

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7551500号
(P7551500)

(45)発行日 令和6年9月17日(2024.9.17)

(24)登録日 令和6年9月6日(2024.9.6)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

Z N A

A 6 1 K 38/12 (2006.01)

A 6 1 K 38/12

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

C 0 7 K 7/50 (2006.01)

C 0 7 K 7/50

請求項の数 14 (全155頁)

(21)出願番号 特願2020-554265(P2020-554265)

(86)(22)出願日 平成31年4月2日(2019.4.2)

(65)公表番号 特表2021-520378(P2021-520378
A)

(43)公表日 令和3年8月19日(2021.8.19)

(86)国際出願番号 PCT/GB2019/050951

(87)国際公開番号 WO2019/193328

(87)国際公開日 令和1年10月10日(2019.10.10)

審査請求日 令和4年4月1日(2022.4.1)

(31)優先権主張番号 1805492.4

(32)優先日 平成30年4月4日(2018.4.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(31)優先権主張番号 1820981.7

(32)優先日 平成30年12月21日(2018.12.21)

最終頁に続く

(73)特許権者 519226757

バイスкулテクス・リミテッド
イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエス
ケンブリッジ グレート アピントン グ
ランタ パーク ポートウェイ ビルディ
ング ブロックス エアアンドビー

(74)代理人 100099623

弁理士 奥山 尚一

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(72)発明者 キーン, ニコラス

イギリス国, シービー 2 2 ・ 3 エイティ
ー, ケンブリッジシャー, ケンブリッジ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 免疫細胞上に存在する成分に結合する第1のペプチドリガンドであって、前記第1のペプチドリガンドがCD137結合二環式ペプチドリガンドを含み、前記CD137結合二環式ペプチドリガンドが、

C_i I E E G Q Y C_{i i} F A D P Y [N l e] C_{i i i} (配列番号1) ;

C_i [t B u A l a] P E [D - A l a] P Y C_{i i} F A D P Y [N l e] C_{i i i} (配列番号3) ;

C_i I E E G Q Y C_{i i} F [D - A l a] D P Y [N l e] C_{i i i} (配列番号4) ;

C_i [t B u A l a] P K [D - A l a] P Y C_{i i} F A D P Y [N l e] C_{i i i} (配列番号5) ;

C_i [t B u A l a] P E [D - L y s] P Y C_{i i} F A D P Y [N l e] C_{i i i} (配列番号6) ;

C_i [t B u A l a] P [K (P Y A)] [D - A l a] P Y C_{i i} F A D P Y [N l e] C_{i i i} (配列番号7) ;

C_i [t B u A l a] P E [D - L y s (P Y A)] P Y C_{i i} F A D P Y [N l e] C_{i i i} (配列番号8) ;

C_i I E E [D - L y s (P Y A)] Q Y C_{i i} F A D P Y (N l e) C_{i i i} (配列番号9) ; または、

[d C_i] [d I] [d E] [d E] [K (P Y A)] [d Q] [d Y] [d C_{i i}] [d

10

20

F][dA][dD][dP][dY][dNle][dC_{iii}](配列番号10)から選択されるアミノ酸配列またはその薬学的に許容される塩を含み、

(b)がん細胞上に存在する成分に結合する第2のペプチドリガンドであって、前記第2のペプチドリガンドが、

(i)C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HArg]C_{iii}(配列番号2);および

C_iLWDPTPC_{ii}ANLHL[HArg]C_{iii}(配列番号11);

から選択されるアミノ酸配列またはその薬学的に許容される塩を含む、EphA2結合二環式ペプチドリガンド;

(ii)C_i[HArg]DWC_{ii}HWTF SHGHPC_{iii}(配列番号12);

C_iSAGWLTMC_{ii}QKLHLC_{iii}(配列番号13);および

C_iSAGWLTMC_{ii}Q[K(PYA)]LHLC_{iii}(配列番号14);から選択されるアミノ酸配列またはその薬学的に許容される塩を含む、PD-L1結合二環式ペプチドリガンド;または

(iii)C_iP[1Na1][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}(配列番号15);

C_iP[1Na1][dD]C_{ii}M[HArg]D[dW]STP[HyP][dW]C_{iii}(配列番号16);

C_iP[1Na1][dK](Sar₁₀-(B-Ala))C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}(配列番号17);または

C_iPFGC_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}(配列番号18)

から選択されるアミノ酸配列またはその薬学的に許容される塩を含む、ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンド

を含む、第2のペプチドリガンドにリンカーを介してコンジュゲートされた、第1のペプチドリガンド

を含むヘテロタンデム二環式ペプチド複合体であって、

前記ペプチドリガンドの各々は、少なくとも2つのポリペプチドループが分子足場上に形成されるように、前記ペプチドのシステイン残基と共有結合を形成する分子足場を含み、前記分子足場が1,1',1''-(1,3,5-トリアジナン-1,3,5-トリイル)トリプロパ-2-エン-1-オン(TATA)であり、

式中、C_i、C_{ii}およびC_{iii}はそれぞれ第1、第2および第3のシステイン残基を表し、1Na1は1-ナフチルアラニンを表し、B-Alaはβ-アラニンを表し、dDはD配置のアスパラギン酸を表し、HArgはホモアルギニンを表し、HyPはヒドロキシプロリンを表し、Nleはノルロイシンを表し、PYAは4-ペンチン酸を表し、Sar₁₀は10個のサルコシン単位を表し、tBuAlaはt-ブチル-アラニンを表す、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項2】

前記リンカーが、-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-およびB-Ala-Sar₅-PEG₅-から選択される、請求項1に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項3】

前記免疫細胞が、白血球;リンパ球(例えば、Tリンパ球もしくはT細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞);CD8またはCD4;CD8;樹状細胞、濾胞樹状細胞および顆粒球から選択される、請求項1または2に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項4】

前記CD137結合二環式ペプチドリガンドが、N末端修飾およびC末端修飾を含み、

10

20

30

40

50

A c - A - (配列番号 1) - D a p (以下、 B C Y 7 7 3 2 と呼ぶ) ;
 A c - A - (配列番号 1) - D a p (P Y A) (以下、 B C Y 7 7 4 1 と呼ぶ) ;
 A c - (配列番号 3) - D a p (以下、 B C Y 9 1 7 2 と呼ぶ) ;
 A c - (配列番号 3) - D a p (P Y A) (以下、 B C Y 1 1 0 1 4 と呼ぶ) ;
 A c - A - (配列番号 4) - D a p (以下、 B C Y 8 0 4 5 と呼ぶ) ;
 A c - (配列番号 5) - A (以下、 B C Y 8 9 1 9 と呼ぶ) ;
 A c - (配列番号 6) - A (以下、 B C Y 8 9 2 0 と呼ぶ) ;
 A c - (配列番号 7) - A (以下、 B C Y 8 9 2 7 と呼ぶ) ;
 A c - (配列番号 8) - A (以下、 B C Y 8 9 2 8 と呼ぶ) ;
 A c - A - (配列番号 9) - A (以下、 B C Y 7 7 4 4 と呼ぶ) ; および
 A c - [d A] - (配列番号 10) - [d A] - N H ₂ (以下、 B C Y 1 1 5 0 6 と呼ぶ) ;

10

(式中、 A c はアセチル基を表し、 D a p はジアミノプロピオン酸を表し、 P Y A は 4 - ペンチン酸を表す)

またはその薬学的に許容される塩を含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項 5】

前記がん細胞が、 H T 1 0 8 0、 S C - O V - 3、 P C 3、 H 1 3 7 6、 N C I - H 2 9 2、 L n C a p、 M C 3 8 および R K O 腫瘍細胞から選択される、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

20

【請求項 6】

前記第 2 のペプチドリガンドが E p h A 2 結合二環式ペプチドリガンドを含む、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体であって、

前記 E p h A 2 結合二環式ペプチドリガンドが、
 C i [H y P] L V N P L C i i L H P [d D] W [H A r g] C i i i (配列番号 2) ;
 および

C i L W D P T P C i i A N L H L [H A r g] C i i i (配列番号 11) ;

(式中、 C i、 C i i および C i i i はそれぞれ第 1、第 2 および第 3 のシステイン残基を表し、 H y P はヒドロキシプロリンを表し、 d D は D 配置のアスパラギン酸を表し、 H A r g はホモアルギニンを表す)

30

から選択されるアミノ酸配列またはその薬学的に許容される塩を含む、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項 7】

前記 E p h A 2 結合二環式ペプチドリガンドが、 N 末端修飾を含み、

A - H A r g - D - (配列番号 2) (以下、 B C Y 9 5 9 4 と呼ぶ) ;

[B - A l a] - [S a r ₁₀] - A - [H A r g] - D - (配列番号 2) (以下、 B C Y 6 0 9 9 と呼ぶ) ;

[P Y A] - [B - A l a] - [S a r ₁₀] - A - [H A r g] - D - (配列番号 2) (以下、 B C Y 6 1 6 9 と呼ぶ) ; および

[P Y A] - [B - A l a] - [S a r ₁₀] - V G P - (配列番号 11) (以下、 B C Y 8 9 4 1 と呼ぶ) ;

40

(式中、 H A r g はホモアルギニンを表し、 P Y A は 4 - ペンチン酸を表し、 S a r ₁₀ は 10 個のサルコシン単位を表し、 B - A l a は - アラニンを表す)

またはその薬学的に許容される塩を含む、請求項 6 に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項 8】

前記第 2 のペプチドリガンドが P D - L 1 結合二環式ペプチドリガンドを含む、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体であって、

前記 P D - L 1 結合二環式ペプチドリガンドが、

C i [H A r g] D W C i i H W T F S H G H P C i i i (配列番号 12) ;

50

$C_i S A G W L T M C_{i i} Q K L H L C_{i i i}$ (配列番号 13) ; および
 $C_i S A G W L T M C_{i i} Q [K (P Y A)] L H L C_{i i i}$ (配列番号 14) ;
 (式中、 C_i 、 $C_{i i}$ および $C_{i i i}$ はそれぞれ第 1、第 2 および第 3 のシステイン残基を表し、 $H A r g$ はホモアルギニンを表し、 $P Y A$ は 4 - ペンチン酸を表す)
 から選択されるアミノ酸配列またはその薬学的に許容される塩を含む、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項 9】

前記 $P D - L 1$ 結合二環式ペプチドリガンドが、N末端修飾および/またはC末端修飾を含み、

$[P Y A] - [B - A l a] - [S a r_{10}] -$ (配列番号 12) (以下、 $B C Y 8 9 3$ と呼ぶ) ;

$[P Y A] - [B - A l a] - [S a r_{10}] - S D K -$ (配列番号 13) (以下、 $B C Y 1 0 0 4 3$ と呼ぶ) ;

$N H_2 - S D K -$ (配列番号 13) - $[S a r_{10}] - [K (P Y A)]$ (以下、 $B C Y 1 0 0 4 4$ と呼ぶ) ;

$N H_2 - S D K -$ (配列番号 14) (以下、 $B C Y 1 0 0 4 5$ と呼ぶ) ; および

$A c - S D K -$ (配列番号 14) - $P S H$ (以下、 $B C Y 1 0 8 6 1$ と呼ぶ) ;

(式中、 $P Y A$ は 4 - ペンチン酸を表し、 $B - A l a$ は - アラニンを表し、 $S a r_{10}$ は 10 個のサルコシン単位を表す)

またはその薬学的に許容される塩を含む、請求項 8 に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項 10】

前記第 2 のペプチドリガンドがネクチン - 4 結合二環式ペプチドリガンドを含む、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体であって、

前記ネクチン - 4 結合二環式ペプチドリガンドが、

$C_i P [1 N a l] [d D] C_{i i} M [H A r g] D W S T P [H y P] W C_{i i i}$ (配列番号 15 ; 以下、 $B C Y 8 1 1 6$ と呼ぶ) ;

$C_i P [1 N a l] [d D] C_{i i} M [H A r g] D [d W] S T P [H y P] [d W] C_{i i i}$ (配列番号 16 ; 以下、 $B C Y 1 1 4 1 5$ と呼ぶ) ; および

$C_i P [1 N a l] [d K] (S a r_{10} - (B - A l a)) C_{i i} M [H A r g] D W S T P [H y P] W C_{i i i}$ (配列番号 17) ;

$C_i P F G C_{i i} M [H A r g] D W S T P [H y P] W C_{i i i}$ (配列番号 18 ; 以下、 $B C Y 1 1 4 1 4$ と呼ぶ) ;

(式中、 C_i 、 $C_{i i}$ および $C_{i i i}$ はそれぞれ第 1、第 2 および第 3 のシステイン残基を表し、 $1 N a l$ は 1 - ナフチルアラニンを表し、 $H A r g$ はホモアルギニンを表し、 $H y P$ はヒドロキシプロリンを表し、 $S a r_{10}$ は 10 個のサルコシン単位を表し、 $B - A l a$ は - アラニンを表す)

から選択されるアミノ酸配列またはその薬学的に許容される塩を含む、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項 11】

前記ネクチン - 4 結合二環式ペプチドリガンドが、場合により、N末端修飾を含み、配列番号 15 (以下、 $B C Y 8 1 1 6$ と呼ぶ) ;

$[P Y A] - [B - A l a] - [S a r_{10}] -$ (配列番号 15) (以下、 $B C Y 8 8 4 6$ と呼ぶ) ;

配列番号 16 (以下、 $B C Y 1 1 4 1 5$ と呼ぶ) ;

$[P Y A] - [B - A l a] - [S a r_{10}] -$ (配列番号 16) (以下、 $B C Y 1 1 9 4 2$ と呼ぶ) ;

$A c -$ (配列番号 17) (以下、 $B C Y 8 8 3 1$ と呼ぶ) ; および

配列番号 18 (以下、 $B C Y 1 1 4 1 4$ と呼ぶ) ;

(式中、 $P Y A$ は 4 - ペンチン酸を表し、 $B - A l a$ は - アラニンを表し、 $S a r_{10}$

10

20

30

40

50

は10個のサルコシン単位を表す)

またはその薬学的に許容される塩を含む、請求項10に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項12】

前記薬学的に許容される塩が、遊離酸またはナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム塩から選択される、請求項1から11のいずれか1項に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項13】

1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて、請求項1から12のいずれか1項に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体を含む医薬組成物。

10

【請求項14】

がんの予防、抑制または治療に使用するための、請求項1から12のいずれか1項に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がん細胞上に存在する成分に結合する第2のペプチドリガンドにリンカーを介してコンジュゲートされた、免疫細胞上に存在する成分に結合する第1のペプチドリガンドを含むヘテロタンデム二環式ペプチド複合体に関する。本発明はまた、がんの予防、抑制または治療における前記ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体の使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

環状ペプチドは、タンパク質に、高い親和性および標的特異性で結合することができ、よって、治療薬の開発にとって魅力的な分子クラスである。実際、いくつかの環状ペプチドが、例えば、抗菌ペプチドバンコマイシン、免疫抑制薬シクロスポリンまたは抗がん薬オクトレオチドとして、診療所で既にうまく使用されている(Driggers et al. (2008), Nat Rev Drug Discov 7(7), 608-24)。優れた結合特性は、ペプチドと標的との間に形成される比較的大きな相互作用表面、ならびに環状構造の構造的柔軟性の減少に起因する。典型的には、大環状分子は、例えば、環状ペプチドCXCR4アンタゴニストCVX15(400²; Wu et al. (2007), Science 330, 1066-71)、インテグリン Vb3に結合するArg-Gly-Aspモチーフを有する環状ペプチド(355²)(Xiong et al. (2002), Science 296(5565), 151-5)またはウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子に結合する環状ペプチド阻害剤ウパイン-1(upain-1)(603²; Zhao et al. (2007), J Struct Biol 160(1), 1-10)として、数百平方オングストロームの表面に結合する。

30

【0003】

その環状構造のために、ペプチド大環状分子は、直鎖ペプチドよりも柔軟性が低く、標的への結合時にエントロピーの損失が少なく、結合親和性が高くなる。柔軟性の減少はまた、標的-特異的構造のロックをもたらし、直鎖ペプチドと比較して結合特異性を増加させる。この効果は、マトリックスメタロプロテイナーゼ8(MMP-8)の強力な選択的阻害剤によって例示され、この阻害剤は開環すると、他のMMPに対するその選択性を失った(Cherney et al. (1998), J Med Chem 41(11), 1749-51)。大環状化を通して達成される好ましい結合特性は、例えば、バンコマイシン、ナイシンおよびアクチノマイシンとして、2つ以上のペプチド環を有する多環式ペプチドでより一層顕著である。

40

【0004】

様々な研究チームが、以前、システイン残基を有するポリペプチドを合成分子構造に繋いだ(Kemp and McNamara (1985), J. Org. Chem; Tim

50

merman et al. (2005), ChemBioChem)。Meloenおよび同僚らは、タンパク質表面の構造的模倣のため、合成足場上での複数のペプチドループの迅速で定量的な環化のためにトリス(ブロモメチル)ベンゼンおよび関連分子を使用した(Timmerman et al. (2005), ChemBioChem)。システイン含有ポリペプチドを、例えば、トリス(ブロモメチル)ベンゼンとしての分子足場に連結することによって生成される候補薬物化合物を生成する方法は、国際公開第2004/077062号および国際公開第2006/078161号に開示されている。

【0005】

目的の標的に対する二環式ペプチドの大きなライブラリーを作成およびスクリーニングするためのファージディスプレイに基づくコンビナトリアルアプローチが開発されている(Heinis et al. (2009), Nat Chem Biol 5(7), 502-7および国際公開第2009/098450号)。手短に言えば、3つのシステイン残基および6つのランダムアミノ酸の2つの領域を含有する直鎖ペプチド(Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys)のコンビナトリアルライブラリーをファージ上にディスプレイし、システイン側鎖を小分子(トリス(ブロモメチル)ベンゼン)に共有結合的に連結することによって環化した。

【発明の概要】

【0006】

本発明の第1の態様によると、

(a) 免疫細胞上に存在する成分に結合する第1のペプチドリガンドであって、

(b) がん細胞上に存在する成分に結合する第2のペプチドリガンドにリンカーを介してコンジュゲートされた、第1のペプチドリガンド

を含むヘテロタンデム二環式ペプチド複合体であって、

前記ペプチドリガンドの各々は、少なくとも2つのループ配列によって分離された、少なくとも3つのシステイン残基を含むポリペプチドと、少なくとも2つのポリペプチドループが分子足場上に形成されるように、ポリペプチドのシステイン残基と共有結合を形成する分子足場とを含む、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

【0007】

本発明のさらなる態様によると、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせ、本明細書に定義されるヘテロタンデム二環式ペプチド複合体を含む医薬組成物が提供される。

【0008】

本発明のさらなる態様によると、がんの予防、抑制または治療に使用するための、本明細書に定義されるヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】免疫細胞とがん細胞の両方に結合したEphA2およびCD137ペプチドリガンドを含むヘテロタンデム二環式ペプチド複合体の概略図である。

【図2】EphA2-CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY7985の構造および組成を示す図である。

【図3】EphA2発現HT1080細胞の存在下でのPromega CD137ルシフェラーゼレポーターアッセイ(CS196008)におけるEphA2-CD137ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY7985の分析を示す図である。

【図4】EphA2/CD137ヘテロタンデムが、CD137レポーターアッセイで活性であり、活性化誘導倍率が、共培養で使用される細胞株上の腫瘍標的発現レベルに依存することを示す図である。

【図5】EphA2/CD137ヘテロタンデムが、初代ヒトT細胞およびがん細胞共培養アッセイで腫瘍細胞殺傷を誘導することを示す図である。腫瘍細胞殺傷を、経時的に生存NucLight red陽性腫瘍細胞を計数することによって評価する。カスパーゼ3/7色素を使用してアポトーシス性腫瘍細胞を特定する。

10

20

30

40

50

【図6】ネクチン - 4 / C D 1 3 7 ヘテロタンデムが、C D 1 3 7 レポーターアッセイで活性であり、活性化誘導倍率が、共培養で使用する細胞株上の腫瘍標的発現レベル（H T 1 3 7 6 : ネクチン - 4 高およびN C I - H 2 9 2 : ネクチン - 4 中）に依存することを示す図である。

【図7】ネクチン - 4 / C D 1 3 7 ヘテロタンデムが、P B M C - 4 T 1 共培養アッセイでI L - 2 およびI F N - γ サイトカイン分泌を誘導することを示す図である。B C Y 9 3 5 0 およびB C Y 9 3 5 1 は、それぞれネクチン - 4 およびC D 1 3 7 の非結合対照である。

【図8】ネクチン - 4 / C D 1 3 7 ヘテロタンデムが、初代患者由来肺腫瘍のエキソビボ培養物中で標的依存性サイトカイン放出を誘導することを示す図である。（A）エキソビボ患者由来腫瘍細胞は、培養中4時間以内に3 D スフェロイドを形成する、光学顕微鏡下10倍像。（B）3人のドナーからの患者由来腫瘍試料中のネクチン - 4 発現のフロー解析。（C）表は、3人のドナーの試料中のC D 1 3 7 + T細胞%およびネクチン - 4 + 細胞%を示す。（D）対照 / 試験化合物による処理に応じた免疫マーカーの変化%（ビヒクルに正規化）を示すヒートマップ。（E）対照 / 試験化合物による処理に応じたC D 8 + k i 6 7 + T細胞%（ビヒクルを点線で示す）。

10

【図9】P D - L 1 / C D 1 3 7 ヘテロタンデムが、P D - L 1 発現細胞株R K Oの存在下、C D 1 3 7 レポーターアッセイで活性であることを示す図である。

【図10】S D ラットにおけるヘテロタンデムの薬物動態を示す図である：B C Y 1 0 5 7 2 およびB C Y 1 0 0 0 0 を2 m g / k g でI V 投与した（n = 3）。

20

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明の第1の態様によると、

（b）がん細胞上に存在する成分に結合する第2のペプチドリガンドにリンカーを介してコンジュゲートされた、

（a）免疫細胞上に存在する成分に結合する第1のペプチドリガンドを含むヘテロタンデム二環式ペプチド複合体であって、

前記ペプチドリガンドの各々は、少なくとも2つのループ配列によって分離された、少なくとも3つのシステイン残基を含むポリペプチドと、少なくとも2つのポリペプチドループが分子足場上に形成されるように、ポリペプチドのシステイン残基と共有結合を形成する分子足場とを含む、ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

30

【0011】

第1のペプチドリガンド

本明細書における「免疫細胞」という用語への言及は、免疫系中の任意の細胞を含む。適切な例としては、リンパ球（例えば、Tリンパ球もしくはT細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞）などの白血球が挙げられる。一実施形態では、T細胞がC D 8またはC D 4である。さらなる実施形態では、T細胞がC D 8である。免疫細胞の他の例としては、樹状細胞、濾胞樹状細胞および顆粒球が挙げられる。

【0012】

一実施形態では、免疫細胞上に存在する成分がC D 1 3 7である。

40

【0013】

C D 1 3 7 は、腫瘍壊死因子（T N F）受容体ファミリーのメンバーである。その代替名は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9（T N F R S F 9）、4 - I B B およびリンパ球活性化により誘導された（I L A）である。C D 1 3 7 は、活性化T細胞によって発現され得るが、C D 4 + T細胞よりもC D 8 + T細胞上でより多く発現される。さらに、C D 1 3 7 発現は、樹状細胞、濾胞樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、顆粒球および炎症部位の血管壁の細胞に見られる。C D 1 3 7 の1つの特徴付けられた活性は、活性化T細胞に対するその共刺激活性である。C D 1 3 7 の架橋により、T細胞増殖、I L - 2 分泌、生存および細胞溶解活性が増強される。さらに、これにより、マウスにおいて腫瘍を除去する免疫活性が増強され得る。

50

【0014】

CD137は、TCR活性化で誘導されるT細胞共刺激受容体である(Nam et al., Curr. Cancer Drug Targets, 5:357-363(2005); Waits et al., Annu. Rev. Immunol., 23:23-68(2005))。活性化CD4+およびCD8+T細胞上でのその発現に加えて、CD137はまた、CD4+CD25+制御性T細胞、ナチュラルキラー(NK)およびNK-T細胞、単球、好中球ならびに樹状細胞上でも発現される。その天然リガンド、CD137Lは、B細胞、単球/マクロファージおよび樹状細胞を含む抗原提示細胞で記載されている(Watts et al., Annu. Rev. Immunol., 23:23-68(2005))。そのリガンドと相互作用すると、CD137は、増加したTCR誘導T細胞増殖、サイトカイン産生、機能的成熟および延長したCD8+T細胞生存をもたらす(Nam et al., Curr. Cancer Drug Targets, 5:357-363(2005); Watts et al., Annu. Rev. Immunol., 23:23-68(2005))。

10

【0015】

CD137LまたはCD137に対するアゴニストモノクローナル抗体(mAb)によるCD137を通じたシグナル伝達は、増加したTCR誘導T細胞増殖、サイトカイン産生および機能的成熟、ならびに延長したCD8+T細胞生存をもたらす。これらの効果は、(1)NF- κ B、c-Jun NH2末端キナーゼ/ストレス活性化プロテインキナーゼ(JNK/SAPK)およびp38マイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)シグナル伝達経路の活性化、ならびに(2)抗アポトーシスおよび細胞周期関連遺伝子発現の制御に起因する。

20

【0016】

CD137とCD137Lの両方が欠損したマウスで実施された実験が、完全コンピテントT細胞応答の生成におけるCD137共刺激の重要性をさらに実証している。

【0017】

IL-2およびIL-15活性化NK細胞はCD137を発現し、アゴニストmAbによるCD137のライゲーションはNK細胞増殖およびIFN- γ 分泌を刺激するが、その細胞溶解活性は刺激しない。

【0018】

さらに、CD137刺激NK細胞は、インビトロで活性化T細胞の拡大を促進する。

30

【0019】

その共刺激機能によって、CD137に対するアゴニストmAbは、心臓および皮膚同種移植片の拒絶を促進し、確立された腫瘍を根絶し、一次抗ウイルスCD8+T細胞応答を広げ、T細胞の細胞溶解能力を増加させることが示されている。これらの研究は、CD137シグナル伝達が、腫瘍および感染症に対する免疫を増強し得るT細胞機能を促進するという考え方を裏付ける。

【0020】

一実施形態では、第1のペプチドリガンドがCD137結合二環式ペプチドリガンドを含む。

40

【0021】

CD137結合二環式ペプチドリガンドの適切な例は、そのペプチドが引用することにより本明細書の一部をなすものとする、英国特許出願第1712589.9号および同第1802934.8号に開示されている。

【0022】

一実施形態では、CD137結合二環式ペプチドリガンドが、アミノ酸配列：
C_iIEEGQYC_iiFADPY[Nle]C_iii(配列番号1)；
C_i[tBuAla]PE[D-Ala]PYC_iiFADPY[Nle]C_iii(配列番号3)；
C_iIEEGQYC_iiF[D-Ala]DPY[Nle]C_iii(配列番号4)；

50

$C_i[tBuAla]PK[D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (配列番号5) ;

$C_i[tBuAla]PE[D-Lys]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (配列番号6) ;

$C_i[tBuAla]P[K(PYA)][D-Ala]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (配列番号7) ;

$C_i[tBuAla]PE[D-Lys(PYA)]PYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (配列番号8) ;

$C_iIEE[D-Lys(PYA)]QYC_{ii}FADPY(Nle)C_{iii}$ (配列番号9) ; および

$[dC_i][dI][dE][dE][K(PYA)][dQ][dY][dC_{ii}][dF][dA][dD][dP][dY][dNle][dC_{iii}]$ (配列番号10) ;

(式中、 C_i 、 C_{ii} および C_{iii} はそれぞれ第1、第2および第3のシステイン残基を表し、 Nle はノルロイシンを表し、 $tBuAla$ は t -ブチル-アラニンを表し、 PYA は4-ベンチン酸を表す)

またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0023】

言及され得る1つの特定の実施形態では、 $CD137$ 結合二環式ペプチドリガンドが、アミノ酸配列：

$C_iIEEGQYC_{ii}FADPY[Nle]C_{iii}$ (配列番号1) ;

(式中、 C_i 、 C_{ii} および C_{iii} はそれぞれ第1、第2および第3のシステイン残基を表し、 Nle はノルロイシンを表す)

またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0024】

さらなる実施形態では、 $CD137$ 結合二環式ペプチドリガンドが、 N 末端修飾および C 末端修飾を含み、

$Ac-A$ - (配列番号1) - Dap (以下、 $BCY7732$ と呼ぶ) ;

$Ac-A$ - (配列番号1) - $Dap(PYA)$ (以下、 $BCY7741$ と呼ぶ) ;

Ac - (配列番号3) - Dap (以下、 $BCY9172$ と呼ぶ) ;

Ac - (配列番号3) - $Dap(PYA)$ (以下、 $BCY11014$ と呼ぶ) ;

$Ac-A$ - (配列番号4) - Dap (以下、 $BCY8045$ と呼ぶ) ;

Ac - (配列番号5) - A (以下、 $BCY8919$ と呼ぶ) ;

Ac - (配列番号6) - A (以下、 $BCY8920$ と呼ぶ) ;

Ac - (配列番号7) - A (以下、 $BCY8927$ と呼ぶ) ;

Ac - (配列番号8) - A (以下、 $BCY8928$ と呼ぶ) ;

$Ac-A$ - (配列番号9) - A (以下、 $BCY7744$ と呼ぶ) ; および

$Ac-[dA]$ - (配列番号10) - $[dA]-NH_2$ (以下、 $BCY11506$ と呼ぶ) ;

(式中、 Ac はアセチル基を表し、 Dap はジアミノプロピオン酸を表し、 PYA は4-ベンチン酸を表す)

またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0025】

言及され得るさらなる実施形態では、 $CD137$ 結合二環式ペプチドリガンドが、 N 末端修飾および C 末端修飾を含み、

$Ac-A$ - (配列番号1) - Dap (以下、 $BCY7732$ と呼ぶ) ;

(式中、 Ac はアセチル基を表し、 Dap はジアミノプロピオン酸を表す)

またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0026】

第2のペプチドリガンド

本明細書における「がん細胞」という用語への言及は、がんに関与することが知られて

10

20

30

40

50

いる任意の細胞を含む。がん細胞は、細胞分裂の制御を担う遺伝子が損傷を受けた場合に作り出される。発癌は、増殖と細胞死との間の正常なバランスを狂わせる、正常細胞の遺伝物質の突然変異およびエピ変異 (e p i m u t a t i o n) によって引き起こされる。これにより、制御されない細胞分裂および体内での自然選択によるこれらの細胞の進化がもたらされる。細胞の制御されない、通常は急速な増殖は、良性または悪性腫瘍 (がん) をもたらし得る。良性腫瘍は、体の他の部分に広がらず、他の組織に侵入もしない。悪性腫瘍は、他の器官に侵入し、遠隔位置に広がり (転移)、生命を脅かし得る。

【 0 0 2 7 】

一実施形態では、がん細胞が、H T 1 0 8 0、S C - O V - 3、P C 3、H 1 3 7 6、N C I - H 2 9 2、L n C a p、M C 3 8、4 T 1 - D 0 2 および R K O 腫瘍細胞から選択される。

10

【 0 0 2 8 】

一実施形態では、がん細胞上に存在する成分が E p h A 2 である。

【 0 0 2 9 】

E p h 受容体チロシンキナーゼ (E p h) は、チロシン残基上でタンパク質をリン酸化するキナーゼである受容体チロシンキナーゼ (R T K) の大きなグループに属する。E p h およびその膜結合エフリンリガンド (エフリン) は、細胞位置決めおよび組織編成を制御する (P o l i a k o v e t a l . (2 0 0 4) D e v C e l l 7 , 4 6 5 - 8 0)。機能的および生化学的 E p h 応答は、より高いリガンドオリゴマー化状態で起こる (S t e i n e t a l . (1 9 9 8) G e n e s D e v 1 2 , 6 6 7 - 6 7 8)。

20

【 0 0 3 0 】

数あるパターンニング機能の中でも、様々な E p h およびエフリンが、血管の発達において役割を果たすことが示されている。E p h B 4 およびエフリン - B 2 のノックアウトは、毛細血管床を血管に再構築する能力の欠如 (P o l i a k o v e t a l .、上記) および胚性致死をもたらす。いくつかの E p h 受容体およびエフリンの持続的発現は、新たに形成された成人微小血管でも観察されている (B r a n t l e y - S i e d e r s e t a l . (2 0 0 4) C u r r P h a r m D e s 1 0 , 3 4 3 1 - 4 2 ; A d a m s (2 0 0 3) J A n a t 2 0 2 , 1 0 5 - 1 2)。

【 0 0 3 1 】

成人におけるいくつかのエフリンおよびその受容体の脱制御された再出現が、腫瘍浸潤、転移および血管新生に寄与することも観察されている (N a k a m o t o e t a l . (2 0 0 2) M i c r o s c R e s T e c h 5 9 , 5 8 - 6 7 ; B r a n t l e y - S i e d e r s e t a l .、上記)。さらに、いくつかの E p h ファミリーメンバーが、様々なヒト腫瘍由来の腫瘍細胞上で過剰発現されることが分かっている (B r a n t l e y - S i e d e r s e t a l .、上記 ; M a r m e (2 0 0 2) A n n H e m a t o l 8 1 S u p p l 2 , S 6 6 ; B o o t h e t a l . (2 0 0 2) N a t M e d 8 , 1 3 6 0 - 1)。

30

【 0 0 3 2 】

E P H 受容体 A 2 (エフリン A 型受容体 2) は、ヒトでは、E P H A 2 遺伝子によってコードされるタンパク質である。

40

【 0 0 3 3 】

E p h 2 は、通常は疾患進行、転移および予後不良と相関して、ヒトの複数のがん、例えば、乳がん (Z e l i n s k i e t a l (2 0 0 1) C a n c e r R e s . 6 1 , 2 3 0 1 - 2 3 0 6 ; Z h u a n g e t a l (2 0 1 0) C a n c e r R e s . 7 0 , 2 9 9 - 3 0 8 ; B r a n t l e y - S i e d e r s e t a l (2 0 1 1) P L o S O n e 6 , e 2 4 4 2 6)、肺がん (B r a n n a n e t a l (2 0 0 9) C a n c e r P r e v R e s (P h i l a) 2 , 1 0 3 9 - 1 0 4 9 ; K i n c h e t a l (2 0 0 3) C l i n C a n c e r R e s . 9 , 6 1 3 - 6 1 8 ; G u o e t a l (2 0 1 3) J T h o r a c O n c o l . 8 , 3 0 1 - 3 0 8)、胃がん (N a k a m u r a e t a l (2 0 0 5) C a n c e r S c i . 9 6 , 4 2 - 4 7 ; Y u a n

50

et al (2009) Dig Dis Sci 54, 2410 - 2417)、膵臓がん (Mudali et al (2006) Clin Exp Metastasis 23, 357 - 365)、前立腺がん (Walker - Daniels et al (1999) Prostate 41, 275 - 280)、肝臓がん (Yang et al (2009) Hepatol Res. 39, 1169 - 1177) および膠芽腫 (Wykosky et al (2005) Mol Cancer Res. 3, 541 - 551; Li et al (2010) Tumour Biol. 31, 477 - 488) で上方制御される。

【0034】

がん進行における EphA2 の完全な役割は依然として定義されていないが、腫瘍細胞成長、生存、浸潤および血管新生を含むがん進行の多数の段階での相互作用についての証拠が存在する。EphA2 発現の下方制御は、腫瘍がん細胞増殖を抑制し (Binda et al (2012) Cancer Cell 22, 765 - 780)、EphA2 遮断は、VEGF 誘導細胞遊走 (Hess et al (2001) Cancer Res. 61, 3250 - 3255)、出芽および血管新生 (Cheng et al (2002) Mol Cancer Res. 1, 2 - 11; Lin et al (2007) Cancer 109, 332 - 40) ならびに転移進行 (Brantley - Sieders et al (2005) FASEB J. 19, 1884 - 1886) を阻害する。

【0035】

EphA2 との抗体薬物複合体は、ラットおよびマウス異種移植片モデルで腫瘍成長を有意に減少させることが示されており (Jackson et al (2008) Cancer Research 68, 9367 - 9374)、同様のアプローチがヒトで試みられているが、治療に関連する有害事象のために治療を中断しなければならなかった (Annunziata et al (2013) Invest New drugs 31, 77 - 84)。

【0036】

一実施形態では、第2のペプチドリガンドが EphA2 結合二環式ペプチドリガンドを含む。

【0037】

EphA2 結合二環式ペプチドリガンドの適切な例は、そのペプチドが引用することにより本明細書の一部をなすものとする、英国特許出願第 1721259.8 号および同第 1804102.0 号に開示されている。

【0038】

一実施形態では、EphA2 結合二環式ペプチドリガンドが、アミノ酸配列：
C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HA_{rg}]C_{iii}(配列番号2)；
および
C_iLWDPTPC_{ii}ANLHL[HA_{rg}]C_{iii}(配列番号11)；
(式中、C_i、C_{ii}およびC_{iii}はそれぞれ第1、第2および第3のシステイン残基を表し、HyPはヒドロキシプロリンを表し、dDはD配置のアスパラギン酸を表し、HA_{rg}はホモアルギニンを表す)
またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0039】

言及され得る一実施形態では、EphA2 結合二環式ペプチドリガンドが、アミノ酸配列：

C_i[HyP]LVNPLC_{ii}LHP[dD]W[HA_{rg}]C_{iii}(配列番号2)；
(式中、C_i、C_{ii}およびC_{iii}はそれぞれ第1、第2および第3のシステイン残基を表し、HyPはヒドロキシプロリンを表し、dDはD配置のアスパラギン酸を表し、HA_{rg}はホモアルギニンを表す)
またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0040】

さらなる実施形態では、EphA2 結合二環式ペプチドリガンドが、N末端修飾を含み、

10

20

30

40

50

A - H A r g - D - (配列番号 2) (以下、B C Y 9 5 9 4 と呼ぶ) ;
 [B - A l a] - [S a r 1 0] - A - [H A r g] - D - (配列番号 2) (以下、B C
 Y 6 0 9 9 と呼ぶ) ;
 [P Y A] - [B - A l a] - [S a r 1 0] - A - [H A r g] - D - (配列番号 2)
 (以下、B C Y 6 1 6 9 と呼ぶ) ; および
 [P Y A] - [B - A l a] - [S a r 1 0] - V G P - (配列番号 1 1) (以下、B C
 Y 8 9 4 1 と呼ぶ) ;
 (式中、H A r g はホモアルギニンを表し、P Y A は 4 - ペンチン酸を表し、S a r 1 0
 は 1 0 個のサルコシン単位を表し、B - A l a は - アラニンを表す)
 またはその薬学的に許容される塩を含む。

10

【 0 0 4 1 】

言及され得るさらなる実施形態では、E p h A 2 結合二環式ペプチドリガンドが、N末
 端修飾を含み、

A - H A r g - D - (配列番号 2) (以下、B C Y 9 5 9 4 と呼ぶ)
 (式中、H A r g はホモアルギニンを表す)
 またはその薬学的に許容される塩を含む。

【 0 0 4 2 】

代替実施形態では、がん細胞上に存在する成分が P D - L 1 である。

【 0 0 4 3 】

プログラム細胞死 1 リガンド 1 (P D - L 1) は、マウス染色体 1 9 およびヒト染色体
 9 上の C D 2 7 4 遺伝子によってコードされる 2 9 0 アミノ酸 I 型膜貫通タンパク質であ
 る。P D - L 1 発現は、慢性感染症、例えば、慢性ウイルス感染症 (例えば、中でも H I
 V、H B V、H C V および H T L V を含む)、慢性細菌感染症 (例えば、中でもヘリコバ
 クター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) を含む) および慢性寄生生
 物感染症 (例えば、マンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) を含
 む) に関する免疫応答の回避に關与する。P D - L 1 発現は、T 細胞、B 細胞、マクロ
 ファージ、樹状細胞、ならびに内皮細胞、肝細胞、筋細胞および胎盤を含む非造血細胞を
 含むいくつかの組織および細胞型で検出されている。

20

【 0 0 4 4 】

P D - L 1 発現は、抗腫瘍免疫活性の抑制にも関与している。腫瘍は、宿主 T 細胞によ
 って認識され得る抗原を発現するが、腫瘍の免疫学的排除はまれである。この失敗の一部
 は、腫瘍微小環境による免疫抑制のためである。多くの腫瘍での P D - L 1 発現が、この
 抑制環境の構成要素であり、他の免疫抑制シグナルと合わせて作用する。P D - L 1 発現
 は、乳房、肺、結腸、卵巣、黒色腫、膀胱、肝臓、唾液、胃、神経膠腫、甲状腺、胸腺上
 皮、頭頸部を含む多種多様な固形腫瘍上で、インサイチューで示されている (B r o w n
 J A et al . 2 0 0 3 Immunol . 1 7 0 : 1 2 5 7 - 6 6 ; D o n g H
 et al . 2 0 0 2 Nat . Med . 8 : 7 9 3 - 8 0 0 ; H a m a n i s h i J ,
 et al . 2 0 0 7 Proc . Natl . Acad . Sci . USA 1 0 4 : 3 3 6
 0 - 6 5 ; S t r o m e S E et al . 2 0 0 3 Cancer Res . 6 3 : 6
 5 0 1 - 5 ; I n m a n B A et al . 2 0 0 7 Cancer 1 0 9 : 1 4 9 9
 - 5 0 5 ; K o n i s h i J et al . 2 0 0 4 Clin . Cancer Res
 . 1 0 : 5 0 9 4 - 1 0 0 ; N a k a n i s h i J et al . 2 0 0 7 C a n c e r
 Immunol . Immunother . 5 6 : 1 1 7 3 - 8 2 ; N o m i T et
 al . 2 0 0 7 Clin . Cancer Res . 1 3 : 2 1 5 1 - 5 7 ; T h o m p s
 o n R H et al . 2 0 0 4 Proc . Natl . Acad . Sci . USA 1
 0 1 : 1 7 1 7 4 - 7 9 ; W u C et al . 2 0 0 6 Acta Histoche
 m . 1 0 8 : 1 9 - 2 4) 。さらに、P D - L 1 の受容体、プログラム細胞死タンパク質
 1 (P D - 1 および C D 2 7 9 としても知られている) の発現が、腫瘍浸潤リンパ球で上
 方制御されており、これも、腫瘍免疫抑制に寄与している (B l a n k C et al .
 2 0 0 3 Immunol . 1 7 1 : 4 5 7 4 - 8 1) 。最も重要なことに、腫瘍上の P

30

40

50

D - L 1 発現を疾患転帰と関連付ける研究は、PD - L 1 発現が、腎臓がん、卵巣がん、膀胱がん、乳がん、胃がんおよび膵臓がんにおいて予後不良と強く関連していることを示している (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)。さらに、これらの研究は、腫瘍上のより高レベルのPD - L 1 発現が、腫瘍段階の前進およびより深い組織構造への侵入を促進し得ることを示唆している。

【0045】

PD - 1 経路はまた、血液悪性腫瘍においても役割を果たすことができる。PD - L 1 は、多発性骨髄腫細胞上で発現されるが、正常な形質細胞上では発現されない (Liu J et al. 2007 Blood 110:296 - 304)。PD - L 1 は、いくつかの原発性T細胞リンパ腫、特に未分化大細胞型Tリンパ腫上で発現される (Brown JA et al. 2003 Immunol. 170:1257 - 66)。PD - 1 は、血管免疫芽球性リンパ腫のT細胞上で高度に発現され、PD - L 1 は、関連する濾胞樹状細胞ネットワーク上で発現される (Dorfman DM et al. 2006 Am. J. Surg. Pathol. 30:802 - 10)。結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫では、リンパ球性または組織球性 (L & H) 細胞に関連するT細胞がPD - 1 を発現する。PD - 1 連結によって誘導される遺伝子の読み取りを使用したマイクロアレイ解析は、腫瘍関連T細胞が、ホジキンリンパ腫で、インサイチューでPD - 1 シグナルに回答していることを示唆している (Chemnitz JM et al. 2007 Blood 110:3226 - 33)。PD - 1 およびPD - L 1 は、HTLV - 1 媒介成人T細胞白血病およびリンパ腫においてCD4 T細胞上で発現される (Shimauchi T et al. 2007 Int. J. Cancer 121:2585 - 90)。これらの腫瘍細胞は、TCRシグナルに対して低反応性である。

【0046】

動物モデルでの研究が、腫瘍上のPD - L 1 がT細胞活性化および腫瘍細胞の溶解を阻害し、ある場合には、腫瘍特異的T細胞死の増加をもたらすことを実証している (Dong H et al. 2002 Nat. Med. 8:793 - 800; Hirano F et al. 2005 Cancer Res. 65:1089 - 96)。腫瘍関連APCはまた、PD - 1 : PD - L 1 経路を利用して抗腫瘍T細胞応答を制御することもできる。腫瘍関連骨髄DCの集団でのPD - L 1 発現は、腫瘍環境因子によって上方制御される (Curriel TJ et al. 2003 Nat. Med. 9:562 - 67)。B16黒色腫の腫瘍流入領域リンパ節中の形質細胞様樹状細胞 (DC) は、制御性T細胞の抑制活性を強力に活性化するIDOを発現する。IDOで処理された制御性T細胞の抑制活性には、IDO発現DCとの細胞接触が必要であった (Sharma MD et al. 2007 Clin. Invest. 117:2570 - 82)。

【0047】

一実施形態では、第2のペプチドリガンドがPD - L 1 結合二環式ペプチドリガンドを含む。

【0048】

PD - L 1 結合二環式ペプチドリガンドの適切な例は、そのペプチドが引用することにより本明細書の一部をなすものとする、英国特許出願第1820956.9号および同第1820969.2号に開示されている。

【0049】

10

20

30

40

50

一実施形態では、PD-L1二環式ペプチドリガンドが、
 $C_i[HArg]DWC_{ii}HWTFSHGHP C_{iii}$ (配列番号12) ;
 $C_iSAGWLTMC_{ii}QKLHLC_{iii}$ (配列番号13) ; および
 $C_iSAGWLTMC_{ii}Q[K(PYA)]LHLC_{iii}$ (配列番号14) ;
 (式中、 C_i 、 C_{ii} および C_{iii} はそれぞれ第1、第2および第3のシステイン残基を表し、HArgはホモアルギニンを表し、PYAは4-ペンチン酸を表す)
 から選択されるアミノ酸配列またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0050】

さらなる実施形態では、PD-L1結合二環式ペプチドリガンドが、N末端修飾および/またはC末端修飾を含み、

$[PYA]-[B-Ala]-[Sar_{10}]$ - (配列番号12) (以下、BCY8938と呼ぶ) ;

$[PYA]-[B-Ala]-[Sar_{10}]-SDK$ - (配列番号13) (以下、BCY10043と呼ぶ) ;

NH_2-SDK - (配列番号13) - $[Sar_{10}]-[K(PYA)]$ (以下、BCY10044と呼ぶ) ;

NH_2-SDK - (配列番号14) (以下、BCY10045と呼ぶ) ; および

$Ac-SDK$ - (配列番号14) - PSH (以下、BCY10861と呼ぶ) ;

(式中、PYAは4-ペンチン酸を表し、B-Alaは - アラニンを表し、 Sar_{10} は10個のサルコシン単位を表す)

またはその薬学的に許容される塩を含む。

【0051】

代替実施形態では、がん細胞上に存在する成分がネクチン-4である。

【0052】

ネクチン-4は、4つのメンバーを含むタンパク質のネクチンファミリーに属する表面分子である。ネクチンは、発達および成人期中の上皮、内皮、免疫および神経細胞のための極性、増殖、分化および遊走などの様々な生物学的過程において重要な役割を果たす細胞接着分子である。これらは、ヒトにおけるいくつかの病理学的過程に参与する。これらは、ポリオウイルス、単純ヘルペスウイルスおよび麻疹ウイルスの主な受容体である。ネクチン-1(PVRL1)またはネクチン-4(PVRL4)をコードする遺伝子の突然変異は、他の異常に関連する外胚葉性異形成症候群を引き起こす。ネクチン-4は、胎児発生中に発現される。成人組織では、その発現が、ファミリーの他のメンバーの発現よりも制限される。ネクチン-4は、乳癌、卵巣癌および肺癌のそれぞれ50%、49%および86%における腫瘍関連抗原であり、ほとんど予後不良の腫瘍上にある。その発現は、対応する正常組織では検出されない。乳房腫瘍では、ネクチン-4が、主にトリプルネガティブおよびERBB2+癌で発現される。これらのがんを有する患者の血清では、ネクチン-4の可溶性の検出が、予後不良に関連している。血清ネクチン-4のレベルは、転移進行中に増加し、治療後に減少する。これらの結果は、ネクチン-4が、がんの治療の信頼できる標的となり得ることを示唆している。したがって、いくつかの抗ネクチン-4抗体が先行技術で記載されている。特に、エンホルツマブペドチン(ASG-22ME)は、ネクチン-4を標的とする抗体薬物複合体(ADC)であり、固形腫瘍を患っている患者の治療について現在臨床的に調査されている。

【0053】

一実施形態では、第2のペプチドリガンドがネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドを含む。

【0054】

ネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドの適切な例は、そのペプチドが引用することにより本明細書の一部をなすものとする、英国特許出願第1810250.9号、同第1815684.4号および同第1818499.4号に開示されている。

【0055】

10

20

30

40

50

一実施形態では、ネクチン - 4 結合二環式ペプチドリガンドが、
 $C_i P[1Na1][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (配列番号 15 ; 以下、BCY8116 と呼ぶ) ;
 $C_i P[1Na1][dD]C_{ii}M[HArg]D[dW]STP[HyP][dW]C_{iii}$ (配列番号 16 ; 以下、BCY11415 と呼ぶ) ; および
 $C_i P[1Na1][dK](Sar_{10}-(B-Ala))C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (配列番号 17) ;
 $C_i PFGC_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$ (配列番号 18 ; 以下、BCY11414 と呼ぶ) ;
(式中、 C_i 、 C_{ii} および C_{iii} はそれぞれ第 1、第 2 および第 3 のシステイン残基を表し、1Na1 は 1 - ナフチルアラニンを表し、HArg はホモアルギニンを表し、HyP はヒドロキシプロリンを表し、 Sar_{10} は 10 個のサルコシン単位を表し、B-Ala は - アラニンを表す)
から選択されるアミノ酸配列またはその薬学的に許容される塩を含む。
【0056】

10

さらなる実施形態では、ネクチン - 4 結合二環式ペプチドリガンドが、場合により、N 末端修飾を含み、
配列番号 15 (以下、BCY8116 と呼ぶ) ;
 $[PYA]-[B-Ala]-[Sar_{10}]$ - (配列番号 15) (以下、BCY8846 と呼ぶ) ;
配列番号 16 (以下、BCY11415 と呼ぶ) ;
 $[PYA]-[B-Ala]-[Sar_{10}]$ - (配列番号 16) (以下、BCY11942 と呼ぶ) ;
Ac - (配列番号 17) (以下、BCY8831 と呼ぶ) ; および
配列番号 18 (以下、BCY11414 と呼ぶ) ;
(式中、PYA は 4 - ペンチン酸を表し、B-Ala は - アラニンを表し、 Sar_{10} は 10 個のサルコシン単位を表す)
またはその薬学的に許容される塩を含む。
【0057】

20

代替実施形態では、がん細胞上に存在する成分が前立腺特異的膜抗原 (PSMA) である。
【0058】
前立腺特異的膜抗原 (PSMA) (グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ II (GCP II)、N - アセチル - L - アスパルチル - L - グルタミン酸ペプチダーゼ I (NAALADase I) および NAAG ペプチダーゼとしても知られている) は、ヒトでは、FOLH1 (葉酸ヒドロラーゼ 1) 遺伝子によってコードされる酵素である。ヒト GCP II は、750 アミノ酸を含み、重さがおよそ 84 kDa である。

30

【0059】
ヒト PSMA は、前立腺で高度に、ほとんどの他の組織よりもおよそ 100 倍高く発現される。いくつかの前立腺がんでは、PSMA が、2 番目に多く上方制御される遺伝子産物であり、非がん性前立腺細胞のレベルよりも 8 ~ 12 倍増加している。この高い発現のために、PSMA は、いくつかのがんの療法および画像化のための潜在的なバイオマーカーとして開発されている。ヒト前立腺がんでは、より高度に発現している腫瘍は、進行までの時間が速く、再発を患う患者の割合が高いことを伴う。

40

【0060】
一実施形態では、第 2 のペプチドリガンドが PSMA 結合二環式ペプチドリガンドを含む。
【0061】

PSMA 結合二環式ペプチドリガンドの適切な例は、そのペプチドが引用することにより本明細書の一部をなすものとする、英国特許出願第 1810318.4 号、同第 181

50

0325.9号および同第1820325.7号に開示されている。

【0062】

リンカー

第1のペプチドリガンドを、任意の適切なリンカーを介して第2のペプチドリガンドにコンジュゲートすることができることが理解されるだろう。典型的には、前記リンカーの設計は、2つの二環式ペプチドが、単独で、または両標的受容体に同時に結合している間にそれぞれの標的に邪魔されずに結合することができるように提供されるようなものとなる。さらに、リンカーは、所望の機能的帰結をもたらす標的細胞間の適切な距離を維持しながら、両標的に同時に結合することを許すべきである。リンカーの特性を、所望の機能的帰結を最適化するために、長さ、剛性または可溶性を増加させるよう調節することができる。リンカーを、2つ以上の二環が同じ標的に付着することを許すよう設計することもできる。いずれかの結合ペプチドの結合価を増加させることが、標的細胞に対するヘテロタンデムの親和性を増加させるのに役立ち得る、または標的受容体の一方もしくは両方のオリゴマー化を誘導するのに役立ち得る。

10

【0063】

一実施形態では、リンカーが、以下の配列、 $-CH_2-$ 、 $-PEG_5-$ 、 $-PEG_{10}-$ 、 $-PEG_{12}-$ 、 $-PEG_{23}-$ 、 $-PEG_{24}-$ 、 $-PEG_{15}-Sar_5-$ 、 $-PEG_{10}-Sar_{10}-$ 、 $-PEG_5-Sar_{15}-$ 、 $-PEG_5-Sar_5-$ 、 $-B-Ala-Sar_{20}-$ 、 $-B-Ala-Sar_{10}-PEG_{10}-$ 、 $-B-Ala-Sar_5-PEG_{15}-$ および $B-Ala-Sar_5-PEG_5-$ から選択される。

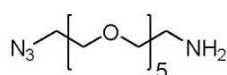
20

【0064】

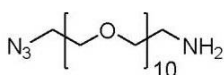
適切なリンカーの構造的表現を以下に詳述する。

【0065】

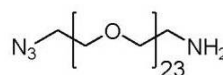
【化1】



H2N-Peg5-N3
COM00000132

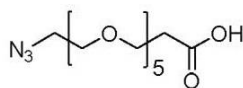


H2N-Peg10-N3
COM00000134

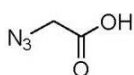


H2N-Peg23-N3
COM00000135

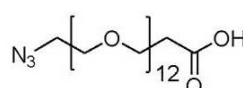
30



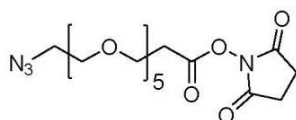
N3-PEG5-COOH
COM00000467



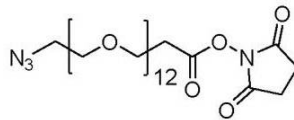
N3-CH2-COOH
COM00000468



N3-PEG12-COOH
COM00000466



NHS-PEG5-N3



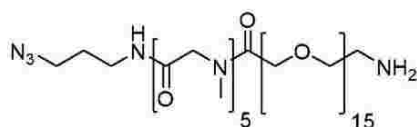
NHS-PEG12-N3

40

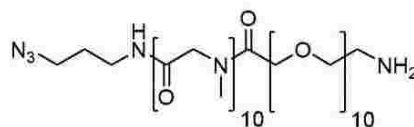
【0066】

50

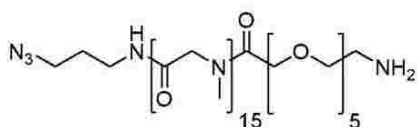
【化 2】



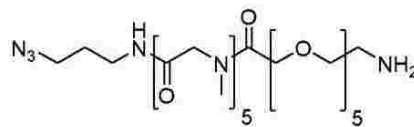
H2N-PEG15-SAR5-N3
COM00000128



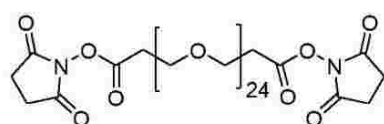
H2N-PEG10-SAR10-N3
COM00000129



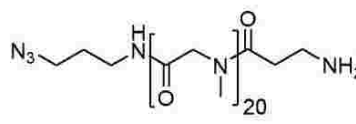
H2N-PEG5-SAR15-N3
COM00000130



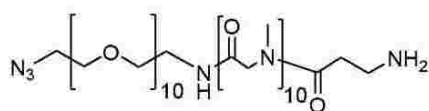
H2N-PEG5-SAR5-N3
COM00000131



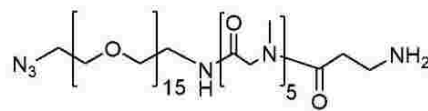
NHS-PEG24-NHS
COM00000469



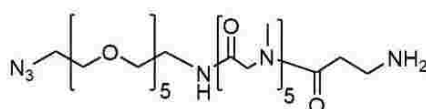
H2N-(B-Ala)-SAR20-N3
COM00000470



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



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



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

【 0 0 6 7 】

ヘテロタンデム複合体

1つの具体的な実施形態では、第1のペプチドリガンドが、T A T A足場に結合したC D 1 3 7結合二環式ペプチドリガンドを含み、第2のペプチドリガンドが、T A T A足場に結合したE p h A 2結合二環式ペプチドリガンドを含み、前記ヘテロタンデム複合体が

【 0 0 6 8 】

10

20

30

40

50

【表 1】

複合体 番号	EphA2 BCY番号	結合点	リンカー	CD137 BCY番号	結合点
BCY9173	BCY6169	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C末端Dap
BCY7985	BCY6169	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C末端Dap
BCY8942	BCY6169	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8045	C末端Dap
BCY8943	BCY8941	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C末端Dap
BCY9647	BCY6099	N末端	-PEG ₁₀ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9648	BCY6099	N末端	-PEG ₂₃ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9655	BCY6099	N末端	-PEG ₁₅ - Sar ₅ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9656	BCY6099	N末端	-PEG ₁₀ - Sar ₁₀ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9657	BCY6099	N末端	-PEG ₅ - Sar ₁₅ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9658	BCY6099	N末端	-PEG ₅ - Sar ₅ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9659	BCY6099	N末端	-PEG ₅ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9758	BCY6099	N末端	-PEG ₂₄ -	BCY7732	C末端Dap
BCY10568	BCY6169	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8919	Lys3
BCY10570	BCY6169	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8920	dLys4
BCY10574	BCY9594	N末端	-PEG ₅ -	BCY8927	Lys (PYA)3
BCY10575	BCY9594	N末端	-PEG ₅ -	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY10576	BCY9594	N末端	-PEG ₅ -	BCY11014	C末端Dap(PYA)
BCY10577	BCY6169	N末端	-CH ₂ -	BCY9172	C末端Dap

10

20

30

から選択される。

【0069】

ヘテロタンデム二環式ペプチド複合体BCY7985は、PEG₁₂を介してEphA2特異的ペプチドBCY6169のN末端PYA基に連結されたCD137特異的ペプチドBCY7859からなる(図2に絵によって示される)。

【0070】

CD137はホモ三量体タンパク質であり、天然リガンドCD137Lは、免疫細胞上で発現されるまたは分泌されるホモ三量体として存在する。CD137の生物学は、免疫細胞でCD137活性を誘導するための多量体化に高度に依存する。CD137多量体化をもたらす1つの方法は、別の細胞上に存在する特異的受容体との相互作用を通したCD137特異的アゴニストの細胞架橋を通したものである。

40

【0071】

EphA2は、腫瘍細胞上で高度に発現され、エフリン-Aリガンドによるこの受容体チロシンキナーゼのオリゴマー化が、その活性化を駆動する。理論によって拘束されるものではないが、本発明者らは、1つのCD137特異的ペプチドにカップリングした1つのEphA2特異的ペプチドからなるEphA2-CD137ヘテロタンデムが、CD137を架橋するよう作用すると考えている。どうやらCD137が、腫瘍細胞などの細胞上で、EphA2の存在下で多量体化および活性化されるようである。これにより、局所

50

腫瘍環境でのCD137免疫細胞活性化が駆動されるだろう（図1）。

【0072】

この仮説を、本明細書に記載されるCD137細胞活性レポーターアッセイで試験し、結果を図3で本明細書において示すと、BCY7985が、EphA2発現HT1080細胞の存在下、Promega CD137ルシフェラーゼレポーターアッセイ（CS196008）でCD137細胞活性の強力な誘導を示したことが分かる。

【0073】

1つの代替の具体的な実施形態では、第1のペプチドリガンドが、TATA足場に結合したCD137結合二環式ペプチドリガンドを含み、第2のペプチドリガンドが、TATA足場に結合したネクチン-4結合二環式ペプチドリガンドを含み、前記ヘテロタンデム複合体が、

【0074】

【表2-1】

複合体 番号	ネクチン-4 BCY番号	結合点	リンカー	CD137 BCY番号	結合点
BCY8854	BCY8846	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C末端Dap
BCY9350	BCY11942	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C末端Dap
BCY9351	BCY8846	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8045	C末端Dap
BCY9399	BCY8116	N末端	-PEG ₁₀ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9400	BCY8116	N末端	-PEG ₂₃ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9401	BCY8116	N末端	-B-Ala- Sar ₂₀ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9403	BCY8116	N末端	-B-Ala- Sar ₁₀ - PEG ₁₀ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9405	BCY8116	N末端	-B-Ala- Sar ₅ - PEG ₁₅ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9406	BCY8116	N末端	-B-Ala- Sar ₅ - PEG ₅ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9407	BCY8116	N末端	-PEG ₁₅ - Sar ₅ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9408	BCY8116	N末端	-PEG ₁₀ - Sar ₁₀ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

BCY9409	BCY8116	N末端	-PEG ₅ - Sar ₁₅ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9410	BCY8116	N末端	-PEG ₅ - Sar ₅ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9411	BCY8116	N末端	-PEG ₅ -	BCY7741	C末端Dap(PYA)
BCY9759	BCY8116	N末端	-PEG ₂₄ -	BCY7732	C末端Dap
BCY10000	BCY8846	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C末端Dap
BCY10567	BCY8846	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8919	Lys3
BCY10569	BCY8846	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY8920	dLys4
BCY10571	BCY8116	N末端	-PEG ₅ -	BCY8927	Lys(PYA)3
BCY10572	BCY8116	N末端	-PEG ₅ -	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY10573	BCY8116	N末端	-PEG ₅ -	BCY11014	C末端Dap(PYA)
BCY10578	BCY8846	N末端PYA	-CH ₂ -	BCY9172	C末端Dap
BCY10917	BCY8831	dLys(Sar ₁₀)-(B-Ala))4	-PEG ₁₂ -	BCY11014	C末端Dap(PYA)
BCY11020	BCY8831	dLys(Sar ₁₀)-(B-Ala))4	-PEG ₅ -	BCY11014	C末端Dap(PYA)
BCY11373	BCY8116	N末端	-CH ₂ -	BCY8927	Lys(PYA)3
BCY11374	BCY8116	N末端	-CH ₂ -	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY11375	BCY8116	N末端	-CH ₂ -	BCY11014	C末端Dap(PYA)
BCY11616	BCY8116	N末端	-PEG ₅ -	BCY7744	dLys (PYA)4
BCY11617	BCY8116	N末端	-PEG ₅ -	BCY11506	Lys(PYA)4
BCY11857	BCY11414	N末端	-PEG ₅ -	BCY7744	dLys (PYA)4
BCY11858	BCY11414	N末端	-PEG ₅ -	BCY8928	dLys (PYA)4
BCY11859	BCY11415	N末端	-PEG ₅ -	BCY8928	dLys (PYA)4

