

(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
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)	(73)特許権者	519226757 バイスクルテクス・リミテッド
(86)(22)出願日	平成31年4月2日(2019.4.2)		イギリス国 シービー 21 6ジーエス
(65)公表番号	特表2021-520378(P2021-520378 A)		ケンブリッジ グレート アビントン グ
(43)公表日	令和3年8月19日(2021.8.19)		ランタ パーク ポートウェイ ビルディ
(86)国際出願番号	PCT/GB2019/050951	(74)代理人	ング ブロックス エーアンドビー 100099623
(87)国際公開番号	WO2019/193328	(74)代理人	弁理士 奥山 尚一
(87)国際公開日	令和1年10月10日(2019.10.10)	(74)代理人	100125380
審査請求日	令和4年4月1日(2022.4.1)	(74)代理人	弁理士 中村 紗子
(31)優先権主張番号	1805492.4	(74)代理人	100142996
(32)優先日	平成30年4月4日(2018.4.4)	(74)代理人	弁理士 森本 聰二
(33)優先権主張国・地域又は機関	英國(GB)	(72)発明者	キーン,ニコラス
(31)優先権主張番号	1820981.7		イギリス国, シービー 22・3エイティ
(32)優先日	平成30年12月21日(2018.12.21) 最終頁に続く		-,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_iI E E G Q Y C_ii F A D P Y [N₁e] C_ii i (配列番号1) ;

C_i[t B u A l a] P E [D - A l a] P Y C_ii F A D P Y [N₁e] C_ii i (配列番号3) ;

C_iI E E G Q Y C_ii F [D - A l a] D P Y [N₁e] C_ii i (配列番号4) ;

C_i[t B u A l a] P K [D - A l a] P Y C_ii F A D P Y [N₁e] C_ii i (配列番号5) ;

C_i[t B u A l a] P E [D - L y s] P Y C_ii F A D P Y [N₁e] C_ii 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_ii F A D P Y [N₁e] C_ii 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_ii F A D P Y [N₁e] C_ii i (配列番号8) ;

C_iI E E [D - L y s (P Y A)] Q Y C_ii F A D P Y (N₁e) C_ii 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_ii] [d

10

20

F] [dA] [dD] [dP] [dY] [dNle] [dCiii] (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) Ci [HyP] LVNPLCiiLHP [dD] W [HArg] Ciii (配列番号2) ; および

Ci LWDPPTPCiiANLHL [HArg] Ciii (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) Ci [HArg] DWCiiHWTFSHGHPCiii (配列番号12) ; 10

Ci SAGWLTMCiiQKLHL Ciii (配列番号13) ; および

Ci SAGWLTMCiiQ [K(PYA)] LHL Ciii (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) Ci P [1Nal] [dD] Ciim [HArg] DWSTP [HyP] WCii (配列番号15) ;

Ci P [1Nal] [dD] Ciim [HArg] D [dW] STP [HyP] [dW] Ci (配列番号16) ;

Ci P [1Nal] [dK] (Sar10 - (B-Ala)) Ciim [HArg] DWSTP [HyP] WCiii (配列番号17) ; または

Ci PFGCiim [HArg] DWSTP [HyP] WCiii (配列番号18) 20

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) 30 トリプロパ-2-エン-1-オン(TATA) であり、

式中、Ci、Ci i およびCi 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、1Nalは1-ナフチルアラニンを表し、B-Alaは-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-ペンチル酸を表し、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。 40

【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、

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)
) ;

(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ニ酸を表し、P Y A は 4 - ペンチニン酸を表す)

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。

【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 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 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)

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) ;

(式中、H A r g はホモアルギニンを表し、P Y A は 4 - ペンチニン酸を表し、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 i H W T F S H G H P C i i i (配列番号 12) ;

10

20

30

40

50

$C_i S A G W L T M C_{ii} Q K L H L C_{iii}$ (配列番号 13) ; および
 $C_i S A G W L T M C_{ii} Q [K(PYA)] L H L C_{iii}$ (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 - ペンチニ酸を表す)
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 PD - 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、

[PYA] - [B - Ala] - [Sar₁₀] - (配列番号 12) (以下、BCY 893 10
8 と呼ぶ) ;

[PYA] - [B - Ala] - [Sar₁₀] - SDK - (配列番号 13) (以下、BC
Y 10043 と呼ぶ) ;

NH₂ - SDK - (配列番号 13) - [Sar₁₀] - [K(PYA)] (以下、BCY 1
0044 と呼ぶ) ;

NH₂ - SDK - (配列番号 14) (以下、BCY 10045 と呼ぶ) ; および

Ac - SDK - (配列番号 14) - PSH (以下、BCY 10861 と呼ぶ) ;

(式中、PYA は 4 - ペンチニ酸を表し、B - Ala は - アラニンを表し、Sar₁₀ 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。 20

【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、

$C_i P [1Na1] [dD] C_{ii} M [HArg] DWSTP [HyP] WC_{iii}$ (配列番号 15 ; 以下、BCY 8116 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、BCY 11415 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) ; 30

$C_i P FGC_{ii} M [HArg] DWSTP [HyP] WC_{iii}$ (配列番号 18 ; 以下、BCY 11414 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、Sar₁₀ 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、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、BCY 8116 と呼ぶ) ;

[PYA] - [B - Ala] - [Sar₁₀] - (配列番号 15) (以下、BCY 884 46 と呼ぶ) ;

配列番号 16 (以下、BCY 11415 と呼ぶ) ;

[PYA] - [B - Ala] - [Sar₁₀] - (配列番号 16) (以下、BCY 119 42 と呼ぶ) ;

Ac - (配列番号 17) (以下、BCY 8831 と呼ぶ) ; および

配列番号 18 (以下、BCY 11414 と呼ぶ) ;

(式中、PYA は 4 - ペンチニ酸を表し、B - Ala は - アラニンを表し、Sar₁₀) 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 1_0 に記載のヘテロタンデム二環式ペプチド複合体。

【請求項 1_2】

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 1_1 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 1_3】

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 1_2 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 1_4】

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 1_2 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ボ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ー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、マトリックスマ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(プロモメチル)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(プロモメチル)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】

目的の標的にに対する二環式ペプチドの大きなライプ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プ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(プロモメチル)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。

10

【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、

20

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て、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。

30

【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。

40

【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Nucleight 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。

50

【図6】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（HT1376：ネクチン-4高およびNCI-H292：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 / CD137ヘテロタンデムが、PBM C - 4 T 1 共培養アッセイでIL-2およびIFN- サイトカイン分泌を誘導することを示す図である。BCY9350およびBCY9351は、それぞれネクチン-4およびCD137の非結合対照である。

【図8】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3D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CD137⁺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CD8⁺k i 6 7⁺T細胞%（ビヒクルを点線で示す）。

【図9】PD-L1 / CD137ヘテロタンデムが、PD-L1発現細胞株RKOの存在下、CD137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】SD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：BCY10572およびBCY10000を2mg/kgでIV投与した（n=3）。

【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。

【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CD8またはCD4である。さらなる実施形態では、T細胞がCD8である。免疫細胞の他の例としては、樹状細胞、濾胞樹状細胞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CD137である。

【0013】

CD137は、腫瘍壞死因子（TNF）受容体ファミリーのメンバーである。その代替名は、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー9（TNFRSF9）、4-IIBおよびリンパ球活性化により誘導された（ILA）である。CD137は、活性化T細胞によって発現され得るが、CD4⁺T細胞よりもCD8⁺T細胞上でより多く発現される。さらに、CD137発現は、樹状細胞、濾胞樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、顆粒球および炎症部位の血管壁の細胞に見られる。CD137の1つの特徴付けられた活性は、活性化T細胞に対するその共刺激活性である。CD137の架橋により、T細胞増殖、IL-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。

10

20

30

40

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))。

【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を通したシグナル伝達は、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-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。

【0016】

CD137とCD137Lの両方が欠損したマウスで実施された実験が、完全コンピメント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。

【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できることが示されている。これらの研究は、CD137シグナル伝達が、腫瘍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。

【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_iI E E G Q Y C_{i i}F A D P Y [Nle] C_{i i i}(配列番号1)；
C_i[tBuA1a]P E [D-A1a]P Y C_{i i}F A D P Y [Nle] C_{i i i}(配列番号3)；
C_iI E E G Q Y C_{i i}F [D-A1a]D P Y [Nle] C_{i i i}(配列番号4)；

10

20

30

40

50

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) ; および

[d C_i] [d I] [d E] [d E] [K (P Y A)] [d Q] [d Y] [d C_{i i}] [d F] [d A] [d D] [d P] [d Y] [d N l e] [d C_{i i i}] (配列番号10) ;

