다.

[0255]

COM470

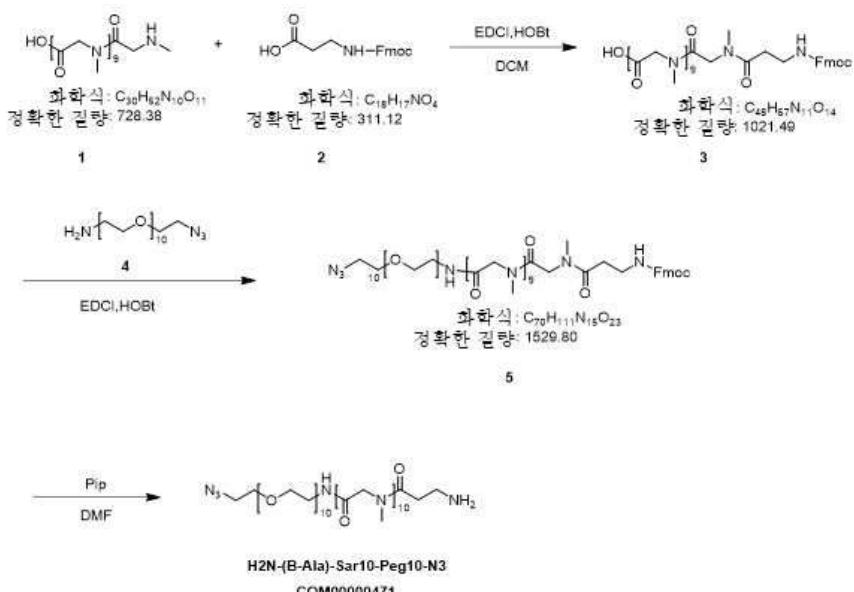


[0256]

[0257] DMF(6 mL) 중의 COM122(228 mg, 149.83 μmol, 1.0 eq), 화합물 1(51.31 mg, 164.82 μmol, 1.1 eq)의 용액에, HATU(85.40 mg, 224.75 μmol, 1.5 eq), 및 DIEA(19.37 mg, 149.83 μmol, 26.10 μL, 1.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 2시간 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 1814.99, 관측된 m/z: 908.2([M/2H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(54 mg, 29.75 μmol, 19.86% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0258] DMF(2 mL) 중의 화합물 2(54 mg, 29.8 μmol, 1.0 eq)의 용액에, 피페리딘(61 mg, 715 μmol, 71 μL, 24.0 eq)을 가하였다. 혼합물을 2시간 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 1592.75, 관측된 m/z: 796.27([M/2H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. COM470(40 mg, 25.11 μmol, 84.41% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0259] COM471



[0260]

[0261] 화합물 1(900 mg, 1.23 mmol, 1.0 eq) 및 화합물 2(1.0 g, 3.21 mmol, 2.6 eq)의 혼합물을 DCM(20 mL)에 용해시킨 다음, (284.0 mg, 1.48 mmol, 1.2 eq), HOBr(200.2 mg, 1.48 mmol, 1.2 eq)를 가하였다. 혼합물을 2시간 동안 25°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 1021.49, 관측된 m/z: 1022.2([M+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(0.900 g, 880.53 μmol, 71.30% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0262]

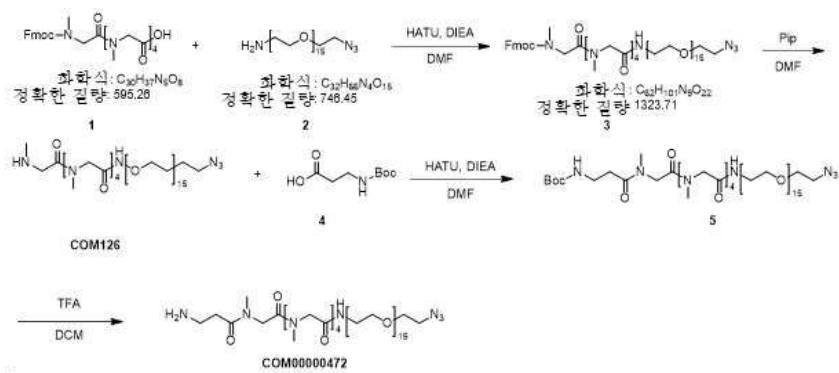
화합물 3(500.0 mg, 489.19 μmol, 1.0 eq), 화합물 4(257.6 mg, 489.19 μmol, 1.0 eq)의 혼합물을 DCM(5 mL)에 용해시킨 다음, HOBr(132.2 mg, 978.37 μmol, 2.0 eq), EDCI(187.6 mg, 978.37 μmol, 2.0 eq)을 가하였다. 혼합물을 2시간 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 1529.80 관측된 m/z: 765.9([M/2H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(420 mg, 246.94 μmol, 50.48% 수율)을 생성시켰으며 무색 오일로서 수득하였다.

[0263]

화합물 5(420 mg, 274.38 μmol, 1.0 eq)를 DMF(4 mL)에 용해시킨 다음, 피페리딘(865.2 mg, 10.16 mmol, 1 mL, 37 eq)을 가하였다. 혼합물을 2시간 동안 25-30°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 5가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 1308.48, 관측된 m/z: 654.8([M/2H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 조 생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제하였다. COM471(386 mg, 265.50 μmol, 96.76% 수율)을 무색 오일로서 수득하였다.

[0264]

COM472



[0265]

화합물 1(0.5 g, 839.43 μmol, 1.0 eq), 화합물 2(627.0 mg, 839.43 μmol, 1.0 eq) 및 DIEA(217.0 mg, 1.68 mmol, 292.4 μl, 2.0 eq)의 혼합물을 DMF(2 ml)에 용해시키고, 이어서 HATU(319.2 mg, 839.4 μmol, 1.0 eq)를 혼합물에 가하였다. 이어서 혼합물을 30분 동안 25°C에서 교반하였다. TLC(DCM:CH₃OH=10:1, R_f=0.24)는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 하나의 새로운 스포트이 형성되었음을 보였다. 용매를 증발시켜 화합물 3(0.45 g, 339.75 μmol, 40.47% 수율, 조 물질)을 무색 오일로서 수득하였으며, 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0266]

화합물 3(450.0 mg, 339.75 μmol, 1.0 eq)을 DMF(8 ml)에 용해시킨 다음, 피페리딘(2 ml)을 가하였다. 혼합물을 15분 동안 25°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는(계산된 MW: 1102.27, 관측된 m/z: 552.11([M/2H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(370.0 mg, 335.67 μmol, 98.80% 수율)을 무색 오일로서 수득하였다.

[0267]

화합물 3(450.0 mg, 339.75 μmol, 1.0 eq)을 DMF(8 ml)에 용해시킨 다음, 피페리딘(2 ml)을 가하였다. 혼합물을 15분 동안 25°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 혼합물을 증발시켜 용매를 제거하고, 화합물 5(30 mg, 조 물질)를 무색 오일로서 수득하였으며, 이를 추가의 정제 없이 다음 단계에 사용하였다.

[0268]

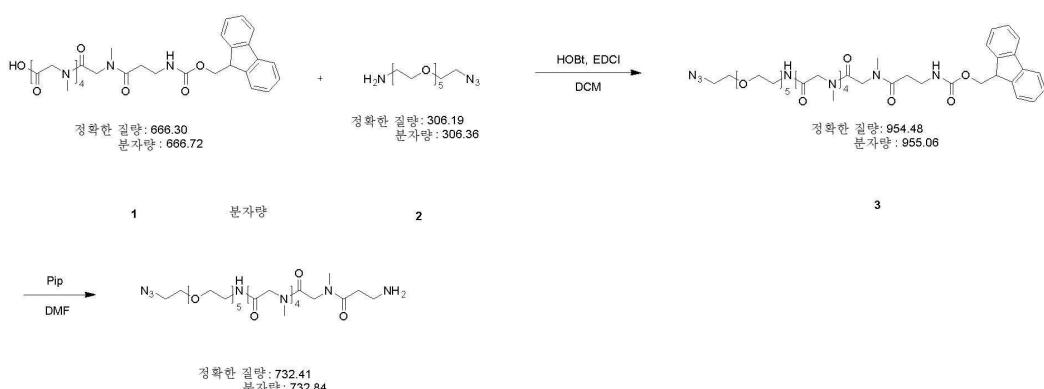
화합물 5(30 mg, 23.57 μmol, 1.0 eq)를 DCM(4.5 ml)에 용해시키고, 이어서 TFA(0.5 ml)를 가하고 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 5가 완전히 소멸되었고 목적하는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. COM472(10 mg, 8.52 μmol)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0269]

화합물 5(30 mg, 23.57 μmol, 1.0 eq)를 DCM(4.5 ml)에 용해시키고, 이어서 TFA(0.5 ml)를 가하고 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 5가 완전히 소멸되었고 목적하는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. COM472(10 mg, 8.52 μmol)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0270]

COM473



[0271]

COM00000473

[0272]

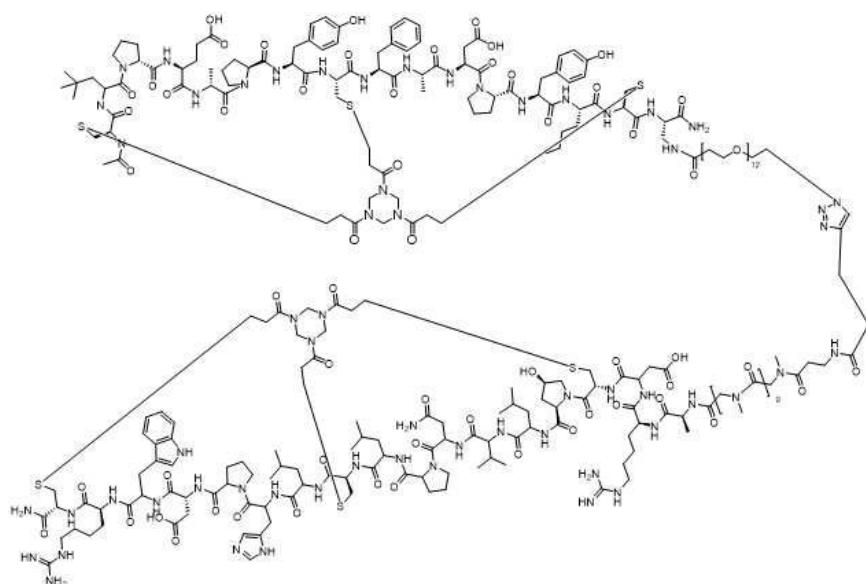
화합물 1(300 mg, 449.96 μmol, 1.0 eq), 화합물 2(138 mg, 449.96 μmol, 1.0 eq), HOBT(122 mg, 899.93 μmol, 2.0 eq), EDCI(173 mg, 899.93 μmol, 2.0 eq)의 혼합물을 DCM(10 ml, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 혼합물을 이어서 N₂ 분위기하에 1시간 동안 20-25°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이

완전히 소멸되었고 목적하는(MW: 955.06, 관측된 m/z : 955.3($[M+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하였다. 혼합물을 감압하에서 증발시키고 화합물 3(300 mg, 조 물질)을 황색 오일로서 수득하였다.

[0273] 화합물 3(300 mg, 314.12 μmol , 1.0 eq)을 DMF(4 mL)에 용해시키고, 이어서 피페리딘(1 mL)을 가하고 혼합물을 1시간 동안 20-25°C에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 732.83, 관측된 m/z : 733.2($[M+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켰다. COM473(160 mg, 218.33 μmol , 69.51% 수율)를 무색 오일로서 수득하였다.

[0274] 실시예 2: EphA2/CD137 결합 헤테로텐덤 비사이클릭 펩티드의 합성

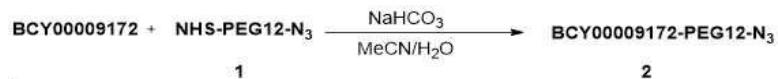
[0275] BCY9173



BCY00009173

[0276]

BCY9172-PEG12-N₃의 제조 과정



[0278]

[0279] BCY9172(520 mg, 248.16 μmol , 1 eq) 및 화합물 1(370 mg, 499.47 μmol , 2.01 eq)을 DMF(5 mL)에 용해시키고 DIEA(48.11 mg, 372.24 μmol , 64.84 μl , 1.5 eq)를 가하고 이어서 혼합물을 30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY9172가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 2721.12, 관측된 m/z : 1360.9($[M/2+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 화합물 2(284 mg, 101.10 μmol , 40.74% 수율, 96.87% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.



[0280]

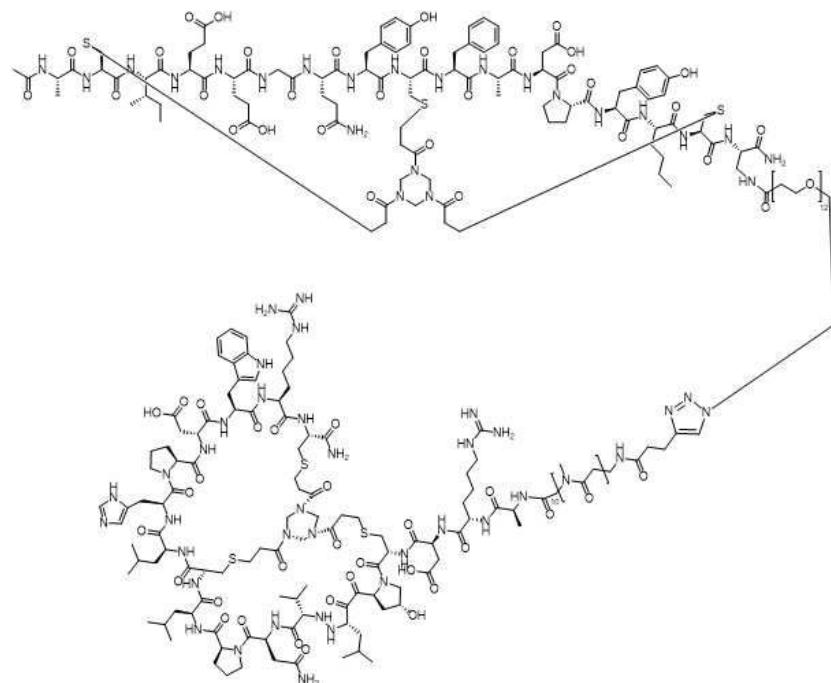
BCY9173의 제조 과정

[0282] 본 반응을 2개의 독립적인 용기에서 나란히 수행하였다. 하나의 용기에 대해서, 화합물 2(100 mg, 36.75 μmol , 1.0 eq) 및 BCY6169(120 mg, 36.78 μmol , 1.0 eq)를 먼저 10 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 91.9 μl , 1.0 eq), VcNa(0.4 M, 183.8 μl , 2.0 eq) 및 THPTA(0.4M, 91.9 μl , 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 페징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 40°C에서 16시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는

m/z(계산된 MW: 5983.85 관측된 m/z: 997.6600([M/6+H]⁺) 및 1197.2300([M/5+H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 BCY9173(218 mg, 34.97 μmol, 47.58% 수율, 96% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0283]

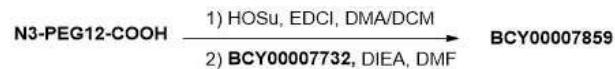
BCY7985



BCY00007985

[0284]

[0285] BCY7859의 일반적인 제조 과정



[0286]

DMA(4.5 mL) 및 DCM(1.5 mL) 중의 N3-PEG12-COOH(250 mg, 388 μmol) 및 HOSu(67.0 mg, 583 μmol)의 용액에 EDCI(89.3 mg, 466 μmol)을 20°C에서 16시간 동안 교반하면서 가하였다. 5 mL의 DMA 중의 BCY7732(855 mg, 388 μmol)의 혼합물을 함유하는 또 다른 50 mL의 둑근 플라스크에 DIEA(186 mg, 1.44 mmol, 250 μL)를 10분간 교반하면서 가하였다. 이어서 초기 반응 혼합물을 추가로 5시간 동안 20°C에서 추가로 교반하면서 상기 플라스크에 가하였다. LC-MS(ES8396-307-P1B1)는 BCY7732가 완전히 소멸되었고 목적하는 질량을 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 생성되는 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켜 화합물 BCY7859(621 mg, 200 μmol, 51.6% 수율, TFA 염)를 백색 고체로서 제공하였다.

[0288]

BCY6169의 일반적인 제조 과정

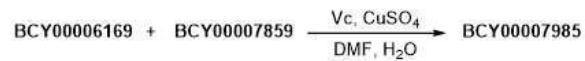


[0289]

DMA(2 mL) 중의 BCY6099(300 mg, 94.3 μmol)의 용액에 DIEA(36.6 mg, 283 μmol, 49.3 μL)를 10분 동안 교반하면서 가하였다. 그 후에, PYA-NHS(36.8 mg, 189 μmol)를 추가로 15시간 동안 20°C에서 추가로 교반하면서 가하였다. LC-MS는 BCY6099가 완전히 소멸되었고 목적하는 질량을 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켜 화합물 BCY6169(299 mg, 86.2 μmol, 91.5% 수율)를 백색 고체로서 제공하였다.

[0291]

BCY7985의 일반적인 제조 과정

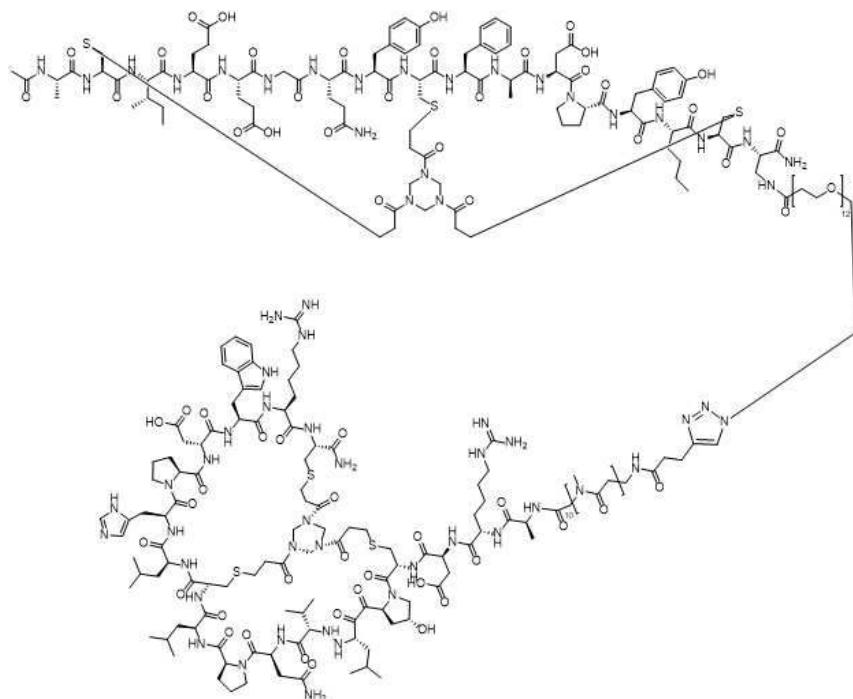


[0292]

[0293] 2시간 동안 질소에 의해 펴징된 DMF(5 mL) 중의 BCY7859(220 mg, 77.8 μ mol) 및 BCY6169(251 mg, 77.1 μ mol)의 용액에 수성 아스코르브산 용액(0.8M, 963 μ L)를 가한 다음 질소 분위기하에서 수성 CuSO₄(0.8M, 289 μ L)를 가하였다. 이어서 혼합물을 2시간 동안 20°C에서 교반하였다. LC-MS는 BCY6169가 완전히 소멸되었고 목적하는 질량을 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켜 화합물 BCY7985(283 mg, 43.4 μ mol, 56.3% 수율, TFA)를 백색 고체로서 제공하였다.

[0294]

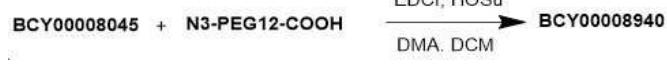
BCY8942



BCY00008942

[0295]

[0296] BCY8940의 일반적인 제조 과정

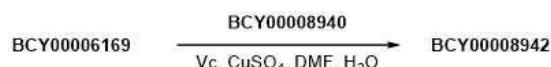


[0297]

[0298] DMA(3 mL) 및 DCM(1 mL) 중의 N3-PEG12-COOH(120 mg, 186 μ mol, 1.0 eq)의 용액에 HOSu(32.2 mg, 280 μ mol, 1.5 eq)를 교반하면서 가하였다. 이어서 EDCI(42.9 mg, 224 μ mol, 1.2 eq)을 20°C에서 추가로 7시간 동안 추가로 교반하면서 혼합물에 가하였다. LCMS는 활성화된 에스테르가 완전하게 형성되었음을 보였다. DMA(3 mL) 중의 BCY8045(410 mg, 186 μ mol, 1.0 eq)가 있는 또 다른 플라스크에 DIEA(120 mg, 932 μ mol, 162 μ L, 5.0 eq)를 교반하면서 가하고, 이어서 활성화된 에스테를 가하고 혼합물을 18시간 동안 20°C에서 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 진공하에서 농축시켜 DCM을 제거하였다. 생성 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켜 BCY8940(190 mg, 67.2 μ mol, 36.1% 수율)를 백색 고체로서 제공하였다.

[0299]

BCY8942의 일반적인 제조 과정



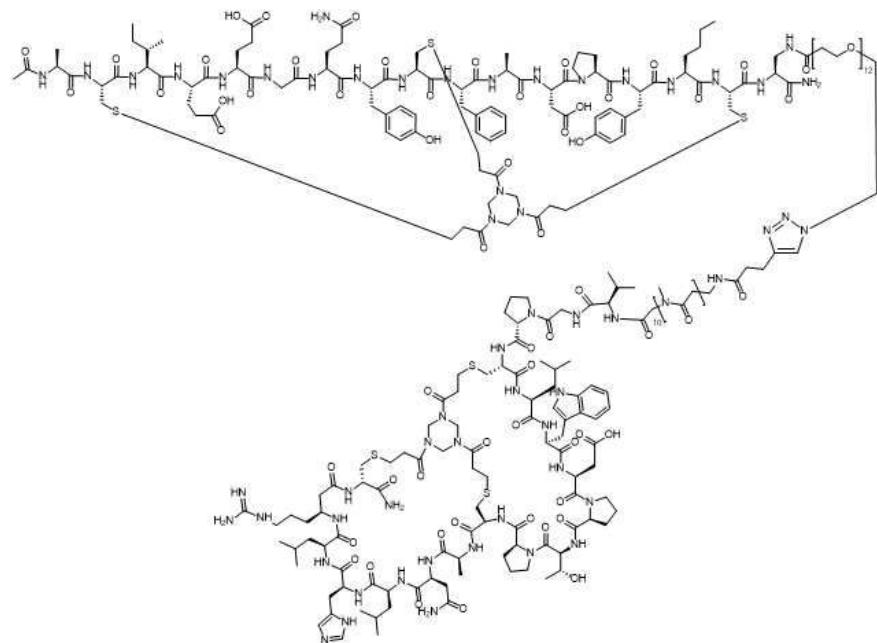
[0300]

[0301] DMF(2.0 mL) 중의 BCY8940(28.6 mg, 10.1 μ mol, 1.1 eq) 및 BCY6169(30.0 mg, 9.19 μ mol, 1.0 eq)의 용액에 (2R)-2-[(1S)-1,2-디하이드록시에틸]-3,4-디하이드록시-2H-푸란-5-온(1.0M, 92.0 μ L) 및 CuSO₄(1.0M, 27.6 μ L)를 20°C에서 2시간 동안 질소 분위기하에서 교반하면서 가하였다. LC-MS는 BCY6169가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 6089.91 관측된 m/z: 1218.4([M+5H]⁺), 1016.0([M+6H]⁺), 870.7([M+7H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켜 화합물

BCY8942(15.4 mg, 2.46 μmol , 26.8% 수율, 97.3% 순도)를 백색 고체로서 제공하였다.

[0302]

BCY8943

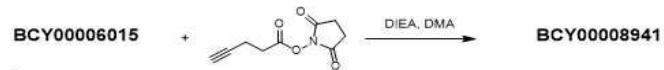


[0303]

BCY00008943

[0304]

BCY8941의 일반적인 제조 과정



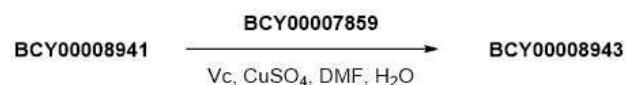
[0305]

[0306]

DMA(2 mL) 중의 BCY6015(PYA 부분의 부재를 제외하고 BCY8941과 동일한 펩티드; 100 mg, 32.9 μmol)의 용액에 DIEA(12.8 mg, 98.7 μmol , 17.2 μl)를 10분 동안 교반하면서 가하였다. 이어서 (2,5-디옥소페롤리딘-1-일)펜트-4-이노에이트(12.8 mg, 65.8 μmol)를 혼합물에 가한 다음 20°C에서 16시간 동안 추가로 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 3119.60, 관측된 m/z : 1040.5($[\text{M}/3\text{H}]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 혼합물을 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켜 화합물 BCY8941(90.0 mg, 28.9 μmol , 87.7% 수율)을 백색 고체로서 제공하였다.

[0307]

BCY8943의 일반적인 제조 과정



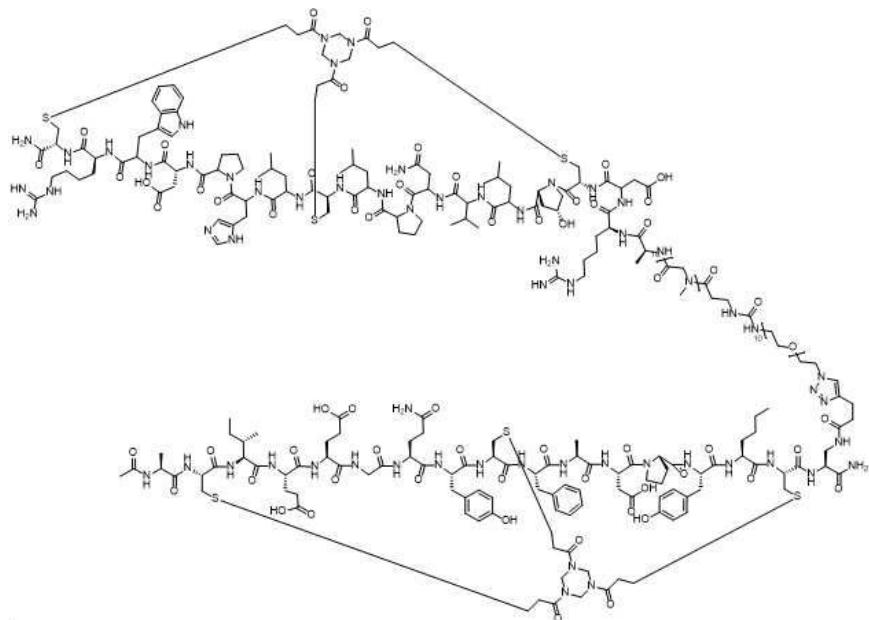
[0308]

[0309]

DMSO(2 mL, 1시간 동안 질소에 의해 예비-폐징됨) 중의 BCY7859(BCY7985에 기재된 바와 같이 제조될 수 있음; 40.0 mg, 14.2 μmol) 및 BCY8941(42.0 mg, 13.5 μmol)의 용액에 (2R)-2[(1S)-1,2-디하이드록시에틸]-3,4-디하이드록시-2H-푸란-5-온(1.0M, 270 μl) 및 CuSO_4 (1.0M, 80.9 μl)를 가하였다. 혼합물을 질소로 3회 폐징하고 15°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8941이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 5946.77, 관측된 m/z : 1190.2($[\text{M}/5\text{H}]^+$), 991.5($[\text{M}/6\text{H}]^+$), 849.9($[\text{M}/7\text{H}]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(A: H_2O 중의 0.075% TFA, B: ACN)에 의해 정제시켜 화합물 BCY8943(11.5 mg, 1.90 μmol , 14.1% 수율, 98.1% 순도)을 백색 고체로서 제공하였다.

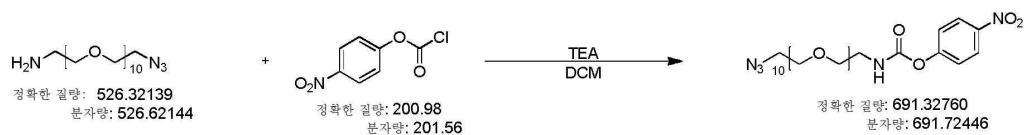
[0310]

BCY9647



[0311]

[0312]



[0313]

[0314]

DCM(0.5 mL) 중의 COM134(30.0 mg, 57.0 μ mol, 1.0 eq), 화합물 1(17.2 mg, 85.3 μ mol, 1.5 eq)의 용액에 TEA(8.65 mg, 11.9 μ L, 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS는 COM134가 완전히 소멸되었고 목적하는 질량(계산된 MW: 691.72, 관측된 m/z : 692.3($[M+H]^+$) 및 709.3($[M+NH_4]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시키고, 이어서 동결건조시켜 조 화합물 2(30.5 mg, 조물질)를 백색으로서 생성시켰다.

[0315]

화합물 3의 제조 과정



[0316]

[0317]

DMF(1 mL) 중의 화합물 2(10 mg, 1.0 eq)의 용액에 BCY6099(46 mg, 1.0 eq) 및 DIEA(5.61 mg, 7.55 μ L, 3.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 3735.28 관측된 m/z: 1245.9([M+3H] $^{+}$) 및 934.5([M+4H] $^{+}$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상 HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(34 mg, 62.96% 수율, 100% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0318]

BCY9647의 제조 과정

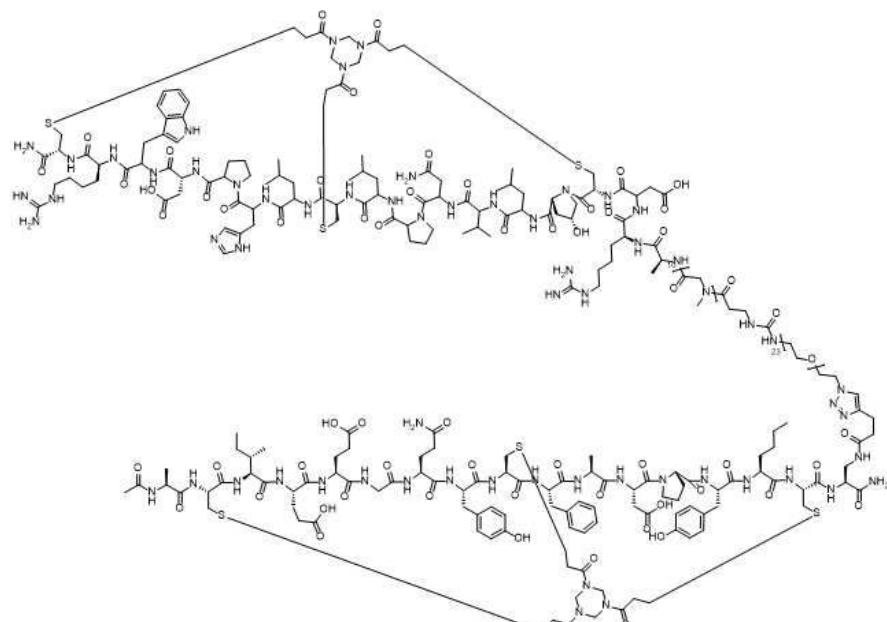


[0319]

[0320] 화합물 3(34 mg, 9.10 μmol , 1.0 eq), BCY7741(23 mg, 10.08 μmol , 1.11 eq) 및 THPTA(0.4M, 11.4 μl , 0.5 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 11.4 μl , 0.5 eq) 및 VcNa(0.4M, 22.8 μl , 1 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 6016.82, 관측된 m/z: 1204.1([M/5+H]⁺), 1003.5([M/6+H]⁺), 860.3([M/7+H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9647(31.2 mg, 54.67% 수율, 95.96% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0321]

BCY9648



[0322]

[0323] 화합물 2의 제조 과정



[0324]

COM00000135

1

2

[0325]

DCM(0.5 mL) 중의 COM135(30 mg, 27.29 μmol , 1.0 eq), 화합물 1(8.25 mg, 40.94 μmol , 1.5 eq)의 용액에 TEA(4.14 mg, 40.94 μmol , 5.70 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS는 COM135가 완전히 소멸되었고 목적하는 질량[계산된 MW: 1264.41, 관측된 m/z: 1281.4([M+NH₄]⁺), 649.8([M/2+H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켜 화합물 2(18 mg, 14.2 μmol , 52.14% 수율)를 제공하였다.

[0326]

화합물 3의 제조 과정



[0327]

[0328] DMF(1 mL) 중의 화합물 3(9 mg, 7.12 μ mol, 1 eq)의 용액에 BCY6099(23 mg, 7.23 μ mol, 1.02 eq) 및 DIEA(2.76 mg, 21.35 μ mol, 3.72 μ L, 3.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 4307.96 관측된 m/z: 1436.9([M+3H] $^{+}$), 1077.9([M/4+H] $^{+}$), 862.5([M/5+H] $^{+}$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상 HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(14.6 mg, 47.61% 수율, 100% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0329] BCY9648의 제조 과정

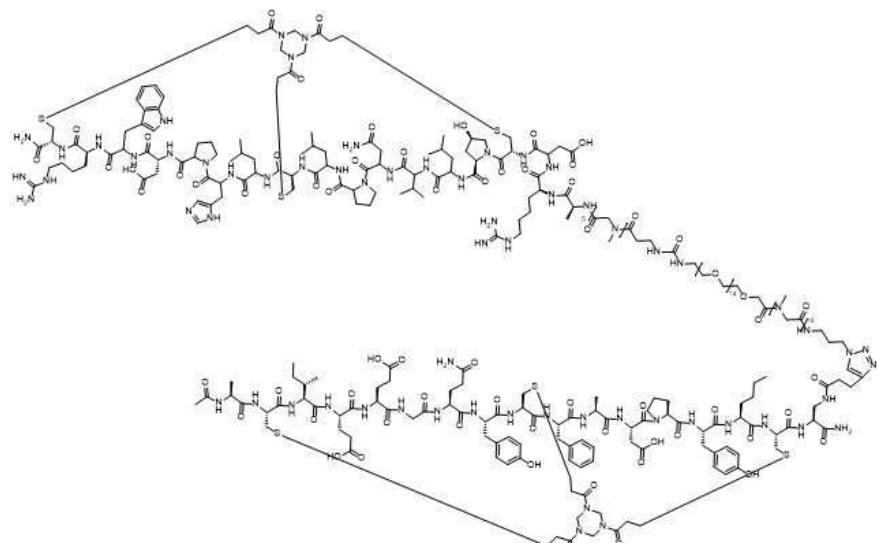


[0330]

[0331] 화합물 3(14.6 mg, 3.39 μ mol, 1 eq), BCY7741(8.5 mg, 3.73 μ mol, 1.1 eq) 및 THPTA(0.4M, 4.3 μ L, 0.5 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 4.3 μ L, 0.5 eq) 및 VcNa(0.4M, 8.6 μ L, 1.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 6589.50, 관측된 m/z: 1098.8([M/6+H] $^{+}$), 942.1([M/7+H] $^{+}$), 824.6([M/8+H] $^{+}$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9648(14.7 mg, 63.34% 수율, 96.22% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

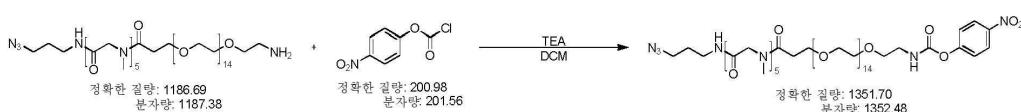
[0332]

BCY9655



[0333]

[0334] 화합물 2의 제조 과정



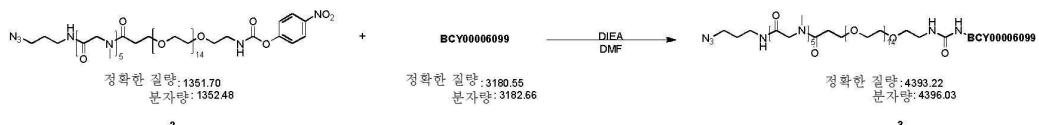
[0335]

[0336]

DCM(0.5 mL) 중의 COM128(120 mg, 101.06 μ mol, 1.0 eq), 화합물 1(25 mg, 124.03 μ mol, 1.25 eq)의 용액에 TEA(15.34 mg, 151.59 μ mol, 21.10 μ L, 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z(계산된 MW: 1352.48, 관측된 m/z: 676.8([M/2+H] $^{+}$), 1369.3([M+NH4] $^{+}$)를 갖는 하나의 주 피

크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(14 mg, 8.99 μmol , 8.90% 수율, 86.86% 순도)를 무색 오일로서 수득하였다.