から選択される。

【 0 0 7 5 】

理論によって拘束されるものではないが、本発明者らは、1つのCD137特異的ペプチドにカップリングした1つのネクチン - 4特異的ペプチドからなるネクチン - 4 - CD137ヘテロタンデムが、EphA2について前に記載されるのと同様に、CD137を架橋するよう作用すると考えている。

【 0 0 7 6 】

一実施形態では、ネクチン - 4 - CD137ヘテロタンデムが、BCY11857、BCY11858および/またはBCY11859のうちのいずれか1つまたは複数以外である。

【 0 0 7 7 】

1つの代替の具体的な実施形態では、第1のペプチドリガンドが、TATA足場に結合したCD137結合二環式ペプチドリガンドを含み、第2のペプチドリガンドが、TATA足場に結合したPD-L1結合二環式ペプチドリガンドを含み、前記ヘテロタンデム複合体が、

【 0 0 7 8 】

10

20

30

40

50

【表 3】

複合体 番号	PD-L1 BCY番号	結合点	リンカー	CD137 BCY番号	結合点
BCY8939	BCY8938	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY7732	C末端Dap
BCY10580	BCY10043	N末端PYA	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C末端Dap
BCY10581	BCY10044	C末端Lys(PYA)	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C末端Dap
BCY10582	BCY10045	Lys(PYA)9	-PEG ₁₂ -	BCY9172	C末端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末端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末端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末端Dap

10

20

から選択される。

【0079】

理論によって拘束されるものではないが、本発明者らは、1つのCD137特異的ペプチドにカップリングした1つのPD-L1特異的ペプチドからなるPD-L1-CD137ヘテロタンデムが、EphA2について前に記載されるのと同様に、CD137を架橋するよう作用すると考えている。

【0080】

30

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、ペプチド化学、細胞培養およびファージディスプレイ、核酸化学および生化学の分野などの当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。引用することにより本明細書の一部をなすものとする、標準的な技術が、分子生物学、遺伝子および生化学方法に使用される(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. 参照)。

40

【0081】

命名法

番号付け

本発明の化合物内のアミノ酸残基位置に言及する場合、システイン残基(C_i、C_{ii}およびC_{iii})は不変であるため番号付けから省かれるので、配列番号1内のアミノ酸残基の番号付けは、

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

と呼ばれる。

【0082】

50

本明細書の目的のために、全ての二環式ペプチドは、T B M B (1 , 3 , 5 - トリス (プロモメチル) ベンゼン) または 1 , 1 ' , 1 ' ' - (1 , 3 , 5 - トリアジナン - 1 , 3 , 5 - トリイル) トリプロパ - 2 - エン - 1 - オン (1 , 1 ' , 1 ' ' - (1 , 3 , 5 - triazinane - 1 , 3 , 5 - triyl) triprop - 2 - en - 1 - one : T A T A) で環化され、三置換構造をもたらすと仮定される。T B M B および T A T A による環化は、C_i、C_{ii} および C_{iii} で起こる。

【 0 0 8 3 】

分子フォーマット

二環コア配列への N 末端伸長または C 末端伸長は、配列の左側または右側に付加され、ハイフンによって分離される。例えば、N 末端 A l a - S a r 1 0 - A l a 尾部は、A l a - S a r 1 0 - A - (配列番号 X) として表される。

10

【 0 0 8 4 】

逆ペプチド配列

N a i r e t a l (2 0 0 3) J I m m u n o l 1 7 0 (3) , 1 3 6 2 - 1 3 7 3 の開示に照らして、本明細書に開示されるペプチド配列が、そのレトロインベルソ型 (r e t r o - i n v e r s o f o r m) でも有用性を見出すと想定される。例えば、配列が逆にされ (すなわち、N 末端が C 末端になる、および逆もまた同様である)、その立体化学も同様に逆にされる (すなわち、D - アミノ酸が L - アミノ酸になる、および逆もまた同様である)。

【 0 0 8 5 】

ペプチドリガンド

本明細書で言及されるペプチドリガンドは、分子足場に共有結合したペプチドを指す。典型的には、このようなペプチドは、足場との共有結合を形成することができる 2 つ以上の反応性基 (すなわち、システイン残基)、およびペプチドが足場に結合している場合に、ループを形成するので、ループ配列と呼ばれる、前記反応性基の間に定められる配列を含む。この場合、ペプチドは、少なくとも 3 つのシステイン残基 (本明細書では C_i、C_{ii} および C_{iii} と呼ばれる) を含み、足場上に少なくとも 2 つのループを形成する。

20

【 0 0 8 6 】

薬学的に許容される塩

塩形態が本発明の範囲内にあり、ペプチドリガンドへの言及が、前記リガンドの塩形態を含むことが理解されるだろう。

30

【 0 0 8 7 】

本発明の塩は、P h a r m a c e u t i c a l S a l t s : P r o p e r t i e s , S e l e c t i o n , a n d U s e , P . H e i n r i c h S t a h l (E d i t o r) , C a m i l l e G . W e r m u t h (E d i t o r) , I S B N : 3 - 9 0 6 3 9 - 0 2 6 - 8 , H a r d c o v e r , 3 8 8 p a g e s , A u g u s t 2 0 0 2 に記載される方法などの従来の化学的方法によって塩基性部分または酸性部分を含む親化合物から合成することができる。一般的に、このような塩は、これらの化合物の遊離酸形態または遊離塩基形態を、水もしくは有機溶媒または 2 者の混合物中、適切な塩基または酸と反応させることによって調製することができる。

【 0 0 8 8 】

酸付加塩 (一塩または二塩) は、無機と有機の両方の、多種多様な酸で形成され得る。酸付加塩の例としては、酢酸、2 , 2 - ジクロロ酢酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸 (例えば、L - アスコルビン酸)、L - アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、4 - アセトアミド安息香酸、ブタン酸、(+) 樟脳酸、カンファースルホン酸、(+) - (1 S) - カンファー - 1 0 - スルホン酸、カプリン酸、カプロン酸、カプリル酸、ケイヒ酸、クエン酸、シクラミン酸、ドデシル硫酸、エタン - 1 , 2 - ニスルホン酸、エタンスルホン酸、2 - ヒドロキシエタンスルホン酸、ギ酸、フマル酸、ガラクトール酸、ゲンチジン酸、グルコヘプトン酸、D - グルコン酸、グルクロン酸 (例えば、D - グルクロン酸)、グルタミン酸 (例えば、L - グルタミン酸)、- オキシグルタル酸、グリコール酸、馬尿酸、ハロゲン化水素酸 (例えば、臭化水素酸、塩酸、ヨウ化水素酸)、

40

50

イセチオン酸、乳酸（例えば、 $(+)$ -L-乳酸、 (\pm) -DL-乳酸）、ラクトピオン酸、マレイン酸、リンゴ酸、 $(-)$ -L-リンゴ酸、マロン酸、 (\pm) -DL-マンデル酸、メタンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ナフタレン-1,5-ジスルホン酸、1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、ニコチン酸、硝酸、オレイン酸、オロト酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモ酸、リン酸、プロピオン酸、ピルビン酸、L-ピログルタミン酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、硫酸、タンニン酸、 $(+)$ -L-酒石酸、チオシアン酸、p-トルエンスルホン酸、ウンデシレン酸および吉草酸、ならびにアシル化アミノ酸および陽イオン交換樹脂からなる群から選択される酸で形成される一塩または二塩が挙げられる。

【0089】

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

【0090】

化合物がアニオン性である、またはアニオン性になり得る官能基を有する（例えば、 $-COOH$ は $-COO^-$ になり得る）場合、塩が有機塩基または無機塩基で形成され、適切なカチオンを生成し得る。適切な無機カチオンの例としては、それだけに限らないが、 Li^+ 、 Na^+ および K^+ などのアルカリ金属イオン、 Ca^{2+} および Mg^{2+} などのアルカリ土類金属カチオン、ならびに Al^{3+} または Zn^{2+} などの他のカチオンが挙げられる。適切な有機カチオンの例としては、それだけに限らないが、アンモニウムイオン（すなわち、 NH_4^+ ）および置換アンモニウムイオン（例えば、 NH_3R^+ 、 $NH_2R_2^+$ 、 NHR_3^+ 、 NR_4^+ ）が挙げられる。いくつかの適切な置換アンモニウムイオンの例は、メチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、プロピルアミン、ジシクロヘキシルアミン、トリエチルアミン、ブチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジン、ベンジルアミン、フェニルベンジルアミン、コリン、メグルミンおよびトロメタミン、ならびにリジンおよびアルギニンなどのアミノ酸から誘導されるものである。一般的な第四級アンモニウムイオンの例は、 $N(CH_3)_4^+$ である。

【0091】

本発明の化合物がアミン官能基を含む場合、これらは、例えば、当業者に周知の方法に従って、アルキル化剤との反応によって、第四級アンモニウム塩を形成し得る。このような第四級アンモニウム化合物は、本発明の範囲内である。

【0092】

修飾誘導体

本明細書に定義されるペプチドリガンドの修飾誘導体は本発明の範囲内であることが理解されるだろう。このような適切な修飾誘導体の例としては、N末端修飾および/またはC末端修飾；1つまたは複数のアミノ酸残基の1つまたは複数の非天然アミノ酸残基による置き換え（1つまたは複数の極性アミノ酸残基の1つまたは複数の等価または等電子アミノ酸による置き換え；1つまたは複数の非極性アミノ酸残基の他の非天然等価または等電子アミノ酸による置き換えなど）；スパーサー基の付加；1つまたは複数の酸化感受性アミノ酸残基の1つまたは複数の酸化耐性アミノ酸残基による置き換え；1つまたは複数のアミノ酸残基のアラニンによる置き換え、1つまたは複数のL-アミノ酸残基の1つまたは複数のD-アミノ酸残基による置き換え；二環式ペプチドリガンド内の1つまたは複数のアミド結合のN-アルキル化；1つまたは複数のペプチド結合の代理結合による置き換え；ペプチド骨格長の修飾；1つまたは複数のアミノ酸残基の炭素上の水素の別の化学基による置換、システイン、リジン、グルタミン酸/アスパラギン酸およびチロシンなどのアミノ酸の、前記アミノ酸を官能化するための適切なアミン、チオール、カルボン酸およびフェノール-反応性試薬による修飾、ならびにそれぞれ、官能化に適した直交性

10

20

30

40

50

反応基、例えば、アジドを導入するアミノ酸、またはアルキンによる官能化を可能にするアルキン基保有アミノ酸、またアジド保有部分の導入または置き換えから選択される1つまたは複数の修飾が挙げられる。

【0093】

一実施形態では、修飾誘導体がN末端修飾および/またはC末端修飾を含む。さらなる実施形態では、修飾誘導体が、適切なアミノ反応性化学を使用したN末端修飾、および/または適切なカルボキシ反応性化学を使用したC末端修飾を含む。さらなる実施形態では、前記N末端修飾またはC末端修飾が、それだけに限らないが、細胞傷害剤、放射性キレート剤または発色団を含むエフェクター基の付加を含む。

【0094】

さらなる実施形態では、修飾誘導体がN末端修飾を含む。さらなる実施形態では、N末端修飾がN末端アセチル基を含む。この実施形態では、N末端システイン基（本明細書でC_iと呼ばれる基）が、ペプチド合成中に無水酢酸または他の適切な試薬でキャッピングされて、N末端アセチル化された分子をもたらす。この実施形態は、アミノペプチダーゼにとっての潜在的な認識点を除去するという利点を提供し、二環式ペプチドの分解の可能性を回避する。

【0095】

代替実施形態では、N末端修飾が、エフェクター基のコンジュゲーションおよび二環式ペプチドの標的に対する効力の保持を促進する分子スペーサー基の付加を含む。

【0096】

さらなる実施形態では、修飾誘導体がC末端修飾を含む。さらなる実施形態では、C末端修飾がアミド基を含む。この実施形態では、C末端システイン基（本明細書でC_{iii}と呼ばれる基）が、ペプチド合成中にアミドとして合成されて、C末端アミド化された分子をもたらす。この実施形態は、カルボキシペプチダーゼにとっての潜在的な認識点を除去するという利点を提供し、二環式ペプチドのタンパク質分解の可能性を減少させる。

【0097】

一実施形態では、修飾誘導体が、1つまたは複数のアミノ酸残基の1つまたは複数の非天然アミノ酸残基による置き換えを含む。この実施形態では、分解性プロテアーゼによって認識されず、標的効力に対する有害効果も有さない等価/等電子側鎖を有する非天然アミノ酸が選択され得る。

【0098】

あるいは、近くのペプチド結合のタンパク質分解性加水分解がコンフォメーション的および立体的に妨げられるように、拘束されたアミノ酸側鎖を有する非天然アミノ酸が使用され得る。特に、これらは、プロリン類似体、嵩高い側鎖、C - 二置換誘導体（例えば、アミノイソ酪酸、Aib）およびシクロアミノ酸、アミノシクロプロピルカルボン酸である単純な誘導体に関する。

【0099】

一実施形態では、修飾誘導体がスペーサー基の付加を含む。さらなる実施形態では、修飾誘導体が、N末端システイン（C_i）および/またはC末端システイン（C_{iii}）に対するスペーサー基の付加を含む。

【0100】

一実施形態では、修飾誘導体が、1つまたは複数の酸化感受性アミノ酸残基の1つまたは複数の酸化耐性アミノ酸残基による置き換えを含む。さらなる実施形態では、修飾誘導体が、トリプトファン残基のナフチルアラニンまたはアラニン残基による置き換えを含む。この実施形態は、結果として生じる二環式ペプチドリガンドの薬学的安定性プロファイルを改善するという利点を提供する。

【0101】

一実施形態では、修飾誘導体が、1つまたは複数の荷電アミノ酸残基の1つまたは複数の疎水性アミノ酸残基による置き換えを含む。代替実施形態では、修飾誘導体が、1つまたは複数の疎水性アミノ酸残基の1つまたは複数の荷電アミノ酸残基による置き換えを含

10

20

30

40

50

む。荷電アミノ酸残基対疎水性アミノ酸残基の正しいバランスが、二環式ペプチドリガンドの重要な特性である。例えば、疎水性アミノ酸残基は、血漿タンパク質結合の程度に影響を及ぼし、よって、血漿中の遊離の利用可能な画分の濃度に影響を及ぼす一方、荷電アミノ酸残基（特に、アルギニン）は、ペプチドと細胞表面上のリン脂質膜の相互作用に影響を及ぼし得る。この2つは組み合わせさせて、ペプチド薬物の半減期、分布容積および曝露に影響を及ぼし得るので、臨床的エンドポイントに従って調整することができる。さらに、荷電アミノ酸残基対疎水性アミノ酸残基の正しい組み合わせおよび数は、注射部位での刺激を減少させ得る（ペプチド薬物が皮下投与されている場合）。

【0102】

一実施形態では、修飾誘導体が、1つまたは複数のL-アミノ酸残基の1つまたは複数のD-アミノ酸残基による置き換えを含む。この実施形態は、立体障害およびD-アミノ酸がターンコンフォメーションを安定化する傾向によってタンパク質分解安定性を増加させると考えられる（Tugyi et al (2005) PNAS, 102(2), 413-418）。

10

【0103】

一実施形態では、修飾誘導体が、任意のアミノ酸残基の除去およびアラニンによる置換を含む。この実施形態は、潜在的なタンパク質分解攻撃部位（複数可）を除去するという利点を提供する。

【0104】

上記修飾の各々が、ペプチドの効力または安定性を計画的に改善するのに役立つことに留意すべきである。修飾に基づくさらなる効力改善は、

20

- より高い親和性が達成されるように、疎水性効果を利用し、より低い解離速度をもたらす疎水性部分を組み込むこと；
- 長期のイオン相互作用を利用して、より速い会合速度およびより高い親和性をもたらす荷電基を組み込むこと（例えば、Schreiber et al, Rapid, electrostatically assisted association of proteins (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31 参照）；および

- 例えば、標的結合時のエントロピー損失が最小となるように、アミノ酸の側鎖を正しく拘束すること、標的結合時のエントロピー損失が最小となるように、骨格のねじれ角を拘束すること、および同一の理由で追加の環化を分子に導入することによって、追加の拘束をペプチドに組み込むこと

30

という機構を通して達成され得る（概要については、Gentilucci et al, Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203, およびNestor et al, Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418 参照）。

【0105】

同位体変種

本発明は、1つまたは複数の原子が、同じ原子番号を有するが、天然で通常見られる原子質量または質量数とは異なる原子質量または質量数を有する原子によって置き換えられている、本発明の全ての薬学的に許容される（放射性）同位体標識ペプチドリガンド、および関連する（放射性）同位体を保持することができる金属キレート基が結合している（「エフェクター」と呼ばれる）本発明のペプチドリガンド、および一定の官能基が関連する（放射性）同位体または同位体標識官能基で共有結合的に置き換えられている、本発明のペプチドリガンドを含む。

40

【0106】

本発明のペプチドリガンドに含めるのに適した同位体の例としては、 ^2H （D）および ^3H （T）などの水素の同位体、 ^{11}C 、 ^{13}C および ^{14}C などの炭素の同位体、 ^{36}Cl などの塩素の同位体、 ^{18}F などのフッ素の同位体、 ^{123}I 、 ^{125}I および ^{131}I などのヨウ素の同位体、 ^{13}N および ^{15}N などの窒素の同位体、 ^{15}O 、 ^{17}O および ^{18}O

50

などの酸素の同位体、 ^{32}P などのリンの同位体、 ^{35}S などの硫黄の同位体、 ^{64}Cu などの銅の同位体、 ^{67}Ga または ^{68}Ga などのガリウムの同位体、 ^{90}Y などのイットリウムの同位体、ならびに ^{177}Lu などのルテニウムの同位体、ならびに ^{213}Bi などのビスマスの同位体が挙げられる。

【0107】

本発明の一定の同位体標識ペプチドリガンド、例えば、放射性同位体を組み込んだものは、薬物および/または基質組織分布研究において、ならびに疾患組織上のネクチン-4標的の存在および/または非存在を臨床的に評価するために有用である。本発明のペプチドリガンドは、標識化合物と他の分子、ペプチド、タンパク質、酵素または受容体との間の複合体の形成を検出または特定するために使用することができるという点で、有用な診断特性をさらに有することができる。検出または特定方法は、放射性同位体、酵素、蛍光物質、発光物質（例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、エクオリンおよびルシフェラーゼ）等などの標識剤で標識された化合物を使用することができる。放射性同位体トリチウム、すなわち、 ^3H （T）および炭素-14、すなわち、 ^{14}C が、組み込みの容易さおよび迅速な検出手段を考慮して、この目的に特に有用である。

10

【0108】

重水素、すなわち、 ^2H （D）などのより重い同位体による置換は、より大きな代謝安定性に起因する一定の治療上の利点、例えば、インビボ半減期の増加または投与量要求の減少を与えることができ、よって、状況によって好まれ得る。

【0109】

^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O および ^{13}N などの陽電子放出同位体による置換は、標的占有率を調査するためのポジトロン断層法（Positron Emission Topography）（PET）で有用となり得る。

20

【0110】

本発明のペプチドリガンドの同位体標識化合物は、一般に、当業者に知られている従来技術によって、または前に使用された非標識試薬の代わりに適切な同位体標識試薬を使用して付随する実施例に記載されるのと同様の方法によって調製することができる。

【0111】

分子足場

分子足場は、例えば、国際公開第2009/098450号およびその中に引用される参考文献、特に国際公開第2004/077062号および国際公開第2006/078161号に記載される。

30

【0112】

前記文献に言及されるように、分子足場は、小有機分子などの小分子であり得る。

【0113】

一実施形態では、分子足場が高分子であり得る。一実施形態では、分子足場が、アミノ酸、ヌクレオチドまたは炭水化物で構成される高分子である。

【0114】

一実施形態では、分子足場が、ポリペプチドの官能基（複数可）と反応して、共有結合を形成することができる反応性基を含む。

40

【0115】

分子足場は、アミン、チオール、アルコール、ケトン、アルデヒド、ニトリル、カルボン酸、エステル、アルケン、アルキン、アジド、無水物、スクシンイミド、マレイミド、ハロゲン化アルキルおよびハロゲン化アシルなどの、ペプチドと結合を形成する化学基を含み得る。

【0116】

一実施形態では、分子足場が、ヘキサヒドロ-1,3,5-トリアジン、特に1,3,5-トリアクリロイルヘキサヒドロ-1,3,5-トリアジン（「TATA」）またはその誘導体を含み得る、またはからなり得る。

【0117】

50

一実施形態では、分子足場が 2, 4, 6 - トリス (ブロモメチル) メシチレンである。この分子は、1, 3, 5 - トリス (ブロモメチル) ベンゼン (T B M B) と類似であるが、ベンゼン環に結合した 3 つの追加のメチル基を含む。これは、追加のメチル基がポリペプチドとのさらなる接点を形成し、よって、追加の構造上の拘束を加え得るという利点を有する。

【0118】

本発明の分子足場は、本発明のコードされるライブラリーのポリペプチドの官能基が、分子足場と共有結合的連結を形成することを可能にする化学基を含む。前記化学基は、アミン、チオール、アルコール、ケトン、アルデヒド、ニトリル、カルボン酸、エステル、アルケン、アルキン、無水物、スクシンイミド、マレイミド、アジド、ハロゲン化アルキルおよびハロゲン化アシルを含む広範囲の官能基から選択される。

10

【0119】

システインのチオール基と反応するために分子足場上で使用され得る足場反応性基は、ハロゲン化アルキル (またはハロゲノアルカンもしくはハロアルカンとも呼ばれる) である。

【0120】

例としては、ブロモメチルベンゼン (T B M B) によって例示される足場反応性基) またはヨードアセトアミドが挙げられる。化合物をタンパク質中のシステインに選択的にカップリングするために使用される他の足場反応性基は、マレイミド、不飽和カルボニル含有化合物および - ハロメチルカルボニル含有化合物である。本発明で分子足場として使用され得るマレイミドの例としては、トリス - (2 - マレイミドエチル) アミン、トリス - (2 - マレイミドエチル) ベンゼン、トリス - (マレイミド) ベンゼンが挙げられる。不飽和カルボニル含有化合物の例は、1, 1', 1'' - (1, 3, 5 - トリアジナン - 1, 3, 5 - トリイル) トリプロパ - 2 - エン - 1 - オン (T A T A) (Angewandte Chemie, International Edition (2014), 53 (6), 1602 - 1606) である。 - ハロメチルカルボニル含有化合物の例は、N, N', N'' - (ベンゼン - 1, 3, 5 - トリイル) トリス (2 - ブロモアセトアミド) である。セレノシステインも、システインと同様の反応性を有し、同じ反応に使用することができる天然アミノ酸である。よって、文脈が別のことを示唆しない限り、システインが言及される場合はいつでも、セレノシステインで置換することが典型的に許容される。

20

30

【0121】

合成

本発明のペプチドは、標準的な技術によって合成的に製造され、引き続いてインビトロで分子足場と反応し得る。これを実施する場合、標準的な化学が使用され得る。これにより、さらなる下流の実験または検証のために可溶性材料の迅速な大規模調製が可能になる。このような方法は、Timmerman et al (上記) に開示されるような従来の化学を使用して達成することができるだろう。

【0122】

よって、本発明はまた、本明細書に示される、選択されるポリペプチドまたはコンジュゲートの製造であって、以下で説明される任意のさらなるステップを含む製造に関する。一実施形態では、これらのステップが、化学合成によって調製された最終生成物ポリペプチド/コンジュゲートに行われる。

40

【0123】

コンジュゲートまたは複合体を製造する場合、場合により、目的のポリペプチド中のアミノ酸残基を置換してもよい。

【0124】

ペプチドを伸長して、例えば、別のループを組み込み、よって、複数の特異性を導入することもできる。

【0125】

ペプチドを伸長するために、標準的な固相または液相化学を使用して、直交的に保護さ

50

れた (orthogonally protected) リジン (および類似体) を使用して、ペプチドをその N 末端もしくは C 末端で、またはループ内で化学的に簡単に伸長することができる。標準的な (バイオ) コンジュゲーション技術を使用して、活性化もしくは活性化可能な N 末端または C 末端を導入することができる。あるいは、例えば、(Dawson et al. 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science 266: 776 - 779) に記載されるように、フラグメント縮合もしくは天然化学ライグーションによって、または (Chang et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 20; 91(26): 12544 - 8) もしくは Hikari et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000 - 6003) に記載されるサブチリガーゼ (subtiligase) を使用して、酵素によって、付加を行うことができる。

【0126】

あるいは、ジスルフィド結合を通したさらなるコンジュゲーションによって、ペプチドを伸長または修飾することができる。これは、第 1 および第 2 のペプチドが、細胞の還元環境内で一度に互いに解離することを可能にするという追加の利点を有する。この場合、分子足場 (例えば、TBMB) を第 1 のペプチドの化学合成中に添加して、3 つのシステイン基と反応させることができ; 次いで、さらなるシステインまたはチオールを第 1 のペプチドの N または C 末端に付加して、結果としてこのシステインまたはチオールのみを第 2 のペプチドの遊離システインまたはチオールと反応させて、ジスルフィド連結二環式ペプチド - ペプチドコンジュゲートを形成することができるだろう。

【0127】

同様の技術を 2 つの二環式および二重特異性高分子の合成 / カップリングに等しく適用すると、四重特異性分子が潜在的に作成される。

【0128】

さらに、N 末端もしくは C 末端で、または側鎖を介してカップリングする適切な化学を使用して、他の官能基またはエフェクター基の付加を同様に達成することができる。一実施形態では、いずれの実態の活性も阻害しないようにカップリングが行われる。

【0129】

医薬組成物

本発明のさらなる態様によると、1 つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて、本明細書に定義されるペプチドリガンドを含む医薬組成物が提供される。

【0130】

一般的に、本ペプチドリガンドは、薬理的に適切な賦形剤または担体と合わせて、精製された形態で利用される。典型的には、これらの賦形剤または担体には、生理食塩水および / または緩衝化媒体を含む、水性もしくはアルコール性 / 水性の溶液、エマルジョンまたは懸濁液が含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースならびに塩化ナトリウムおよび乳酸加リンゲル液が含まれる。懸濁液中にポリペプチド複合体を保持するために必要な場合、適切な生理学的に許容されるアジュバントがカルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチンおよびアルギン酸塩などの増粘剤から選択され得る。

【0131】

静脈内ビヒクルには、リンゲルデキストロースに基づくものなどの、流体および栄養素補液ならびに電解質補液が含まれる。抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガスなどの保存剤および他の添加剤も存在することができる (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition)。

【0132】

本発明のペプチドリガンドは、別々に投与される組成物として、または他の薬剤と合わ

せて使用され得る。これらは、抗体、抗体フラグメント、およびシクロスポリン、メトトレキサート、アドリマイシンまたはシスプラチンなどの様々な免疫療法薬、および免疫毒素を含むことができる。医薬組成物は、本発明のタンパク質リガンド、または投与前にプールされているか否かにかかわらず、様々な標的リガンドを使用して選択されるポリペプチドなどの、異なる特異性を有する本発明による選択されるポリペプチドの組み合わせと合わせた、様々な細胞傷害剤または他の薬剤の「カクテル」を含むことができる。

【0133】

本発明による医薬組成物の投与経路は、当業者に一般的に知られているもののいずれかであり得る。療法のために、本発明のペプチドリガンドを、標準的な技術に従って、任意の患者に投与することができる。投与は、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮、経肺経路を介して、または適切には、カテーテルによる直接注入によるものを含む任意の適切な様式によることができる。好ましくは、本発明による医薬組成物が吸入によって投与される。投与量および投与頻度は、患者の年齢、性別および状態、他の薬物の同時投与、禁忌薬、ならびに臨床医によって考慮されるべき他のパラメータに依存する。

10

【0134】

本発明のペプチドリガンドを、貯蔵のために凍結乾燥し、使用前に適切な担体で再構成することができる。この技術は有効であることが示されており、当技術分野で既知の凍結乾燥および再構成技術を使用することができる。凍結乾燥および再構成が、様々な程度の活性損失をもたらす可能性があり、そのレベルを上向きに調整して補わなければならない場合があることが当業者によって理解される。

20

【0135】

本ペプチドリガンドまたはそのカクテルを含有する組成物を、予防的および/または治療的処置のために投与することができる。一定の治療用途では、選択される細胞の集団の少なくとも部分的な阻害、抑制、調節、殺傷またはいくつかの他の測定可能なパラメータを達成するのに十分な量が、「治療上有効用量」として定義される。この投与量を達成するのに必要な量は、疾患の重症度、および患者自身の免疫系の全体的な状態に依存するが、一般的に、体重1キログラム当たり0.005~5.0mgの選択されるペプチドリガンドに及び、0.05~2.0mg/kg/投与の用量がより一般的に使用される。予防的用途では、本ペプチドリガンドまたはそのカクテルを含有する組成物はまた、同様のまたはわずかに低い投与量で投与され得る。

30

【0136】

本発明によるペプチドリガンドを含有する組成物は、哺乳動物の選択標的細胞集団の変更、不活性化、殺傷または除去を助けるために予防的および治療的設定で利用され得る。さらに、本明細書に記載されるペプチドリガンドは、細胞の不均一集合物から標的細胞集団を殺傷する、枯渇させる、または有効に除去するために体外でまたはインビトロで選択的に使用され得る。標準的な技術に従って、哺乳動物由来の血液を選択されるペプチドリガンドと体外で組み合わせ、それによって不要な細胞を殺傷する、または哺乳動物に戻すために血液から除去することができる。

【0137】

治療的使用

40

本発明のさらなる態様によると、がんを予防、抑制または治療するのに使用するための、本明細書に定義されるヘテロタンデム二環式ペプチド複合体が提供される。

【0138】

治療（または阻害）され得るがん（およびその良性対応物）の例としては、それだけに限らないが、上皮由来の腫瘍（腺癌、扁平上皮癌、移行上皮癌および他の癌腫を含む様々な型の腺腫および癌腫）、例えば、膀胱および尿路、乳房、胃腸管（食道、胃（胃の）、小腸、結腸、直腸および肛門を含む）、肝臓（肝細胞癌）、胆嚢および胆道系、膵外分泌部、腎臓、肺（例えば、腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、気管支肺胞上皮癌および中皮腫）、頭頸部（例えば、舌、頬側口腔、喉頭、咽頭、上咽頭、扁桃、唾液腺、鼻腔および副鼻腔のがん）、卵巣、輸卵管、腹膜、膈、外陰部、陰茎、子宮頸部、子宮筋層、子宮内

50

膜、甲状腺（例えば、甲状腺濾胞癌）、副腎、前立腺、皮膚および付属器（例えば、黒色腫、基底細胞癌、扁平細胞癌、角化棘細胞腫、異形成母斑）の癌；血液悪性腫瘍（すなわち、白血病、リンパ腫）ならびに血液悪性腫瘍およびリンパ系統の関連する状態（例えば、急性リンパ性白血病〔ALL〕、慢性リンパ性白血病〔CLL〕、B細胞リンパ腫、例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫〔DLBCL〕、濾胞性リンパ腫、バーキットリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫および白血病、ナチュラルキラー〔NK〕細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、有毛細胞白血病、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症、形質細胞腫、多発性骨髄腫および移植後リンパ増殖性障害）、ならびに血液悪性腫瘍および骨髄系統の関連する状態（例えば、急性骨髄性白血病〔AML〕、慢性骨髄性白血病〔CML〕、慢性骨髄単球性白血病〔CMML〕、好酸球増加症候群、骨髄増殖性障害、例えば、真性多血症、本態性血小板血症および原発性骨髄線維症、骨髄増殖症候群、骨髄異形成症候群および前骨髄球性白血病）を含む前悪性血液障害および境界領域悪性障害；間葉起源の腫瘍、例えば、軟部組織、骨または軟骨の肉腫、例えば、骨肉腫、線維肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、血管肉腫、カポジ肉腫、ユーイング肉腫、滑膜肉腫、類上皮肉腫、消化管間質腫瘍、良性および悪性組織球腫、ならびに隆起性皮膚線維肉腫；中枢および末梢神経系の腫瘍（例えば、星細胞腫、神経膠腫および神経膠芽腫、髄膜腫、上衣腫、松果体腫瘍およびシュワン腫）；内分泌腫瘍（例えば、下垂体腫瘍、副腎腫瘍、膵島細胞腫瘍、副甲状腺腫瘍、カルチノイド腫瘍および甲状腺髄様癌）；眼および付属器腫瘍（例えば、網膜芽細胞腫）；生殖細胞および絨毛性腫瘍（例えば、奇形腫、精上皮腫、未分化胚細胞腫、胞状奇胎および絨毛癌）；ならびに小児および胎児性腫瘍（例えば、髄芽腫、神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍および原始神経外胚葉性腫瘍）；あるいは患者を悪性腫瘍に感受性にしておく、先天的なまたはその他の症候群（例えば、色素性乾皮症）が挙げられる。

10

20

【0139】

さらなる実施形態では、がんが、非ホジキンリンパ腫（NHL）、バーキットリンパ腫（BL）、多発性骨髄腫（MM）、B細胞性慢性リンパ性白血病（B-CLL）、B細胞性およびT細胞性急性リンパ性白血病（ALL）、T細胞リンパ腫（TCL）、急性骨髄性白血病（AML）、有毛細胞白血病（HCL）、ホジキンリンパ腫（HL）および慢性骨髄性白血病（CML）から選択されるものなどの血液悪性腫瘍から選択される。

【0140】

本明細書における「予防」という用語への言及は、疾患の誘導前の保護組成物の投与を伴う。「抑制」は、誘導イベント後であるが、疾患の臨床的出現前の組成物の投与を指す。「治療」は、疾患症状が明らかになった後の保護組成物の投与を伴う。

30

【0141】

疾患に対する保護または疾患の治療におけるペプチドリガンドの有効性をスクリーニングするために使用することができる動物モデル系が利用可能である。動物モデル系の使用は、ヒトおよび動物標的と交差反応して、動物モデルの使用を可能にすることができるポリペプチドリガンドの開発を可能にする本発明によって促進される。

【0142】

本発明を、以下の実施例を参照して、以下でさらに説明する。

40

【実施例】

【0143】

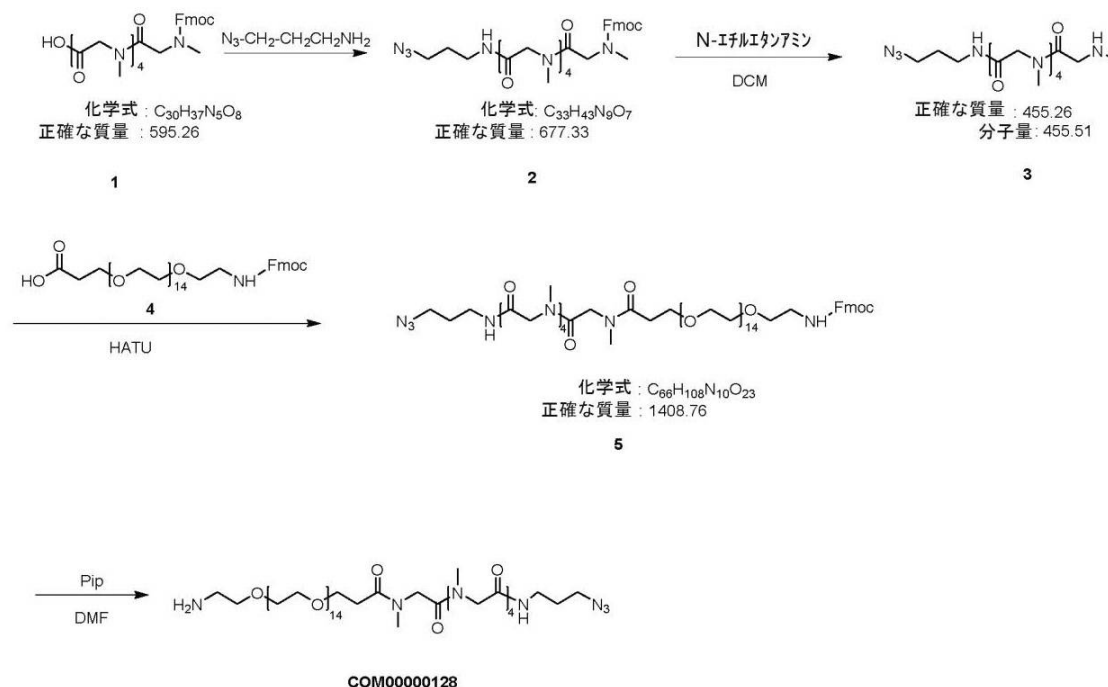
【実施例1】

リンカーの合成

COM128

【0144】

【化 3】



10

20

化合物 1 (700.0 mg、1.18 mmol、1.0 当量)、3-アジドプロパン-1-アミン (117.66 mg、1.18 mmol、1.0 当量)、EDCI (270.4 mg、1.41 mmol、1.2 当量)、HOBT (190.6 mg、1.41 mmol、1.2 当量) の混合物を DCM (20 mL、予め脱気し、 N_2 で 3 回パージした) に溶解し、次いで、混合物を、 N_2 雰囲気下、20 ~ 25 °C で 1 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 1 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 677.33、実測 m/z : 678.2 ($[M+H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。溶媒を蒸発させて、化合物 2 (600 mg、粗) を白色固体として得た。

【0145】

化合物 2 (600.0 mg、885.3 μmol 、1.0 当量)、N-エチルエタンアミン (1.29 g、15.19 mmol、1.50 mL、17.2 当量) の混合物を DCM (3 mL、予め脱気し、 N_2 で 3 回パージした) に溶解し、次いで、混合物を、 N_2 雰囲気下、25 ~ 30 °C で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 455.51、実測 m/z : 456.3 ($[M+H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。溶媒を蒸発させて、化合物 3 (400 mg、粗) を無色の油状物として得た。化合物 3 (150.0 mg、329.3 μmol 、1.0 当量)、化合物 4 (320.1 mg、329.3 μmol 、1.0 当量)、HATU (125.2 mg、329.3 μmol 、1.0 当量)、DIEA (42.6 mg、329.3 μmol 、57.4 μL 、1.0 当量) の混合物を DMF (2 mL、予め脱気し、 N_2 で 3 回パージした) に溶解し、次いで、混合物を、 N_2 雰囲気下、25 ~ 30 °C で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 1408.76、実測 m/z : 705.3 ($[M/2+H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。溶媒を蒸発させて、化合物 5 (400 mg、粗) を黄色の油状物として得た。

30

40

【0146】

化合物 5 (400 mg、283.77 μmol 、1.0 当量) を DMF (4 mL、予め脱気し、 N_2 で 3 回パージした) に溶解し、引き続いてピペリジン (862.2 mg、10.13 mmol、1 mL、35.7 当量) を添加し、次いで、混合物を、 N_2 雰囲気下、25 ~ 30 °C で 15 分間攪拌した。LC-MS は、化合物 5 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 1187.37、実測 m/z : 594.4 ($[M/2+H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。

50

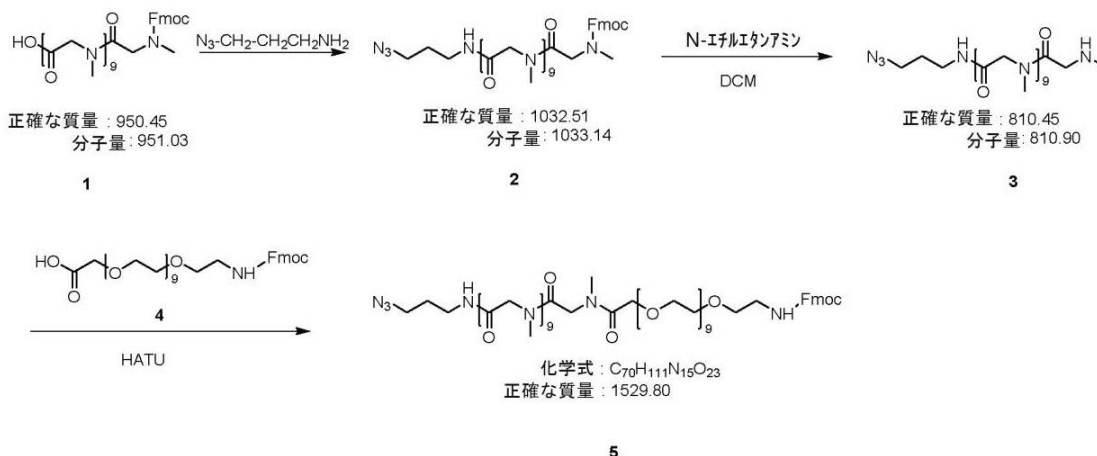
2 + H]⁺、1187.4 [M + H]⁺)を有する1つの主ピークが検出された。溶媒を蒸発させて、COM128 (250 mg、粗)を無色の油状物として得た。

【0147】

COM129

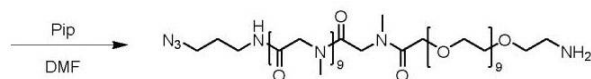
【0148】

【化4】



10

20



COM00000129

化合物1 (1.4 g、1.47 mmol、1.0当量)、3-アジドプロパン-1-アミン (162.1 mg、1.62 mmol、1.1当量)、EDCI (338.6 mg、1.77 mmol、1.2当量)、HOBt (238.7 mg、1.77 mmol、1.2当量)の混合物をDCM (5 mL、予め脱気し、N₂で3回パージした)に溶解し、次いで、混合物を、N₂雰囲気下、20~25℃で1時間攪拌した。LC-MSは、化合物1が完全に消費されていることを示し、所望のm/z (計算MW: 1033.14、実測m/z: 1033.2 ([M + H]⁺))を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を数滴の1 M HClで処理し、有機層を減圧下で蒸発させて、溶媒を除去した。化合物2 (1.1 g、粗)を黄色の油状物として得た。

30

【0149】

化合物2 (1.1 g、1.06 mmol、1当量)、N-エチルエタンアミン (3.89 g、53.24 mmol、5.48 mL、50当量)の混合物をDCM (5 mL、予め脱気し、N₂で3回パージした)に溶解し、次いで、混合物を、N₂雰囲気下、20~25℃で1時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていることを示し、所望のm/z (計算MW: 810.90、実測m/z: 810.9 ([M + H]⁺))を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で蒸発させ、化合物3 (810 mg、粗)を白色固体として得た。

40

【0150】

化合物3 (810.0 mg、998.9 μmol、1.0当量)、化合物4 (810.7 mg、1.10 mmol、1.1当量)、HATU (455.8 mg、1.20 mmol、1.2当量)、DIEA (258.2 mg、2.00 mmol、348.0 μL、2.0当量)の混合物をDMF (2 mL、予め脱気し、N₂で3回パージした)に溶解し、次いで、混合物を、N₂雰囲気下、25~30℃で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていることを示し、所望のm/z (計算MW: 1530.72、実測m/z: 765.5 ([M/2 + H]⁺))を有する1つの主ピークが検出された。反応混

50

合物を数滴の 1 M H C l で処理し、有機層を回収し、減圧下で蒸発させて、溶媒を除去した。化合物 5 (1 . 1 g、粗) を黄色固体として得た。

【 0 1 5 1 】

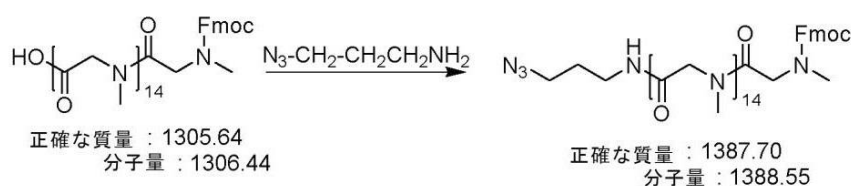
化合物 5 (1 g、6 5 3 . 2 9 μ m o l、1 当量) を D C M (1 0 m L、予め脱気し、 N_2 で 3 回パージした) に溶解し、引き続いてピペリジン (2 . 3 9 g、3 2 . 6 6 m m o l、3 . 3 6 m L、5 0 当量) を添加し、次いで、混合物を、 N_2 雰囲気下、2 5 ~ 3 0 で 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 5 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 M W : 1 3 0 8 . 4 7、実測 m/z : 1 3 0 8 . 4 ([M + H] $^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。残留物を分取 H P L C (T F A 条件 : A 相 : H_2O 中 0 . 0 7 5 % T F A、B 相 : M e C N、カラム : L u n a 2 0 0 * 2 5 m m 1 0 μ m、C 1 8、1 1 0 A および G e m i n 1 5 0 * 3 0 m m、C 1 8、5 μ m、1 1 0 A、接続、5 0) によって精製した。C O M 1 2 9 (7 0 0 m g、4 6 3 . 7 2 μ m o l、収率 7 0 . 9 8 %) を黄色固体として得た。

【 0 1 5 2 】

C O M 1 3 0

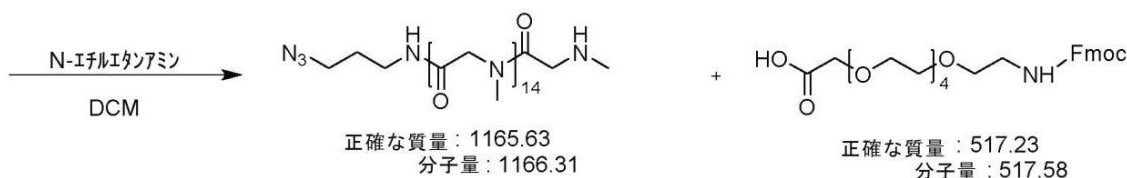
【 0 1 5 3 】

【 化 5 】



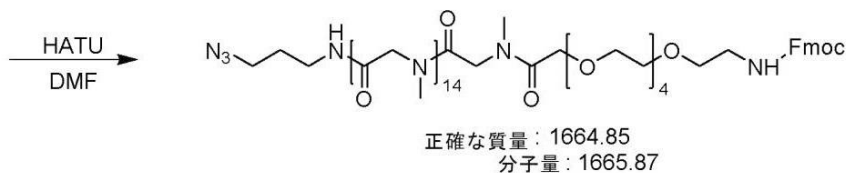
1

2

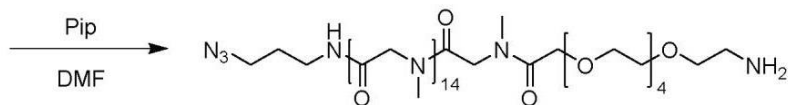


3

4



5



COM00000130

化合物 1 (2 9 1 m g、2 2 2 . 7 5 μ m o l、1 . 0 当量)、3 - アジドプロパン - 1 - アミン (2 4 . 5 3 m g、2 4 5 . 0 2 μ m o l、1 . 1 当量)、E D C I (5 1 . 2 4 m g、2 6 7 . 3 0 μ m o l、1 . 2 当量)、H O B t (3 6 . 1 2 m g、2 6 7 . 3 0 μ m o l、1 . 2 当量) の混合物を D C M (3 m L、予め脱気し、 N_2 で 3 回パージ

した)に溶解し、次いで、混合物を、 N_2 雰囲気下、20～25 で1時間攪拌した。LC-MSは、化合物1が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 1388.53、実測 m/z : 694.7 ($[M/2 + H]^+$))を有する1つの主ピークが検出された。残留物を分取HPLC (中性条件)によって精製した。化合物2 (200 mg、144.04 μmol 、収率64.66%)を白色固体として得た。

【0154】

化合物2 (200 mg、144.04 μmol 、1.0当量)、N-エチルエタンアミン (210.7 mg、2.88 mmol、297 μL 、20.0当量)の混合物をDCM (3 mL、予め脱気し、 N_2 で3回パージした)に溶解し、次いで、混合物を、 N_2 雰囲気下、20～25 で1時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 1166.29、実測 m/z : 1166.3 ($[M + H]^+$))を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を蒸発させ、化合物3 (150 mg、粗)を黄色の油状物として得た。

10

【0155】

化合物3 (150 mg、128.61 μmol 、1.0当量)、化合物4 (75 mg、144.91 μmol 、1.13当量)、HATU (58.7 mg、154.34 μmol 、1.2当量)およびDIEA (33.24 mg、257.23 μmol 、44.80 μL 、2.0当量)の混合物をDMF (5 mL、予め脱気し、 N_2 で3回パージした)に溶解し、次いで、混合物を、 N_2 雰囲気下、20～25 で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 1665.84、実測 m/z : 833.2 ($[M/2 + H]^+$))を有する1つの主ピークが検出された。溶媒を減圧下で除去し、化合物5 (300 mg、粗)を黄色の油状物として得た。

20

【0156】

粗化合物5 (300 mg、DMF 10 mLに溶解した)に、ピペリジン (2 mL)を添加し、混合物を30 で2時間攪拌した。LCMSは、所望の m/z (MW: 1443.60 実測 m/z : 722.7 ($[M/2 + H]^+$))を有する1つの主ピークが検出されることを示した。残留物を分取HPLC (中性条件)によって精製した。COM130 (140 mg、58.19 μmol 、収率32.31%、純度60%)を白色固体として得た。

【0157】

30

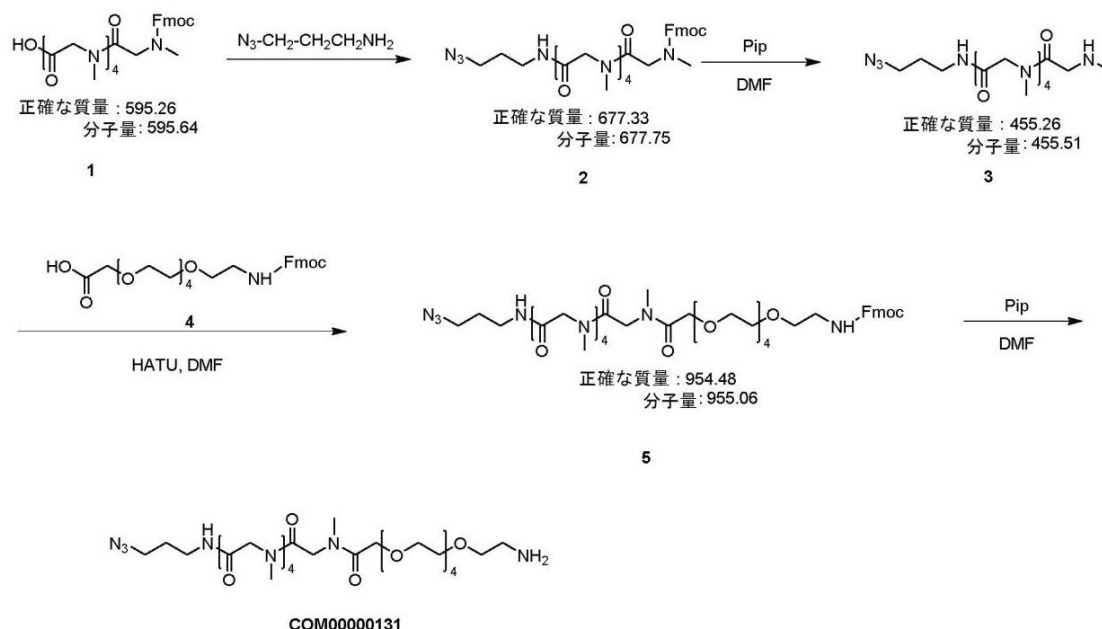
COM131

【0158】

40

50

【化 6】



化合物 1 (7 0 0 . 0 m g 、 1 . 1 8 m m o l 、 1 . 0 当 量) 、 3 - アジドプロパン - 1 - アミン (1 1 7 . 7 m g 、 1 . 1 8 m m o l 、 1 . 0 当 量) 、 H O B t (1 9 0 . 6 m g 、 1 . 4 1 m m o l 、 1 . 2 当 量) 、 E D C I (2 7 0 . 4 m g 、 1 . 4 1 m m o l 、 1 . 2 当 量) の混合物を D C M (2 0 m L 、 予め脱気し、N₂で3回パージした)に溶解し、次いで、混合物を、N₂雰囲気下、25 ~ 30 で2時間攪拌した。LC - MSは、化合物 1 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (計算 MW : 6 7 7 . 7 5 、実測 m / z : 6 7 8 . 2 ([M + H] ⁺)) を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を数滴の 1 M H C l で処理し、有機層を回収し、減圧下で蒸発させた。化合物 2 (6 0 0 . 0 m g 、 粗) を白色固体として得た。

【 0 1 5 9】

化合物 2 (6 0 0 . 0 m g 、 8 8 5 . 2 μ m o l 、 1 . 0 当 量) を D M F (3 m L 、 予め脱気し、N₂で3回パージした)に溶解し、次いで、ピペリジン (1 . 2 9 g 、 1 5 . 1 9 m m o l 、 1 . 5 0 m L 、 1 7 . 2 当 量) を添加し、混合物を、N₂雰囲気下、25 ~ 30 で2時間攪拌した。LC - MSは、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (計算 MW : 4 5 5 . 5 1 、実測 m / z : 4 5 6 . 3 ([M + H] ⁺)) を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製し、化合物 3 (4 0 0 . 0 m g 、 8 7 9 . 1 μ m o l) を無色の油状物として得た。

【 0 1 6 0】

化合物 3 (2 5 0 . 0 m g 、 5 4 8 . 8 3 μ m o l 、 1 . 0 当 量) 、 化合物 4 (2 8 4 . 1 m g 、 5 4 8 . 8 3 μ m o l 、 1 当 量) 、 H A T U (2 2 9 . 6 m g 、 6 0 3 . 7 2 μ m o l 、 1 . 1 当 量) 、 D I E A (1 4 1 . 9 m g 、 1 . 1 0 m m o l 、 1 9 1 . 1 9 μ L 、 2 . 0 当 量) の D C M (2 0 m L 、 予め脱気し、N₂で3回パージした)中混合物、次いで、混合物を、N₂雰囲気下、25 ~ 30 で2時間攪拌した。LC - MSは、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (計算 MW : 9 5 5 . 0 6 、実測 m / z : 9 5 5 . 6 ([M + H] ⁺)) を有する1つの主ピークが検出された。残留物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 5 (4 0 0 . 0 m g 、 4 1 9 . 1 μ m o l) を白色固体として得た。化合物 5 (4 0 0 . 0 m g 、 4 1 8 . 8 2 μ m o l 、 1 . 0 当 量) の混合物を D M F (4 m L 、 予め脱気し、N₂で3回パージした)に溶解し、次いで、ピペリジン (8 6 2 . 2 m g 、 1 0 . 1 3 m m o l 、 1 m L 、 2 4 . 2 当 量) を添加し、混合物を、N₂雰囲気下、25 ~ 30 で2時間攪拌した。LC - MSは、化合物 5 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (M W : 7 3 2 . 8 3 実測

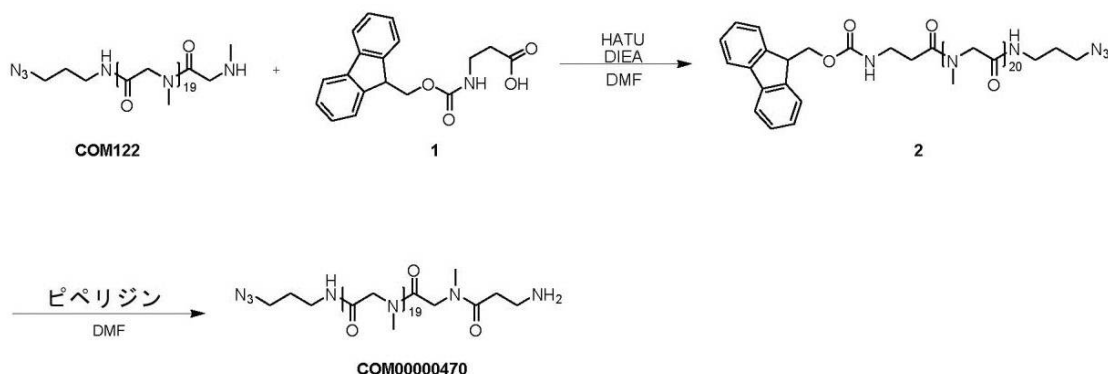
m/z : 733.3 ($[M+H]^+$) を有する 1 つの主ピークが検出された。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、COM131 (200 mg、272.9 μ mol) を無色の油状物として得た。

【0161】

COM470

【0162】

【化7】



10

COM122 (228 mg、149.83 μ mol、1.0 当量)、化合物 1 (51.31 mg、164.82 μ mol、1.1 当量) の DMF (6 mL) 中溶液に、HATU (85.40 mg、224.75 μ mol、1.5 当量) および DIEA (19.37 mg、149.83 μ mol、26.10 μ L、1.0 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 1 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 1814.99、実測 m/z : 908.2 ($[M/2+H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (中性条件) によって精製した。化合物 2 (54 mg、29.75 μ mol、収率 19.86%) を白色固体として得た。

20

【0163】

化合物 2 (54 mg、29.8 μ mol、1.0 当量) の DMF (2 mL) 中溶液に、ピペリジン (61 mg、715 μ mol、71 μ L、24.0 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 1592.75 実測 m/z : 796.27 ($[M/2+H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。COM470 (40 mg、25.11 μ mol、収率 84.41%) を白色固体として得た。

30

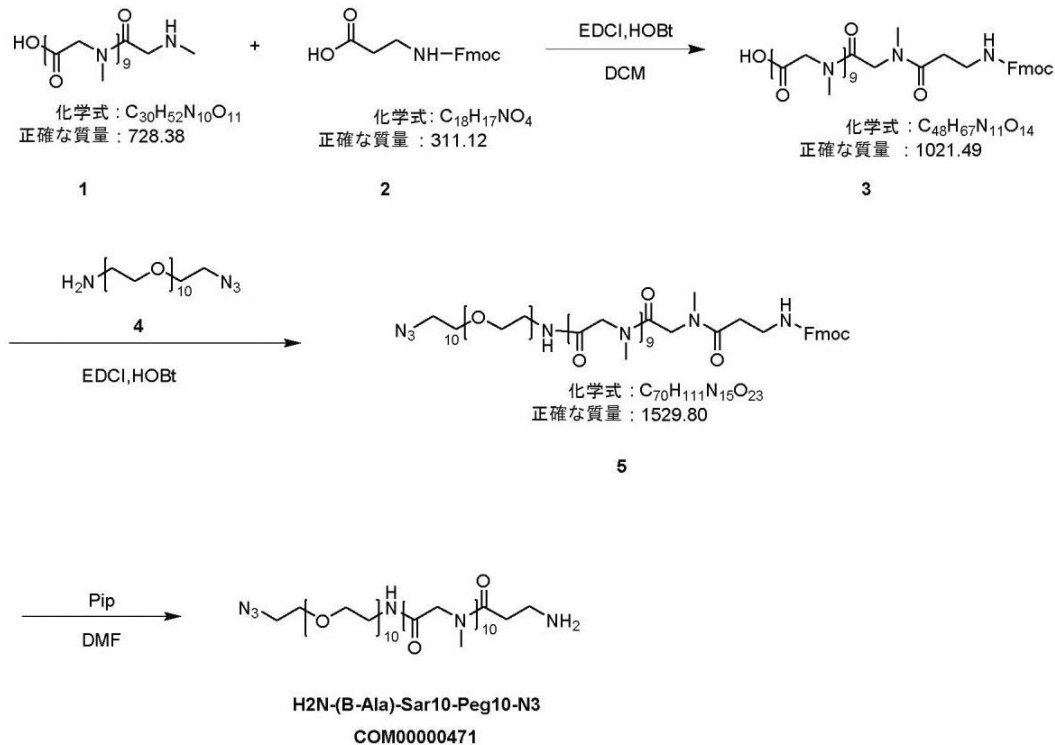
【0164】

COM471

【0165】

40

【化 8】



10

20

化合物 1 (900 mg、1.23 mmol、1.0 当量) および化合物 2 (1.0 g、3.21 mmol、2.6 当量) の混合物を DCM (20 mL) に溶解し、引き続いて (284.0 mg、1.48 mmol、1.2 当量)、HOBT (200.2 mg、1.48 mmol、1.2 当量) を添加した。混合物を 25 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 1 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 1021.49、実測 m/z : 1022.2 ($[M+H]^+$)) を有する 1 つのピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 3 (0.900 g、880.53 μ mol、収率 71.30 %) を白色固体として得た。

30

【0166】

化合物 3 (500.0 mg、489.19 μ mol、1.0 当量)、化合物 4 (257.6 mg、489.19 μ mol、1.0 当量) の混合物を DCM (5 mL) に溶解し、引き続いて HOBT (132.2 mg、978.37 μ mol、2.0 当量)、EDCI (187.6 mg、978.37 μ mol、2.0 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 1529.80 実測 m/z : 765.9 ($[M/2+H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (中性条件) によって精製した。化合物 3 (420 mg、246.94 μ mol、収率 50.48 %) を無色の油状物として得た。

40

【0167】

化合物 5 (420 mg、274.38 μ mol、1.0 当量) を DMF (4 mL) に溶解し、引き続いてピペリジン (865.2 mg、10.16 mmol、1 mL、37 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 5 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 1308.48、実測 m/z : 654.8 ($[M/2+H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。粗生成物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。COM 471 (386 mg、265.50 μ mol、収率 96.76 %) を無色の油状物として得た。

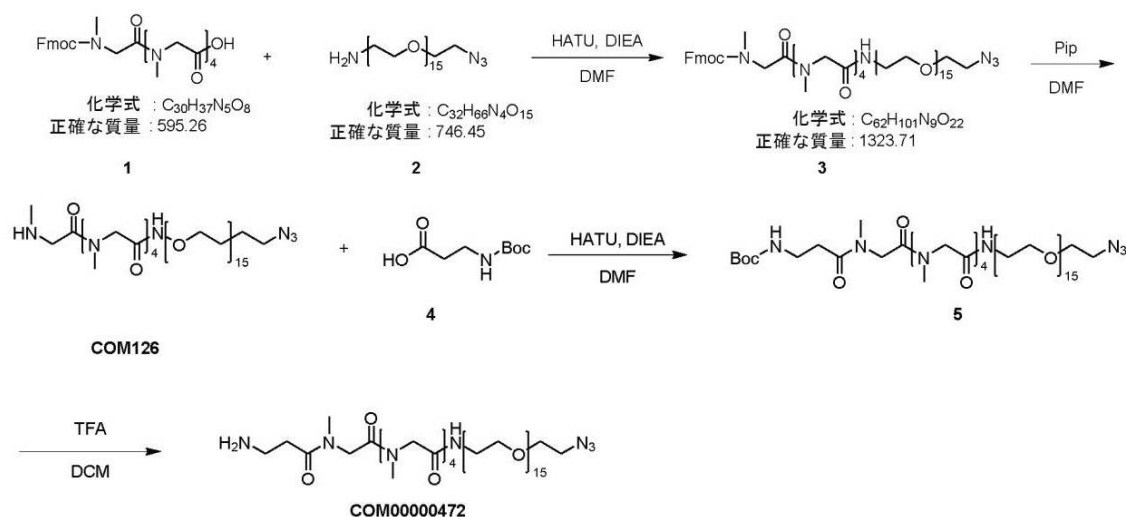
【0168】

50

COM 472

【0169】

【化9】



10

化合物1 (0.5 g、839.43 μmol 、1.0当量)、化合物2 (627.0 mg、839.43 μmol 、1.0当量) およびDIEA (217.0 mg、1.68 mmol、292.4 μL 、2.0当量)の混合物をDMF (2 mL)に溶解し、次いで、HATU (319.2 mg、839.4 μmol 、1.0当量)を混合物に添加した。次いで、混合物を25℃で30分間攪拌した。TLC (DCM:CH₃OH = 10:1、 R_f = 0.24)は、化合物1が完全に消費されており、1つの新たなスポットが形成されたことを示した。溶媒を蒸発させて、化合物3 (0.45 g、339.75 μmol 、収率40.47%、粗)を無色の油状物として得て、これをさらに精製することなく次のステップに使用した。