(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、N l eはノルロイシンを表し、t B u A l aはt - ブチル - アラニンを表し、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。

【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_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) ;

(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、N l e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、

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 H₂ (以下、B C Y 1 1 5 0 6と呼ぶ) ;

(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ニ酸を表し、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。

【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、

A c - A - (配列番号1) - D a p (以下、B C Y 7 7 3 2と呼ぶ) ;

(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ニ酸を表す)

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

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 (epimutation) 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。

【0027】

一実施形態では、がん細胞が、HT1080、SC-OV-3、PC3、H1376、NCI-H292、LnCap、MC38、4T1-D02およびRKO腫瘍細胞から選択される。

10

【0028】

一実施形態では、がん細胞上に存在する成分がEPHA2である。

【0029】

EPH受容体チロシンキナーゼ（EPH）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（RTK）の大きなグループに属する。EPH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（Poliaikov et al. (2004) Dev Cell 7, 465-80）。機能的および生化学的 EPH 応答は、より高いリガンドオリゴマー化状態で起こる（Stein et al. (1998) Genes Dev 12, 667-678）。

20

【0030】

数あるパターンング機能の中でも、様々な EPH 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。EPHB4 およびエフリン-B2 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（Poliaikov et al.、上記）および胚性致死をもたらす。いくつかの EPH 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（Brantley-Sieders et al. (2004) Curr Pharm Des 10, 3431-42；Adams (2003) J Anat 202, 105-12）。

【0031】

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（Nakamoto et al. (2002) Microsc Res Tech 59, 58-67；Brantley-Sieders et al.、上記）。さらに、いくつかの EPH 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（Brantley-Sieders et al.、上記；Marme (2002) Ann Hematol 81 Suppl 2, S66；Booth et al. (2002) Nat Med 8, 1360-1）。

30

【0032】

EPH受容体A2（エフリンA型受容体2）は、ヒトでは、EPHA2遺伝子によってコードされるタンパク質である。

40

【0033】

EPH2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（Zelinski et al (2001) Cancer Res. 61, 2301-2306；Zhuang et al (2010) Cancer Res. 70, 299-308；Brantley-Sieders et al (2011) PLoS One 6, e24426）、肺がん（Brannan et al (2009) Cancer Prev Res (Phila) 2, 1039-1049；Kinch et al (2003) Clin Cancer Res. 9, 613-618；Guo et al (2013) J Thorac Oncol. 8, 301-308）、胃がん（Nakamura et al (2005) Cancer Sci. 96, 42-47；Yuan

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でき (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つた (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_iiLHP [dD] W[HArg]C_{ii}i (配列番号 2) ; および C_iLWDPTPC_iiANLHL [HArg]C_{ii}i (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、HArg 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_iiLHP [dD] W[HArg]C_{ii}i (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、HArg 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11) (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。

10

【0041】

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。

【0042】

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。

【0043】

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19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290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 (*H e l i c o b a c t e r p y l o r i*) 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 (*S c h i s t o s o m a m a n s o n i*) を含む）に関する免疫応答の回避に関する。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

【0044】

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 (Brown J A et al. 2003 *Immunol. 170* : 1257 - 66; Dong H et al. 2002 *Nat. Med. 8* : 793 - 800; Hamanishi J, et al. 2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104* : 33360 - 65; Strome S E et al. 2003 *Cancer Res. 63* : 6501 - 5; Inman B A 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; Nomii T et al. 2007 *Clin. Cancer Res. 13* : 2151 - 57; Thompson R H et al. 2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101* : 17174 - 79; Wu C et al. 2006 *Acta Histochem. 108* : 19 - 24)。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 (Blank C et al. 2003 *Immunol. 171* : 4574 - 81)。最も重要なことに、腫瘍上のP

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相関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、腫瘍上により高レベルの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 シグナルに応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。腫瘍関連骨髓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 (Curieel 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、P D - L 1 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} (配列番号 1 2) ;
 C_i S A G W L T M C_{i i} Q K L H L C_{i i} (配列番号 1 3) ; 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} (配列番号 1 4) ;
 (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 - ペンチニ酸を表す)
 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。

【 0 0 5 0 】

さらなる実施形態では、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 r₁₀] - (配列番号 1 2) (以下、B C Y 8 9 3
 8 と呼ぶ) ;
 [P Y A] - [B - A l a] - [S a r₁₀] - S D K - (配列番号 1 3) (以下、B C
 Y 1 0 0 4 3 と呼ぶ) ;
 N H₂ - S D K - (配列番号 1 3) - [S a r₁₀] - [K (P Y A)] (以下、B C Y 1
 0 0 4 4 と呼ぶ) ;
 N H₂ - S D K - (配列番号 1 4) (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 1 4) - P S H (以下、B C Y 1 0 8 6 1 と呼ぶ) ;
 (式中、P Y A は 4 - ペンチニ酸を表し、B - A l a は - アラニンを表し、S a r₁₀
 は 1 0 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。

【 0 0 5 1 】

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。

【 0 0 5 2 】

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関与する。これら
 は、ポリオウイルス、単純ヘルペスウイルスおよび麻疹ウイルスの主な受容体である。ネ
 クチン - 1 (P V R L 1) またはネクチン - 4 (P V R L 4) 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 5 0 % 、 4 9 % およ
 び 8 6 % 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 E R B B 2 + 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 の可溶型の検出が、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、エンホルツマブベドチン (A S G - 2 2 M E)
 は、ネクチン - 4 を標的とする抗体薬物複合体 (A D C) 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。

【 0 0 5 3 】

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。

【 0 0 5 4 】

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 1 8 1 0 2 5 0 . 9 号、同第 1
 8 1 5 6 8 4 . 4 号および同第 1 8 1 8 4 9 9 . 4 号に開示されている。

【 0 0 5 5 】

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_iP [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_iP [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_iP [1 N a l] [d K] (S a r₁₀ - (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_iP 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 r₁₀ 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)
 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む。

【 0 0 5 6 】

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、 B C Y 8 1 1 6 と呼ぶ) ;

[P Y A] - [B - A l a] - [S a r₁₀] - (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 r₁₀] - (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 - ペンチニン酸を表し、 B - A l a は - アラニンを表し、 S a r₁₀ 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。

【 0 0 5 7 】

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 (P S M A) である。

【 0 0 5 8 】

前立腺特異的膜抗原 (P S M A) (グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ I I (G C P I I) 、 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 (N A A L A D a s e I) および N A A G ペプチダーゼとしても知られている) は、ヒトでは、 F O L H 1 (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 G C P I I は、 750 アミノ酸を含み、重さがおよそ 84 k D a である。

【 0 0 5 9 】

ヒト P S M A 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、 P S M A 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、 P S M A 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。

【 0 0 6 0 】

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

【 0 0 6 1 】

P S M A 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、英國特許出願第 1810318.4 号、同第 181

10

20

30

40

50

0 3 2 5 . 9 号および同第 1 8 2 0 3 2 5 . 7 号に開示されている。

【 0 0 6 2 】

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事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ができる。いずれかの結合ペプチドの結合価を増加させることができ、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