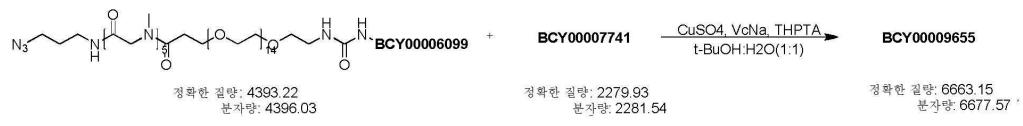
[0337] 화합물 3의 제조 과정



[0338]

[0339] DMF(2 mL) 중의 화합물 2(7 mg, 5.18 μmol , 1.0 eq) 및 BCY6099(16 mg, 5.03 μmol , 1.0 eq)의 용액에 DIEA(2.01 mg, 15.53 μmol , 2.70 μl)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 4396.02, 관측된 m/z : 879.8($[\text{M}+5\text{H}]^+$) 및 1099.8($[\text{M}+4\text{H}]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상 HPLC(0.1% TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(11.8 mg, 48.29% 수율, 93.11% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

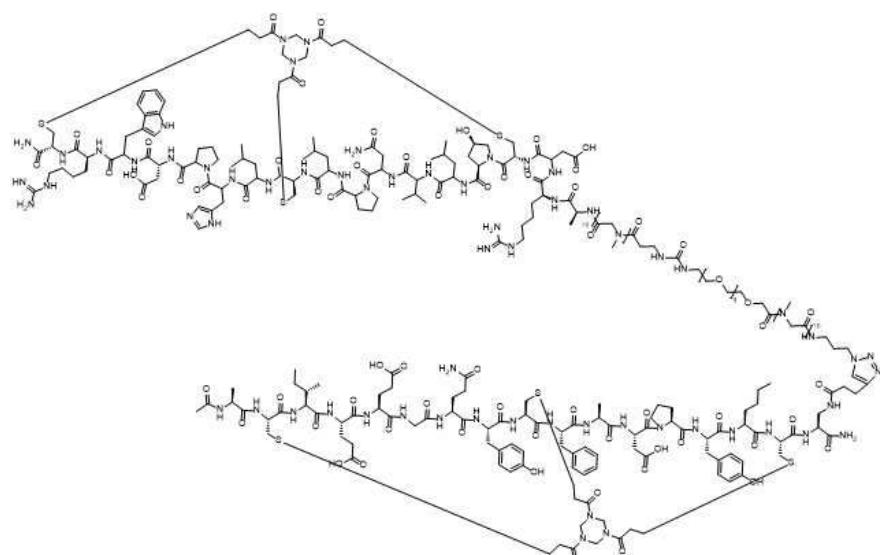
[0340] BCY9655의 제조 과정



[0341]

[0342] 화합물 3(11.8 mg, 2.69 μmol , 1.0 eq), BCY7741(7.0 mg, 3.07 μmol , 1.14 eq) 및 THPTA(0.4M, 6.8 μl , 1 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 6.8 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 13.6 μl , 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 6677.57, 관측된 m/z : 1113.7($[\text{M}+6\text{H}]^+$), 954.7($[\text{M}+7\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9655(1.9 mg, 0.26 μmol , 9.65% 수율, 91.15% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

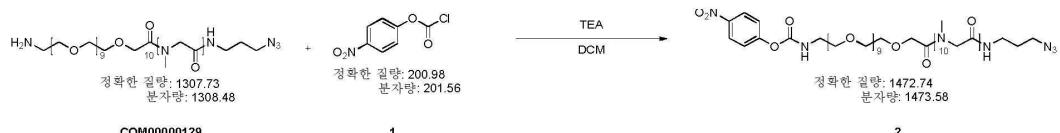
[0343] BCY9656



[0344]

[0345]

화합물 2의 제조 과정



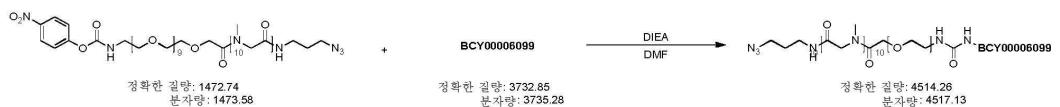
[0346]

[0347]

DCM(3 mL) 중의 COM129(30.0 mg, 22.93 μ mol, 1.0 eq), 화합물 1(6.9 mg, 34.39 μ mol, 1.5 eq)의 용액에 TEA(3.5 mg, 34.39 μ L, 4.8 μ L, 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 탈기시키고 N_2 로 3회 페징하고, 이어서 혼합물을 25°C에서 1시간 동안 N_2 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 COM129가 완전히 소멸되었고 목적하는 *m/z*(계산된 MW: 1473.58, 관측된 *m/z*: 737.3($[M+2H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켜 화합물 2(12.3 mg, 8.35 μ mol, 36.41% 수율)를 백색 고체로서 생성시켰다.

[0348]

화합물 3의 제조 과정



[0349]

[0350]

DMF(3 mL) 중의 화합물 2(9.26 mg, 6.28 μmol, 1.0 eq) 및 BCY6099(10 mg, 3.14 μmol, 0.5 eq)의 용액에 TEA(0.7 mg, 6.93 μmol, 1 μL, 1.1 eq)를 가하였다. 혼합물을 탈기시키고 N₂로 3회 펴징하고, 이어서 혼합물을 25–30°C에서 1시간 동안 N₂ 분위기 하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 4517.12, 관측된 m/z: 1129.8([M/4+H]⁺), 904.1([M/5+H]⁺), 753.7([M/6+H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상 HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(12 mg, 72.36% 수율, 85.58% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0351]

BCY9656의 제조 과정



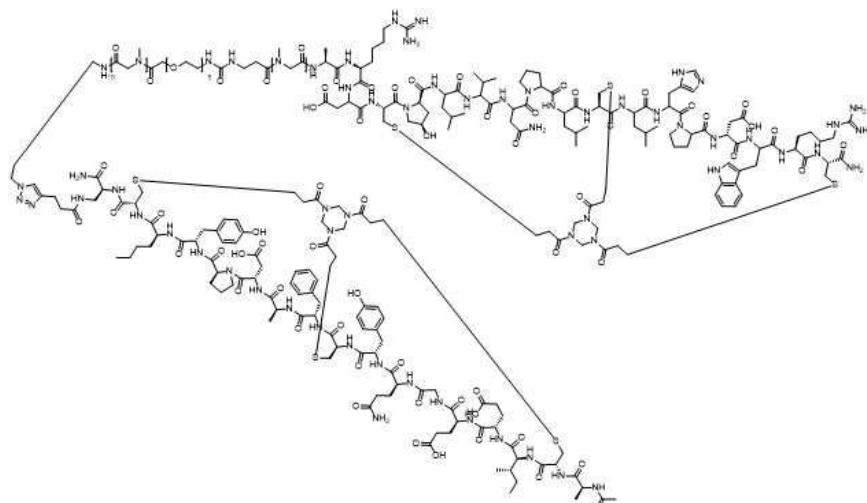
[0352]

[0353]

화합물 3(11 mg, 2.44 μ mol, 1.0 eq), BCY7741(6.0 mg, 2.63 μ mol, 1.08 eq) 및 THPTA(0.4M, 6.1 μ l, 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 ml, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 6.1 μ l, 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 12.2 μ l, 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 6798.66, 관측된 m/z: 1133.8([M/6+H]⁺), 971.9([M/7+H]⁺), 850.7([M/8+H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9656(6.8 mg, 37.36% 수율, 90.97% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

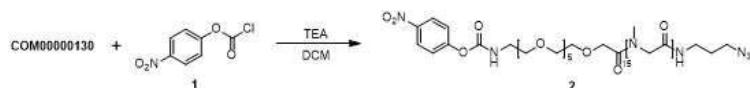
[0354]

BCY9657



[0355]

[0356] 화합물 2의 제조 과정



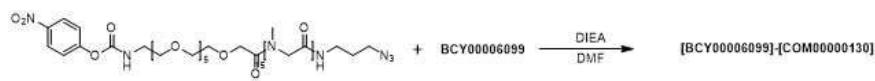
[0357]

[0358]

DCM(3 ml) 중의 COM130(30.0 mg, 20.78 μmol , 1.0 eq), 화합물 1(6.3 mg, 31.17 μmol , 1.5 eq)의 용액에 TEA(3.2 mg, 31.17 μmol , 4.4 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS는 COM130이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 1608.7, 관측된 m/z : 804.8($[\text{M}/2+\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시키고 동결건조시켜 화합물 2(7.9 mg, 조물질)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0359]

화합물 3의 제조 과정



[0360]

[0361]

DMF(1 ml) 중의 화합물 2(7.9 mg, 4.91 μmol , 1.0 eq) 및 BCY6099(16 mg, 5.03 μmol , 1.02 eq)의 용액에 DIEA(1.9 mg, 14.73 μmol , 2.6 μl , 3.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 4652.25, 관측된 m/z : 1551.3($[\text{M}/3+\text{H}]^+$), 1163.6($[\text{M}/4]^+$), 931.1($[\text{M}/5+\text{H}]^+$), 776.1($[\text{M}/6+\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상 HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(13.3 mg, 2.86 μmol , 53.22% 수율, 91.42% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0362]

BCY9657의 제조 과정



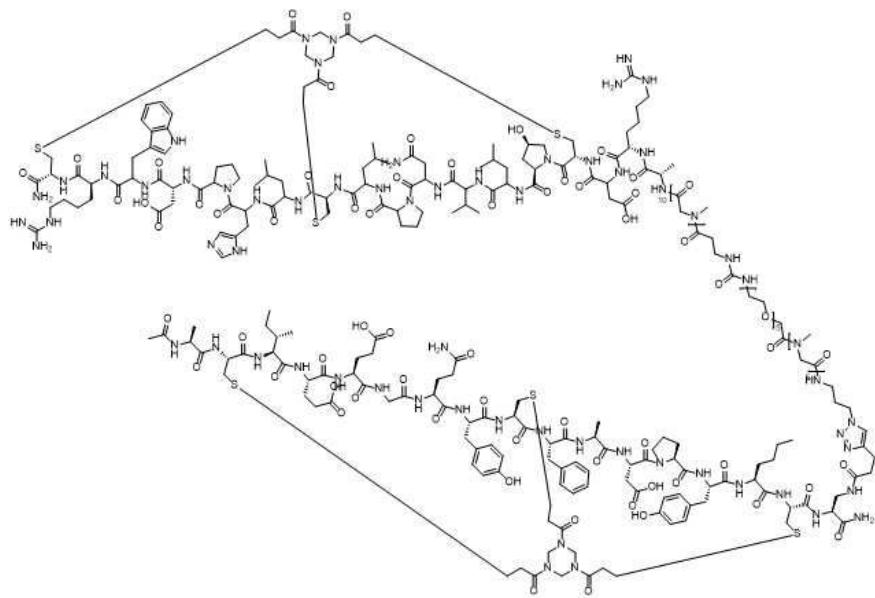
[0363]

화합물 3(13.3 mg, 2.86 μmol , 1.0 eq), BCY7741(7.0 mg, 3.07 μmol , 1.03 eq) 및 THPTA(0.4M, 7.5 μl , 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 ml, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 7.5 μl , 1 eq) 및 VcNa(0.4M, 15 μl , 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z [MW: 6933.78, 관측된 m/z : 1156.7($[\text{M}/6+\text{H}]^+$), 991.4($[\text{M}/7+\text{H}]^+$), 867.4($[\text{M}/8+\text{H}]^+$)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보

였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9657(8.4 mg, 40.21% 수율, 94.9% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0365]

BCY9658

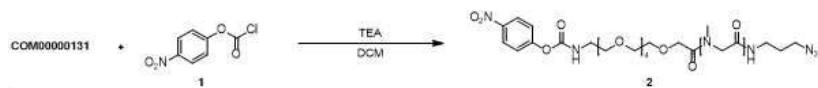


[0366]

BCY00009658

[0367]

화합물 2의 제조 과정



[0368]

[0369]

DCM(5 mL) 중의 COM131(167.0 mg, 227.89 μmol , 1.0 eq), 화합물 1(55.0 mg, 272.87 μmol , 1.2 eq)의 용액에 TEA(36.4 mg, 359.23 μmol , 50.0 μl , 1.6 eq)를 가하였다. 혼합물을 25~30°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z (MW: 897.93 관측된 920.3($[\text{M}+\text{Na}^+]$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(35 mg, 33.74 μmol , 14.81% 수율, 86.56% 순도)를 무색 오일로서 수득하였다.

[0370]

화합물 3의 제조 과정



[0371]

[0372]

DMF(2 mL) 중의 화합물 2(15 mg, 16.71 μmol , 1.0 eq) 및 BCY6099(53 mg, 16.65 μmol , 1.0 eq)의 용액에 DIEA(6.48 mg, 65.05 μmol , 50.1 μl , 4.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 3941.47 관측된 m/z : 986.0($[\text{M}/4+\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상 HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. [BCY6099]-[COM131](5 mg, 50.48% 수율, 94.96% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0373]

BCY9658의 제조 과정



[0374]

3

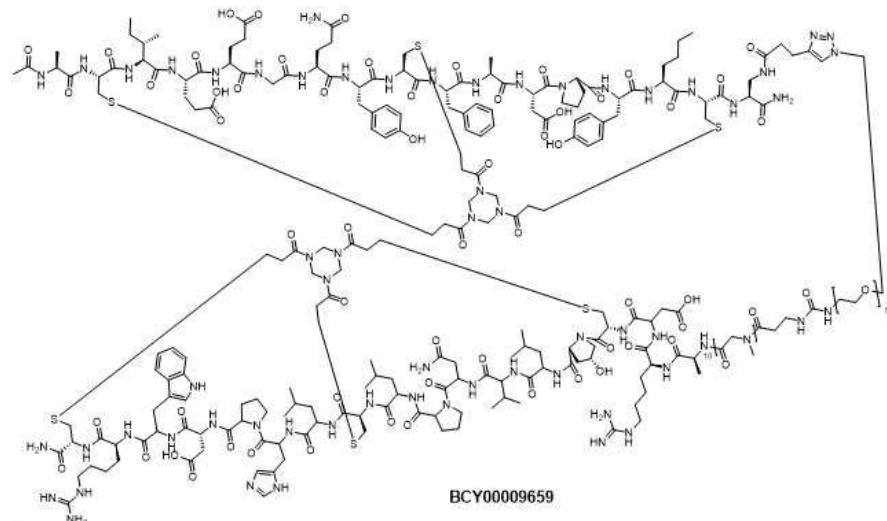
[0375]

화합물 3(35 mg, 8.88 μmol , 1.0 eq), BCY7741(21 mg, 9.20 μmol , 1.03 eq) 및 THPTA(0.4M, 22.2 μl , 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M,

22.2 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 44.4 μl , 2.0 eq)를 N_2 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH_4HCO_3 (1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25~30°C에서 12시간 동안 N_2 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z[MW: 6223.01 관측된 m/z: 1038.0([M/6+H]⁺) 및 889.8([M/8+H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9658(13.2 mg, 21.54% 수율, 90.16% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0376]

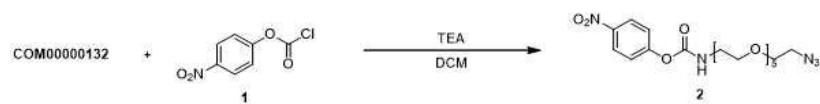
BCY9659



[0377]

[0378]

화합물 2의 제조 과정



[0379]

[0380]

DCM(5 mL) 중의 COM132(20.0 mg, 65.28 μmol , 1.0 eq), 화합물 1(15.8 mg, 78.34 μmol , 1.2 eq)의 용액에 TEA(36.4 mg, 359.23 μmol , 50 μl , 5.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z[MW: 471.46, 관측된 m/z: 489.2([M+NH₄]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 화합물 2(26 mg, 조 물질)를 무색 오일로서 제공하였다.

[0381]

화합물 3의 제조 과정

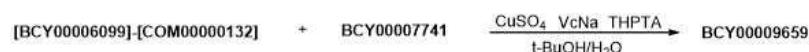


[0382]

DMF(3 mL) 중의 화합물 2(15.0 mg, 4.71 μmol , 1.0 eq) 및 BCY6099(3.33 mg, 7.07 μmol , 1.5 eq)의 용액에 TEA(0.7 mg, 6.93 μmol , 1 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z[MW: 3515.01, 관측된 m/z: 1172.1([M/3+H]⁺) 879.5([M/4+H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상 HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(12.7 mg, 3.26 μmol , 69.23% 수율, 90.3% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0384]

BCY9659의 제조 과정



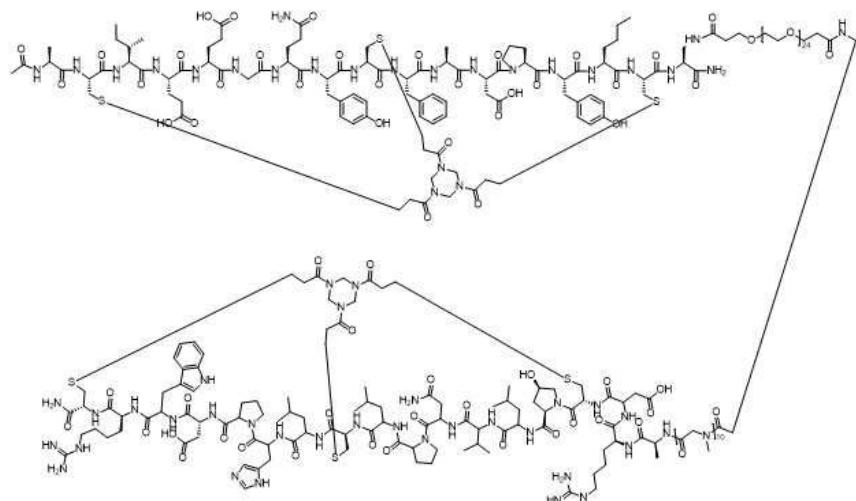
[0385]

3

[0386] 화합물 3(12.7 mg, 2.89 μ mol, 1.0 eq), BCY7741(6.80 mg, 2.98 μ mol, 1.03 eq) 및 THPTA(1.3 mg, 2.99 μ mol, 1.03 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 7.3 μ L, 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 14.6 μ L, 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z[MW: 5796.54 관측된 m/z: 1159.8([M+5H]⁺) 966.7([M/6+H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9659(6.2 mg, 1.06 μ mol, 36.58% 수율, 98.86% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0387]

BCY9758



[0388]

[0389] 화합물 2의 제조 과정

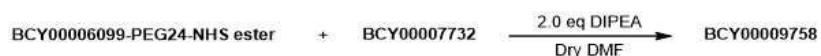


[0390]

[0391] DMF(3 mL) 중의 화합물 1(5.0 mg, 3.54 μ mol, 1.0 eq), BCY6099(11.3 mg, 3.54 μ mol, 1.0 eq)의 용액에 DIEA(0.9 mg, 7.07 μ mol, 1.2 μ L, 2.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 20분 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z[MW: 4481.11, 관측된 m/z: 1101.3([M+4H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시키고 동결건조시켜 화합물 2(15 mg, 조 물질)를 백색 고체로서 제공하였다.

[0392]

BCY9758의 제조 과정

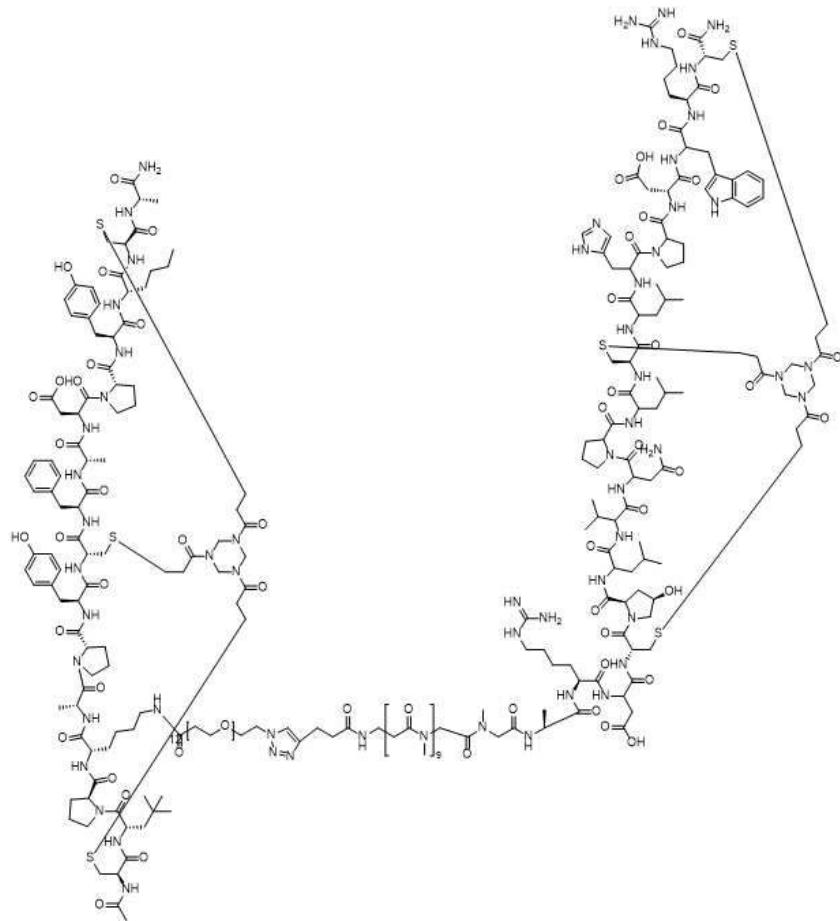


[0393]

[0394] DMF(3 mL) 중의 화합물 2(15 mg, 3.35 μ mol, 1.0 eq) 및 BCY7732(14.74 mg, 6.69 μ mol, 2.0 eq)의 용액에 DIEA(0.9 mg, 7.07 μ mol, 1.2 μ L, 2.1 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z[MW: 6567.48, 관측된 m/z: 1095.1([M/6+H]⁺), 938.8([M/7+H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상 HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. BCY9758(5.8 mg, 24.26% 수율, 91.97% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0395]

BCY10568

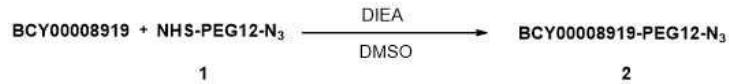


BCY00010568

[0396]

[0397]

BCY8919-PEG12-N₃의 제조 과정



[0398]

[0399]

BCY8919(80.0 mg, 38.47 μ mol, 1.0 eq) 및 화합물 1(29.6 mg, 40.01 μ mol, 1.04 eq)을 DMSO(1 mL)에 용해시켰다. 이어서 용액에 DIPEA(7.46 mg, 55.71 μ mol, 10.0 μ L, 1.5 eq)를 가하고 이어서 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8919의 대부분이 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 2705.16, 관측된 m/z: 1353.1([M/2H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 화합물 2(18.6 mg, 6.86 μ mol, 17.83% 수율, 99.76% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0400]

BCY10568의 제조 과정



[0401]

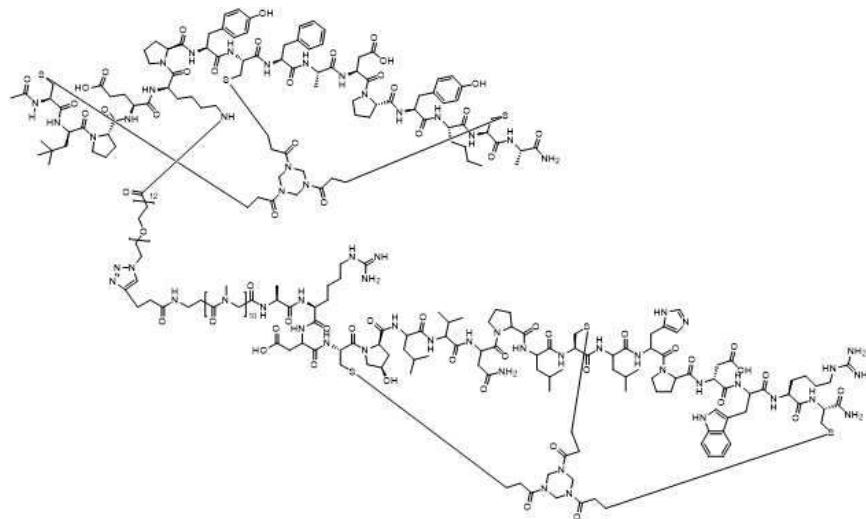
[04021]

화합물 2(9.0 mg, 3.33 μ mol, 1.0 eq) 및 BCY6169(11.0 mg, 3.36 μ mol, 1.01 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 8.3 μ L, 1.0 eq), VcNa(1.4 mg, 7.06 μ mol, 2.1 eq) 및 THPTA(1.4 mg, 3.22 μ mol, 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 0.4M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 펴징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 16시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 5967.90, 관측된 m/z: 995.00([M/5H]⁺)

및 1194.70($[M/6+H]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 BCY10568(13.4 mg, 2.16 μmol , 69.44% 수율, 96.3% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0403]

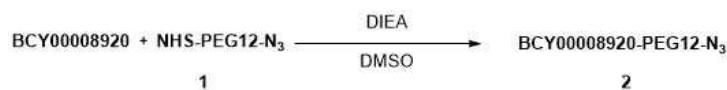
BCY10570



BCY00010570

[0404]

[0405]

BCY8920-PEG12-N₃의 제조 과정

[0406]

[0407]

DMSO(2 mL) 중의 BCY8920(37 mg, 17.31 μmol , 1.0 eq) 및 화합물 1(15 mg, 20.25 μmol , 1.2 eq)의 용액에 DIEA(3.36 mg, 25.96 μmol , 4.5 μL , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8920이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 2763.2, 관측된 m/z : 689.07($[M/4+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 생성시켰다. 이어서 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(22.8 mg, 8.15 μmol , 47.09% 수율, 98.78% 순도)를 백색 고체로서 제공하였다.

[0408]

BCY10570의 제조 과정



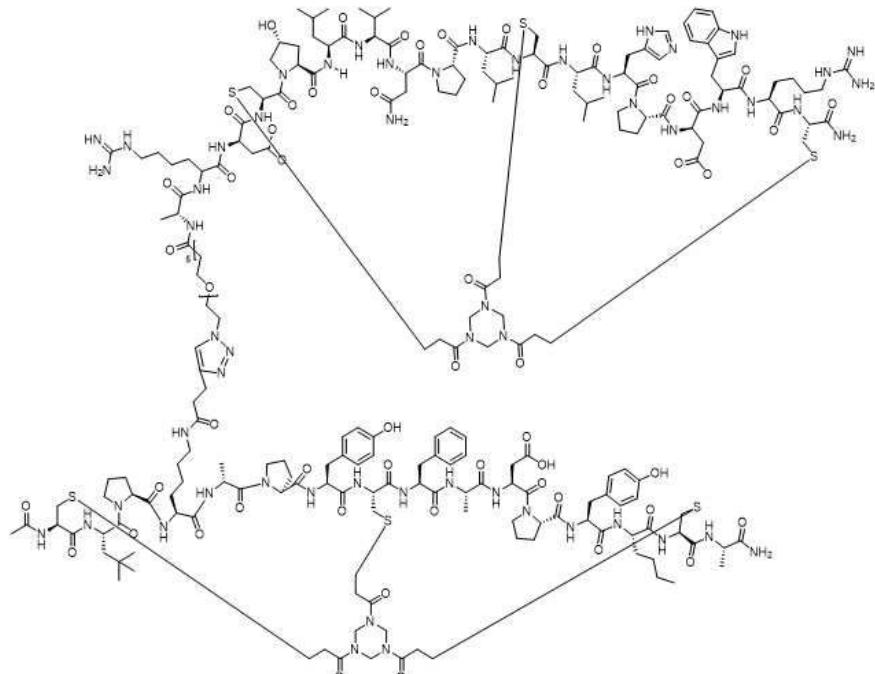
[0409]

[0410]

화합물 2(6 mg, 2.17 μmol , 1.0 eq) 및 BCY6169(7.08 mg, 2.17 μmol , 1.0 eq)를 먼저 2 mL 의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 5.4 μL , 1.0 eq), VcNa(0.4 M, 10.8 μL , 2.0 eq) 및 THPTA(0.4M, 5.4 μL , 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 0.2M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 퍼짐되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 4시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 6025.93, 관측된 m/z : 1004.56($[M/6+H]^+$) 및 861.48($[M/7+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. BCY10570(7.2 mg, 1.17 μmol , 53.90% 수율, 97.95% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

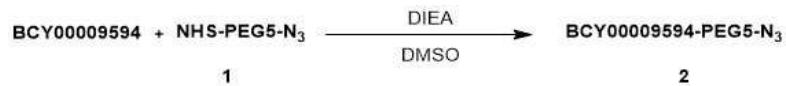
[0411]

BCY10574



[0412]

[0413]



[0414]

[0415] DMSO(1 mL) 중의 BCY9594(65 mg, 27.07 μ mol, 1 eq), 화합물 1(12.00 mg, 27.75 μ mol, 1.02 eq)의 용액에 DIEA(5.25 mg, 40.61 μ mol, 7.07 μ L, 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY9594가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 2718.13, 관측된 m/z : 906.04([M/3+H] $^{+}$, 1359.07([M/2+H] $^{+}$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 갑압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(42.6 mg, 15.67 μ mol, 57.89% 수율, 100% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0416]

BCY10574의 제조 과정



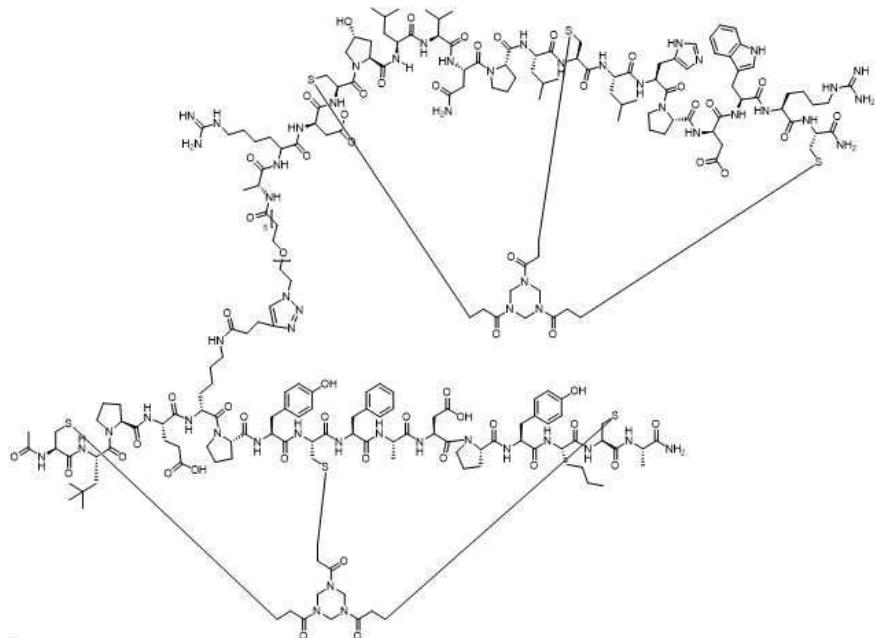
[0417]

[0418]

화합물 2(20 mg, 7.36 μ mol, 1.0 eq), BCY8927(17 mg, 7.87 μ mol, 1.07 eq), 및 THPTA(0.4M, 18.4 μ l, 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 ml, 예비-탈기되고 N₂로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 18.4 μ l, 1.0 eq) 및 VcNa(0.4 M, 36.8 μ l, 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하고, 상기 용액은 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기 하에 25–30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 4877.68, 관측된 m/z: 1219.42([M/4+H]⁺) 및 975.54([M/5+H]⁺])를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY10574(17.6 mg, 3.41 μ mol, 46.29% 수율, 94.40% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

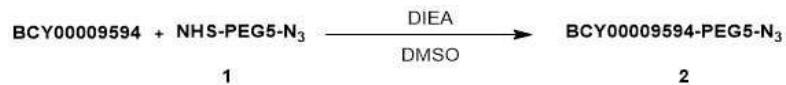
[0419]

BCY10575



[0420]

[0421]

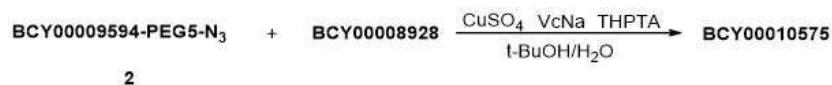


[0422]

[0423] DMSO(1 mL) 중의 BCY9594(65 mg, 27.07 μ mol, 1 eq), 화합물 1(12.00 mg, 27.75 μ mol, 1.02 eq)의 용액에 DIEA(5.25 mg, 40.61 μ mol, 7.07 μ L, 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z [계산된 MW: 2718.13 관측된 m/z : 906.04($[M+3H]^+$), 및 1359.07($[M+2H]^+$)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 갑압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(42.6 mg, 15.67 μ mol, 57.89% 수율, 100% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0424]