20

【0170】

化合物3 (450.0 mg、339.75 μmol 、1.0当量)をDMF (8 mL)に溶解し、引き続いてピペリジン (2 mL)を添加した。混合物を25℃で15分間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていることを示し、所望の(計算MW: 1102.27、実測 m/z : 552.1 ([M/2+H]⁺))を有する1つの主ピークが検出された。残留物を分取HPLC (TFA条件)によって精製した。化合物3 (370.0 mg、335.67 μmol 、収率98.80%)を無色の油状物として得た。

30

【0171】

COM126 (60 mg、54.45 μmol 、1.0当量)、化合物4 (15.5 mg、81.68 μmol 、1.5当量)のDMF (5 mL)中溶液に、HATU (31 mg、81.68 μmol 、1.5当量)およびDIEA (10.5 mg、61.68 μmol 、1.5 μL 、1.5当量)を添加した。混合物を30℃で2時間攪拌した。LC-MSは、COM126が完全に消費されていることを示し、所望の1つの主ピークが検出された。混合物を蒸発させて、溶媒を除去し、化合物5 (30 mg、粗)を無色の油状物として得て、これをさらに精製することなく次のステップに使用した。

40

【0172】

化合物5 (30 mg、23.57 μmol 、1.0当量)をDCM (4.5 mL)に溶解し、次いで、TFA (0.5 mL)を添加し、混合物を25~30℃で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物5が完全に消費されていることを示し、所望の1つの主ピークが検出された。残留物を分取HPLC (TFA条件)によって精製した。COM472 (10 mg、8.52 μmol)を白色固体として得た。

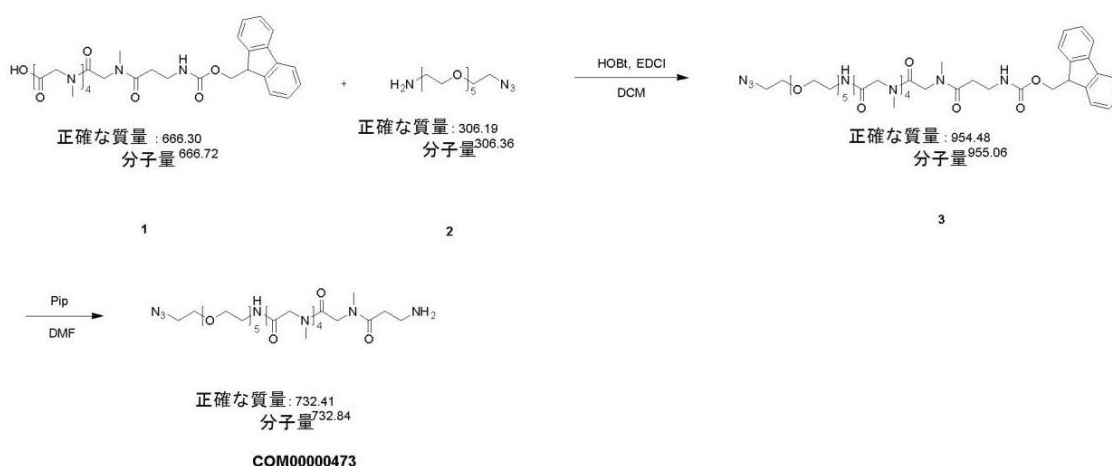
【0173】

COM 473

50

【 0 1 7 4 】

【化 1 0】



化合物 1 (3 0 0 m g 、 4 4 9 . 9 6 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 化合物 2 (1 3 8 m g 、 4 4 9 . 9 6 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 H O B t (1 2 2 m g 、 8 9 9 . 9 3 μ m o l 、 2 . 0 当量) 、 E D C I (1 7 3 m g 、 8 9 9 . 9 3 μ m o l 、 2 . 0 当量) の混合物を D C M (1 0 m L 、 予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、混合物を、N₂ 雰囲気下、2 0 ~ 2 5 °C で 1 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 1 が完全に消費されていることを示し、所望の (M W : 9 5 5 . 0 6 、実測 m / z : 9 5 5 . 3 ([M + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去した。混合物を減圧下で蒸発させ、化合物 3 (3 0 0 m g 、粗) を黄色の油状物として得た。

【 0 1 7 5 】

化合物 3 (3 0 0 m g 、 3 1 4 . 1 2 μ m o l 、 1 . 0 当量) を D M F (4 m L) に溶解し、次いで、ピペリジン (1 m L) を添加し、混合物を 2 0 ~ 2 5 $^{\circ}$ C で 1 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (M W : 7 3 2 . 8 3 、実測 m / z : 7 3 3 . 2 ([M + H] $^{+}$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。残留物を分取 H P L C (中性条件) によって精製した。C O M 4 7 3 (1 6 0 m g 、 2 1 8 . 3 3 μ m o l 、 収率 6 9 . 5 1 %) を無色の油状物として得た。

【 0 1 7 6 】

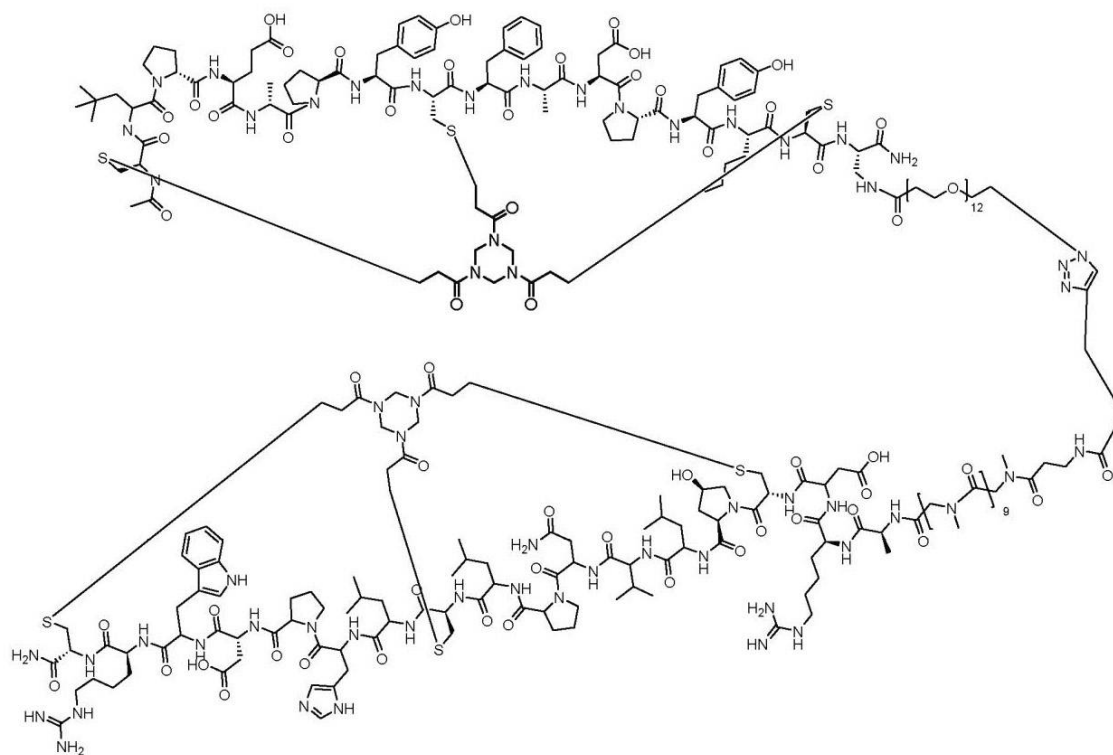
[实施例 2]

E p h A 2 / C D 1 3 7 結合ヘテロタンデム二環式ペプチドの合成

B C Y 9 1 7 3

【 0 1 7 7 】

【化 1 1】

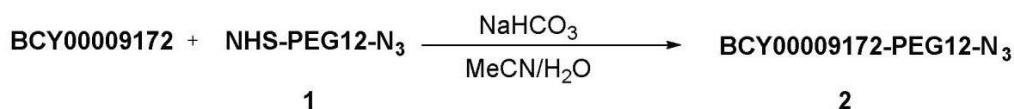


BCY00009173

BCY9172 - PEG12 - N₃ を調製する手順

【0178】

【化 1 2】



BCY9172 (520 mg、248.16 μmol、1 当量) および化合物 1 (370 mg、499.47 μmol、2.01 当量) を DMF (5 mL) に溶解し、DIEA (48.11 mg、372.24 μmol、64.84 μL、1.5 当量) を添加し、次いで、混合物を 30℃ で 12 時間攪拌した。LC-MS は、BCY9172 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 2721.12、実測 m/z: 1360.9 ([M/2 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、化合物 2 (284 mg、101.10 μmol、収率 40.74%、純度 96.87%) を白色固体として得た。

【0179】

【化 1 3】



BCY9173 を調製する手順

この反応を並行して 2 つの独立した容器で実施した。1 つの容器について、化合物 2 (100 mg、36.75 μmol、1.0 当量) および BCY6169 (120 mg、3

6.78 μmol 、1.0当量)を最初に $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) 10 mL に溶解し、次いで、 CuSO_4 (0.4 M、91.9 μL 、1.0当量)、 VcNa (0.4 M、183.8 μL 、2.0当量) および THPTA (0.4 M、91.9 μL 、1.0当量) を添加した。最後に、1 M NH_4HCO_3 を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、 N_2 で 3 回パージした。反応混合物を、 N_2 雰囲気下、40 で 16 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていること、および所望の m/z (計算 MW: 5983.85、実測 m/z : 997.6600 ($[\text{M}/6 + \text{H}]^+$) および 1197.2300 ($[\text{M}/5 + \text{H}]^+$)) を有する 1 つの主ピークを示した。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY9173 (218 mg、34.97 μmol 、収率 47.58%、純度 96%) を白色固体として得た。

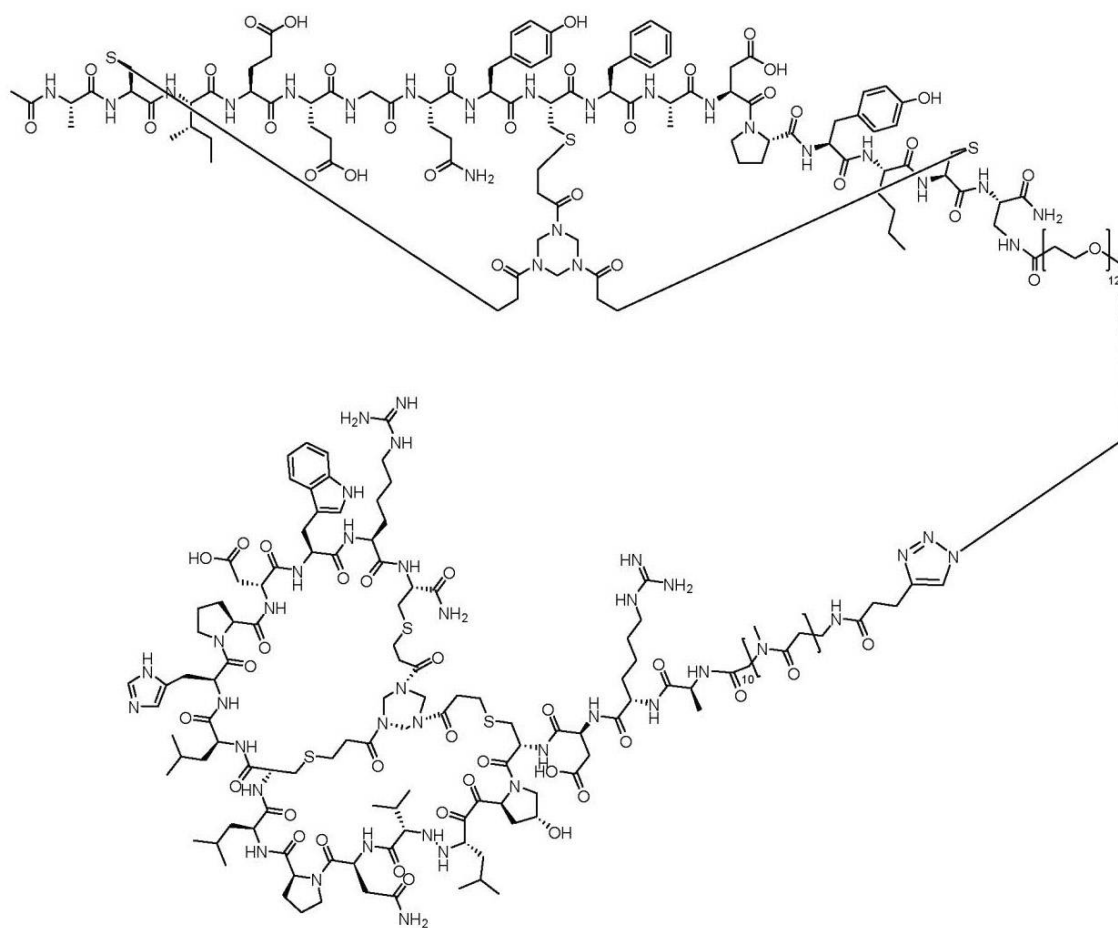
10

【0180】

BCY7985

【0181】

【化14】



20

30

BCY00007985

40

BCY7859 を調製する一般的な手順

【0182】

【化15】



N3-PEG12-COOH (250 mg、388 μmol) および HOSu (67.

50

0 mg、583 μmol) の DMA (4.5 mL) および DCM (1.5 mL) 中溶液に、EDCI (89.3 mg、466 μmol) を添加し、20 で16時間攪拌した。BCY7732 (855 mg、388 μmol) の DMA 5 mL 中混合物を含有する別の50 mL 丸底フラスコに、DIEA (186 mg、1.44 mmol、250 μL) を添加し、10分間攪拌した。次いで、初期反応混合物をフラスコに添加し、20 でさらに5時間、さらに攪拌した。LC-MS (ES8396-307-P1B1) は、BCY7732 が完全に消費されていることを示し、所望の質量を有する1つの主ピークが検出された。得られた反応混合物を分取HPLC (TFA条件) によって直接精製して、化合物BCY7859 (621 mg、200 μmol 、収率51.6%、TFA塩) を白色固体として得た。

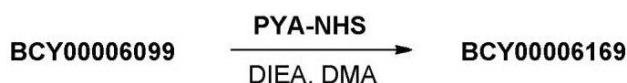
10

【0183】

BCY6169を調製する一般的な手順

【0184】

【化16】



BCY6099 (300 mg、94.3 μmol) の DMA (2 mL) 中溶液に、DIEA (36.6 mg、283 μmol 、49.3 μL) を添加し、10分間攪拌した。その後、PYA-NHS (36.8 mg、189 μmol) を添加し、20 でさらに15時間、さらに攪拌した。LC-MSは、BCY6099 が完全に消費されていることを示し、所望の質量を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を分取HPLC (中性条件) によって精製して、化合物BCY6169 (299 mg、86.2 μmol 、収率91.5%) を白色固体として得た。

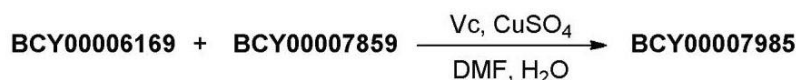
20

【0185】

BCY7985を調製する一般的な手順

【0186】

【化17】



30

BCY7859 (220 mg、77.8 μmol) およびBCY6169 (251 mg、77.1 μmol) の窒素によって2時間バージされたDMF (5 mL) 中溶液に、アスコルビン酸水溶液 (0.8 M、963 μL) を添加し、引き続いて窒素雰囲気下でCuSO₄水溶液 (0.8 M、289 μL) を添加した。次いで、混合物を20 で2時間攪拌した。LC-MSは、BCY6169 が完全に消費されていることを示し、所望の質量を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を分取HPLC (TFA条件) によって直接精製して、化合物BCY7985 (283 mg、43.4 μmol 、収率56.3%、TFA) を白色固体として得た。

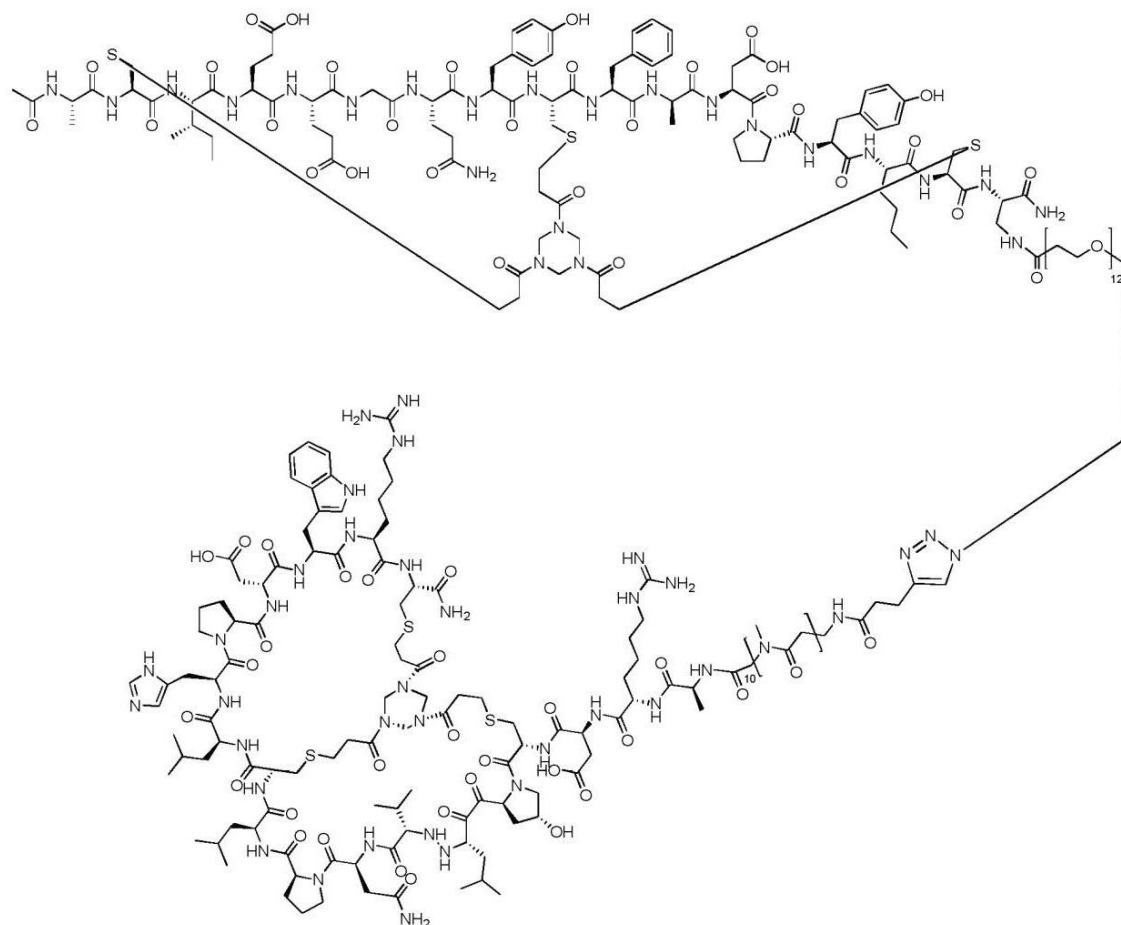
40

【0187】

BCY8942

【0188】

【化 1 8】



BCY00008942

BCY8940を調製する一般的な手順

【0189】

【化 1 9】



N3-PEG12-COOH (120 mg、186 μmol 、1.0 当量) の DMA (3 mL) および DCM (1 mL) 中溶液に、HOSu (32.2 mg、280 μmol 、1.5 当量) を添加し、攪拌した。次いで、EDCI (42.9 mg、224 μmol 、1.2 当量) を混合物に添加し、20 でさらに7時間、さらに攪拌した。LCMSは、活性化エステルが完全に形成されていることを示した。DMA (3 mL) 中 BCY8045 (410 mg、186 μmol 、1.0 当量) を含む別のフラスコに、DIEA (120 mg、932 μmol 、162 μL 、5.0 当量) を添加し、攪拌し、次いで、活性化エステルを添加し、混合物を20 で18時間攪拌した。LC-MSは、所望の m/z を有する1つの主ピークが検出されることを示した。反応混合物を真空中で濃縮して、DCMを除去した。得られた混合物を分取HPLC (TFA条件) によって精製して、BCY8940 (190 mg、67.2 μmol 、収率36.1%) を白色固体として得た。

【0190】

BCY8942を調製する一般的な手順

【0191】

10

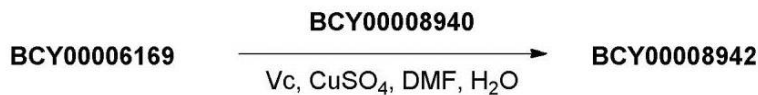
20

30

40

50

【化 2 0】



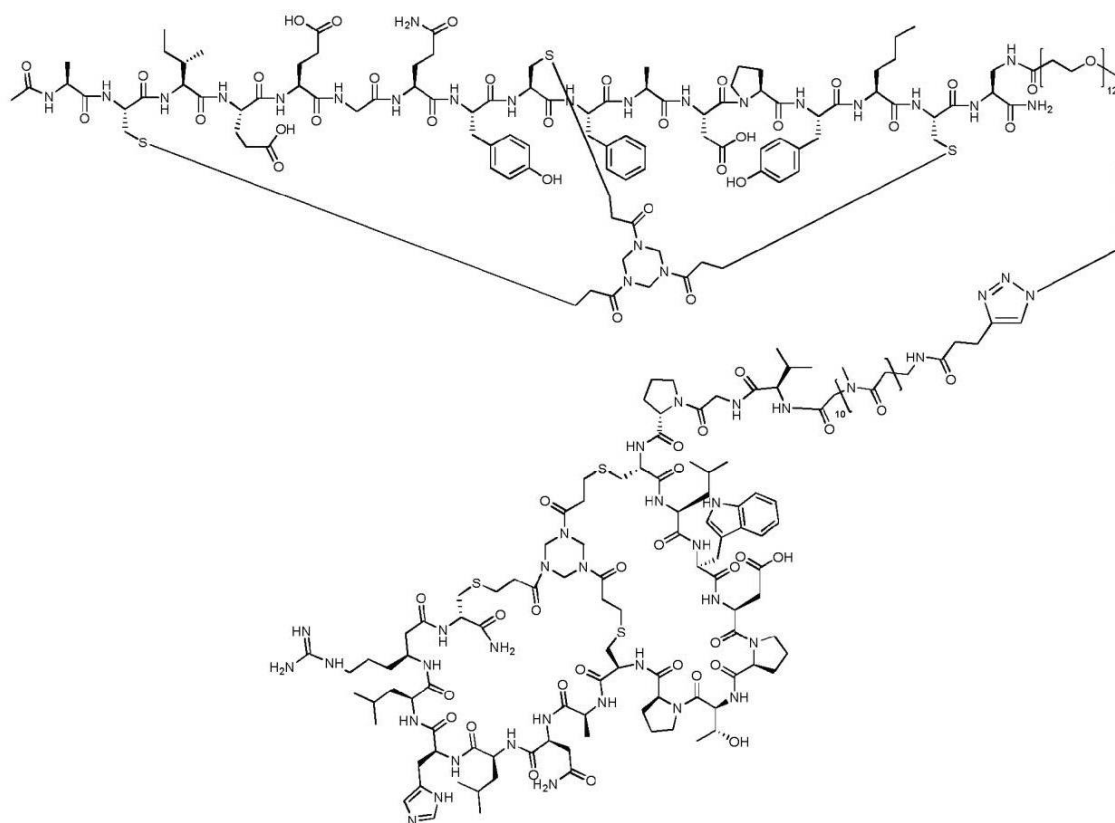
BCY8940 (28.6 mg、10.1 μmol 、1.1 当量) および BCY6169 (30.0 mg、9.19 μmol 、1.0 当量) の DMF (2.0 mL) 中溶液に、(2R)-2-[(1S)-1,2-ジヒドロキシエチル]-3,4-ジヒドロキシ-2H-フラン-5-オン (1.0 M、92.0 μL) および CuSO_4 (1.0 M、27.6 μL) を添加し、窒素雰囲気下、20 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、BCY6169 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 6089.91 実測 m/z : 1218.4 ($[\text{M}/5 + \text{H}]^+$)、1016.0 ($[\text{M}/6 + \text{H}]^+$)、870.7 ($[\text{M}/7 + \text{H}]^+$) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製して、化合物 BCY8942 (15.4 mg、2.46 μmol 、収率 26.8%、純度 97.3%) を白色固体として得た。

【0192】

BCY8943

【0193】

【化 2 1】

**BCY00008943**

BCY8941 を調製する一般的な手順

【0194】

10

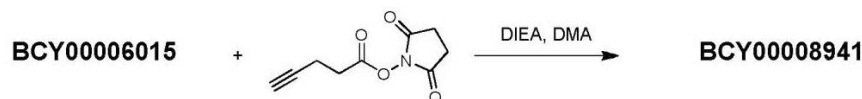
20

30

40

50

【化 2 2】



BCY6015 (PYA部分が存在しないことを除いて、BCY8941と同一のペプチド; 100 mg、32.9 μmol) のDMA (2 mL) 中溶液に、DIEA (12.8 mg、98.7 μmol 、17.2 μL) を添加し、10分間攪拌した。次いで、(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)ペンタ-4-イノエート (12.8 mg、65.8 μmol) を混合物に添加し、引き続いて20 で16時間さらに攪拌した。LC-MSは、化合物1が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算MW: 3119.60、実測 m/z : 1040.5 ($[M/3 + H]^+$)) を有する1つの主ピークが検出された。混合物を分取HPLC (中性条件) によって精製して、化合物BCY8941 (90.0 mg、28.9 μmol 、収率87.7%) を白色固体として得た。

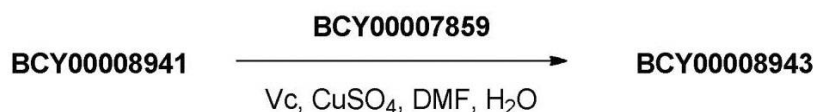
10

【0195】

BCY8943を調製する一般的な手順

【0196】

【化 2 3】



20

BCY7859 (BCY7985に記載されるように調製され得る; 40.0 mg、14.2 μmol) およびBCY8941 (42.0 mg、13.5 μmol) のDMSO (2 mL、窒素によって1時間予めパージされた) 中溶液に、(2R)-2-[(1S)-1,2-ジヒドロキシエチル]-3,4-ジヒドロキシ-2H-フラン-5-オン (1.0 M、270 μL) およびCuSO₄ (1.0 M、80.9 μL) を添加した。混合物を窒素で3回パージし、15 で2時間攪拌した。LC-MSは、BCY8941が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算MW: 5946.77、実測 m/z : 1190.2 ($[M/5 + H]^+$))、991.5 ($[M/6 + H]^+$))、849.9 ($[M/7 + H]^+$) を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を分取HPLC (A: H₂O中0.075% TFA、B: ACN) によって精製して、化合物BCY8943 (11.5 mg、1.90 μmol 、収率14.1%、純度98.1%) を白色固体として得た。

30

【0197】

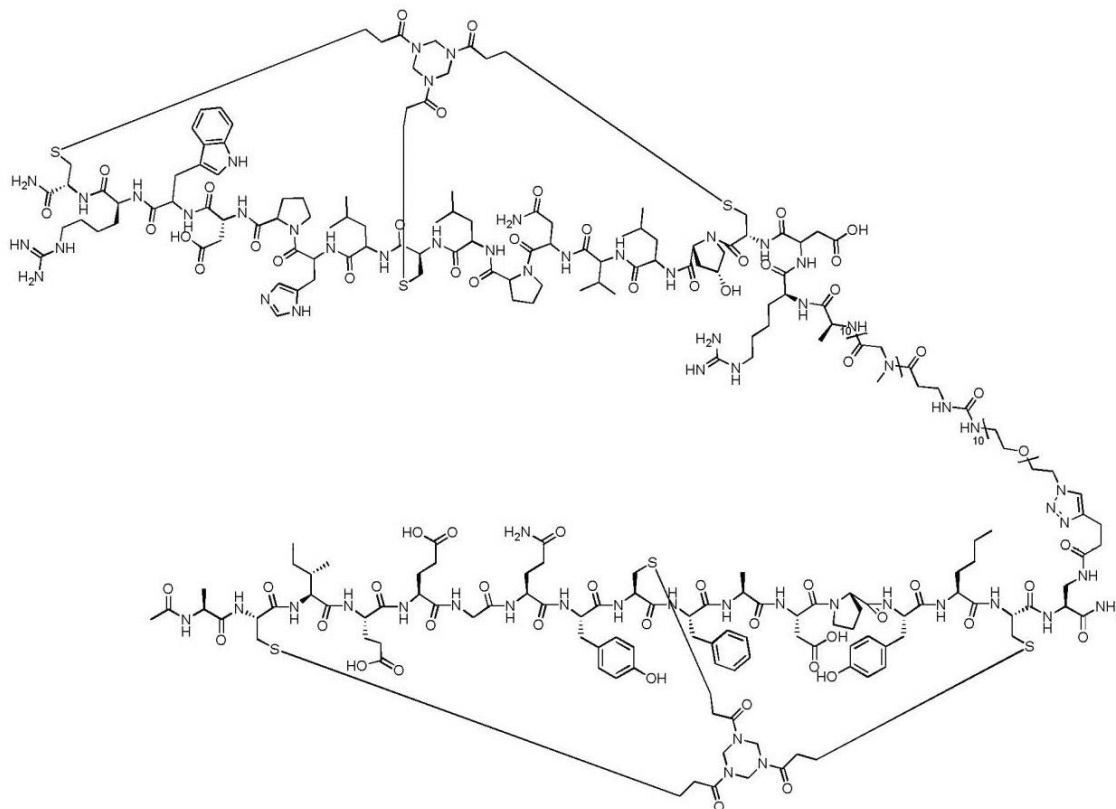
BCY9647

【0198】

40

50

【化 2 4】



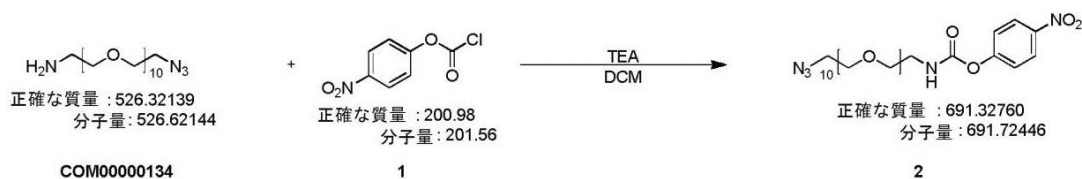
10

20

化合物 2 を調製する手順

【 0 1 9 9 】

【化 2 5】



30

COM 134 (300.0 mg、57.0 μmol 、1.0 当量)、化合物 1 (17.2 mg、85.3 μmol 、1.5 当量) の DCM (0.5 mL) 中溶液に、TEA (8.65 mg、11.9 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 25 で 1 時間攪拌した。LC-MS は、COM 134 が完全に消費されていることを示し、所望の質量 (計算 MW : 691.72、実測 m/z : 692.3 ($[M+H]^+$) および 709.3 ($[M+NH_4]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮し、次いで、凍結乾燥して、粗化合物 2 (30.5 mg、粗) を白色として得た。

40

【 0 2 0 0 】

化合物 3 を調製する手順

【 0 2 0 1 】

【化 2 6】



50

化合物 2 (1 0 m g 、 1 . 0 当量) の D M F (1 m L) 中溶液に、 B C Y 6 0 9 9 (4 6 m g 、 1 , 0 当量) および D I E A (5 . 6 1 m g 、 7 . 5 5 μ L 、 3 . 0 当量) を添加した。混合物を 3 0 で 2 時間攪拌した。 L C - M S は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW : 3 7 3 5 . 2 8 実測 m/z : 1 2 4 5 . 9 ([M / 3 + H] ⁺) および 9 3 4 . 5 ([M / 4 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 3 (3 4 m g 、 収率 6 2 . 9 6 % 、 純度 1 0 0 %) を白色固体として得た。

【 0 2 0 2 】

B C Y 9 6 4 7 を調製する手順

10

【 0 2 0 3 】

【 化 2 7 】



化合物 3 (3 4 m g 、 9 . 1 0 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 7 7 4 1 (2 3 m g 、 1 0 . 0 8 μ m o l 、 1 . 1 1 当量) および T H P T A (0 . 4 M 、 1 1 . 4 μ L 、 0 . 5 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1 、 2 m L 、 予め脱気し、 N ₂ で 3 回バ

ージした) に溶解し、次いで、 C u S O ₄ (0 . 4 M 、 1 1 . 4 μ L 、 0 . 5 当量) およ

び V c N a (0 . 4 M 、 2 2 . 8 μ L 、 1 当量) を N ₂ 下で添加した。 0 . 2 M N H ₄ H

C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8

に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、 N ₂ 雰囲気下、 2 5 ~ 3 0 で 1

2 時間攪拌した。 L C - M S は、化合物 3 が完全に消費されていること、および所望の m

/ z (計算 MW : 6 0 1 6 . 8 2 、 実測 m/z : 1 2 0 4 . 1 ([M / 5 + H] ⁺) 、 1

0 0 3 . 5 ([M / 6 + H] ⁺) 、 8 6 0 . 3 ([M / 7 + H] ⁺) を有する 1 つの主ピー

クを示した。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって直接精製した。 B C Y

9 6 4 7 (3 1 . 2 m g 、 収率 5 4 . 6 7 % 、 純度 9 5 . 9 6 %) を白色固体として得た。

20

30

【 0 2 0 4 】

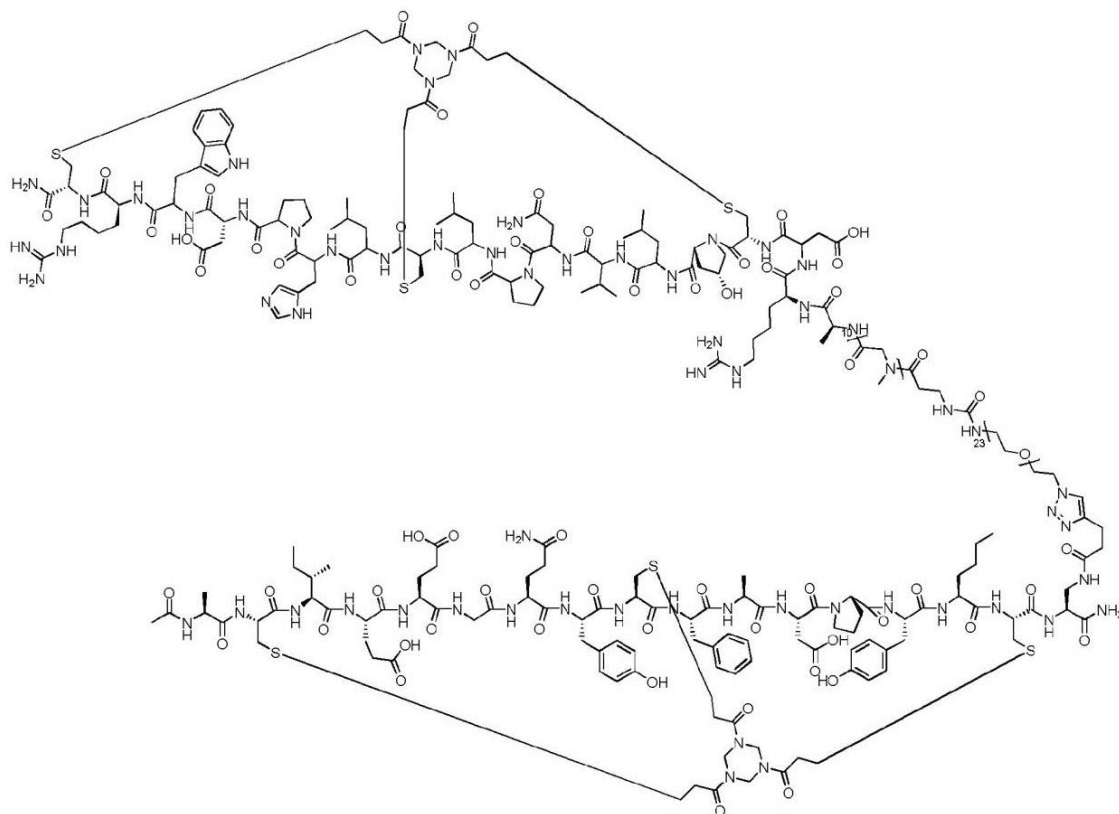
B C Y 9 6 4 8

【 0 2 0 5 】

40

50

【化 2 8】



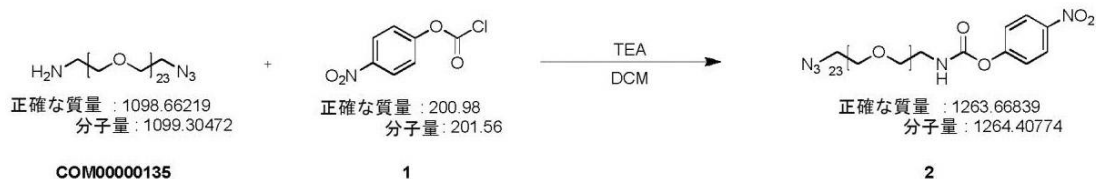
10

20

化合物 2 を調製する手順

【 0 2 0 6】

【化 2 9】



30

COM 135 (30 mg、27.29 μmol 、1.0 当量)、化合物 1 (8.25 mg、40.94 μmol 、1.5 当量) の DCM (0.5 mL) 中溶液に、TEA (4.14 mg、40.94 μmol 、5.70 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 °C で 1 時間攪拌した。LC-MS は、COM 135 が完全に消費されていることを示し、所望の質量 [計算 MW : 1264.41、実測 m/z : 1281.4 ($[\text{M} + \text{NH}_4]^+$)、649.8 ($[\text{M}/2 + \text{H}]^+$)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製して、化合物 2 (18 mg、14.2 μmol 、収率 52.14%) を得た。

40

【 0 2 0 7】

化合物 3 を調製する手順

【 0 2 0 8】

50

【化 3 0】



化合物 3 (9 m g 、 7 . 1 2 μ m o l 、 1 当量) の D M F (1 m L) 中溶液に、 B C Y 6 0 9 9 (2 3 m g 、 7 . 2 3 μ m o l 、 1 . 0 2 当量) および D I E A (2 . 7 6 m g 、 2 1 . 3 5 μ m o l 、 3 . 7 2 μ L 、 3 . 0 当量) を添加した。混合物を 3 0 で 2 時間攪拌した。 L C - M S は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW : 4 3 0 7 . 9 6 実測 m/z : 1 4 3 6 . 9 ([M / 3 + H] ⁺) 、 1 0 7 7 . 9 ([M / 4 + H] ⁺) 、 8 6 2 . 5 ([M / 5 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 3 (1 4 . 6 m g 、 収率 4 7 . 6 1 % 、 純度 1 0 0 %) を白色固体として得た。

10

【 0 2 0 9】

B C Y 9 6 4 8 を調製する手順

【 0 2 1 0】

【化 3 1】

20



化合物 3 (1 4 . 6 m g 、 3 . 3 9 μ m o l 、 1 当量) 、 B C Y 7 7 4 1 (8 . 5 m g 、 3 . 7 3 μ m o l 、 1 . 1 当量) および T H P T A (0 . 4 M 、 4 . 3 μ L 、 0 . 5 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1 、 2 m L 、 予め脱気し、 N ₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、 C u S O ₄ (. 4 M 、 4 . 3 μ L 、 0 . 5 当量) および V c N a (0 . 4 M 、 8 . 6 μ L 、 1 . 0 当量) を N ₂ 下で添加した。 0 . 2 M N H ₄ H C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、 N ₂ 雰囲気下、 2 5 ~ 3 0 で 1 2 時間攪拌した。 L C - M S は、化合物 3 が完全に消費されていること、および所望の m/z (MW : 6 5 8 9 . 5 0 、 実測 m/z : 1 0 9 8 . 8 ([M / 6 + H] ⁺) 、 9 4 2 . 1 ([M / 7 + H] ⁺) 、 8 2 4 . 6 ([M / 8 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークを示した。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって直接精製した。 B C Y 9 6 4 8 (1 4 . 7 m g 、 収率 6 3 . 3 4 % 、 純度 9 6 . 2 2 %) を白色固体として得た。

30

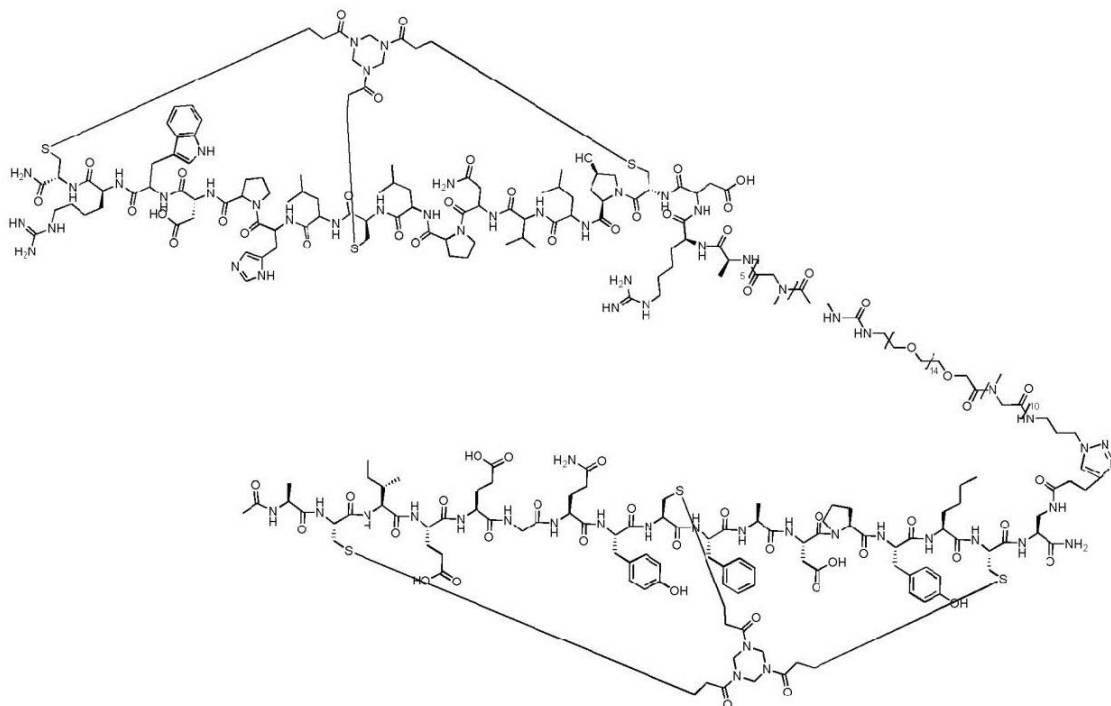
【 0 2 1 1】

B C Y 9 6 5 5

40

【 0 2 1 2】

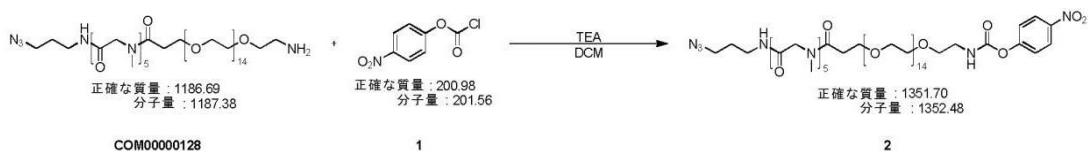
【化 3 2】



化合物 2 を調製する手順

【 0 2 1 3】

【化 3 3】



COM 1 2 8 (1 2 0 m g 、 1 0 1 . 0 6 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 化合物 1 (2 5 m g 、 1 2 4 . 0 3 μ m o l 、 1 . 2 5 当量) の D C M (0 . 5 m L) 中溶液に、 T E A (1 5 . 3 4 m g 、 1 5 1 . 5 9 μ m o l 、 2 1 . 1 0 μ L 、 1 . 5 当量) を添加した。混合物を 2 5 で 1 時間攪拌した。 L C - M S は、所望の m / z (計算 MW : 1 3 5 2 . 4 8 、 実測 m / z : 6 7 6 . 8 ([M / 2 + H] ⁺) 、 1 3 6 9 . 3 ([M + N H 4] ⁺)) を有する 1 つの新たなピークが検出されることを示した。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 H P L C (中性条件) によって精製した。化合物 2 (1 4 m g 、 8 . 9 9 μ m o l 、 収率 8 . 9 0 % 、 純度 8 6 . 8 6 %) を無色の油状物として得た。

【 0 2 1 4】

化合物 3 を調製する手順

【 0 2 1 5】

【化 3 4】



化合物 2 (7 m g 、 5 . 1 8 μ m o l 、 1 . 0 当量) および B C Y 6 0 9 9 (1 6 m g 、 5 . 0 3 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M F (2 m L) 中溶液に、 D I E A (2 . 0 1 m

g、 $15.53\text{ }\mu\text{mol}$ 、 $2.70\text{ }\mu\text{L}$)を添加した。混合物を 30°C で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算MW: 4396.02 、実測 m/z : 879.8 ($[M/5+H]^+$)および 1099.8 ($[M/4+H]^+$))を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相HPLC(0.1% TFA条件)によって精製した。化合物3(11.8 mg 、収率 48.29% 、純度 93.11%)を白色固体として得た。

【0216】

BCY9655を調製する手順

【0217】

【化35】



化合物3(11.8 mg 、 $2.69\text{ }\mu\text{mol}$ 、 1.0 当量)、BCY7741(7.0 mg 、 $3.07\text{ }\mu\text{mol}$ 、 1.14 当量)およびTHPTA(0.4 M 、 $6.8\text{ }\mu\text{L}$ 、 1 当量)の混合物を $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ ($1:1$ 、 2 mL 、予め脱気し、 N_2 で3回パー
ジした)に溶解し、次いで、 CuSO_4 (0.4 M 、 $6.8\text{ }\mu\text{L}$ 、 1.0 当量)および VcNa (0.4 M 、 $13.6\text{ }\mu\text{L}$ 、 2.0 当量)を N_2 下で添加した。 0.2 M NH_4HCO_3 ($1:1$ $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 中)を滴加することによって、この溶液の pH を8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、 N_2 雰囲気下、 $25\sim 30^\circ\text{C}$ で12時間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていること、および所望の m/z (計算MW: 6677.57 、実測 m/z : 1113.7 ($[M/6+H]^+$)、 954.7 ($[M/7+H]^+$))を有する1つの主ピークを示した。反応混合物を分取HPLC(TFA条件)によって直接精製した。BCY9655(1.9 mg 、 $0.26\text{ }\mu\text{mol}$ 、収率 9.65% 、純度 91.15%)を白色固体として得た。

【0218】

BCY9656

【0219】

10

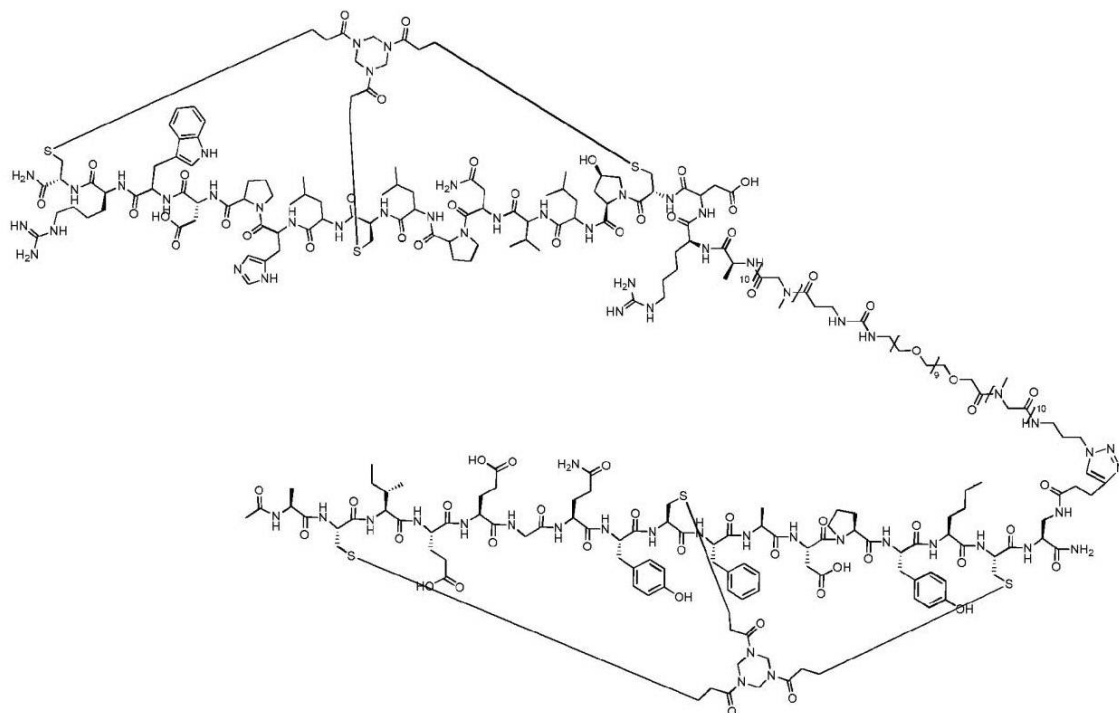
20

30

40

50

【化 3 6】



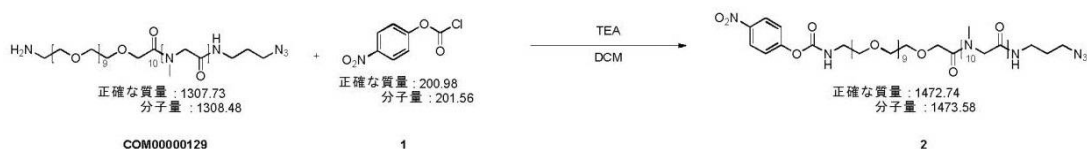
10

20

化合物 2 を調製する手順

【 0 2 2 0】

【化 3 7】



30

COM 1 2 9 (3 0 . 0 m g 、 2 2 . 9 3 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 化合物 1 (6 . 9 m g 、 3 4 . 3 9 μ m o l 、 1 . 5 当量) の D C M (3 m L) 中溶液に、 T E A (3 . 5 m g 、 3 4 . 3 9 μ m o l 、 4 . 8 μ L 、 1 . 5 当量) を添加した。混合物を脱気し、 N₂ で 3 回バージし、次いで、混合物を、 N₂ 雰囲気下、 2 5 ° C で 1 時間攪拌した。 L C - M S は、 C O M 1 2 9 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (計算 M W : 1 4 7 3 . 5 8 、実測 m / z : 7 3 7 . 3 ([M / 2 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 H P L C (中性条件) によって精製して、化合物 2 (1 2 . 3 m g 、 8 . 3 5 μ m o l 、収率 3 6 . 4 1 %) を白色固体として得た。

【 0 2 2 1】

40

化合物 3 を調製する手順

【 0 2 2 2】

【化 3 8】



2

3

化合物 2 (9 . 2 6 m g 、 6 . 2 8 μ m o l 、 1 . 0 当量) および B C Y 6 0 9 9 (1

50

10

BCY 9 6 5 6を調製する手順

【化 3 9】



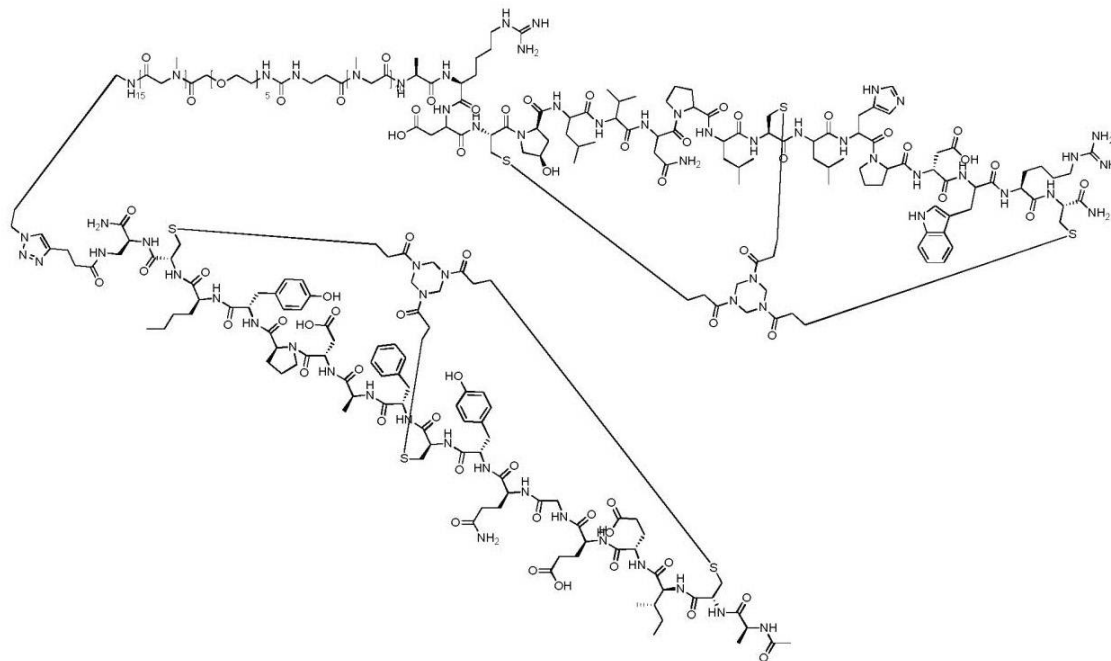
20

B C Y 9 6 5 7

30

40

【化 4 0】



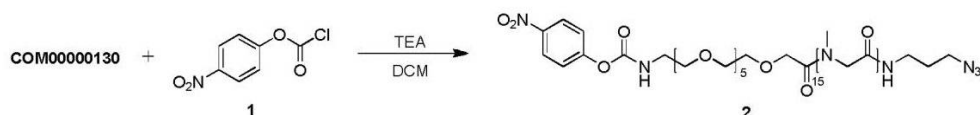
10

20

化合物 2 を調製する手順

【 0 2 2 7】

【化 4 1】



COM130 (30.0 mg、20.78 μmol 、1.0 当量)、化合物 1 (6.3 mg、31.17 μmol 、1.5 当量) の DCM (3 mL) 中溶液に、TEA (3.2 mg、31.17 μmol 、4.4 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 1 時間攪拌した。LC-MS は、COM130 が完全に消費されていることを示し、
 所望の m/z (計算 MW: 1608.7、実測 m/z : 804.8 ($[M/2 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮し、凍結乾燥して、
 化合物 2 (7.9 mg、粗) を白色固体として得た。

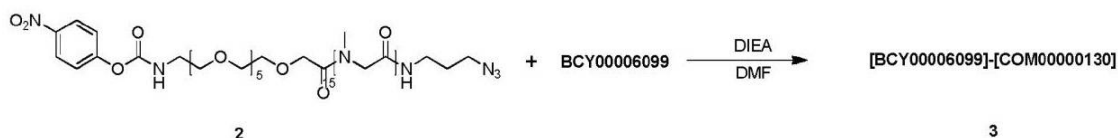
30

【 0 2 2 8】

化合物 3 を調製する手順

【 0 2 2 9】

【化 4 2】



40

化合物 2 (7.9 mg、4.91 μmol 、1.0 当量) および BCY6099 (16 mg、5.03 μmol 、1.02 当量) の DMF (1 mL) 中溶液に、DIEA (1.9 mg、14.73 μmol 、2.6 μL 、3.0 当量) を添加した。混合物を 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 4652.25、実測 m/z : 1551.3 ($[M/3 + H]^+$)、1163.6 ($[M/4]^+$)、931.1 ($[M/5 + H]^+$ 、776.1 ($[M/6 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮し

50

て、残留物を得た。粗生成物を逆相 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 3 (13.3 mg、2.86 μmol 、収率 53.22%、純度 91.42%) を白色固体として得た。

【0230】

BCY9657 を調製する手順

【0231】

【化43】



3

10

化合物 3 (13.3 mg、2.86 μmol 、1.0 当量)、BCY7741 (7.0 mg、3.07 μmol 、1.03 当量) および THPTA (0.4 M、7.5 μL 、1.0 当量) の混合物を t-BuOH/H₂O (1:1、2 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、7.5 μL 、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、15 μL 、2.0 当量) を N₂ 下で添加した。0.2 M NH₄HCO₃ (1:1 t-BuOH/H₂O 中) を滴加することによって、この溶液の pH を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、25 ~ 30 °C で 12 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [MW: 6933.78、実測 m/z: 1156.7 ([M/6 + H]⁺)、991.4 ([M/7 + H]⁺)、867.4 ([M/8 + H]⁺)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって直接精製した。BCY9657 (8.4 mg、収率 40.21%、純度 94.9%) を白色固体として得た。

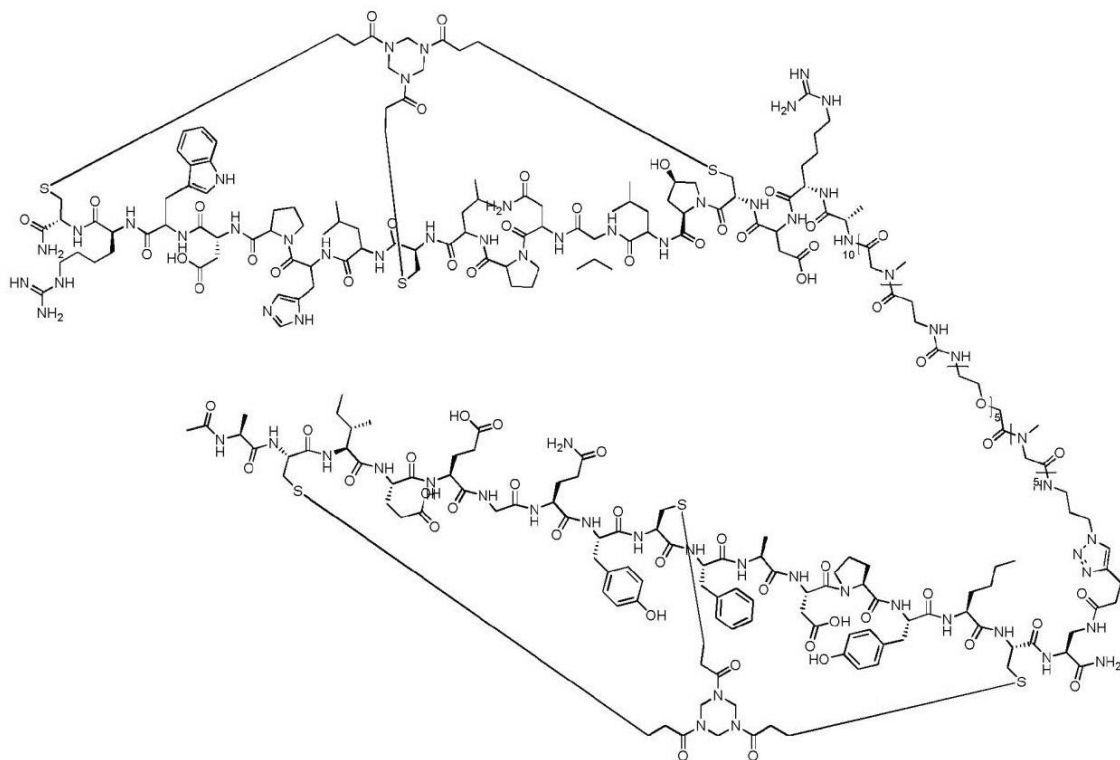
20

【0232】

BCY9658

【0233】

【化44】



BCY00009658

30

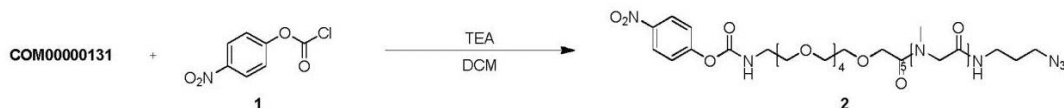
40

50

化合物 2 を調製する手順

【 0 2 3 4 】

【 化 4 5 】



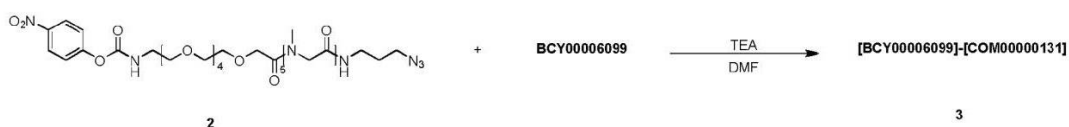
COM 1 3 1 (1 6 7 . 0 m g 、 2 2 7 . 8 9 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、化合物 1 (5 5 . 0 m g 、 2 7 2 . 8 7 μ m o l 、 1 . 2 当量) の D C M (5 m L) 中溶液に、T E A (3 6 . 4 m g 、 3 5 9 . 2 3 μ m o l 、 5 0 . 0 μ L 、 1 . 6 当量) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3 0 で 1 時間攪拌した。L C - M S は、所望の m/z (M W : 8 9 7 . 9 3 実測 9 2 0 . 3 ([M + N a ⁺])) を有する 1 つの主ピークが検出されることを示した。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 2 (3 5 m g 、 3 3 . 7 4 μ m o l 、 収率 1 4 . 8 1 % 、純度 8 6 . 5 6 %) を無色の油状物として得た。

【 0 2 3 5 】

化合物 3 を調製する手順

【 0 2 3 6 】

【 化 4 6 】



化合物 2 (1 5 m g 、 1 6 . 7 1 μ m o l 、 1 . 0 当量) および B C Y 6 0 9 9 (5 3 m g 、 1 6 . 6 5 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M F (2 m L) 中溶液に、D I E A (6 . 4 8 m g 、 6 5 . 0 5 μ m o l 、 5 0 . 1 μ L 、 4 . 0 当量) を添加した。混合物を 3 0 で 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (M W : 3 9 4 1 . 4 7 実測 m/z : 9 8 6 . 0 ([M / 4 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相 H P L C (T F A 条件) によって精製した。[B C Y 6 0 9 9] - [C O M 1 3 1] (5 m g 、 収率 5 0 . 4 8 % 、純度 9 4 . 9 6 %) を白色固体として得た。