【 0 0 6 3 】

一実施形態では、リンカーが、以下の配列、-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。

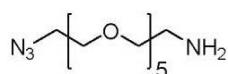
20

【 0 0 6 4 】

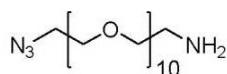
適切なリンカーの構造的表現を以下に詳述する。

【 0 0 6 5 】

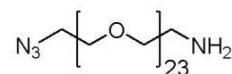
【 化 1 】



H2N-Peg5-N3
COM00000132

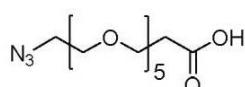


H2N-Peg10-N3
COM00000134

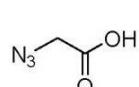


H2N-Peg23-N3
COM00000135

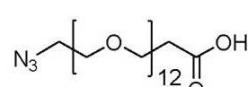
30



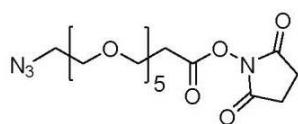
N3-PEG5-COOH
COM00000467



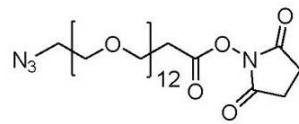
N3-CH2-COOH
COM00000468



N3-PEG12-COOH
COM00000466



NHS-PEG5-N3



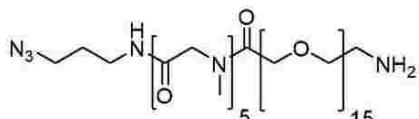
NHS-PEG12-N3

40

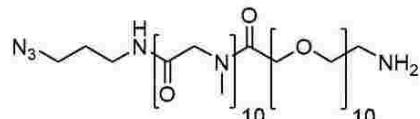
【 0 0 6 6 】

50

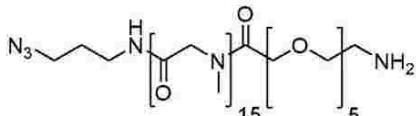
【化 2】



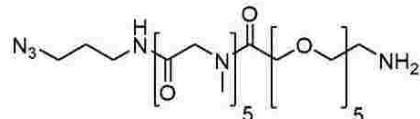
H2N-PEG15-SAR5-N3
COM00000128



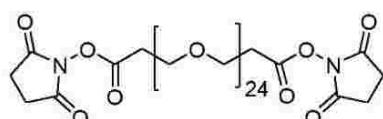
H2N-PEG10-SAR10-N3
COM00000129



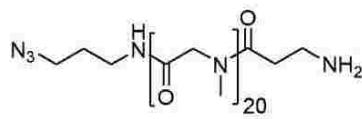
H2N-PEG5-SAR15-N3
COM00000130



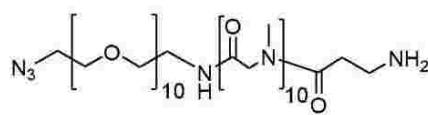
H2N-PEG5-SAR5-N3
COM00000131



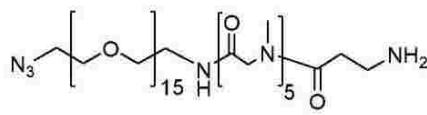
NHS-PEG24-NHS
COM00000469



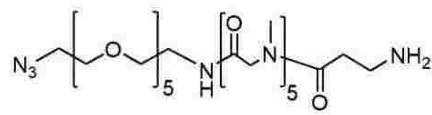
H2N-(B-Ala)-SAR20-N3
COM00000470



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



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



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

10

20

30

【0067】

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

【0068】

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

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。

【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

10

20

30

40

50

腫瘍環境での C D 1 3 7 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 C D 1 3 7 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、B C Y 7 9 8 5 が、E p h A 2 発現H T 1 0 8 0 細胞の存在下、P r o m e g a C D 1 3 7 ルシフェラーゼレポーターアッセイ(C S 1 9 6 0 0 8)でC D 1 3 7 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、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。

【0075】

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。

【0076】

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。

【0077】

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、

【0078】

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

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へテロタンデムが、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】

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)。

【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})は不变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】

10

20

30

40

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

Nair et al (2 0 0 3) J Immunol 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 (retro-inverso form) 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

20

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。

【 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、Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3 - 9 0 6 3 9 - 0 2 6 - 8 , Hardcover , 3 8 8 pages , August 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、(+) 樟脑酸、カンファースルホン酸、(+) - (1 S) - カンファー - 1 0 - スルホン酸、カブリン酸、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) 、 - オキソグルタル酸、グリコール酸、馬尿酸、ハロゲン化水素酸 (例えば、臭化水素酸、塩酸、ヨウ化水素酸) 、

40

50

イセチオン酸、乳酸（例えば、(+) - L - 乳酸、(±) - DL - 乳酸）、ラクトビオン酸、マレイン酸、リンゴ酸、(-) - L - リンゴ酸、マロン酸、(±) - DL - マンデル酸、メタンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ナフタレン-1,5-ニスルホン酸、1-ヒドロキシ-2-ナフト酸、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、バモ酸、リン酸、プロピオン酸、ピルビン酸、L - ピログルタミン酸、サリチル酸、4 - アミノサリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、硫酸、タンニン酸、(+) - L - 酒石酸、チオシアノ酸、p - トルエンスルホン酸、ウンデシレン酸および吉草酸、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】

10

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（メシリ酸）、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ビオン酸から形成される塩からなる。1つの特定の塩は塩酸塩である。別の特定の塩は酢酸塩である。

【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、Ca²⁺およびMg²⁺などのアルカリ土類金属カチオン、ならびにAl³⁺またはZn⁺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、NH₄⁺）および置換アンモニウムイオン（例えば、NH₃R⁺、NH₂R₂⁺、NHR₃⁺、NR₄⁺）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、ジシクロヘキシリルアミン、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(CH₃)₄⁺である。

20

【0091】

30

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）；スペーサー基の付加；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

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_{i i i}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_{i i i})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む。

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（Tugyiet 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、¹¹C、¹³C および¹⁴C などの炭素の同位体、³⁶S などの塩素の同位体、¹⁸F などのフッ素の同位体、¹²³I、¹²⁵I および¹³¹I などのヨウ素の同位体、¹³N および¹⁵N などの窒素の同位体、¹⁵O、¹⁷O および¹⁸O

50

などの酸素の同位体、³²Pなどのリンの同位体、³⁵Sなどの硫黄の同位体、⁶⁴Cuなどの銅の同位体、⁶⁷Gaまたは⁶⁸Gaなどのガリウムの同位体、⁹⁰Yなどのイットリウムの同位体、ならびに¹⁷⁷Luなどのルテニウムの同位体、ならびに²¹³Bi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、¹⁴C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。

【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】

¹¹C、¹⁸F、¹⁵Oおよび¹³N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 Tomography）(PET)で有用となり得る。

【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。

【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、ス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。

【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】

10

20

30

40

50

一実施形態では、分子足場が 2 , 4 , 6 - トリス(プロモメチル)メシチレンである。この分子は、1 , 3 , 5 - トリス(プロモメチル)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。

【 0 1 1 8 】

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リルを含む広範囲の官能基から選択される。

10

【 0 1 1 9 】

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。

【 0 1 2 0 】

例としては、プ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ティ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-プロモアセトアミド)である。セレノシステインも、システインと同様の反応性を有し、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

【 0 1 2 1 】

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、引き続いてインピ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。

30

【 0 1 2 2 】

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

【 0 1 2 3 】

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。

【 0 1 2 4 】

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。

【 0 1 2 5 】

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ゲーションによって、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。10

【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、T B M B) 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。20

【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。30

【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、薬理学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、リングルデキストロース、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グル液が含まれる。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。40

【0131】

静脈内ビヒクルには、リング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50

せて使用され得る。これらは、抗体、抗体フラグメント、およびシクロスボリン、メトトレキサート、アドリアマイシンまたはシスプラチニ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 $0.005\sim5.0\text{ mg}$ の選択されるペプチドリガンドに及び、 $0.05\sim2.0\text{ mg/kg}$ 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癌および癌腫）、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、頸側口腔、喉頭、咽頭、上咽頭、扁桃、唾液腺、鼻腔および副鼻腔のがん）、卵巢、輸卵管、腹膜、膣、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 [A L L]、慢性リンパ性白血病 [C L L]、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 [D L B C L]、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 [N K] 細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、有毛細胞白血病、意義不明の単クローニ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、急性骨髓性白血病 [A M L]、慢性骨髓性白血病 [C M L]、慢性骨髓单球性白血病 [C M M L]、好酸球增加症候群、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髓線維症、骨髓増殖症候群、骨髓異形成症候群および前骨髓球性白血病）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、ユーリング肉腫、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、髓膜腫、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、胰島細胞腫瘍、副甲状腺腫瘍、カルチノイド腫瘍および甲状腺髓様癌）；眼および付属器腫瘍（例えば、網膜芽細胞腫）；生殖細胞および绒毛性腫瘍（例えば、奇形腫、精上皮腫、未分化胚細胞腫、胞状奇胎および绒毛癌）；ならびに小児および胎児性腫瘍（例えば、髓芽腫、神經芽細胞腫、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。

【 0 1 3 9 】

さらなる実施形態では、がんが、非ホジキンリンパ腫 (N H L)、バーキットリンパ腫 (B L)、多発性骨髄腫 (M M)、B 細胞性慢性リンパ性白血病 (B - C L L)、B 細胞性および T 細胞性急性リンパ性白血病 (A L L)、T 細胞リンパ腫 (T C L)、急性骨髓性白血病 (A M L)、有毛細胞白血病 (H C L)、ホジキンリンパ腫 (H L) および慢性骨髓性白血病 (C M L) 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。