BCY10575의 제조 과정



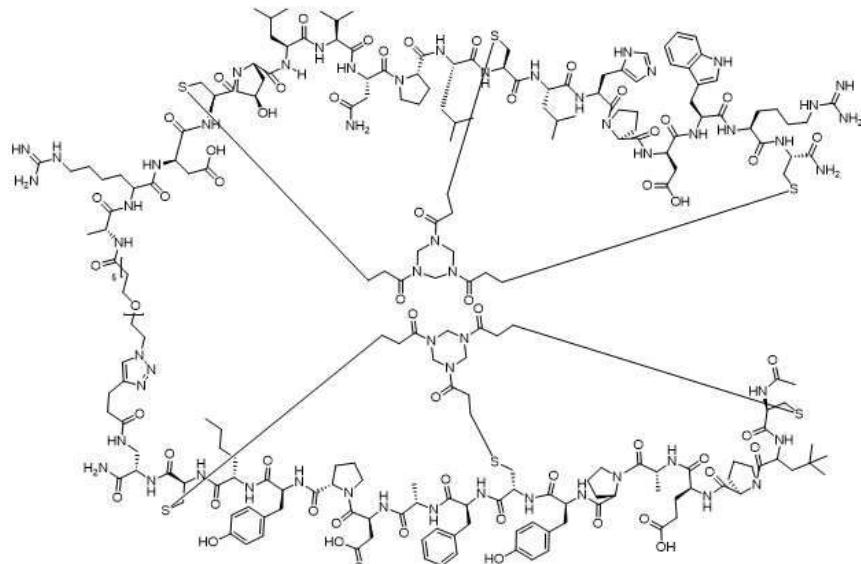
504257

504267

화합물 2(20 mg, 7.36 μmol , 1.0 eq), BCY8928(17 mg, 7.67 μmol , 1.04 eq), 및 THPTA(0.4M, 18.4 μl , 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 18.4 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4 M, 36.8 μl , 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하고, 상기 용액은 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기 하에 25~30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z[계산된 MW: 4935.71, 관측된 m/z: 1234.59([M/4H]⁺) 및 987.71([M/5H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY10575(12 mg, 2.37 μmol , 32.27% 수율, 97.67% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

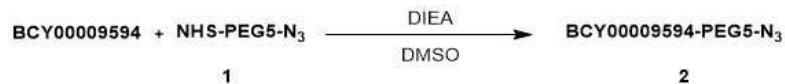
[0427]

BCY10576



[0428]

[0429] 화합물 2의 제조 과정

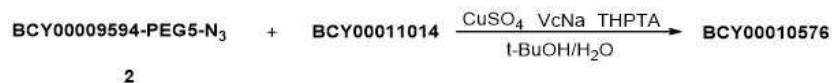


[0430]

DMSO(1 mL) 중의 BCY9594(30.0 mg, 12.50 μmol , 1.0 eq), 화합물 1(5.54 mg, 12.81 μmol , 1.02 eq)의 용액에 DIEA(2.42 mg, 18.74 μmol , 3.3 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25~30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이 완전하게 소멸되었고 목적하는 m/z [계산된 MW: 2718.3, 관측된 m/z : 906.45($[\text{M}/3+\text{H}]^+$) 및 1359.50($[\text{M}/2+\text{H}]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(16 mg, 5.80 μmol , 46.42% 수율, 98.54% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0432]

BCY10576의 제조 과정

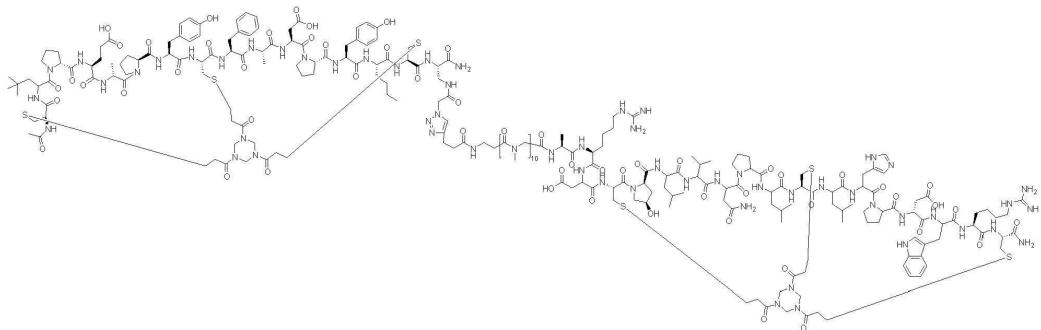


[0433]

화합물 2(17.0 mg, 6.25 μmol , 1.0 eq), BCY11014(13.6 mg, 6.25 μmol , 1.0 eq), 및 THPTA(0.4M, 1.8 μl , 2.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 15.6 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4 M, 1.84 μl , 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하고, 상기 용액은 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기 하에 25~30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2의 대부분이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z [계산된 MW: 4893.63, 관측된 m/z : 1224.7($[\text{M}/4+\text{H}]^+$) 및 980.0($[\text{M}/6+\text{H}]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY10576(20.5 mg, 4.13 μmol , 66.02% 수율, 98.57% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

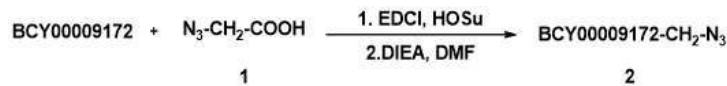
[0435]

BCY10577



[0436]

[0437]



[0438]

[0439] DMF(1 mL) 중의 화합물 1(5.0 mg, 49.5 μ mol, 1.0 eq)의 용액에 EDCI(8.5 mg, 54.8 μ mol, 1.1 eq) 및 HOSu(5.7 mg, 49.5 μ mol, 1.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 30분 동안 교반하였다. TLC는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 하나의 새로운 스폷이 형성되었음을 가리켰다. 이어서 BCY9172(53 mg, 25.29 μ mol, 0.47 eq) 및 DIEA(3.27 mg, 25.29 μ mol, 4.4 μ L, 0.47 eq)를 반응 혼합물에 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY9172가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 2178.46, 관측된 m/z : 1089.5700([M/2+H $^+$]))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 생성시켰다. 이어서 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(30 mg, 13.77 μ mol, 54.45% 수율, 100% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0440]

BCY10577의 제조 과정



[0441]

[0442]

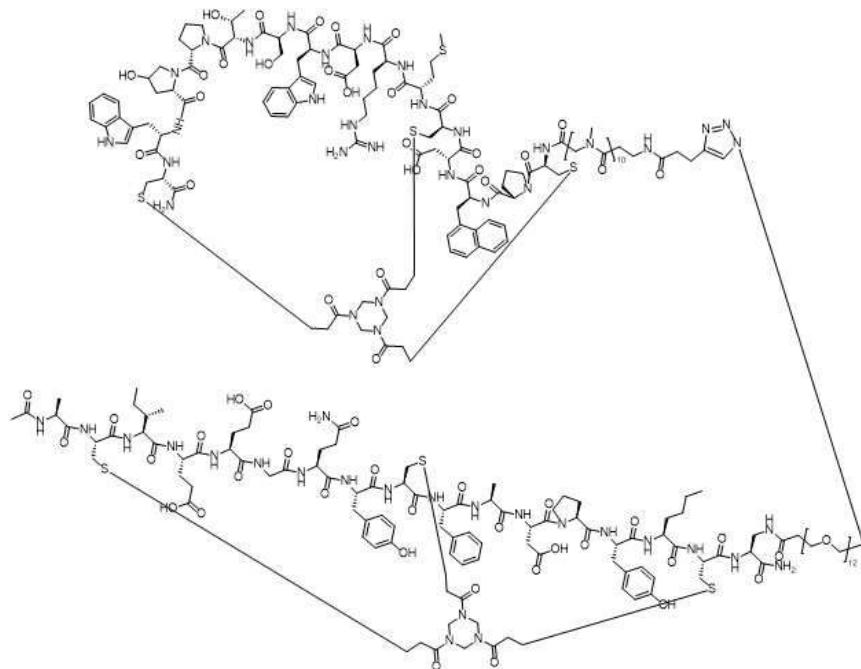
화합물 2(20 mg, 9.18 μ mol, 1.0 eq) 및 BCY6169(32.95 mg, 10.10 μ mol, 1.1 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 23 μ L, 1 eq), VcNa(0.4M, 46 μ L, 2.0 eq) 및 THPTA(0.4M, 23 μ L, 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 페징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 4시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 5441.20, 관측된 m/z: 1361.8([M/4+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. BCY10577(16.2 mg, 2.98 μ mol, 32.43% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0443]

실시예 3: 네트-4/CD137 결합 헤테로트랜스 비사이클릭 펩티드의 합성

[0444]

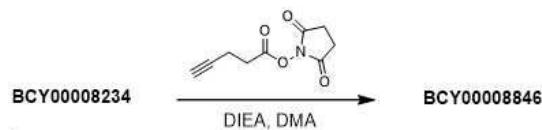
BCY8854



[0445]

[0446]

BCY8846의 일반적인 제조 과정



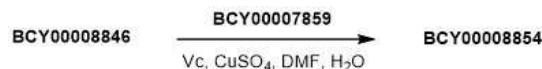
[0447]

[0448]

DMA(3 mL) 중의 BCY8234(PYA 부분의 부재를 제외하고 BCY8846과 동일한 펩티드; 300 mg, 102 μmol , 1.0 eq)의 용액에 DIEA(52.5 mg, 406 μmol , 70.8 μl , 4.0 eq)를 10분 동안 교반하면서 가하였다. 이어서 (2,5-디옥소피롤리딘-1-일)펜트-4-이노에이트(25.8 mg, 132 μmol , 1.3 eq)를 상기에 가하고 혼합물을 20°C에서 추가로 16시간 동안 추가로 교반하였다. LC-MS는 BCY8234가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 3034.43, 관측된 m/z : 1011.8($[\text{M}/3+\text{H}]^+$), 1517.0($[\text{M}/2+\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켜 화합물 BCY8846(290 mg, 95.6 μmol , 94.1% 수율)을 백색 고체로서 제공하였다.

[0449]

BCY8854의 일반적인 제조 과정



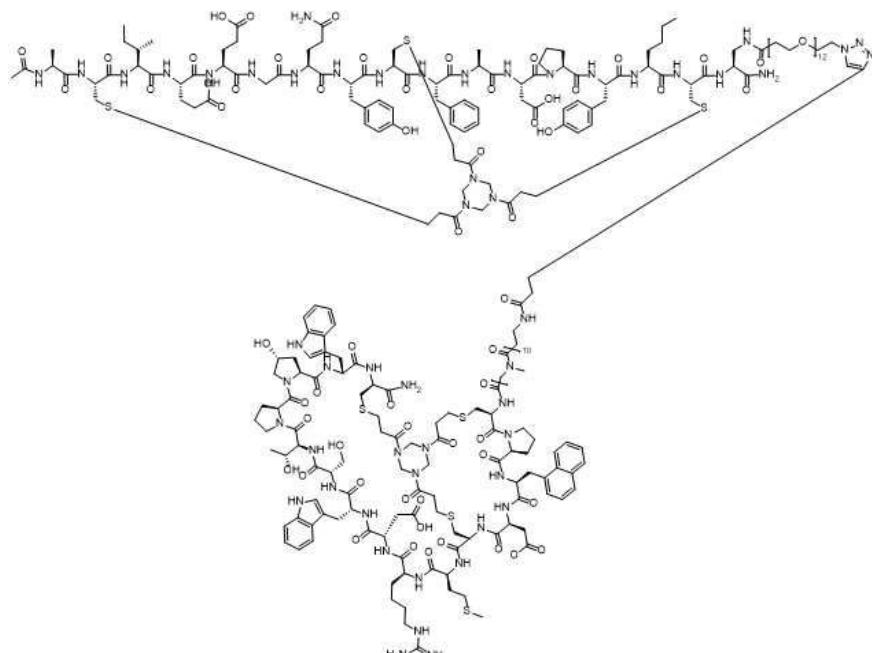
[0450]

[0451]

DMF(5 mL) 중의 BCY8846(234 mg, 77.1 μmol , 1.0 eq)의 용액에 BCY7859(BCY7985에 기재된 바와 같이 제조될 수 있음; 220 mg, 77.8 μmol , 1.0 eq)을 가한 다음, (2R)-2[(1S)-1,2-디하이드록시에틸]-3,4-디하이드록시-2H-푸란-5-온(0.80M, 963 μl , 1.0 eq) 및 CuSO₄(0.80M, 289 μl , 0.3 eq)를 가하였다. 혼합물을 20°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8846이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 5861.59, 관측된 m/z : 837.9($[\text{M}/7+\text{H}]^+$), 977.6($[\text{M}/6+\text{H}]^+$), 1173.3($[\text{M}/5+\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(A: H₂O 중의 0.075% TFA, B: ACN)에 의해 정제시켜 화합물 BCY8854(292 mg, 46.8 μmol , 60.8% 수율, 95.9% 순도, TFA)을 백색 고체로서 제공하였다.

[0452]

BCY9350



[0453]

[0454]

BCY8782-PYA의 일반적인 제조 과정



[0455]

[0456]

DMA(1 mL) 중의 BCY8782(PYA 부분의 부재를 제외하고 BCY11942와 동일한 펩티드; 20.0 mg, 6.77 μ mol, 1.0 eq)의 용액에 DIEA(4.37 mg, 33.9 μ mol, 5.90 μ L, 5.0 eq) 및 (2,5-디옥소피롤리딘-1-일)펜트-4-이노에이트(2.64 mg, 13.5 μ mol, 2.0 eq)를 25°C에서 12시간 동안 교반하면서 가하였다. LC-MS는 BCY8782가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 3034.43, 관측된 m/z : 1012.1($[M/3H]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켜 화합물 BCY11942(20.0 mg, 6.00 μ mol, 88.6% 수율, 91.0% 순도)을 백색 고체로서 제공하였다.

[0457]

BCY9350의 일반적인 제조 과정

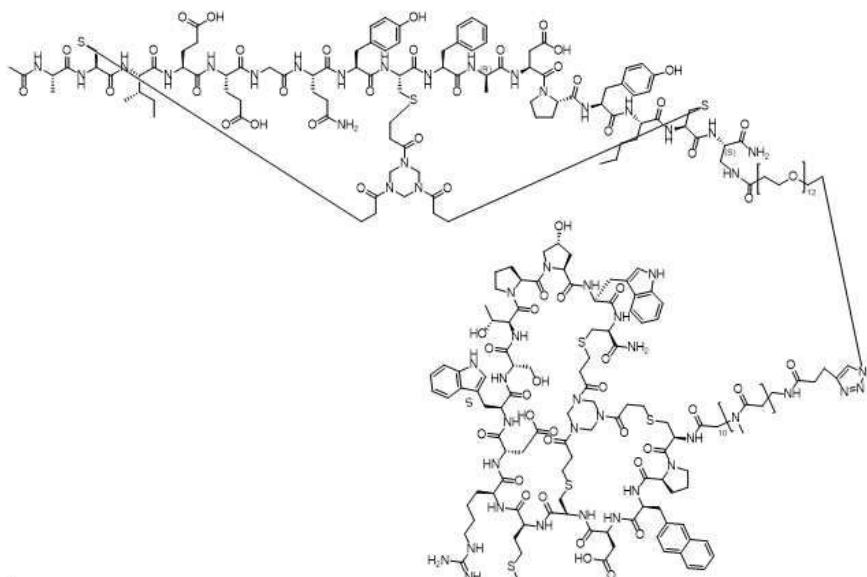


[0458]

[0459]

DMF(1 mL) 중의 BCY11942(20 mg, 6.59 μ mol, 1.0 eq) 및 BCY7859(BCY7985에 기재된 바와 같이 제조될 수 있음; 20.5 mg, 7.25 μ mol, 1.1 eq)의 용액에 (2R)-2[(1S)-1,2-디하이드록시에틸]-3,4-디하이드록시-2H-푸란-5-온(0.4M, 330 μ L, 20.0 eq)을 가하고 CuSO4(0.4M, 98.9 μ L, 6.0 eq)를 혼합물에 가하였다. 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8782-PYA가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 5861.59, 관측된 m/z : 1173.3($[M/5H]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(A: H2O 중의 0.075% TFA, B: ACN)에 의해 정제시켜 BCY9350(14.5 mg, 2.40 μ mol, 36.5% 수율, 97.2% 순도)을 백색 고체로서 제공하였다.

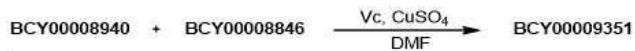
[0460]

BCY9351

[0461]

[0462]

BCY9351의 일반적인 제조 과정

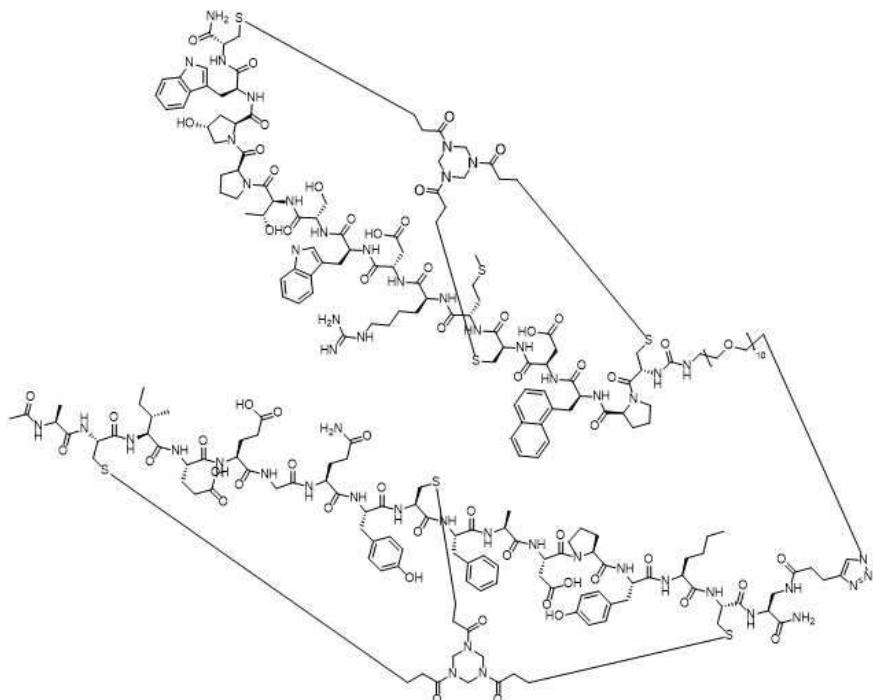


[0463]

[0464]

DMF(1 mL) 중의 BCY8940(BCY8942에 기재된 바와 같이 제조될 수 있음; 9.4 mg, 3.33 μmol , 1.01 eq) 및 BCY8846(10.0 mg, 3.30 μmol , 1.0 eq)의 용액에 Vc(0.4M, 165 μl , 20.0 eq) 및 CuSO₄(0.4M, 49.4 μl , 6.0 eq)를 질소 분위기하에서 가하였다. 혼합물을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8940이 완전히 소멸되었고 목적하는 *m/z*(계산된 MW: 5861.59, 관측된 *m/z*: 975.4[M/6+H]⁺, 1172.3([M/5+H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(A: H₂O 중의 0.075% TFA, B: ACN)에 의해 정제시켜 BCY9351(5.30 mg, 0.904 μmol , 26.3% 수율, 96.0% 순도)을 백색 고체로서 제공하였다.

[0465]

BCY9399

[0466]

[0467] 화합물 2의 제조 과정



[0468] COM00000134

1

2

[0469]

DCM(0.5 mL) 중의 COM134(30 mg, 56.97 μmol), 화합물 1(17.22 mg, 85.45 μmol)의 용액에 TEA(8.65 mg, 85.45 μl , 11.9 eq)를 가하였다. 혼합물을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS는 COM134가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 691.72, 관측된 m/z : 692.3($[\text{M}+\text{H}]^+$) 및 709.3($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(30.5 mg)를 무색 오일로서 수득하였다.

[0470] 화합물 3의 제조 과정

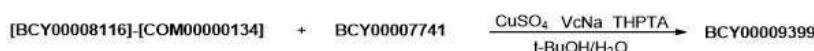


[0471]

[0472]

DMF(1 mL) 중의 화합물 2(15 mg, 21.68 μmol) 및 BCY8116(47 mg, 21.68 μmol)의 용액에 DIEA(8.41 mg, 65.05 μmol , 11.33 μl)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 2725.1 관측된 m/z : 1362.7($[\text{M}/2+\text{H}]^+$), 909.0($[\text{M}/3+\text{H}]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상 HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(20 mg, 33.41% 수율, 98.71% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0473] BCY9399의 제조 과정



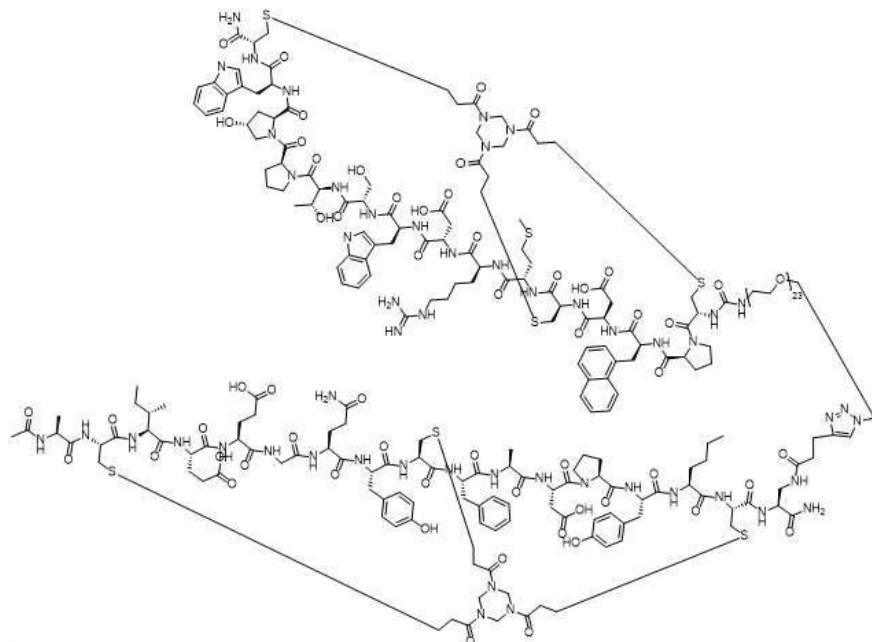
[0474] 3

[0475]

화합물 3(20.0 mg, 5.35 μmol , 1.0 eq), BCY7741(13.0 mg, 5.70 μmol , 1.01 eq) 및 THPTA(0.4M, 13.4 μl , 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 13.4 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 26.8 μl , 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z [MW: 5006.64 관측된 m/z : 834.9($[\text{M}/6+\text{H}]^+$), 1002.3($[\text{M}/5+\text{H}]^+$), 1252.4($[\text{M}/4+\text{H}]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9399(9.1 mg, 27.20% 수율, 96.29% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

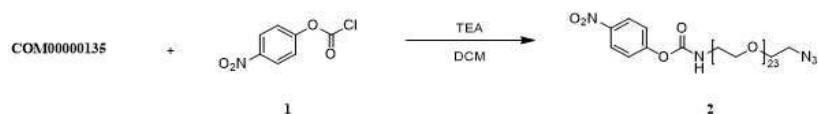
[0476]

BCY9400



[0477]

[0478] 화합물 2의 제조 과정



[0479]

[0480] DCM(2 ml) 중의 COM135(BCY9648에 기재된 바와 같이 제조될 수 있음; 30.0 mg, 27.29 μmol), 화합물 1(8.3 mg, 40.94 μmol)의 용액에 TEA(4.14 mg, 40.94 μl , 5.7 eq)를 가하였다. 이어서 반응 혼합물을 25-30°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS는 COM135가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 1264.40, 관측된 m/z : 1281.4($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켜 화합물 2(18 mg)를 백색 고체로서 제공하였다.

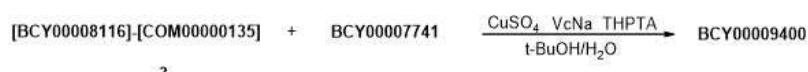
[0481] 화합물 3의 제조 과정



[0482]

[0483] DMF(2 ml) 중의 화합물 2(15.5 mg, 7.12 μmol) 및 BCY8116(9 mg, 7.12 μmol)의 용액에 DIEA(1.4 mg, 10.68 μmol , 1.9 μl)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 3297.78, 관측된 m/z : 1099.7($[\text{M}/3\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상 HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(19.5 mg, 5.91 μmol , 33.41% 수율, 83.07% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0484] BCY9400의 제조 과정

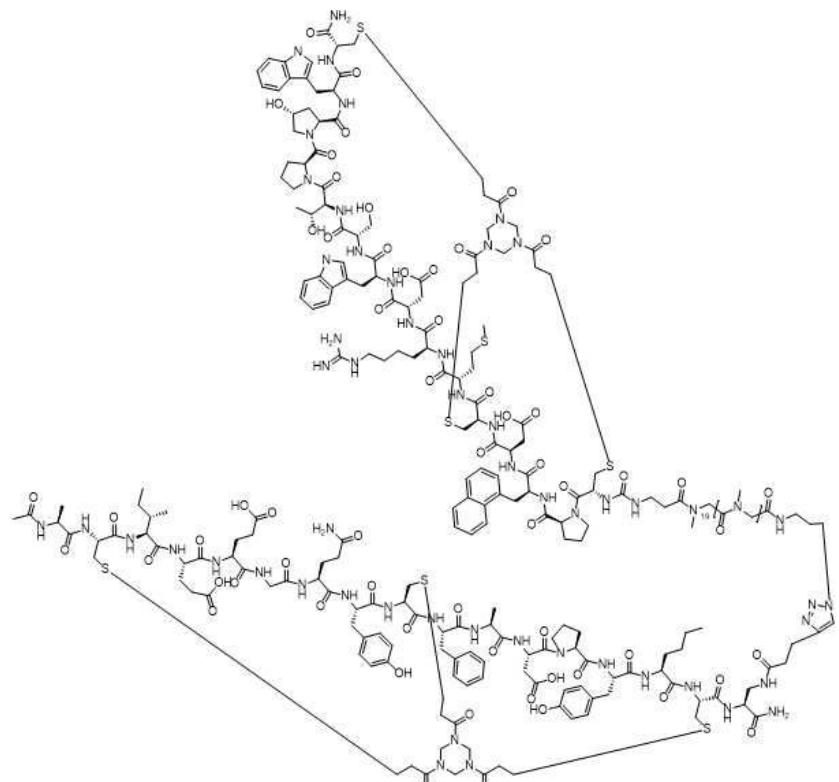


[0485]

[0486] 화합물 3(19.5 mg, 5.91 μmol), BCY7741(14 mg, 6.14 μmol , 1.01 eq) 및 THPTA(0.4M, 15 μl , 1 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 ml, 예비-탈기되고 N₂로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 15 μl , 1 eq) 및 VcNa(0.4M, 30 μl , 2 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하

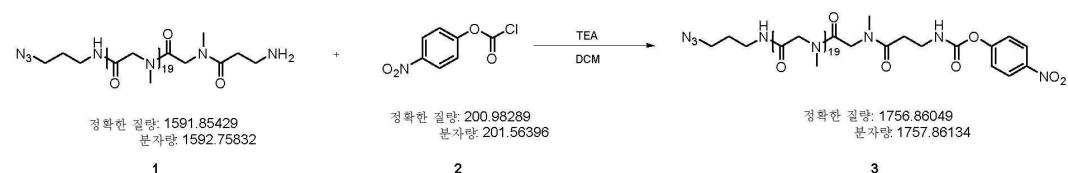
에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z [MW: 5579.31 관측된 m/z : 930.5($[M/6+H]^+$), 1116.6($[M/5+H]^+$)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9400(13.9 mg, 2.33 μmol , 27.20% 수율, 93.56% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0487] BCY9401



[0488]

[0489] 화합물 3의 제조 과정



[0490] COM00000470

[0491] DCM(2 mL) 중의 화합물 1(50.0 mg, 31.39 μmol , 1 eq), 화합물 2(6.6 mg, 32.96 μmol , 1.05 eq)의 용액에 TEA(4.8 mg, 47.09 μmol , 6.6 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 1757.86 관측된 m/z : 879.10($[M/2+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(0.02 g, 6.56 μmol , 20.91% 수율, 57.7% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0492] 화합물 4의 제조 과정

3 $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{N}_3$

BCY00008116

DIEA
DMF

4 $[\text{BCY00008116}]\text{[COM00000122]}$

[0493]

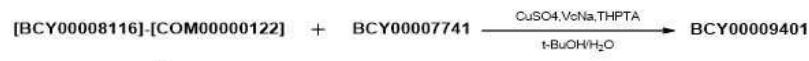
[0494] DMF(4 mL) 중의 화합물 3(20 mg, 11.38 μmol , 1 eq), BCY8116(25 mg, 11.51 μmol , 1.01 eq)의 용액에 DIEA(2.2 mg, 17.07 μmol , 2.97 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 3791.23, 관측된 m/z : 1263.2($[M/3+H]^+$))를 갖는 하나의

- 56 -

주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응물을 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 직접 정제시켰다. 화합물 4(10 mg, 2.43 μmol , 21.33% 수율, 92% 순도)을 무색 오일로서 수득하였다.

[0495]

BCY9401의 제조 과정



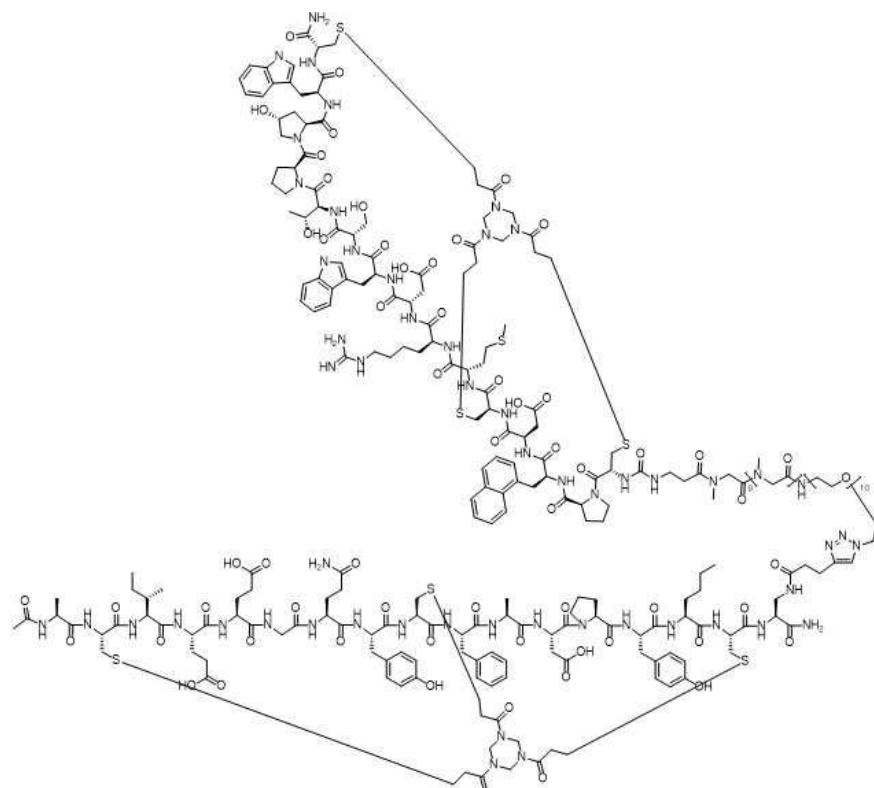
[0496]

[0497]

화합물 4(10 mg, 2.43 μmol , 0.9 eq), BCY7741(6.32 mg, 2.77 μmol , 1.0 eq) 및 THPTA(0.4M, 6.7 μl , 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL , 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 6.7 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 13.4 μl , 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 4가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z[MW: 6072.77, 관측된 m/z: 1012.00([M/6H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9401(8.4 mg, 1.56 μmol , 59.31% 수율, 95.52% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0498]

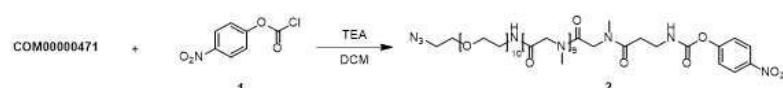
BCY9403



[0499]

[0500]

화합물 2의 제조 과정



[0501]

[0502]

DCM(10 mL) 중의 COM471(100.0 mg, 76.42 μmol , 1.0 eq), 4-나트로페닐클로로포르메이트(16.2 mg, 80.25 μmol , 1.05 eq)의 용액에 TEA(11.6 mg, 114.64 μmol , 16.0 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 COM471이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z[MW: 1473.58, 관측된 m/z: 736.83([M/2H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(62.8 mg, 42.67 μmol , 55.84% 수율, 48.37% 순도)를 백색 오일로서 수득하였다.

[0503] 화합물 3의 제조 과정



[0504] 2

[0505]

DMF(2 mL) 중의 화합물 2(44 mg, 29.46 μmol , 1.0 eq), BCY8116(63 mg, 29.18 μmol , 1.0 eq)의 용액에 DIEA(5.66 mg, 43.77 μmol , 7.62 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 40°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 3506.95, 관측된 m/z : 1168.58([M/3+H] $^{+}$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(20 mg, 5.42 μmol , 18.57% 수율, 95.04% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0506] BCY9403의 제조 과정

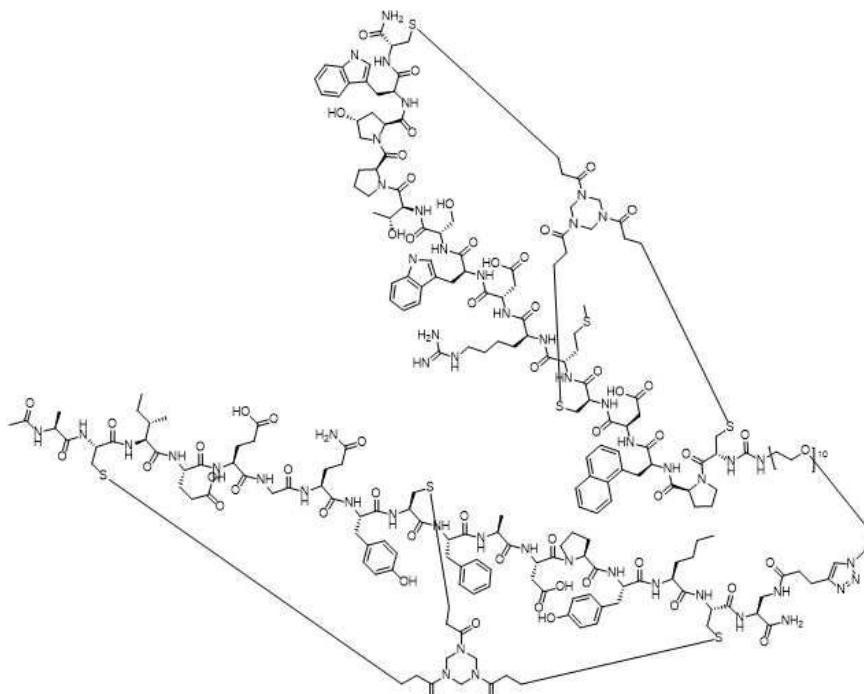


[0507] 3

[0508]

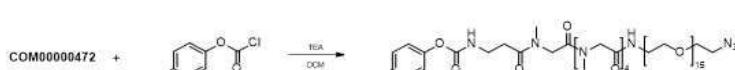
화합물 3(10.0 mg, 2.71 μmol , 1.0 eq), BCY7741(6.83 mg, 2.99 μmol , 1.1 eq) 및 THPTA(0.4M, 7 μl , 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 7 μl , 1 eq) 및 VcNa(0.4M, 14 μl , 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기 하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 5788.49, 관측된 m/z : 1157.00([M/5+H] $^{+}$) 및 964.60([M/6+H] $^{+}$)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9403(2.1 mg, 0.34 μmol , 11.93% 수율, 93.80% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0509] BCY9405



[0510]

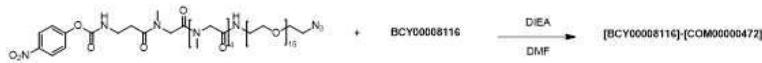
[0511] 화합물 2의 제조 과정



[0512] 1

[0513] DCM(4 mL) 중의 COM472(44.7 mg, 38.1 μ mol), 화합물 1(9.2 mg, 45.72 μ mol)의 용액에 TEA(5.8 mg, 57.14 μ mol, 8 μ L)를 가하였다. 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 COM472가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 1338.45, 관측된 m/z: 686.23([M/2+NH4⁺])를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(20 mg, 14.94 μ mol, 39.2% 수율)를 무색 오일로서 수득하였다.