【 0 2 3 7 】

B C Y 9 6 5 8 を調製する手順

【 0 2 3 8 】

【 化 4 7 】



3

化合物 3 (3 5 m g 、 8 . 8 8 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 7 7 4 1 (2 1 m g 、 9 . 2 0 μ m o l 、 1 . 0 3 当量) および T H P T A (0 . 4 M 、 2 2 . 2 μ L 、 1 . 0 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1 、 2 m L 、 予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 4 M 、 2 2 . 2 μ L 、 1 . 0 当量) および V c N a (0 . 4 M 、 4 4 . 4 μ L 、 2 . 0 当量) を N ₂ 下で添加した。0 . 2 M N H ₄ H C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N ₂ 雰囲気下、2 5 ~ 3 0 で 1 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [M W : 6 2 2 3 . 0 1 実測 m/z : 1 0 3 8 . 0 ([M / 6 + H] ⁺) および 8 8 9 . 8 ([M / 8 + H] ⁺)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって直接精製した。B C Y 9 6 5 8 (1 3 . 2 m g 、 収

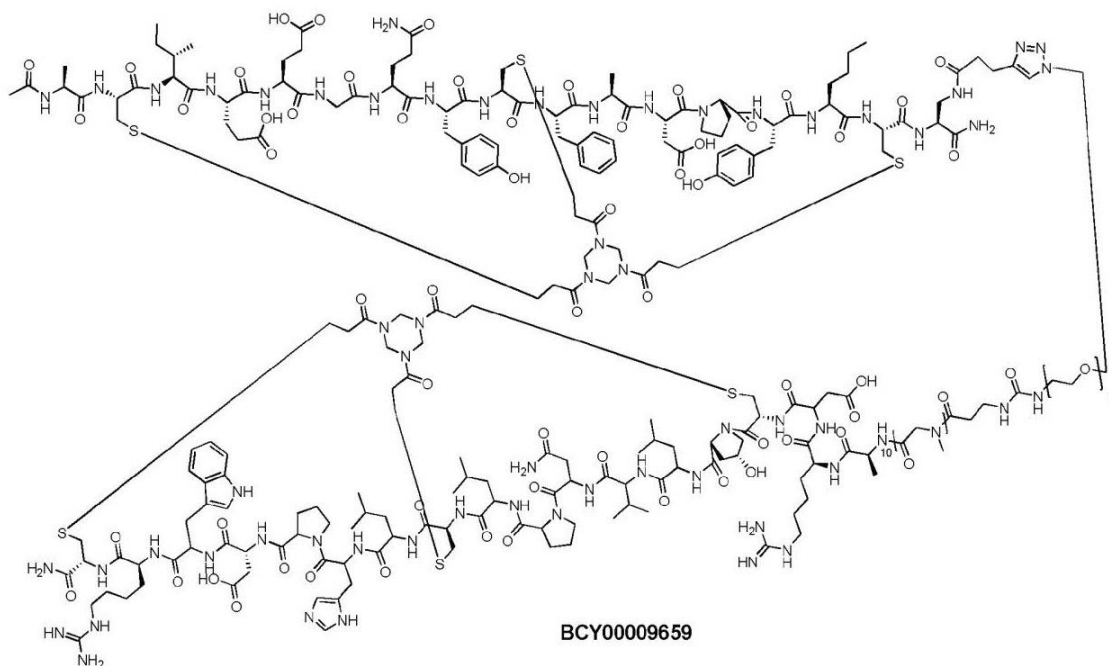
率 21.54%、純度 90.16%) を白色固体として得た。

【0239】

BCY9659

【0240】

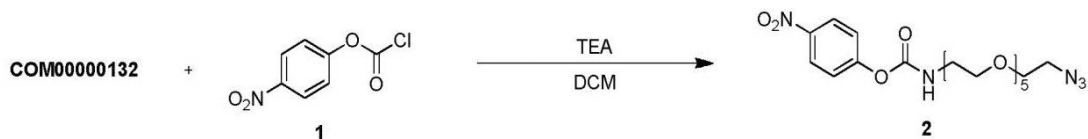
【化48】



化合物 2 を調製する手順

【0241】

【化49】



COM132 (20.0 mg、65.28 μmol 、1.0 当量)、化合物 1 (15.8 mg、78.34 μmol 、1.2 当量) の DCM (5 mL) 中溶液に、TEA (36.4 mg、359.23 μmol 、50 μL 、5.5 当量) を添加した。混合物を 25 で 1 時間攪拌した。所望の m/z (MW: 471.46、実測 m/z : 489.2 ($[M + NH_4]^+$)) を有する LC-MS の 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、化合物 2 (26 mg、粗) の無色の油状物を得た。

【0242】

化合物 3 を調製する手順

【0243】

【化50】



化合物 2 (15.0 mg、4.71 μmol 、1.0 当量) および BCY6099 (3

10

20

30

40

50

. 33 mg、7.07 μmol 、1.5 当量) の DMF (3 mL) 中溶液に、TEA (0.7 mg、6.93 μmol 、1 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 3515.01、実測 m/z : 1172.1 ($[M/3 + H]^+$) 879.5 ($[M/4 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 3 (12.7 mg、3.26 μmol 、収率 69.23%、純度 90.3%) を白色固体として得た。

【0244】

BCY9659 を調製する手順

10

【0245】

【化51】



3

化合物 3 (12.7 mg、2.89 μmol 、1.0 当量)、BCY7741 (6.80 mg、2.98 μmol 、1.03 当量) および THPTA (1.3 mg、2.99 μmol 、1.03 当量) の混合物を t-BuOH/H₂O (1:1、2 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、7.3 μL 、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、14.6 μL 、2.0 当量) を N₂ 下で添加した。0.2 M NH₄HCO₃ (1:1 t-BuOH/H₂O 中) を滴加することによって、この溶液の pH を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、25 ~ 30 で 12 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [MW: 5796.54 実測 m/z : 1159.8 ($[M/5 + H]^+$) 966.7 ($[M/6 + H]^+$)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって直接精製した。BCY9659 (6.2 mg、1.06 μmol 、収率 36.58%、純度 98.86%) を白色固体として得た。

20

【0246】

BCY9758

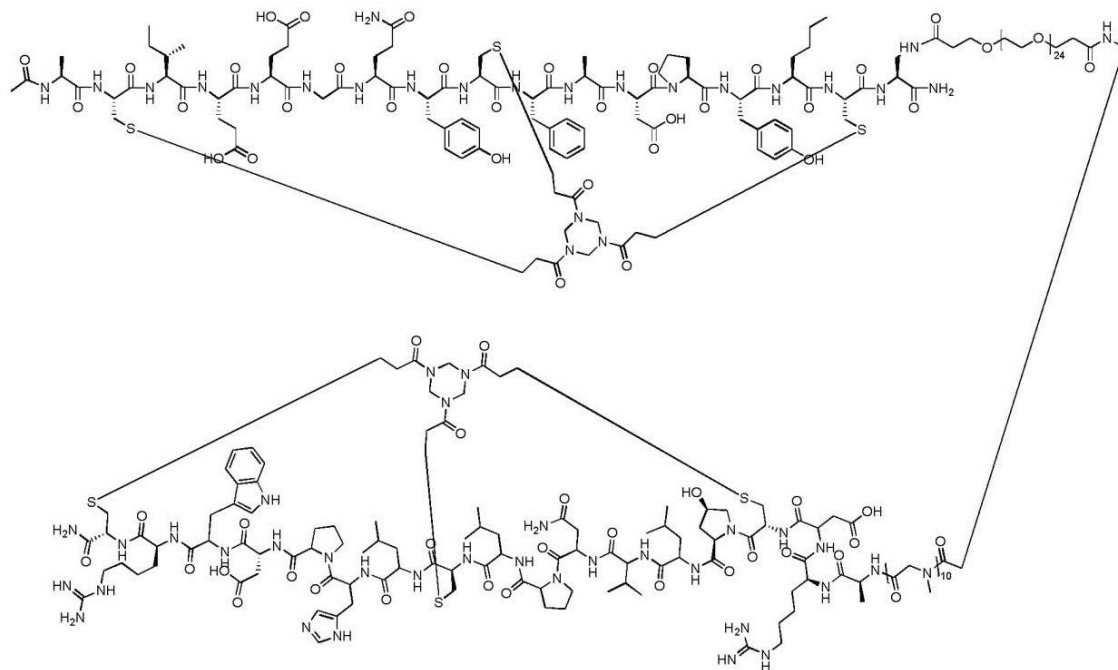
30

【0247】

40

50

【化 5 2】



10

20

化合物 2 を調製する手順

【 0 2 4 8】

【化 5 3】



化合物 1 (5 . 0 m g 、 3 . 5 4 μmol 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 6 0 9 9 (1 1 . 3 m g 、 3 . 5 4 μmol 、 1 . 0 当量) の D M F (3 m L) 中溶液に、 D I E A (0 . 9 m g 、 7 . 0 7 μmol 、 1 . 2 μL 、 2 . 0 当量) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3 0 で 2 0 分間攪拌した。 L C - M S は、所望の m/z (M W : 4 4 8 1 . 1 1 、実測 m/z : 1 1 0 1 . 3 ([M / 4 + H] $^{+}$)) を有する 1 つのピークが検出されることを示した。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮し、凍結乾燥して、化合物 2 (1 5 m g 、粗) を白色固体として得た。

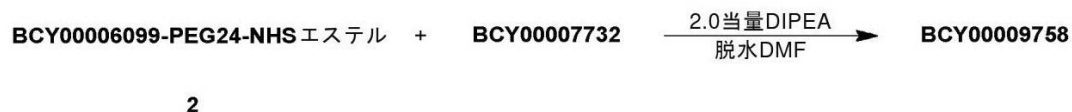
30

【 0 2 4 9】

B C Y 9 7 5 8 を調製する手順

【 0 2 5 0】

【化 5 4】



40

化合物 2 (1 5 m g 、 3 . 3 5 μmol 、 1 . 0 当量) および B C Y 7 7 3 2 (1 4 . 7 4 m g 、 6 . 6 9 μmol 、 2 . 0 当量) の D M F (3 m L) 中溶液に、 D I E A (0 . 9 m g 、 7 . 0 7 μmol 、 1 . 2 μL 、 2 . 1 当量) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3 0 で 2 時間攪拌した。 L C - M S は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (M W : 6 5 6 7 . 4 8 、実測 m/z : 1 0 9 5 . 1 ([M / 6 + H]) 、 9 3 8 . 8 ([M / 7 + H] $^{+}$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾

50

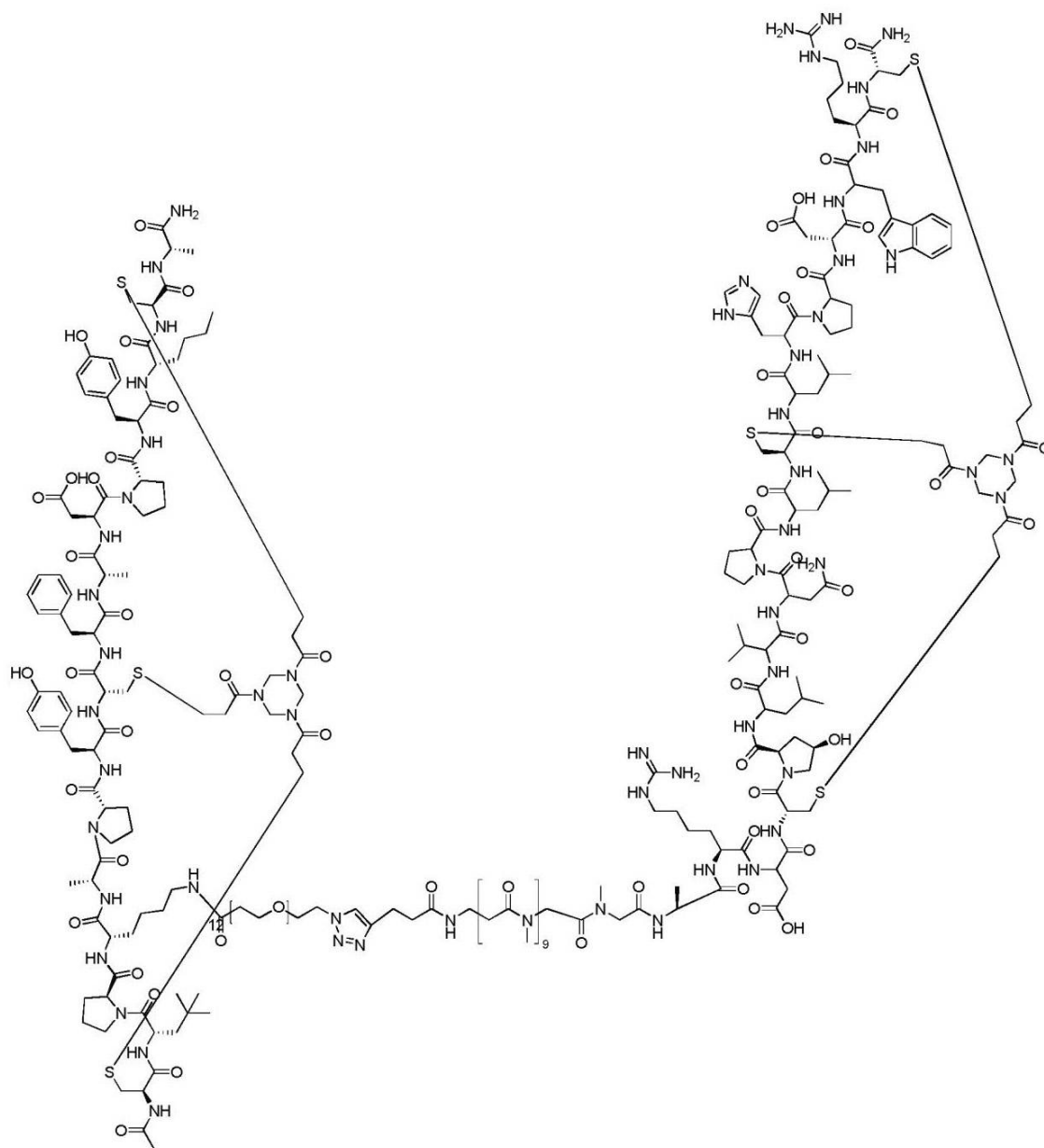
過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相 HPLC (TFA 条件) によって精製した。BCY 9758 (5.8 mg、収率 24.26%、純度 91.97%) を白色固体として得た。

【0251】

BCY 10568

【0252】

【化55】

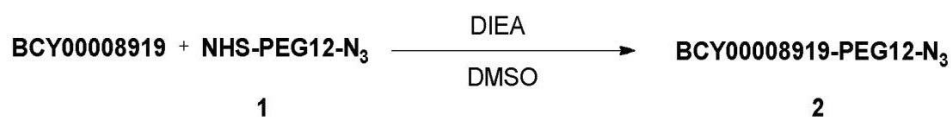


BCY00010568

BCY 8919 - PEG 12 - N₃ を調製する手順

【0253】

【化56】



10

20

30

40

50

BCY8919 (80.0 mg、38.47 μmol 、1.0 当量) および化合物 1 (29.6 mg、40.01 μmol 、1.04 当量) を DMSO (1 mL) に溶解した。次いで、溶液に DIPEA (7.46 mg、55.71 μmol 、10.0 μl 、1.5 当量) を添加し、次いで、混合物を 25 ~ 30 °C で 2 時間攪拌した。LC-MS は、BCY8919 の大部分が消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 2705.16、実測 m/z : 1353.1 ([$M/2 + H$] $^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、化合物 2 (18.6 mg、6.86 μmol 、収率 17.83%、純度 99.76%) を白色固体として得た。

【0254】

BCY10568 を調製する手順

10

【0255】

【化57】



2

化合物 2 (9.0 mg、3.33 μmol 、1.0 当量) および BCY6169 (11.0 mg、3.36 μmol 、1.01 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 2 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、8.3 μL 、1.0 当量)、VcNa (1.4 mg、7.06 μmol 、2.1 当量) および THPTA (1.4 mg、3.22 μmol 、1.0 当量) を添加した。最後に、0.4 M NH₄HCO₃ を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、30 °C で 16 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていること、および所望の m/z (計算 MW: 5967.90、実測 m/z : 995.00 ([$M/5 + H$] $^+$) および 1194.70 ([$M/6 + H$] $^+$)) を有する 1 つの主ピークを示した。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY10568 (13.4 mg、2.16 μmol 、収率 69.44%、純度 96.3%) を白色固体として得た。

20

【0256】

BCY10570

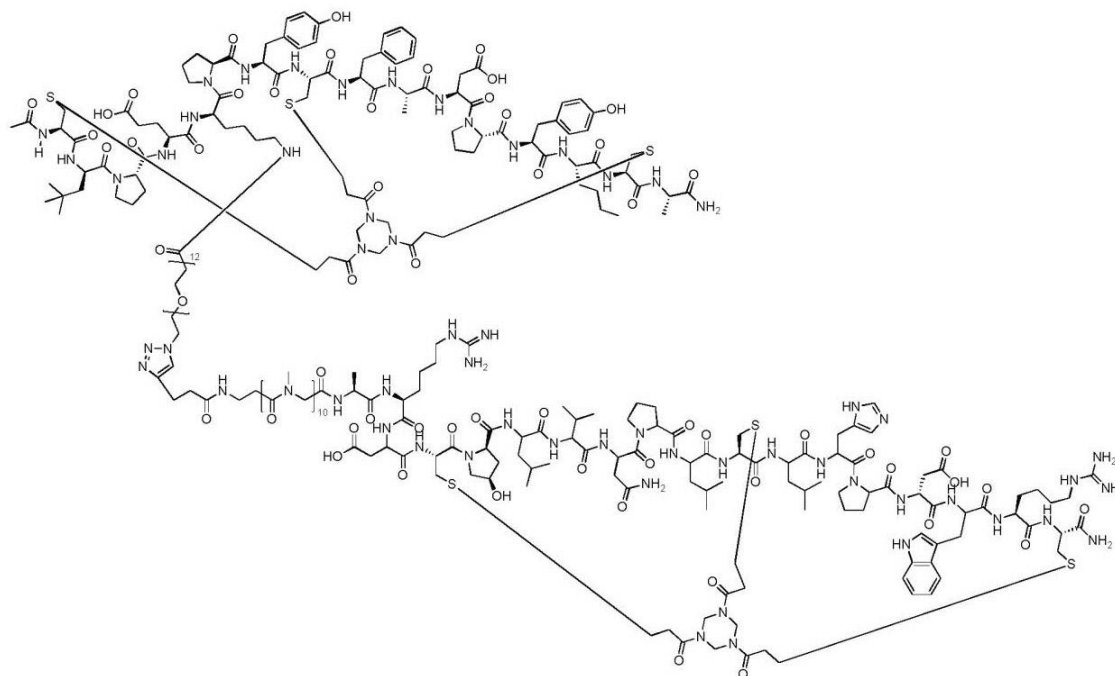
【0257】

30

40

50

【化 5 8】

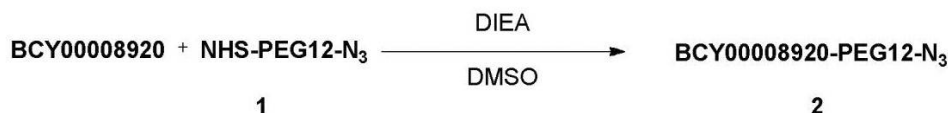


BCY00010570

BCY8920 - PEG12 - N₃を調製する手順

【0258】

【化 5 9】



BCY8920 (37 mg、17.31 μmol、1.0 当量) および化合物 1 (15 mg、20.25 μmol、1.2 当量) の DMSO (2 mL) 中溶液に、DIEA (3.36 mg、25.96 μmol、4.5 μL、1.5 当量) を添加した。混合物を 30 で 12 時間攪拌した。LC-MS は、BCY8920 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 2763.2、実測 m/z: 689.07 ([M/4 - H⁺])) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去し、残留物を得た。次いで、残留物を分取 HPLC (中性条件) によって精製した。化合物 2 (22.8 mg、8.15 μmol、収率 47.09%、純度 98.78%) を白色固体として得た。

【0259】

BCY10570を調製する手順

【0260】

【化 6 0】



化合物 2 (6 mg、2.17 μmol、1.0 当量) および BCY6169 (7.08 mg、2.17 μmol、1.0 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 2 mL

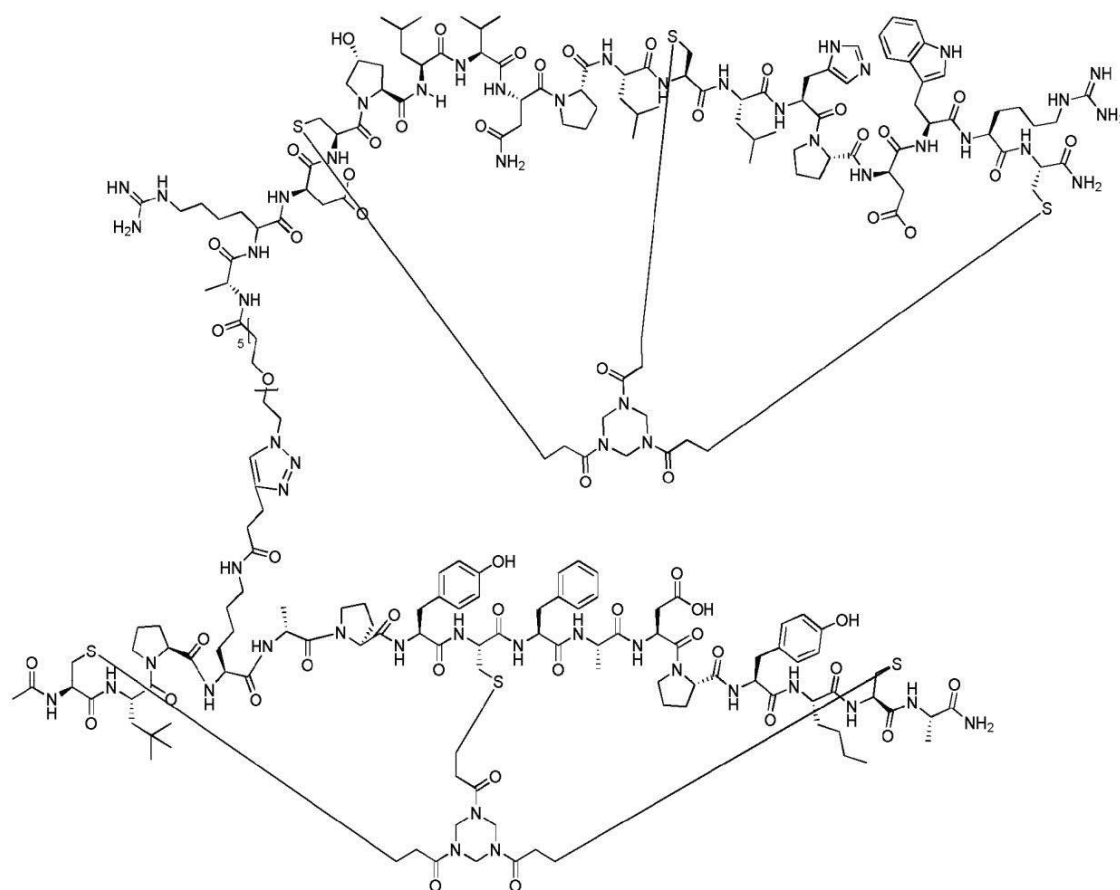
に溶解し、次いで、 CuSO_4 (0.4 M、5.4 μL 、1.0 当量)、 VcNa (0.4 M、10.8 μL 、2.0 当量) および THPTA (0.4 M、5.4 μL 、1.0 当量) を添加した。最後に、0.2 M NH_4HCO_3 を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、 N_2 で 3 回パージした。反応混合物を、 N_2 雰囲気下、30 で 4 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MS: 6025.93、実測 m/z : 1004.56 ($[\text{M}/6 + \text{H}]^+$) および 861.48 ($[\text{M}/7 + \text{H}]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。BCY10570 (7.2 mg、1.17 μmol 、収率 53.90%、純度 97.95%) を白色固体として得た。

【0261】

BCY10574

【0262】

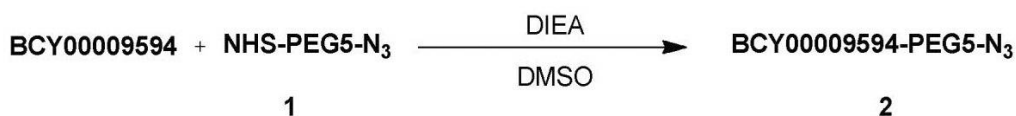
【化61】



化合物 2 を調製する手順

【0263】

【化62】



BCY9594 (65 mg、27.07 μmol 、1 当量)、化合物 1 (12.00 mg、27.75 μmol 、1.02 当量) の DMSO (1 mL) 中溶液に、DIEA (5.25 mg、40.61 μmol 、7.07 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、BCY9594 が完全に消費されているこ

とを示し、所望の m/z (計算 MW : 2718.13、実測 m/z : 906.04 ($[M/3 + H]^+$)、1359.07 ($[M/2 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 2 (42.6 mg、15.67 μmol 、収率 57.89%、純度 100%) を白色固体として得た。

【0264】

BCY10574 を調製する手順

【0265】

【化63】



2

化合物 2 (20 mg、7.36 μmol 、1.0 当量)、BCY8927 (17 mg、7.87 μmol 、1.07 当量) および THPTA (0.4 M、18.4 μL 、1.0 当量) の混合物を $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1、2 mL、予め脱気し、 N_2 で 3 回パージした) に溶解し、次いで、 CuSO_4 (0.4 M、18.4 μL 、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、36.8 μL 、2.0 当量) を N_2 下で添加した。0.2 M NH_4HCO_3 (1:1 $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 中) を滴加することによって、この溶液の pH を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、 N_2 雰囲気下、25 ~ 30 で 12 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW : 4877.68、実測 m/z : 1219.42 ($[M/4 + H]^+$) および 975.54 ($[M/5 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって直接精製した。BCY10574 (17.6 mg、3.41 μmol 、収率 46.29%、純度 94.40%) を白色固体として得た。

【0266】

BCY10575

【0267】

10

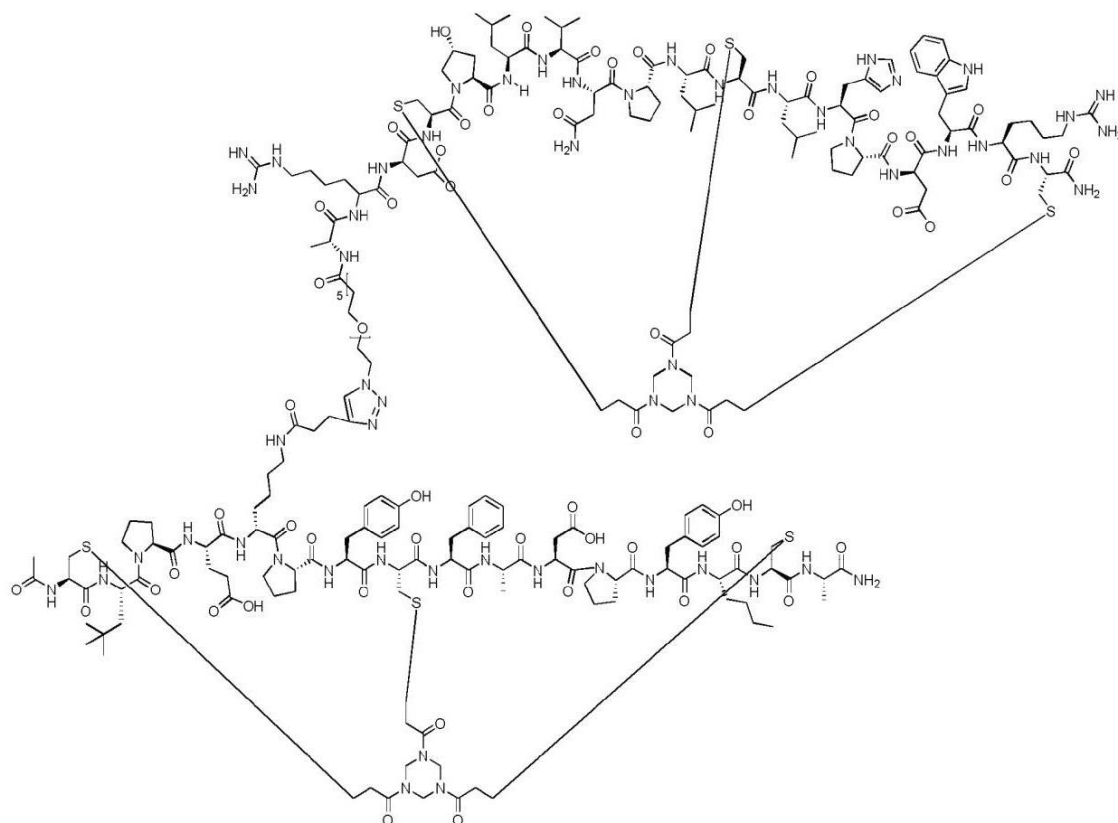
20

30

40

50

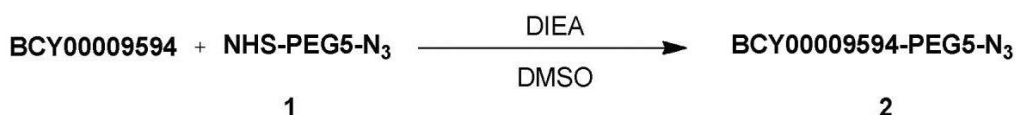
【化 6 4】



化合物 2 を調製する手順

【 0 2 6 8】

【化 6 5】



BCY9594 (65 mg、27.07 μmol 、1 当量)、化合物 1 (12.0 mg、27.75 μmol 、1.02 当量) の DMSO (1 mL) 中溶液に、DIEA (5.25 mg、40.61 μmol 、7.07 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 1 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [計算 MW : 2718.13 実測 m/z : 906.04 ([$M/3 + H$] $^+$) および 1359.07 ([$M/2 + H$] $^+$)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 2 (42.6 mg、15.67 μmol 、収率 57.89 %、純度 100 %) を白色固体として得た。

【 0 2 6 9】

BCY10575 を調製する手順

【 0 2 7 0】

【化 6 6】



化合物 2 (20 mg、7.36 μmol 、1.0 当量)、BCY8928 (17 mg、7.67 μmol 、1.04 当量) および THPTA (0.4 M、18.4 μL 、1.0

当量)の混合物を t -BuOH/H₂O (1:1、2 mL、予め脱気し、N₂で3回パー
ジした)に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、18.4 μ L、1.0 当量)および
VcNa (0.4 M、36.8 μ L、2.0 当量)をN₂下で添加した。0.2 M NH₄
HCO₃ (1:1 t -BuOH/H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを
8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、25~30
で12時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていることを示し、所望の
 m/z [計算MW: 4935.71、実測 m/z : 1234.59 ([M/4+H]⁺)
および987.71 ([M/5+H]⁺)]を有する1つの主ピークが検出された。反応
混合物を分取HPLC (TFA条件)によって直接精製した。BCY10575 (12 m
g、2.37 μ mol、収率32.27%、純度97.67%)を白色固体として得た。

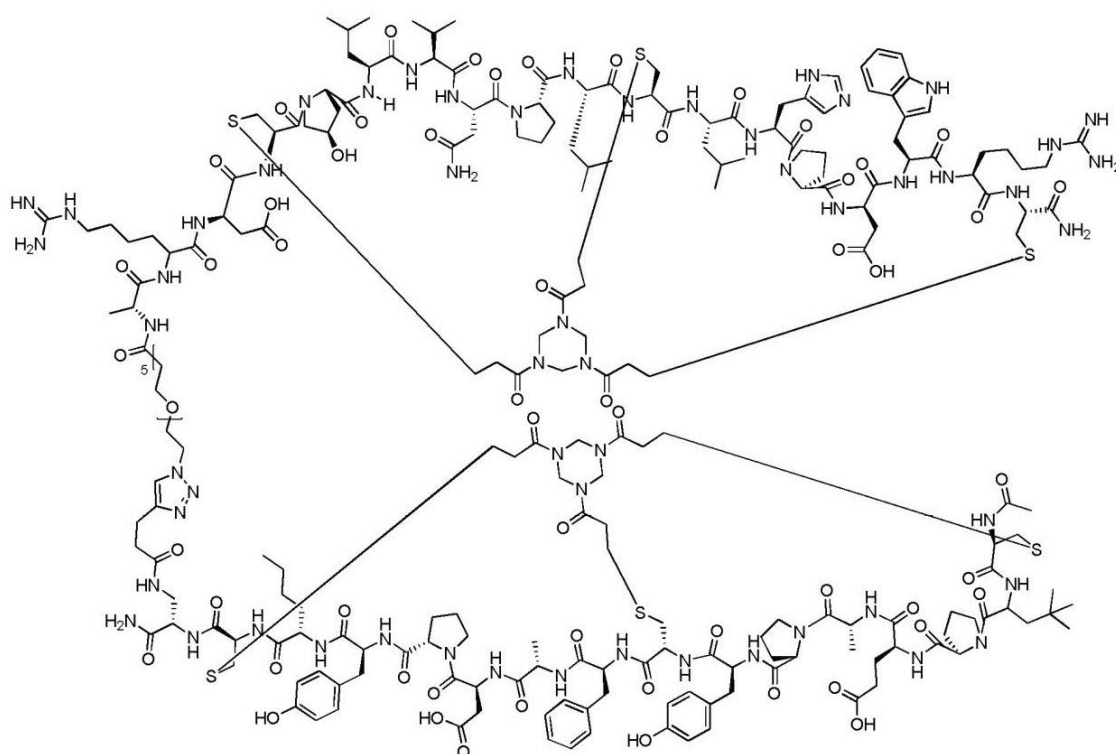
10

【0271】

BCY10576

【0272】

【化67】



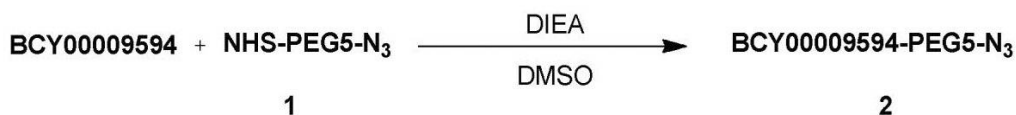
20

30

化合物2を調製する手順

【0273】

【化68】



40

BCY9594 (30.0 mg、12.50 μ mol、1.0 当量)、化合物1 (5.54 mg、12.81 μ mol、1.02 当量)のDMSO (1 mL)中溶液に、DIEA (2.42 mg、18.74 μ mol、3.3 μ L、1.5 当量)を添加した。混合物を25~30で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物1が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [計算MW: 2718.13、実測 m/z : 906.45 ([M/3+H]⁺)および1359.50 ([M/2+H]⁺)]を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分

50

取 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 2 (1 6 m g 、 5 . 8 0 μ m o l 、 収率 4 6 . 4 2 % 、 純度 9 8 . 5 4 %) を白色固体として得た。

【 0 2 7 4 】

B C Y 1 0 5 7 6 を調製する手順

【 0 2 7 5 】

【 化 6 9 】



2

10

化合物 2 (1 7 . 0 m g 、 6 . 2 5 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 1 1 0 1 4 (1 3 . 6 m g 、 6 . 2 5 μ m o l 、 1 . 0 当量) および T H P T A (0 . 4 M 、 1 . 8 μ L 、 2 . 0 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1 、 2 m L 、 予め脱気し、N₂で3回パージした) に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 4 M 、 1 5 . 6 μ L 、 1 . 0 当量) および V c N a (0 . 4 M 、 1 . 8 4 μ L 、 2 . 0 当量) を N ₂ 下で添加した。0 . 2 M N H ₄ H C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、2 5 ~ 3 0 で 1 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 2 の大部分が消費されていることを示し、所望の m / z [計算 M W : 4 8 9 3 . 6 3 、実測 m / z : 1 2 2 4 . 7 ([M / 4 + H] ⁺) および 9 8 0 . 0 1 ([M / 6 + H] ⁺)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって直接精製した。B C Y 1 0 5 7 6 (2 0 . 5 m g 、 4 . 1 3 μ m o l 、 収率 6 6 . 0 2 % 、 純度 9 8 . 5 7 %) を白色固体として得た。

20

【 0 2 7 6 】

B C Y 1 0 5 7 7

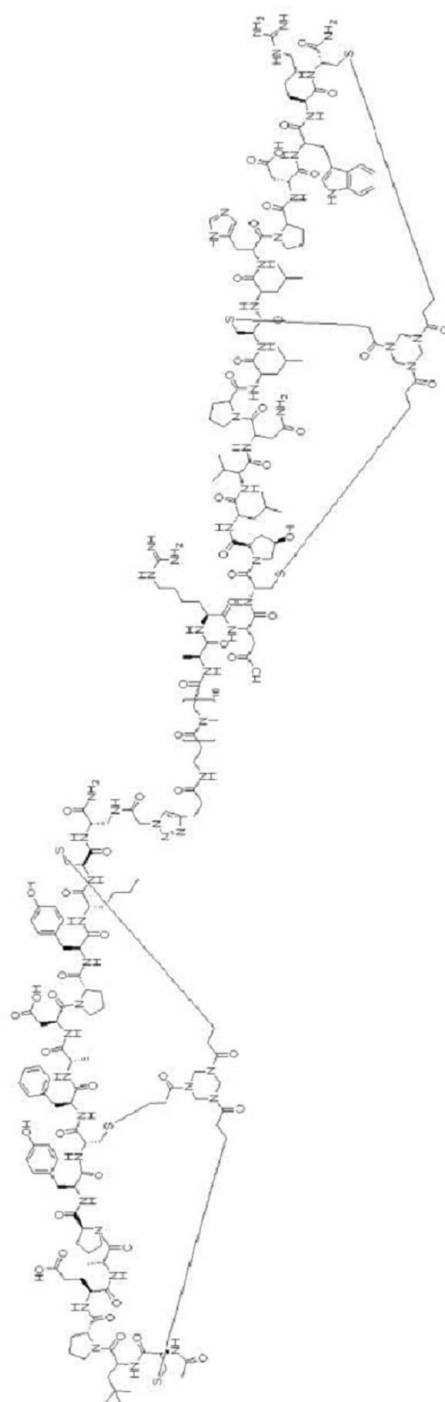
【 0 2 7 7 】

30

40

50

【化 7 0】

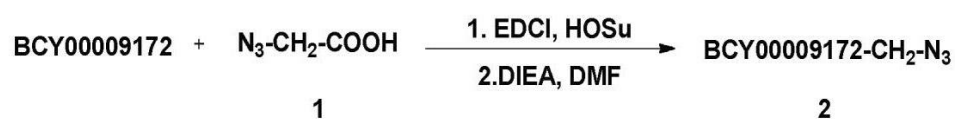


BCY00010577

化合物 2 を調製する手順

【 0 2 7 8】

【化 7 1】



化合物 1 (5 . 0 m g 、 4 9 . 5 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M F (1 m L) 中溶液に、 E D C I (8 . 5 m g 、 5 4 . 8 μ m o l 、 1 . 1 当量) および H O S u (5 . 7 m g

、 $49.5 \mu\text{mol}$ 、 1.0 当量)を添加した。混合物を $25 \sim 30^\circ\text{C}$ で 30 分間攪拌した。TLCは、化合物1が完全に消費されており、1つの新たなスポットが形成されたことを示した。次いで、BCY9172(53 mg 、 $25.29 \mu\text{mol}$ 、 0.47 当量)およびDIEA(3.27 mg 、 $25.29 \mu\text{mol}$ 、 $4.4 \mu\text{L}$ 、 0.47 当量)を反応混合物に添加した。混合物を $25 \sim 30^\circ\text{C}$ で 2 時間攪拌した。LC-MSは、BCY9172が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 2178.46 、実測 m/z : 1089.5700 ($[(M/2 + H)^+]$))を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去し、残留物を得た。次いで、残留物を分取HPLC(中性条件)によって精製した。化合物2(30 mg 、 $13.77 \mu\text{mol}$ 、収率 54.45% 、純度 100%)を白色固体として得た。

10

【0279】

BCY10577を調製する手順

【0280】

【化72】



化合物2(20 mg 、 $9.18 \mu\text{mol}$ 、 1.0 当量)およびBCY6169(32.95 mg 、 $10.10 \mu\text{mol}$ 、 1.1 当量)を最初に $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ ($1:1$) 2 mL に溶解し、次いで、 CuSO_4 (0.4 M 、 $23 \mu\text{L}$ 、 1 当量)、 VcNa (0.4 M 、 $46 \mu\text{L}$ 、 2.0 当量)およびTHPTA(0.4 M 、 $23 \mu\text{L}$ 、 1.0 当量)を添加した。最後に、 1 M NH_4HCO_3 を添加して、 pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、 N_2 で 3 回パージした。反応混合物を、 N_2 雰囲気下、 30°C で 4 時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算MS: 5441.20 、実測 m/z : 1361.8 ($[(M/4 + H)^+]$))を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取HPLC(TFA条件)によって精製した。BCY10577(16.2 mg 、 $2.98 \mu\text{mol}$ 、収率 32.43%)を白色固体として得た。

20

【0281】

[実施例3]

ネクチン-4/CD137結合ヘテロタンデム二環式ペプチドの合成

BCY8854

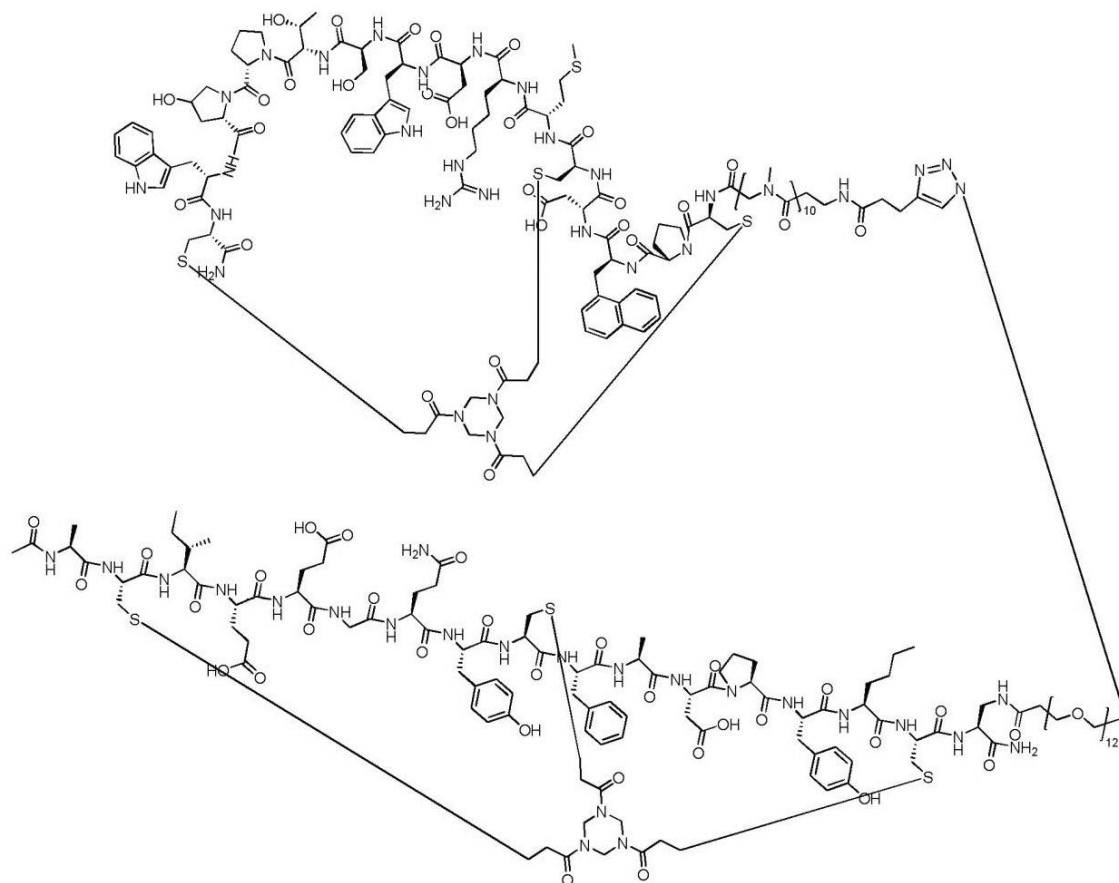
【0282】

30

40

50

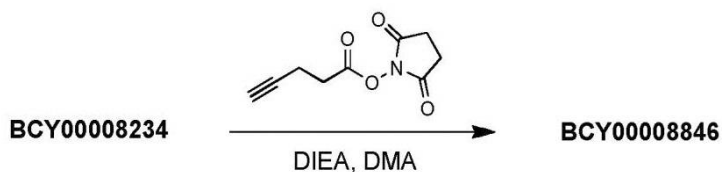
【化 7 3】



BCY8846を調製する一般的な手順

【0283】

【化 7 4】



BCY8234 (PYA部分が存在しないことを除いて、BCY8846と同一のペプチド; 300 mg、102 μmol 、1.0当量)のDMA (3 mL)中溶液に、DIEA (52.5 mg、406 μmol 、70.8 μL 、4.0当量)を添加し、10分間攪拌した。次いで、(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)ペンタ-4-イノエート (25.8 mg、132 μmol 、1.3当量)をここに添加し、混合物を20℃でさらに16時間、さらに攪拌した。LC-MSは、BCY8234が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算MW: 3034.43、実測 m/z : 1011.8 ($[M/3 + H]^+$)、1517.0 ($[M/2 + H]^+$))を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を分取HPLC (中性条件)によって精製して、化合物BCY8846 (290 mg、95.6 μmol 、収率94.1%)を白色固体として得た。

【0284】

BCY8854を調製する一般的な手順

【0285】

10

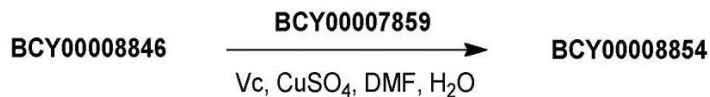
20

30

40

50

【化 7 5】



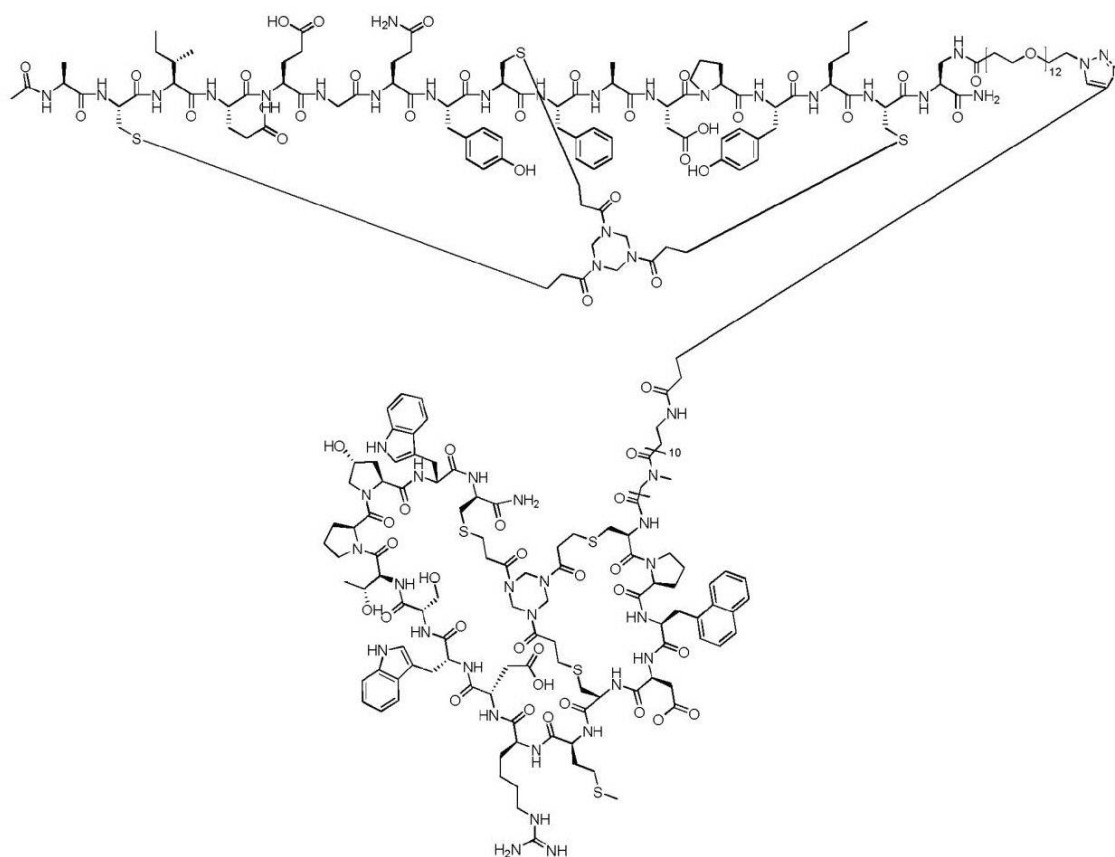
BCY8846 (234 mg、77.1 μmol 、1.0 当量) の DMF (5 mL) 中溶液に、BCY7859 (BCY7985 に記載されるように調製され得る; 220 mg、77.8 μmol 、1.0 当量) を添加し、引き続いて (2R)-2-[(1S)-1,2-ジヒドロキシエチル]-3,4-ジヒドロキシ-2H-フラン-5-オン (0.80 M、963 μL 、1.0 当量) および CuSO_4 (0.80 M、289 μL 、0.3 当量) を添加した。混合物を 20 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、BCY8846 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 5861.59、実測 m/z : 837.9 ($[\text{M}/7 + \text{H}]^+$)、977.6 ($[\text{M}/6 + \text{H}]^+$)、1173.3 ($[\text{M}/5 + \text{H}]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (A: H_2O 中 0.075% TFA、B: ACN) によって精製して、化合物 BCY8854 (292 mg、46.8 μmol 、収率 60.8%、純度 95.9%、TFA) を白色固体として得た。

【0286】

BCY9350

【0287】

【化 7 6】



BCY8782 - PYA を調製する一般的な手順

【0288】

10

20

30

40

50

【化 7 7】



BCY 8 7 8 2 (P Y A 部分が存在しないことを除いて、BCY 1 1 9 4 2 と同一のペプチド；20.0 mg、6.77 μmol 、1.0 当量) の DMA (1 mL) 中溶液に、DIEA (4.37 mg、33.9 μmol 、5.90 μL 、5.0 当量) および (2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル) ペンタ - 4 - イノエート (2.64 mg、13.5 μmol 、2.0 当量) を添加し、25 で 12 時間攪拌した。LC - MS は、BCY 8 7 8 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW : 3034.43、実測 m/z : 1012.1 [$M/3 + H$] $^{+}$) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (中性条件) によって精製して、BCY 1 1 9 4 2 (20.0 mg、6.00 μmol 、収率 88.6 %、純度 91.0 %) を白色固体として得た。

【 0 2 8 9 】

BCY 9 3 5 0 を調製する一般的な手順

【 0 2 9 0 】

【化 7 8】



BCY 1 1 9 4 2 (20 mg、6.59 μmol 、1.0 当量) および BCY 7 8 5 9 (BCY 7 9 8 5 に記載されるように調製され得る；20.5 mg、7.25 μmol 、1.1 当量) の DMF (1 mL) 中溶液に、(2 R) - 2 - [(1 S) - 1 , 2 - ジヒドロキシエチル] - 3 , 4 - ジヒドロキシ - 2 H - フラン - 5 - オン (0.4 M、330 μL 、20.0 当量) を添加し、CuSO₄ (0.4 M、98.9 μL 、6.0 当量) を混合物に添加した。混合物を 25 で 2 時間攪拌した。LC - MS は、BCY 8 7 8 2 - P Y A が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW : 5861.59、実測 m/z : 1173.3 [$M/5 + H$] $^{+}$) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (A : H₂O 中 0.075 % TFA、B : ACN) によって精製して、BCY 9 3 5 0 (14.5 mg、2.40 μmol 、収率 36.5 %、純度 97.2 %) を白色固体として得た。

【 0 2 9 1 】

BCY 9 3 5 1

【 0 2 9 2 】

10

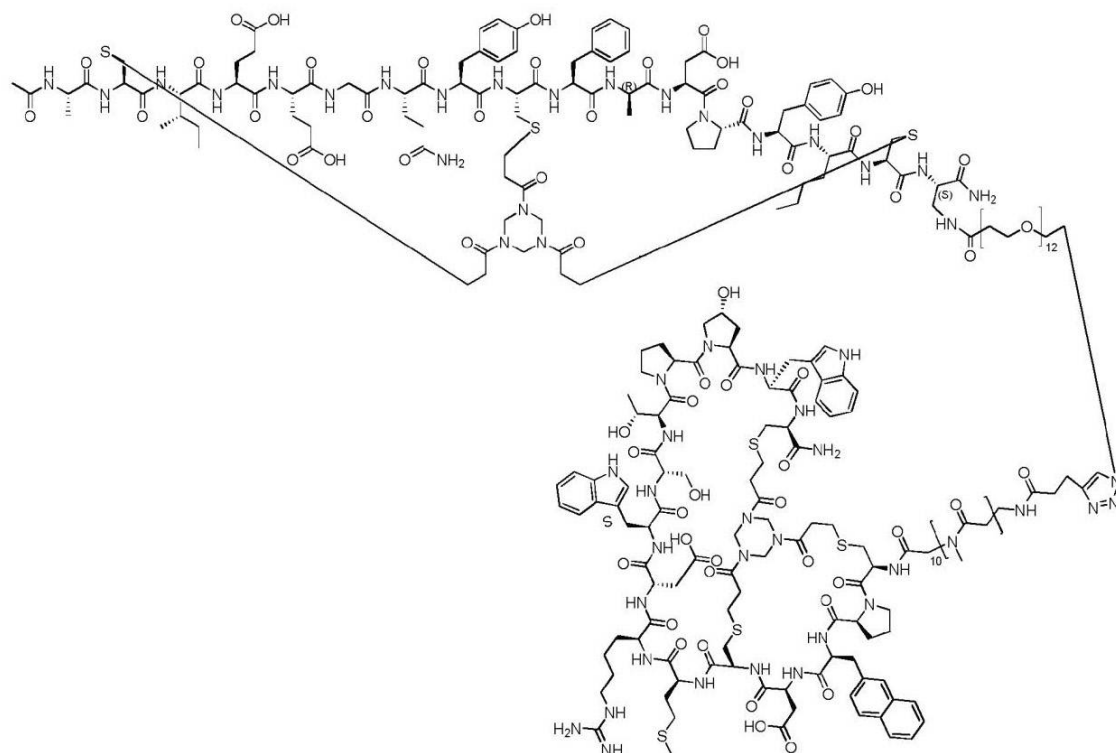
20

30

40

50

【化 7 9】



10

20

BCY9351を調製する一般的な手順

【0293】

【化 8 0】



BCY8940 (BCY8942に記載されるように調製され得る; 9.4 mg、3.33 μmol 、1.01当量) および BCY8846 (10.0 mg、3.30 μmol 、1.0当量) の DMF (1 mL) 中溶液に、窒素雰囲気下で、Vc (0.4 M、165 μL 、20.0当量) および CuSO_4 (0.4 M、49.4 μL 、6.0当量) を添加した。混合物を 25 で 1 時間攪拌した。LC-MS は、BCY8940 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 5861.59、実測 m/z : 975.4 $[\text{M}/6 + \text{H}]^+$ 、1172.3 $[\text{M}/5 + \text{H}]^+$) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (A: H_2O 中 0.075% TFA、B: ACN) によって精製して、BCY9351 (5.30 mg、0.904 μmol 、収率 26.3%、純度 96.0%) を白色固体として得た。

30

【0294】

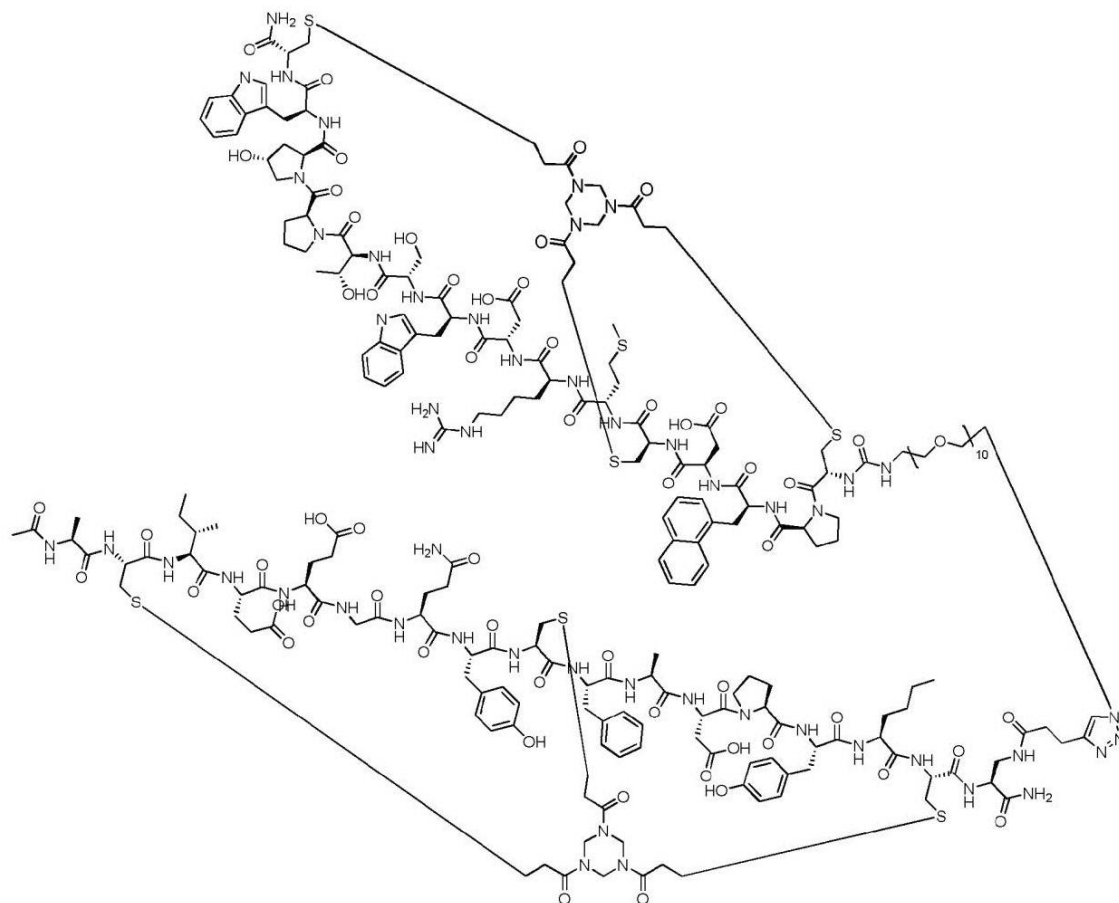
40

BCY9399

【0295】

50

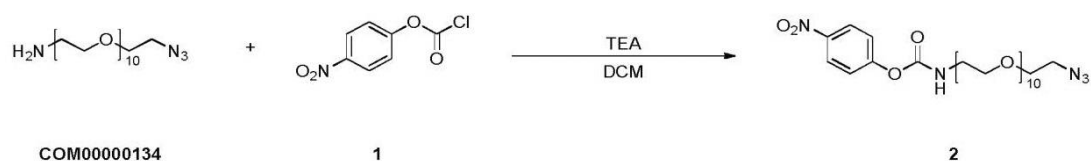
【化 8 1】



化合物 2 を調製する手順

【 0 2 9 6】

【化 8 2】



COM 134 (30 mg、56.97 μmol)、化合物 1 (17.22 mg、85.45 μmol) の DCM (0.5 mL) 中溶液に、TEA (8.65 mg、85.45 μmol 、11.9 μL) を添加した。混合物を 25 で 1 時間攪拌した。LC-MS は、COM 134 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 691.72、実測 m/z : 692.3 ($[M+H]^+$) および 709.3 ($[M+NH_4]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (中性条件) によって精製した。化合物 2 (30.5 mg) を無色の油状物として得た。

【 0 2 9 7】

化合物 3 を調製する手順

【 0 2 9 8】

10

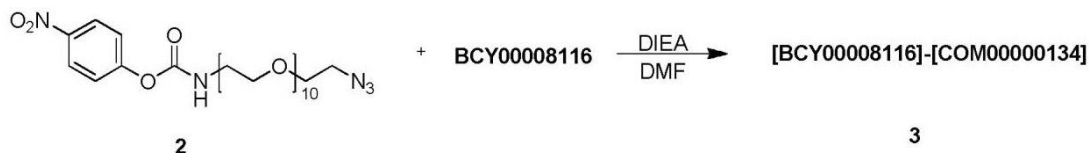
20

30

40

50

【化 8 3】



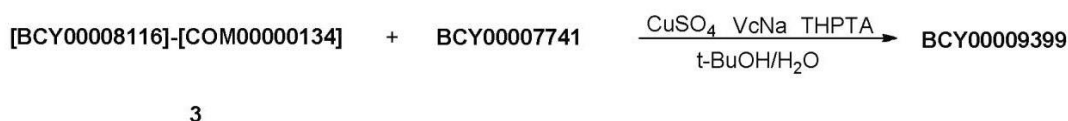
化合物 2 (15 mg、21.68 μmol) および B C Y 8 1 1 6 (47 mg、21.68 μmol) の DMF (1 mL) 中溶液に、D I E A (8.41 mg、65.05 μmol 、11.33 μL) を添加した。混合物を 30 で 2 時間攪拌した。LC - MS は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW : 2725.1 実測 m/z : 1362.7 ($[M/2 + H]^+$)、909.0 ($[M/3 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 3 (20 mg、収率 33.41%、純度 98.71%) を白色固体として得た。

【 0 2 9 9】

B C Y 9 3 9 9 を調製する手順

【 0 3 0 0】

【化 8 4】



化合物 3 (20.0 mg、5.35 μmol 、1.0 当量)、B C Y 7 7 4 1 (13.0 mg、5.70 μmol 、1.01 当量) および T H P T A (0.4 M、13.4 μL 、1.0 当量) の混合物を t - B u O H / H₂O (1 : 1、2 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、C u S O₄ (0.4 M、13.4 μL 、1.0 当量) および V c N a (0.4 M、26.8 μL 、2.0 当量) を N₂ 下で添加した。0.2 M N H₄ H C O₃ (1 : 1 t - B u O H / H₂O 中) を滴加することによって、この溶液の pH を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、25 ~ 30 で 12 時間攪拌した。LC - MS は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [MW : 5006.64 実測 m/z : 834.9 ($[M/6 + H]^+$)、1002.3 ($[M/5 + H]^+$)、1252.4 ($[M/4 + H]^+$)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって直接精製した。B C Y 9 3 9 9 (9.1 mg、収率 27.20%、純度 96.29%) を白色固体として得た。