【 0 1 4 0 】

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。

【 0 1 4 1 】

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。

【 0 1 4 2 】

本発明を、以下の実施例を参照して、以下でさらに説明する。

【実施例】

【 0 1 4 3 】

【実施例 1 】

リンカーの合成

C O M 1 2 8

【 0 1 4 4 】

10

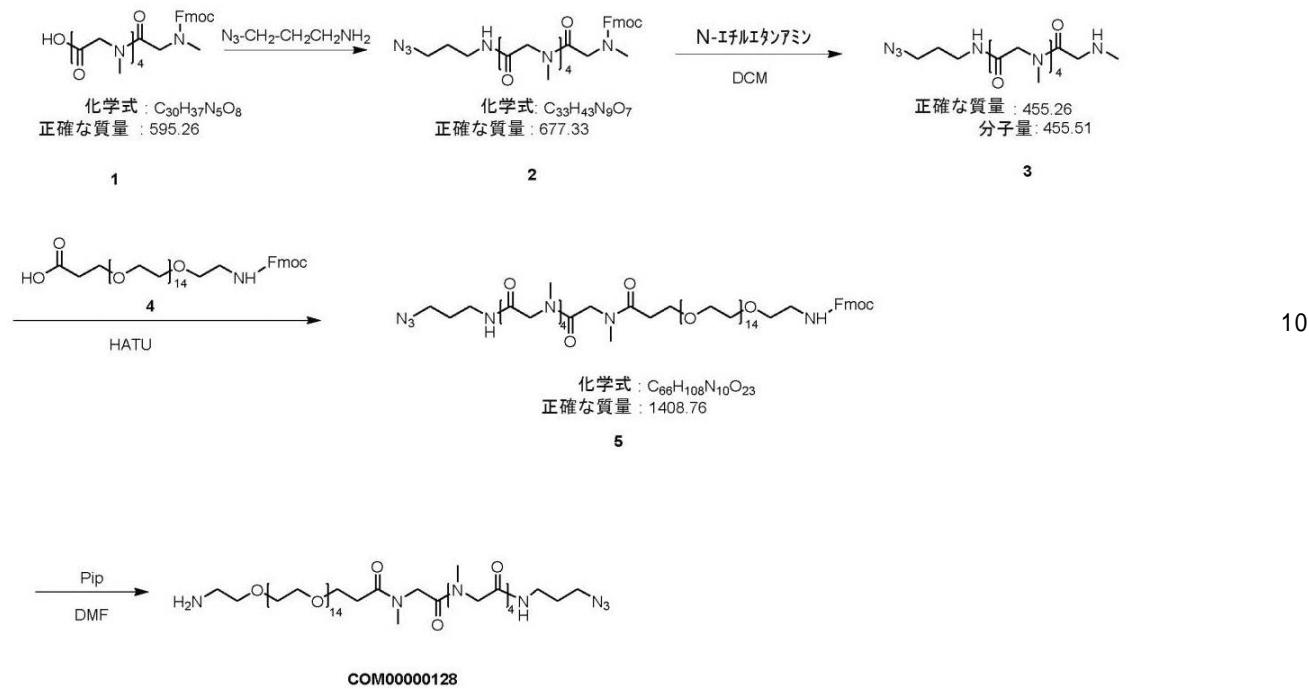
20

30

40

50

【化 3】



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、N₂で3回バージした) 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 : 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-エチルエタノラミン (1.29 g、15.19 mmol、1.50 mL、1.7.2 当量) の混合物を DCM (3 mL、予め脱気し、N₂で3回バージした) 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 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、N₂で3回バージした) 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 : 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。

【0146】

化合物 5 (400 mg、283.77 μmol、1.0 当量) を DMF (4 mL、予め脱気し、N₂で3回バージした) 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、N₂雰囲気下、25~30℃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 /

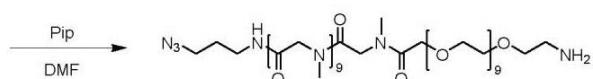
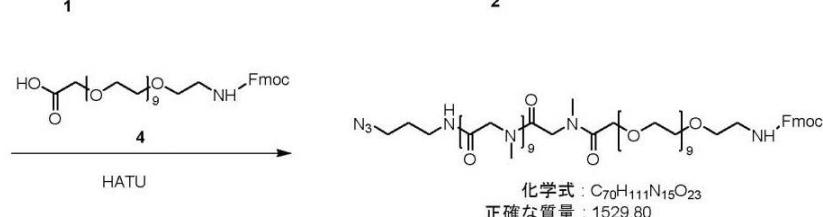
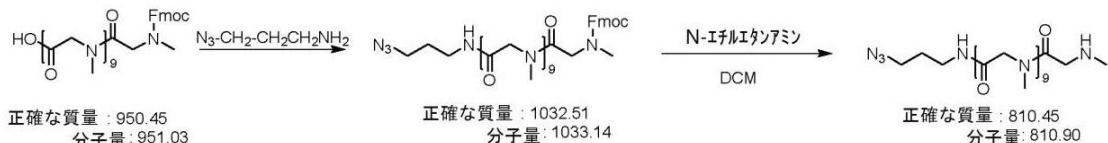
$[M + H]^+$ 、 $1187.4 [M + H]^+$)を有する1つの主ピークが検出された。溶媒を蒸発させて、COM128(250mg、粗)を無色の油状物として得た。

【0147】

COM129

【0148】

【化4】



COM00000129

化合物1(1.4g、1.47mmol、1.0当量)、3-アジドプロパン-1-アミン(162.1mg、1.62mmol、1.1当量)、EDCI(338.6mg、1.77mmol、1.2当量)、HOBT(238.7mg、1.77mmol、1.2当量)の混合物をDCM(5mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)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1M 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(1.1g、粗)を黄色の油状物として得た。

【0149】

化合物2(1.1g、1.06mmol、1当量)、N-エチルエタンアミン(3.89g、53.24mmol、5.48mL、50当量)の混合物をDCM(5mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)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(810mg、粗)を白色固体として得た。

【0150】

化合物3(810.0mg、998.9μmol、1.0当量)、化合物4(810.7mg、1.10mmol、1.1当量)、HATU(455.8mg、1.20mmol、1.2当量)、DIEA(258.2mg、2.00mmol、348.0μL、2.0当量)の混合物をDMF(2mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、混合物を、N₂雰囲気下、25~30℃で2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

10

20

30

40

50

合物を数滴の 1 M HCl 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。

【0151】

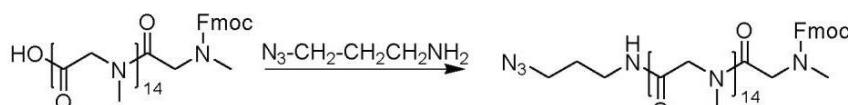
化合物 5 (1 g、653.29 μmol、1 当量) を DCM (10 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回バージした) に溶解し、引き続いでピペリジン (2.39 g、32.66 mmol、3.36 mL、5.0 当量) を添加し、次いで、混合物を、N₂ 雰囲気下、25~30 °C で 2 時間攪拌した。LC-MS は、化合物 5 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (計算 MW : 1308.47、実測 m/z : 1308.4 ([M + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。残留物を分取 HPLC (TFA 条件：A 相：H₂O 中 0.075% TFA、B 相：MeCN、カラム：Luna 200*25 mm 10 μm、C18、110 A および Gemini 150*30 mm、C18、5 μm、110 A、接続、5.0) によって精製した。COM129 (700 mg、463.72 μmol、収率 70.98%) を黄色固体として得た。

【0152】

COM130

【0153】

【化5】

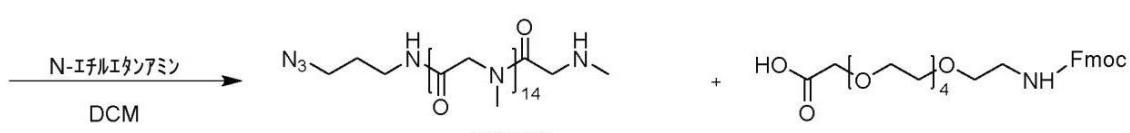


正確な質量 : 1305.64
分子量 : 1306.44

正確な質量 : 1387.70
分子量 : 1388.55

1

2

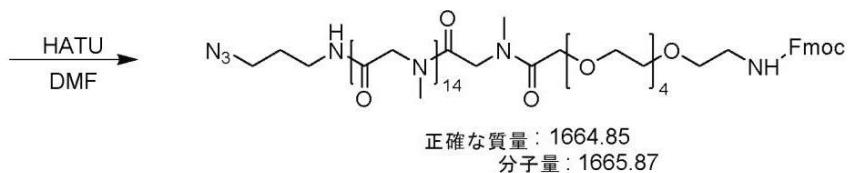


正確な質量 : 1165.63
分子量 : 1166.31

正確な質量 : 517.23
分子量 : 517.58

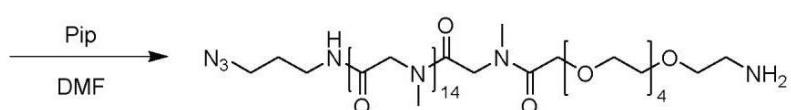
3

4



正確な質量 : 1664.85
分子量 : 1665.87

5



COM00000130

化合物 1 (291 mg、222.75 μmol、1.0 当量)、3-アジドプロパン-1-アミン (24.53 mg、245.02 μmol、1.1 当量)、EDCI (51.24 mg、267.30 μmol、1.2 当量) の混合物を DCM (3 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回バージ