[0514] 화합물 3의 제조 과정



[0515]

[0516] DMF(4 mL) 중의 화합물 2(20 mg, 14.94 μ mol) 및 BCY8116(38.96 mg, 17.93 μ mol)의 용액에 DIEA(1.9 mg, 14.94 μ mol, 2.6 μ L)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 3371.82, 관측된 m/z: 1123.94([M/3+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상 HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(10 mg, 99.07% 수율, 19.66 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0517] BCY9405의 제조 과정

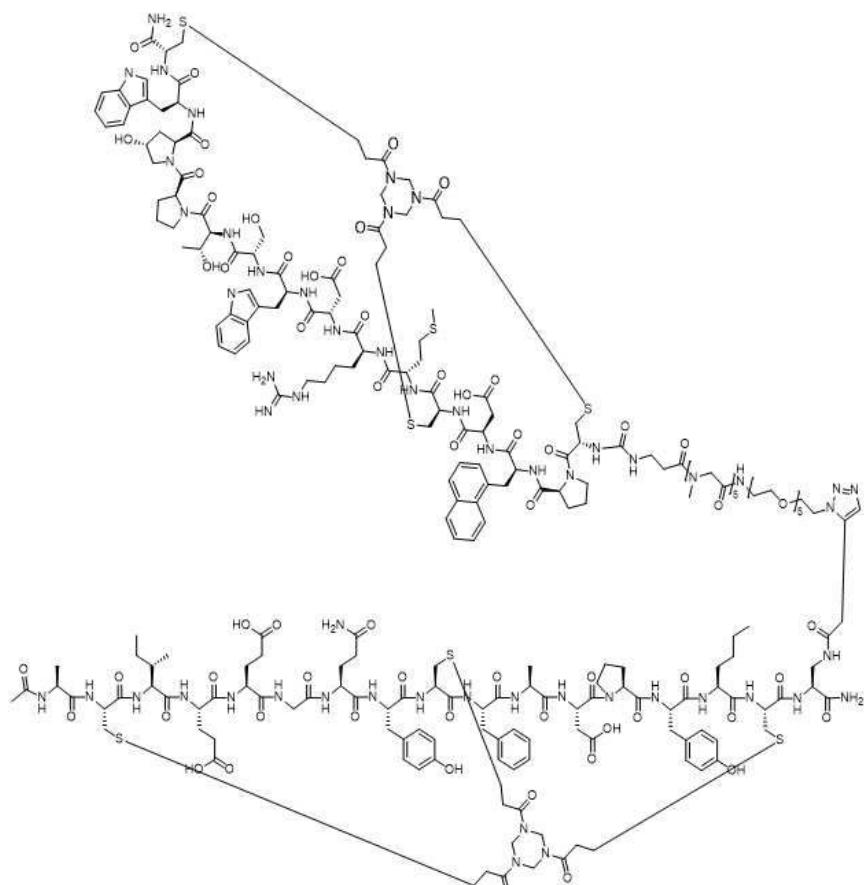


[0518]

[0519] 화합물 3(10.0 mg, 2.97 μ mol, 1.0 eq), BCY7741(7.4 mg, 3.26 μ mol, 1.1 eq) 및 THPTA(1.3 mg, 2.97 μ mol, 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 7.5 μ L, 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 151 μ L, 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 5653.36 관측된 m/z: 1130.47([M/5+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9405(7.8 mg, 46.08% 수율, 97.8% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0520]

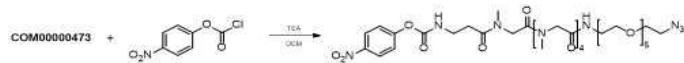
BCY9406



[0521]

[0522]

화합물 2의 제조 과정



[0523]

[0524]

DCM(3 ml) 중의 COM473(130.0 mg, 177.40 μmol , 1.0 eq), (4-나트로페닐) 카보노클로리데이트(36.4 mg, 180.59 μmol , 1.02 eq)의 용액에 TEA(27.0 mg, 266.09 μmol , 37 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 35°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 COM473이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 897.93, 관측된 m/z : 897.65($[\text{M}+\text{H}]^+$), 914.60($[\text{M}+\text{NH}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(90 mg, 95.87 μmol , 54.04% 수율, 95.65% 순도)를 무색 오일로서 수득하였다.

[0525]

화합물 3의 제조 과정

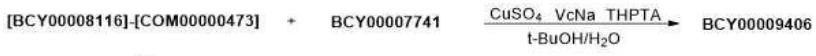


[0526]

[0527]

DMF(2 ml) 중의 화합물 2(10 mg, 11.14 μmol , 1 eq), BCY8116(25 mg, 11.51 μmol , 1.03 eq)의 용액에 DIEA(2.16 mg, 16.71 μmol , 2.91 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z (MW: 2931.30, 관측된 m/z : 977.00($[\text{M}/3+\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상-HPLC(FTA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(15 mg, 5.12 μmol , 45.79% 수율, 99.66% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

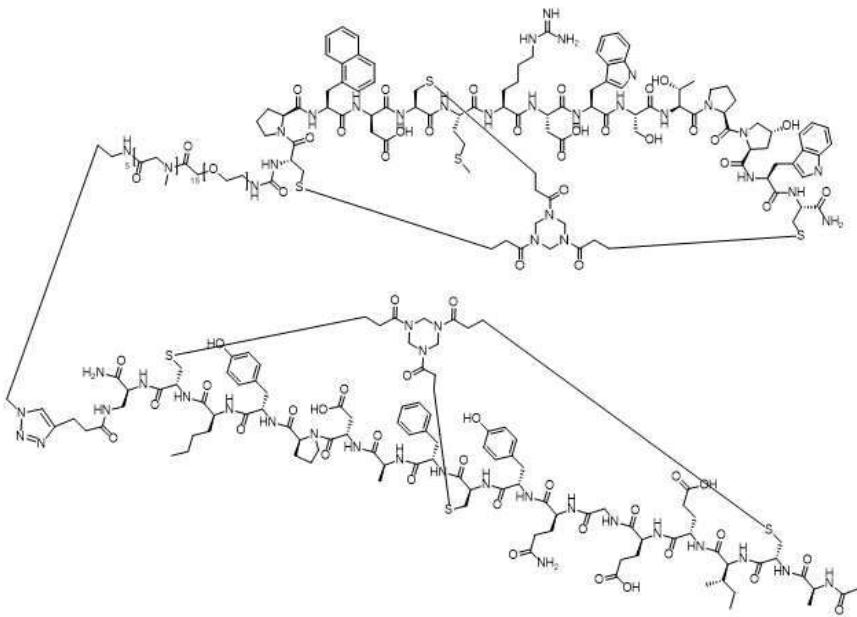
[0528] BCY9406의 제조 과정



[0529]

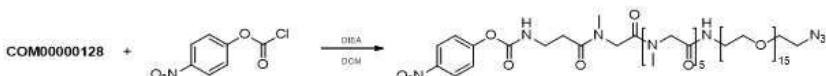
[0530] 화합물 3(15 mg, 5.12 μ mol, 1.0 eq), BCY7741(12 mg, 5.26 μ mol, 1.03 eq) 및 THPTA(0.4M, 12.8 μ l, 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 ml, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 12.8 μ l, 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 25.6 μ l, 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z[MW: 5212.84 관측된 m/z: 1042.74([M/4H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9406(14.4 mg, 2.57 μ mol, 50.21% 수율, 93.01% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0531] BCY9407



[0532]

[0533] 화합물 2의 제조 과정



[0534]

[0535] DCM(5 mL) 중의 COM128(60 mg, 50.53 μ mol, 1.0 eq), 화합물 1(13 mg, 64.50 μ mol, 1.28 eq), DIEA(9.80 mg, 75.80 μ mol, 13.20 μ L, 1.5 eq)의 용액을 탈기시키고 N_2 로 3회 퍼징하고, 이어서 혼합물을 25-30°C에서 1시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. LC-MS는 COM128이 완전히 소멸되었고 목적하는 *m/z*(계산된 MW: 1352.48, 판측된 *m/z*: 676.7($[M/2+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(12 mg, 8.87 μ mol, 17.56% 수율)를 무색 오일로서 수득하였다.

[0536] [BCY8116]-[COM128]의 제조 과정



[0537]

[0538] DMF(3 mL) 중의 화합물 2(7 mg, 5.18 μ mol, 1.0 eq) 및 BCY8116(11 mg, 5.06 μ mol, 1.0 eq), DIEA(2.01 mg, 15.53 μ mol, 2.70 μ L, 3.0 eq)의 용액을 탈기시키고 N_2 로 3회 펴징하고, 이어서 혼합물을 25-30°C에서 1시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z(계산된 MW: 3385.85, 관측된 m/z: 1129.3([M/3H] $^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. [BCY8116]-[COM128](15.6 mg, 4.46 μ mol, 86.13% 수율, 96.75% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

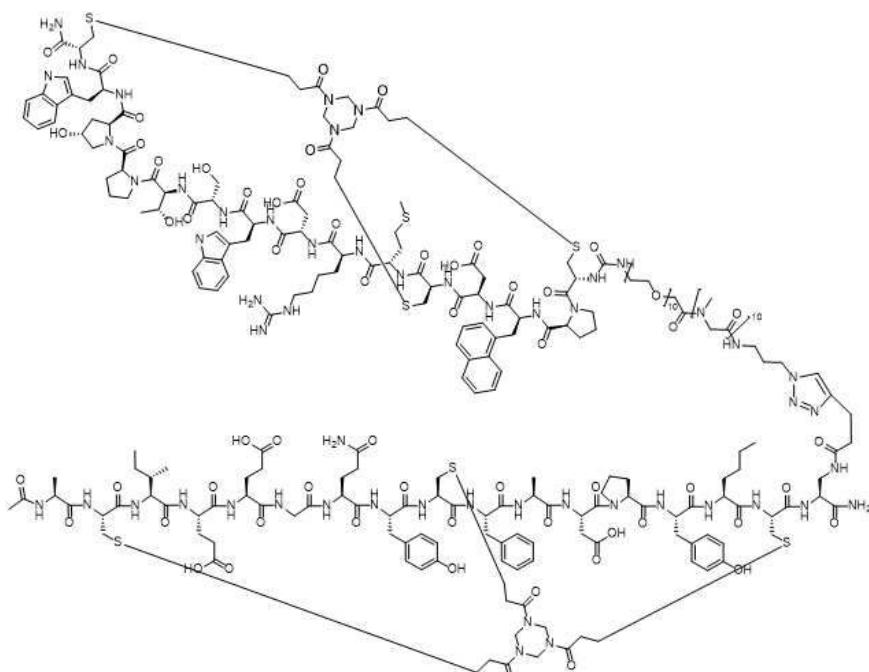
[0539] BCY9407의 제조 과정



[0540]

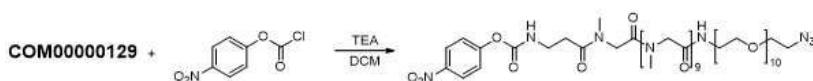
[0541] [BCY8116]-[COM128](15.6 mg, 4.61 μ mol, 1.0 eq), BCY7741(11 mg, 4.82 μ mol, 1.05 eq) 및 THPTA(0.8M, 5.8 μ L, 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N_2 로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 11.6 μ L, 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 23.2 μ L, 2.0 eq)를 N_2 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z(계산된 MW: 5667.39, 관측된 m/z: 945.6([M/6H] $^+$) 및 1134.2([M/5H] $^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9407(1.3 mg, 0.23 μ mol, 4.33% 수율, 86.90% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0542] BCY9408



[0543]

[0544] 화합물 2의 제조 과정



[0545]

[0546] DCM(5 mL) 중의 COM129(45.0 mg, 34.39 μ mol, 1.0 eq), 화합물 1(15.0 mg, 74.42 μ mol, 2.1 eq)의 용액에 TEA(5.5 mg, 53.88 μ mol, 7.5 μ L, 1.5 eq)를 가하고 이어서 혼합물을 25-30°C에서 1시간 동안 N_2 분위기 하에서 교반하였다. LC-MS는 COM129가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 1473.58, 관측된 m/z: 737.3([M/2H] $^+$))를

갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(9 mg, 6.11 μmol , 17.01% 수율, 95.76% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0547]

화합물 3의 제조 과정



[0548]

[0549]

DMF(3 mL) 중의 화합물 2(9.0 mg, 6.11 μmol , 1.0 eq) 및 BCY8116(13.3 mg, 6.11 μmol , 1.0 eq)의 용액에 DIEA(2.4 mg, 18.32 μmol , 3.2 μl , 3.0 eq)를 가하였다. 모든 용매는 탈기되고 N_2 로 3회 펴징되었으며, 이어서 혼합물을 25-30°C에서 1시간 동안 N_2 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 3506.95, 관측된 m/z : 877.4($[\text{M}/4\text{H}]^+$) 및 m/z : 1169.6($[\text{M}/3\text{H}]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(7.2 mg, 2.05 μmol , 31.93% 수율, 95% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0550]

BCY9408의 제조 과정



3

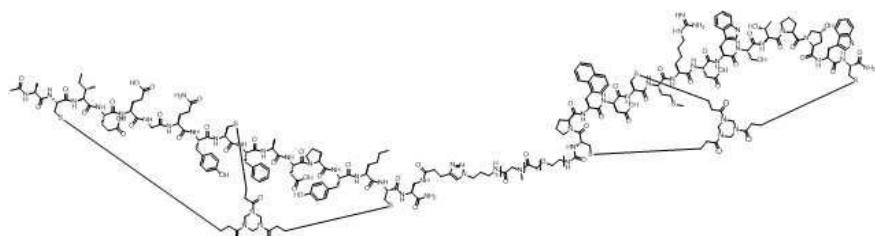
[0551]

[0552]

화합물 3(7.2 mg, 2.05 μmol , 1.0 eq), BCY7741(5.0 mg, 2.19 μmol , 1.03 eq) 및 THPTA(0.4M, 5.1 μl , 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N_2 로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 5.1 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 10.2 μl , 2.0 eq)를 N_2 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N_2 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z [MW: 5788.49 관측된 m/z : 968.9($[\text{M}/6\text{H}]^+$) 및 1158.0($[\text{M}/5\text{H}]^+$)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9408(3.1 mg, 4.97e-1 μmol , 24.23% 수율, 92.87% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0553]

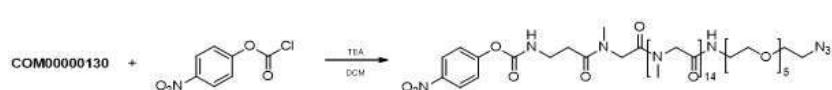
BCY9409



[0554]

[0555]

화합물 2의 제조 과정



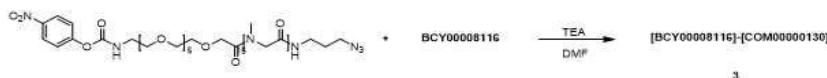
[0556]

[0557]

DCM(3 mL) 중의 화합물 1(30.0 mg, 20.78 μmol), COM130(6.28 mg, 31.17 μmol)의 용액에 TEA(3.15 mg, 31.17 μmol , 4.34 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 1608.70 관측된 m/z : 804.8($[\text{M}/2\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시키고 이어서 동결건조시켜 화합물 2(10.2 mg, 조 물질)를 백색 고체로서 제공하였다.

[0558]

화합물 3의 제조 과정



[0559]

[0560]

DMF(2 mL) 중의 화합물 2(10.2 mg, 6.34 μmol) 및 BCY8116(13.50 mg, 6.22 μmol)의 용액에 DIEA(0.8 mg, 6.22 μmol , 1.1 μl , 1.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z(MW: 3642.08, 관측된 m/z: 1214.4([M+3H] $^{+}$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(15.0 mg, 4.12 μmol , 62.94% 수율, 95% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0561]

BCY9409의 제조 과정



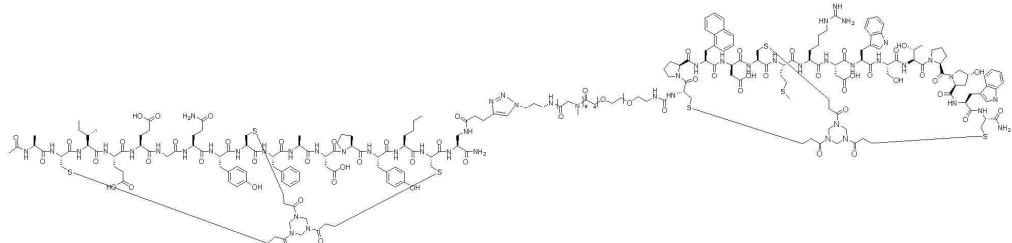
[0562]

[0563]

화합물 3(15 mg, 4.12 μmol , 1.0 eq), BCY7741(10 mg, 4.38 μmol , 1.03 eq) 및 THPTA(0.4M, 10.3 μl , 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 10.3 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 20.6 μl , 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 5923.61, 관측된 m/z: 988.2([M+4H] $^{+}$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9409(3.1 mg, 0.52 μmol , 12.62% 수율, 90.89% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0564]

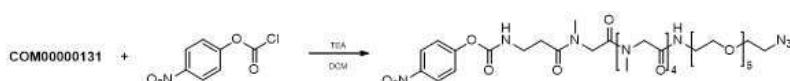
BCY9410



[0565]

[0566]

화합물 2의 제조 과정



[0567]

[0568]

DCM(5 mL) 중의 COM131(167.0 mg, 227.89 μmol , 1.0 eq), 화합물 1(55.0 mg, 272.87 μmol , 1.2 eq)의 용액에 TEA(36.4 mg, 359.23 μmol , 50.0 μl , 1.6 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z(MW: 897.93 관측된 920.3([M+Na] $^{+}$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(35 mg, 33.74 μmol , 14.81% 수율, 86.56% 순도)를 무색 오일로서 수득하였다.

[0569]

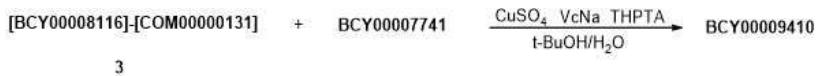
화합물 3의 제조 과정



[0570]

[0571] DMF(2 mL) 중의 화합물 2(20 mg, 22.27 μ mol, 1.0 eq) 및 BCY8116(48 mg, 22.09 μ mol, 1.0 eq)의 용액에 DIEA(8.64 mg, 66.82 μ mol, 11.64 μ L, 3.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 2931.32, 관측된 m/z: 977.7([M+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(40 mg, 13.08 μ mol, 58.7% 수율, 95.82% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

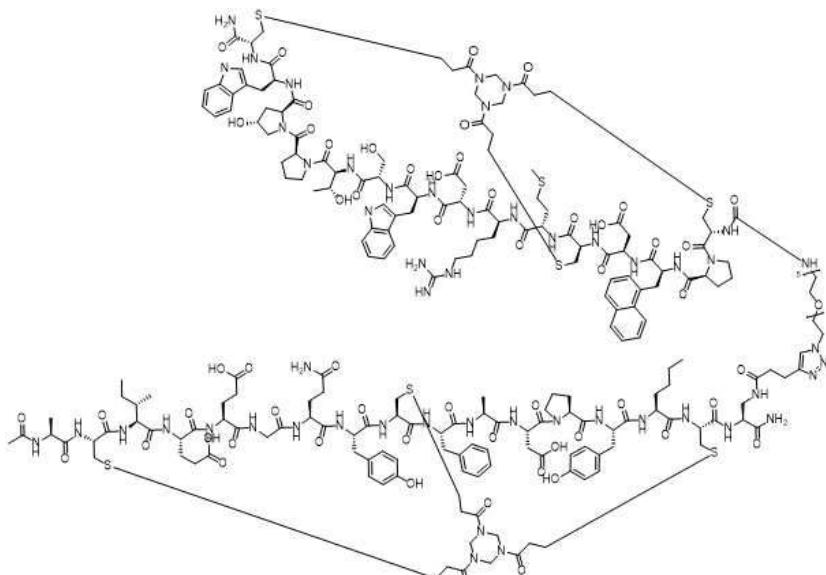
[0572] BCY9410의 제조 과정



[0573]

[0574] 화합물 3(40 mg, 13.08 μ mol, 1.0 eq), BCY7741(35 mg, 15.34 μ mol, 1.17 eq) 및 THPTA(0.4M, 34 μ L, 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 퍼징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 34 μ L, 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 68 μ L, 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기 하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 5212.85, 관측된 m/z: 1043.2([M/5+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9410(38.6 mg, 6.78 μ mol, 49.71% 수율, 91.6% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0575] BCY9411



[0576]

[0577] 화합물 2의 제조 과정



[0578] COM00000132

[0579] DCM(5 mL) 중의 COM132(5 mg, 16.32 μ mol, 1 eq), 화합물 1(4 mg, 19.85 μ mol, 1.22 eq)의 용액에 TEA(2.8 mg, 24.48 μ mol, 3.4 μ L, 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z(계산된 MW: 471.46, 관측된 m/z: 489.2([M+NH₄]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 침압하에서 농축시켜 용매를 제거하고, 이어서 동결건조시켜 화합물 2(8 mg, 조 물질)를 백색 고체로서 제공하였다.

[0580] 화합물 3의 제조 과정



[0581] 2

[0582]

DMF(5 ml) 중의 화합물 2(3.3 mg, 6.9 μ mol, 1.5 eq) 및 BCY8116(10.0 mg, 4.6 μ mol, 1.0 eq)의 용액에 DIEA(0.7 mg, 6.90 μ mol, 1 μ l, 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 2504.83, 관측된 m/z : 1252.3([M/2+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(4.2 mg, 1.51 μ mol, 32.78% 수율, 90% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0583] BCY9411의 제조 과정

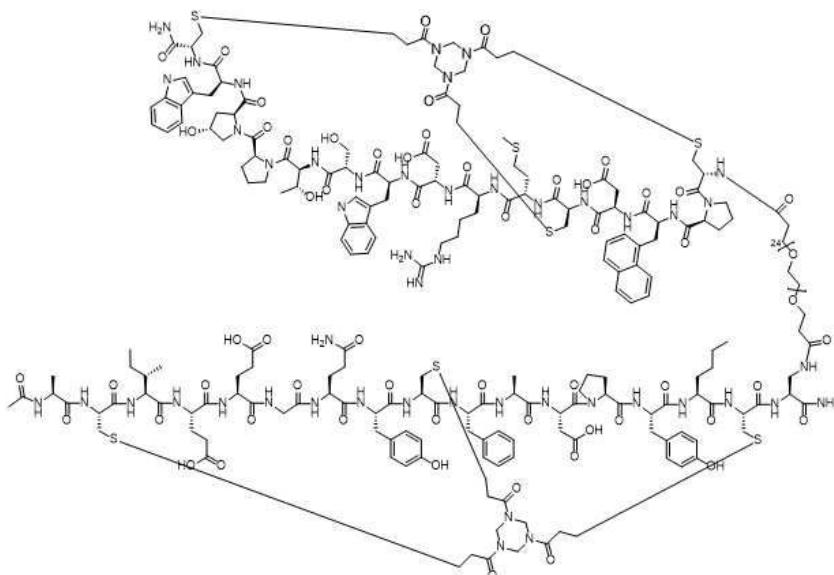


[0584] 3

[0585]

화합물 3(4.2 mg, 1.68 μ mol, 1.0 eq), BCY7741(4.0 mg, 1.75 μ mol, 1.05 eq) 및 THPTA(0.04M, 84 μ l, 2.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 ml, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.04M, 84 μ l, 2.0 eq) 및 VcNa(0.04M, 168 μ l, 4.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z [MW: 4786.37 관측된 m/z : 1596.2([M/3+H]⁺), 1196.9([M/4+H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY9411(4.1 mg, 0.86 μ mol, 50.20% 수율, 98.26% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0586] BCY9759



[0587]

[0588] 화합물 2의 제조 과정



[0589] 1

[0590]

DCM(3 ml) 중의 화합물 1(5.0 mg, 3.54 μ mol, 1.0 eq), BCY8116(7.7 mg, 3.54 μ mol, 1.0 eq)의 용액에 DIEA(0.9 mg, 7.07 μ mol, 1.2 μ l, 2.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 0°C에서 20분 동안 교반하였다. LC-MS는 NHS

기기 떨어진 화합물 2에 상응하는 질량을 검출하였다(계산된 MW: 3470.95, 가수분해된 MW: 3373.81, 관측된 m/z : 1125.0($[M/3H]^+$)). 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시키고 동결건조시켜 화합물 2(15 mg, 조 물질)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0591]

BCY9759의 제조 과정



[0592]

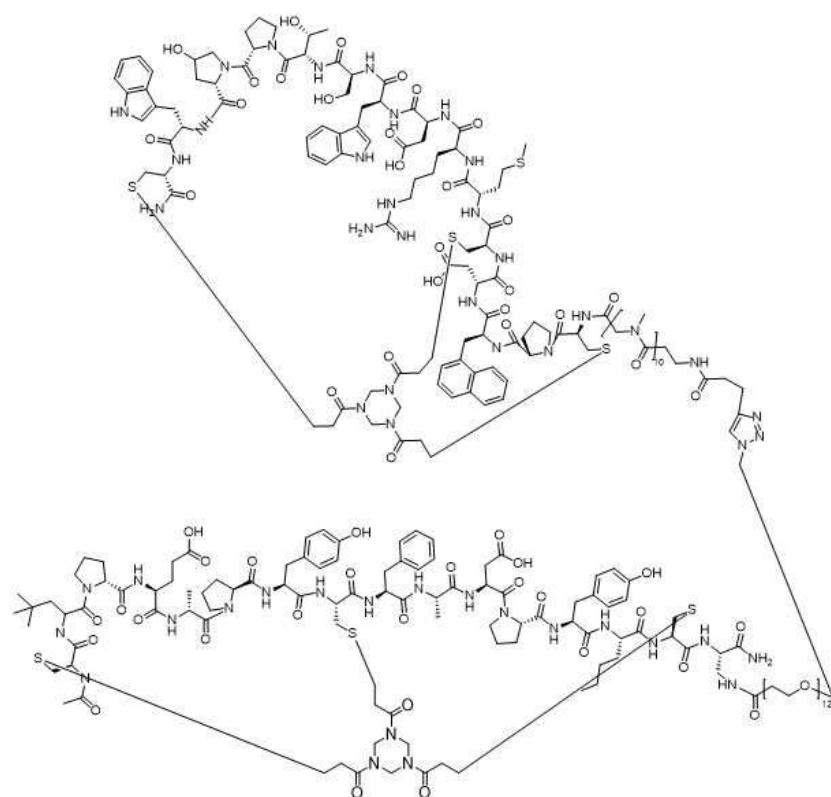
2

[0593]

DMF(3 ml) 중의 화합물 2(20 mg, 5.76 μmol , 1.0 eq) 및 BCY7732(12.7 mg, 5.76 μmol , 1.0 eq)의 용액에 DIEA(1.5 mg, 11.52 μmol , 2.0 μl , 2.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 5557.3, 관측된 m/z : 927.0($[M/6H]^+$) 및 1112.2($[M/5H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 역상-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. BCY9759(2.3 mg, 6.92% 수율, 96.29% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

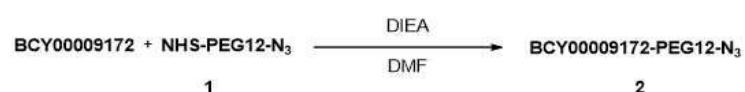
[0594]

BCY10000

**BCY00010000**

[0595]

[0596]

BCY9172-PEG12-N₃의 제조 과정

[0597]

1

2

[0598]

BCY9172(520 mg, 248.16 μmol , 1.0 eq) 및 화합물 1(370 mg, 499.47 μmol , 2.01 eq)을 DMF(5 ml)에 용해시키고 혼합물에 DIEA(48.11 mg, 372.24 μmol , 64.84 μl , 1.5 eq)를 가하고 30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY9172가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 2721.12, 관측된 m/z : 1360.9($[M/2H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 화합물 2(284 mg, 101.10 μmol , 40.74% 수율, 96.87% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0599]

BCY10000의 제조 과정



[0600]

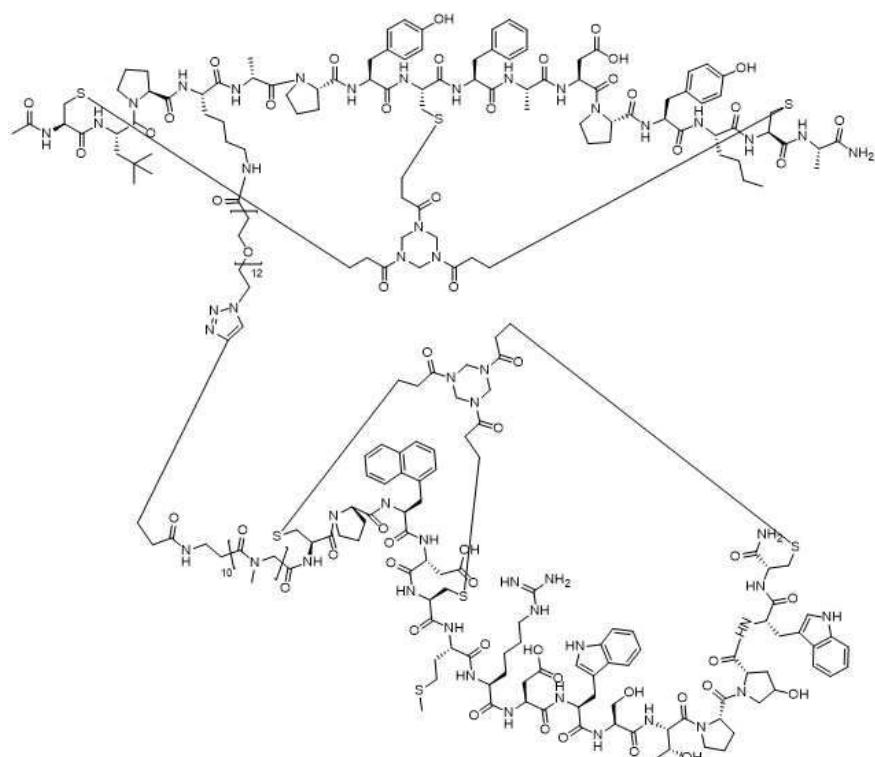
2

[0601]

본 반응을 2개의 독립적인 용기에서 나란히 수행하였다. 하나의 용기에 대해서, 화합물 2(142 mg, 52.18 μmol , 1.0 eq) 및 BCY8846(157 mg, 51.74 μmol , 1.0 eq)를 먼저 10 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 130.5 μl , 1.0 eq), VcNa(0.4 M, 261.0 μl , 2.0 eq) 및 THPTA(0.4M, 130.5 μl , 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 펴징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 5755.54, 관측된 m/z: 959.60([M/6+H]⁺) 및 1151.55([M/5+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 BCY10000(314.9 mg, 51.99 μmol , 49.82% 수율, 95.03% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0602]

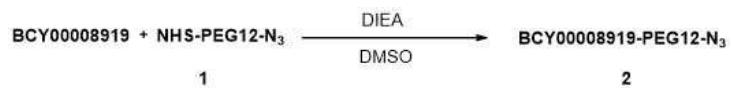
BCY10567



BCY00010567

[0603]

[0604]

BCY8919-PEG12-N₃의 제조 과정

[0605]

1

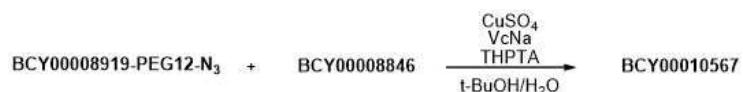
2

[0606]

BCY8919(60.0 mg, 28.85 μmol , 1.0 eq) 및 화합물 1(22.2 mg, 30.01 μmol , 1.04 eq)을 DMSO(1 mL)에 용해시켰다. 용액에 DIPEA(5.6 mg, 43.28 μmol , 7.6 μl , 1.5 eq)를 가하고 이어서 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8919가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 2705.16, 관측된 m/z: 1353.15([M/2+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 화합물 2(BCY8919-PEG12-N₃, 18.5 mg, 6.77 μmol , 23.47% 수율, 99.04% 순도)를 백색 고체로서 수

득하였다.

[0607] BCY10567의 제조 과정

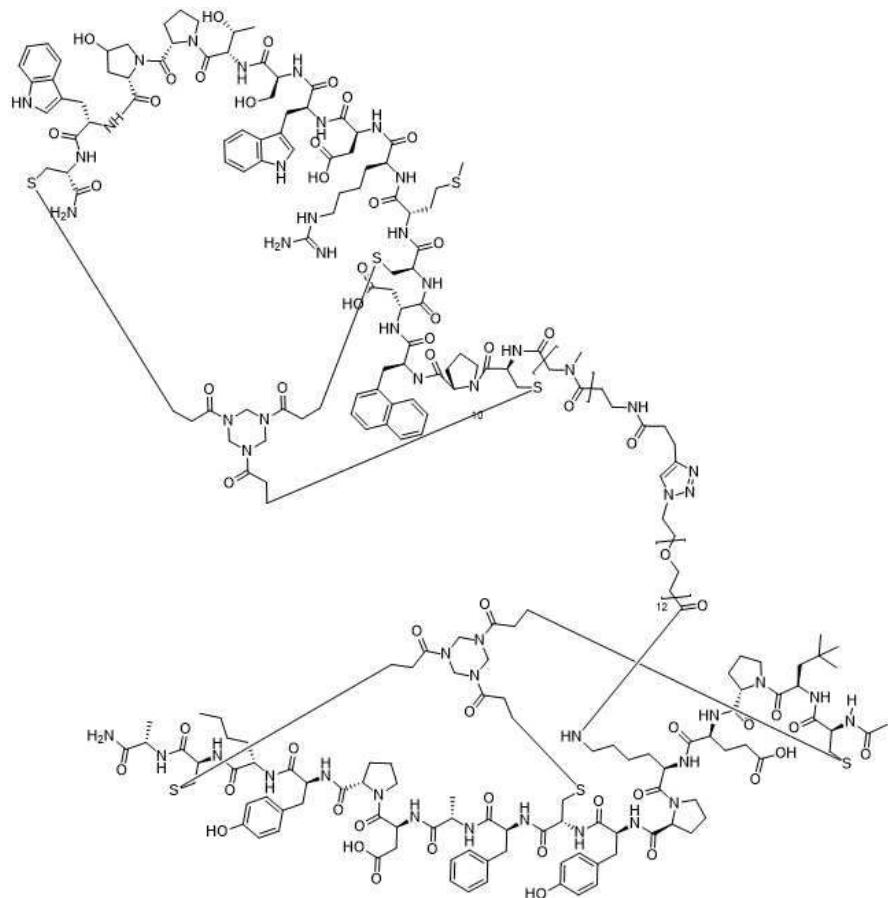


2

[0608] 주: 본 반응을 2회 수행하였으며, 첫 번째 반응을 하기에 기재한다.