【 0 3 0 1】

B C Y 9 4 0 0

【 0 3 0 2】

10

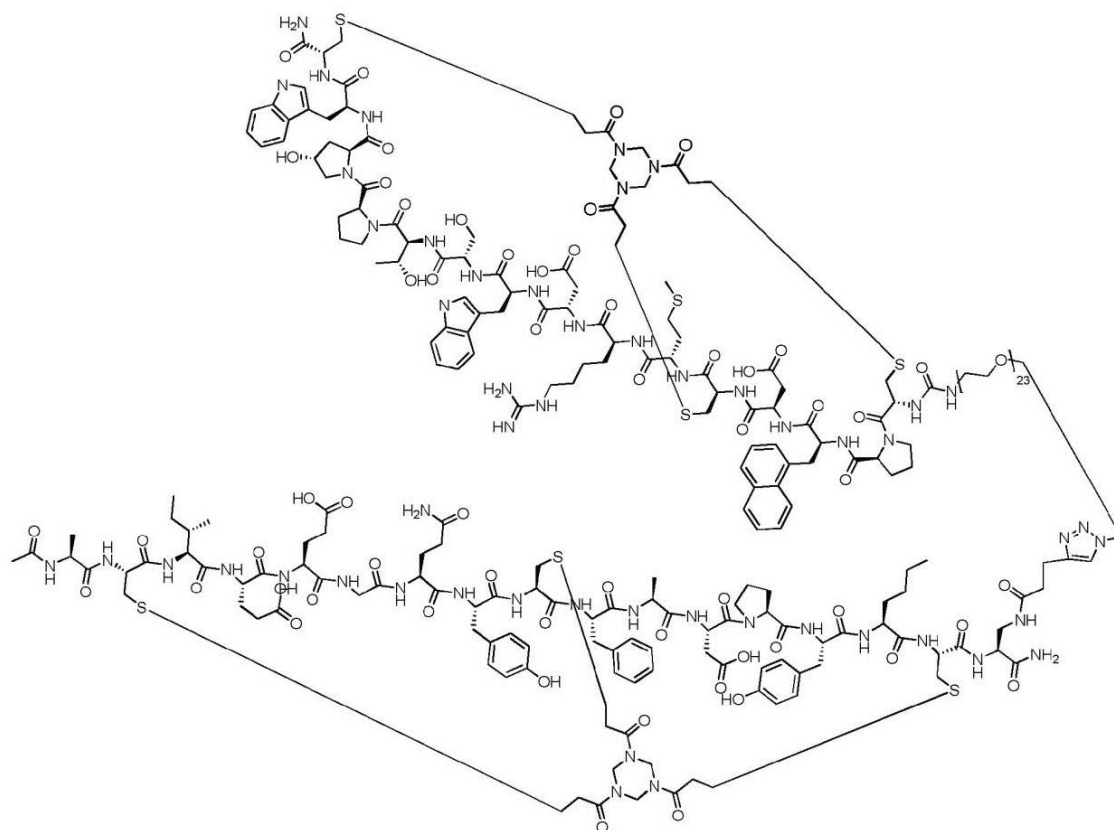
20

30

40

50

【化 8 5】



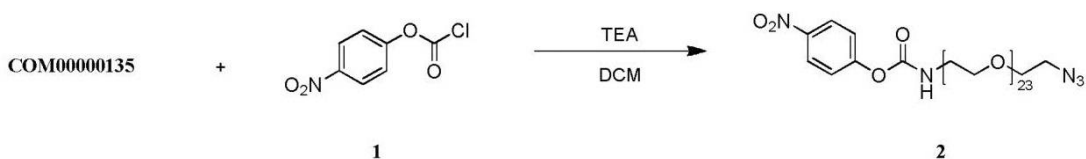
10

20

化合物 2 を調製する手順

【 0 3 0 3 】

【化 8 6】



30

COM135 (BCY9648 に記載されるように調製され得る; 30.0 mg、27.29 μmol)、化合物 1 (8.3 mg、40.94 μmol) の DCM (2 mL) 中溶液に、TEA (4.14 mg、40.94 μmol 、5.7 μL) を添加した。次いで、反応混合物を 25 ~ 30 で 1 時間攪拌した。LC-MS は、COM135 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 1264.40、実測 m/z : 1281.4 ($[M + \text{NH}_4]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (中性条件) に

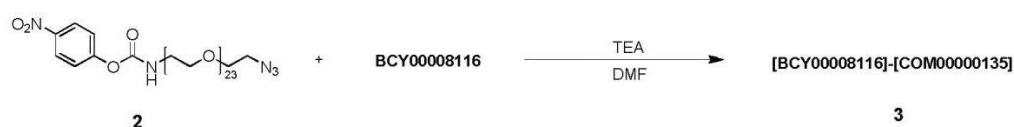
40

【 0 3 0 4 】

化合物を調製する手順

【 0 3 0 5 】

【化 8 7】



2

3

50

化合物 2 (15 . 5 m g、7 . 12 μ m o l) および B C Y 8 1 1 6 (9 m g、7 . 12 μ m o l) の D M F (2 m L) 中溶液に、D I E A (1 . 4 m g、10 . 68 μ m o l、1 . 9 μ L) を添加した。混合物を 30 で 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (M W : 3297 . 78、実測 m / z : 1099 . 7 ([M / 3 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 3 (19 . 5 m g、5 . 91 μ m o l、収率 33 . 41 %、純度 83 . 07 %) を白色固体として得た。

【 0306 】

B C Y 9 4 0 0 を調製する手順

10

【 0307 】

【 化 88 】



3

化合物 3 (19 . 5 m g、5 . 91 μ m o l)、B C Y 7 7 4 1 (14 m g、6 . 14 μ m o l、1 . 01 当量) および T H P T A (0 . 4 M、15 μ L、1 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1、2 m L、予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 4 M、15 μ L、1 当量) および V c N a (0 . 4 M、30 μ L、2 当量) を N₂ 下で添加した。0 . 2 M N H ₄ H C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、25 ~ 30 で 12 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z [M W : 5579 . 31 実測 m / z : 930 . 5 ([M / 6 + H] ⁺)、1116 . 6 ([M / 5 + H] ⁺)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって直接精製した。B C Y 9 4 0 0 (13 . 9 m g、2 . 33 μ m o l、収率 27 . 20 %、純度 93 . 56 %) を白色固体として得た。

20

【 0308 】

B C Y 9 4 0 1

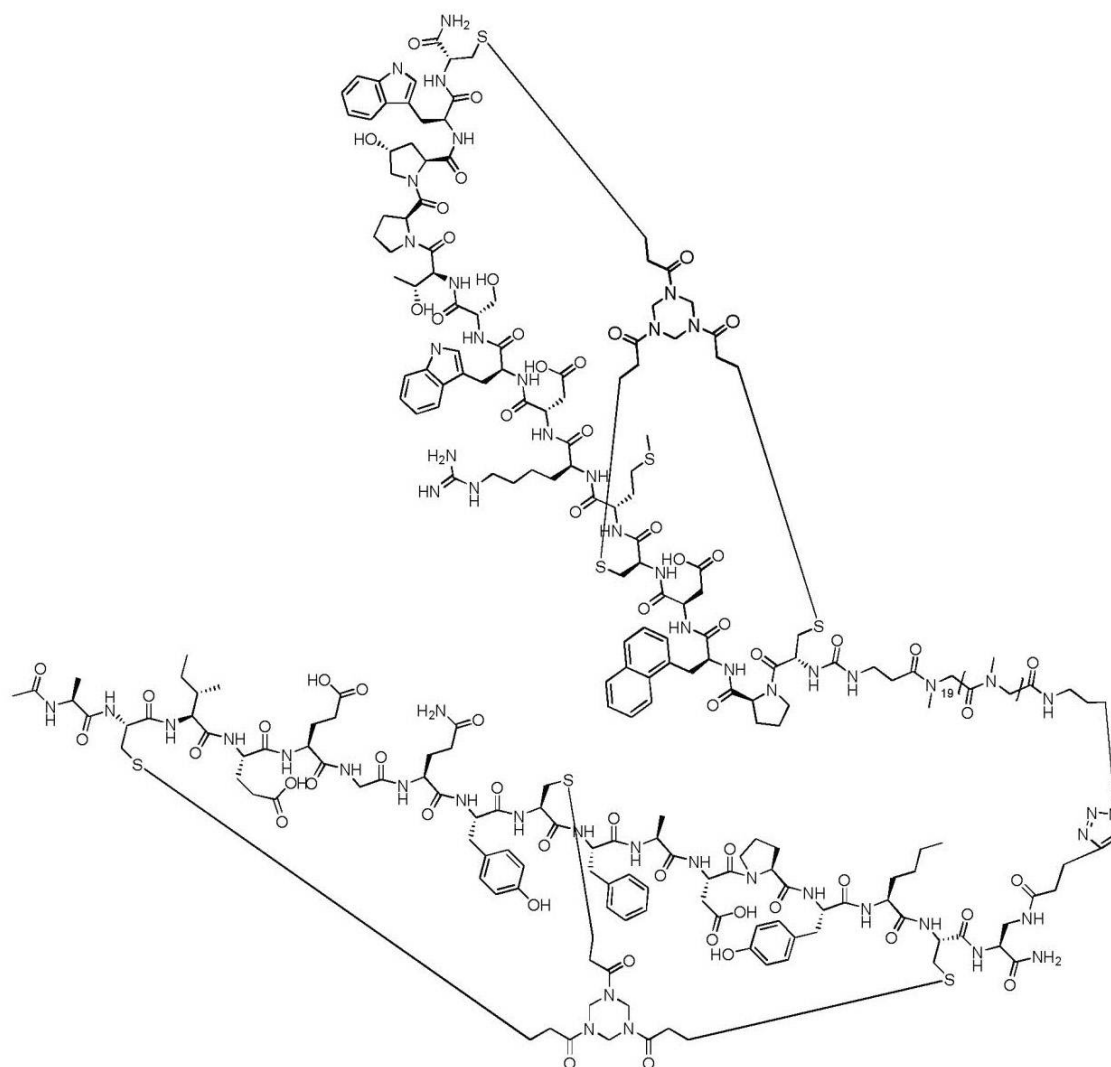
30

【 0309 】

40

50

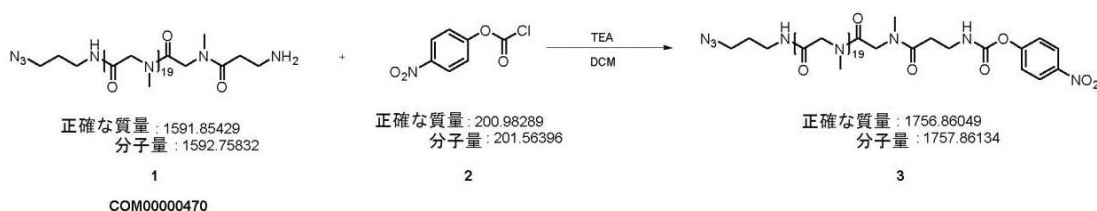
【化 8 9】



化合物 3 を調製する手順

【 0 3 1 0】

【化 9 0】



化合物 1 (50.0 mg、31.39 μmol 、1 当量)、化合物 2 (6.6 mg、32.96 μmol 、1.05 当量) の DCM (2 mL) 中溶液に、TEA (4.8 mg、47.09 μmol 、6.6 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 2 時間攪拌した。LC - MS は、化合物 1 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 1757.86 実測 m/z : 879.10 ($[M/2 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 3 (0.02 g、6.56 μmol 、収率 20.91%、純度 57.7%) を白色固体として得た。

【 0 3 1 1】

【化 9 1】



10

20

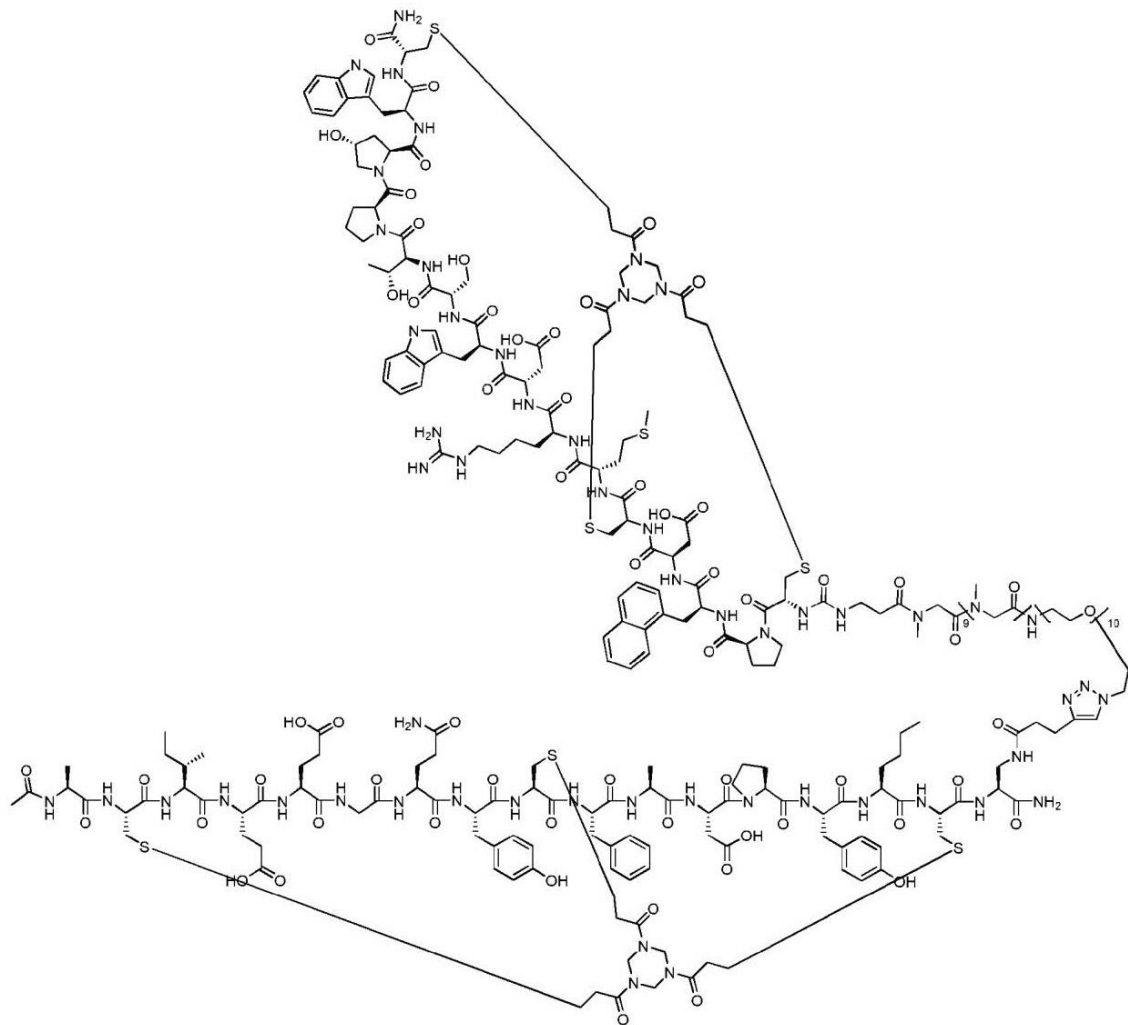
【化 9 2】



30

40

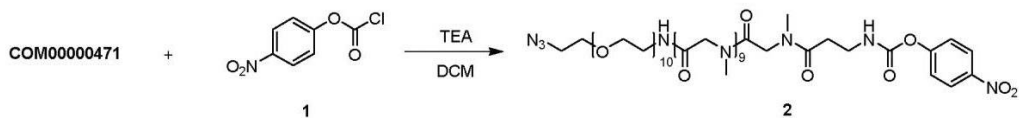
【化 9 3】



化合物 2 を調製する手順

【 0 3 1 7】

【化 9 4】



COM 471 (100.0 mg、76.42 μmol 、1.0 当量)、4-ニトロフェニルクロロホルメート (16.2 mg、80.25 μmol 、1.05 当量) の DCM (10 mL) 中溶液に、TEA (11.6 mg、114.64 μmol 、16.0 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、COM 471 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 1473.58、実測 m/z : 736.83 ($[M/2 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 2 (62.8 mg、42.67 μmol 、収率 55.84%、純度 48.37%) を白色の油状物として得た。

【 0 3 1 8】

化合物 3 を調製する手順

【 0 3 1 9】

10

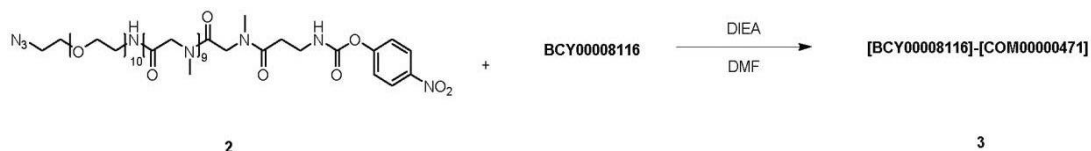
20

30

40

50

【化 9 5】



化合物 2 (4 4 m g 、 2 9 . 4 6 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 8 1 1 6 (6 3 m g 、 2 9 . 1 8 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M F (2 m L) 中溶液に、 D I E A (5 . 6 6 m g 、 4 3 . 7 7 μ m o l 、 7 . 6 2 μ L 、 1 . 5 当量) を添加した。混合物を 4 0 °C で 1 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (M W : 3 5 0 6 . 9 5 、 実測 m/z : 1 1 6 8 . 5 8 ([M / 3 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。残留物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 3 (2 0 m g 、 5 . 4 2 μ m o l 、 収率 1 8 . 5 7 % 、 純度 9 5 . 0 4 %) を白色固体として得た。

【 0 3 2 0 】

B C Y 9 4 0 3 を調製する手順

【 0 3 2 1 】

【化 9 6】



化合物 3 (1 0 . 0 m g 、 2 . 7 1 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 7 7 4 1 (6 . 8 3 m g 、 2 . 9 9 μ m o l 、 1 . 1 当量) および T H P T A (0 . 4 M 、 7 μ L 、 1 . 0 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1 、 2 m L 、 予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 4 M 、 7 μ L 、 1 . 0 当量) および V c N a (0 . 4 M 、 1 4 μ L 、 2 . 0 当量) を N ₂ 下で添加した。0 . 2 M N H ₄ H C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、2 5 ~ 3 0 °C で 1 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [M W : 5 7 8 8 . 4 9 、 実測 m/z : 1 1 5 7 . 0 0 ([M / 5 + H] ⁺) および 9 6 4 . 6 0 ([M / 6 + H] ⁺)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって直接精製した。B C Y 9 4 0 3 (2 . 1 m g 、 0 . 3 4 μ m o l 、 収率 1 1 . 9 3 % 、 純度 9 3 . 8 0 %) を白色固体として得た。

【 0 3 2 2 】

B C Y 9 4 0 5

【 0 3 2 3 】

10

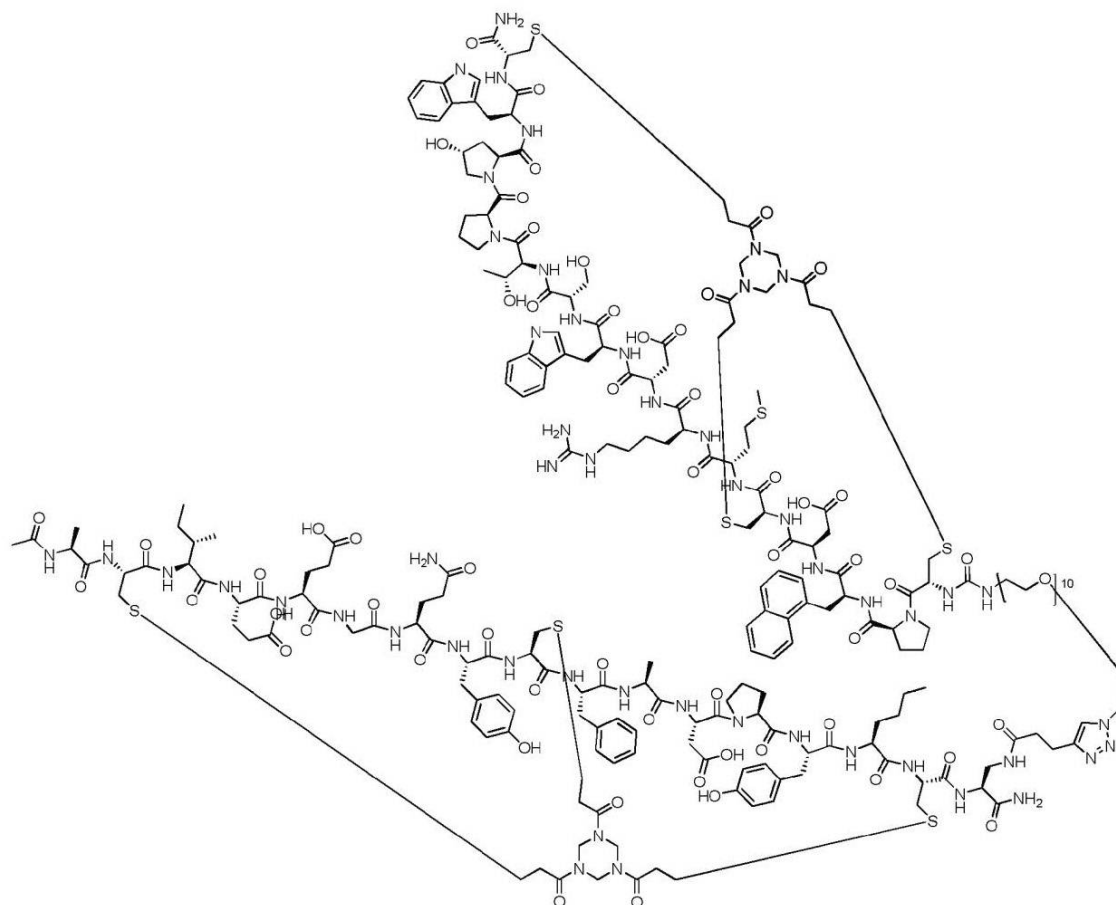
20

30

40

50

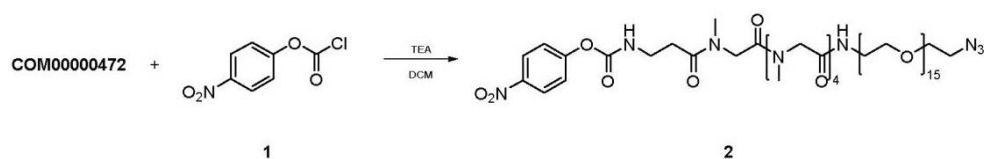
【化 9 7】



化合物 2 を調製する手順

【 0 3 2 4】

【化 9 8】



COM 4 7 2 (4 4 . 7 m g 、 3 8 . 1 μ m o l) 、化合物 1 (9 . 2 m g 、 4 5 . 7 μ m o l) の D C M (4 m L) 中溶液に、T E A (5 . 8 m g 、 5 7 . 1 4 μ m o l 、 8 μ L) を添加した。混合物を 2 5 で 2 時間攪拌した。L C - M S は、C O M 4 7 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (M W : 1 3 3 8 . 4 5 、実測 m/z : 6 8 6 . 2 3 ([M / 2 + N H 4 ^ +])) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 H P L C (中性条件) によって精製した。化合物 2 (2 0 m g 、 1 4 . 9 4 μ m o l 、収率 3 9 . 2 %) を無色の油状物として得た。

【 0 3 2 5】

化合物 3 を調製する手順

【 0 3 2 6】

10

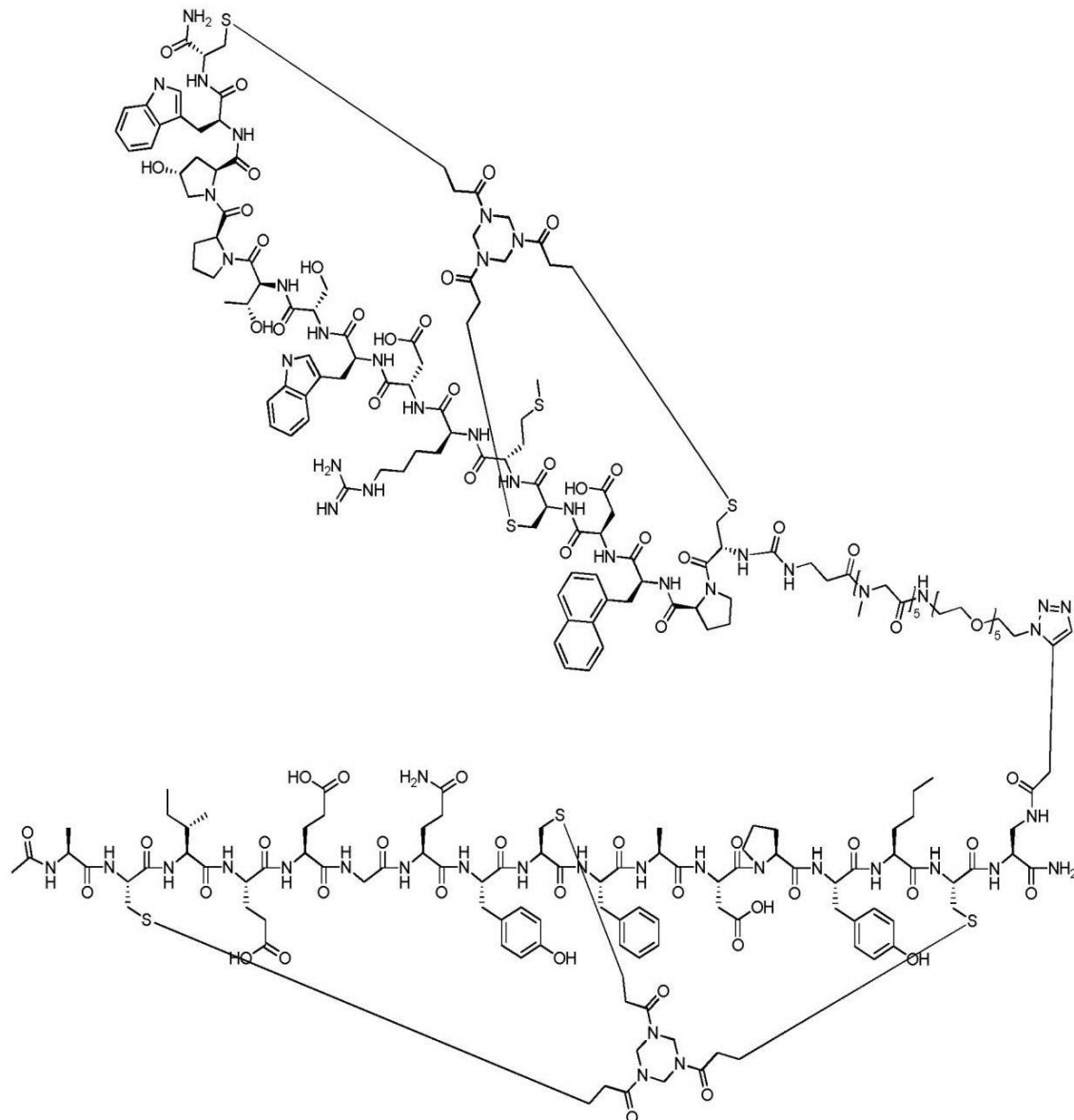
20

30

40

50

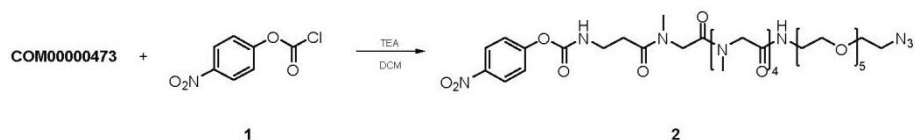
【化 1 0 1】



化合物 2 を調製する手順

【 0 3 3 1】

【化 1 0 2】



COM473 (130.0 mg、177.40 μmol 、1.0 当量)、(4-ニトロフェニル)カルボノクロリダート (36.4 mg、180.59 μmol 、1.02 当量) の DCM (3 mL) 中溶液に、TEA (27.0 mg、266.09 μmol 、3.7 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 35 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、COM473 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 897.93、実測 m/z : 897.65 ($[M+H]^+$)、914.60 ($[M+NH_4]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 2 (90 mg、95.87 μmol 、収率 54.04%、純度 95.65%) を無色の油状物として得た。

【 0 3 3 2 】

化合物 3 を調製する手順

【 0 3 3 3 】

【 化 1 0 3 】



化合物 2 (1 0 m g 、 1 1 . 1 4 μmol 、 1 当量) 、 B C Y 8 1 1 6 (2 5 m g 、 1 1 . 5 1 μmol 、 1 . 0 3 当量) の D M F (2 m L) 中溶液に、 D I E A (2 . 1 6 m g 、 1 6 . 7 1 μmol 、 2 . 9 1 μL 、 1 . 5 当量) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3 0 ° C で 1 2 時間攪拌した。 L C - M S は、所望の m/z (M W : 2 9 3 1 . 3 0 、 実測 m/z : 9 7 7 . 0 0 ([M / 3 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出されることを示した。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相 H P L C (F T A 条件) によって精製した。化合物 3 (1 5 m g 、 5 . 1 2 μmol 、 収率 4 5 . 7 9 % 、 純度 9 9 . 6 6 %) を白色固体として得た。

【 0 3 3 4 】

B C Y 9 4 0 6 を調製する手順

【 0 3 3 5 】

【 化 1 0 4 】



化合物 3 (1 5 m g 、 5 . 1 2 μmol 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 7 7 4 1 (1 2 m g 、 5 . 2 6 μmol 、 1 . 0 3 当量) および T H P T A (0 . 4 M 、 1 2 . 8 μL 、 1 . 0 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1 、 2 m L 、 予め脱気し、 N ₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、 C u S O ₄ (0 . 4 M 、 1 2 . 8 μL 、 1 . 0 当量) および V c N a (0 . 4 M 、 2 5 . 6 μL 、 2 . 0 当量) を N ₂ 下で添加した。 0 . 2 M N H ₄ H C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、 N ₂ 雰囲気下、 2 5 ~ 3 0 ° C で 1 2 時間攪拌した。 L C - M S は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [M W : 5 2 1 2 . 8 4 実測 m/z : 1 0 4 2 . 7 4 ([M / 4 + H] ⁺)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって直接精製した。 B C Y 9 4 0 6 (1 4 . 4 m g 、 2 . 5 7 μmol 、 収率 5 0 . 2 1 % 、 純度 9 3 . 0 1 %) を白色固体として得た。

【 0 3 3 6 】

B C Y 9 4 0 7

【 0 3 3 7 】

10

20

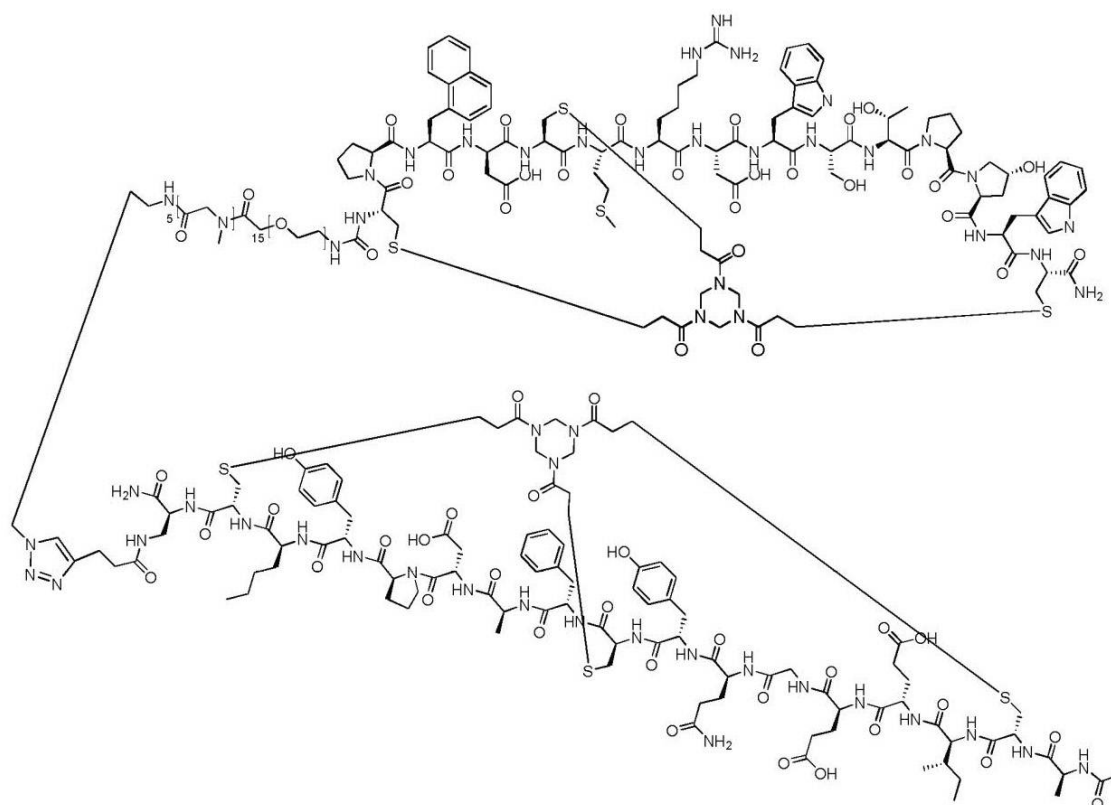
30

40

50

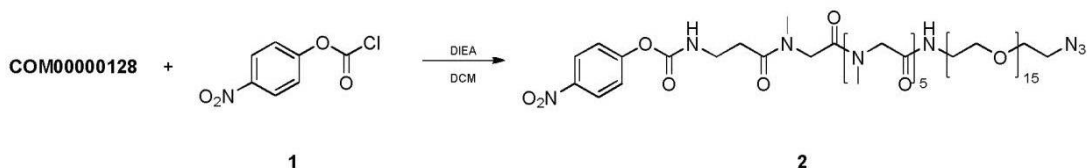
10

20



BCY00009407

【化 1 0 6】



30

COM128 (60 mg、50.53 μ mol、1.0 当量)、化合物1 (13 mg、64.50 μ mol、1.28 当量)、DIEA (9.80 mg、75.80 μ mol、13.20 μ L、1.5 当量)のDCM (5 mL)中溶液を脱気し、N₂で3回バージし、次いで、混合物を、N₂雰囲気下、25~30℃で1時間攪拌した。LC-MSは、COM128が完全に消費されていることを示し、所望のm/z (計算MW: 1352.48、実測m/z: 676.7 ([M/2 + H]⁺))を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取HPLC (TFA条件)によって精製した。化合物2 (12 mg、8.87 μ mol、収率17.56%)を無色の油状物として得た。

40

「BCY8116」-「COM128」を調製する手順

【 0 3 4 0 】

【化 1 0 7】



化合物 2 (7 m g 、 5 . 1 8 μ m o l 、 1 . 0 当量) および B C Y 8 1 1 6 (1 1 m g 、 5 . 0 6 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 D I E A (2 . 0 1 m g 、 1 5 . 5 3 μ m o l 、 2 . 7 0 μ L 、 3 . 0 当量) の D M F (3 m L) 中溶液を脱気し、 N_2 で 3 回パージし、次いで、混合物を、 N_2 雰囲気下、2 5 ~ 3 0 で 1 時間攪拌した。L C - M S は、所望の m/z (計算 M W : 3 3 8 5 . 8 5 、実測 m/z : 1 1 2 9 . 3 ([M / 3 + H] $^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出されることを示した。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相 H P L C (T F A 条件) によって精製した。[B C Y 8 1 1 6] - [C O M 1 2 8] (1 5 . 6 m g 、 4 . 4 6 μ m o l 、収率 8 6 . 1 3 % 、純度 9 6 . 7 5 %) を白色固体として得た。

10

【 0 3 4 1】

B C Y 9 4 0 7 を調製する手順

【 0 3 4 2】

【化 1 0 8】



20

[B C Y 8 1 1 6] - [C O M 1 2 8] (1 5 . 6 m g 、 4 . 6 1 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 7 7 4 1 (1 1 m g 、 4 . 8 2 μ m o l 、 1 . 0 5 当量) および T H P T A (0 . 8 M 、 5 . 8 μ L 、 1 . 0 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1 、 2 m L 、 予め脱気し、 N_2 で 3 回パージした) に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 4 M 、 1 1 . 6 μ L 、 1 . 0 当量) および V c N a (0 . 4 M 、 2 3 . 2 μ L 、 2 . 0 当量) を N_2 下で添加した。0 . 2 M N H ₄ H C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、 N_2 雰囲気下、2 5 ~ 3 0 で 1 2 時間攪拌した。L C - M S は、所望の m/z (計算 M W : 5 6 6 7 . 3 9 、実測 m/z : 9 4 5 . 6 ([M / 6 + H] $^+$) および 1 1 3 4 . 2 ([M / 5 + H] $^+$)) を有する 1 つのピークが検出されることを示した。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって直接精製した。B C Y 9 4 0 7 (1 . 3 m g 、 0 . 2 3 μ m o l 、収率 4 . 3 3 % 、純度 8 6 . 9 0 %) を白色固体として得た。

30

【 0 3 4 3】

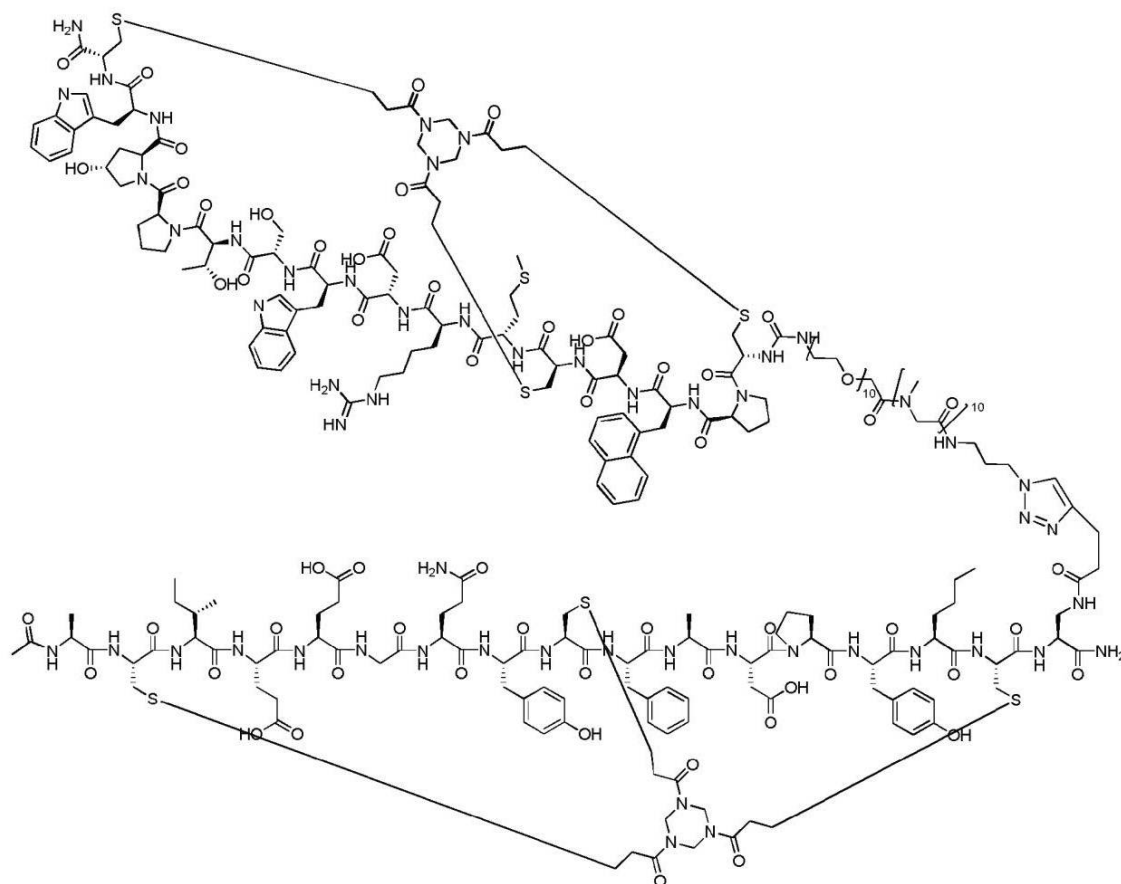
B C Y 9 4 0 8

【 0 3 4 4】

40

50

【化 1 0 9】



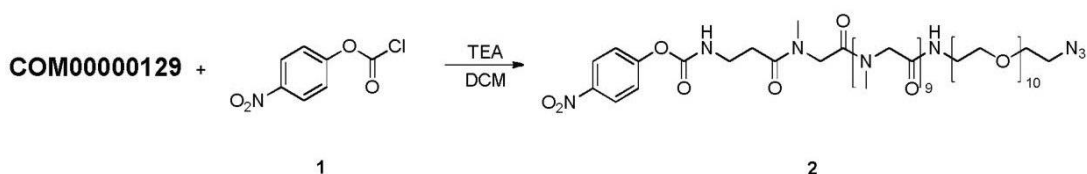
10

20

化合物 2 を調製する手順

【 0 3 4 5】

【化 1 1 0】



30

COM 1 2 9 (4 5 . 0 m g 、 3 4 . 3 9 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 化合物 1 (1 5 . 0 m g 、 7 4 . 4 2 μ m o l 、 2 . 1 当量) の D C M (5 m L) 中溶液に、 T E A (5 . 5 m g 、 5 3 . 8 8 μ m o l 、 7 . 5 μ L 、 1 . 5 当量) を添加し、次いで、混合物を、 N_2 雰囲気下、 2 5 ~ 3 0 $^{\circ}$ C で 1 時間攪拌した。 L C - M S は、 C O M 1 2 9 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (M W : 1 4 7 3 . 5 8 、実測 m/z : 7 3 7 . 3 ([M / 2 + H] $^{+}$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 2 (9 m g 、 6 . 1 1 μ m o l 、 収率 1 7 . 0 1 % 、純度 9 5 . 7 6 %) を白色固体として得た。

40

【 0 3 4 6】

化合物 3 を調製する手順

【 0 3 4 7】

50

【化 1 1 1】



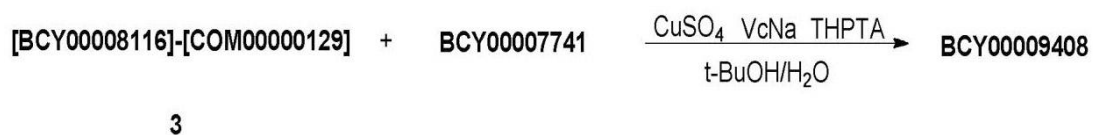
化合物 2 (9 . 0 m g 、 6 . 1 1 μmol 、 1 . 0 当量) および B C Y 8 1 1 6 (1 3 . 3 m g 、 6 . 1 1 μmol 、 1 . 0 当量) の D M F (3 m L) 中溶液に、D I E A (2 . 4 m g 、 1 8 . 3 2 μmol 、 3 . 2 μL 、 3 . 0 当量) を添加した。全ての溶媒を脱気し、 N_2 で 3 回パージし、次いで、混合物を、 N_2 雰囲気下、2 5 ~ 3 0 °C で 1 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (M W : 3 5 0 6 . 9 5 、実測 m/z : 8 7 7 . 4 ([M / 4 + H] ^ +) および m/z : 1 1 6 9 . 6 ([M / 3 + H] ^ +)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 3 (7 . 2 m g 、 2 . 0 5 μmol 、収率 3 1 . 9 3 % 、純度 9 5 %) を白色固体として得た。

【 0 3 4 8 】

B C Y 9 4 0 8 を調製する手順

【 0 3 4 9 】

【化 1 1 2】



化合物 3 (7 . 2 m g 、 2 . 0 5 μmol 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 7 7 4 1 (5 . 0 m g 、 2 . 1 9 μmol 、 1 . 0 3 当量) および T H P T A (0 . 4 M 、 5 . 1 μL 、 1 . 0 当量) の混合物を t - B u O H / H _ 2 O (1 : 1 、 2 m L 、 予め脱気し、 N_2 で 3 回パージした) に溶解し、次いで、C u S O _ 4 (0 . 4 M 、 5 . 1 μL 、 1 . 0 当量) および V c N a (0 . 4 M 、 1 0 . 2 μL 、 2 . 0 当量) を N_2 下で添加した。0 . 2 M N H _ 4 H C O _ 3 (1 : 1 t - B u O H / H _ 2 O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、 N_2 雰囲気下、2 5 ~ 3 0 °C で 1 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [M W : 5 7 8 8 . 4 9 実測 m/z : 9 6 8 . 9 ([M / 6 + H] ^ +) および 1 1 5 8 . 0 ([M / 5 + H] ^ +)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって直接精製した。B C Y 9 4 0 8 (3 . 1 m g 、 4 . 9 7 e - 1 μmol 、収率 2 4 . 2 3 % 、純度 9 2 . 8 7 %) を白色固体として得た。

【 0 3 5 0 】

B C Y 9 4 0 9

【 0 3 5 1 】

10

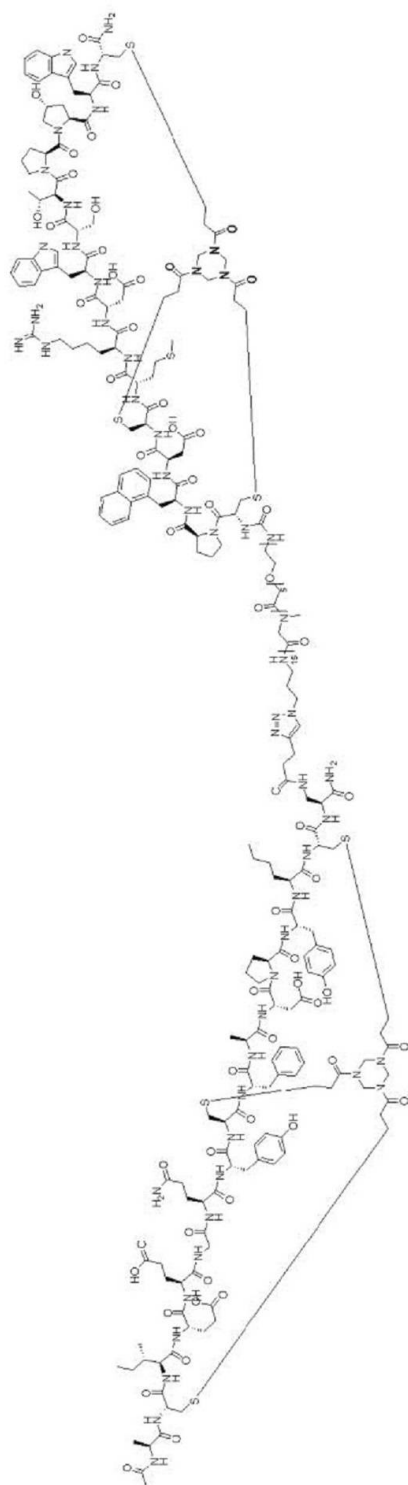
20

30

40

50

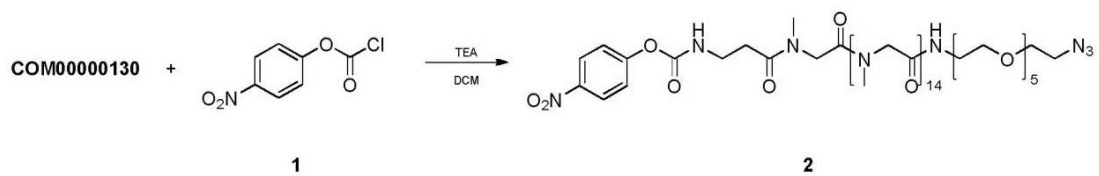
【化 1 1 3】



化合物 2 を調製する手順

【 0 3 5 2 】

【化 1 1 4】



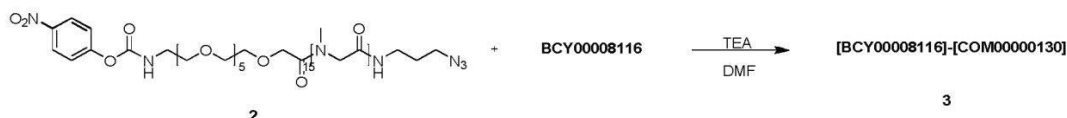
化合物 1 (30 mg、20.78 μmol)、COM130 (6.28 mg、31.17 μmol) の DCM (3 mL) 中溶液に、TEA (3.15 mg、31.17 μmol 、4.34 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 1 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 1 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 1608.70 実測 m/z : 804.8 ($[M/2 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮し、次いで、凍結乾燥して、化合物 2 (10.2 mg、粗) を白色固体として得た。

【0353】

化合物 3 を調製する手順

【0354】

【化115】



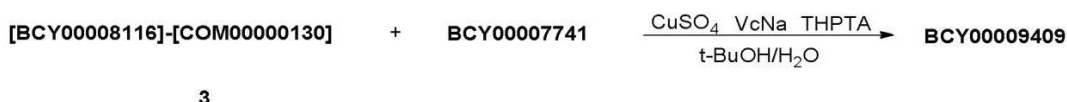
化合物 2 (10.2 mg、6.34 μmol) および BCY8116 (13.50 mg、6.22 μmol) の DMF (2 mL) 中溶液に、DIEA (0.8 mg、6.22 μmol 、1.1 μL 、1.0 当量) を添加した。混合物を 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、所望の m/z (MW: 3642.08、実測 m/z : 1214.4 ($[M/3 + H]^+$)) を検出した。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 3 (15.0 mg、4.12 μmol 、収率 62.94%、純度 95%) を白色固体として得た。

【0355】

BCY9409 を調製する手順

【0356】

【化116】



化合物 3 (15 mg、4.12 μmol 、1.0 当量)、BCY7741 (10 mg、4.38 μmol 、1.03 当量) および THPTA (0.4 M、10.3 μL 、1.0 当量) の混合物を t-BuOH/H₂O (1:1、2 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、10.3 μL 、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、20.6 μL 、2.0 当量) を N₂ 下で添加した。0.2 M NH₄HCO₃ (1:1 t-BuOH/H₂O 中) を滴加することによって、この溶液の pH を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、25 ~ 30 で 12 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [MW: 5923.61、実測 m/z : 988.2 ($[M/6 + H]^+$)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって直接精製した。BCY9409 (3.1 mg、0.52 μmol 、収率 12.62%、純度 90.89%) を白色固体として得た。

【0357】

BCY9410

【0358】

10

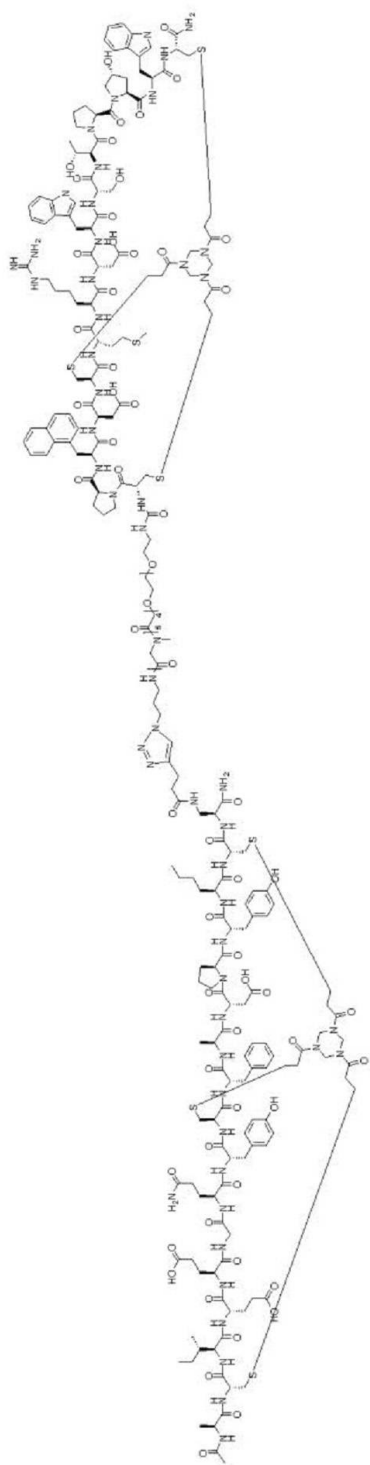
20

30

40

50

10

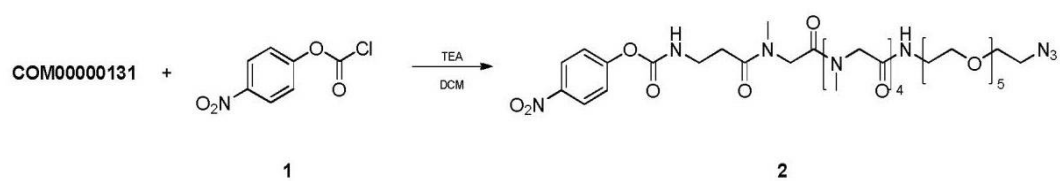


20

30

40

【化 1 1 8】



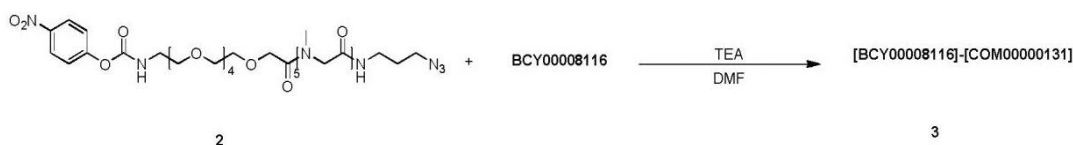
COM131 (167.0 mg、227.89 μmol 、1.0 当量)、化合物 1 (55.0 mg、272.87 μmol 、1.2 当量) の DCM (5 mL) 中溶液に、TEA (36.4 mg、359.23 μmol 、50.0 μL 、1.6 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 1 時間攪拌した。LC-MS は、所望の m/z (MW: 897.93 実測 920.3 ($[M + Na]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出されることを示した。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 2 (35 mg、33.74 μmol 、収率 14.81%、純度 86.56%) を無色の油状物として得た。

【0360】

化合物 3 を調製する手順

【0361】

【化119】



化合物 2 (20 mg、22.27 μmol 、1.0 当量) および BCY8116 (48 mg、22.09 μmol 、1.0 当量) の DMF (2 mL) 中溶液に、DIEA (8.64 mg、66.82 μmol 、11.64 μL 、3.0 当量) を添加した。混合物を 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 2931.32、実測 m/z : 977.7 ($[M + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 3 (40 mg、13.08 μmol 、収率 58.7%、純度 95.82%) を白色固体として得た。

【0362】

BCY9410 を調製する手順

【0363】

【化120】



化合物 3 (40 mg、13.08 μmol 、1.0 当量)、BCY7741 (35 mg、15.34 μmol 、1.17 当量) および THPTA (0.4 M、34 μL 、1.0 当量) の混合物を t-BuOH/H₂O (1:1、2 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、34 μL 、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、68 μL 、2.0 当量) を N₂ 下で添加した。0.2 M NH₄HCO₃ (1:1 t-BuOH/H₂O 中) を滴加することによって、この溶液の pH を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、25 ~ 30 で 12 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [MW: 5212.85、実測 m/z : 1043.2 ($[M/5 + H]^+$)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって直接精製した。BCY9410 (38.6 mg、6.78 μmol 、収率 49.71%、純度 91.6%) を白色固体として得た。

【0364】

BCY9411

【0365】

10

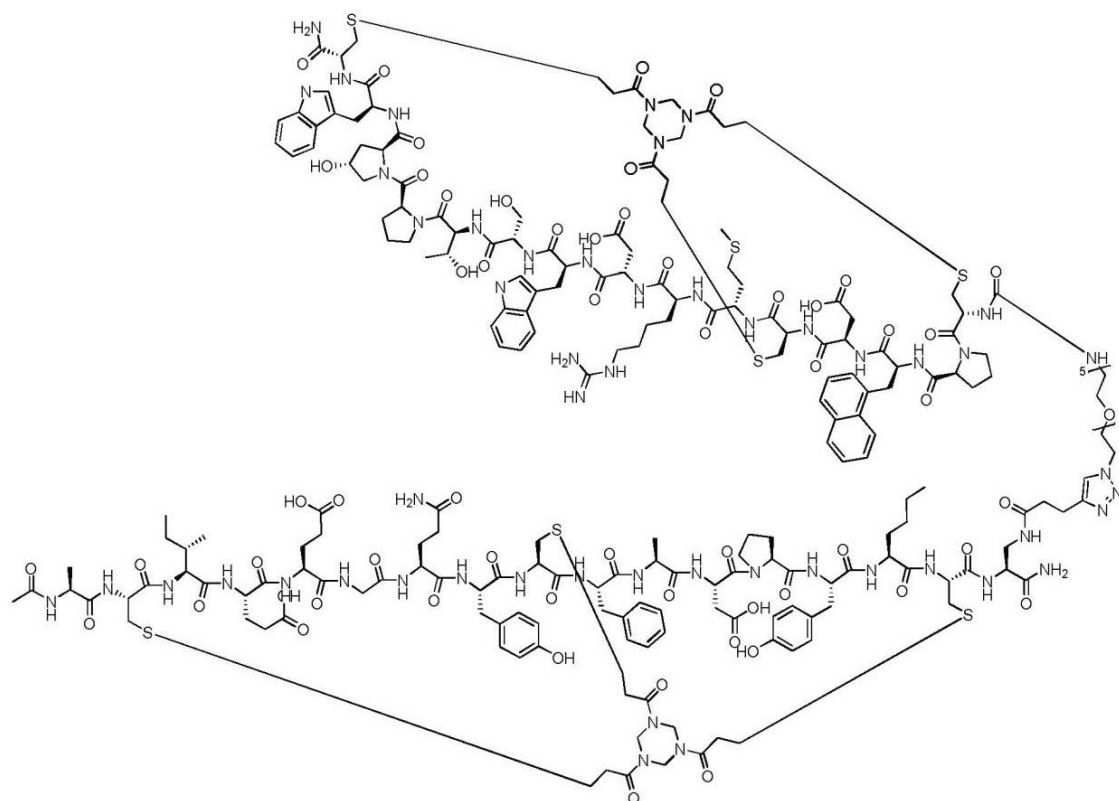
20

30

40

50

【化 1 2 1】



10

20

化合物 2 を調製する手順

【 0 3 6 6】

【化 1 2 2】



30

COM00000132

1

2

COM 132 (5 mg、16.32 μmol 、1 当量)、化合物 1 (4 mg、19.8 μmol 、1.22 当量) の DCM (5 mL) 中溶液に、TEA (2.8 mg、24.48 μmol 、3.4 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 25 で 1 時間攪拌した。LC-MS は、所望の m/z (計算 MW: 471.46、実測 m/z : 489.2 ($[M + NH_4]^+$)) を有する 1 つのピークが検出されることを示した。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去し、次いで、凍結乾燥して、化合物 2 (8 mg、粗) を白色固体として得た。

40

【 0 3 6 7】

化合物 3 を調製する手順

【 0 3 6 8】

【化 1 2 3】



2

3

50

化合物 2 (3 . 3 m g 、 6 . 9 μ m o l 、 1 . 5 当量) および B C Y 8 1 1 6 (1 0 . 0 m g 、 4 . 6 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M F (5 m L) 中溶液に、 D I E A (0 . 7 m g 、 6 . 9 0 μ m o l 、 1 μ L 、 1 . 5 当量) を添加した。混合物を 3 0 で 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW : 2 5 0 4 . 8 3 、実測 m/z : 1 2 5 2 . 3 ([M / 2 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 3 (4 . 2 m g 、 1 . 5 1 μ m o l 、 収率 3 2 . 7 8 % 、純度 9 0 %) を白色固体として得た。

【 0 3 6 9 】

B C Y 9 4 1 1 を調製する手順

10

【 0 3 7 0 】

【 化 1 2 4 】



化合物 3 (4 . 2 m g 、 1 . 6 8 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 7 7 4 1 (4 . 0 m g 、 1 . 7 5 μ m o l 、 1 . 0 5 当量) および T H P T A (0 . 0 4 M 、 8 4 μ L 、 2 . 0 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1 、 2 m L 、 予め脱気し、N₂で3回バージした) に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 0 4 M 、 8 4 μ L 、 2 . 0 当量) および V c N a (0 . 0 4 M 、 1 6 8 μ L 、 4 . 0 当量) を N₂ 下で添加した。0 . 2 M N H ₄ H C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、2 5 ~ 3 0 で 1 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [MW : 4 7 8 6 . 3 7 、実測 m/z : 1 5 9 6 . 2 ([M / 3 + H] ⁺) 、 1 1 9 6 . 9 ([M / 4 + H] ⁺)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって直接精製した。B C Y 9 4 1 1 (4 . 1 m g 、 0 . 8 6 μ m o l 、 収率 5 0 . 2 0 % 、純度 9 8 . 2 6 %) を白色固体として得た。

20

【 0 3 7 1 】

B C Y 9 7 5 9

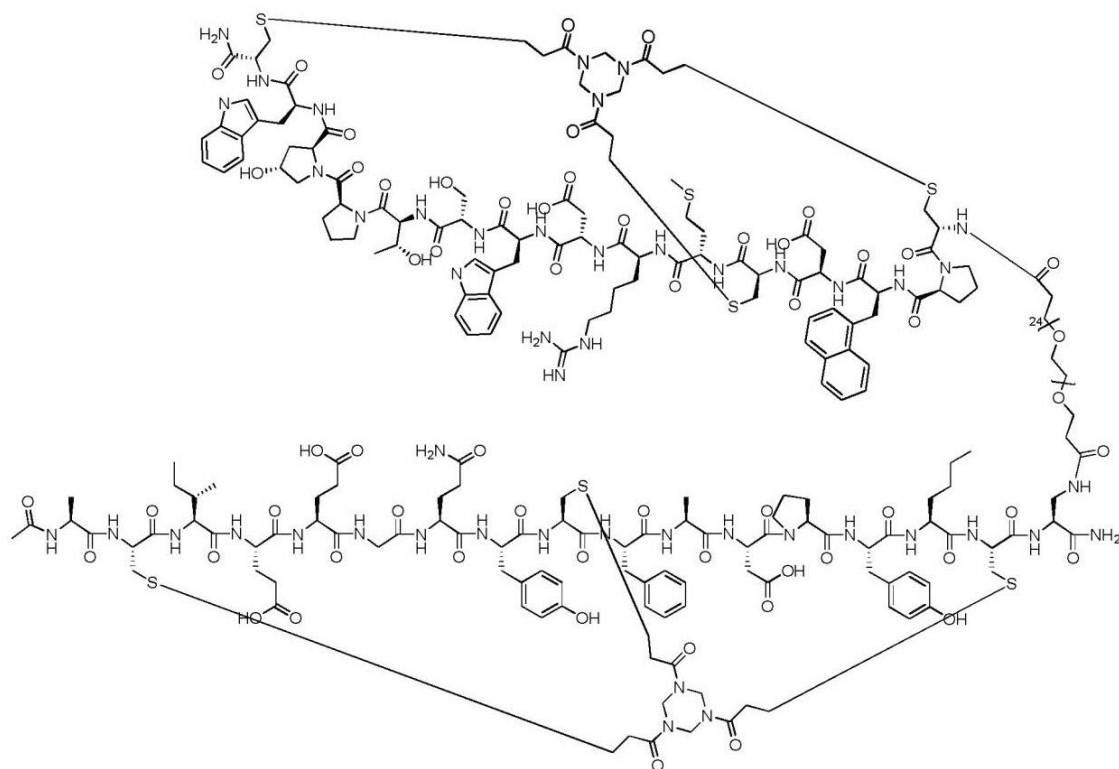
30

【 0 3 7 2 】

40

50

【化 1 2 5】



10

20

化合物 2 を調製する手順

【 0 3 7 3】

【化 1 2 6】



30

化合物 1 (5 . 0 m g 、 3 . 5 4 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 8 1 1 6 (7 . 7 m g 、 3 . 5 4 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M F (3 m L) 中溶液に、 D I E A (0 . 9 m g 、 7 . 0 7 μ m o l 、 1 . 2 μ L 、 2 . 0 当量) を添加した。混合物を 0 で 2 0 分間攪拌した。L C - M S は、N H S 基が脱落している化合物 2 に対応する質量 (計算 M W : 3 4 7 0 . 9 5 、加水分解 M W : 3 3 7 3 . 8 1 、実測 m / z : 1 1 2 5 . 0 ([M / 3 + H] ⁺)) を検出した。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮し、凍結乾燥して、化合物 2 (1 5 m g 、粗) を白色固体として得た。