10

20

30

40

50

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(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(200mg、144.04μmol、収率64.66%)を白色固体として得た。

【0154】

化合物2(200mg、144.04μmol、1.0当量)、N-エチルエタンアミン(210.7mg、2.88mmol、297μL、20.0当量)の混合物をDCM(3mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)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(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(150mg、粗)を黄色の油状物として得た。

10

【0155】

化合物3(150mg、128.61μmol、1.0当量)、化合物4(75mg、144.91μmol、1.13当量)、HATU(58.7mg、154.34μmol、1.2当量)およびDIEA(33.24mg、257.23μmol、44.80μL、2.0当量)の混合物をDMF(5mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、混合物を、N₂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(300mg、粗)を黄色の油状物として得た。

20

【0156】

粗化合物5(300mg、DMF 10mLに溶解した)に、ピペリジン(2mL)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(140mg、58.19μmol、収率32.31%、純度60%)を白色固体として得た。

【0157】

30

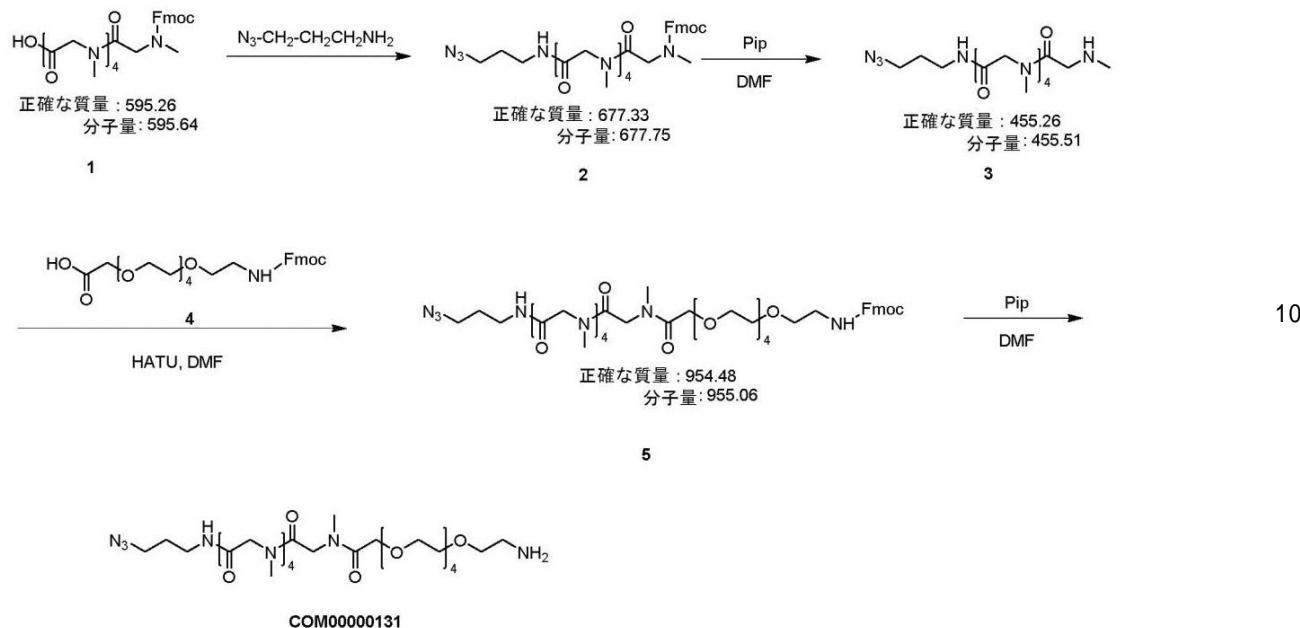
COM131

【0158】

40

50

【化6】



化合物1(700.0mg、1.18mmol、1.0当量)、3-アジドプロパン-1-アミン(117.7mg、1.18mmol、1.0当量)、HOBt(190.6mg、1.41mmol、1.2当量)、EDCI(270.4mg、1.41mmol、1.2当量)の混合物をDCM(20mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)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:677.75、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。反応混合物を数滴の1M HClで処理し、有機層を回収し、減圧下で蒸発させた。化合物2(600.0mg、粗)を白色固体として得た。

【 0 1 5 9 】

化合物2(600.0mg、885.2μmol、1.0当量)をDMF(3mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、ピペリジン(1.29g、15.19mmol、1.50mL、17.2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: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。反応混合物を分取HPLC(TFA条件)によって精製し、化合物3(400.0mg、879.1μmol)を無色の油状物として得た。

【 0 1 6 0 】

化合物3(250.0mg、548.83μmol、1.0当量)、化合物4(284.1mg、548.83μmol、1当量)、HATU(229.6mg、603.72μmol、1.1当量)、DIEA(141.9mg、1.10mmol、191.19μL、2.0当量)のDCM(20mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)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:955.06、実測m/z:955.6([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HPLC(TFA条件)によって精製した。化合物5(400.0mg、419.1μmol)を白色固体として得た。化合物5(400.0mg、418.82μmol、1.0当量)の混合物をDMF(4mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、ピペリジン(862.2mg、10.13mmol、1mL、24.2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(MW:732.83、実測

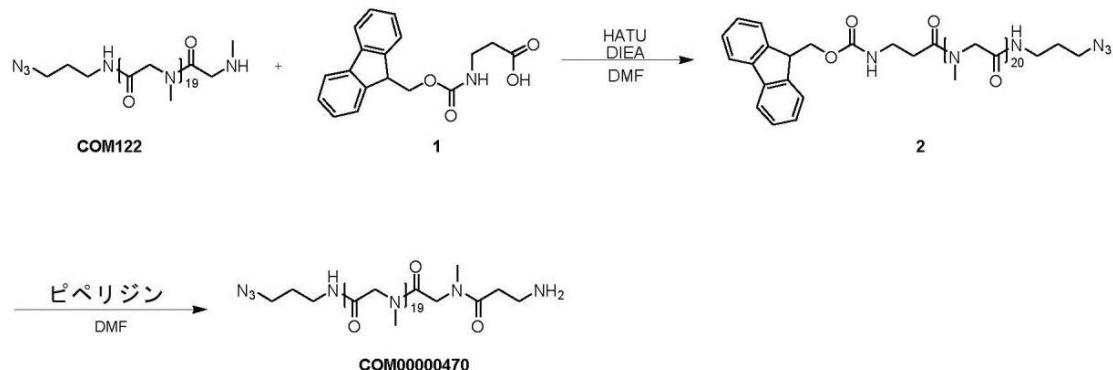
m/z : 733.3 ([M + H]⁺) を有する 1 つの主ピークが検出された。残留物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、COM131 (200 mg, 272.9 μmol) を無色の油状物として得た。

【0161】

COM470

【0162】

【化7】



COM122 (228 mg, 149.83 μmol, 1.0 当量)、化合物 1 (51.31 mg, 164.82 μmol, 1.1 当量) の DMF (6 mL) 中溶液に、HATU (85.40 mg, 224.75 μmol, 1.5 当量) および DIEA (19.37 mg, 149.83 μmol, 26.10 μL, 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 μmol、収率 19.86%) を白色固体として得た。

【0163】

化合物 2 (54 mg, 29.8 μmol, 1.0 当量) の DMF (2 mL) 中溶液に、ピペリジン (61 mg, 715 μmol, 71 μL, 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 μmol、収率 84.41%) を白色固体として得た。