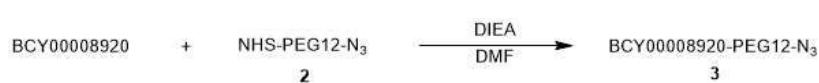
[0609] [0610] 화합물 2(9.0 mg, 3.33 μmol , 1.0 eq) 및 BCY8846(10.1 mg, 3.33 μmol , 1.0 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 8.3 μl , 1.0 eq), VcN(1.3 mg, 6.56 μmol , 2.0 eq) 및 THPTA(1.4 mg, 3.22 μmol , 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 0.4M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 펴징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 16시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 5739.58, 관측된 m/z: 956.75([M/6H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 BCY10567(6.85 mg, 1.18 μmol , 35.48% 수율, 98.91% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0611] BCY10569



BCY00010569

[0612] 화합물 3의 제조 과정



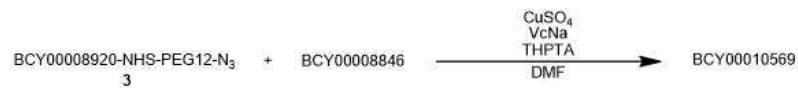
2

3

[0613] [0614] 화합물 BCY8920(40.0 mg, 18.71 μmol , 1.0 eq), 화합물 2(16.0 mg, 21.6 μmol , 1.15 eq) 및 DIEA(5.0 μl ,

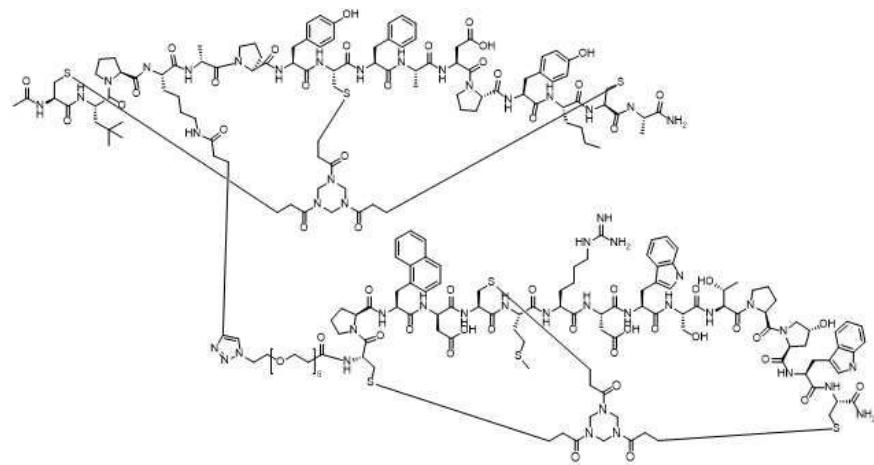
28.0 μmol , 1.5 eq)의 혼합물을 DMF에 용해시켰다. 반응 혼합물을 40°C에서 1시간 동안, LC-MS가 목적하는 m/z(계산된 MW: 2763.2, 관측된 m/z: 912.17([M-28]/2+H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보일때까지 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 생성시킨 다음, 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(23.4 mg, 8.47 μmol , 45.25% 수율, 99.0% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0616] BCY10569의 제조 과정



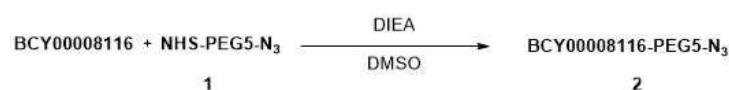
[0618] 화합물 3(5.0 mg, 1.81 μmol , 1.0 eq), BCY8846(5.8 mg, 1.9 μmol , 1.05 eq) 및 THPTA(1.0 mg, 2.3 μmol , 1.3 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 1 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 5.0 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 5.0 μl , 1.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 5797.62, 관측된 m/z: 1160.7([M+H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시키고 BCY10569(5.7 mg, 1.18 μmol , 52.25% 수율, 96.16% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0619] BCY10571



[0620]

[0621] BCY8116-PEG5-N₃의 제조 과정



[0623] BCY8116(60 mg, 27.62 μmol , 1.0 eq) 및 화합물 1(12.0 mg, 27.75 μmol , 1.0 eq)을 먼저 DMSO(1 mL)에 용해시키고, 이어서 혼합물에 DIEA(5.4 mg, 41.43 μmol , 7.22 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z(MW: 2489.82, 관측된 m/z: 1245.1700([M/2+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(48 mg, 19.28 μmol , 69.80% 수율, 100% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0624] BCY10571의 제조 과정



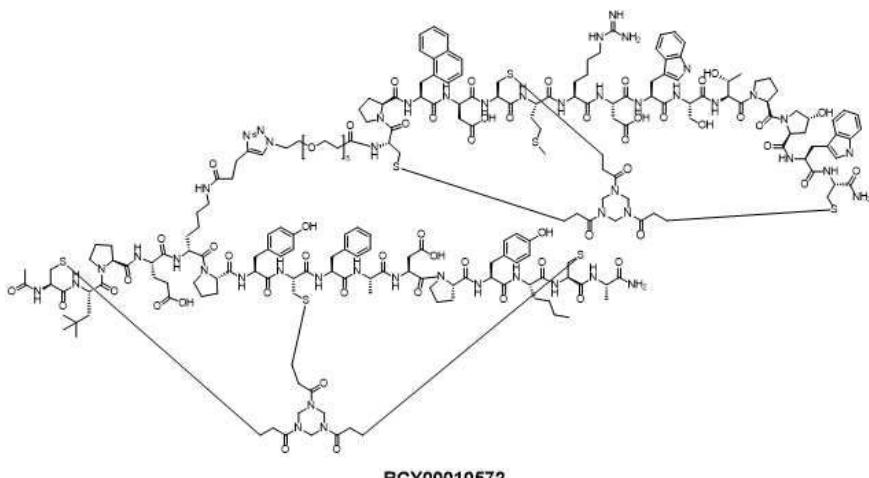
2

[0625]

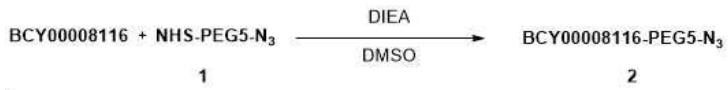
본 반응을 2개의 독립적인 용기에서 나란히 수행하였다. 하나의 용기에 대해서, 화합물 2(10 mg, 4.02 μmol , 1.0 eq) 및 BCY8927(9 mg, 4.17 μmol , 1.04 eq)를 먼저 2 ml의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 10.0 μl , 1.0 eq), VcNa(0.4 M, 20.1 μl , 2.0 eq) 및 THPTA(0.4M, 10.0 μl , 1 eq)를 가하였다. 최종적으로 0.4M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 펴징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 4시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 4649.36, 관측된 m/z: 1162.57([M/4H]⁺), 1549.69([M/3H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. BCY10571(13 mg, 2.79 μmol , 34.88% 수율, 96.48% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0627]

BCY10572



[0628]

[0629] BCY8116-PEG5-N₃의 제조 과정

[0630]

[0631]

BCY8116(60 mg, 27.62 μmol , 1.0 eq) 및 화합물 1(12.0 mg, 27.75 μmol , 1.0 eq)을 먼저 DMSO(1 ml)에 용해시키고, 이어서 혼합물에 DIEA(5.4 mg, 41.43 μmol , 7.22 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z(MW: 2489.82, 관측된 m/z: 1245.1700([M/2H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(48 mg, 19.28 μmol , 69.80% 수율, 100% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0632]

BCY10572의 제조 과정



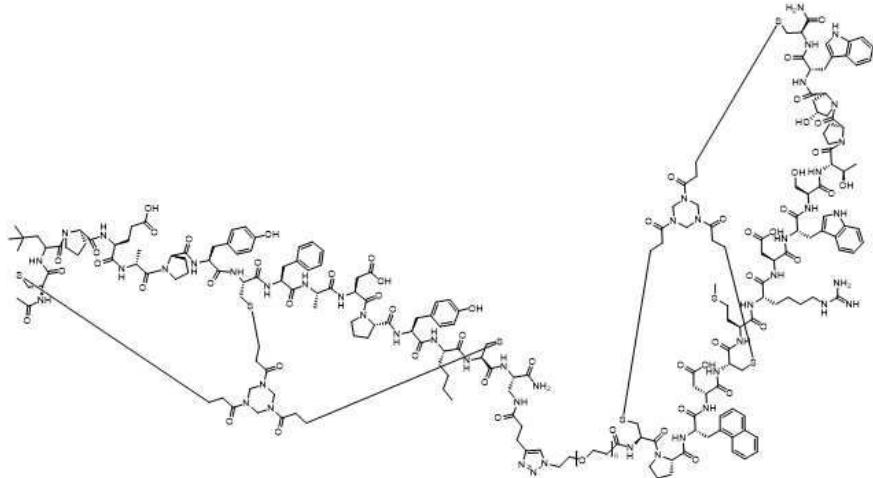
2

[0633]

본 반응을 2개의 독립적인 용기에서 나란히 수행하였다. 하나의 용기에 대해서, 화합물 2(10 mg, 4.02 μmol , 1.0 eq) 및 BCY8928(9 mg, 4.06 μmol , 1.01 eq)를 먼저 2 ml의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서

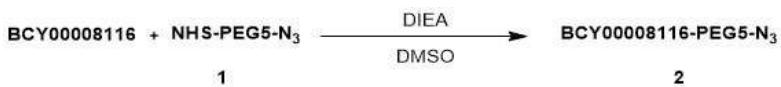
CuSO_4 (0.4M, 10.1 μl , 1 eq), VcNa (0.4 M, 20.2 μl , 2.0 eq) 및 THPTA(0.4M, 10.1 μl , 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 0.4M NH_4HCO_3 를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N_2 로 3회 페징되었다. 반응 혼합물을 N_2 분위기하에 30°C에서 4시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 4707.40, 관측된 m/z : 1568.29($[\text{M}/3+\text{H}]^+$) 및 1176.83($[\text{M}/4+\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. BCY10572(21 mg, 4.46 μmol , 55.7% 수율, 97.51% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

BCY10573



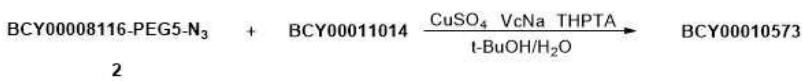
BCY00010573

화합물 2의 제조 과정



DMSO(1 mL) 중의 BCY8116(35 mg, 16.11 μ mol, 1 eq), 화합물 1(7.00 mg, 16.19 μ mol, 1 eq)의 용액에 DIEA(3.12 mg, 24.17 μ mol, 4.21 μ L, 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 25–30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8116의 대부분이 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 2489.82, 관측된 1245.37([M/2H]⁺) 및 830.25([M/3H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(26.8 mg, 10.76 μ mol, 66.81% 수율, 100% 순도)를 백색 고체로서 수집하였다.

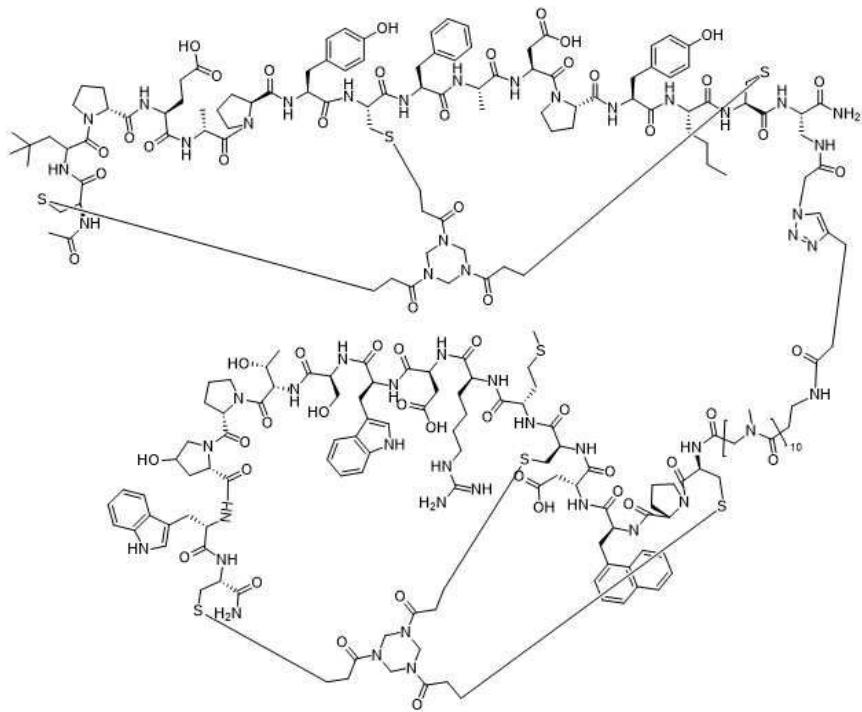
BCY10573의 제조 과정



화합물 2(15 mg, 6.02 μ mol, 1.0 eq), BCY11014(13.50 mg, 6.21 μ mol, 1.03 eq) 및 THPTA(0.4M, 15.1 μ l, 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 ml, 예비-탈기되고 N₂로 3회 퍼징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 15.1 μ l, 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 30.2 μ l, 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 25–30 °C에서 12시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z[MW: 4665.32, 관측된 m/z: 1167.50([M+4H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY10573(11.5 mg, 2.42 μ mol, 40.14% 수율, 98.11% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0643]

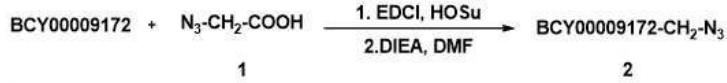
BCY10578



BCY00010578

[0644]

[0645] 화합물 2의 제조 과정



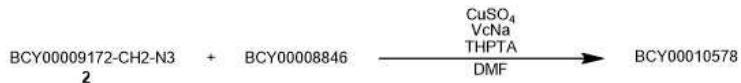
[0646]

[0647]

화합물 1(5.0 mg, 49.5 μmol , 1.0 eq)을 먼저 EDCI(8.5 mg, 54.8 μmol , 1.1 eq) 및 HOSu(5.7 mg, 49.5 μmol , 1.0 eq)를 혼합함으로써 활성화시켰다. 혼합물을 25-30°C에서 30분 동안 교반하였다. TLC는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 하나의 새로운 스폷이 형성되었음을 가리켰다. 이어서 화합물 BCY9172(80.0 mg, 38.18 μmol , 0.8 eq) 및 DIEA(6.3 mg, 8.5 μl , 49.5 μmol , 1.0 eq)를 상기 혼합물에 가하고, LC-MS가 목적하는 m/z (계산된 MW: 2178.46, 관측된 m/z : 1089.44($[\text{M}/2\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보일때까지, 40°C에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 생성시킨 다음, 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(15 mg, 6.88 μmol , 18.66% 수율, 73.3% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0648]

BCY10578의 제조 과정



[0649]

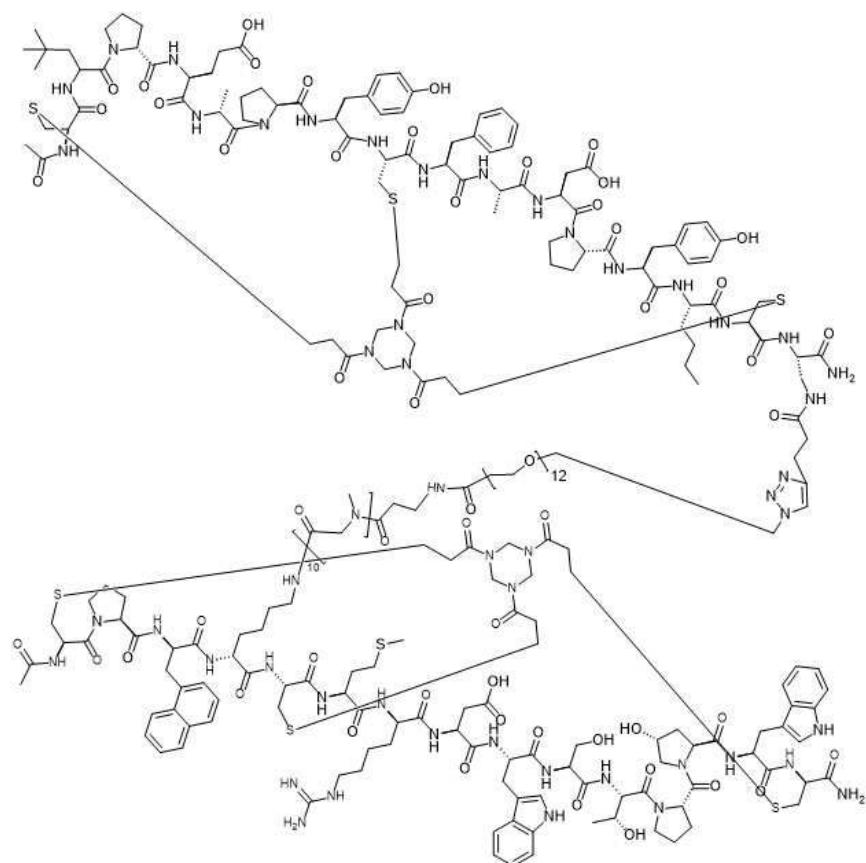
[0650]

화합물 2(9.8 mg, 4.5 μmol , 1.0 eq), BCY8846(14.0 mg, 4.6 μmol , 1.0 eq) 및 THPTA(2.0 mg, 4.6 μmol , 1.0 eq)의 혼합물을 $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 1 $\text{m}\ell$, 예비-탈기되고 N_2 로 3회 퍼징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO_4 (0.4M, 12 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 24 μl , 2.0 eq)를 N_2 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH_4HCO_3 (1:1 $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 N_2 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 5212.88, 관측된 m/z : 1304.2($[\text{M}/4\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시키고,

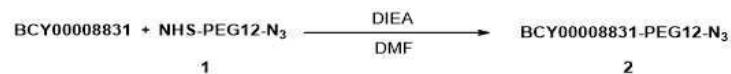
BCY10578(13.78 mg, 2.64 μmol , 58.66% 수율, 96.23% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0651]

BCY10917



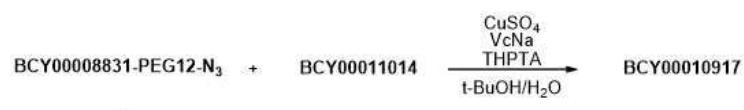
[0652]

[0653] BCY8831-PEG12-N₃의 제조 과정

[0654]

[0655] BCY8831(40.0 mg, 13.29 μmol , 1.0 eq) 및 화합물 1(10.5 mg, 14.17 μmol , 1.07 eq)을 DMF(1 mL)에 용해시켰다. 용액에 DIPEA(2.6 mg, 20.09 μmol , 3.5 μl , 1.5 eq)를 가하고 이어서 혼합물을 30°C에서 16시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8831이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 3635.16 관측된 m/z: 1212.0([M/3+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 화합물 2(22.0 mg, 5.83 μmol , 43.85% 수율, 96.39% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0656] BCY10917의 제조 과정



[0657] 2

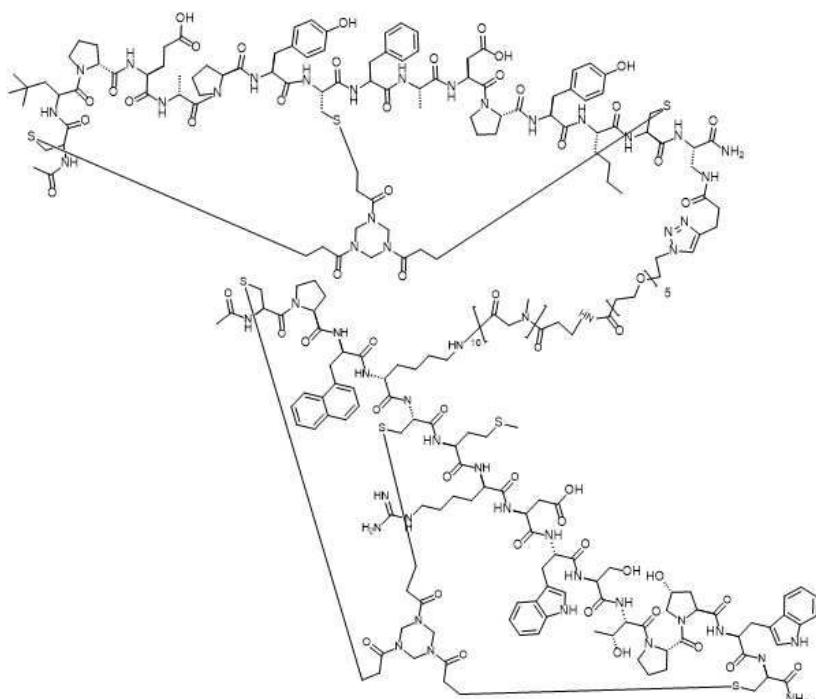
[0658] 주: 2개의 배치를 제조하였으며, 첫 번째 것을 최종 보고서용으로 기록하였다.

[0659]

화합물 2(10.0 mg, 2.75 μmol , 1.0 eq) 및 BCY11014(5.98 mg, 2.75 μmol , 1.0 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 13.7 μl , 2.0 eq), VcNa(1.1 mg, 5.55 μmol , 2.0 eq) 및 THPTA(1.2 mg, 2.76 μmol , 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 펴징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 16시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 5810.66 관측된 m/z: 1163.0([M/5+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고

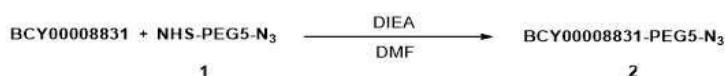
BCY10917(6.4 mg, 1.07 μmol , 39.03% 수율, 97.49% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0660] BCY11020



[0661]

[0662] BCY8831-PEG5-N₃의 제조 과정



[0663]

BCY8831(25.0 mg, 8.31 μmol , 1.0 eq) 및 화합물 1(3.9 mg, 9.02 μmol , 1.09 eq)을 DMF(1 mL)에 용해시켰다. 혼합물을 DIPEA(1.6 mg, 12.46 μmol , 2.2 μl , 1.5 eq)를 가하고, 이어서 혼합물을 35°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8831이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 3326.79, 관측된 m/z: 1109.66([M/3H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 화합물 2(7.3 mg, 2.09 μmol , 25.20% 수율, 95.41% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0665] BCY11020의 제조 과정

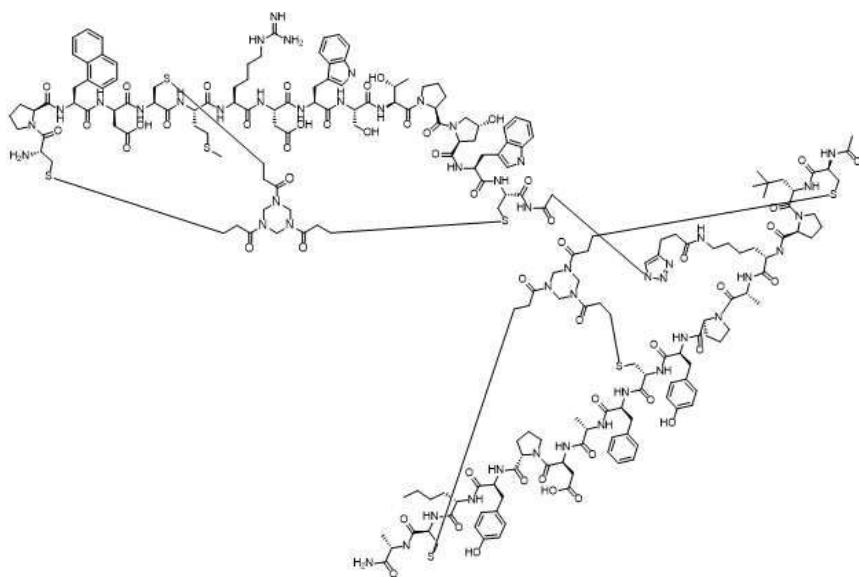


[0666]

화합물 2(7.3 mg, 2.19 μmol , 1.0 eq) 및 BCY11014(4.8 mg, 2.19 μmol , 1.0 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 5.5 μl , 1.0 eq), VcNa(1.0 mg, 5.05 μmol , 2.3 eq) 및 THPTA(1.0 mg, 2.30 μmol , 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 페징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 5502.29, 관측된 m/z: 1101.74([M/5H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 BCY11020(3.3 mg, 0.577 μmol , 26.30% 수율, 96.24% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0668]

BCY11373

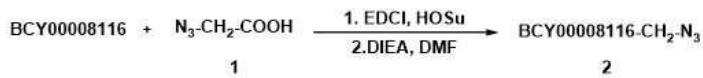


BCY00011373

[0669]

[0670]

화합물 2의 제조 과정



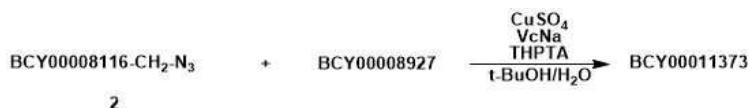
[0671]

[0672]

DMF(1 mL) 중의 화합물 1(5.0 mg, 49.5 μmol , 1.0 eq)의 용액에 EDCI(8.5 mg, 54.8 μmol , 1.1 eq) 및 HOSu(5.7 mg, 49.5 μmol , 1.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 30분 동안 교반하였다. TLC는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 하나의 새로운 스폷이 형성되었음을 가리켰다. 이어서 0.3 mL의 상기 혼합물에 BCY8116(30.0 mg, 13.81 μmol , 0.28 eq) 및 DIEA(2.4 μl , 13.81 μmol , 0.28 eq)를 가하고, 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8116이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 2255.53, 관측된 m/z: 1128.34([M+2H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 이어서 반응 혼합물을 침입하에서 농축시켜 용매를 제거하여 잔사를 생성시킨 다음, 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(21 mg, 8.9 μmol , 64.43% 수율, 95.56% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0673]

BCY11373의 제조 과정



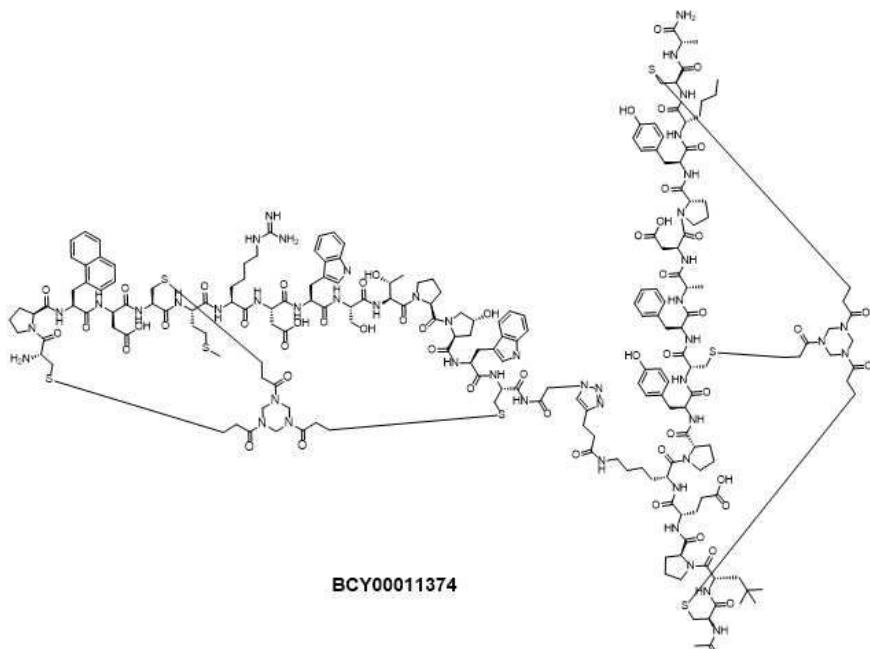
[0674]

[0675]

화합물 2(5 mg, 2.22 μmol , 1.0 eq), BCY8928(4.79 mg, 2.22 μmol , 1.0 eq) 및 THPTA(1.0 mg, 2.30 μmol , 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 1 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 5.6 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 5.6 μl , 1.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 4415.07, 관측된 m/z: 1471.5([M/3H]⁺ 및 1103.8([M/4H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 침입하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고, BCY11373(4.9 mg, 1.03 μmol , 46.26% 수율, 92.4% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

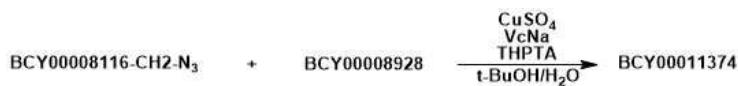
[0676]

BCY11374



[0677]

[0678] BCY11374의 제조 과정



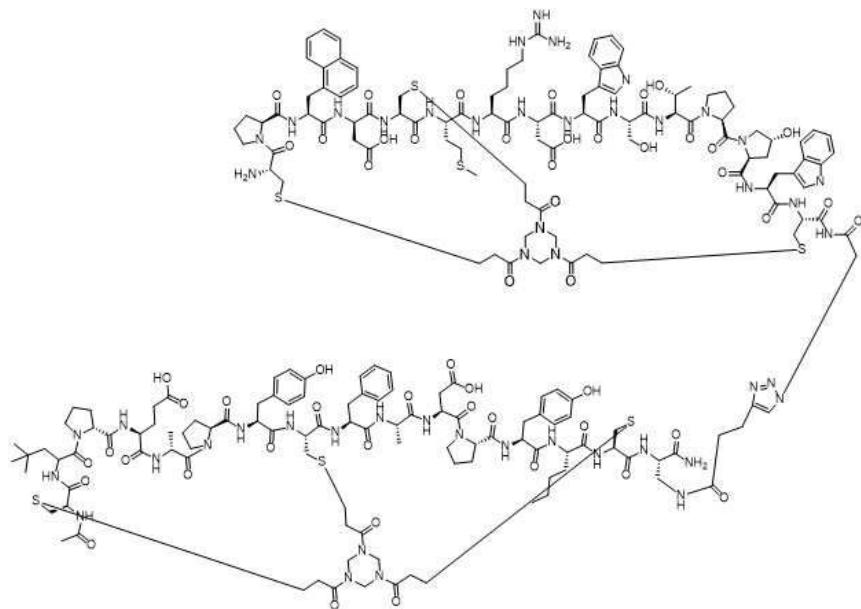
[0679] 2

[0680]

화합물 2(BCY11373의 제조 과정에 기재된 바와 같이 제조될 수 있음; 5 mg, 2.22 μmol , 1.0 eq), BCY8928(4.9 mg, 2.22 μmol , 1.0 eq) 및 THPTA(1.0 mg, 2.30 μmol , 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 1 mL, 예비-탈기 되고 N₂로 3회 펴징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 5.6 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 5.6 μl , 1.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 4473.11, 관측된 m/z: 1491.5([M/3+H]⁺ 및 1118.5([M/4+H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시키고, BCY11374(4.1 mg, 1.27 μmol , 38.04% 수율, 92.0% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0681]

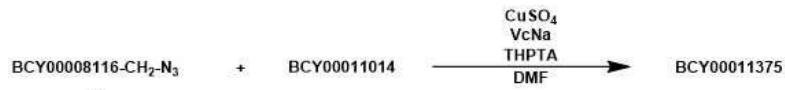
BCY11375



BCY00011375

[0682]

[0683] BCY11375의 제조 과정



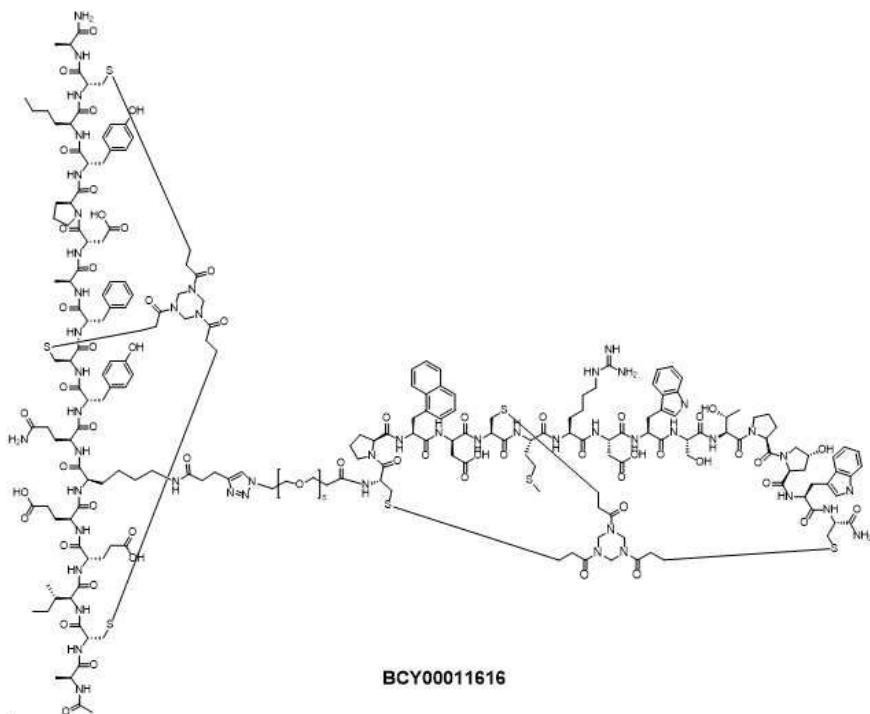
[0684]

[0685]

화합물 2(BCY11373의 제조 과정에 기재된 바와 같이) 제조될 수 있음; 5 mg, 2.22 μmol , 1.0 eq), BCY11014(4.8 mg, 2.22 μmol , 1.0 eq) 및 THPTA(0.5 mg, 2.30 μmol , 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 1 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 5.6 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 5.6 μl , 1.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 일부 목적하는 m/z(계산된 MW: 4431.03, 관측된 m/z: 1107.59([M+4H]⁺ 및 1477.90([M/3+H]⁺)를 검출하였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시키고, BCY11375(6 mg, 1.31 μmol , 59.13% 수율, 96.8% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0686]

BCY11616



[0687]

[0688]

화합물 3의 제조 과정



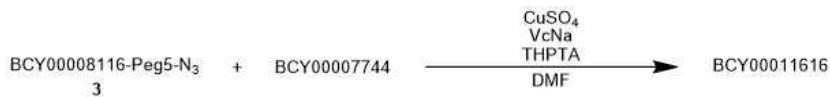
[0689]

[0690]

화합물 BCY8116(30.0 mg, 13.81 μmol , 1.0 eq), 화합물 2(6.0 mg, 13.88 μmol , 1.0 eq) 및 DIEA(2.4 μl , 13.82 μmol , 1.0 eq)의 혼합물을 DMF에 용해시켰다. 반응 혼합물을, LC-MS가 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 2389.82, 관측된 m/z : 1245.4($[\text{M}/2+\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보일 때 까지 40°C에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 생성시킨 다음, 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 3(27 mg, 10.29 μmol , 74.52% 수율, 94.9% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0691]

BCY11616의 제조 과정

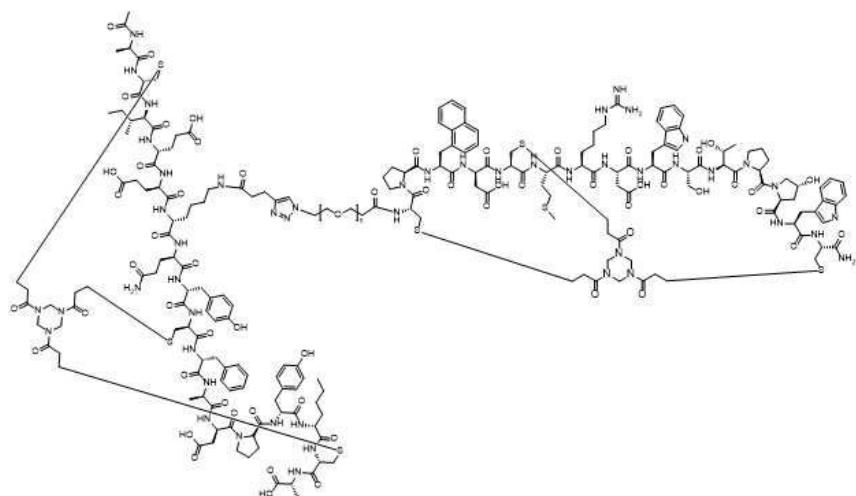


[0692]

[0693]

화합물 3(5 mg, 2.01 μmol , 1.0 eq), BCY7744(5.2 mg, 2.21 μmol , 1.0 eq) 및 THPTA(1.0 mg, 2.30 μmol , 1.0 eq)의 혼합물을 $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 1 mL , 예비-탈기되고 N_2 로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO_4 (0.4M, 5.0 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 5.0 μl , 1.0 eq)를 N_2 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH_4HCO_3 (1:1 $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 N_2 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 4827.46, 관측된 m/z : 1207.12($[\text{M}/4+\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시키고, BCY11616(4.7 mg, 1.0 μmol , 48.48% 수율, 94.7% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

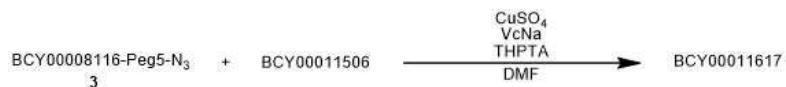
[0694]

BCY11617

BCY00011617

[0695]

[0696] BCY11617의 제조 과정



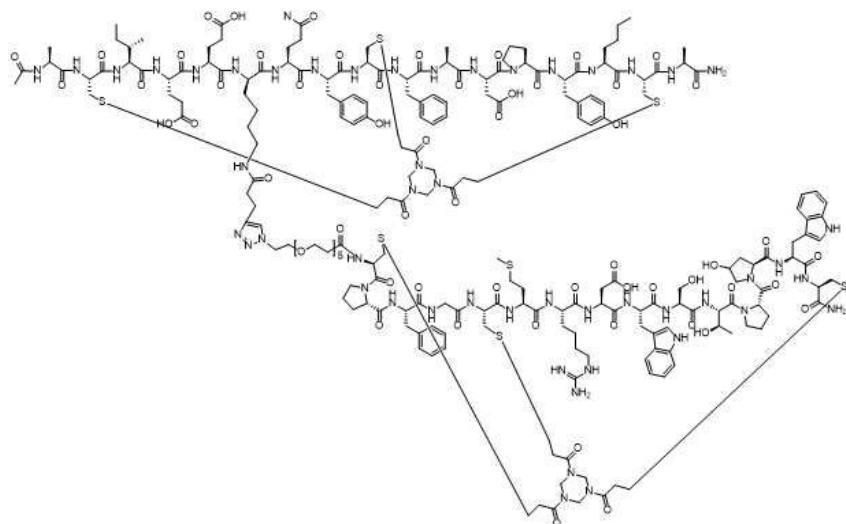
[0697]

[0698]

화합물 3(BCY11616의 제조 과정에 기재된 바와 같이 제조될 수 있음; 5 mg, 2.01 μmol , 1.0 eq), BCY11506(5.2 mg, 2.21 μmol , 1.0 eq) 및 THPTA(1.0 mg, 2.30 μmol , 1.1 eq)의 혼합물을 $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 1 mL , 예비-탈기되고 N_2 로 3회 퍼징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO_4 (0.4M, 5.0 μL , 1.0 eq) 및 VcNa (0.4M, 5.0 μL , 1.0 eq)를 N_2 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH_4HCO_3 (1:1 $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 N_2 분위기하에서 교반하였다.

LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 4828.45, 관측된 m/z : 1206.97($[\text{M}/4\text{H}]^+$ 및 965.91($[\text{M}/5\text{H}]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고, BCY11617(3.2 mg, 0.63 μmol , 31.37% 수율, 95.05% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

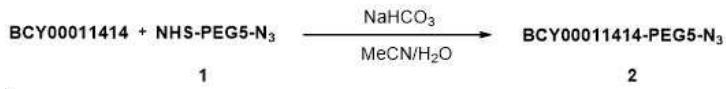
[0699]

BCY11857

BCY00011857

[0700]

BCY11414-PEG5-N₃의 제조 과정



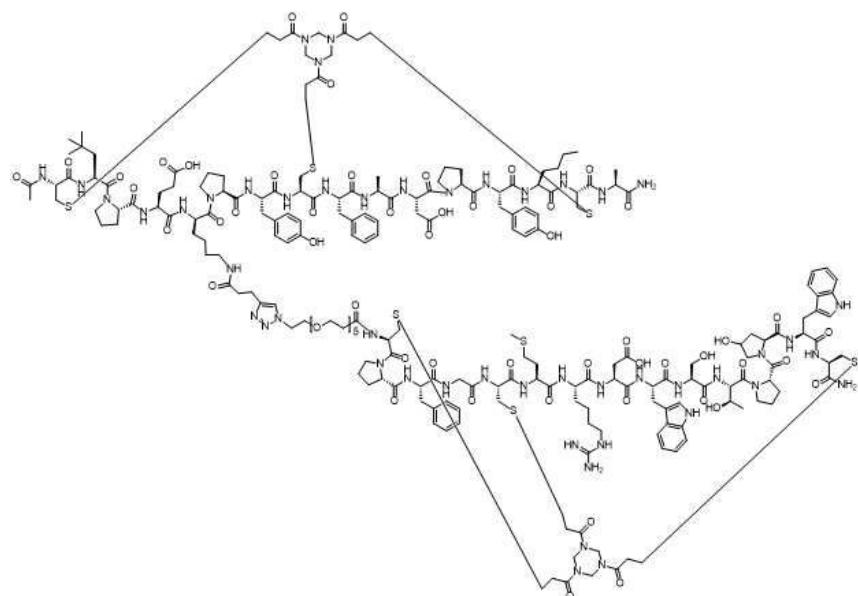
BCY11414(60.0 mg, 29.06 μ mol, 1.0 eq) 및 화합물 1(13.0 mg, 30.06 μ mol, 1.03 eq)을 2 mL의 MeCN/H₂O(1:1)에 용해시켰다. pH를 NaHCO₃(0.4M)로 8로 조절하고, 이어서 혼합물을 25–30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z(계산된 MW: 2381.72, 관측된 m/z: 1191.07([M/2H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 화합물 2(38.0 mg, 15.9 μ mol, 54.71% 수율, 97.35% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

BCY11857의 제조 과정

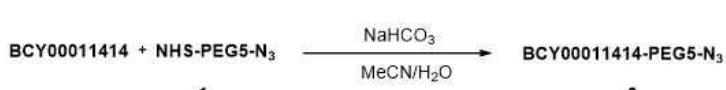


화합물 2(10.0 mg, 4.20 μ mol, 1.0 eq) 및 BCY7744(11.5 mg, 4.92 μ mol, 1.2 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 11.0 μ L, 1.0 eq), VcNa(2.0 mg, 10 μ mol, 2.4 eq) 및 THPTA(2.0 mg, 4.6 μ mol, 1.1 eq)를 가하였다. 최종적으로 0.2M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 페징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 16시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 4719.37, 관측된 m/z: 1180.24([M/4H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 BCY11857(10.3 mg, 2.18 μ mol, 51.90% 수율, 96.02% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

BCY11858



PGW11 (14) PGW5_Natl_2013-03-20



BCV11414 (60.0 mg, 39.06 μmol , 1.0 cc) 例 113 (60.0 mg, 39.06 μmol , 1.03 cc) を 2 mL 81

MeCN/H₂O(1:1)에 용해시켰다. pH를 NaHCO₃(0.4M)로 8로 조절하고, 이어서 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z(계산된 MW: 2381.72, 관측된 m/z: 1191.07([M/2H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 화합물 2(38.0 mg, 15.9 μmol, 54.71% 수율, 97.35% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0712] BCY11858의 제조 과정

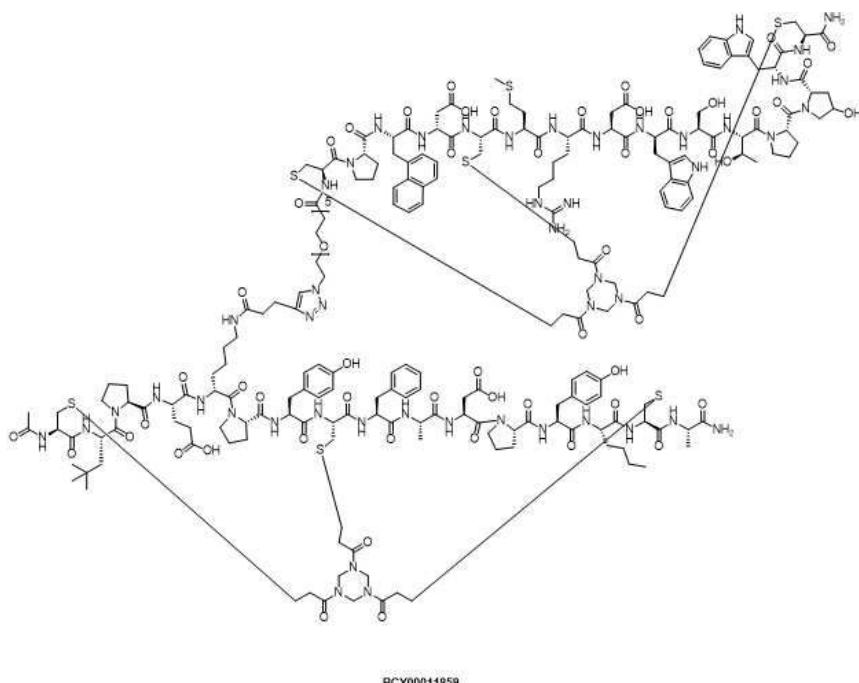


2

[0713]

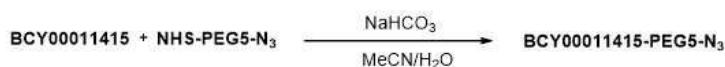
화합물 2(20.0 mg, 8.40 μmol, 1.0 eq) 및 BCY8928(22.0 mg, 9.92 μmol, 1.1 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 21.0 μL, 1.0 eq), VcNa(4.0 mg, 20.19 μmol, 2.4 eq) 및 THPTA(4.0 mg, 9.20 μmol, 1.1 eq)를 가하였다. 최종적으로 0.4M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 페징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 16시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 4599.30, 관측된 m/z: 920.38([M/5H]⁺), 1150.79([M/4H]⁺), 1533.35([M/3H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 BCY11858(16.9 mg, 3.67 μmol, 43.43% 수율, 99.25% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0715] BCY11859



[0716]

[0717] BCY11415-PEG5-N₃의 제조 과정



1 2

[0718]

BCY11415(30.0 mg, 13.81 μmol, 1.0 eq) 및 화합물 1(6.0 mg, 30.06 μmol, 1.0 eq)을 2 mL의 MeCN/H₂O(1:1)에 용해시켰다. pH를 NaHCO₃(0.4M)로 8로 조절하고, 이어서 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z(계산된 MW: 2489.82, 관측된 m/z: 1245.18([M/2H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음

을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 화합물 2(24.0 mg, 9.63 μmol , 69.7% 수율, 99.28% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0720] BCY11859의 제조 과정

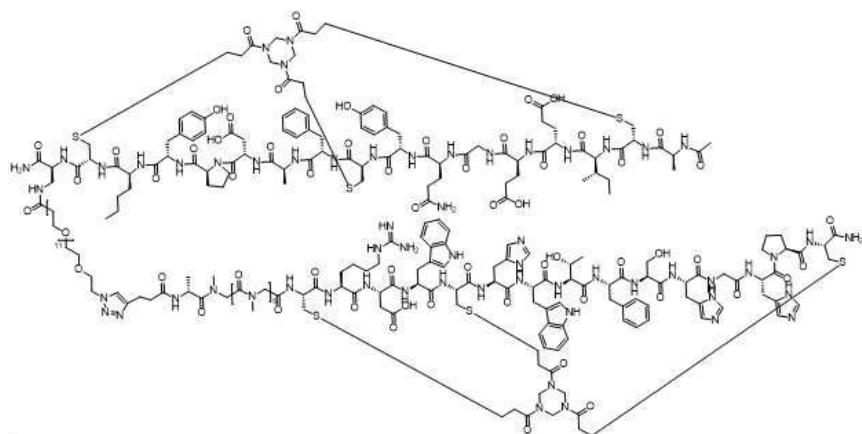


[0721] 2

[0722] 화합물 2(20.0 mg, 8.03 μmol , 1.0 eq) 및 BCY8928(21.0 mg, 9.47 μmol , 1.1 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 21.0 μl , 1.0 eq), VcNa(4.0 mg, 2.5 eq) 및 THPTA(4.0 mg, 1.1 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 털기되고 N₂로 3회 페징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 16시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 4707.40, 관측된 m/z: 941.7([M/5H]⁺), 1176.9([M/4H]⁺), 1569.6([M/3H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 BCY11859(19.2 mg, 4.01 μmol , 49.87% 수율, 98.22% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

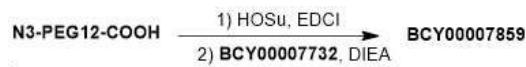
[0723] 실시예 4: PD-L1/CD137 결합 혼합 헤테로텐덤 비사이클릭 펩티드의 합성

[0724] BCY8939



[0725]

[0726] BCY8939의 일반적인 제조 과정

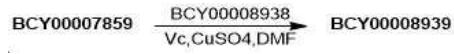


[0727]

[0728] DMA(4.5 mL) 및 DC(1.5 mL) 중의 N3-PEG12-COOH(250 mg, 388 μmol) 및 HOSu(67.0 mg, 583 μmol)의 용액에 EDCI(89.3 mg, 466 μmol)을 20°C에서 16시간 동안 교반하면서 가하였다. LCMS는 목적하는 중간체가 완전히 형성되었음을 보였다. BCY7732(854.97 mg, 388.37 μmol , 1 eq) 및 DIEA(186 mg, 1.44 mmol, 250 μl)를 20°C에서 추가로 5시간 동안 추가로 교반하면서 혼합물에 가하였다. LC-MS는 BCY7732가 완전히 소멸되었고 목적하는 질량을 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켜 백색 고체로서 화합물 BCY7859(621 mg, 200.58 μmol , 51.65% 수율, 95% 순도, TFA)를 제공하였다. 계산된 MW: 2817.16, 관측된 m/z: 942.7[M/3H]⁺

[0729]

BCY8939의 일반적인 제조 과정



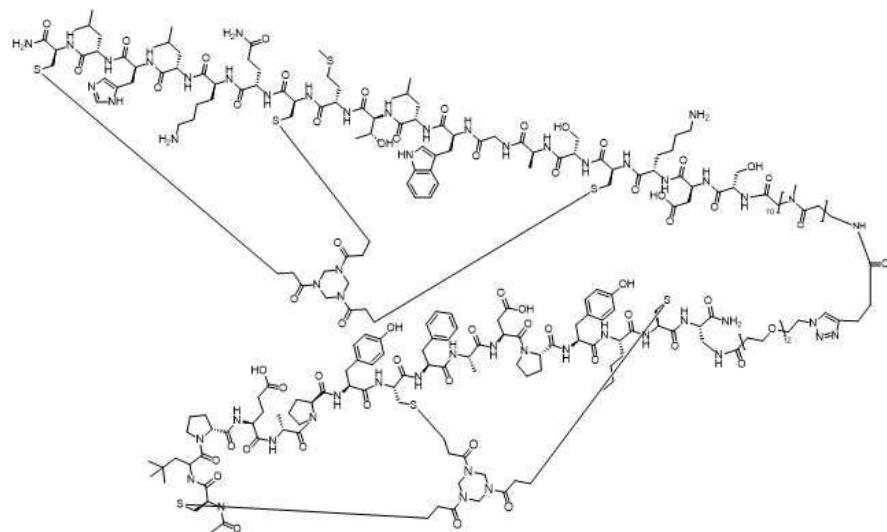
[0730]

[0731] DMF(2 mL) 중의 BCY7859(31.1 mg, 11.0 μmol) 및 BCY8938(30.0 mg, 10.0 μmol)의 용액에 (2R)-2-[(1S)-1,2-디하이드록시에틸]-3,4-디하이드록실-2H-푸란-5-온(1M, 100 μl) 및 CuSO₄(1M, 30.0 μl)를 20°C에서 2시간 동안 질소 분위기하에서 교반하면서 가하였다. LCMS는 BCY7859가 완전히 소멸되었고 목적하는 질량을 갖는 하나

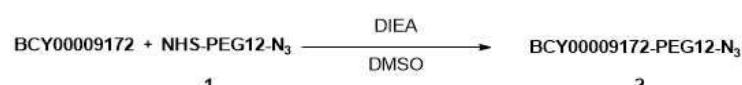
의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켜 백색 고체로서 화합물 BCY8939(16.1 mg, 2.72 μmol , 27.1% 수율, 98.3% 순도)를 제공하였다. 계산된 MW: 5823.49, 관측된 m/z: 1165.4[M/5+H]⁺, 971.0[M/6+H]⁺, 832.9[M/7+H]⁺

[0732]

BCY10580



[0733]

[0734] BCY9172-PEG12-N₃의 제조 과정

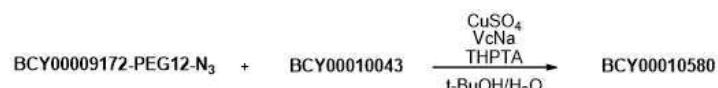
[0735]

[0736]

DMSO(2 mL) 중의 BCY9172(100.0 mg, 47.72 μmol , 1 eq) 및 화합물 1(40.0 mg, 54.00 μmol , 1.13 eq)에 DIEA(9.25 mg, 71.58 μmol , 12.47 μl , 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY9172가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 2721.12, 관측된 m/z: 1361.07[M/2+H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 생성시켰다. 이어서 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(48 mg, 17.44 μmol , 45.68% 수율, 98.87% 순도)를 백색 고체로서 제공하였다.

[0737]

BCY10580의 제조 과정



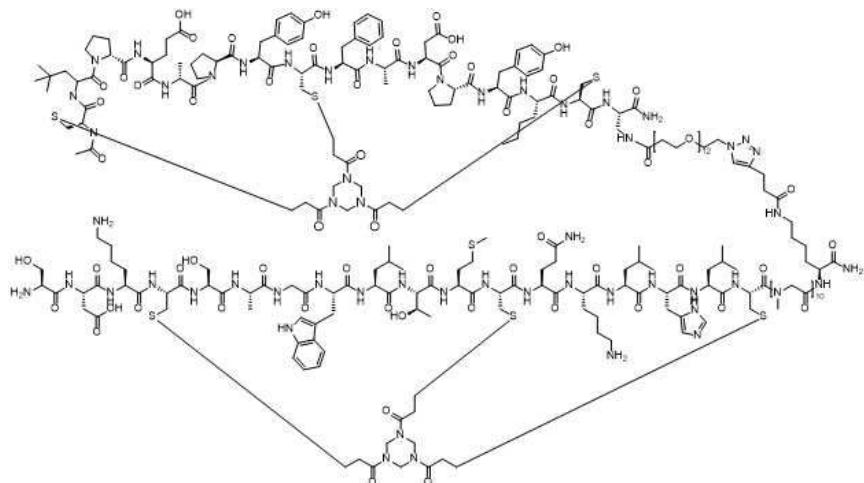
[0738]

[0739]

화합물 2(20 mg, 7.35 μmol , 1.0 eq) 및 BCY10043(23.1 mg, 7.35 μmol , 1.0 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 18.4 μl , 1.0 eq), VcNa(0.4 M, 36.8 μl , 2.0 eq) 및 THPTA(0.4M, 18.4 μl , 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 페징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 4시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 5855.74, 관측된 m/z: 976.40[M/6+H]⁺ 및 1171.67[M/5+H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. BCY10580(29 mg, 4.85 μmol , 65.95% 수율, 97.879% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

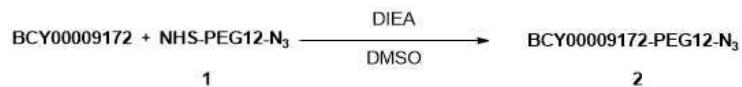
[0740]

BCY10581



[0741]

[0742]

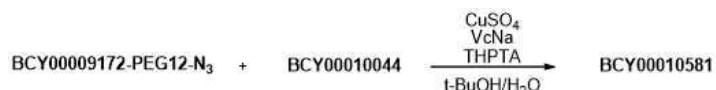


[0743]

[0744] DMSO(2 mL) 중의 BCY9172(100.0 mg, 47.72 μ mol, 1 eq) 및 화합물 1(40.00 mg, 54.00 μ mol, 1.13 eq)에 DIEA(9.25 mg, 71.58 μ mol, 12.47 μ L, 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY9172가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 2721.12, 관측된 m/z : 1361.07([M/2+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 생성시켰다. 이어서 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(48 mg, 17.44 μ mol, 45.68% 수율, 98.87% 순도)를 백색 고체로서 제공하였다.

[0745]

BCY10581의 제조 과정



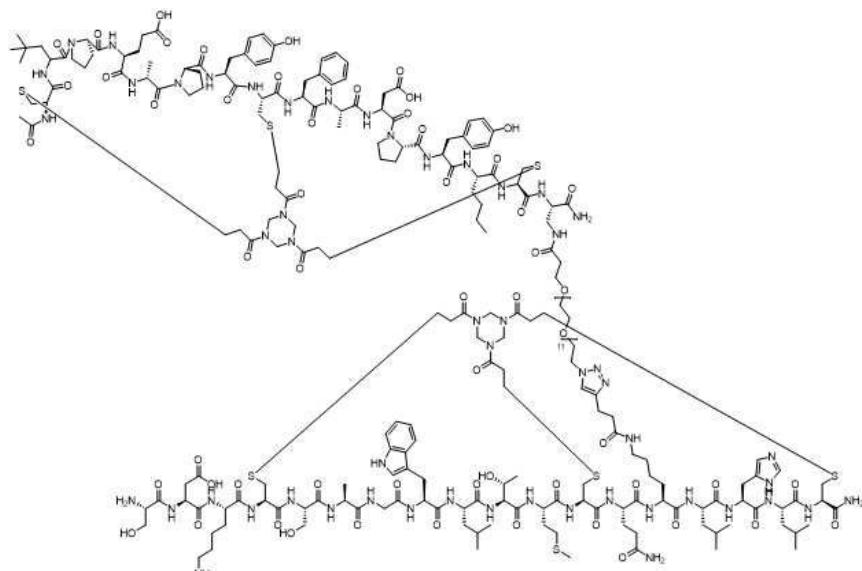
[0746]

[0747]

화합물 2(12 mg, 4.41 μ mol, 1 eq) 및 BCY10044(14.08 mg, 4.41 μ mol, 1 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 11.02 μ L, 1 eq), VcNa(0.4 M, 22.05 μ L, 2 eq) 및 THPTA(0.4M, 10.04 μ L, 1 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 펴징되었다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 30°C에서 4시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(MW: 5912.84, 관측된 m/z: 985.90([M/6H]⁺) 및 1183.28([M/5H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 잔사를 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. BCY10581(9.3 mg, 1.47 μ mol, 33.36% 수율, 93.541% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

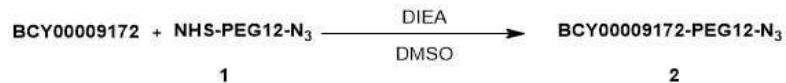
[0748]

BCY10582



[0749]

[0750]

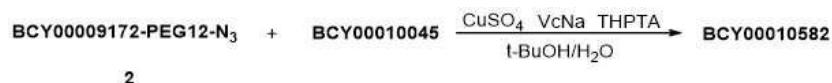


[0751]

[0752] DMSO(2 mL) 중의 BCY9172(100.0 mg, 47.7 μ mol, 1.0 eq) 및 화합물 1(40.0 mg, 54.0 μ mol, 1.13 eq)의 용액에 DIEA(9.2 mg, 71.6 μ mol, 12.5 μ L, 1.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY9172가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (MW: 2721.12, 관측된 m/z : 1361.07([M/2H] $^{+}$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 제공하였다. 잔사를 예비-HPLC(중성 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(37 mg, 13.60 μ mol, 28.49% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0753]

BCY10582의 제조 과정



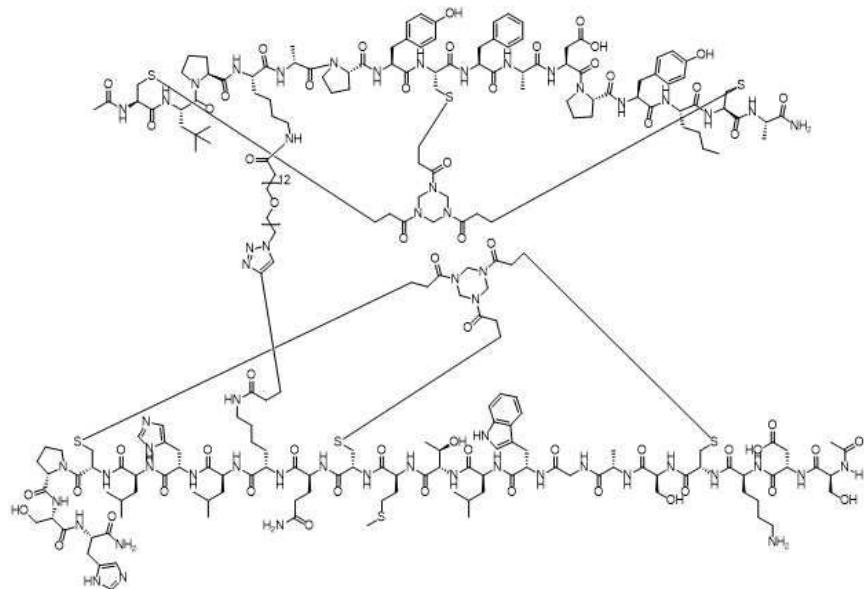
[0754]

[0755]

화합물 2(16.0 mg, 5.9 μ mol, 1.0 eq), BCY10045(14.0 mg, 6.0 μ mol, 1.01 eq) 및 THPTA(0.4M, 14.7 μ l, 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 2 ml, 예비-탈기되고 N₂로 3회 페징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 14.7 μ l, 1.0 eq) 및 VcNa(0.4 M, 29.4 μ l, 2.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)를 적가하여 8로 조절하였으며, 용액은 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 N₂ 분위기하에 25-30°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z[계산된 MW: 5073.89, 관측된 m/z: 1015.24([M+5H]⁺) 및 1268.97([M/4+H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시켰다. BCY10582(10 mg, 1.92 μ mol, 32.58% 수율, 97.21% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0756]

BCY11017



BCY00011017

[0757]

[0758] BCY11017의 제조 과정



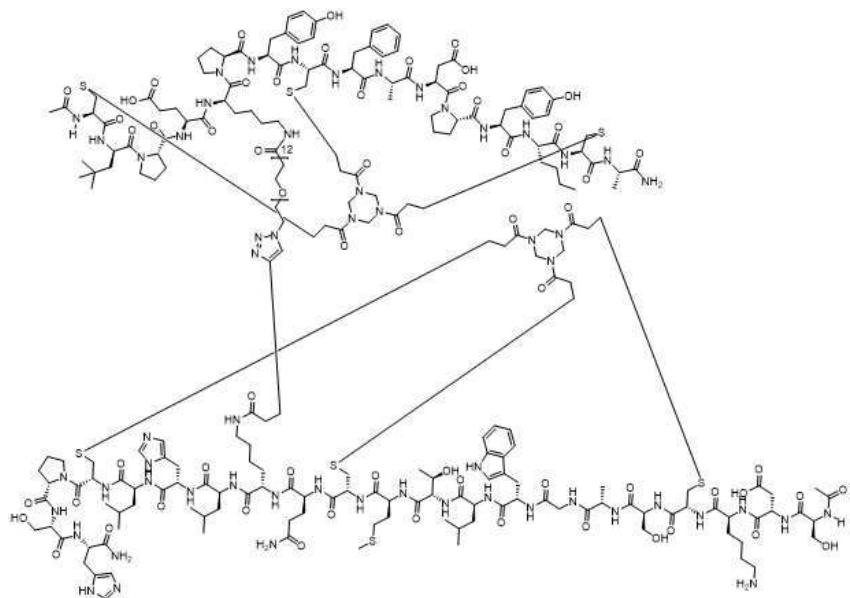
2

[0759]

화합물 2(BCY10567의 제조 과정에 기재된 바와 같이 제조될 수 있음; 7.0 mg, 2.59 μmol , 1.0 eq) 및 BCY10861(7.03 mg, 2.59 μmol , 1.0 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 13.0 μl , 2.0 eq), VcNa(1.0 mg, 5.03 μmol , 2.0 eq) 및 THPTA(1.1 mg, 2.53 μmol , 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 펴졌다. 반응 혼합물을 35°C에서 16시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 5421.30, 관측된 m/z: 1084.7([M/5+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고, BCY11017(6.6 mg, 1.17 μmol , 45.24% 수율, 96.16% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0761]

BCY11018



[0762]

BCY00011018

[0763]

BCY11018의 제조 과정



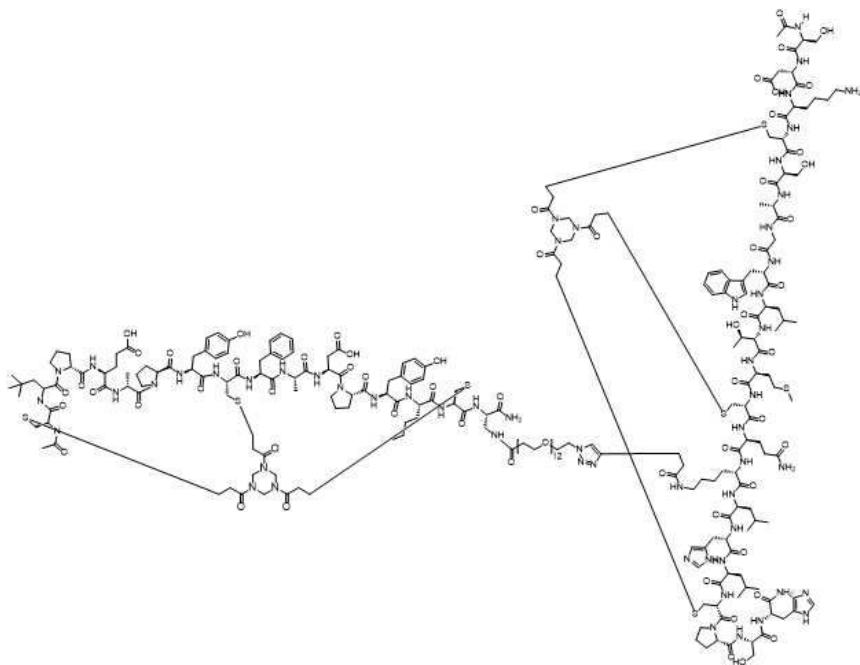
2

[0764]

화합물 2(BCY10570의 제조 과정에 기재된 바와 같이 제조될 수 있음; 6.0 mg, 2.17 μmol , 1.0 eq) 및 BCY10861(5.9 mg, 2.17 μmol , 1.0 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 11.0 μl , 2.0 eq), VcNa(1.0 mg, 2.3 eq) 및 THPTA(1.1 mg, 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 펴징되었다. 반응 혼합물을 35°C에서 16시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 5479.34, 관측된 m/z: 1096.40([M/5+H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고, BCY11018(2.3 mg, 0.40 μmol , 18.31% 수율, 94.73% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0766]

BCY11019



[0767]

BCY00011019

[0768]

BCY11019의 제조 과정



2

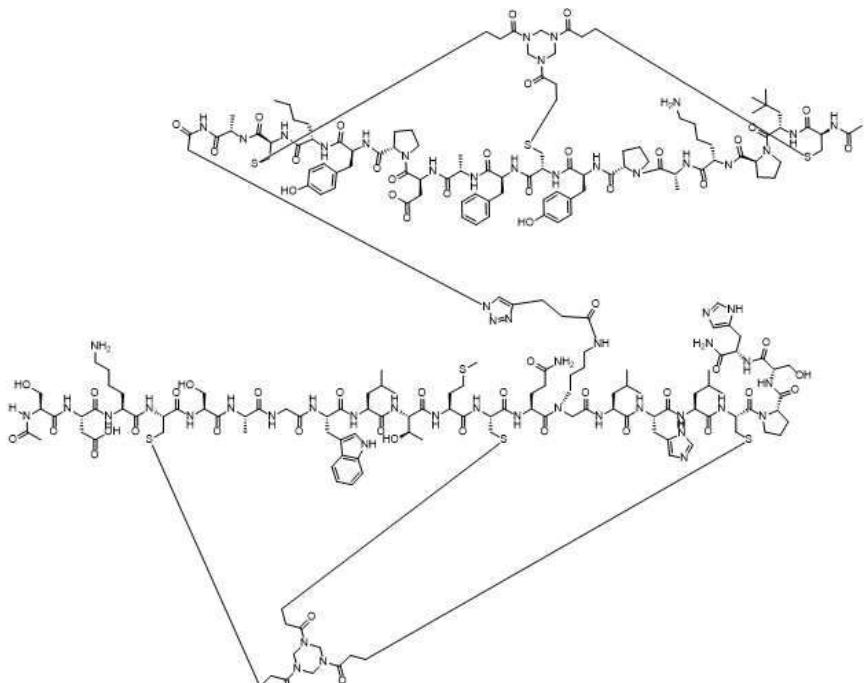
[0769]

[0770]

화합물 2(BCY10581의 제조 과정에 기재된 바와 같이 제조될 수 있음; 8.0 mg, 2.59 μmol , 1.0 eq) 및 BCY10861(8.0 mg, 2.95 μmol , 1.0 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 14.7 μl , 2.0 eq), VcNa(1.2 mg, 6.05 μmol , 2.0 eq) 및 THPTA(1.3 mg, 2.99 μmol , 1.0 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 펴징되었다. 반응 혼합물을 35°C에서 16시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 5437.26, 관측된 m/z: 1088.09([M/5H]⁺) 및 1360.19([M/4H]⁺)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고, BCY11019(7.6 mg, 1.36 μmol , 46.09% 수율, 96.95% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

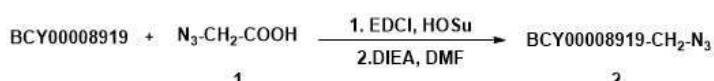
[0771]

BCY11376



[0772]

[0773]