【 0 3 7 4】

B C Y 9 7 5 9 を調製する手順

【 0 3 7 5】

【化 1 2 7】



2

化合物 2 (2 0 m g 、 5 . 7 6 μ m o l 、 1 . 0 当量) および B C Y 7 7 3 2 (1 2 . 7 m g 、 5 . 7 6 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M F (3 m L) 中溶液に、 D I E A (1 . 5 m g 、 1 1 . 5 2 μ m o l 、 2 . 0 μ L 、 2 . 0 当量) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3

50

0 で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 5557.3、実測 m/z : 927.0 ($[M/6+H]^+$) および 1112.2 ($[M/5+H]^+$)) を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相HPLC (TFA条件) によって精製した。BCY9759 (2.3 mg、収率6.92%、純度96.29%) を白色固体として得た。

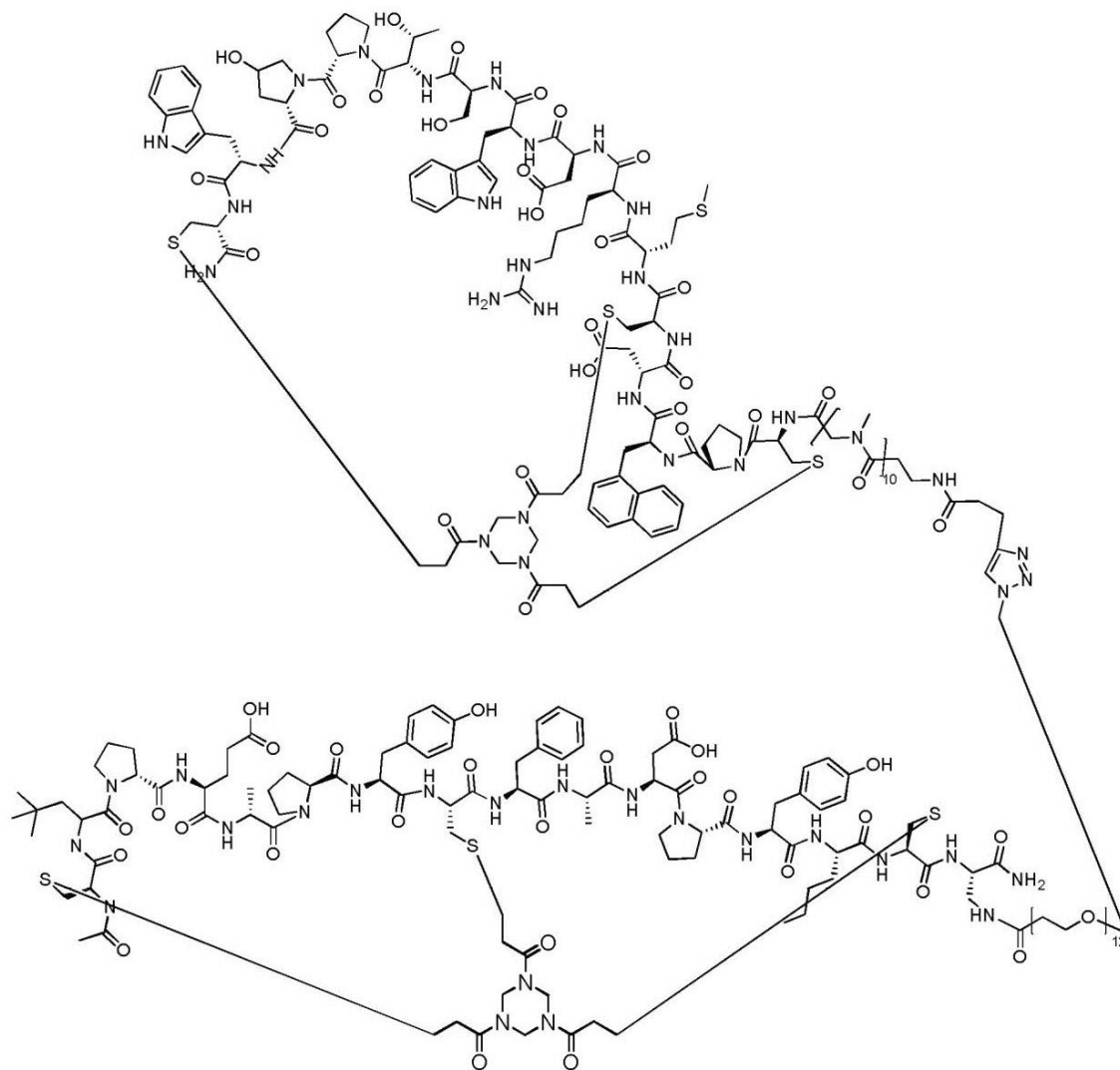
【0376】

BCY10000

【0377】

【化128】

10



20

30

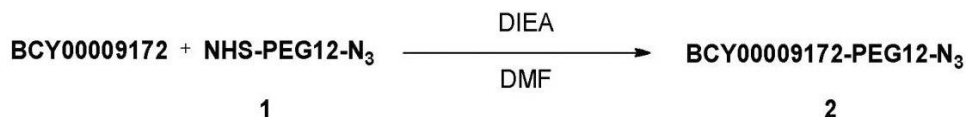
40

BCY00010000

BCY9172-PEG12-N₃を調製する手順

【0378】

【化129】



BCY9172 (520 mg、248.16 μmol、1.0当量) および化合物1 (

50

370 mg、499.47 μmol 、2.01 当量) を DMF (5 mL) に溶解し、次いで、混合物に DIEA (48.11 mg、372.24 μmol 、64.84 μL 、1.5 当量) を添加し、30 で 12 時間攪拌した。LC-MS は、BCY9172 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 2721.12、実測 m/z : 1360.9 ($[M/2 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、化合物 2 (284 mg、101.10 μmol 、収率 40.74%、純度 96.87%) を白色固体として得た。

【0379】

BCY10000 を調製する手順

【0380】

【化130】

10



2

この反応を並行して 2 つの独立した容器で実施した。1 つの容器について、化合物 2 (142 mg、52.18 μmol 、1.0 当量) および BCY8846 (157 mg、51.74 μmol 、1.0 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 10 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、130.5 μL 、1.0 当量)、VcNa (0.4 M、261.0 μL 、2.0 当量) および THPTA (0.4 M、130.5 μL 、1.0 当量) を添加した。最後に、1 M NH₄HCO₃ を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂ で 3 回バージした。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、30 で 12 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 5755.54、実測 m/z : 959.60 ($[M/6 + H]^+$) および 1151.55 ($[M/5 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY10000 (314.9 mg、51.99 μmol 、収率 49.82%、純度 95.03%) を白色固体として得た。

20

【0381】

BCY10567

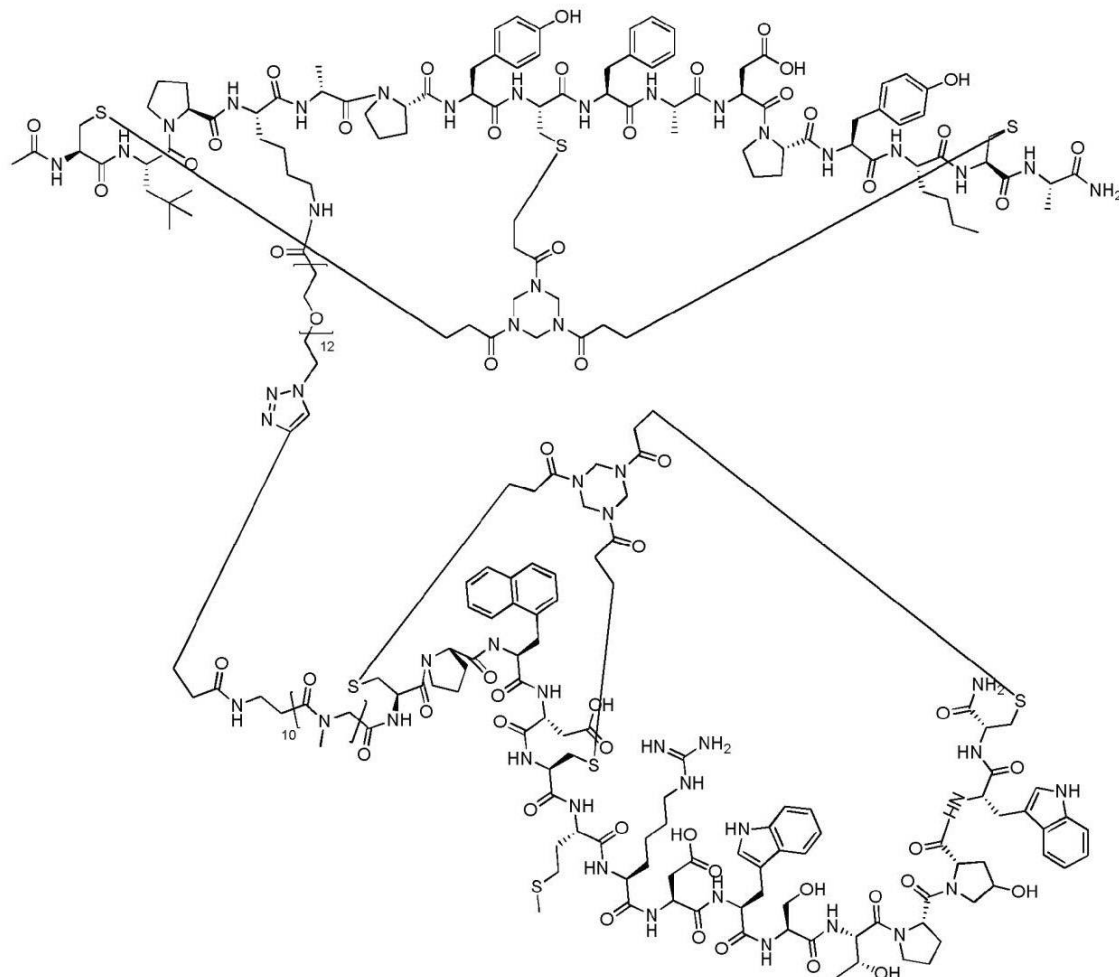
【0382】

30

40

50

【化 1 3 1】

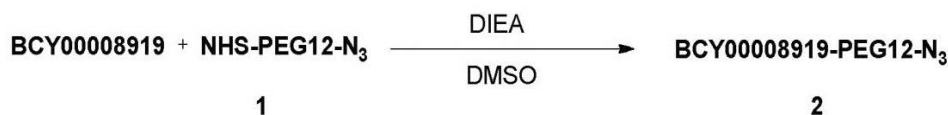


BCY00010567

BCY8919 - PEG12 - N₃ を調製する手順

【0383】

【化 1 3 2】



BCY8919 (60.0 mg、28.85 μmol、1.0 当量) および化合物 1 (22.2 mg、30.01 μmol、1.04 当量) を DMSO (1 mL) に溶解した。溶液に DIEA (5.6 mg、43.28 μmol、7.6 μl、1.5 当量) を添加し、次いで、混合物を 25 ~ 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、BCY8919 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 2705.16、実測 m/z: 1353.15 ([M/2 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、化合物 2 (BCY8919 - PEG12 - N₃、18.5 mg、6.77 μmol、収率 23.47%、純度 99.04%) を白色固体として得た。

【0384】

BCY10567 を調製する手順

【0385】

【化 1 3 3】



2

注：この反応を 2 回実施し、最初の反応を以下に記載する。

化合物 2 (9 . 0 m g 、 3 . 3 3 μ m o l 、 1 . 0 当量) および B C Y 8 8 4 6 (1 0 . 1 m g 、 3 . 3 3 μ m o l 、 1 . 0 当量) を最初に t - B u O H / H ₂ O (1 : 1) 2 m L に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 4 M 、 8 . 3 μ L 、 1 . 0 当量) 、 V c N (1 . 3 m g 、 6 . 5 6 μ m o l 、 2 . 0 当量) および T H P T A (1 . 4 m g 、 3 . 2 2 μ m o l 、 1 . 0 当量) を添加した。最後に、0 . 4 M N H ₄ H C O ₃ を添加して、p H を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N ₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N ₂ 雰囲気下、3 0 ° C で 1 6 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 2 が完全に消費されていること、および所望の m / z (計算 M S : 5 7 3 9 . 5 8 、実測 m / z : 9 5 6 . 7 5 ([M / 6 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークを示した。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製し、B C Y 1 0 5 6 7 (6 . 8 5 m g 、 1 . 1 8 μ m o l 、収率 3 5 . 4 8 % 、純度 9 8 . 9 1 %) を白色固体として得た。

【 0 3 8 6 】

B C Y 1 0 5 6 9

【 0 3 8 7 】

10

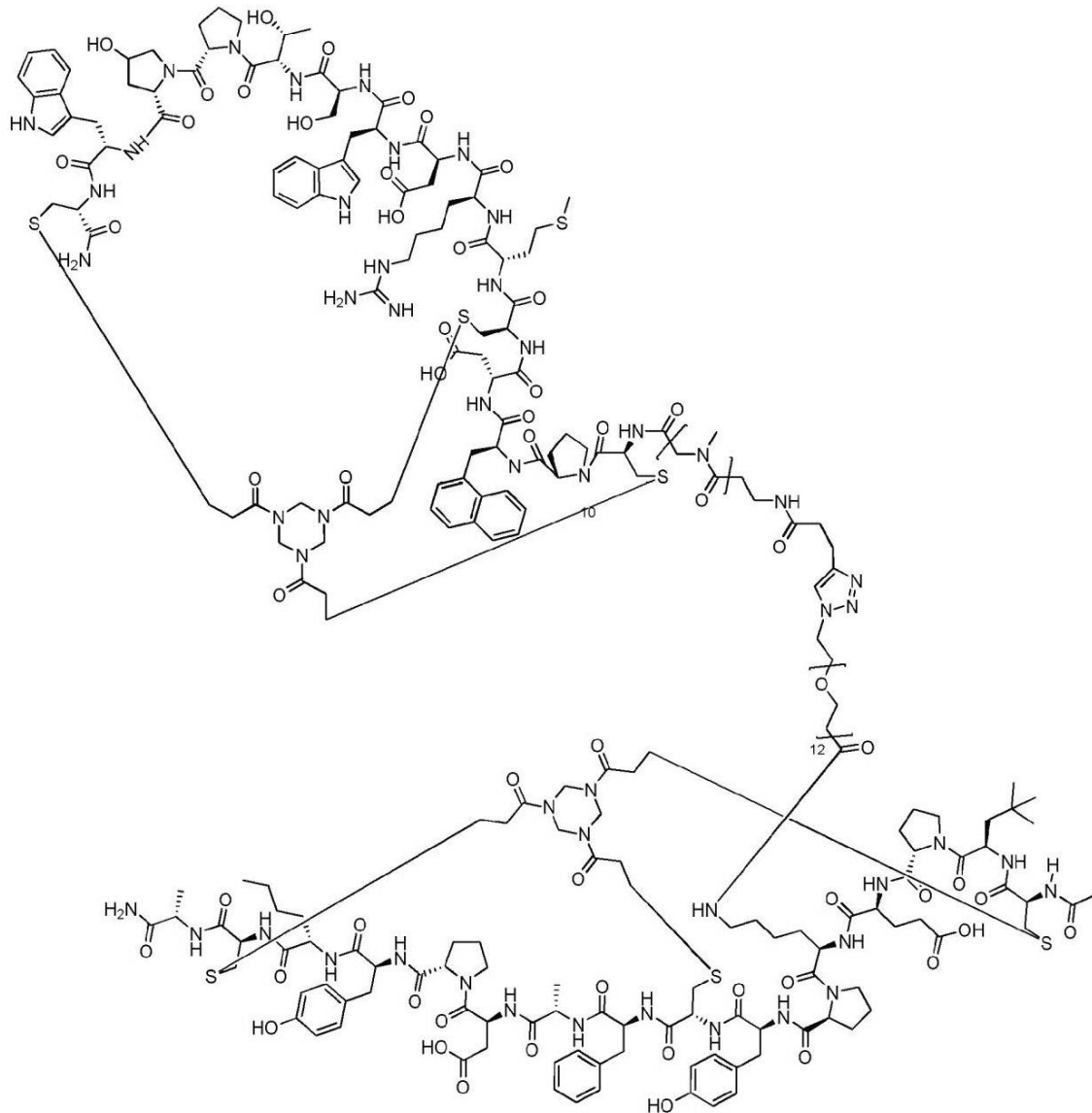
20

30

40

50

【化 1 3 4】

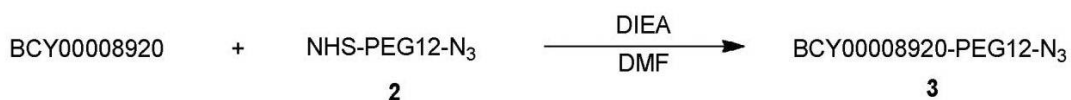


BCY00010569

化合物 3 を調製する手順

【 0 3 8 8】

【化 1 3 5】



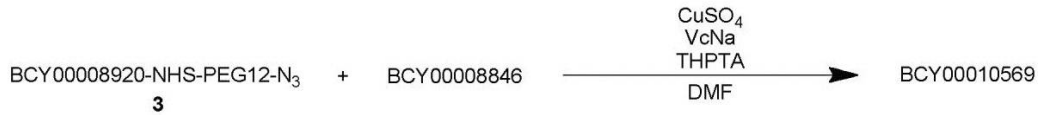
化合物 BCY 8 9 2 0 (4 0 . 0 m g 、 1 8 . 7 1 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 化合物 2 (1 6 . 0 m g 、 2 1 . 6 μ m o l 、 1 . 1 5 当量) および DIEA (5 . 0 μ L 、 2 8 . 0 μ m o l 、 1 . 5 当量) の混合物を DMF に溶解した。LC - MS が、所望の m/z (計算 MW : 2 7 6 3 . 2 、 実測 m/z : 9 1 2 . 1 7 ([(M - 2 8) / 2 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出されることを示すまで、反応混合物を 4 0 ° で 1 時間攪拌した。次いで、反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得て、引き続いて分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 3 (2 3 . 4 m g 、 8 . 4 7 μ m o l 、 収率 4 5 . 2 5 % 、 純度 9 9 . 0 %) を白色固体として得た。

【 0 3 8 9 】

B C Y 1 0 5 6 9 を調製する手順

【 0 3 9 0 】

【 化 1 3 6 】



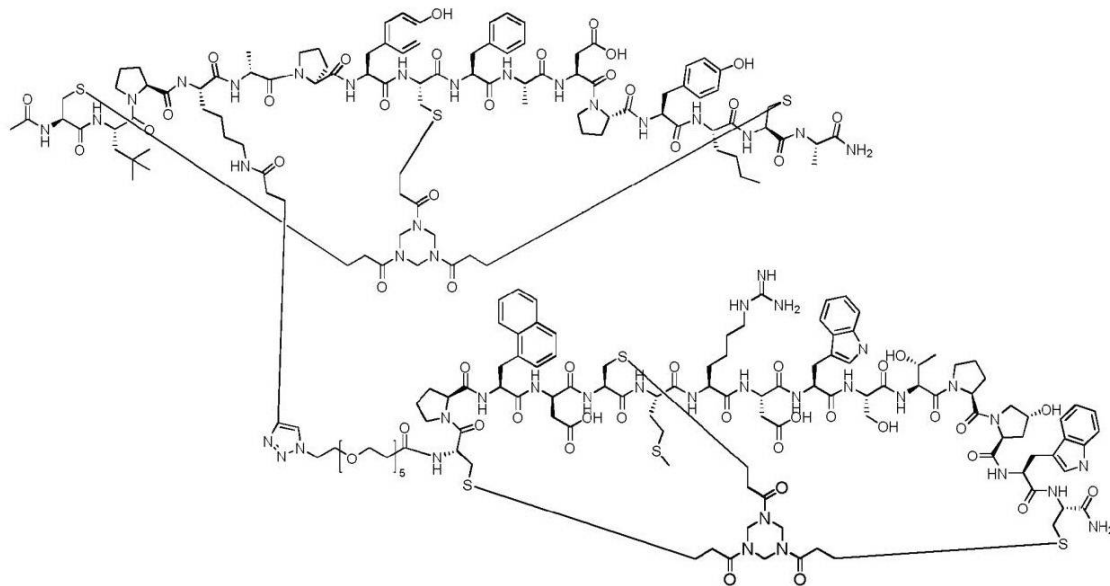
化合物 3 (5 . 0 m g 、 1 . 8 1 μmol 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 8 8 4 6 (5 . 8 m g 、 1 . 9 μmol 、 1 . 0 5 当量) および T H P T A (1 . 0 m g 、 2 . 3 μmol 、 1 . 3 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1 、 1 m L 、 予め脱気し、N₂で3回パージした) に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 4 M 、 5 . 0 μL 、 1 . 0 当量) および V c N a (0 . 4 M 、 5 . 0 μL 、 1 . 0 当量) を N ₂ 下で添加した。0 . 2 M N H ₄ H C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、4 0 ° で 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (計算 M W : 5 7 9 7 . 6 2 、実測 m / z : 1 1 6 0 . 7 ([M / 5 + H] ⁺) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製し、B C Y 1 0 5 6 9 (5 . 7 m g 、 1 . 1 8 μmol 、収率 5 2 . 2 5 % 、純度 9 6 . 1 6 %) を白色固体として得た。

【 0 3 9 1 】

B C Y 1 0 5 7 1

【 0 3 9 2 】

【 化 1 3 7 】

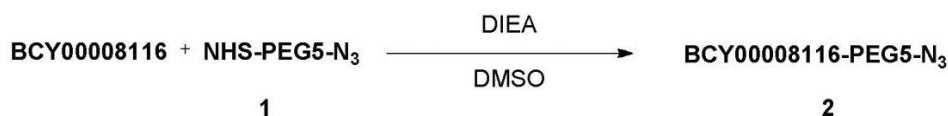


BCY00010571

B C Y 8 1 1 6 - P E G 5 - N ₃ を調製する手順

【 0 3 9 3 】

【 化 1 3 8 】



B C Y 8 1 1 6 (6 0 m g 、 2 7 . 6 2 μmol 、 1 . 0 当量) および化合物 1 (1 2

． 0 m g、 2 7 . 7 5 μ m o l、 1 . 0 当量) を最初に D M S O (1 m L) に溶解し、次いで、混合物に D I E A (5 . 4 m g、 4 1 . 4 3 μ m o l、 7 . 2 2 μ L、 1 . 5 当量) を添加した。混合物を 3 0 で 1 2 時間攪拌した。L C - M S は、所望の m / z (M W : 2 4 8 9 . 8 2、実測 m / z : 1 2 4 5 . 1 7 0 0 ([M / 2 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出されることを示した。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 2 (4 8 m g、 1 9 . 2 8 μ m o l、収率 6 9 . 8 0 %、純度 1 0 0 %) を白色固体として得た。

【 0 3 9 4 】

B C Y 1 0 5 7 1 を調製する手順

10

【 0 3 9 5 】

【 化 1 3 9 】



2

この反応を並行して 2 つの独立した容器で実施した。1 つの容器について、化合物 2 (1 0 m g、 4 . 0 2 μ m o l、 1 . 0 当量) および B C Y 8 9 2 7 (9 m g、 4 . 1 7 μ m o l、 1 . 0 4 当量) を最初に t - B u O H / H ₂ O (1 : 1) 2 m L に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 4 M、 1 0 . 0 μ L、 1 . 0 当量)、V c N a (0 . 4 M、 2 0 . 1 μ L、 2 . 0 当量) および T H P T A (0 . 4 M、 1 0 . 0 μ L、 1 当量) を添加した。最後に、0 . 4 M N H ₄ H C O ₃ を添加して、p H を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N ₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N ₂ 雰囲気下、3 0 で 4 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (M W : 4 6 4 9 . 3 6、実測 m / z : 1 1 6 2 . 5 7 ([M / 4 + H] ⁺)、1 5 4 9 . 6 9 ([M / 3 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。残留物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製した。B C Y 1 0 5 7 1 (1 3 m g、 2 . 7 9 μ m o l、収率 3 4 . 8 8 %、純度 9 6 . 4 8 %) を白色固体として得た。

20

30

【 0 3 9 6 】

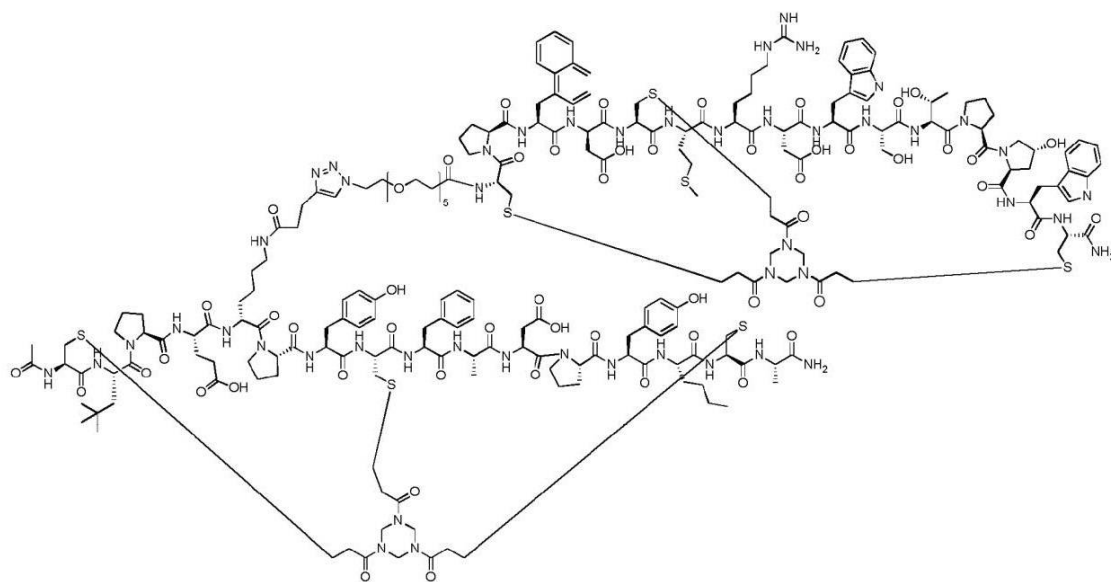
B C Y 1 0 5 7 2

【 0 3 9 7 】

40

50

【化 1 4 0】



BCY00010572

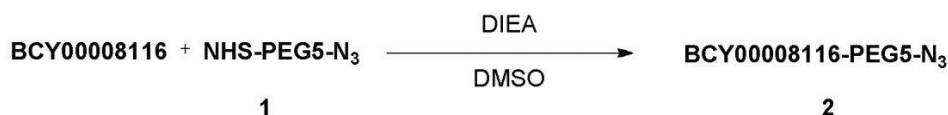
10

BCY8116 - PEG5 - N₃ を調製する手順

20

【0398】

【化 1 4 1】



BCY8116 (60 mg、27.62 μmol、1.0 当量) および化合物 1 (12.0 mg、27.75 μmol、1.0 当量) を最初に DMSO (1 mL) に溶解し、次いで、混合物に DIEA (5.4 mg、41.43 μmol、7.22 μL、1.5 当量) を添加した。混合物を 30 で 12 時間攪拌した。LC-MS は、所望の m/z (MW : 2489.82、実測 m/z : 1245.1700 ([M/2 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出されることを示した。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 2 (48 mg、19.28 μmol、収率 69.80%、純度 100%) を白色固体として得た。

30

【0399】

BCY10572 を調製する手順

【0400】

【化 1 4 2】



40

この反応を並行して 2 つの独立した容器で実施した。1 つの容器について、化合物 2 (10 mg、4.02 μmol、1.0 当量) および BCY8928 (9 mg、4.06 μmol、1.01 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1 : 1) 2 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、10.1 μL、1 当量)、VcNa (0.4 M、20.2 μL、2.0 当量) および THPTA (0.4 M、10.1 μL、1.0 当量) を添加した

50

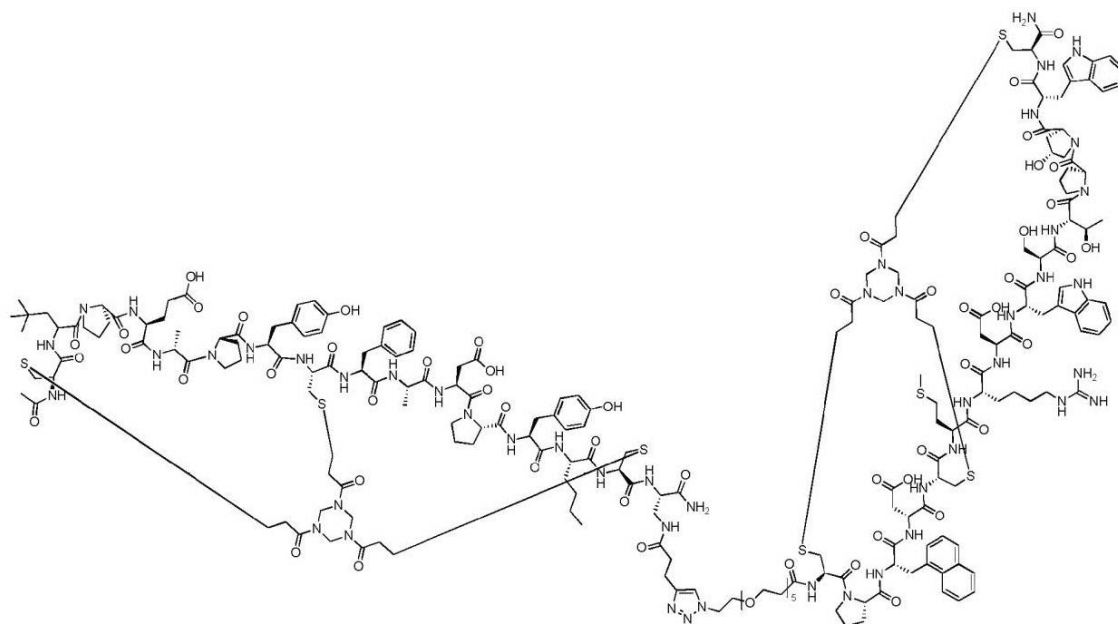
。最後に、 $0.4\text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ を添加して、 pH を8に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、 N_2 で3回パージした。反応混合物を、 N_2 雰囲気下、 30°C で4時間攪拌した。LC-MSは、化合物1が完全に消費されていることを示し、所望の m/z ($\text{MW}: 4707.40$ 、実測 $m/z: 1568.29$ ($[\text{M}/3 + \text{H}]^+$) および 1176.83 ($[\text{M}/4 + \text{H}]^+$)) を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取HPLC (TFA条件) によって精製した。BCY10572 (21 mg 、 $4.46\text{ }\mu\text{mol}$ 、収率 55.7% 、純度 97.51%) を白色固体として得た。

【0401】

BCY10573

【0402】

【化143】

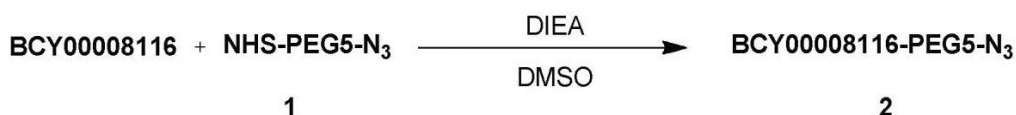


BCY00010573

化合物2を調製する手順

【0403】

【化144】



BCY8116 (35 mg 、 $16.11\text{ }\mu\text{mol}$ 、1当量)、化合物1 (7.00 mg 、 $16.19\text{ }\mu\text{mol}$ 、1当量) のDMSO (1 mL) 中溶液に、DIEA (3.12 mg 、 $24.17\text{ }\mu\text{mol}$ 、 $4.21\text{ }\mu\text{L}$ 、 1.5 当量) を添加した。混合物を $25 \sim 30^\circ\text{C}$ で2時間攪拌した。LC-MSは、BCY8116の大部分が消費されていることを示し、所望の m/z (計算 $\text{MW}: 2489.82$ 、実測 $m/z: 1245.37$ ($[\text{M}/2 + \text{H}]^+$) および 830.25 ($[\text{M}/3 + \text{H}]^+$)) を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取HPLC (TFA条件) によって精製した。化合物2 (26.8 mg 、 $10.76\text{ }\mu\text{mol}$ 、収率 66.81% 、純度 100%) を白色固体として得た。

【0404】

BCY10573を調製する手順

10

20

30

40

50

【 0 4 0 5 】

【 化 1 4 5 】



2

化合物 2 (1 5 m g 、 6 . 0 2 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 1 1 0 1 4 (1 3 . 5 0 m g 、 6 . 2 1 μ m o l 、 1 . 0 3 当量) および T H P T A (0 . 4 M 、 1 5 . 1 μ L 、 1 . 0 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1 、 2 m L 、 予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 4 M 、 1 5 . 1 μ L 、 1 . 0 当量) および V c N a (0 . 4 M 、 3 0 . 2 μ L 、 2 . 0 当量) を N₂ 下で添加した。0 . 2 M N H ₄ H C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、2 5 ~ 3 0 で 1 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z [M W : 4 6 6 5 . 3 2 、実測 m / z : 1 1 6 7 . 5 0 ([M / 4 + H] ⁺)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって直接精製した。B C Y 1 0 5 7 3 (1 1 . 5 m g 、 2 . 4 2 μ m o l 、収率 4 0 . 1 4 % 、純度 9 8 . 1 1 %) を白色固体として得た。

10

【 0 4 0 6 】

B C Y 1 0 5 7 8

20

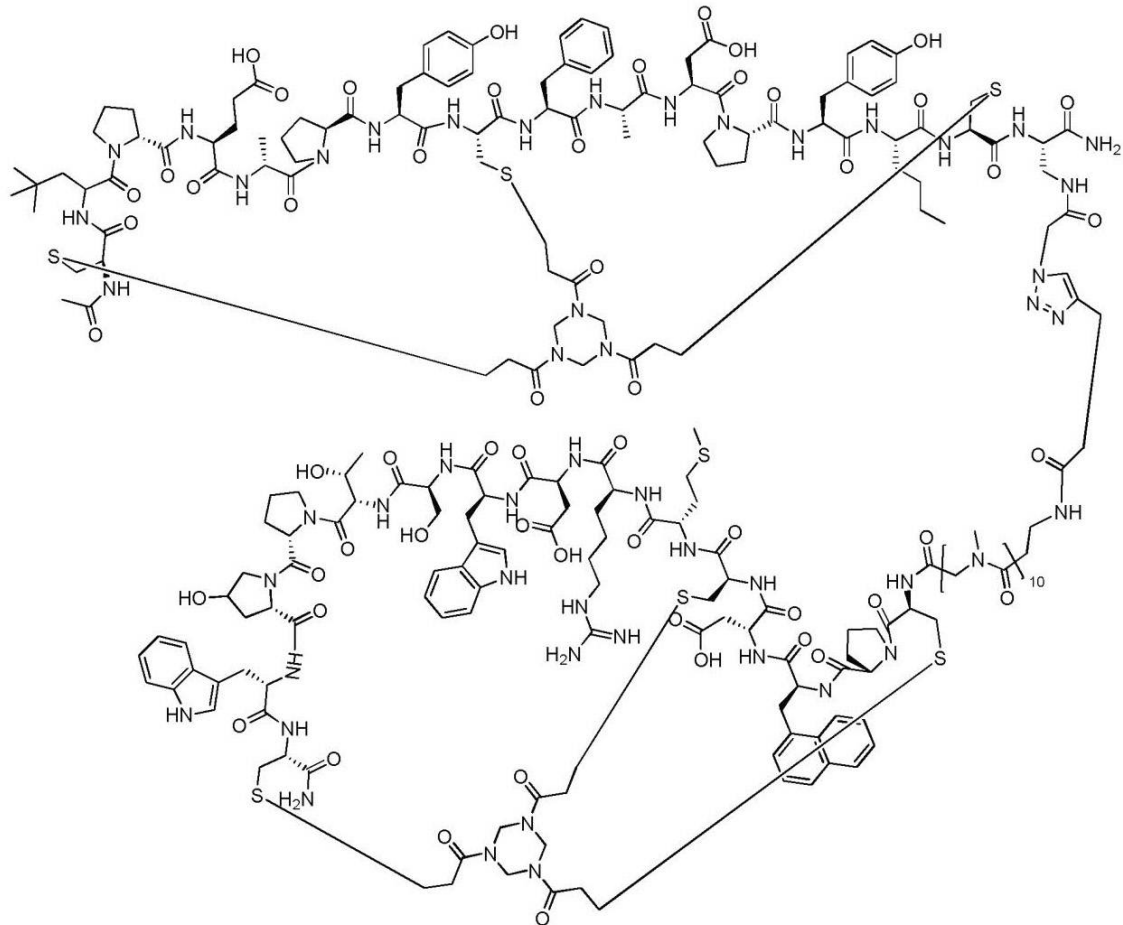
【 0 4 0 7 】

30

40

50

【化 1 4 6】

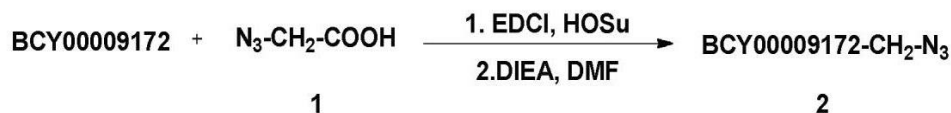


BCY00010578

化合物 2 を調製する手順

【 0 4 0 8】

【化 1 4 7】



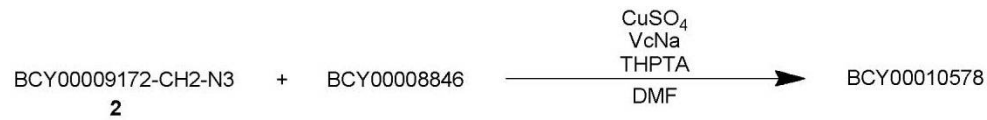
化合物 1 (5 . 0 m g 、 4 9 . 5 μmol 、 1 . 0 当量) を最初に E D C I (8 . 5 m g 、 5 4 . 8 μmol 、 1 . 1 当量) および H O S u (5 . 7 m g 、 4 9 . 5 μmol 、 1 . 0 当量) と混合することによって活性化した。混合物を 2 5 ~ 3 0 で 3 0 分間攪拌した。T L C は、化合物 1 が完全に消費されており、1 つの新たなスポットが形成されたことを示した。次いで、化合物 B C Y 9 1 7 2 (8 0 . 0 m g 、 3 8 . 1 8 μmol 、 0 . 8 当量) および D I E A (6 . 3 m g 、 8 . 5 μL 、 4 9 . 5 μmol 、 1 . 0 当量) をこの混合物に添加し、L C - M S が、所望の m/z (計算 MW : 2 1 7 8 . 4 6 、実測 m/z : 1 0 8 9 . 4 4 ([M / 2 + H] ^ +)) を有する 1 つの主ピークが検出されることを示すまで、4 0 で 1 時間攪拌した。次いで、反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去し、残留物を得て、引き続いて分取 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 2 (1 5 m g 、 6 . 8 8 μmol 、収率 1 8 . 6 6 % 、純度 7 3 . 3 %) を白色固体として得た。

【 0 4 0 9】

BCY10578を調製する手順

【0410】

【化148】



化合物2 (9.8 mg、4.5 μmol 、1.0当量)、BCY8846 (14.0 mg、4.6 μmol 、1.0当量) およびTHPTA (2.0 mg、4.6 μmol 、1.0当量) の混合物を *t*-BuOH/H₂O (1:1、1 mL、予め脱気し、N₂で3回パージした) に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、12 μL 、1.0当量) および VcNa (0.4 M、24 μL 、2.0当量) をN₂下で添加した。0.2 M NH₄HCO₃ (1:1 *t*-BuOH/H₂O中) を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、40℃で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていることを示し、所望の *m/z* (計算MW: 5212.88、実測 *m/z*: 1304.2 ([M/4 + H]⁺)) を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取HPLC (TFA条件) によって精製し、BCY10578 (13.78 mg、2.64 μmol 、収率58.66%、純度96.23%) を白色固体として得た。

【0411】

BCY10917

【0412】

10

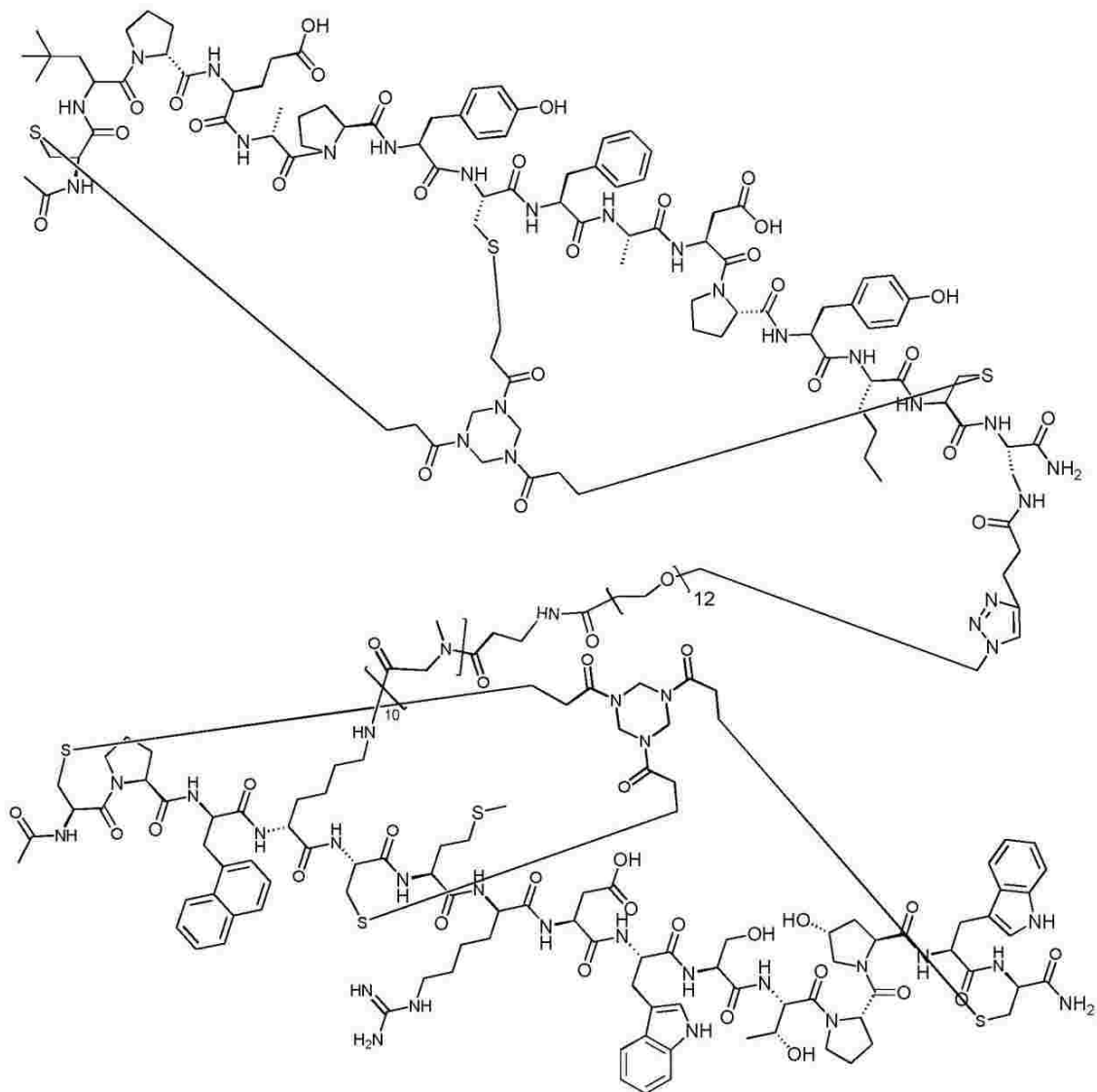
20

30

40

50

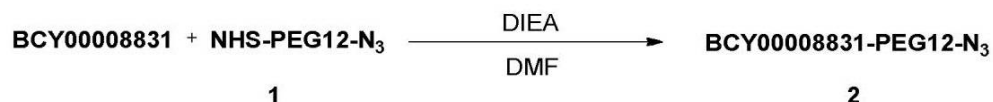
【化 1 4 9】



BCY8831 - PEG12 - N₃ を調製する手順

【0413】

【化150】



BCY8831 (40.0 mg、13.29 μmol、1.0 当量) および化合物 1 (10.5 mg、14.17 μmol、1.07 当量) を DMF (1 mL) に溶解した。溶液に DIEA (2.6 mg、20.09 μmol、3.5 μl、1.5 当量) を添加し、次いで、混合物を 30 で 16 時間攪拌した。LC-MS は、BCY8831 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 3635.16 実測 m/z : 1212.0 ($[M/3 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、化合物 2 (22.0 mg、5.83 μmol、収率 43.85%、純度 96.39%) を白色固体として得た。

【 0 4 1 4 】

BCY10917を調製する手順

【 0 4 1 5 】

【 化 1 5 1 】



2

10

注：2つのバッチを作り、最初のを最終報告のために記載した。

化合物2 (10.0 mg、2.75 μmol 、1.0当量) およびBCY11014 (5.98 mg、2.75 μmol 、1.0当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 2 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、13.7 μL 、2.0当量)、VcNa (1.1 mg、5.55 μmol 、2.0当量) およびTHPTA (1.2 mg、2.76 μmol 、1.0当量) を添加した。最後に、1 M NH₄HCO₃ を添加して、pHを8に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂で3回パージした。反応混合物を、N₂雰囲気下、30℃で16時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていること、および所望のm/z (計算MW: 5810.66 実測m/z: 1163.0 ([M/5 + H]⁺)) を有する1つの主ピークを示した。反応混合物を分取HPLC (TFA条件) によって精製し、BCY10917 (6.4 mg、1.07 μmol 、収率39.03%、純度97.49%) を白色固体として得た。

20

【 0 4 1 6 】

BCY11020

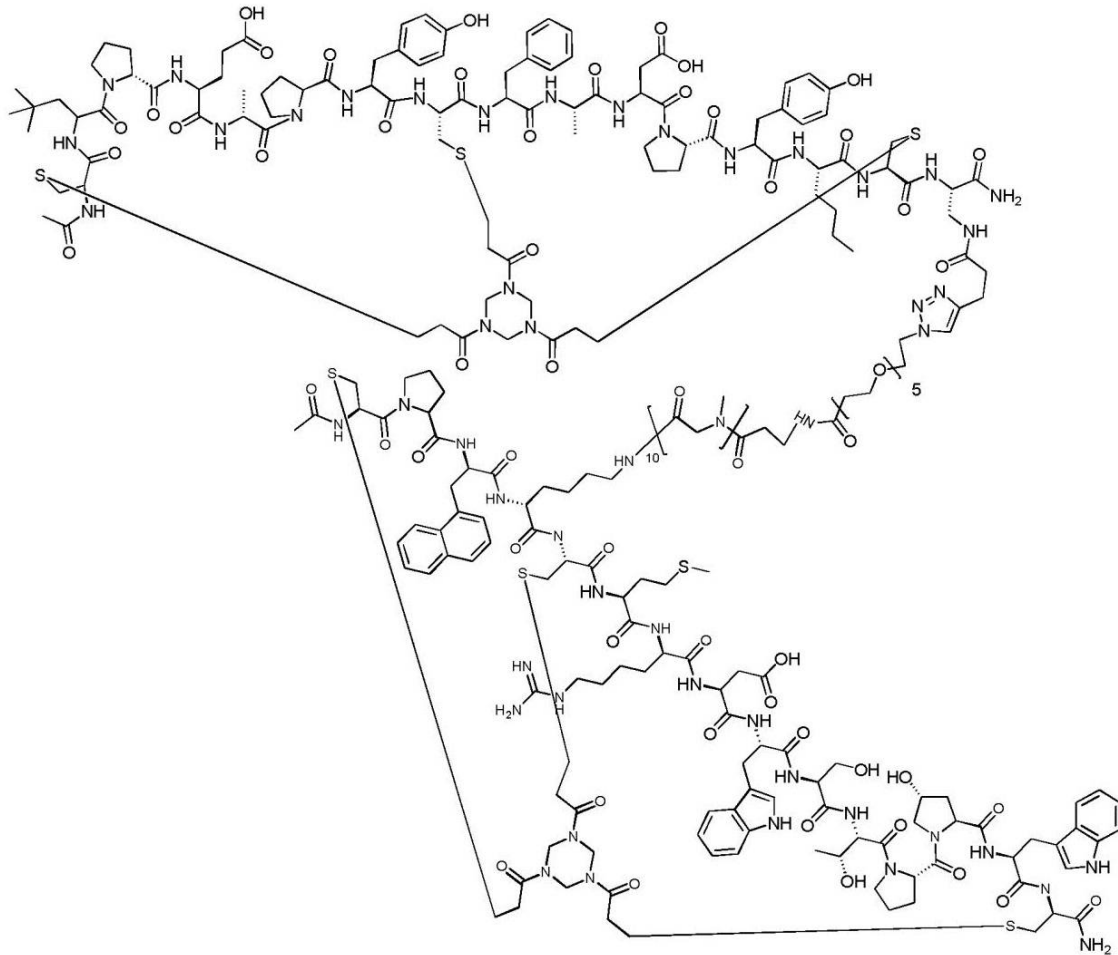
【 0 4 1 7 】

30

40

50

【化 1 5 2】



10

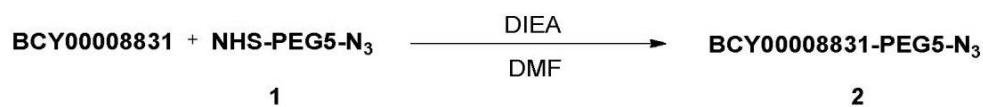
20

BCY8831 - PEG5 - N₃ を調製する手順

【 0 4 1 8 】

【化 1 5 3】

30



BCY8831 (25.0 mg、8.31 μmol、1.0 当量) および化合物 1 (3.9 mg、9.02 μmol、1.09 当量) を DMF (1 mL) に溶解した。溶液に DIEA (1.6 mg、12.46 μmol、2.2 μl、1.5 当量) を添加し、次いで、混合物を 35 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、BCY8831 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 3326.79 実測 m/z: 1109.66 ([M/3 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、化合物 2 (7.3 mg、2.09 μmol、収率 25.20%、純度 95.41%) を白色固体として得た。

40

【 0 4 1 9 】

BCY11020 を調製する手順

【 0 4 2 0 】

50

【化 1 5 4】



2

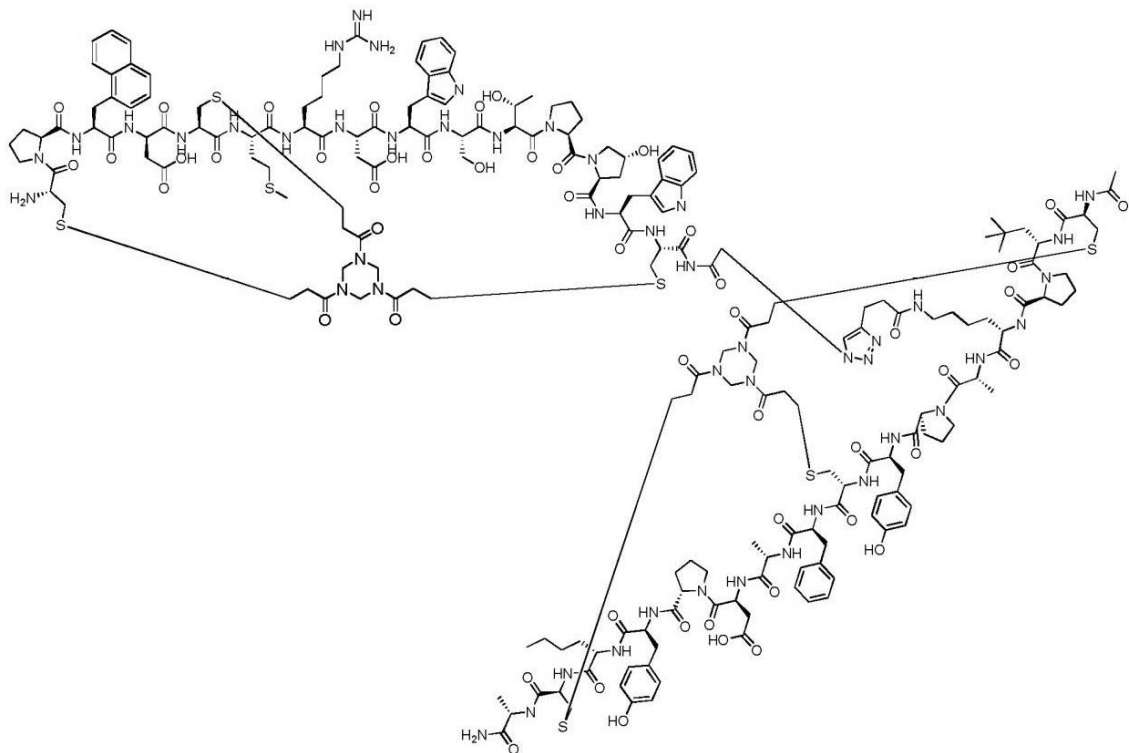
化合物 2 (7.3 mg、2.19 μmol 、1.0 当量) および BCY11014 (4.8 mg、2.19 μmol 、1.0 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 2 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、5.5 μL 、1.0 当量)、VcNa (1.0 mg、5.05 μmol 、2.3 当量) および THPTA (1.0 mg、2.30 μmol 、1.0 当量) を添加した。最後に、1 M NH₄HCO₃ を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、30℃ で 12 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 5502.29、実測 m/z: 1101.74 ([M/5 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11020 (3.3 mg、0.577 μmol 、収率 26.30%、純度 96.24%) を白色固体として得た。

【0 4 2 1】

BCY11373

【0 4 2 2】

【化 1 5 5】



BCY00011373

化合物 2 を調製する手順

【0 4 2 3】

10

20

30

40

50

【化 1 5 6】



化合物 1 (5 . 0 m g 、 4 9 . 5 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M F (1 m L) 中溶液に、E D C I (8 . 5 m g 、 5 4 . 8 μ m o l 、 1 . 1 当量) および H O S u (5 . 7 m g 、 4 9 . 5 μ m o l 、 1 . 0 当量) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3 0 で 3 0 分間攪拌した。T L C は、化合物 1 が完全に消費されており、1 つの新たなスポットが形成されたことを示した。次いで、この混合物 0 . 3 m L に B C Y 8 1 1 6 (3 0 . 0 m g 、 1 3 . 8 1 μ m o l 、 0 . 2 8 当量) および D I E A (2 . 4 μ L 、 1 3 . 8 1 μ m o l 、 0 . 2 8 当量) を添加し、2 5 ~ 3 0 で 2 時間攪拌した。L C - M S は、B C Y 8 1 1 6 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW : 2 2 5 5 . 5 3 、実測 m/z : 1 1 2 8 . 3 4 ([M / 2 + H] ⁺) を有する 1 つの主ピークが検出された。次いで、反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去し、残留物を得て、引き続いて分取 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 2 (2 1 m g 、 8 . 9 μ m o l 、収率 6 4 . 4 3 % 、純度 9 5 . 5 6 %) を白色固体として得た。

10

【 0 4 2 4】

B C Y 1 1 3 7 3 を調製する手順

【 0 4 2 5】

20

【化 1 5 7】



化合物 2 (5 m g 、 2 . 2 2 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 8 9 2 8 (4 . 7 9 m g 、 2 . 2 2 μ m o l 、 1 . 0 当量) および T H P T A (1 . 0 m g 、 2 . 3 0 μ m o l 、 1 . 0 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1 、 1 m L 、 予め脱気し、N ₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 4 M 、 5 . 6 μ L 、 1 . 0 当量) および V c N a (0 . 4 M 、 5 . 6 μ L 、 1 . 0 当量) を N ₂ 下で添加した。0 . 2 M N H ₄ H C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N ₂ 雰囲気下、4 0 で 2 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW : 4 4 1 5 . 0 7 、実測 m/z : 1 4 7 1 . 5 ([M / 3 + H] ⁺) および 1 1 0 3 . 8 ([M / 4 + H] ⁺) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製し、B C Y 1 1 3 7 3 (4 . 9 m g 、 1 . 0 3 μ m o l 、収率 4 6 . 2 6 % 、純度 9 2 . 4 %) を白色固体として得た。

30

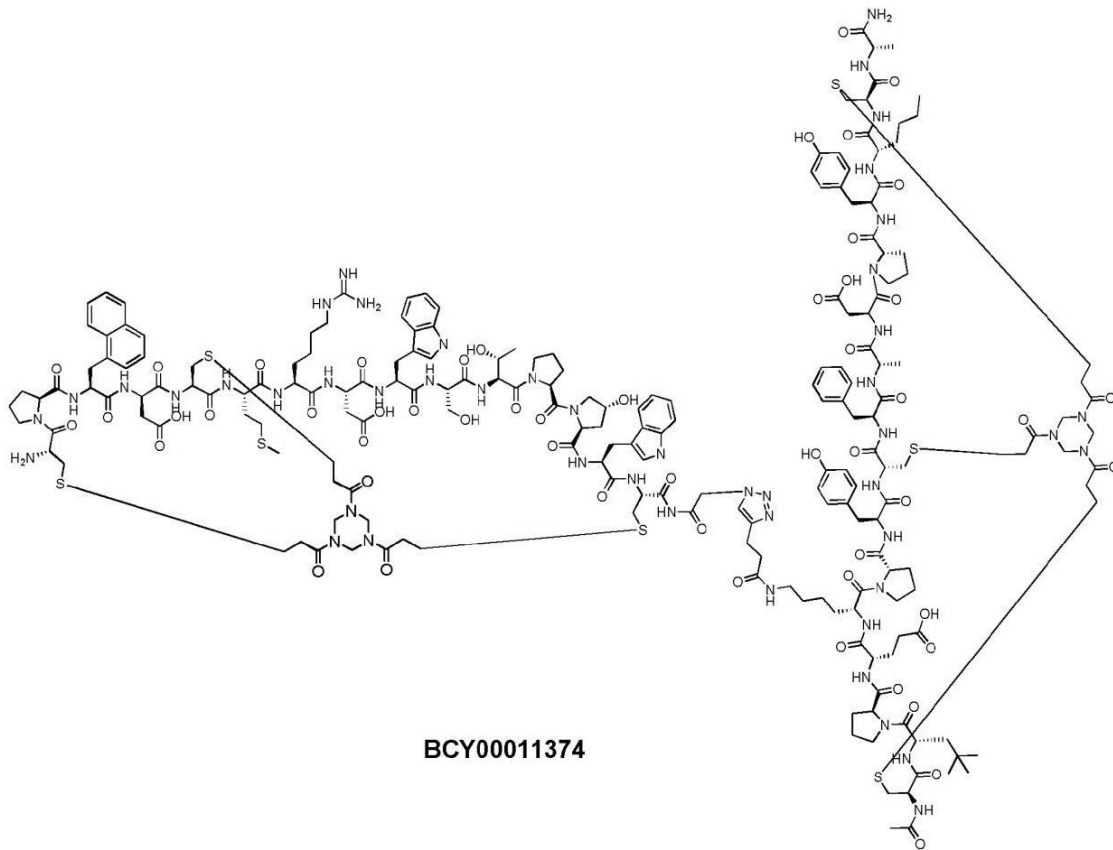
【 0 4 2 6】

40

B C Y 1 1 3 7 4

【 0 4 2 7】

【化 1 5 8】



BCY11374を調製する手順

【0428】

【化 1 5 9】



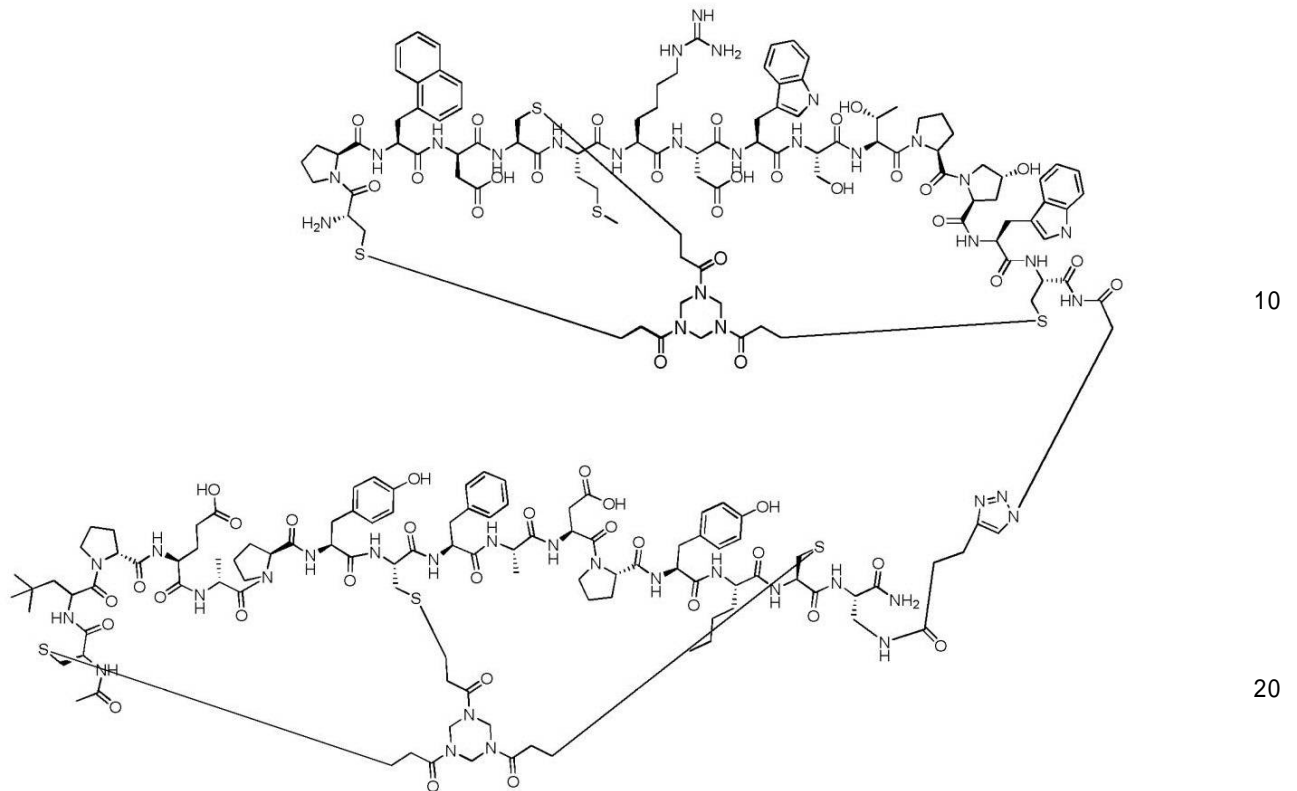
化合物 2 (BCY11373を調製する手順に記載されるように調製され得る; 5 mg、2.22 μmol 、1.0 当量)、BCY8928 (4.9 mg、2.22 μmol 、1.0 当量) および THPTA (1.0 mg、2.30 μmol 、1.0 当量) の混合物を t-BuOH/H₂O (1:1、1 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回バージした) に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、5.6 μL 、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、5.6 μL 、1.0 当量) を N₂ 下で添加した。0.2 M NH₄HCO₃ (1:1 t-BuOH/H₂O 中) を滴加することによって、この溶液の pH を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、40 °C で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 4473.11、実測 m/z: 1491.5 ([M/3 + H]⁺ および 1118.5 ([M/4 + H]⁺) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11374 (4.1 mg、1.27 μmol 、収率 38.04%、純度 92.0%) を白色固体として得た。