【0164】

COM471

【0165】

10

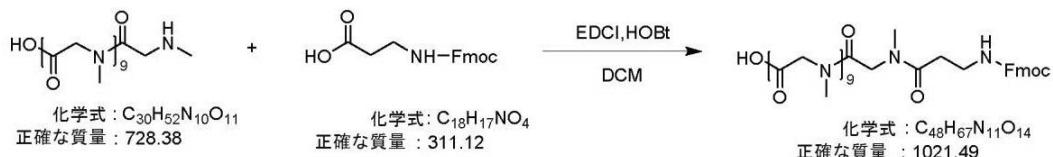
20

30

40

50

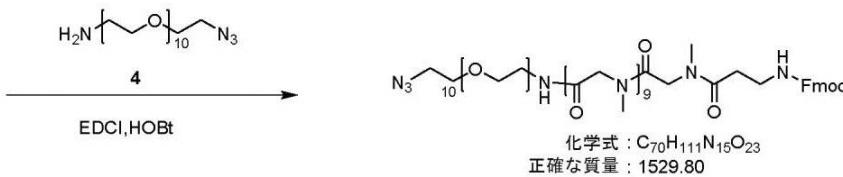
【化 8】



1

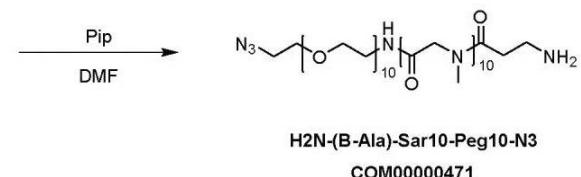
2

3



10

4



5

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 ~ 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 : 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 μmol、収率 71.30 %) を白色固体として得た。

【0166】

化合物 3 (500.0 mg、489.19 μmol、1.0当量)、化合物 4 (257.6 mg、489.19 μmol、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 μmol、2.0当量)、EDCI (187.6 mg、978.37 μmol、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 μmol、収率 50.48 %) を無色の油状物として得た。

【0167】

化合物 5 (420 mg、274.38 μmol、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。COM471 (386 mg、265.50 μmol、収率 96.76 %) を無色の油状物として得た。

【0168】

30

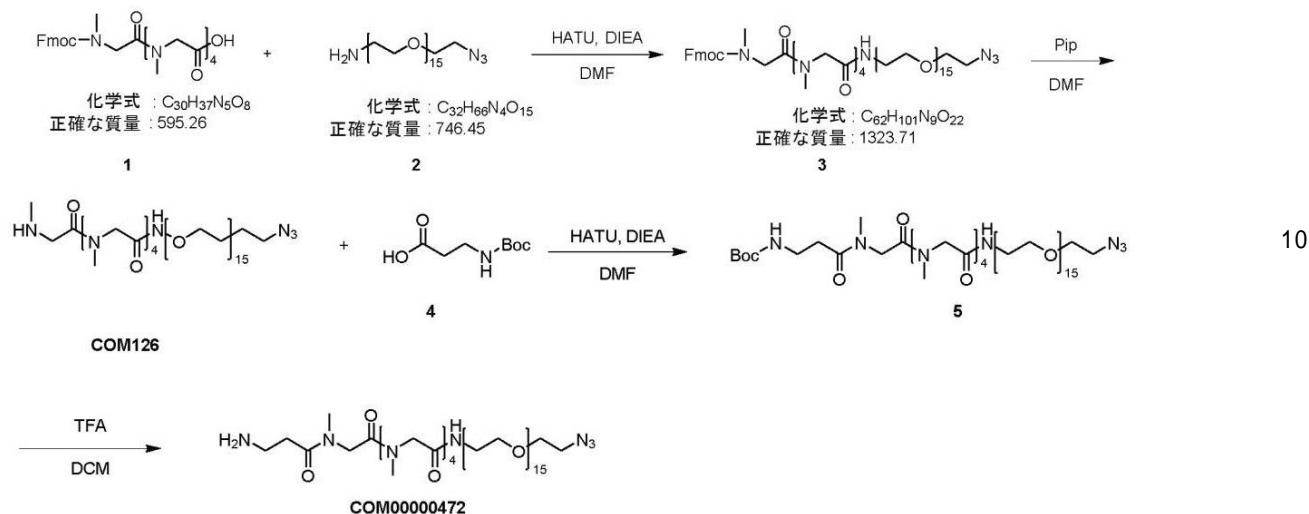
40

50

C O M 4 7 2

【 0 1 6 9 】

【 化 9 】



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 D I E A (217.0 mg、1.68 mmol、292.4 μL、2.0 当量) の混合物を D M F (2 mL) に溶解し、次いで、H A T U (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。T L C (D C M : C H₃OH = 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。

【 0 1 7 0 】

化合物 3 (450.0 mg、339.75 μmol、1.0 当量) を D M F (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。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 (計算 MW : 1102.27、実測 m/z : 552.1 ([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 3 (370.0 mg、335.67 μmol、収率 98.80%) を無色の油状物として得た。

【 0 1 7 1 】

C O M 1 2 6 (60 mg、54.45 μmol、1.0 当量)、化合物 4 (15.5 mg、81.68 μmol、1.5 当量) の D M F (5 mL) 中溶液に、H A T U (31 mg、81.68 μmol、1.5 当量) および D I E A (10.5 mg、61.68 μmol、15 μL、1.5 当量) を添加した。混合物を 30 ℃ で 2 時間攪拌した。L C - M S は、C O M 1 2 6 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。

【 0 1 7 2 】

化合物 5 (30 mg、23.57 μmol、1.0 当量) を D C M (4 . 5 mL) に溶解し、次いで、T F A (0 . 5 mL) を添加し、混合物を 25 ~ 30 ℃ 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 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。C O M 4 7 2 (10 mg、8.52 μmol) を白色固体として得た。

【 0 1 7 3 】

C O M 4 7 3

10

20

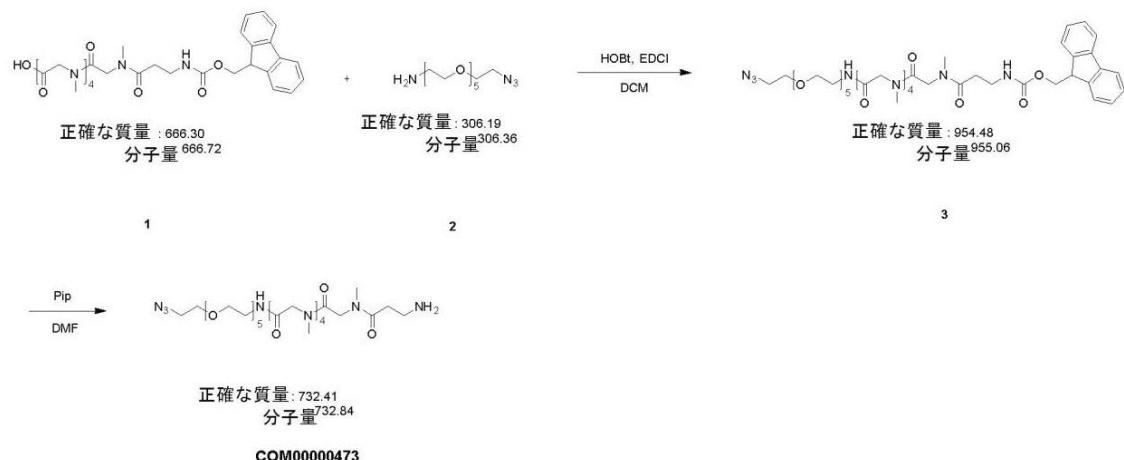
30

40

50

【0174】

【化10】



化合物 1 (300 mg、449.96 μmol、1.0 当量)、化合物 2 (138 mg、449.96 μmol、1.0 当量)、HOBt (122 mg、899.93 μmol、2.0 当量)、EDCI (173 mg、899.93 μmol、2.0 当量) の混合物を DCM (10 mL、予め脱気し、N₂で3回バージした) に溶解し、次いで、混合物を N₂ 霧囲気下、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 (MW : 955.06、実測 m/z : 955.3 ([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 (300 mg、粗) を黄色の油状物として得た。

【0175】

化合物 3 (300 mg、314.12 μmol、1.0 当量) を DMF (4 mL) に溶解し、次いで、ピペリジン (1 mL) を添加し、混合物を 20 ~ 25 ℃ で1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 : 732.83、実測 m/z : 733.2 ([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 HPLC (中性条件) によって精製した。COM473 (160 mg、218.33 μmol、収率 69.51%) を無色の油状物として得た。