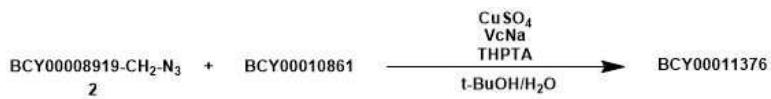


[0774]

[0775] DMF(1 mL) 중의 화합물 1(5.0 mg, 49.5 μ mol, 1.0 eq)의 용액에 EDCI(8.5 mg, 54.8 μ mol, 1.1 eq) 및 HOSu(5.7 mg, 49.5 μ mol, 1.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 30분 동안 교반하였다. TLC는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 하나의 새로운 스폷이 형성되었음을 가리켰다. 이어서 0.2 mL의 상기 혼합물에 BCY8919(20.0 mg, 9.62 μ mol) 및 DIEA(1.7 μ L, 9.62 μ mol)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8919가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 2162.51, 관측된 m/z : 1081.8($[M/2+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보았다. 이어서 반응 혼합물을 검압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 생성시킨 다음, 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(12 mg, 5.55 μ mol, 56.28% 수율, 97.54% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0776]

BCY11376의 제조 과정



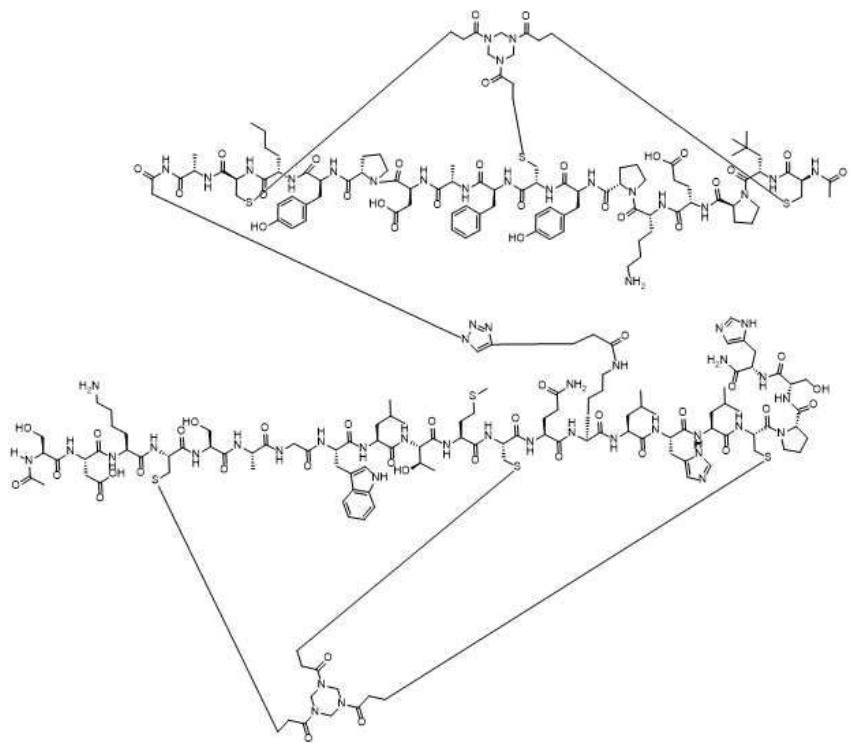
[0777]

[0778]

화합물 2(3 mg, 1.39 μmol , 1.0 eq), BCY10861(3.8 mg, 1.40 μmol , 1.0 eq) 및 THPTA(1.2 mg, 2.76 μmol 2.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 1 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 퍼징됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 3.5 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 3.5 μl , 1.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 BCY10861이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 4878.64, 관측된 m/z: 1220.8([M/4+H]⁺)]를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시키고, BCY11376(1.9 mg, 1.0 μmol , 27.01% 수율, 96.2% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0779]

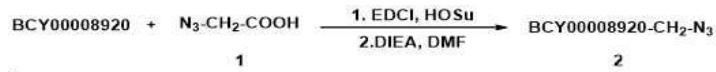
BCY11377



BCY00011377

[0780]

[0781] 화합물 2의 제조 과정



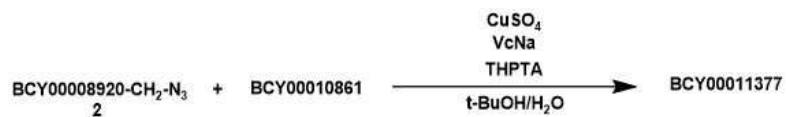
[0782]

[0783]

DMF(1 mL) 중의 화합물 1(5.0 mg, 49.5 μmol , 1.0 eq)의 용액에 EDCI(8.5 mg, 54.8 μmol , 1.1 eq) 및 HOSu(5.7 mg, 49.5 μmol , 1.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 25~30°C에서 30분 동안 교반하였다. TLC는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 하나의 새로운 스폷이 형성되었음을 가리켰다. 이어서 0.2 mL의 상기 혼합물을 BCY8920(20.0 mg, 9.36 μmol) 및 DIEA(1.2 mg, 9.36 μmol)를 가하였다. 혼합물을 25~30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8920이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 2220.54, 관측된 m/z : 1110.90($[\text{M}/2\text{H}]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 이어서 반응 혼합물을 감압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 생성시킨 다음, 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(12 mg, 5.15 μmol , 56.28% 수율, 95.3% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0784]

BCY11377의 제조 과정



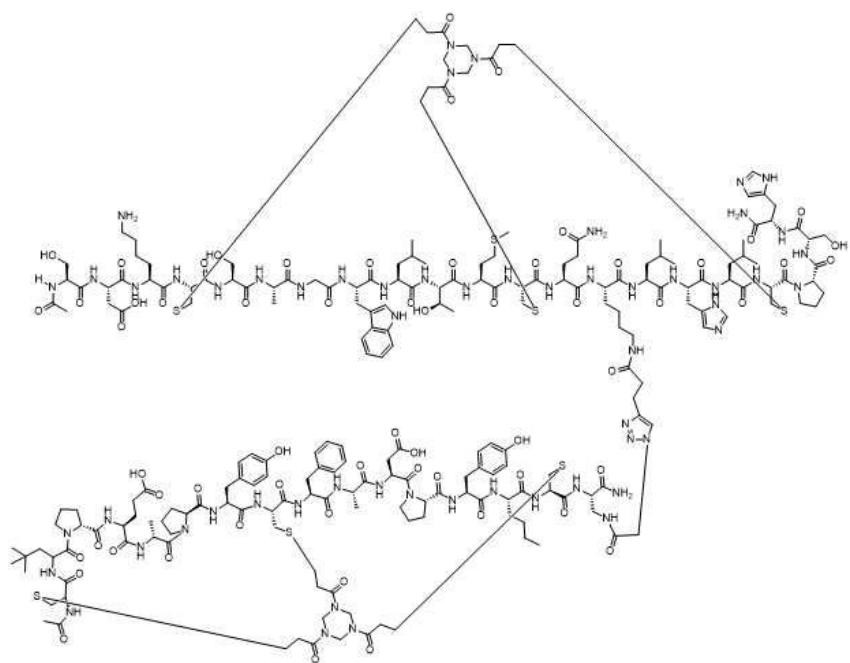
[0785]

[0786]

화합물 2(3 mg, 1.35 μmol , 1.0 eq), BCY10861(3.8 mg, 1.35 μmol , 1.0 eq) 및 THPTA(0.6 mg, 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 1 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 퍼짐됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 3.4 μL , 1 eq) 및 VcNa(0.4M, 3.4 μL , 1 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z (계산된 MW: 4936.68, 관측된 m/z : 1234.9($[\text{M}/4\text{H}]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 직접 정제시키고, BCY11377(3.5 mg, 0.66 μmol , 48.86% 수율, 93.1% 순

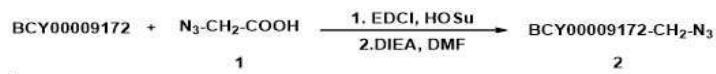
도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0787] BCY11378



BCY00011378

[0788] 화합물 2의 제조 과정



[0790]

[0791] DMF(1 mL) 중의 화합물 1(5.0 mg, 49.5 μmol , 1.0 eq)의 용액에 EDCI(8.5 mg, 54.8 μmol , 1.1 eq) 및 HO^{t-Bu}(5.7 mg, 49.5 μmol , 1.0 eq)를 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 30분 동안 교반하였다. TLC는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 하나의 새로운 스폷이 형성되었음을 가리켰다. 이어서 0.2 mL의 상기 혼합물을 BCY9172(20.0 mg, 9.54 μmol) 및 DIEA(1.7 μl , 9.62 μmol)에 가하였다. 혼합물을 25-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 화합물 1이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 2176.49, 관측된 m/z : 1090.0($[\text{M}/2\text{H}]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 이어서 반응 혼합물을 침압하에서 농축시켜 용매를 제거하고 잔사를 생성시킨 다음, 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시켰다. 화합물 2(20.2 mg, 7.48 μmol , 78.34% 수율, 80.57% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0792] BCY11378의 제조 과정

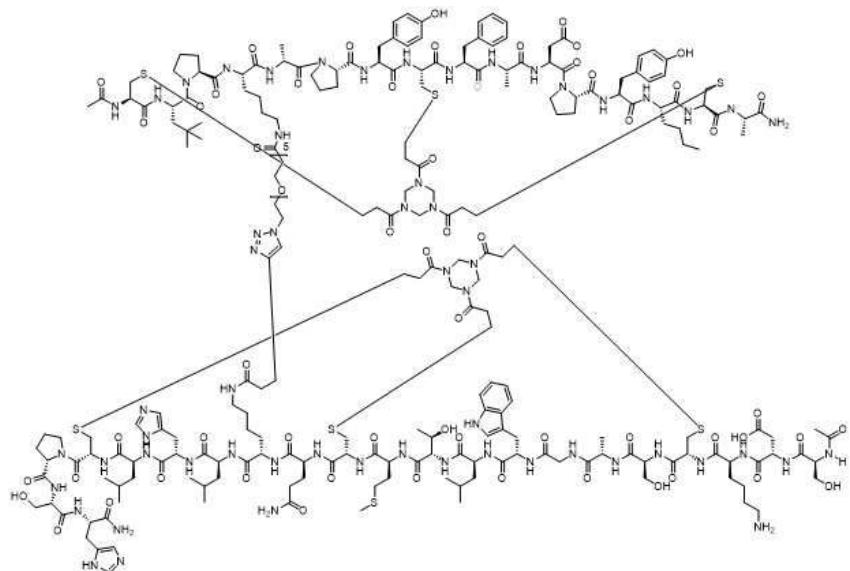


[0793]

[0794] 화합물 2(5 mg, 2.30 μmol , 1.0 eq), BCY10861(6.24 mg, 2.30 μmol , 1.0 eq) 및 THPTA(1.0 mg, 1.0 eq)의 혼합물을 t-BuOH/H₂O(1:1, 1 mL, 예비-탈기되고 N₂로 3회 펴짐됨)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 5.8 μl , 1.0 eq) 및 VcNa(0.4M, 5.8 μl , 1.0 eq)를 N₂ 하에서 가하였다. 상기 용액의 pH를 0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O 중의)의 적가에 의해 8로 조절하였으며, 용액이 밝은 황색으로 변하였다. 반응 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 3이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 4894.61, 관측된 m/z : 1224.3($[\text{M}/4\text{H}]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 여과하고 침압하에서 농축시켜 잔사를 제공하였다. 조 생성물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고, BCY11378(1.2 mg, 0.34 μmol , 10.07% 수율, 94.3% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0795]

BCY11379

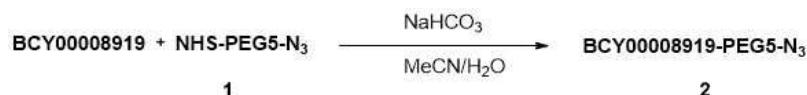


[0796]

BCY00011379

[0797]

BCY8919-PEG5-N₃의 제조 과정



[0798]

[0799] BCY8919(30.0 mg, 14.43 μ mol, 1.0 eq) 및 화합물 1(6.3 mg, 14.57 μ mol, 1.01 eq)을 MeCN(1 mL) 및 H₂O(1 mL)의 혼합물에 용해시켰다. 용액에 1M NaHCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하고, 이어서 혼합물을 35°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8919가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 2396.79, 관측된 m/z: 1198.74([M/2H]⁺) 및 799.50([M/4H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 화합물 2(20 mg, 8.07 μ mol, 55.92% 수율, 96.68% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0800]

BCY11379의 제조 과정

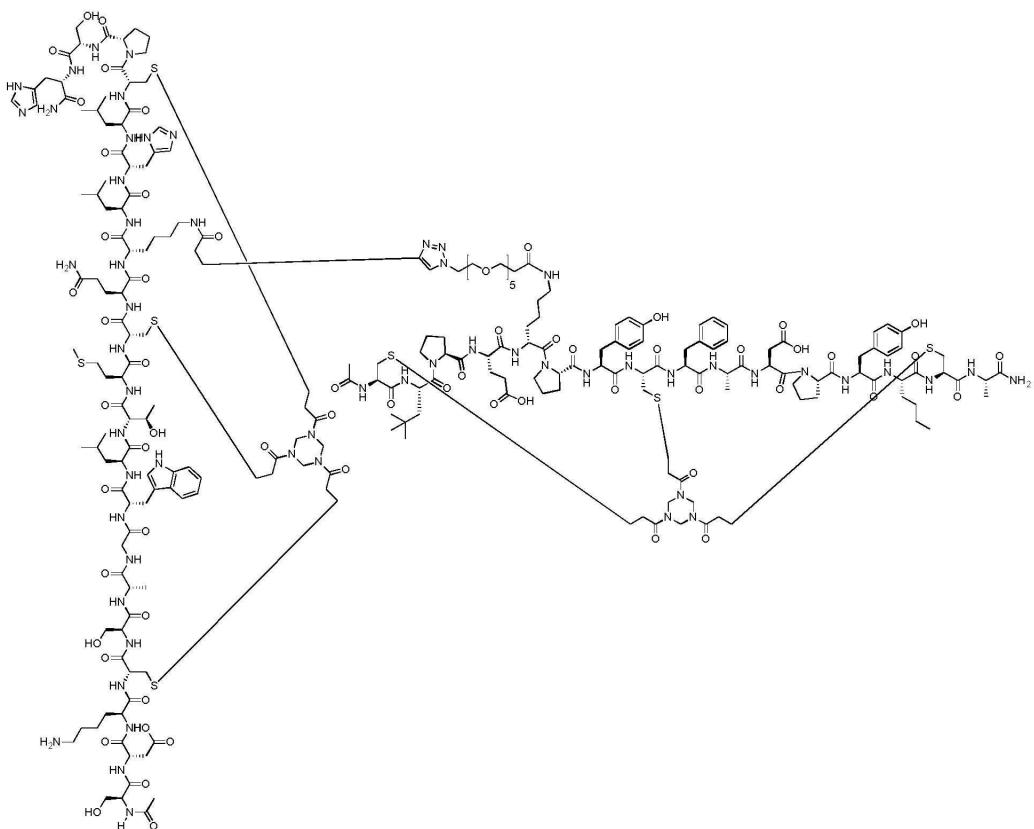


[0801]

[0802] 화합물 2(3.0 mg, 1.25 μ mol, 1.0 eq) 및 BCY10861(3.4 mg, 1.25 μ mol, 1.0 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 7 μ L, 2.24 eq), VcNa(1 mg, 5.04 μ mol, 4.03 eq) 및 THPTA(1 mg, 2.30 μ mol, 1.84 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 페징되었다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 16시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 5112.93 관측된 m/z: 1022.96([M/5H]⁺) 및 1278.74([M/4H]⁺))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고, BCY11379(3.4 mg, 0.615 μ mol, 52.00% 수율, 97.88% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0803]

BCY11380

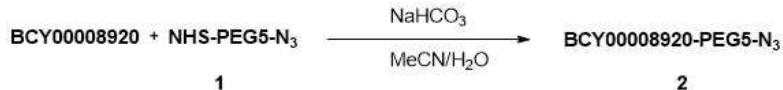


BCY00011380

[0804]

[0805]

BCY8920-PEG5-N₃의 제조 과정



[0806]

[0807]

BCY8920(30.0 mg, 14.04 μ mol, 1.0 eq) 및 화합물 1(6.1 mg, 14.11 μ mol, 1.01 eq)을 MeCN(1 mL) 및 H_2O (1 mL)의 혼합물에 용해시켰다. 용액에 1M $NaHCO_3$ 를 가하여 pH를 8로 조절하고, 이어서 혼합물을 35°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY8920이 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z (계산된 MW: 2454.83, 관측된 m/z : 1227.63($[M/2+H]^+$) 및 818.66($[M/3+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 화합물 2(20 mg, 8.03 μ mol, 57.21% 수율, 98.56% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0808]

BCY11380의 제조 과정



[0809]

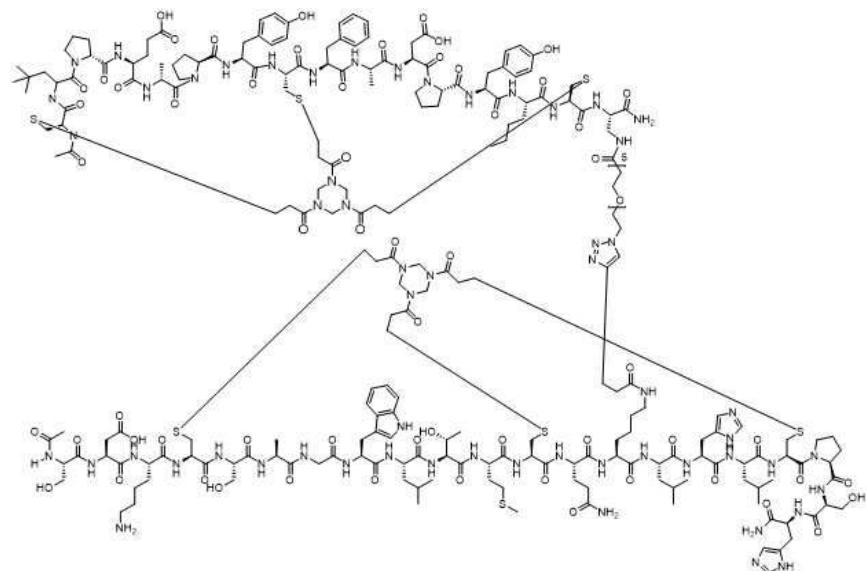
[0810]

화합물 2(3.5 mg, 1.43 μ mol, 1.0 eq) 및 BCY10861(3.9 mg, 1.44 μ mol, 1.0 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/H₂O(1:1)에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 8 μ L, 2.24 eq), VcNa(1 mg, 5.04 μ mol, 3.52 eq) 및 THPTA(1 mg, 2.30 μ mol, 1.61 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 페징되었다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 16시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 화합물 2가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 5170.97, 관측된 m/z:

1034.28($[M/5+H]^+$) 및 1293.10($[M/4+H]^+$)를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고, BCY11380(1.6 mg, 0.296 μmol , 20.77% 수율, 96.77% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

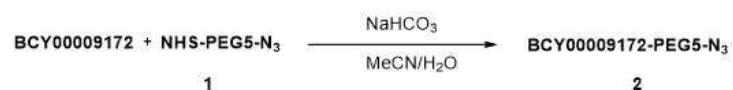
[0811]

BCY11381



[0812]

[0813]

BCY8920-PEG5-N₃의 제조 과정

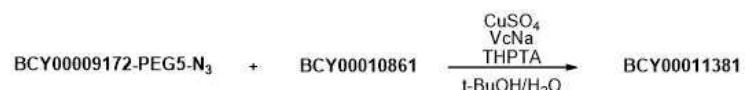
[0814]

[0815]

BCY9172(30.0 mg, 14.32 μmol , 1.0 eq) 및 화합물 1(6.2 mg, 14.34 μmol , 1.0 eq)을 MeCN(1 mL) 및 $\text{H}_2\text{O}(1 \text{ mL})$ 의 혼합물에 용해시켰다. 용액에 1M NaHCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하고, 이어서 혼합물을 35°C에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS는 BCY9172가 완전히 소멸되었고 목적하는 m/z(계산된 MW: 2412.75, 관측된 m/z: 1206.72($[M/2+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고 화합물 2(15 mg, 6.14 μmol , 42.87% 수율, 98.75% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0816]

BCY11381의 제조 과정



[0817]

[0818]

화합물 2(3.0 mg, 1.24 μmol , 1.0 eq) 및 BCY10861(3.4 mg, 1.25 μmol , 1.01 eq)를 먼저 2 mL의 t-BuOH/ $\text{H}_2\text{O}(1:1)$ 에 용해시키고, 이어서 CuSO₄(0.4M, 7 μl , 2.25 eq), VcNa(1 mg, 5.04 μmol , 4.06 eq) 및 THPTA(1 mg, 2.30 μmol , 1.85 eq)를 가하였다. 최종적으로 1M NH₄HCO₃를 가하여 pH를 8로 조절하였다. 여기에서 모든 용매는 탈기되고 N₂로 3회 펴징되었다. 반응 혼합물을 25-30°C에서 16시간 동안 N₂ 분위기하에서 교반하였다. LC-MS는 목적하는 m/z(계산된 MW: 5128.89, 관측된 m/z: 1026.05($[M/5+H]^+$) 및 1282.50($[M/4+H]^+$))를 갖는 하나의 주 피크가 검출되었음을 보였다. 반응 혼합물을 예비-HPLC(TFA 조건)에 의해 정제시키고, BCY11381(1.6 mg, 0.295 μmol , 23.73% 수율, 94.59% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0819]

실시예 5: CD137 단클론 항체 작용제의 생성

[0820]

본원에 제공된 실험에서 CD137 다양체와의 비교에 사용된 CD137 단클론 항체 작용제의 서열은 미국특허 제7,288,638 호에 개시되었다. IgG4 아이소타입 항체를 DNA 발현 구조물의 일시적인 형질감염에 따라 Exp iCHO 발

현 시스템(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 발현시켰다. 항체를 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제시키고 포스페이트-완충된 용액(PBS) pH 7.2에서 제형화하였다. HPLC-SEC(컬럼 GF-250, Agilent)를 사용한 순도 분석은 CD137 단클론 항체의 단량체 비율이 대략 95%임을 가리켰다. 결합 활성 분석은 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 초과의 농도를 갖는 CD137 단클론 항체가 CD137을 발현하는 CHO 세포에 결합할 수 있음을 가리켰다. 특신센서(ToxinSensor)TM 발색성 LAL 내독소 분석 키트(Genscript)를 사용한 내독소 분석은 CD137 단클론 항체 제제가 <7 EU/mg의 내독소를 함유함을 가리켰다.

[0821] 생물학적 데이터

1. CD137 비아코어 실험 설명

[0823] 비아코어(Biacore) 실험을 수행하여 인간 CD137 단백질에 결합하는 헤테로坦덤 펩티드의 k_a ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), k_d (s^{-1}), K_D (nM) 값을 측정하였다. 재조합 인간 CD137(R&D systems)을 EZ-LinkTM 설포-NHS-LC-LC-비오틴 시약(Thermo Fisher)을 제조사가 제시한 프로토콜에 따라 사용하여 PBS 중에 재현시키고 비오틴화시켰다. 단백질을 PBS내로 회전 컬럼을 사용하여 탈염시켜 결합되지 않은 비오틴을 제거하였다.

[0824] 단백질 결합 분석을 위해서, XanTec CMD500D 칩을 갖는 비아코어 T200 또는 비아코어 3000 장치를 사용하였다. 스트렙트아비딘을, 러닝 완충제로서 HBS-N(10 mM HEPES, 0.15M NaCl, pH 7.4)으로 25°C에서 표준 아민-결합 화학을 사용하여 칩상에 고정화시켰다. 간단히, 카복시메틸 텍스트란 표면을 10 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 0.4M 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)/0.1M N-하이드록시 숙신이미드(NHS)의 1:1 비의 7분 주입으로 활성화시켰다. 스트렙트아비딘의 포획을 위해서, 단백질을 10 mM 나트륨 아세테이트(pH 4.5) 중에서 0.2 mg/mL로 회석하고 120 μl 를 활성화된 칩 표면상에 주입하여 포획하였다. 잔여 활성화기를 1M 에탄올아민(pH 8.5)의 7분 주입으로 차단하고 비오틴화된 CD137을 270-1500 RU의 수준으로 포획하였다. 완충제를 PBS/0.05% 트윈 20으로 교환하고 펩티드의 연속 회석률을 0.5%의 최종 DMSO 농도로 상기 완충제 중에서 제조하였다. 펩티드 정상 농도는 6회의 추가의 2-배 또는 3-배 회석으로 500 nM이었다. SPR 분석을 60초 결합 및 900 초 해리와 함께 25°C에서 90 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 실행하였다. 각 주기 후에 재생 단계(10 μl 의 10 mM 글리신 pH 2)를 사용하였다. 데이터를 필요에 따라 DMSO 제외된 부피 영향에 대해 보정하였다. 모든 데이터를 표준 처리 과정을 사용하여 블랭크 주입 및 참조 표면에 대해 이중-참조하였으며 스크러버(Scrubber) 소프트웨어, 버전 2.0c(BioLogic Software)를 사용하여 데이터 처리 및 동역학 피팅을 수행하였다. 데이터를 적합한 경우 질량이 송 효과를 허용하는 간단한 1:1 결합 모델을 사용하여 피팅하였다.

[0825] 몇몇 헤�테로坦덤 펩티드를 상기 분석에서 시험하였으며 결과를 하기 표 1에 나타낸다.

표 1

헤테로坦덤 펩티드에 대한 CD137 비아코어 분석 데이터

복합체 ID	SPR (K_D)(nM)
BCY9173	7.98
BCY7985	143
BCY8942	853
BCY8943	156
BCY9647	206
BCY9648	202
BCY9655	199
BCY9656	159
BCY9657	256
BCY9658	152
BCY9659	88.1
BCY9758	189
BCY8854	108
BCY9350	69.4
BCY9351	3640
BCY9399	73
BCY9400	53
BCY9408	105

BCY9409	97.7
BCY9410	65.8
BCY9411	71.1
BCY9759	44.3
BCY10000	6.19
BCY10571	12.03
BCY10572	5.00
BCY10573	3.39

2. 넥틴-4 비아코어 실험 설명

[0828] 비아코어 실험을 수행하여 인간 넥틴-4 단백질(Charles River로부터 수득됨)에 결합하는 헤테로랜덤 웨티드의 k_a ($M^{-1} s^{-1}$), k_d (s^{-1}), K_D (nM) 값을 측정하였다.

[0829] gp67 신호 서열 및 C-말단 FLAG 태그를 갖는 인간 넥틴-4(잔기 Gly32-Ser349; NCBI RefSeq: NP_112178.2)를 표준 Bac-to-BacTM 프로토콜(Life Technologies)을 사용하여 제조된 pFastbac-1 및 바클로바이러스내에 클로닝하였다. Excell-420 배지(Sigma) 중의 1×10^6 ml^{-1} 의 Sf21 세포를 27°C에서 P1 바이러스 스톡으로 2의 MOI로 감염시키고 72시간째에 상등액을 수확하였다. 상등액을 PBS 중에서 세척된 Anti-FLAG M2 친화성 아가로스 수지(Sigma)와 함께 4°C에서 1시간 동안 배치 결합시키고 후속적으로 수지를 걸럼으로 옮기고 PBS로 광범위 세척하였다. 단백질을 $100 \mu g/ml$ FLAG 웨티드로 용출시켰다. 용출된 단백질을 2 ml로 농축시키고 PBS 중의 S-200 슈퍼렉스 걸럼(GE Healthcare)상에 1 ml/분으로 로딩하였다. 2 ml 분획을 수집하고 넥틴-4 단백질을 함유하는 분획을 16 mg/ml로 농축시켰다.

[0830] 단백질을 EZ-LinkTM 설포-NHS-LC-LC-비오틴 시약(Thermo Fisher)을 제조사가 제시한 프로토콜에 따라 사용하여 PBS 중에서 무작위로 비오틴화시켰다. 단백질을 PBS내로 회전 걸럼을 사용하여 탈염시켜 결합되지 않은 비오틴을 제거하였다.

[0831] 단백질 결합 분석을 위해서, CM5 칩(GE Healthcare)을 갖는 비아코어 3000 장치를 사용하였다. 스트렙트아비딘을, 러닝 완충제로서 HBS-N(10 mM HEPES, 0.15M NaCl, pH 7.4)으로 25°C에서 표준 아민-결합 화학을 사용하여 칩상에 고정화시켰다. 간단히, 카복시메틸 텍스트란 표면을 $10 \mu l$ /분의 유량으로 0.4M 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)/0.1M N-하이드록시 숙신이미드(NHS)의 1:1 비의 7분 주입으로 활성화시켰다. 스트렙트아비딘의 포획을 위해서, 단백질을 10 mM 나트륨 아세테이트(pH 4.5) 중에서 0.2 mg/ml로 희석하고 $120 \mu l$ 의 스트렙트아비딘을 활성화된 칩 표면상에 주입하여 포획하였다. 잔여 활성화기를 1M 에탄올아민(pH 8.5)의 7분 주입으로 차단하고 비오틴화된 넥틴-4를 1,200-1,800 RU의 수준으로 포획하였다. 완충제를 PBS/0.05% 트윈 20으로 교환하고 웨티드의 연속 희석물을 0.5%의 최종 DMSO 농도로 상기 완충제 중에서 제조하였다. 웨티드 정상 농도는 6회의 추가의 2-배 희석으로 100 nM이었다. SPR 분석을 60초 결합 및 개별적인 웨티드에 따라 400 내지 1,200초 해리와 함께 25°C에서 $50 \mu l$ /분의 유량으로 실행하였다. 데이터를 DMSO 제외된 부피 영향에 대해 보정하였다. 모든 데이터를 표준 처리 과정을 사용하여 블랭크 주입 및 참조 표면에 대해 이중-참조하였으며 스크러버 소프트웨어, 버전 2.0c(BioLogic Software)를 사용하여 데이터 처리 및 동역학 피팅을 수행하였다. 데이터를 적합한 경우 질량이송 효과를 허용하는 간단한 1:1 결합 모델을 사용하여 피팅하였다.

[0832] 본 발명의 몇몇 헤�테로랜덤 웨티드를 상기 언급한 넥틴-4 결합 분석에서 시험하였으며 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

표 2

헤테로랜덤 웨티드에 대한 넥틴-4 비아코어 분석 데이터

복합체 ID	SPR K_D (nM)
BCY8854	2.76
BCY9350	> 200 nM
BCY9351	2.47
BCY9399	1.67
BCY9400	1.8

BCY9408	1.57
BCY9409	1.66
BCY9410	1.49
BCY9411	1.48
BCY9759	2.14
BCY10000	2.26

3. EphA2 비아코어 실험 설명

[0835] 비아코어 실험을 수행하여 인간 EphA2 단백질에 결합하는 헤테로랜덤 펩티드의 k_a ($M^{-1} s^{-1}$), k_d (s^{-1}), K_D (nM) 값을 측정하였다.

[0836] EphA2를 단백질당 3x 몰 과잉의 비오틴으로, 4 mM 나트륨 아세테이트, 100mM NaCl, pH 5.4 중에서 1시간 동안 EZ-LinkTM 설포-NHS-LC-비오틴으로 비오틴화시켰다. 표지화 정도를 PBS 내로 반응 혼합물 투석후 형광 비오틴 정량분석 키트(Thermo)를 사용하여 측정하였다. 펩티드 결합 분석을 위해서, XanTec CMD500D 칩을 갖는 비아코어 T200 장치를 사용하였다. 스트렙트아비딘을, 러닝 완충제로서 HBS-N(10 mM HEPES, 0.15M NaCl, pH 7.4)으로 25 °C에서 표준 아민-결합 화학을 사용하여 칩상에 고정화시켰다. 간단히, 카복시메틸 텍스트란 표면을 10 μ l/분의 유량으로 0.4M 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)/0.1M N-하이드록시 속신이미드(NHS)의 1:1 비의 7분 주입으로 활성화시켰다. 스트렙트아비딘의 포획을 위해서, 단백질을 10 mM 나트륨 아세테이트(pH 4.5) 중에서 0.2 mg/ml로 희석하고 120 μ l를 활성화된 칩 표면상에 주입하여 포획하였다. 잔여 활성화기를 1M 에탄올아민(pH 8.5):HBS-N(1:1)의 7분 주입으로 차단하였다. 완충제를 PBS/0.05% 트윈 20으로 교환하고 비오틴화된 EphA2를 완충제 중의 0.2 μ M로의 단백질 희석을 사용하여 500-1500 RU의 수준으로 포획하였다. 펩티드의 연속 희석물을 0.5%의 최종 DMSO 농도로 상기 완충제 중에서 제조하였으며, 이때 펩티드 정상 농도는 6회의 추가의 2-배 희석으로 50 또는 100nM이었다. SPR 분석을 60초 결합 및 900-1200초 해리와 함께 25 °C에서 90 μ l/분의 유량으로 실행하였다. 데이터를 DMSO 제외된 부피 영향에 대해 보정하였다. 모든 데이터를 표준 처리 과정을 사용하여 블랭크 주입 및 참조 표면에 대해 이중-참조하였으며 스크러버 소프트웨어, 버전 2.0c(BioLogic Software)를 사용하여 데이터 처리 및 동역학 피팅을 수행하였다. 데이터를 적합한 경우 질량이 송 효과를 허용하는 간단한 1:1 결합 모델을 사용하여 피팅하였다.

[0837] 본 발명의 몇몇 헤테로랜덤 펩티드를 EphA2 결합 분석에서 시험하였으며 결과를 하기 표 3에 나타낸다.

표 3

헤테로랜덤 펩티드에 대한 EphA2 비아코어 분석 데이터

복합체 ID	SPR K_D (nM)
BCY9173	2.1
BCY7985	2
BCY8942	1.7
BCY8943	> 200 nM
BCY9647	1.69
BCY9648	1.75
BCY9655	1.33
BCY9656	0.75
BCY9657	1.1
BCY9658	1.9
BCY9659	1.03
BCY9758	1.5

4. 종양 세포와의 공-배양 CD137 리포터 분석

[0840] R1 배지라 지칭되는 배양 배지를, RPMI-1640(프로메가(Promega) 키트 CS196005의 성분)에 1% FBS를 가하여 제조한다. R1에서의 시험 항목의 일련의 희석물을 멸균 96 웰-플레이트에서 제조한다. 백혈구 배양 플레이트 중의 지정된 웰에 웰당 25 μ l의 시험 항목 또는 R1(배경 대조용으로서)을 사용한다. 종양 세포^{*}를 수확하고 R1 배지

에 400,000 세포/ mL 의 농도로 재현탁한다. 25 μl /웰의 종양 세포를 백혈구 배양 플레이트에 사용한다. 주르캣 세포(프로메가 키트 CS196005, 0.5 mL)를 수육에서 해동시키고 이어서 5 mL 의 예온된 R1 배지에 가한다. 25 μl /웰의 주르캣 세포를 백혈구 배양 플레이트에 사용한다. 세포 및 시험 항목을 37°C, 5% CO₂에서 6h 동안 배양한다. 6h의 끝에서, 75 μl /웰의 Bio-GloTM (Promega)를 가하고 플레이트 판독기(Clariostar, BMG)에서 발광을 판독하기 전에 10분간 배양한다. 세포(주르캣 세포 + 공-배양에 사용된 세포주)에 대한 변화 배수를 계산하고 로그(작용제) 대 반응으로서 그래프패드 프리즘에서 플롯팅하여 EC50(nM) 및 배경(Max)에 대한 유도 배수를 측정한다.