【0429】

BCY11375

【0430】

【化 1 6 0】

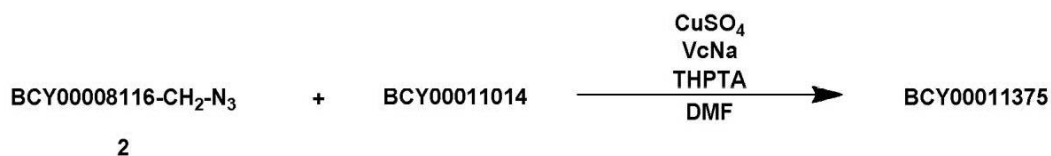


BCY00011375

BCY11375を調製する手順

【0431】

【化 1 6 1】



化合物 2 (BCY11373 に記載されるように調製され得る; 5 mg、2.22 μmol 、1.0 当量)、BCY11014 (4.8 mg、2.22 μmol 、1.0 当量) および THPTA (0.5 mg、2.30 μmol 、1.0 当量) の混合物を t-BuOH / H₂O (1 : 1、1 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、5.6 μL 、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、5.6 μL 、1.0 当量) を N₂ 下で添加した。0.2 M NH₄HCO₃ (1 : 1 t-BuOH / H₂O 中) を滴加することによって、この溶液の pH を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、40 °C で 2 時間攪拌した。LC-MS は、いくつかの所望の m/z (計算 MW : 4431.03、実測 m/z : 1107.59 ([M/4 + H]⁺ および 1477.90 ([M/3 + H]⁺) を検出した。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11375 (6 mg、1.31 μmol 、収率 59.13%、純度 96.8%) を白色固体として得た。

【0432】

BCY11616

10

20

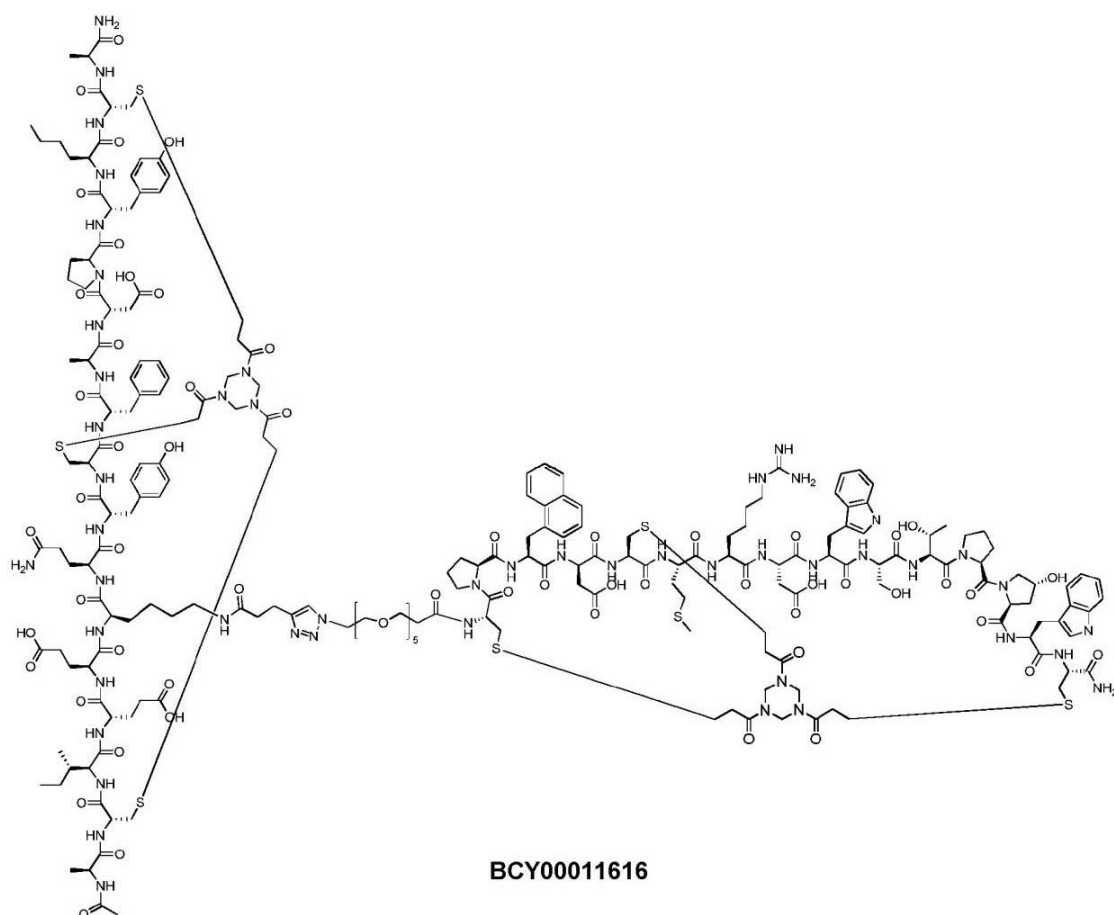
30

40

50

【 0 4 3 3 】

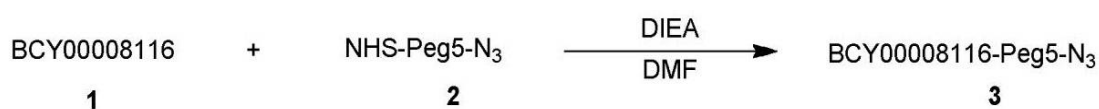
【 化 1 6 2 】



化合物 3 を調製する手順

【 0 4 3 4 】

【 化 1 6 3 】



化合物 BCY 8 1 1 6 (3 0 . 0 m g 、 1 3 . 8 1 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 化合物 2 (6 . 0 m g 、 1 3 . 8 8 μ m o l 、 1 . 0 当量) および DIEA (2 . 4 μ L 、 1 3 . 8 2 μ m o l 、 1 . 0 当量) の混合物を DMF に溶解した。LC - MS が、化合物 1 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (計算 MW : 2 4 8 9 . 8 2 、実測 m / z : 1 2 4 5 . 4 ([M / 2 + H] ⁺) を有する 1 つの主ピークが検出されるまで、反応混合物を 4 0 °C で 1 時間攪拌した。次いで、反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去し、残留物を得て、引き続いて分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 3 (2 7 m g 、 1 0 . 2 9 μ m o l 、 収率 7 4 . 5 2 % 、純度 9 4 . 9 %) を白色固体として得た。

【 0 4 3 5 】

BCY 1 1 6 1 6 を調製する手順

【 0 4 3 6 】

10

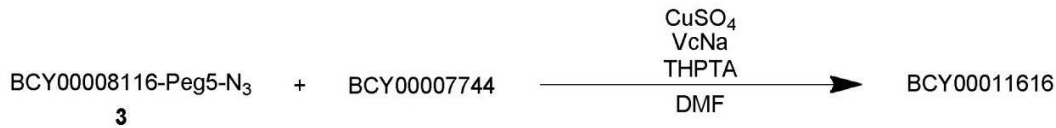
20

30

40

50

【化 1 6 4】



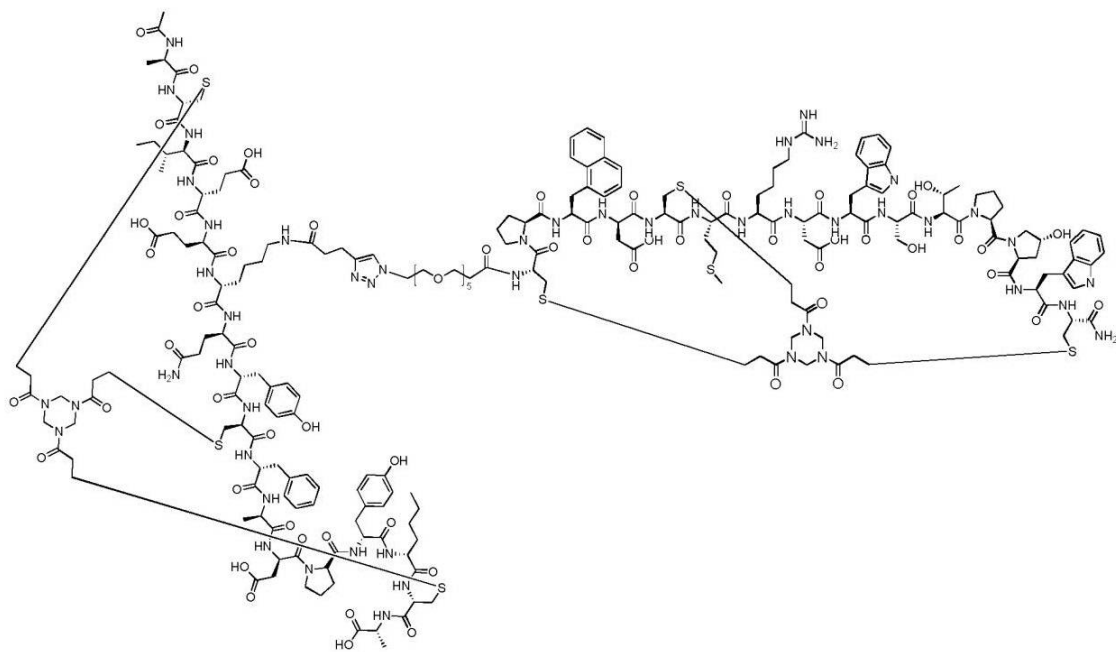
化合物 3 (5 mg、2.01 μmol 、1.0 当量)、BCY7744 (5.2 mg、2.21 μmol 、1.1 当量) および THPTA (1.0 mg、2.30 μmol 、1.0 当量) の混合物を $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1、1 mL、予め脱気し、 N_2 で 3 回パージした) に溶解し、次いで、 CuSO_4 (0.4 M、5.0 μL 、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、5.0 μL 、1.0 当量) を N_2 下で添加した。0.2 M NH_4HCO_3 (1:1 $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ 中) を滴加することによって、この溶液の pH を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、 N_2 雰囲気下、40℃ で 2 時間撹拌した。LC-MS は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 4827.46、実測 m/z : 1207.12 ($[\text{M}/4 + \text{H}]^+$) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11616 (4.7 mg、1.0 μmol 、収率 48.48%、純度 94.7%) を白色固体として得た。

【0 4 3 7】

BCY11617

【0 4 3 8】

【化 1 6 5】



BCY00011617

BCY11617 を調製する手順

【0 4 3 9】

【化 1 6 6】



化合物 3 (BCY11616 を調製する手順に記載されるように調製され得る; 5 mg、2.01 μmol 、1.0 当量)、BCY11506 (5.2 mg、2.21 μmol

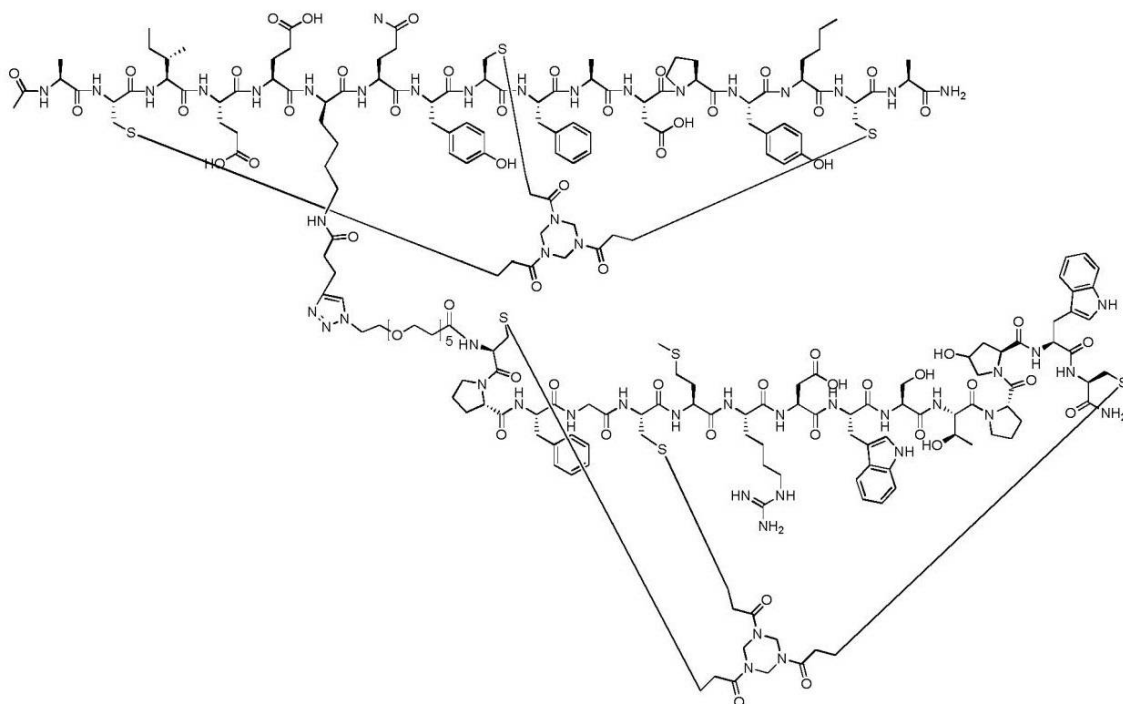
、1.1当量)およびTHPTA(1.0mg、2.30 μ mol、1.1当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、1mL、予め脱気し、N₂で3回パージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、5.0 μ L、1.0当量)およびVcNa(0.4M、5.0 μ L、1.0当量)をN₂下で添加した。0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、40℃で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていることを示し、所望のm/z(計算MW: 4828.45、実測m/z: 1206.97([M/4+H]⁺)および965.91([M/5+H]⁺)を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取HPLC(TFA条件)によって精製し、BCY11617(3.2mg、0.63 μ mol、収率31.37%、純度95.05%)を白色固体として得た。

【0440】

BCY11857

【0441】

【化167】

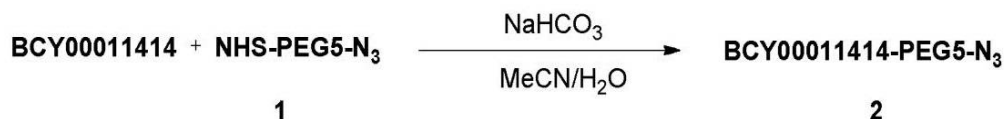


BCY00011857

BCY11414-PEG5-N₃を調製する手順

【0442】

【化168】



BCY11414(60.0mg、29.06 μ mol、1.0当量)および化合物1(13.0mg、30.06 μ mol、1.03当量)をMeCN/H₂O(1:1)2mLに溶解した。NaHCO₃(0.4M)でpHを8に調整し、次いで、混合物を25~30℃で2時間攪拌した。LC-MSは、所望のm/z(計算MW: 2381.72、実測m/z: 1191.07([M/2+H]⁺))を有する1つの主ピークが検出されることを示した。反応混合物を分取HPLC(TFA条件)によって精製し、化合物2(

38.0 mg、15.9 μmol 、収率54.71%、純度97.35%)を白色固体として得た。

【0443】

BCY11857を調製する手順

【0444】

【化169】



2

10

化合物2(10.0 mg、4.20 μmol 、1.0当量)およびBCY7744(11.5 mg、4.92 μmol 、1.2当量)を最初にt-BuOH/H₂O(1:1) 2 mLに溶解し、次いで、CuSO₄(0.4 M、11.0 μL 、1.0当量)、VcNa(2.0 mg、10 μmol 、2.4当量)およびTHPTA(2.0 mg、4.6 μmol 、1.1当量)を添加した。最後に、0.2 M NH₄HCO₃を添加して、pHを8に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂で3回バージした。反応混合物を、N₂雰囲気下、30℃で16時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていること、および所望のm/z(計算MW: 4719.37、実測m/z: 1180.24([M/4+H]⁺))を有する1つの主ピークを示した。反応混合物を分取HPLC(TFA条件)によって精製し、BCY11857(10.3 mg、2.18 μmol 、収率51.90%、純度96.02%)を白色固体として得た。

20

【0445】

BCY11858

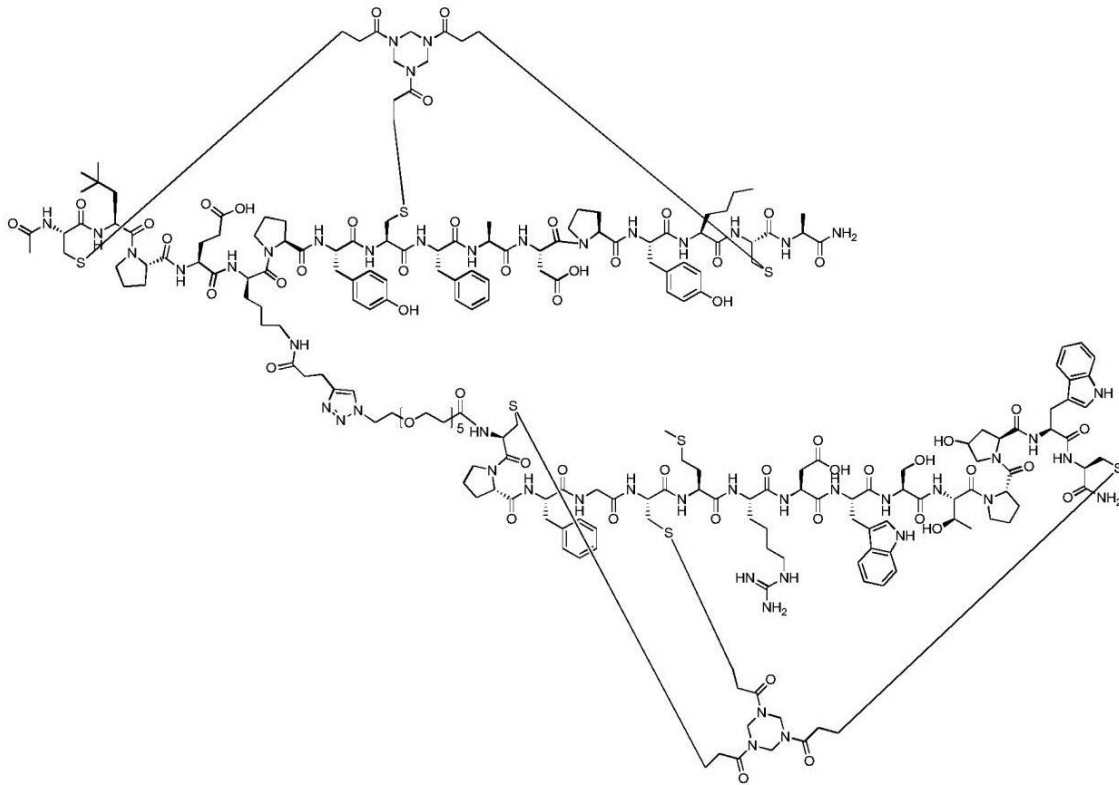
【0446】

30

40

50

【化 1 7 0】

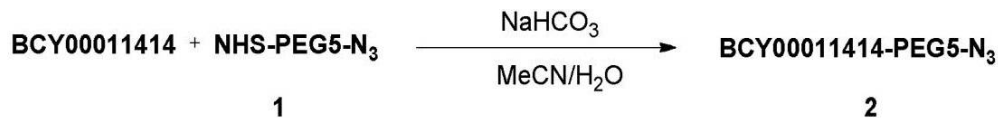


BCY00011858

BCY 1 1 4 1 4 - P E G 5 - N₃ を調製する手順

【 0 4 4 7】

【化 1 7 1】



BCY 1 1 4 1 4 (60.0 mg、29.06 μmol、1.0 当量) および化合物 1 (13.0 mg、30.06 μmol、1.03 当量) を MeCN/H₂O (1:1) 2 mL に溶解した。NaHCO₃ (0.4 M) で pH を 8 に調整し、次いで、混合物を 25 ~ 30 °C で 2 時間攪拌した。LC-MS は、所望の m/z (計算 MW: 2381.72、実測 m/z: 1191.07 ([M/2 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出されることを示した。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、化合物 2 (38.0 mg、15.9 μmol、収率 54.71%、純度 97.35%) を白色固体として得た。

【 0 4 4 8】

BCY 1 1 8 5 8 を調製する手順

【 0 4 4 9】

【化 1 7 2】



2

10

20

30

40

50

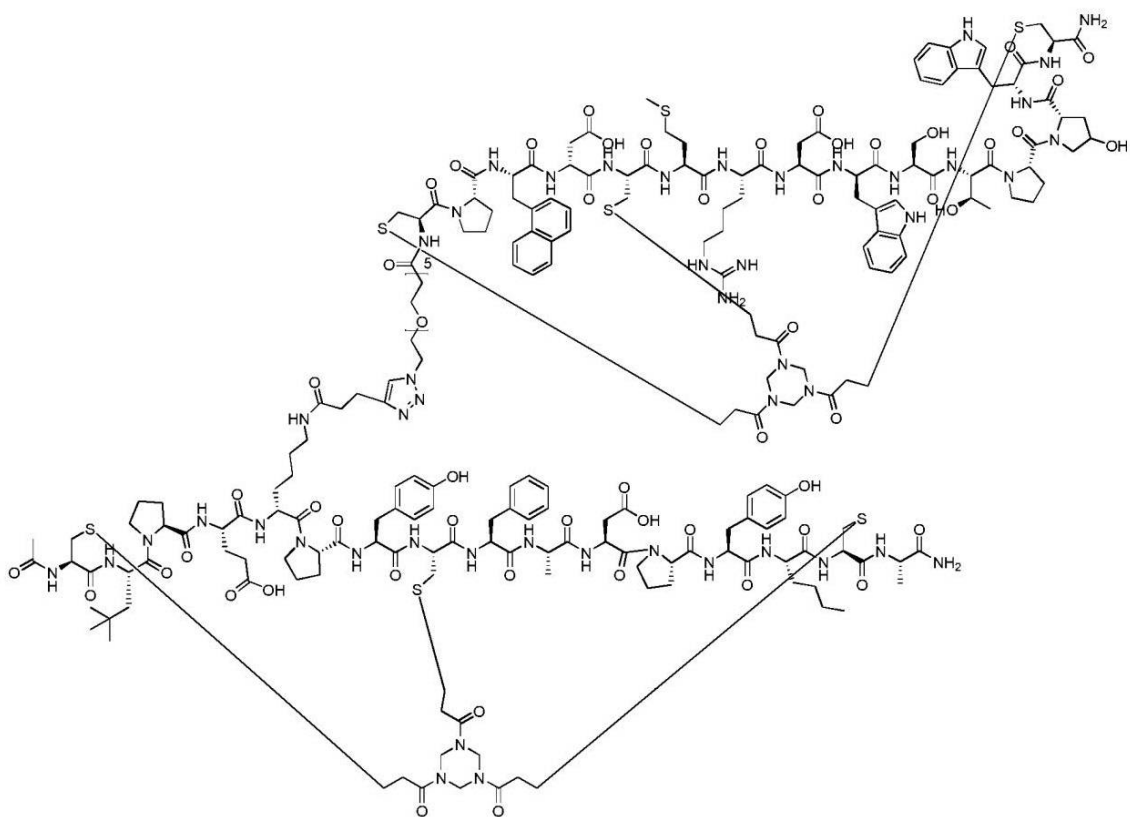
化合物 2 (2 0 . 0 m g 、 8 . 4 0 μ m o l 、 1 . 0 当量) および B C Y 8 9 2 8 (2 2 . 0 m g 、 9 . 9 2 μ m o l 、 1 . 1 当量) を最初に t - B u O H / H ₂ O (1 : 1) 2 m L に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 4 M 、 2 1 . 0 μ L 、 1 . 0 当量) 、 V c N a (4 . 0 m g 、 2 0 . 1 9 μ m o l 、 2 . 4 当量) および T H P T A (4 . 0 m g 、 9 . 2 0 μ m o l 、 1 . 1 当量) を添加した。最後に、0 . 4 M N H ₄ H C O ₃ を添加して、p H を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N ₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N ₂ 雰囲気下、3 0 ° で 1 6 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 2 が完全に消費されていること、および所望の m / z (計算 M W : 4 5 9 9 . 3 0 、実測 m / z : 9 2 0 . 3 8 ([M / 5 + H] ⁺) 、 1 1 5 0 . 7 9 ([M / 4 + H] ⁺) 、 1 5 3 3 . 3 5 ([M / 3 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークを示した。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製し、B C Y 1 1 8 5 8 (1 6 . 9 m g 、 3 . 6 7 μ m o l 、 収率 4 3 . 4 3 % 、純度 9 9 . 2 5 %) を白色固体として得た。

【 0 4 5 0 】

B C Y 1 1 8 5 9

【 0 4 5 1 】

【 化 1 7 3 】

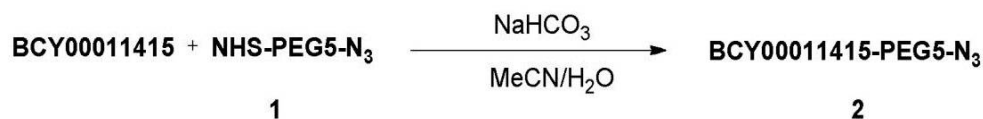


BCY00011859

B C Y 1 1 4 1 5 - P E G 5 - N ₃ を調製する手順

【 0 4 5 2 】

【 化 1 7 4 】



B C Y 1 1 4 1 5 (3 0 . 0 m g 、 1 3 . 8 1 μ m o l 、 1 . 0 当量) および化合物 1 (6 . 0 m g 、 3 0 . 0 6 μ m o l 、 1 . 0 当量) を M e C N / H ₂ O (1 : 1) 2 m L

に溶解した。NaHCO₃ (0.4 M) で pH を 8 に調整し、次いで、混合物を 25 ~ 30 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、所望の m/z (計算 MW: 2489.82、実測 m/z: 1245.18 ([M/2 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出されることを示した。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、化合物 2 (24.0 mg、9.63 μmol、収率 69.7%、純度 99.28%) を白色固体として得た。

【0453】

BCY11859 を調製する手順

【0454】

【化175】

10



2

化合物 2 (20.0 mg、8.03 μmol、1.0 当量) および BCY8928 (21.0 mg、9.47 μmol、1.1 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 2 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、21.0 μL、1.0 当量)、VcNa (4.0 mg、2.5 当量) および THPTA (4.0 mg、1.1 当量) を添加した。最後に、1 M NH₄HCO₃ を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、30 で 16 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていること、および所望の m/z (計算 MW: 4707.40、実測 m/z: 941.7 ([M/5 + H]⁺)、1176.9 ([M/4 + H]⁺)、1569.6 ([M/3 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークを示した。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11859 (19.2 mg、4.01 μmol、収率 49.87%、純度 98.22%) を白色固体として得た。

20

【0455】

[実施例 4]

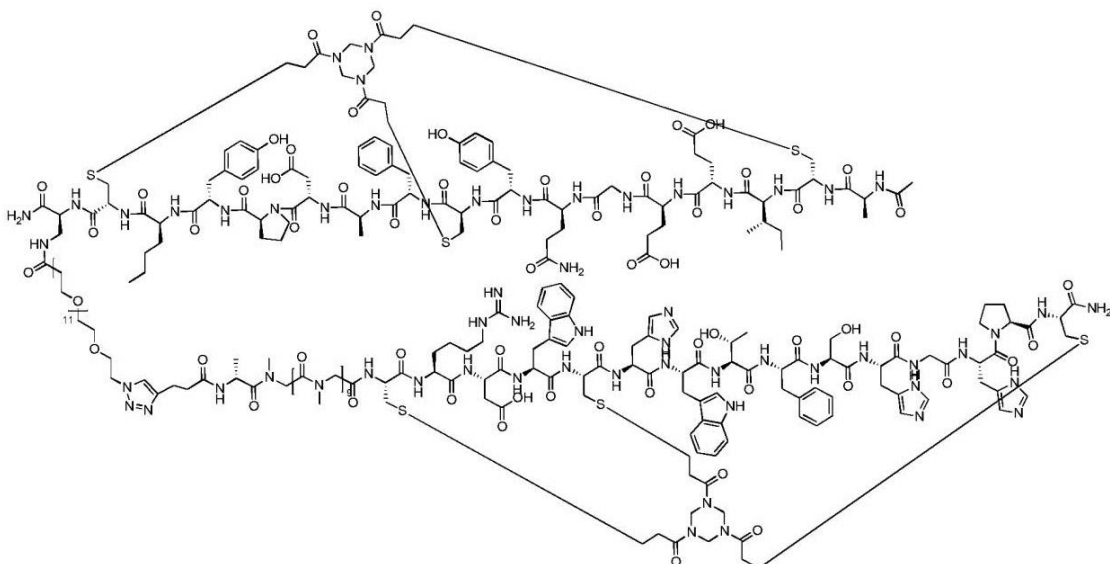
PD-L1 / CD137 結合ヘテロタンデム二環式ペプチドの合成

BCY8939

【0456】

【化176】

30



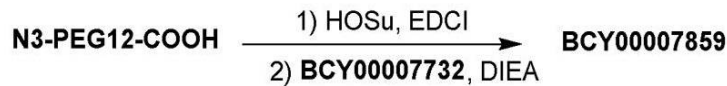
40

50

BCY8939を調製する一般的な手順

【0457】

【化177】



N3-PEG12-COOH (250 mg、388 μmol) および HOSu (67.0 mg、583 μmol) の DMA (4.5 mL) および DCM (1.5 mL) 中溶液に、EDCI (89.3 mg、466 μmol) を添加し、20 で16時間攪拌した。LCMSは、所望の中間体が完全に形成されていることを示した。BCY7732 (854.97 mg、388.37 μmol 、1当量) および DIEA (186 mg、1.44 mmol 、250 μL) を混合物に添加し、20 でさらに5時間、さらに攪拌した。LCMSは、BCY7732が完全に消費されていることを示し、所望の質量を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を分取HPLC (TFA条件) によって精製して、化合物BCY7859 (621 mg、200.58 μmol 、収率51.65%、純度95%、TFA) を白色固体として得た。計算MW: 2817.16、実測m/z: 942.7 [M/3 + H]⁺。

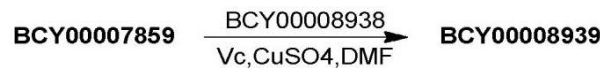
10

【0458】

BCY8939を調製する一般的な手順

【0459】

【化178】



BCY7859 (31.1 mg、11.0 μmol) および BCY8938 (30.0 mg、10.0 μmol) の DMF (2 mL) 中溶液に、(2R)-2-[(1S)-1,2-ジヒドロキシエチル]-3,4-ジヒドロキシル-2H-フラン-5-オン (1 M、100 μL) および CuSO₄ (1 M、30.0 μL) を添加し、窒素雰囲気下、20 で2時間攪拌した。LCMSは、BCY7859が完全に消費されていることを示し、所望の質量を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を分取HPLC (TFA条件) によって精製して、化合物BCY8939 (16.1 mg、2.72 μmol 、収率27.1%、純度98.3%) を白色固体として得た。計算MW: 5823.49、実測m/z: 1165.4 [M/5 + H]⁺、971.0 [M/6 + H]⁺、832.9 [M/7 + H]⁺。

30

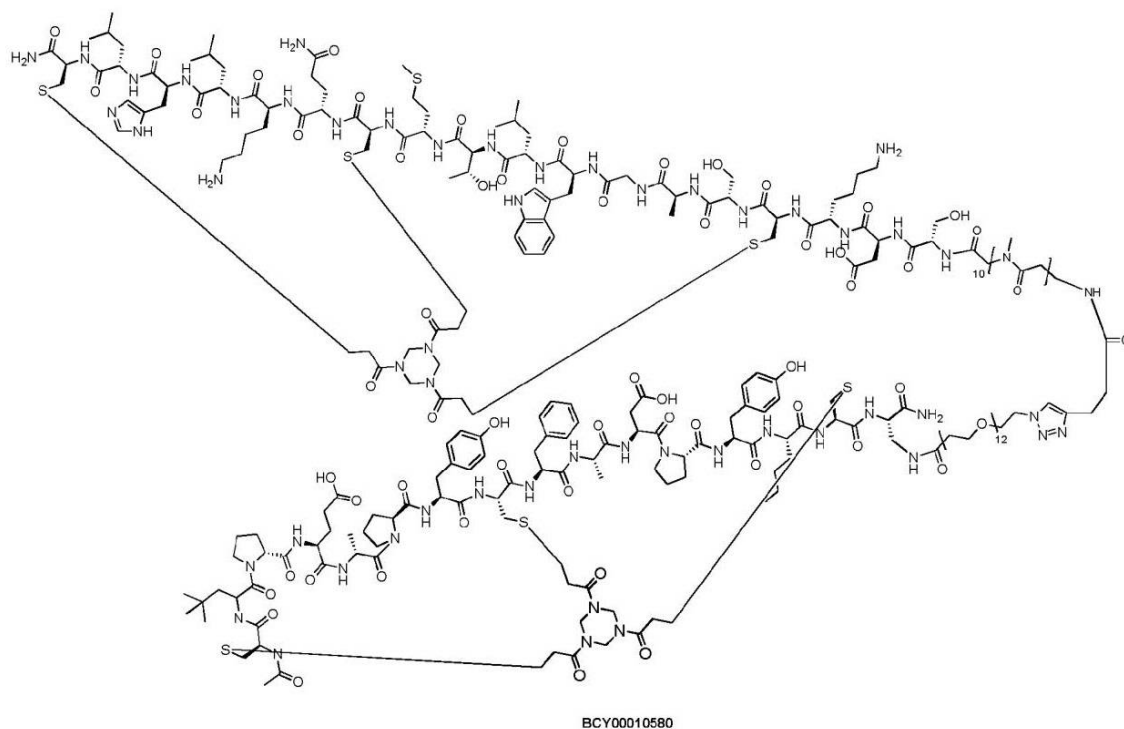
【0460】

BCY10580

【0461】

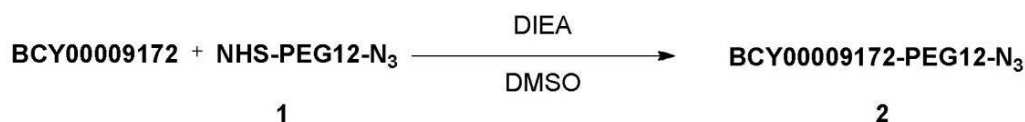
40

【化 1 7 9】

BCY 9 1 7 2 - P E G 1 2 - N₃ を調製する手順

【 0 4 6 2】

【化 1 8 0】



DMSO (2 mL) 中 BCY 9 1 7 2 (100.0 mg、47.72 μmol、1 当量) および化合物 1 (40.0 mg、54.00 μmol、1.13 当量) に、DIEA (9.25 mg、71.58 μmol、12.47 μL、1.5 当量) を添加した。混合物を 30℃ で 12 時間攪拌した。LC-MS は、BCY 9 1 7 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 2721.12、実測 m/z: 1361.07 ([M/2 + H⁺])) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去し、残留物を得た。次いで、残留物を分取 HPLC (中性条件) によって精製した。化合物 2 (48 mg、17.44 μmol、収率 45.68%、純度 98.87%) を白色固体として得た。

【 0 4 6 3】

BCY 1 0 5 8 0 を調製する手順

【 0 4 6 4】

【化 1 8 1】



化合物 2 (20 mg、7.35 μmol、1.0 当量) および BCY 1 0 0 4 3 (23.1 mg、7.35 μmol、1.0 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 2 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、18.4 μL、1.0 当量)、VcNa

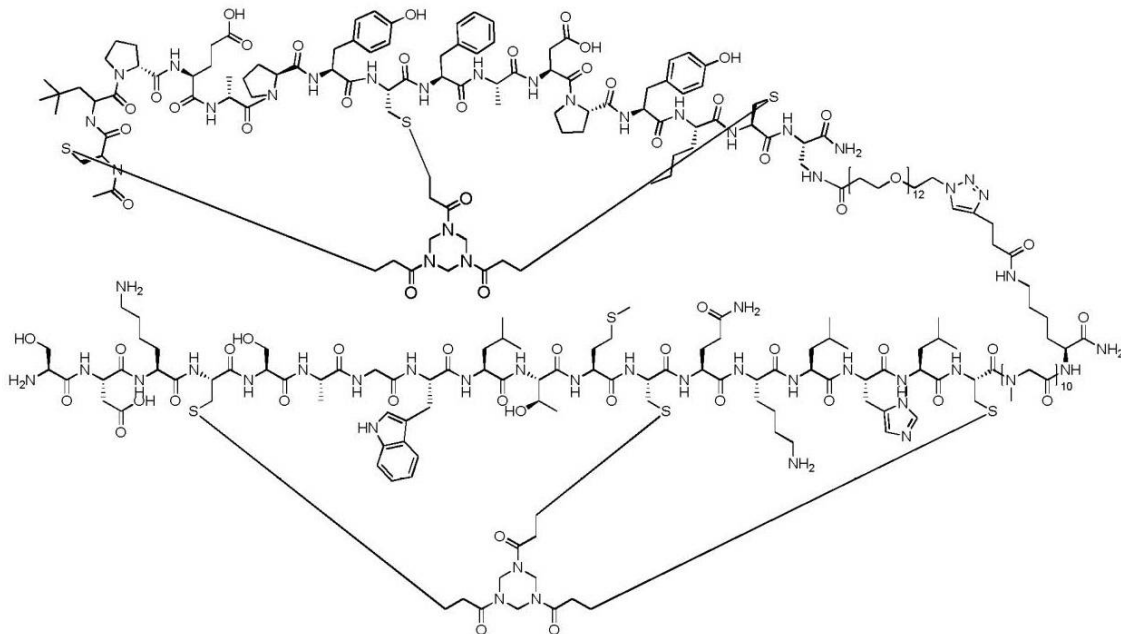
(0.4 M、36.8 μ L、2.0 当量) および THPTA (0.4 M、18.4 μ L、1.0 当量) を添加した。最後に、1 M NH_4HCO_3 を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、 N_2 で 3 回パージした。反応混合物を、 N_2 雰囲気下、30 で 4 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 5855.74 実測 m/z : 976.40 ($[\text{M}/6 + \text{H}]^+$) および 1171.67 ($[\text{M}/5 + \text{H}]^+$) を有する 1 つの主ピークが検出された。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。BCY10580 (29 mg、4.85 μmol 、収率 65.95%、純度 97.879%) を白色固体として得た。

【0465】

BCY10581

【0466】

【化182】

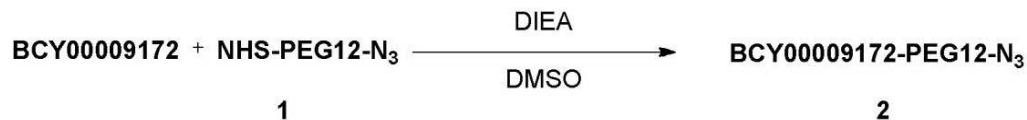


BCY00010581

BCY9172-PEG12-N₃ を調製する手順

【0467】

【化183】



DMSO (2 mL) 中 BCY9172 (100 mg、47.72 μmol 、1 当量) および化合物 1 (40.00 mg、54.00 μmol 、1.13 当量) に、DIEA (9.25 mg、71.58 μmol 、12.47 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 30 で 12 時間攪拌した。LC-MS は、BCY9172 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 2721.12、実測 m/z : 1361.07 ($[(\text{M}/2 + \text{H}^+)]$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去し、残留物を得た。次いで、残留物を分取 HPLC (中性条件) によって精製した。化合物 2 (48 mg、17.44 μmol 、収率 45.68%、純度 98.87%) を白色固体として得た。

【0468】

BCY10581 を調製する手順

10

20

30

40

50

【 0 4 6 9 】

【 化 1 8 4 】



2

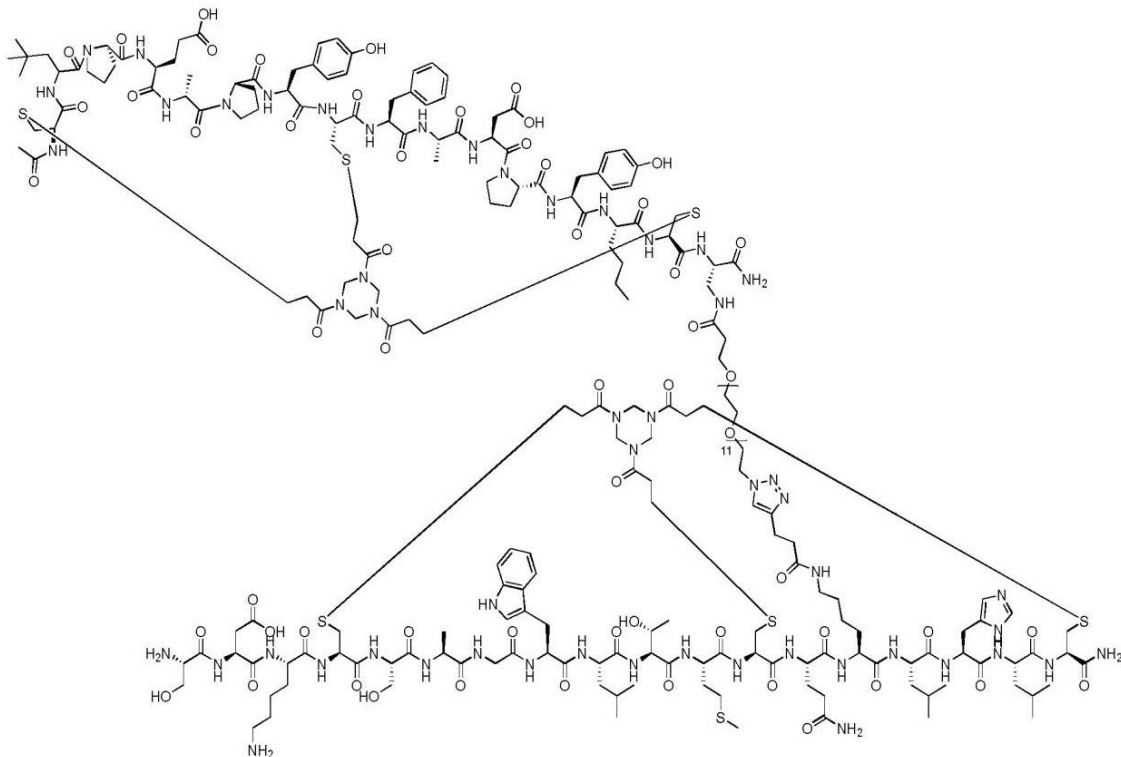
化合物 2 (1 2 m g 、 4 . 4 1 μ m o l 、 1 当量) および B C Y 1 0 0 4 4 (1 4 . 0 8 m g 、 4 . 4 1 μ m o l 、 1 当量) を最初に t - B u O H / H ₂ O (1 : 1) 2 m L に溶解し、次いで、C u S O ₄ (0 . 4 M 、 1 1 . 0 2 μ L 、 1 当量) 、 V c N a (0 . 4 M 、 2 2 . 0 5 μ L 、 2 当量) および T H P T A (0 . 4 M 、 1 0 . 0 4 μ L 、 1 当量) を添加した。最後に、1 M N H ₄ H C O ₃ を添加して、p H を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N ₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N ₂ 雰囲気下、3 0 ° で 4 時間攪拌した。L C - M S は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (M W : 5 9 1 2 . 8 4 、実測 m / z : 9 8 5 . 9 0 ([M / 6 + H] ⁺) および 1 1 8 3 . 2 8 ([M / 5 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。残留物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製した。B C Y 1 0 5 8 1 (9 . 3 m g 、 1 . 4 7 μ m o l 、収率 3 3 . 3 6 % 、純度 9 3 . 5 4 1 %) を白色固体として得た。

【 0 4 7 0 】

B C Y 1 0 5 8 2

【 0 4 7 1 】

【 化 1 8 5 】



化合物 2 を調製する手順

【 0 4 7 2 】

10

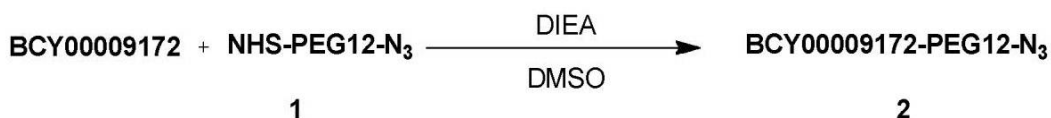
20

30

40

50

【化 1 8 6】



BCY9172 (100.0 mg、47.7 μmol 、1.0 当量)、化合物 1 (40.0 mg、54.0 μmol 、1.13 当量) の DMSO (2 mL) 中溶液に、DIEA (9.2 mg、71.6 μmol 、12.5 μL 、1.5 当量) を添加した。混合物を 30 で 12 時間攪拌した。LC-MS は、BCY9172 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 2721.12、実測 m/z : 1361.07 ($[M/2 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 2 (37 mg、13.60 μmol 、収率 28.49%) を白色固体として得た。

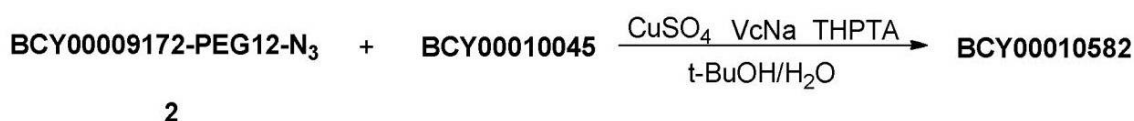
10

【0473】

BCY10582 を調製する手順

【0474】

【化 1 8 7】



化合物 2 (16.0 mg、5.9 μmol 、1.0 当量)、BCY10045 (14.0 mg、6.0 μmol 、1.01 当量) および THPTA (0.4 M、14.7 μL 、1.0 当量) の混合物を t-BuOH/H₂O (1:1、2 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、14.7 μL 、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、29.4 μL 、2.0 当量) を N₂ 下で添加した。0.2 M NH₄HCO₃ (1:1 t-BuOH/H₂O 中) を滴加することによって、この溶液の pH を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、25 ~ 30 で 12 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [計算 MW: 5073.89、実測 m/z : 1015.24 ($[M/5 + H]^+$) および 1268.97 ($[M/4 + H]^+$)] を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって直接精製した。BCY10582 (10 mg、1.92 μmol 、収率 32.58%、純度 97.21%) を白色固体として得た。

30

【0475】

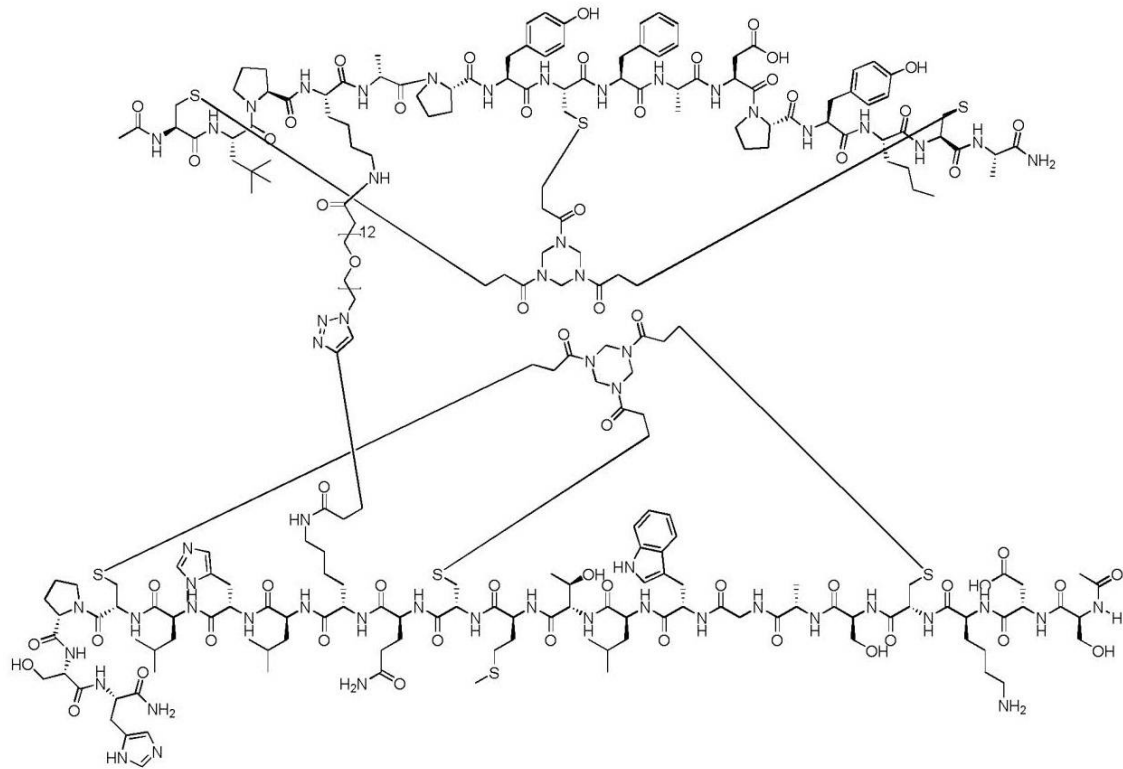
BCY11017

【0476】

40

50

【化 1 8 8】

**BCY00011017**

BCY11017を調製する手順

【0477】

【化 1 8 9】



2

化合物 2 (BCY10567) を調製する手順に記載されるように調製され得る ; 7.0 mg、2.59 μmol 、1.0 当量) および BCY10861 (7.03 mg、2.59 μmol 、1.0 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 2 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、13.0 μL 、2.0 当量)、VcNa (1.0 mg、5.03 μmol 、2.0 当量) および THPTA (1.1 mg、2.53 μmol 、1.0 当量) を添加した。最後に、1 M NH₄HCO₃ を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、35

で 16 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていること、および所望の m/z (計算 MW: 5421.30、実測 m/z: 1084.7 ([M/5 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークを示した。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11017 (6.6 mg、1.17 μmol 、収率 45.24%、純度 96.16%) を白色固体として得た。

【0478】

BCY11018

【0479】

10

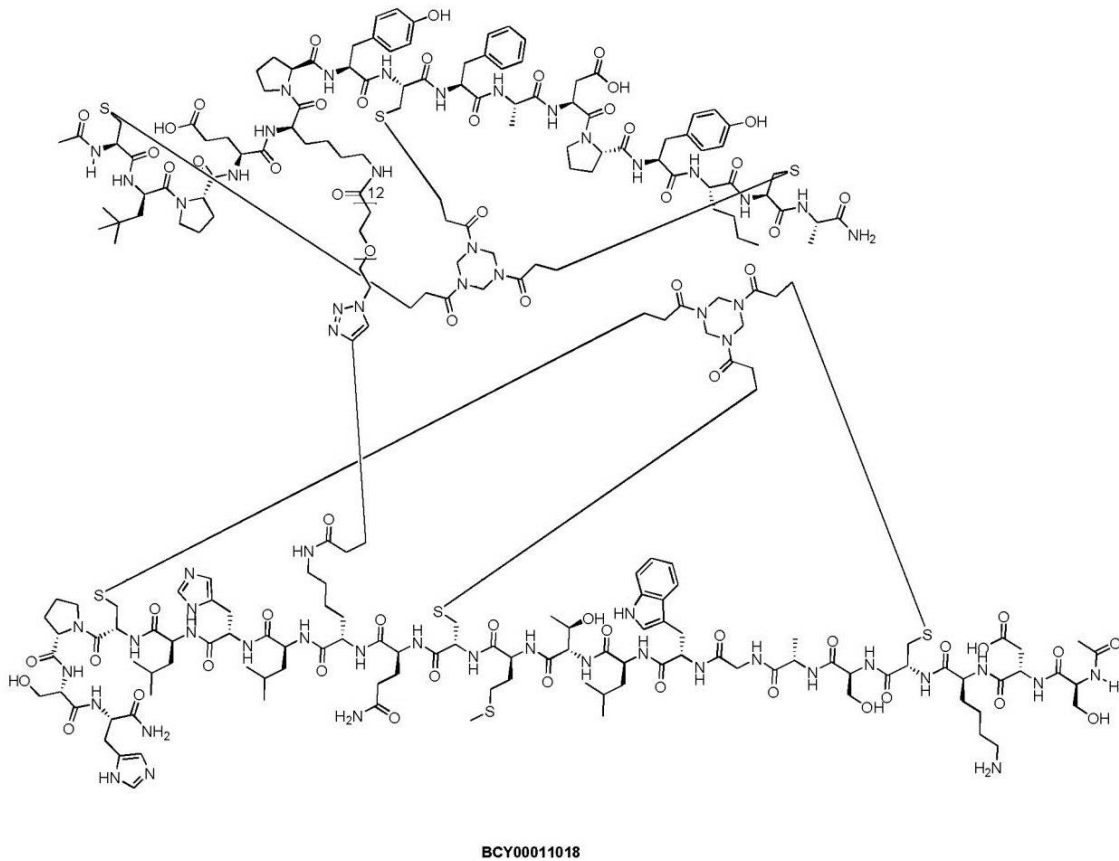
20

30

40

50

【化 1 9 0】



BCY11018を調製する手順

【0480】

【化 1 9 1】



2

化合物 2 (BCY10570) を調製する手順に記載されるように調製され得る ; 6.0 mg、2.17 μmol 、1.0 当量) および BCY10861 (5.9 mg、2.17 μmol 、1.0 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 2 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、11.0 μL 、2.0 当量)、VcNa (1.0 mg、2.3 当量) および THPTA (1.1 mg、1.0 当量) を添加した。最後に、1 M NH₄HCO₃ を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、35 °C で 16 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていること、および所望の m/z (計算 MW : 5479.34、実測 m/z : 1096.40 ([M/5 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークを示した。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11018 (2.3 mg、0.40 μmol 、収率 18.31%、純度 94.73%) を白色固体として得た。

【0481】

BCY11019

【0482】

10

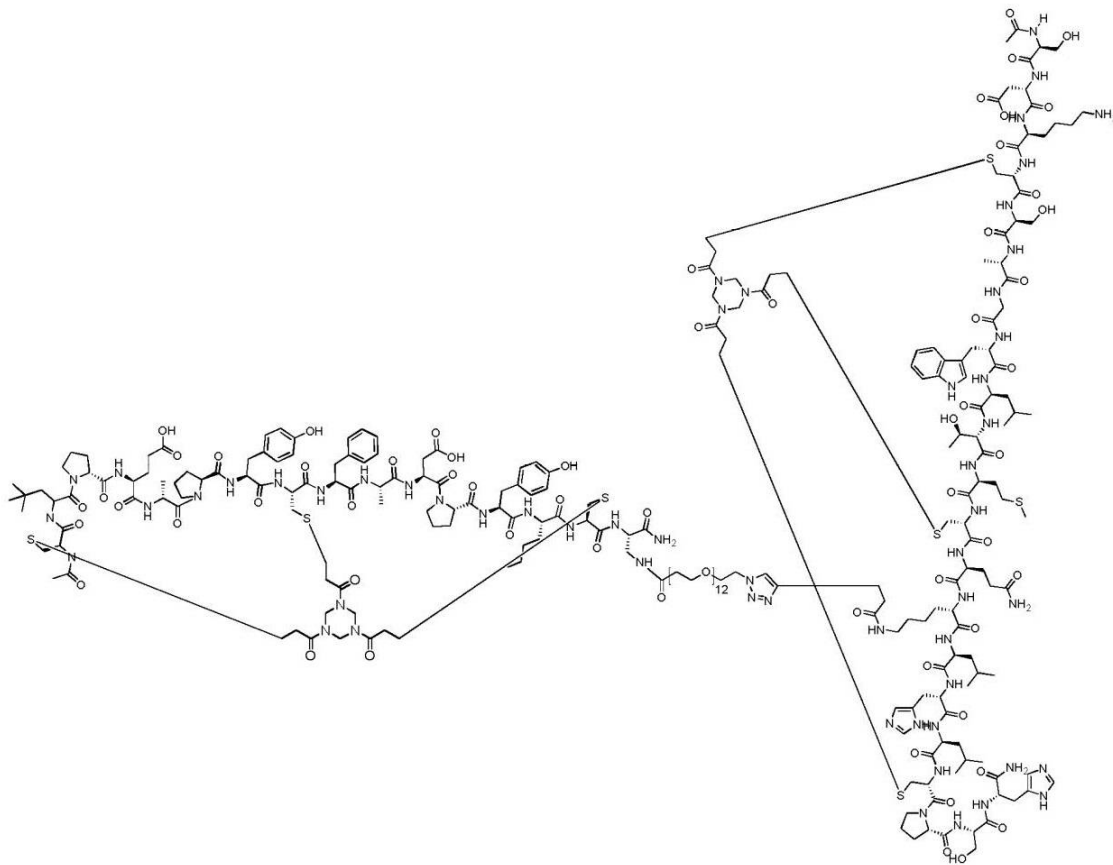
20

30

40

50

【化 1 9 2】



BCY00011019

BCY11019を調製する手順

【0483】

【化 1 9 3】



2

化合物 2 (BCY10581を調製する手順に記載されるように調製され得る; 8.0 mg、2.94 μmol 、1.0 当量) および BCY10861 (8.0 mg、2.95 μmol 、1.0 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 2 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、14.7 μL 、2.0 当量)、VcNa (1.2 mg、6.05 μmol 、2.0 当量) および THPTA (1.3 mg、2.99 μmol 、1.0 当量) を添加した。最後に、1 M NH₄HCO₃ を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、35 で 16 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていること、および所望の m/z (計算 MW: 5437.26、実測 m/z: 1088.09 ([M/5 + H]⁺) および 1360.19 ([M/4 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークを示した。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11019 (7.6 mg、1.36 μmol 、収率 46.09%、純度 96.95%) を白色固体として得た。

【0484】

BCY11376

10

20

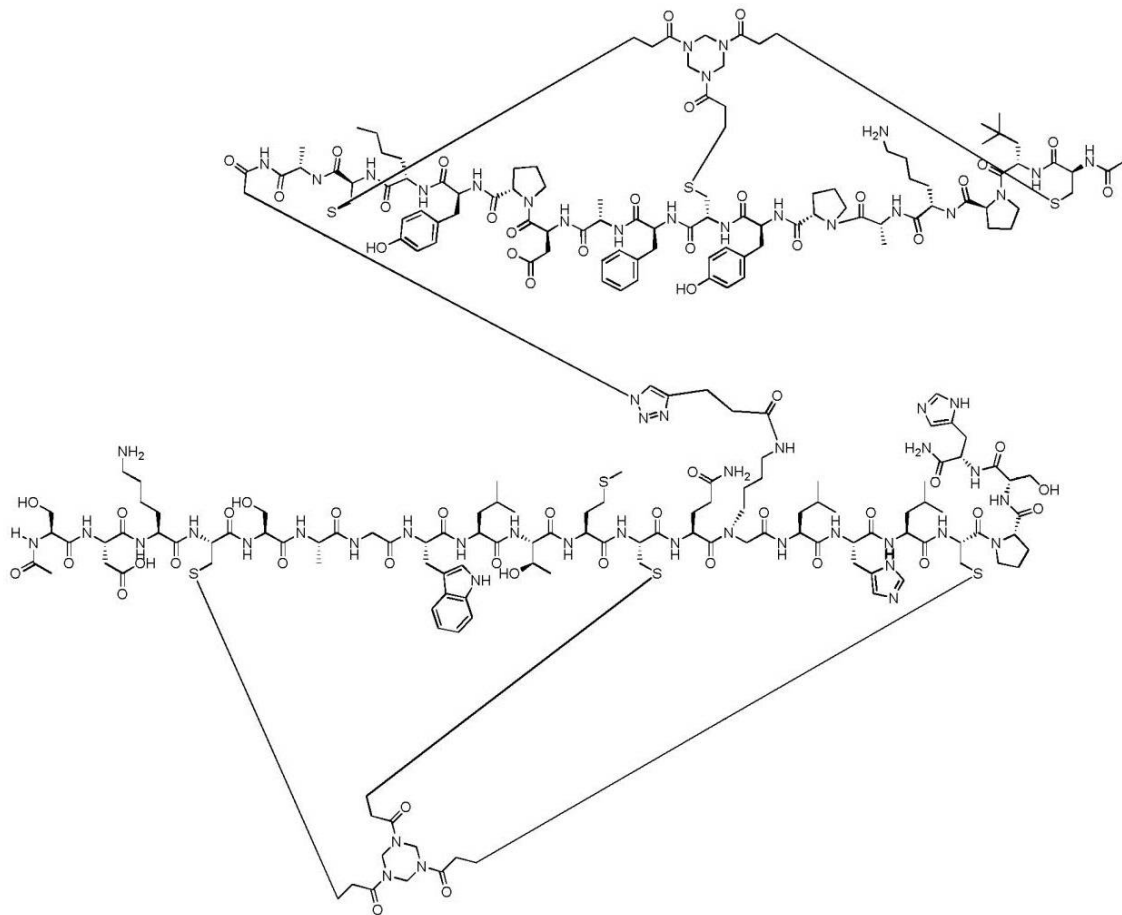
30

40

50

【 0 4 8 5 】

【 化 1 9 4 】

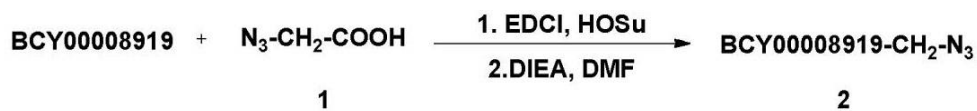


BCY00011376

化合物 2 を調製する手順

【 0 4 8 6 】

【 化 1 9 5 】



化合物 1 (5 . 0 m g 、 4 9 . 5 μmol 、 1 . 0 当量) の DMF (1 m L) 中溶液に、EDCI (8 . 5 m g 、 5 4 . 8 μmol 、 1 . 1 当量) および HOSu (5 . 7 m g 、 4 9 . 5 μmol 、 1 . 0 当量) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3 0 $^{\circ}\text{C}$ で 3 0 分間攪拌した。TLC は、化合物 1 が完全に消費されており、1 つの新たなスポットが形成されたことを示した。次いで、この混合物 0 . 2 m L に BCY 8 9 1 9 (2 0 . 0 m g 、 9 . 6 2 μmol) および DIEA (1 . 7 μL 、 9 . 6 2 μmol) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3 0 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間攪拌した。LC - MS は、BCY 8 9 1 9 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW : 2 1 6 2 . 5 1 、実測 m/z : 1 0 8 1 . 8 ([M / 2 + H] $^{+}$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。次いで、反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去し、残留物を得て、引き続いて分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 2 (1 2 m g 、 5 . 5 5 μmol 、収率 5 6 . 2 8 % 、純度 9 7 . 5 4 %) を白色固体として得た。