【0176】

【実施例 2】

EphA2 / CD137 結合ヘテロタンデム二環式ペプチドの合成

BCY9173

【0177】

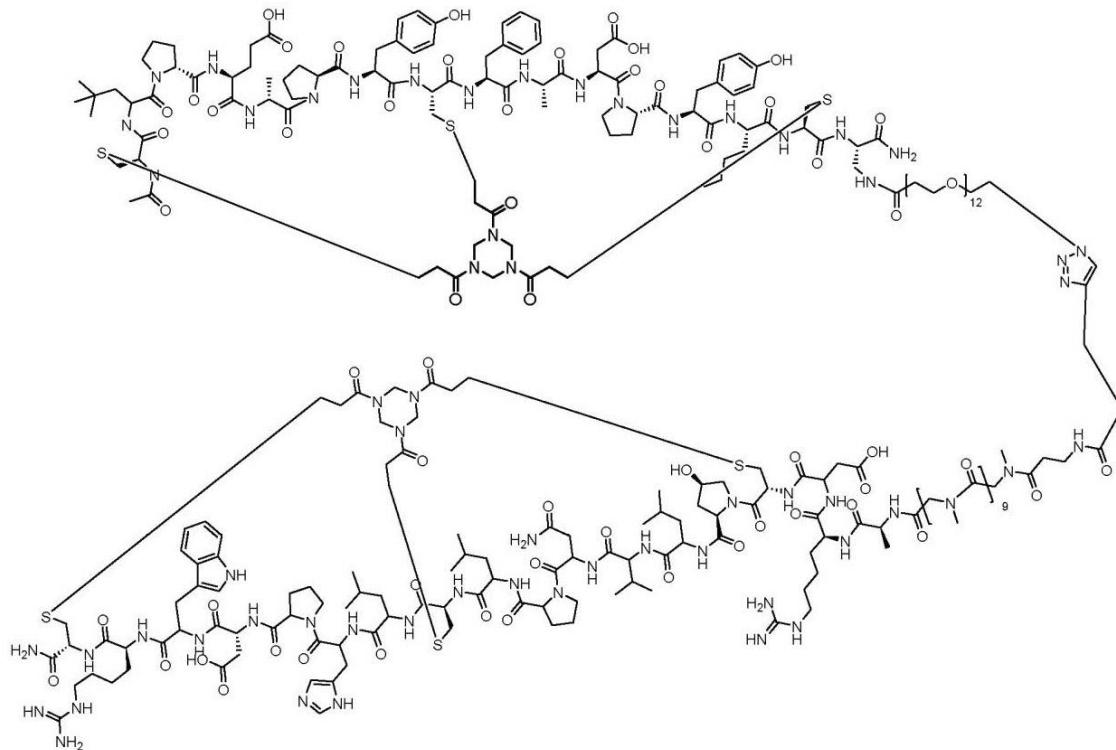
20

30

40

50

【化 1 1】



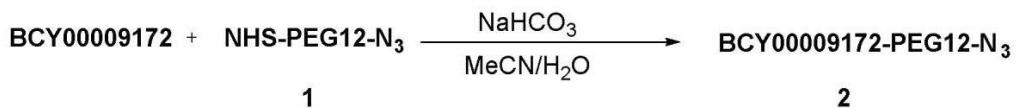
10

20

B C Y 9 1 7 2 - P E G 1 2 - N₃ を調製する手順

〔 0 1 7 8 〕

【化 1 2】



30

B C Y 9 1 7 2 (5 2 0 m g 、 2 4 8 . 1 6 μ m o l 、 1 当量) および化合物 1 (3 7 0 m g 、 4 9 9 . 4 7 μ m o l 、 2 . 0 1 当量) を D M F (5 m L) に溶解し、 D I E A (4 8 . 1 1 m g 、 3 7 2 . 2 4 μ m o l 、 6 4 . 8 4 μ L 、 1 . 5 当量) を添加し、次いで、混合物を 3 0 °C で 1 2 時間攪拌した。L C - M S は、 B C Y 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 (計算 MW : 2 7 2 1 . 1 2 、 実測 m / z : 1 3 6 0 . 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 H P L C (T F A 条件) によって精製し、化合物 2 (2 8 4 m g 、 1 0 1 . 1 0 μ m o l 、 収率 4 0 . 7 4 % 、 純度 9 6 . 8 7 %) を白色固体として得た。

(0 1 7 9)

【化 1 3】



40

B C Y 9 1 7 3 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(100mg、36.75μmol、1.0当量)およびBCY6169(120mg、3

50

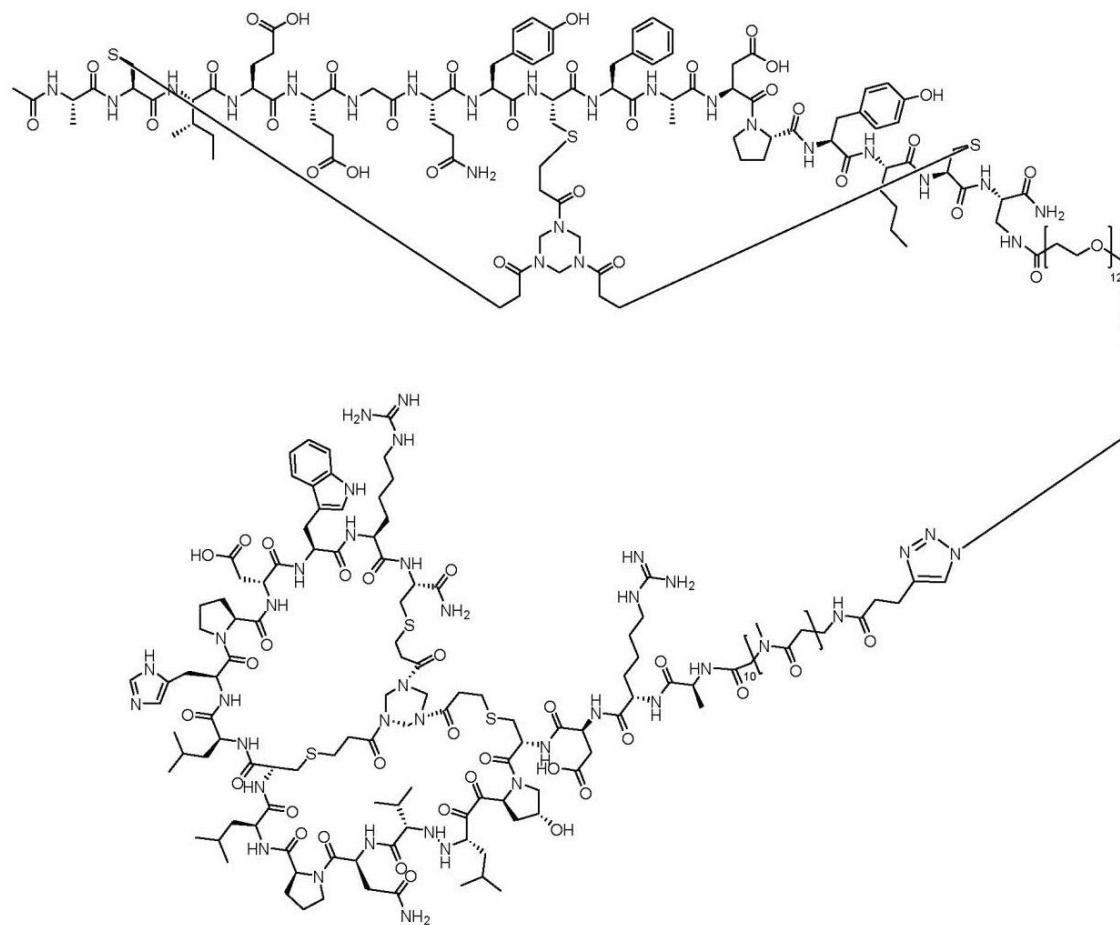
6.78 μmol、1.0当量)を最初に t-BuOH/H₂O(1:1) 10mLに溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、91.9μL、1.0当量)、VcNa(0.4M、183.8μL、2.0当量)およびTHPTA(0.4M、91.9μL、1.0当量)を添加した。最後に、1M NH₄HCO₃を添加して、pHを8に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂で3回バージした。反応混合物を、N₂雰囲気下、40度16時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていること、および所望のm/z(計算MW: 5983.85、実測m/z: 997.6600([M/6+H]⁺)および1197.2300([M/5+H]⁺))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、BCY9173(218mg、34.97μmol、収率47.58%、純度96%)を白色固体として得た。

【0180】

BCY7985

【0181】

【化14】

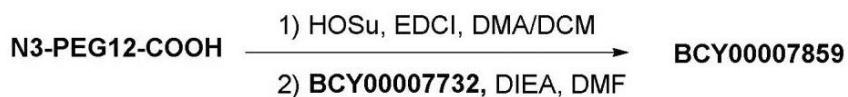


BCY00007985

BCY7859を調製する一般的な手順

【0182】

【化15】



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

10

20

30

40

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 (ES 8396-307-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。