[0841] 공-배양에 사용된 종양 세포 유형은 하기 표 4에 나타낸 바와 같이 헤테로坦덤에 특이적인 종양 표적에 따라 변한다.

표 4

각각의 종양 표적에 사용된 세포주

종양 표적	공-배양에 사용된 세포주
EphA2	A549, SC-OV-3, PC3, LNCaP
넥틴-4	HT1376, NCI-H292
PD-L1	RKO

[0843] EphA2-CD137 헤테로坦덤 BCY7985가 EphA2-발현 HT1080 세포의 존재하에 프로메가 CD137 루시페라제 리포터 분석에서 CD137 세포 활성의 강한 유도를 보였음을 나타내는 데이터를 도 3에 제공한다. HT1080 세포의 부재하에서 헤테로坦덤에 의한 CD137 유도는 존재하지 않는다.

[0844] EphA2/CD137 헤테로坦덤이 CD137 리포터 분석에서 강한 CD137 활성화를 유도하고 활성화 유도 배수는 공-배양에 사용된 세포주상에서의 종양 표적 발현 수준(A549 및 SC-OV-3:EphA2 고 및 LNCaP:EphA2 저)에 의존함을 나타내는 데이터를 도 4에 제공한다.

[0845] 넥틴-4/CD137 헤테로坦덤이 CD137 리포터 분석에서 강한 CD137 활성화를 유도하고 활성화 유도 배수는 공-배양에 사용된 세포주상에서의 종양 표적 발현 수준(HT1376:넥틴-4 고 및 NCI-H292:넥틴-4 중간)에 의존함을 나타내는 데이터를 도 6에 제공한다.

[0846] PD-L1/CD137 헤테로坦덤이 PD-L1 발현 세포주의 존재하에 CD137 리포터 분석에서 CD137의 강한 활성화를 유도함을 나타내는 데이터를 도 9에 제공한다. 상이한 세포주와의 공-배양에서 CD137 리포터 분석에서 헤테로坦덤 웹티드에 의해 유도된 EC50(nM) 및 유도 배수의 요약을 하기 표 5에 보고한다:

표 5

CD137 리포터 분석에서 헤테로坦덤 웹티드에 의해 유도된 유도 배수

복합체 ID	종양 표적	공배양에 사용된 세포주	EC50 (nM)	배경에 대한 유도배수
BCY9173	EphA2	SC-OV-3	0.94	21
BCY7985	EphA2	SC-OV-3	4.0	15
BCY8942	EphA2	PC3	-	100 nM에서 <2배 유도
BCY8943	EphA2	PC3	-	100 nM에서 <2배 유도
BCY9647	EphA2	SC-OV-3	7.2	24
BCY9648	EphA2	SC-OV-3	9.3	20
BCY9655	EphA2	SC-OV-3	4.1	6
BCY9656	EphA2	SC-OV-3	1.1	3
BCY9657	EphA2	SC-OV-3	9.0	26
BCY9658	EphA2	SC-OV-3	6.2	11
BCY9659	EphA2	SC-OV-3	9.9	7
BCY9758	EphA2	SC-OV-3	1.2	7
BCY10568	EphA2	PC3	0.25	32
BCY10570	EphA2	PC3	0.41	38
BCY10574	EphA2	PC3	1.0	32

BCY10575	EphA2	PC3	0.62	38
BCY10576	EphA2	PC3	0.51	38
BCY10577	EphA2	PC3	0.28	37
BCY8854	넥틴4	H1376	1.2	30
BCY9350	넥틴4	H1376	-	100 nM에서 <2배 유도
BCY9351	넥틴4	H1376	-	100 nM에서 <2배 유도
BCY9399	넥틴4	H1376	11	13
BCY9400	넥틴4	H1376	2.9	13
BCY9401	넥틴4	H1376	18	70
BCY9407	넥틴4	H1376	3.4	29
BCY9408	넥틴4	H1376	1.1	20
BCY9409	넥틴4	H1376	1.2	24
BCY9410	넥틴4	H1376	1.3	24
BCY9411	넥틴4	H1376	14	41
BCY9759	넥틴4	H1376	2.7	15
BCY10000	넥틴4	H1376	0.58	61
BCY10567	넥틴4	H1376	1.7	45
BCY10569	넥틴4	H1376	1.2	52
BCY10571	넥틴4	H1376	3.5	60
BCY10572	넥틴4	H1376	0.44	55
BCY10573	넥틴4	H1376	0.90	55
BCY10578	넥틴4	H1376	0.42	58
BCY10917	넥틴4	H1376	0.27	54
BCY11020	넥틴4	H1376	0.26	47
BCY11373	넥틴4	H1376	0.16	74
BCY11374	넥틴4	H1376	0.091	72
BCY11375	넥틴4	H1376	0.23	72
BCY8939	마우스 PD-L1	MC38	-	100 nM에서 <2배 유도
BCY10580	PD-L1	RKO	28	3
BCY10581	PD-L1	RKO	18	6
BCY10582	PD-L1	RKO	28	4
BCY11017	PD-L1	RKO	66	4
BCY11018	PD-L1	RKO	27	7
BCY11019	PD-L1	RKO	18	6
BCY11376	PD-L1	RKO	127	9
BCY11377	PD-L1	RKO	40	6
BCY11378	PD-L1	RKO	80	3
BCY11379	PD-L1	RKO	68	6
BCY11380	PD-L1	RKO	34	7
BCY11381	PD-L1	RKO	105	7

5. 1차 인간 T 세포-A549 공-배양(종양 세포 사멸)

PBMC를 3명의 건강한 공여자로부터 단리하고 2개 농도의 항-CD3 자극의 존재하에서 2개의 한정된 비로 뉴클라이트 레드(Nuclight Red) 표지된 종양 표적 세포(인간 폐암종 세포 A549[®], ATCC CLL-185TM)에 가하였다. 종양 세포: PBMC 공-배양물을 3개의 농도로 리드 비사이클과 배양하였다. 모든 시험 조건을 또한 직접적인 종양 세포 세포독성을 검출하기 위해서 자극된 PBMC의 부재하에서 종양 세포 상에 도말하였다. 종양 사멸을 시간에 따른 생육성 뉴클라이트 레드 양성 종양 세포를 카운트함으로써 평가하였다. 또한, 카스파제 3/7 염료를 사용하여 세포사멸 종양 세포를 식별하였다. 배양물을, 실시간 생 세포 형광 영상화를 허용하는 인큐사이트(Incucyte) S3 기계를 사용하여 분석하였다. 공-배양물을 72시간 동안 영상화하였다. 각각의 조건을 3회 중복하여 확립시켰다.

EphA2/CD137 혜테로坦덤이 1차 인간 T-세포 및 암세포 공-배양 분석에서 종양 세포 사멸을 유도함을 입증하는 데이터를 도 5에 제공한다. 항-CD137 mAb 작용제를 대조용으로서 사용한다.

6. 인간 PBMC-4T1 공-배양(사이토카인 방출) 분석

마우스 유선 종양 세포주 4T1-1(4T1-모) 및 쥐 넥틴-4 과발현 4T1(4T1-D02)을, 10% 엘-불활성화된 소 태아

혈청, 100 I.U./ml 페니실린 및 100 I.U./스트렙토마이신, 20 mM HEPES, 1X 불필수 아미노산, 및 2 mM L-글루타민(RPMI 실행 배지)이 보충된 RPMI1640에서 배양하였다. 건강한 인간 공여자로부터의 동결된 PBMC를 해동시키고 실온 PBS 중에서 1회 세척하고, 이어서 RPMI 실행 배지에 재현탁시켰다. 종양 세포 및 PBMC 공-배양을 위해서, 10000 PBMC 및 2000 종양 세포(5:1)를 혼합하고 384 웰 플레이트의 각 웰에 도말하였다. 인간 PBMC를 자극하기 위해서, 125 ng/ml의 용해성 항-CD3 mAb(클론 OKT3)를 0일째에 배양물에 가하였다. 시험, 대조용 화합물 또는 비히를 대조용을 각각의 웰에 가하고 웰당 최종 부피를 100 ul로 만들었다. 플레이트를 3일이하 동안 5% CO₂가 있는 37°C 세포 배양 배양기에서 배양하였다. 상등액을 자극 후 48시간째에 수집하고, 인간 IL-2 및 IFN-γ를 HTRF 분석을 사용하여 검출하였다. 원 데이터를 엑셀 또는 프리즘 소프트웨어를 사용하여 분석하여 표준 곡선을 생성시켜 단백질 농도를 보간하였다. 데이터는 실험 복제물에서 시험된 3개의 상이한 공여자 PBMC에 대한 하나의 연구를 나타낸다.

[0853] 도 7에 제공된 데이터는 넥틴-4/CD137 혜테로텐덤이 PBMC-4T1 공-배양 분석에서 확고한 IL-2 및 IFN-γ 사이토카인 분비를 유도함을 입증한다. BCY9350 및 BCY9351은 각각 넥틴-4 및 CD137에 대한 비-결합 대조용이다.

[0854] 인간 PBMC-4T1 공-배양(사이토카인 방출) 분석에서 선택된 넥틴-4/CD137 혜테로텐덤 펩티드에 의해 유도된 EC50(nM) 및 최대 IFN-γ 사이토카인 분비(pg/ml)의 요약을 하기 표 6에 보고한다:

표 6

[0855] 인간 PBMC-4T1 공-배양(사이토카인 방출) 분석에서 선택된 넥틴-4/CD137 혜테로텐덤 펩티드에 의해 유도된 EC50 및 최대 IFN-γ 사이토카인 분비

복합체 ID	세포주	EC50 (nM)	max IFN-γ (pg/ml)
BCY8854	4T1-D02(넥틴4+)	0.89	15962
BCY9350	4T1-D02(넥틴4+)	-	1 μM 까지 활성 없음
BCY9351	4T1-D02(넥틴4+)	-	1 μM 까지 활성 없음
BCY10000	4T1-D02(넥틴4+)	0.21	19642
BCY10571	4T1-D02(넥틴4+)	0.44	18349
BCY10572	4T1-D02(넥틴4+)	0.25	17915

7. 생체외 배양 프로토콜

[0857] Discovery Life Sciences(DLS)로부터의 1차 환자 유래된 종양 세포를 벤조나제가 신선하게 첨가된 10 ml의 예온된 세척 배지에서 서서히 해동시킨다. Greiner로부터의 3D 스페로이드 키트(cat#655840)를 사용하여 배양물 중에서 세포를 2일간 유지시킨다. 간단히, 종양 세포를 혈구계를 사용하여 트립판 블루로 카운트한다. 세포를 1500 rpm에서 5분간 원심분리시켜 세척하고, 펠럿을 100 μl/1x10⁶ 세포 N3D 나노셔틀에 재현탁시킨다. 상기를 자성으로 만들기 위해서, 세포를 1500 rpm에서 5분간 회전시키고 재현탁시키고; 상기 과정을 총 4회 반복한다. 최종 회전 후에, 세포를 적합한 양의 신선한 폐 DTC 배지(DLS)에 재현탁시켜 100 μl/웰 중에 웰당 50,000-100,000 세포를 제공한다. Greiner 세포-반발성의 96-웰 플레이트(cat#655976)를 상기 실험에 사용한다. 세포 덩어리 또는 찌꺼기를 볼 수 있는 경우, 샘플을 도말 전에 70-100 μm 필터에 적용한다. 샘플당 적어도 50,000 세포를 제0일 유식 세포측정 패널용으로 남겨두고, 상기 세포를 염색하고, 고정시키고, 나중의 유식 분석을 위해 4°C에서 보관한다. 대조용/시험 화합물 희석물을 폐 DTC 배지에서 2X로 별도의 플레이트에서 제조하고, 100 μl/웰의 상기 2X 약물 용액을 플레이트 맵에 의해 기재된 바와 같이 웰에 가한다. 이어서 분석 플레이트를 37°C, 5% CO₂의 가습 챔버에서 96-웰 자기 스페로이드 드라이브상에 놓는다. 24h째에, 자기 스페로이드 드라이브를 제거한다. 48h째에, 배지를 사이토카인 분석을 위해 수집하고 세포를 제2일 유식 세포측정 패널용으로 수집한다. 사이토카인을 루미넥스(Luminex) 판독기상에서, R&D 시스템스로부터 주문-제작된 사이토카인/케모카인 패널(IP-10, 그랜자임(Granzyme) B, IFN-γ, IL-2, IL-6, TNF-α, IL-8, MIP-1a, MIP-1b, MCP-1, IL-10, MIG)을 사용하여 정량분석한다. 유식 패널: 제0일 = 생/사, CD45, EpCAM, 넥틴4, CD3, CD4, CD8, CD137; 제2일 = 생/사, CD45, EpCAM, Nectin4, CD3, CD8, Ki67, 및 카운팅 비드. 유식 데이터를 플로우조(Flowjo) 소프트웨어로 분석한다.

[0858] 넥틴-4/CD137 혜테로텐덤이 1차 환자-유래된 폐 종양의 생체외 배양물에서 표적 의존적인 사이토카인 방출을 유도함을 입증하는 데이터를 도 8에 나타낸다. BCY10572의 처리는 다수의 면역 마커(비히를에 대해 표준화된) 및

환자-유래된 샘플 중의 $\%CD8^+ki67^+T$ 세포에서 넥틴-4 의존적인 변화를 유도하였다.

8. SD 래트에서 CD137 이중특이성의 약동학

수컷 SD 래트에게 25mM 히스티딘-HCl, 10% 슈크로스 pH 7 중에서 제형화된 2 mg/kg의 각각의 비사이클 다량체를 투여하였다. 일련의 출혈(약 80 μl 혈액/시점)을 각각의 시점에서 턱밀 또는 복제 정맥을 통해 수행하였다. 모든 혈액 샘플을 바로 항-응고제로서 2 μl K2-EDTA(0.5M)를 함유하는 예냉된 미세원심분리 투브로 옮기고 젖은 얼음상에 놓았다. 혈액 샘플을 대략 4°C, 3000 g에서 원심분리에 의해 혈장에 대해 즉시 처리하였다. 내부 표준을 포함하는 침전제를 혈장에 바로 가하고, 잘 혼합하고 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리시켰다. 상등액을 예비-표지된 폴리프로필렌 미세원심분리기 투브로 옮기고, 이어서 마른 얼음상에서 급속-동결시켰다. 샘플을 분석시까지 필요에 따라 70°C 이하에서 보관하였다. 7.5 μl 의 상등액 샘플을, 양이온 모드로 오르비트랩(Orbitrap) Q 이그잭티브(Exactive)를 사용하여 LC-MS/MS 분석을 위해 직접 주입하였다. 혈장 농도 대 시간 데이터를 피닉스 윈놀린(Phoenix WinNonlin) 6.3 소프트웨어 프로그램을 사용하여 비-구획 접근법에 의해 분석하였다. CO, C1, Vdss, $T_{1/2}$, AUC(0-last), AUC(0-inf), MRT(0-last), MRT(0-inf) 및 혈장 농도 대 시간 프로파일의 그래프를 보고하였다.

도 10은 SD 래트(n=3)에서 2 mg/kg IV 용량으로부터의 BCY10572 및 BCY10000의 혈장 농도 대 시간 곡선을 나타낸다:

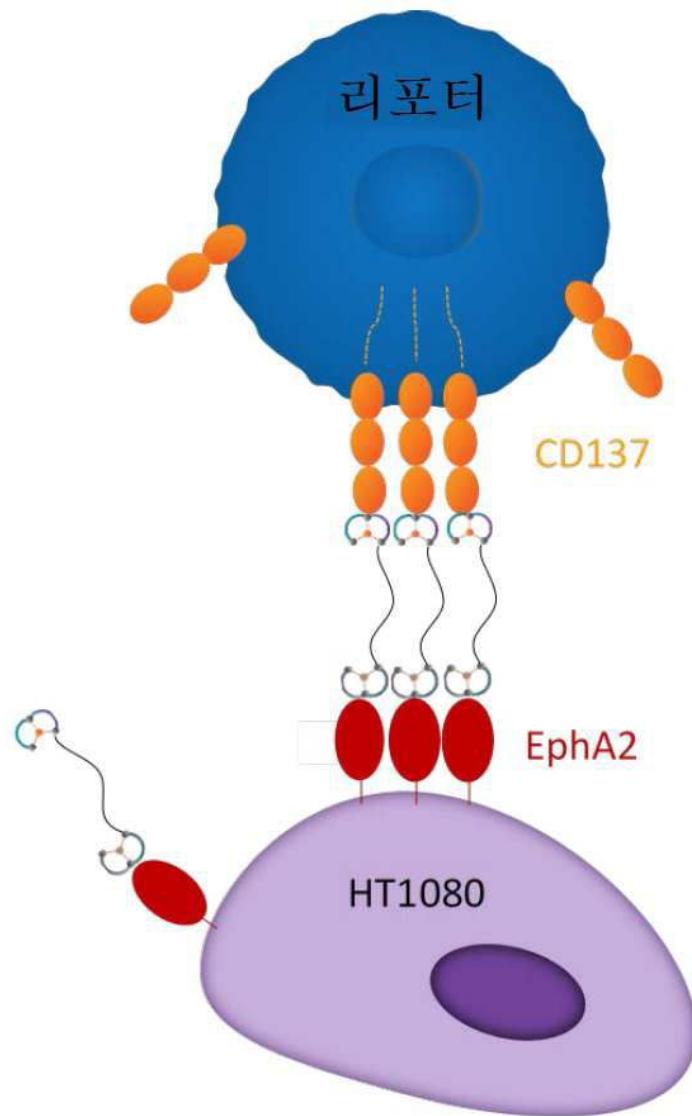
표 7

BCY10572 및 BCY10000의 혈장 농도 대 시간 곡선의 약동학적 매개변수

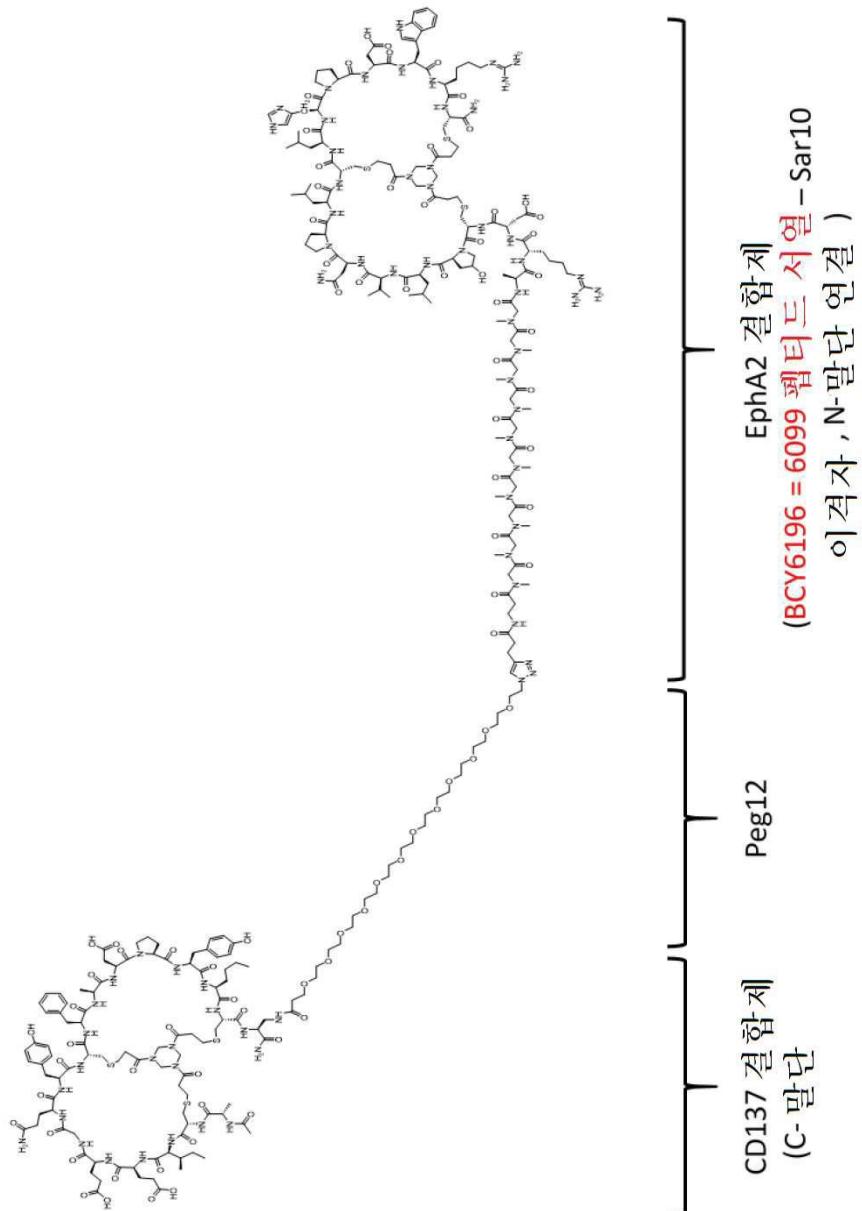
화합물	T1/2(h)	C1p ($\text{m}\text{l}/\text{min}/\text{kg}$)	Vdss (L/kg)
BCY10000	0.357	16.1	0.395
BCY10572	0.926	15.6	0.882

도면

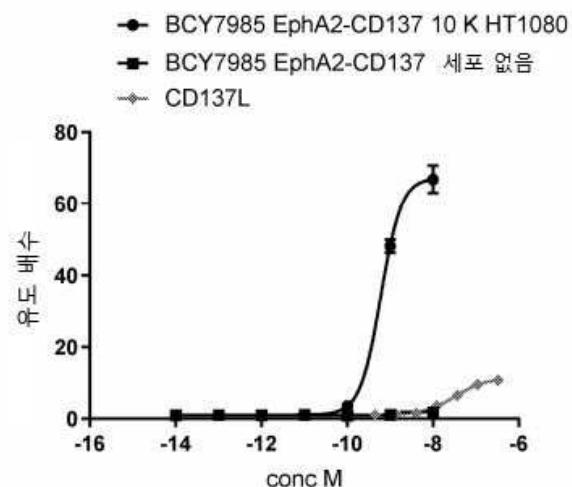
도면1



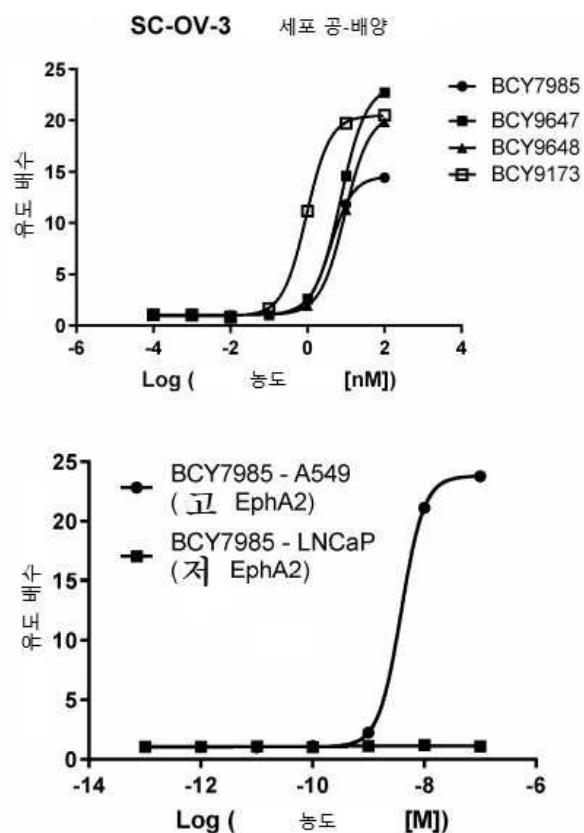
도면2



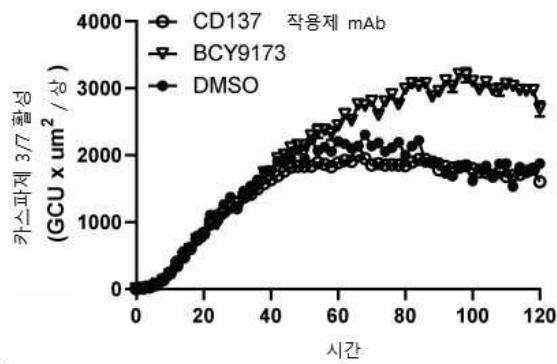
도면3



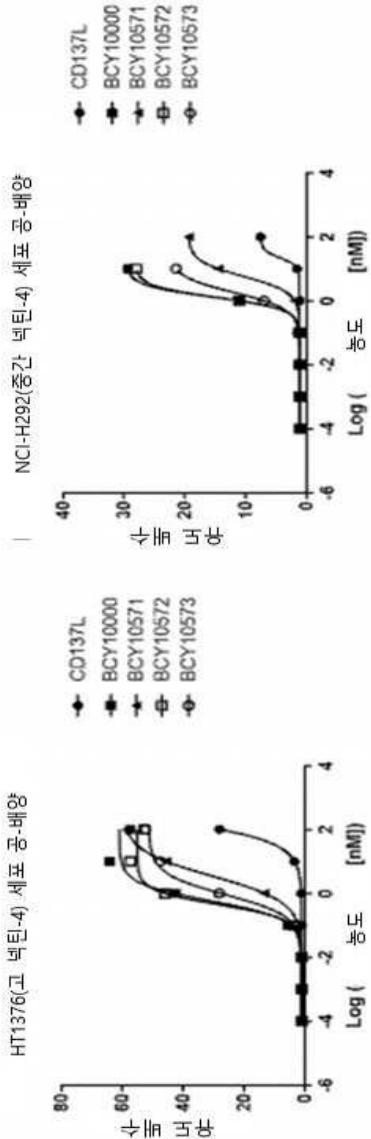
도면4



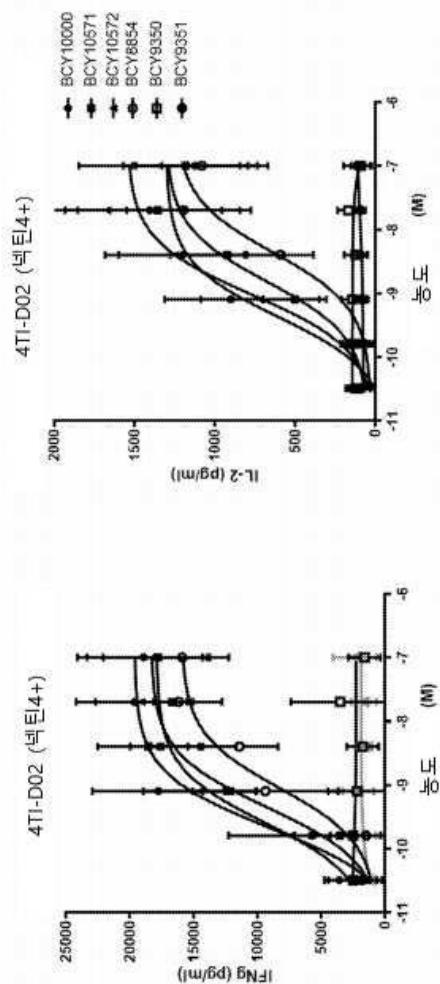
도면5



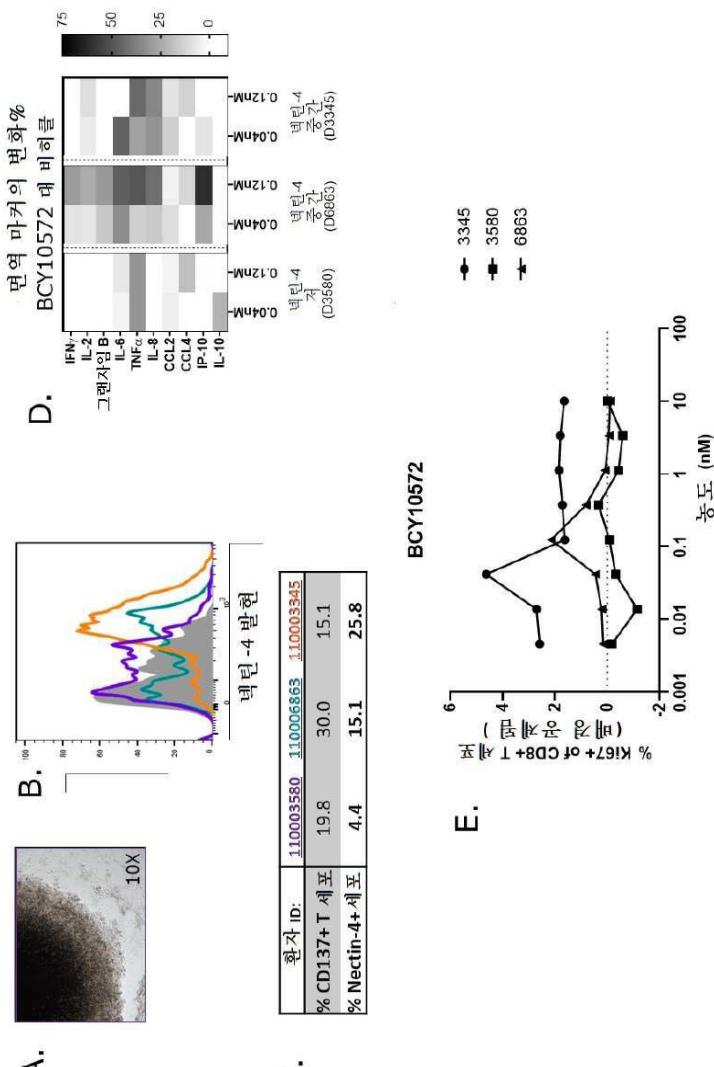
도면6



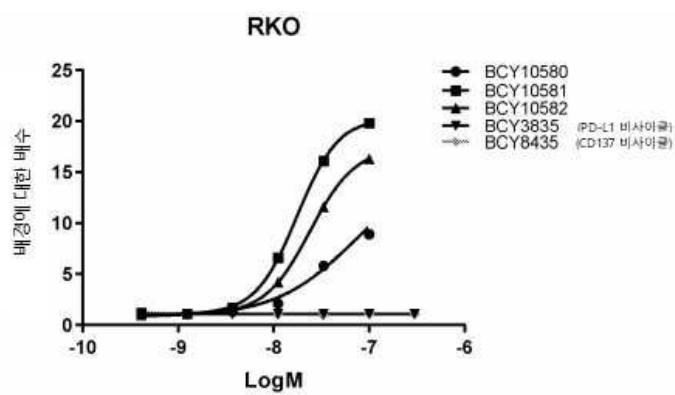
도면7



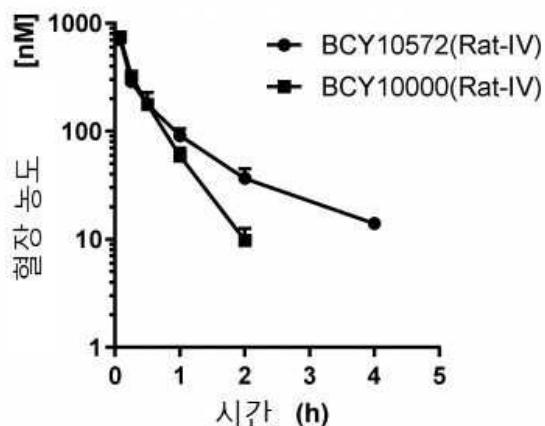
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BicycleTx Limited

<120> HETEROTANDEM BICYCLIC PEPTIDE COMPLEXES

<130> IPA201237-GB

<150> GB 1805492.4

<151> 2018-04-04

<150> GB 1820981.7

<151> 2018-12-21

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Nle

<400> 1

Cys Ile Glu Glu Gly Gln Tyr Cys Phe Ala Asp Pro Tyr Xaa Cys

1

5

10

15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is HyP

<220><221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is HArg

<400> 2

Cys Xaa Leu Val Asn Pro Leu Cys Leu His Pro Asp Trp Xaa Cys

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is tBuAla

<220><221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Nle

<400> 3

Cys Xaa Pro Glu Ala Pro Tyr Cys Phe Ala Asp Pro Tyr Xaa Cys

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Nle

<400> 4

Cys Ile Glu Glu Gly Gln Tyr Cys Phe Ala Asp Pro Tyr Xaa Cys

1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is tBuAla

<220><221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Nle

<400> 5

Cys Xaa Pro Lys Ala Pro Tyr Cys Phe Ala Asp Pro Tyr Xaa Cys

1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is tBuAla

<220><221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Nle

<400> 6

Cys Xaa Pro Glu Lys Pro Tyr Cys Phe Ala Asp Pro Tyr Xaa Cys

1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is tBuAla

<220><221> Xaa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is K(PYA)

<220><221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Nle

<400> 7

Cys Xaa Pro Xaa Ala Pro Tyr Cys Phe Ala Asp Pro Tyr Xaa Cys

1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is tBuAla

<220><221> Xaa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is D-Lys(PYA)

<220><221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Nle

<400> 8

Cys Xaa Pro Glu Xaa Pro Tyr Cys Phe Ala Asp Pro Tyr Xaa Cys

1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is D-Lys(PYA)

<220><221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is Nle

<400> 9

Cys Ile Glu Glu Xaa Gln Tyr Cys Phe Ala Asp Pro Tyr Xaa Cys

1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is K(PYA)

<220><221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is dNle

<400> 10

Cys Ile Glu Glu Xaa Gln Tyr Cys Phe Ala Asp Pro Tyr Xaa Cys

1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is HArg

<400> 11

Cys Leu Trp Asp Pro Thr Pro Cys Ala Asn Leu His Leu Xaa Cys

1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is HArg

<400> 12

Cys Xaa Asp Trp Cys His Trp Thr Phe Ser His Gly His Pro Cys

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<400> 13

Cys Ser Ala Gly Trp Leu Thr Met Cys Gln Lys Leu His Leu Cys

1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is K(PYA)

<400> 14

Cys Ser Ala Gly Trp Leu Thr Met Cys Gln Xaa Leu His Leu Cys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is 1Nal

<220><221> Xaa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is HArg

<220><221> Xaa

<222> (13)..(13)

<223> Xaa is HyP

<400> 15

Cys Pro Xaa Asp Cys Met Xaa Asp Trp Ser Thr Pro Xaa Trp Cys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is 1Nal

<220><221> Xaa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is HArg

<220><221> Xaa

<222> (13)..(13)

<223> Xaa is HyP

<400> 16

Cys Pro Xaa Asp Cys Met Xaa Asp Trp Ser Thr Pro Xaa Trp Cys

1 5 10 15

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is 1Nal

<220><221> Xaa

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is (Sar10-(B-Ala))

<220><221> Xaa

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is HArg

<220><221> Xaa

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is HyP

<400> 17

Cys Pro Xaa Lys Xaa Cys Met Xaa Asp Trp Ser Thr Pro Xaa Trp Cys

1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic peptide

<220><221> Xaa

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is HArg

<220><221> Xaa

<222> (13)..(13)

<223> Xaa is HyP

<400> 18

Cys Pro Phe Gly Cys Met Xaa Asp Trp Ser Thr Pro Xaa Trp Cys

1

5

10

15