【 0 4 8 7 】

BCY 1 1 3 7 6 を調製する手順

【 0 4 8 8 】

10

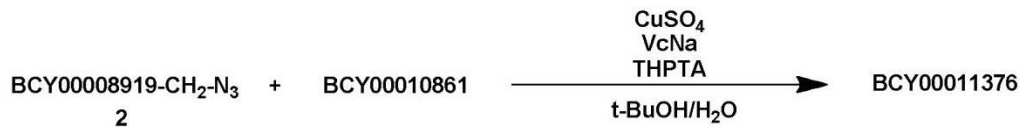
20

30

40

50

【化 1 9 6】



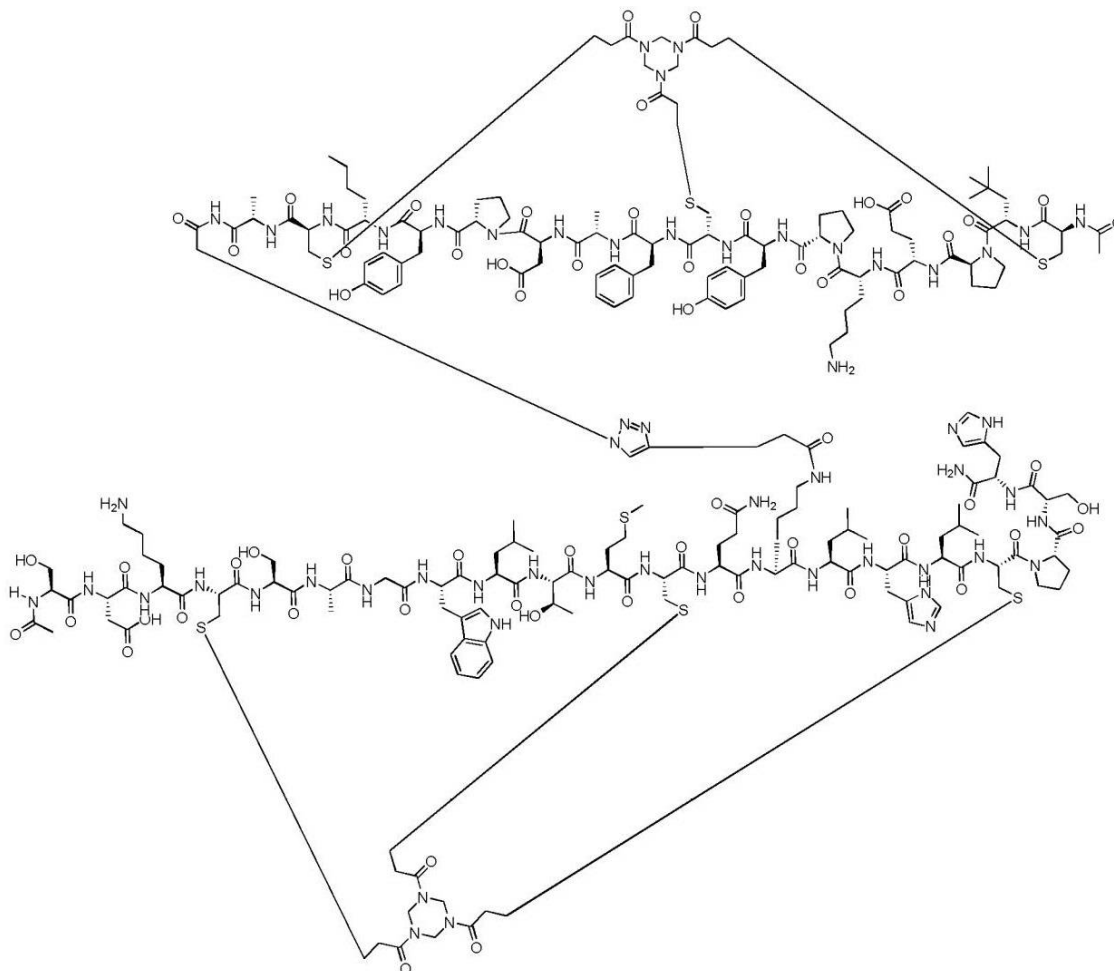
化合物 2 (3 mg、1.39 μmol 、1.0 当量)、BCY10861 (3.8 mg、1.40 μmol 、1.0 当量) および THPTA (1.2 mg、2.76 μmol 、2.0 当量) の混合物を t-BuOH/H₂O (1:1、1 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、3.5 μL 、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、3.5 μL 、1.0 当量) を N₂ 下で添加した。0.2 M NH₄HCO₃ (1:1 t-BuOH/H₂O 中) を滴加することによって、この溶液の pH を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、40 °C で 2 時間攪拌した。LC-MS は、BCY10861 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 4878.64、実測 m/z: 1220.8 ([M/4 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11376 (1.9 mg、1.0 μmol 、収率 27.01%、純度 96.2%) を白色固体として得た。

【0 4 8 9】

BCY11377

【0 4 9 0】

【化 1 9 7】

**BCY00011377**

化合物 2 を調製する手順

【 0 4 9 1 】

【 化 1 9 8 】



化合物 1 (5 . 0 m g 、 4 9 . 5 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M F (1 m L) 中溶液に、 E D C I (8 . 5 m g 、 5 4 . 8 μ m o l 、 1 . 1 当量) および H O S u (5 . 7 m g 、 4 9 . 5 μ m o l 、 1 . 0 当量) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3 0 で 3 0 分間攪拌した。 T L C は、化合物 1 が完全に消費されており、 1 つの新たなスポットが形成されたことを示した。次いで、この混合物 0 . 2 m L に B C Y 8 9 2 0 (2 0 . 0 m g 、 9 . 3 6 μ m o l) および D I E A (1 . 2 m g 、 9 . 3 6 μ m o l) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3 0 で 2 時間攪拌した。 L C - M S は、 B C Y 8 9 2 0 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (計算 M W : 2 2 2 0 . 5 4 、実測 m / z : 1 1 1 0 . 9 0 ([M / 2 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。次いで、反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去し、残留物を得て、引き続いて分取 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 2 (1 2 m g 、 5 . 1 5 μ m o l 、収率 5 6 . 2 8 % 、純度 9 5 . 3 %) を白色固体として得た。

10

【 0 4 9 2 】

B C Y 1 1 3 7 7 を調製する手順

20

【 0 4 9 3 】

【 化 1 9 9 】



化合物 2 (3 m g 、 1 . 3 5 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 B C Y 1 0 8 6 1 (3 . 8 m g 、 1 . 3 5 μ m o l 、 1 . 0 当量) および T H P T A (0 . 6 m g 、 1 . 0 当量) の混合物を t - B u O H / H ₂ O (1 : 1 、 1 m L 、予め脱気し、 N ₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、 C u S O ₄ (0 . 4 M 、 3 . 4 μ L 、 1 当量) および V c N a (0 . 4 M 、 3 . 4 μ L 、 1 当量) を N ₂ 下で添加した。 0 . 2 M N H ₄ H C O ₃ (1 : 1 t - B u O H / H ₂ O 中) を滴加することによって、この溶液の p H を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、 N ₂ 雰囲気下、 4 0 で 2 時間攪拌した。 L C - M S は、所望の m / z (計算 M W : 4 9 3 6 . 6 8 、実測 m / z : 1 2 3 4 . 9 ([M / 4 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出されることを示した。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製し、 B C Y 1 1 3 7 7 (3 . 5 m g 、 0 . 6 6 μ m o l 、収率 4 8 . 8 6 % 、純度 9 3 . 1 %) を白色固体として得た。

30

【 0 4 9 4 】

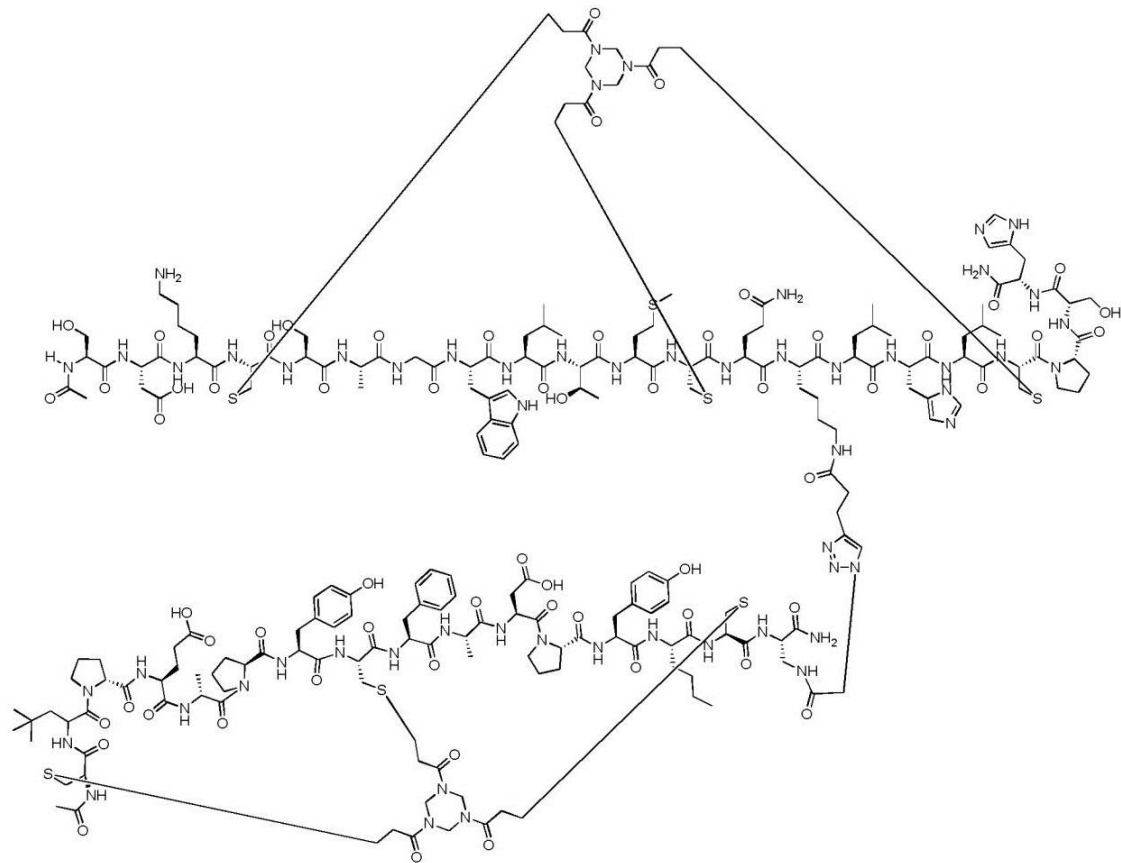
40

B C Y 1 1 3 7 8

【 0 4 9 5 】

50

【化 2 0 0】

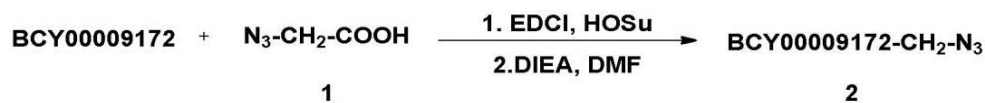


BCY00011378

化合物 2 を調製する手順

【 0 4 9 6】

【化 2 0 1】



化合物 1 (5.0 mg、49.5 μmol 、1.0 当量) の DMF (1 mL) 中溶液に、EDCI (8.5 mg、54.8 μmol 、1.1 当量) および HOSu (5.7 mg、49.5 μmol 、1.0 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 °C で 30 分間攪拌した。TLC は、化合物 1 が完全に消費されており、1 つの新たなスポットが形成されたことを示した。次いで、この混合物 0.2 mL を BCY9172 (20.0 mg、9.54 μmol) および DIEA (1.7 μL 、9.62 μmol) に添加した。混合物を 25 ~ 30 °C で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 1 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 2176.49、実測 m/z : 1090.0 ($[M/2 + H]^+$)) を有する 1 つの主ピークが検出された。次いで、反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去し、残留物を得て、引き続いて分取 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 2 (20.2 mg、7.48 μmol 、収率 78.34%、純度 80.57%) を白色固体として得た。

【 0 4 9 7】

BCY11378 を調製する手順

【 0 4 9 8】

10

20

30

40

50

【化 2 0 2】



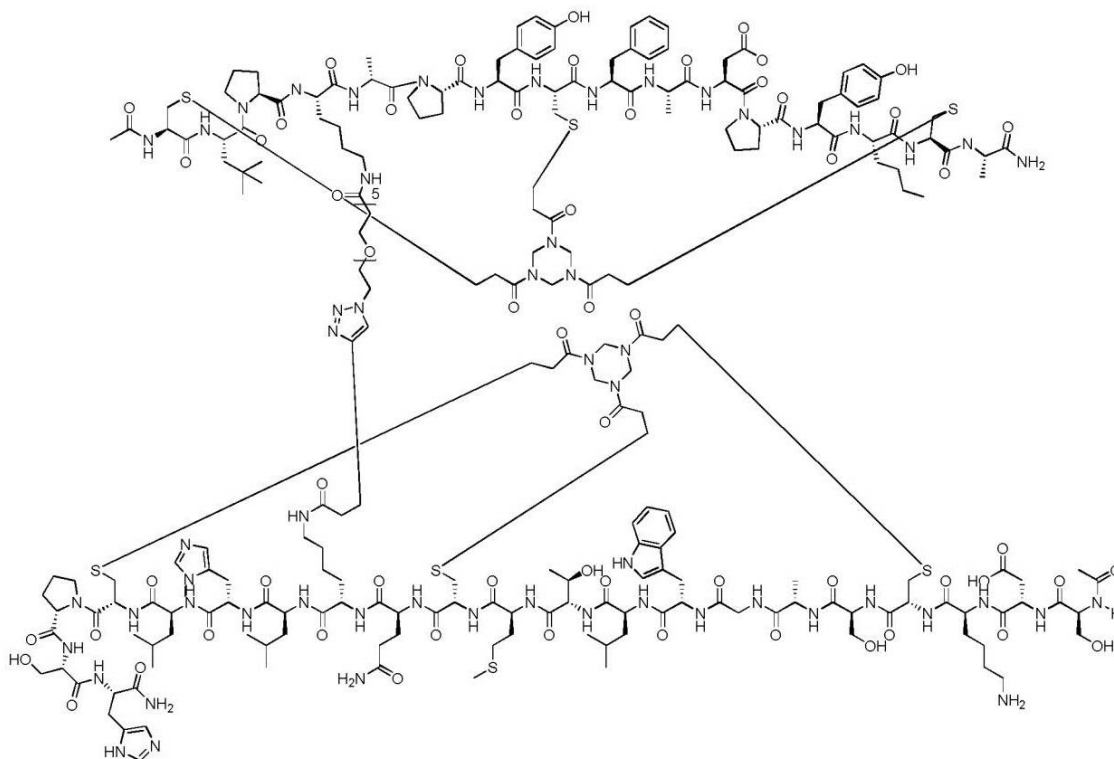
化合物 2 (5 mg、2.30 μmol 、1.0 当量)、BCY10861 (6.24 mg、2.30 μmol 、1.0 当量) および THPTA (1.0 mg、1.0 当量) の混合物を t-BuOH/H₂O (1:1、1 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回パージした) に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、5.8 μL 、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、5.8 μL 、1.0 当量) を N₂ 下で添加した。0.2 M NH₄HCO₃ (1:1 t-BuOH/H₂O 中) を滴加することによって、この溶液の pH を 8 に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、40℃ で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 4894.61、実測 m/z: 1224.3 ([M/4 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11378 (1.2 mg、0.34 μmol 、収率 10.07%、純度 94.3%) を白色固体として得た。

【0499】

BCY11379

【0500】

【化 2 0 3】



BCY00011379

BCY8919-PEG5-N₃ を調製する手順

【0501】

10

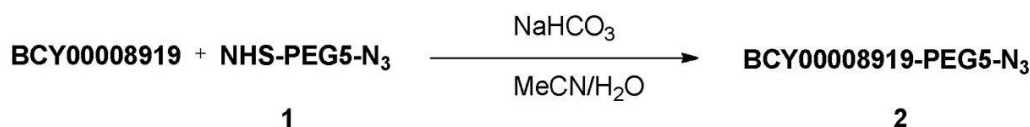
20

30

40

50

【化 2 0 4】



BCY8919 (30.0 mg、14.43 μmol 、1.0 当量) および化合物 1 (6.3 mg、14.57 μmol 、1.01 当量) を、MeCN (1 mL) と H₂O (1 mL) の混合物に溶解した。溶液に 1 M NaHCO₃ を添加して、pH を 8 に調整し、次いで、混合物を 35 ° で 2 時間攪拌した。LC-MS は、BCY8919 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 2396.79、実測 m/z: 1198.74 ([M/2 + H]⁺) および 799.50 ([M/4 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、化合物 2 (20 mg、8.07 μmol 、収率 55.92%、純度 96.68%) を白色固体として得た。

10

【0502】

BCY11379 を調製する手順

【0503】

【化 2 0 5】



20

化合物 2 (3.0 mg、1.25 μmol 、1.0 当量) および BCY10861 (3.4 mg、1.25 μmol 、1.0 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 2 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、7 μL 、2.24 当量)、VcNa (1 mg、5.04 μmol 、4.03 当量) および THPTA (1 mg、2.30 μmol 、1.84 当量) を添加した。最後に、1 M NH₄HCO₃ を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、25 ~ 30 ° で 16 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 が完全に消費されていること、および所望の m/z (計算 MW: 5112.93、実測 m/z: 1022.96 ([M/5 + H]⁺) および 1278.74 ([M/4 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークを示した。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11379 (3.4 mg、0.615 μmol 、収率 52.00%、純度 97.88%) を白色固体として得た。

30

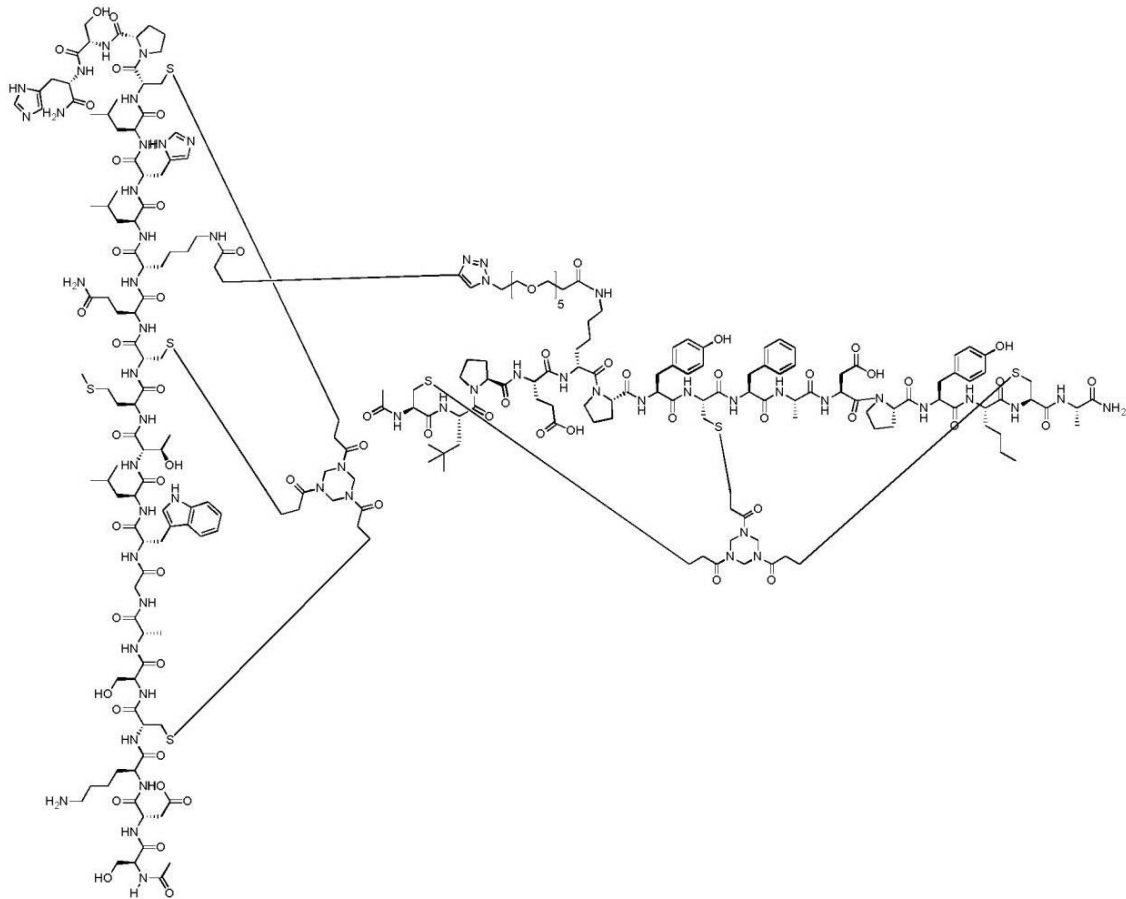
【0504】

BCY11380

【0505】

40

【化 2 0 6】

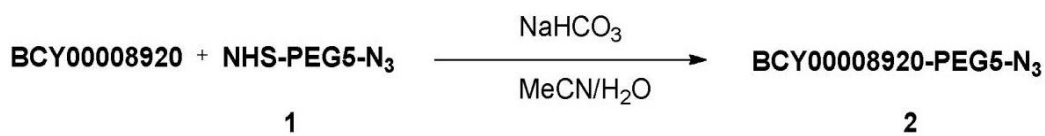


BCY00011380
分子量:4994.77

BCY8920 - PEG5 - N₃ を調製する手順

【 0 5 0 6】

【化 2 0 7】



BCY8920 (30.0 mg、14.04 μmol、1.0 当量) および化合物 1 (6.1 mg、14.11 μmol、1.01 当量) を、MeCN (1 mL) と H₂O (1 mL) の混合物に溶解した。溶液に 1 M NaHCO₃ を添加して、pH を 8 に調整し、次いで、混合物を 35 °C で 2 時間攪拌した。LC-MS は、BCY8920 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 2454.83、実測 m/z: 1227.63 ([M/2 + H]⁺) および 818.66 ([M/3 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、化合物 2 (20 mg、8.03 μmol、収率 57.21%、純度 98.56%) を白色固体として得た。

【 0 5 0 7】

BCY11380 を調製する手順

【 0 5 0 8】

10

20

30

40

50

【化 2 0 8】



2

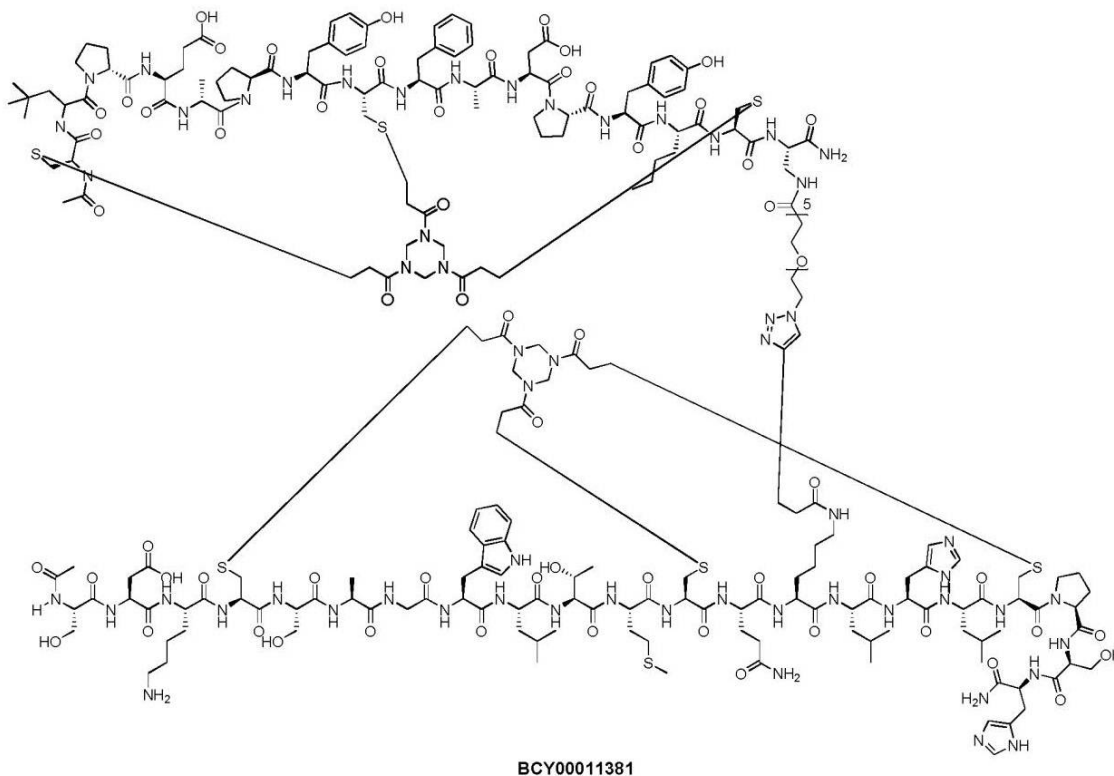
化合物 2 (3.5 mg、1.43 μmol 、1.0 当量) および BCY10861 (3.9 mg、1.44 μmol 、1.0 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 2 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、8 μL 、2.24 当量)、VcNa (1 mg、5.04 μmol 、3.52 当量) および THPTA (1 mg、2.30 μmol 、1.61 当量) を添加した。最後に、1 M NH₄HCO₃ を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、25 ~ 30 °C で 16 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 2 の大部分が消費されていること、および所望の m/z (計算 MW: 5170.97、実測 m/z: 1034.28 ([M/5 + H]⁺) および 1293.10 ([M/4 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークを示した。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11380 (1.6 mg、0.296 μmol 、収率 20.77%、純度 96.77%) を白色固体として得た。

【0509】

BCY11381

【0510】

【化 2 0 9】

BCY8920-PEG5-N₃ を調製する手順

【0511】

10

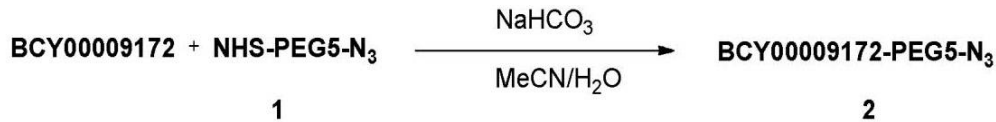
20

30

40

50

【化 2 1 0】



BCY9172 (30.0 mg、14.32 μmol 、1.0 当量) および化合物 1 (6.2 mg、14.34 μmol 、1.0 当量) を、MeCN (1 mL) と H₂O (1 mL) の混合物に溶解した。溶液に 1 M NaHCO₃ を添加して、pH を 8 に調整し、次いで、混合物を 35 で 2 時間攪拌した。LC-MS は、BCY9172 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW: 2412.75、実測 m/z: 1206.72 ([M/2 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、化合物 2 (15 mg、6.14 μmol 、収率 42.87%、純度 98.75%) を白色固体として得た。

10

【0512】

BCY11381 を調製する手順

【0513】

【化 2 1 1】



20

化合物 2 (3.0 mg、1.24 μmol 、1.0 当量) および BCY10861 (3.4 mg、1.25 μmol 、1.01 当量) を最初に t-BuOH/H₂O (1:1) 2 mL に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、7 μL 、2.25 当量)、VcNa (1 mg、5.04 μmol 、4.06 当量) および THPTA (1 mg、2.30 μmol 、1.85 当量) を添加した。最後に、1 M NH₄HCO₃ を添加して、pH を 8 に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂ で 3 回パージした。反応混合物を、N₂ 雰囲気下、25 ~ 30 で 16 時間攪拌した。LC-MS は、所望の m/z (計算 MW: 5128.89、実測 m/z: 1026.05 ([M/5 + H]⁺) および 1282.50 ([M/4 + H]⁺)) を有する 1 つのピークを示した。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、BCY11381 (1.6 mg、0.295 μmol 、収率 23.73%、純度 94.59%) を白色固体として得た。

30

【0514】

[実施例 5]

CD137 モノクローナル抗体アゴニストの作製

本明細書に提示される実験で CD137 他量体と比較するために使用した CD137 モノクローナル抗体アゴニストの配列は、米国特許第 7 288 638 号に開示された。IgG4 アイソタイプ抗体を、DNA 発現構築物の一過的トランスフェクション後に ExpiCHO Expression System (Thermo Fisher Scientific) を使用して発現させた。抗体をプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、リン酸緩衝溶液 (PBS) pH 7.2 中で製剤化した。HPLC-SEC (カラム GF-250、Agilent) を使用した純度分析は、CD137 モノクローナル抗体の単量体割合がおよそ 95% であることを示した。結合活性分析は、1 $\mu\text{g/ml}$ 超の濃度を有する CD137 モノクローナル抗体が、CD137 を発現する CHO 細胞に結合することができることを示した。Toxin Sensor (商標) Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (Genscript) を使用したエンドトキシン分析は、CD137 モノクローナル抗体調製物が、7 EU/mg 未満のエンドトキシンを含有していることを示した。

40

50

【0515】

生物学的データ

1. CD137 Biacore実験説明

Biacore実験を実施して、ヒトCD137タンパク質に結合するヘテロタンデムペプチドの k_a ($M^{-1}s^{-1}$)、 k_d (s^{-1})、 K_D (nM) 値を決定した。組換えヒトCD137 (R&D systems) をPBSに再懸濁し、製造業者の提案されるプロトコルによって、EZ-Link (商標) スルホ-NHS-LC-LC-ビオチン試薬 (Thermo Fisher) を使用してビオチン化した。タンパク質を脱塩して、スピンカラムを使用してカップリングしていないビオチンをPBSに除去した。

【0516】

ペプチド結合を分析するために、Biacore T200またはBiacore 3000機器をXantec CMD500Dチップと共に使用した。ストレプトアビジンを、泳動緩衝液としてHBS-N (10mM HEPES、0.15M NaCl、pH 7.4) を用いて、25で標準的なアミンカップリング化学を使用して、チップに固定した。手短に言えば、カルボキシメチルデキストラン表面を、10 μ l / 分の流速で、1:1比の0.4M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) / 0.1M N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を7分注入することによって活性化した。ストレプトアビジンを捕捉するために、タンパク質を10mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5) 中0.2mg/mlに希釈し、120 μ lを注入することによって活性化チップ表面上に捕捉させた。残留活性化基を、1Mエタノールアミン (pH 8.5) を7分間注入してブロッキングし、ビオチン化CD137を270~1500RUのレベルまで捕捉した。緩衝液をPBS / 0.05% Tween 20に変更し、ペプチドの希釈系列を、最終DMSO濃度0.5%で、この緩衝液中で調製した。上位ペプチド濃度は500nMであり、6回さらに2倍または3倍希釈した。SPR分析を、60秒結合および900秒解離で、90 μ l / 分の流速で、25で行った。各サイクル後に、再生ステップ (10mMグリシンpH 2 10 μ l) を使用した。必要に応じて、DMSOを除いた体積効果についてデータを補正した。全てのデータを、標準的な処理手順を使用して、ブランク注入および参照表面について二重参照し、Scrubberソフトウェア、バージョン2.0c (BioLogic Software) を使用して、データプロセッシングおよびキネティックフィッティングを実施した。該当する場合、物質移動効果を可能にする単純な1:1結合モデルを使用して、データをフィッティングした。

【0517】

一定のヘテロタンデムペプチドをこのアッセイで試験し、結果を以下の表1に示す。

【0518】

10

20

30

40

50

【表 4】

表1:ヘテロタンデムペプチドを用いたCD137 Biacoreアッセイデータ

複合体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

【0519】

2. ネクチン - 4 Biacore 実験説明

Biacore 実験を実施して、ヒトネクチン - 4 タンパク質 (Charles River から入手) に結合するヘテロタンデムペプチドの k_a ($M^{-1}s^{-1}$)、 k_d (s^{-1})、 K_D (nM) 値を決定した。gp67 シグナル配列および C 末端 FLAG タグを有するヒトネクチン - 4 (残基 Gly32 - Ser349; NCBI 参照配列: NP_112178.2) を、pFastbac-1 にクローニングし、標準的な Bac-to-Bac (商標) プロトコル (Life Technologies) を使用してバキュロウイルスを作製した。27 で Excell-420 培地 (Sigma) 中 1×10^6 個 ml^{-1} の Sf21 細胞を、P1 ウイルスストックで、MOI 2 で感染させ、上清を 72 時

間で収穫した。上清を、PBSで洗浄した抗FLAG M2アフィニティーアガロース樹脂 (Sigma) で、4 で1時間バッチ結合し、その後、樹脂をカラムに移し、PBSで広範囲に洗浄した。タンパク質を100 µg / ml FLAGペプチドで溶出した。溶出したタンパク質を2 mlに濃縮し、1 ml / 分で、PBS中S200 Superdexカラム (GE Healthcare) 上にロードした。2 ml画分を回収し、ネクチン - 4タンパク質を含有する画分を16 mg / mlに濃縮した。

タンパク質を、製造業者の提案されるプロトコルによって、EZ-Link (商標) スルホ-NHS-LC-LC-ビオチン試薬 (Thermo Fisher) を使用してPBS中でランダムにビオチン化した。タンパク質を広範囲に脱塩して、スピンカラムを使用してカップリングしていないビオチンをPBSに除去した。

10

ペプチド結合を分析するために、Biacore 3000機器をCM5チップ (GE Healthcare) と共に使用した。ストレプトアビジンを、泳動緩衝液としてHBS-N (10 mM HEPES、0.15 M NaCl、pH 7.4) を用いて、25 で標準的なアミンカップリング化学を使用して、チップに固定した。手短に言えば、カルボキシメチルデキストラン表面を、10 µl / 分の流速で、1 : 1比の0.4 M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) / 0.1 M N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を7分注入することによって活性化した。ストレプトアビジンを捕捉するために、タンパク質を10 mM酢酸ナトリウム (pH 4.5) 中0.2 mg / mlに希釈し、ストレプトアビジン120 µlを注入することによって活性化チップ表面上に捕捉させた。残留活性化基を、1 Mエタノールアミン (pH 8.5) を7分間注入してブロッキングし、ビオチン化ネクチン - 4を1200 ~ 1800 RUのレベルまで捕捉した。緩衝液をPBS / 0.05 % Tween 20に変更し、ペプチドの希釈系列を、最終DMSO濃度0.5 %で、この緩衝液中で調製した。上位ペプチド濃度は100 nMであり、6回さらに2倍希釈した。SPR分析を、個々のペプチドに応じて、60秒結合および400 ~ 1200秒解離で、50 µl / 分の流速で、25で行った。DMSOを除いた体積効果についてデータを補正した。全てのデータを、標準的な処理手順を使用して、ブランク注入および参照表面について二重参照し、Scrubberソフトウェア、バージョン2.0c (Biologic Software) を使用して、データプロセッシングおよびキネティックフィッティングを実施した。該当する場合、物質移動効果を可能にする単純な1 : 1結合モデルを使用して、データをフィッティング

20

30

【0520】

本発明の一定のヘテロタンデムペプチドを上記のネクチン - 4結合アッセイで試験し、結果を以下の表2に示す。

【0521】

40

50

【表 5】

表2:ヘテロタンデムペプチドを用いたネクチン-4 Biacoreアッセイデータ

複合体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

10

【0522】

20

3. EphA2 Biacore実験説明

Biacore実験を実施して、ヒトEphA2タンパク質に結合するヘテロタンデムペプチドの k_a ($M^{-1}s^{-1}$)、 k_d (s^{-1})、 K_D (nM) 値を決定した。

EphA2を、タンパク質に対して3倍モル過剰のビオチンを用いて、4mM酢酸ナトリウム、100mM NaCl、pH5.4中で、1時間、EZ-Link(商標)スルホ-NHS-LC-ビオチンを使用してビオチン化した。反応混合物のPBSへの透析後、Fluorescence Biotin Quantification Kit (Thermo)を使用して、標識化の程度を決定した。ペプチド結合を分析するために、Biacore T200機器を、Xantec CMD500Dチップと共に使用した。ストレプトアビジンを、泳動緩衝液としてHBS-N(10mM HEPES、0.15M NaCl、pH7.4)を用いて、25で標準的なアミンカップリング化学を使用して、チップに固定した。手短に言えば、カルボキシメチルデキストラン表面を、10 μ l/分の流速で、1:1比の0.4M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)/0.1M N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を7分注入することによって活性化した。ストレプトアビジンを捕捉するために、タンパク質を10mM酢酸ナトリウム(pH4.5)中0.2mg/mlに希釈し、120 μ lを注入することによって活性化チップ表面上に捕捉させた。残留活性化基を、1Mエタノールアミン(pH8.5):HBS-N(1:1)を7分間注入してブロッキングした。緩衝液をPBS/0.05% Tween 20に変更し、緩衝液中0.2 μ Mまでのタンパク質の希釈を使用して、ビオチン化EphA2を500~1500RUのレベルまで捕捉した。ペプチドの希釈系列を、最終DMSO濃度0.5%で、この緩衝液中で調製し、上位ペプチド濃度は50または100nMであり、6回さらに2倍希釈した。SPR分析を、60秒結合および900~1200秒解離で、90 μ l/分の流速で、25で行った。DMSOを除いた体積効果についてデータを補正した。全てのデータを、標準的な処理手順を使用して、ブランク注入および参照表面について二重参照し、Scrubberソフトウェア、バージョン2.0c(BioLogic Software)を使用して、データプロセッシングおよびキネティックフィッティングを実施した。該当する場合、物質移動効果を可能にする単純な1:1結合モデルを使用して、データをフィッティングした。

30

40

【0523】

50

本発明の一定のヘテロタンデムペプチドをE p h A 2 結合アッセイで試験し、結果を以下の表 3 に示す。

【 0 5 2 4 】

【表 6 】

表3:ヘテロタンデムペプチドを用いたEphA2 Biacoreアッセイデータ

複合体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

【 0 5 2 5 】

4 . 腫瘍細胞とのC D 1 3 7 レポーターアッセイ共培養

1 % F B S を R P M I - 1 6 4 0 (P r o m e g a キット C S 1 9 6 0 0 5 の成分) に添加することによって、R 1 培地と呼ばれる培養培地を調製する。R 1 中の試験物の系列希釈を滅菌 9 6 ウェルプレートで調製する。白色細胞培養プレートの指定されたウェルに対して、1 ウェル当たり 2 5 μ l の試験物または R 1 (バックグラウンド対照として) を使用する。腫瘍細胞* を収穫し、R 1 培地に 4 0 0 0 0 0 個細胞 / m L の濃度で再懸濁する。2 5 (2 5) μ L / ウェルの腫瘍細胞を白色細胞培養プレートで使用する。J u r k a t 細胞 (P r o m e g a キット C S 1 9 6 0 0 5 、 0 . 5 m L) を水浴中で解凍し、次いで、5 m l 予熱 R 1 培地に添加する。2 5 (2 5) μ L / ウェルの J u r k a t 細胞を白色細胞培養プレートで使用する。細胞および試験物を 3 7 $^{\circ}$ C 、 5 % C O ₂ で 6 時間インキュベートする。6 時間の終わりに、7 5 μ l / ウェルの B i o - G l o (商標) (P r o m e g a) を添加し、1 0 分間インキュベートした後、プレートリーダー (C l a r i o s t a r 、 B M G) で発光を読み取る。細胞 (J u r k a t 細胞 + 共培養で使

【 0 5 2 6 】

共培養に使用した腫瘍細胞型は、以下の表 4 に示されるように、ヘテロタンデムに特異的な腫瘍標的に依存する。

【 0 5 2 7 】

10

20

30

40

50

【表 7】

表4:各腫瘍標的に使用した細胞株

腫瘍標的	共培養に使用した細胞株
EphA2	A549, SC-OV-3, PC3, LNCaP
ネクチン-4	HT1376, NCI-H292
PD-L1	RKO

【0528】

10

EphA2 - CD137ヘテロタンデムBCY7985が、EphA2発現HT1080細胞の存在下、Promega CD137ルシフェラーゼレポーターアッセイでCD137細胞活性の強力な誘導を示したことを示すデータが図3に示される。HT1080細胞の非存在下では、ヘテロタンデムによるCD137誘導はない。

【0529】

EphA2 / CD137ヘテロタンデムがCD137レポーターアッセイで強力なCD137活性化を誘導し、活性化の誘導倍率が、共培養に使用した細胞株（A549およびSC-OV-3：EphA2高およびLNCaP：EphA2低）上の腫瘍標的発現レベルに依存することを示すデータが図4に示される。

【0530】

20

ネクチン - 4 / CD137ヘテロタンデムがCD137レポーターアッセイで強力なCD137活性化を誘導し、活性化の誘導倍率が、共培養に使用した細胞株（HT1376：ネクチン - 4高およびNCI - H292：ネクチン - 4中）上の腫瘍標的発現レベルに依存することを示すデータが図6に示される。

【0531】

PD - L1 / CD137ヘテロタンデムが、PD - L1発現細胞株の存在下、CD137レポーターアッセイでCD137の強力な活性化を誘導することを示すデータが図9に示される。様々な細胞株との共培養においてCD137レポーターアッセイでヘテロタンデムペプチドによって誘導されるEC50（nM）および誘導倍率の概要を以下の表5に報告する。

30

【0532】

【表 8 - 1】

表5:CD137レポーターアッセイでヘテロタンデムペプチドによって誘導される誘導倍率

複合体ID	腫瘍標的	共培養に使用した細胞株	EC50 (nM)	バックグラウンドに対する誘導倍率
BCY9173	EphA2	SC-OV-3	0.94	21
BCY7985	EphA2	SC-OV-3	4.0	15
BCY8942	EphA2	PC3	-	100nMで誘導倍率2未満
BCY8943	EphA2	PC3	-	100nMで誘導倍率2未満
BCY9647	EphA2	SC-OV-3	7.2	24

40

50

【表 8 - 2】

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	ネクチン-4	H1376	1.2	30
BCY9350	ネクチン-4	H1376	-	100nMで誘導倍率 2未満
BCY9351	ネクチン-4	H1376	-	100nMで誘導倍率 2未満
BCY9399	ネクチン-4	H1376	11	13
BCY9400	ネクチン-4	H1376	2.9	13
BCY9401	ネクチン-4	H1376	18	70
BCY9407	ネクチン-4	H1376	3.4	29
BCY9408	ネクチン-4	H1376	1.1	20
BCY9409	ネクチン-4	H1376	1.2	24
BCY9410	ネクチン-4	H1376	1.3	24
BCY9411	ネクチン-4	H1376	14	41
BCY9759	ネクチン-4	H1376	2.7	15
BCY10000	ネクチン-4	H1376	0.58	61
BCY10567	ネクチン-4	H1376	1.7	45
BCY10569	ネクチン-4	H1376	1.2	52
BCY10571	ネクチン-4	H1376	3.5	60
BCY10572	ネクチン-4	H1376	0.44	55
BCY10573	ネクチン-4	H1376	0.90	55
BCY10578	ネクチン-4	H1376	0.42	58
BCY10917	ネクチン-4	H1376	0.27	54

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

BCY11020	ネクチン-4	H1376	0.26	47
BCY11373	ネクチン-4	H1376	0.16	74
BCY11374	ネクチン-4	H1376	0.091	72
BCY11375	ネクチン-4	H1376	0.23	72
BCY8939	マウスPD-L1	MC38	-	100nMで誘導倍率 2未満
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

10

20

【 0 5 3 3 】

5 . 初代ヒトT細胞 - A 5 4 9 共培養（腫瘍細胞殺傷）

3 人の健康なドナーから P B M C を単離し、2 つの濃度で、抗 C D 3 刺激の存在下、2 つの規定比で、N u c l i g h t R e d 標識腫瘍標的細胞（ヒト肺癌細胞 A 5 4 9（登録商標）、A T C C C L L - 1 8 5（商標））に添加した。腫瘍細胞：P B M C 共培養物を 3 つの濃度で、リード二環と共にインキュベートした。直接的な腫瘍細胞への細胞傷害性を検出するために、全ての試験条件を、刺激された P B M C の非存在下で、腫瘍細胞に蒔いた。経時的に生存 N u c e l i g h t r e d 陽性腫瘍細胞を計数することによって、腫瘍殺傷を評価した。さらに、カスパーゼ 3 / 7 色素を使用して、アポトーシス性腫瘍細胞を特定した。リアルタイム生細胞蛍光イメージングを可能にする I n c u C y t e S 3 機械を使用して、培養物を分析した。共培養物を 7 2 時間画像化した。各条件を 3 連で確立した。

30

【 0 5 3 4 】

E p h A 2 / C D 1 3 7 ヘテロタンデムが、初代ヒトT細胞およびがん細胞共培養アッセイで腫瘍細胞への細胞殺傷を誘導することを実証するデータが図 5 に示される。抗 C D 1 3 7 m A b アゴニストを対照として使用する。

40

【 0 5 3 5 】

6 . ヒト P B M C - 4 T 1 共培養（サイトカイン放出）アッセイ

マウス乳腺腫瘍細胞株 4 T 1 - 1（4 T 1 - 親）およびマウスネクチン - 4 過剰発現 4 T 1（4 T 1 - D 0 2）を、1 0 % 熱失活ウシ胎児血清、1 0 0 I . U / m l ペニシリンおよび 1 0 0 I . U / ストレプトマイシン、2 0 m M H E P E S、1 x 非必須アミノ酸および 2 m M L - グルタミンを補充した R P M I 1 6 4 0（R P M I 作業培地）で培養した。健康なヒトドナー由来の凍結 P B M C を解凍し、室温 P B S 中で 1 回洗浄し、次いで、R P M I 作業培地に再懸濁した。腫瘍細胞および P B M C 共培養物について、1 0 0 0 0 個 P B M C および 2 0 0 0 個腫瘍細胞（5 : 1）を混合し、3 8 4 ウェルプレートの

50

各ウェルに蒔いた。ヒトPBM Cを刺激するために、125 ng / mlの可溶性抗CD3 mAb (クローンOKT3)を0日目に培養物に添加した。試験化合物、対照化合物またはビヒクル対照をそれぞれのウェルに添加し、1ウェル当たりの最終体積を100 μlにした。プレートを5%CO₂で、37℃細胞培養インキュベーターで最大3日間インキュベートした。上清を刺激48時間後に回収し、HTRFアッセイを使用して、ヒトIL-2およびIFN-γを検出した。ExcelまたはPrismソフトウェアを使用して生データを分析して、標準曲線を作成して、タンパク質濃度を内挿した。データは、2連で、実験で試験した3人の異なるドナーのPBM Cを使用した1つの試験を表す。

【0536】

図7に示されるデータは、ネクチン-4/CD137ヘテロタンデムがPBM C-4T1共培養アッセイで堅牢なIL-2およびIFN-γサイトカイン分泌を誘導することを実証している。BCY9350およびBCY9351は、それぞれネクチン-4およびCD137についての非結合対照である。

【0537】

ヒトPBM C-4T1共培養(サイトカイン放出)アッセイで選択されたネクチン-4/CD137ヘテロタンデムペプチドによって誘導されるEC50(nM)および最大IFN-γサイトカイン分泌(pg/ml)の概要を以下の表6に報告する。

【0538】

【表9】

表6:ヒトPBM C-4T1共培養(サイトカイン放出)アッセイで選択されたネクチン-4/CD137ヘテロタンデムペプチドによって誘導されるEC50および最大IFN-γサイトカイン分泌

複合体ID	細胞株	EC50 (nM)	最大IFN-γ(pg/ml)
BCY8854	4T1-D02 (ネクチン4+)	0.89	15962
BCY9350	4T1-D02 (ネクチン4+)	-	活性なし~最大1μM
BCY9351	4T1-D02 (ネクチン4+)	-	活性なし~最大1μM
BCY10000	4T1-D02 (ネクチン4+)	0.21	19642
BCY10571	4T1-D02 (ネクチン4+)	0.44	18349
BCY10572	4T1-D02 (ネクチン4+)	0.25	17915

【0539】

7. エキソソーム培養プロトコル

Discovery Life Sciences (DLS)製の初代患者由来腫瘍細胞を、Benzonaseを新たに添加した10 mL予熱洗浄培地中で穏やかに解凍する。Greiner製の3Dスフェロイドキット(カタログ番号655840)を使用して、培養中の細胞を2日間維持する。手短に言えば、腫瘍細胞を、血球計数器を使用してトリパンプルーで計数する。細胞を1500 rpmで5分間遠心分離して洗浄し、ペレットを、1×10⁶個細胞当たり100 μLのN3Dナノシャトルに再懸濁する。これらを磁性にするために、細胞を1500 rpmで5分間遠心沈殿し、再懸濁する；このプロセスを合計4回繰り返す。最後の遠心後、細胞を適量の新鮮な肺DTC培地(DLS)に再懸濁

して、 $100\mu\text{L}$ / ウェルで1ウェル当たり $50000 \sim 100000$ 個の細胞を得る。Greiner製のセルリペレント (cell-repellent) 96ウェルプレート (カタログ番号655976) をこの実験に使用する。目に見える細胞塊または細胞片が存在する場合、試料を蒔く前に $70 \sim 100\mu\text{m}$ フィルターに適用する。1試料当たり少なくとも 50000 個の細胞を0日目のフローサイトメトリーパネルのために取っておき、これらの細胞を染色し、固定し、後のフロー分析のために4で保管する。対照 / 試験化合物希釈物を、肺DTC培地中2倍で別々のプレートに調製し、 $100\mu\text{L}$ / ウェルのこれらの $2 \times$ 薬物溶液をプレートマップによって記載されるようにウェルに添加する。次いで、アッセイプレートを、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の加湿チャンバー中、96ウェル磁気スフェロイドドライブに置く。24時間で、磁気スフェロイドドライブを除去する。48時間で、培地をサイトカイン分析のために回収し、細胞を2日目のフローサイトメトリーパネルのために回収する。Luminexリーダーで、R&D systems製のカスタムビルドサイトカイン / ケモカインパネル (IP-10、グランザイムB、IFN- γ 、IL-2、IL-6、TNF- α 、IL-8、MIP-1a、MIP-1b、MCP-1、IL-10、MIG) を使用して、サイトカインを定量化する。フローパネル：0日目 = 生 / 死、CD45、EpCAM、ネクチン4、CD3、CD4、CD8、CD137；2日目 = 生 / 死、CD45、EpCAM、ネクチン4、CD3、CD8、Ki67、および計数ビーズ。フローデータをFlowjoソフトウェアで分析する。

【0540】

図8に示されるデータは、ネクチン-4 / CD137ヘテロタンデムが、初代患者由来肺腫瘍のエキソビド培養物中で標的依存性サイトカイン放出を誘導することを実証している。BCY10572の処理によって、患者由来試料において、いくつかの免疫マーカー (ビヒクルに対して正規化) および $\text{CD}8^+ \text{Ki}67^+ \text{T}$ 細胞%のネクチン-4依存性変化が誘導された。

【0541】

8. SDラットにおけるCD137二重特異性の薬物動態

雄SDラットに、 25mM ヒスチジンHCl、 10% スクロース pH7に製剤化された $2\text{mg} / \text{kg}$ の各二環多量体を投与した。各時点で、顎下または伏在静脈を介して、連続出血 (約 $80\mu\text{L}$ 血液 / 時点) を実施した。全ての血液試料を直ちに抗凝固剤として $2\mu\text{L}$ K_2EDTA (0.5M) を含有する予冷マイクロ遠心チューブに移し、湿潤氷上に置いた。血液試料を、およそ4、 3000g での遠心分離によって、血漿のために直ちに処理した。内部標準を含む沈殿剤を直ちに血漿に添加し、十分混合し、 12000rpm 、4で10分間遠心分離した。上清を予め標識したポリプロピレンマイクロ遠心チューブに移し、次いで、ドライアイス上で急速凍結した。試料を分析まで必要に応じて 70°C 以下で保管した。上清試料 $7.5\mu\text{L}$ を、正イオンモードでOrbitrap Q Exactiveを使用して、LC-MS / MS分析のために直接注入して、二環多量体の濃度を決定した。Phoenix WinNonlin 6.3ソフトウェアプログラムを使用して、非コンパートメントアプローチによって時間に対する血漿濃度データを分析した。 C_0 、 C_1 、Vdss、 $\text{T}_{1/2}$ 、 $\text{AUC}(0 - \text{last})$ 、 $\text{AUC}(0 - \text{inf})$ 、 $\text{MRT}(0 - \text{last})$ 、 $\text{MRT}(0 - \text{inf})$ および時間に対する血漿濃度プロファイルのグラフを報告した。

【0542】

図10は、SDラット ($n = 3$) における $2\text{mg} / \text{kg}$ IV投与からのBCY10572およびBCY10000の時間に対する血漿濃度の曲線を示す。実験からの薬物動態パラメータは、表7に示される通りである。

【0543】

10

20

30

40

【表 1 0】

表7:BCY10572およびBCY10000の時間に対する血漿濃度曲線の薬物動態パラメータ

化合物	T1/2 (時間)	Clp (ml/分/kg)	Vdss (L/kg)
BCY10000	0.357	16.1	0.395
BCY10572	0.926	15.6	0.882

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

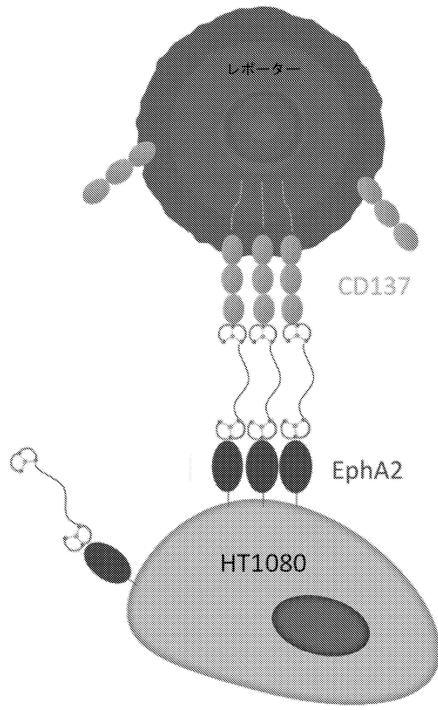


FIGURE 1

【図 2】

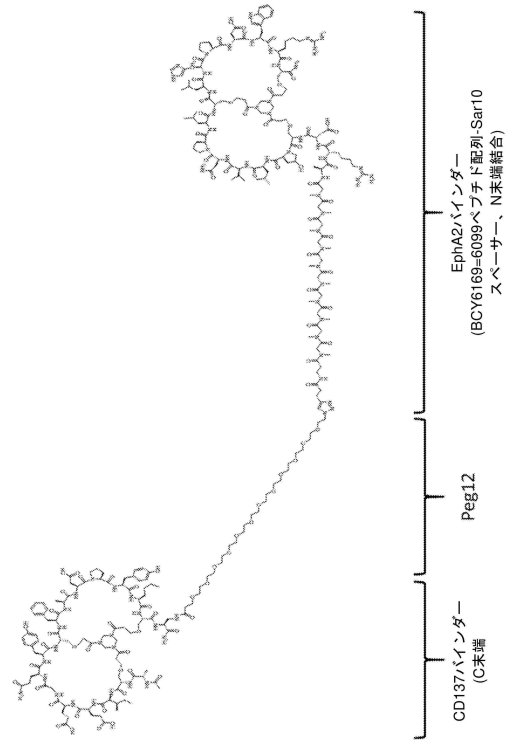


FIGURE 2

10

20

30

40

50

【図 3】

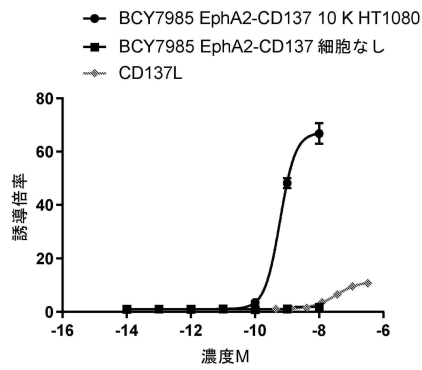


FIGURE 3

【図 4】

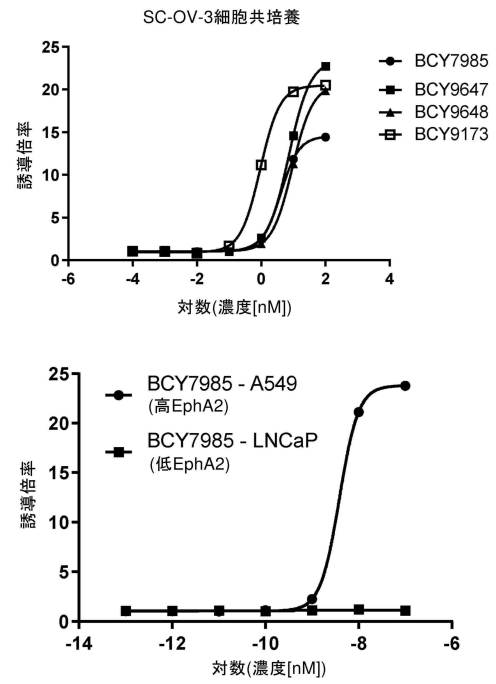


FIGURE 4

【図 5】

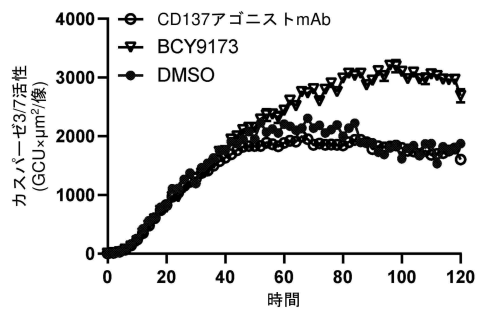


FIGURE 5

【図 6】

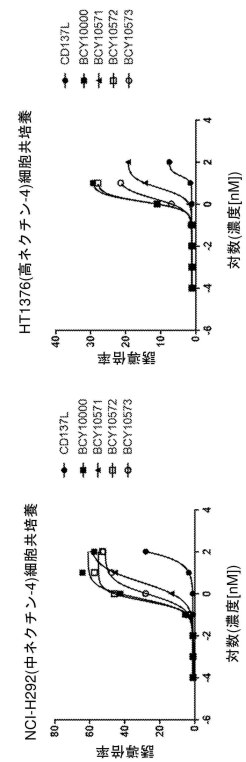


FIGURE 6

10

20

30

40

50

【図 7】

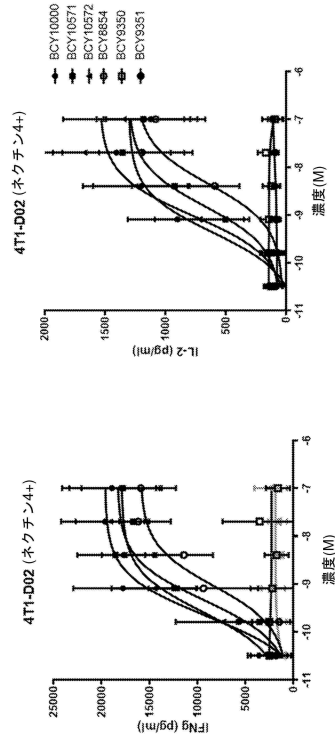


FIGURE 7

【図 8】

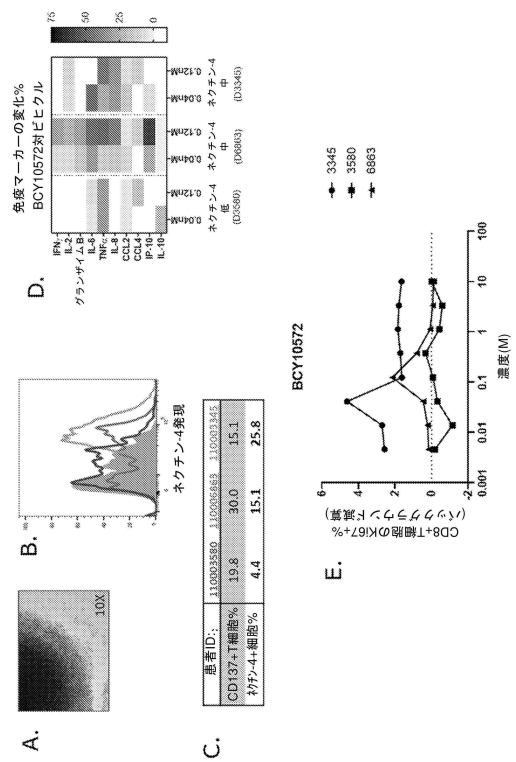


FIGURE 8

【図 9】

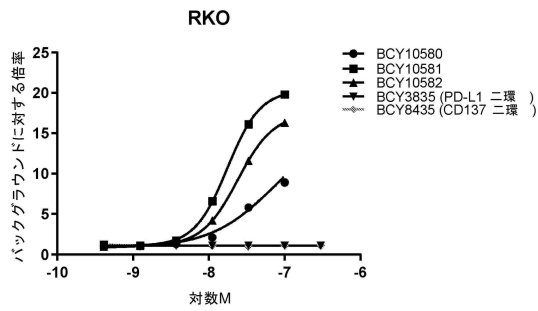


FIGURE 9

【図 10】

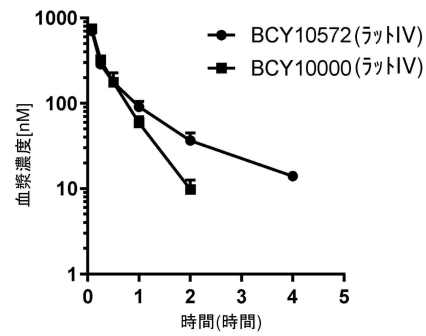


FIGURE 10

10

20

30

40

50

【配列表】

0007551500000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

前置審査

, ベイブラハム・リサーチ・キャンパス, ビー 9 0 0 , バイスクルテクス・リミテッド内

(72)発明者 マクドネル, ケヴィン

イギリス国, シービー 2 2 ・ 3 エイティール, ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, ベイブラハム・リサーチ・キャンパス, ビー 9 0 0 , バイスクルテクス・リミテッド内

(72)発明者 パーク, ピーター

イギリス国, シービー 2 2 ・ 3 エイティール, ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, ベイブラハム・リサーチ・キャンパス, ビー 9 0 0 , バイスクルテクス・リミテッド内

(72)発明者 ウパディヤヤ, プニット

イギリス国, シービー 2 2 ・ 3 エイティール, ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, ベイブラハム・リサーチ・キャンパス, ビー 9 0 0 , バイスクルテクス・リミテッド内

(72)発明者 マッド, ジェンマ

イギリス国, シービー 2 2 ・ 3 エイティール, ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, ベイブラハム・リサーチ・キャンパス, ビー 9 0 0 , バイスクルテクス・リミテッド内

審査官 吉門 沙央里

(56)参考文献 特表 2 0 1 8 - 5 0 2 8 2 5 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 7 / 1 8 2 6 7 2 (W O , A 1)

特表 2 0 1 3 - 5 1 8 8 0 7 (J P , A)

特表 2 0 1 6 - 5 2 7 1 8 0 (J P , A)

Bicycle Therapeutics to Present New BT1718 Data in the "New Drugs on the Horizon" Session at the 2018 American Association for Cancer Research Meeting , Businesswire , 2018 年04月03日, インターネット: <URL :<https://www.businesswire.com/news/home/20180403005152/en/Bicycle-Therapeutics-to-Present-New-BT1718-Data-in-the-New-Drugs-on-the-Horizon-Session-at-the-2018-American-Association-for-Cancer-Research-Meeting> >

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q