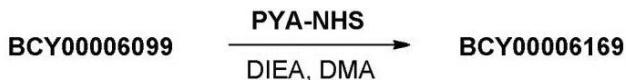
10

【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。

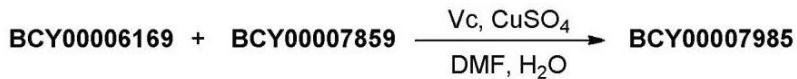
20

【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

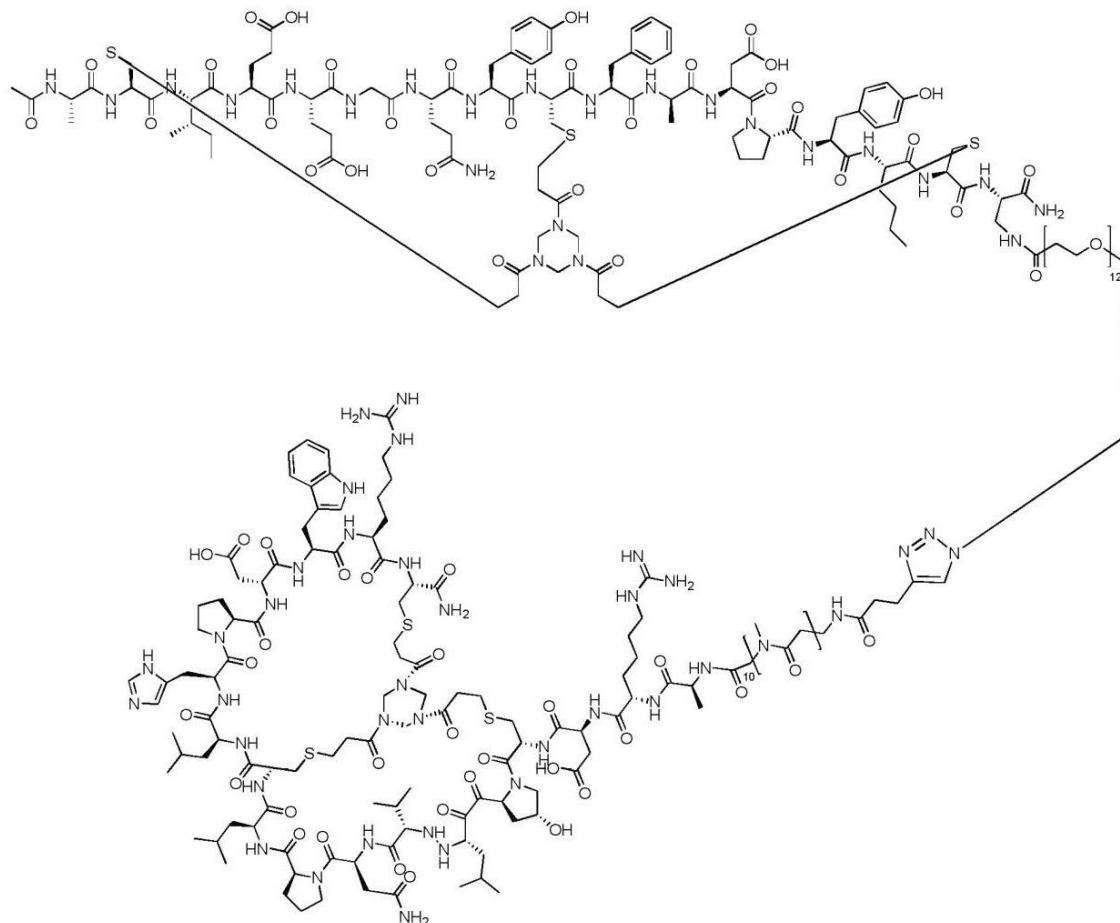
【0187】

BCY8942

【0188】

50

【化18】



10

20

BCY00008942

B C Y 8 9 4 0 を調製する一般的な手順

30

【0189】

【化19】



N3 - P E G 1 2 - C O O H (1 2 0 m g 、 1 8 6 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M A (3 m L) および D C M (1 m L) 中溶液に、 H O S u (3 2 . 2 m g 、 2 8 0 μ m o l 、 1 . 5 当量) を添加し、攪拌した。次いで、 E D C I (4 2 . 9 m g 、 2 2 4 μ m o l 、 1 . 2 当量) を混合物に添加し、 2 0 でさらに 7 時間、さらに攪拌した。 L C M S 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。 D M A (3 m L) 中 B C Y 8 0 4 5 (4 1 0 m g 、 1 8 6 μ m o l 、 1 . 0 当量) を含む別のフラスコに、 D I E A (1 2 0 m g 、 9 3 2 μ m o l 、 1 6 2 μ L 、 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 2 0 で 1 8 時間攪拌した。 L C - M S 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、 D C M を除去した。得られた混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製して、 B C Y 8 9 4 0 (1 9 0 m g 、 6 7 . 2 μ m o l 、 収率 3 6 . 1 %) を白色固体として得た。

40

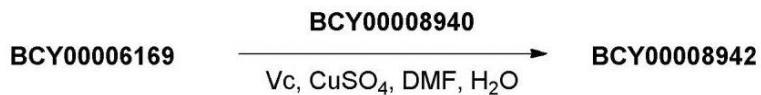
【0190】

B C Y 8 9 4 2 を調製する一般的な手順

【0191】

50

【化 2 0】



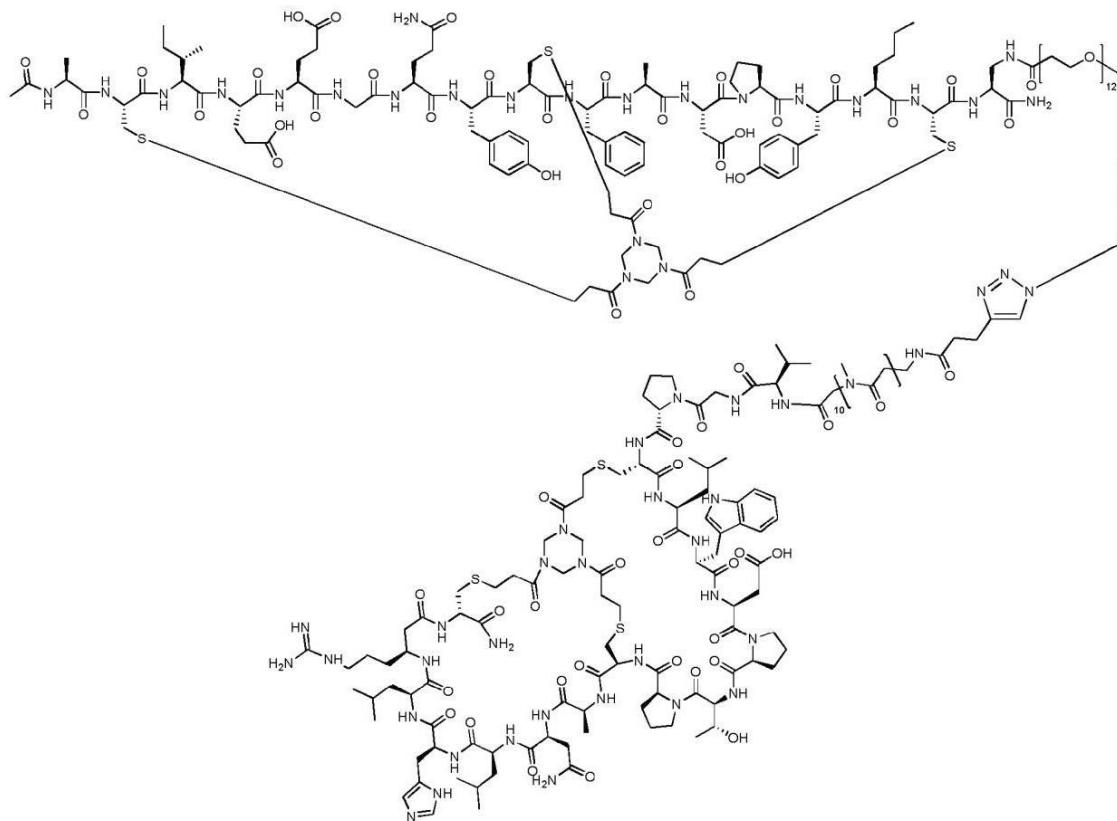
B C Y 8 9 4 0 (2 8 . 6 m g、 1 0 . 1 μ m o l、 1 . 1 当量) および B C Y 6 1 6 9 (3 0 . 0 m g、 9 . 1 9 μ m o l、 1 . 0 当量) の D M F (2 . 0 m L) 中溶液に、 (2 R) - 2 - [(1 S) - 1 , 2 - ジヒドロキシエチル] - 3 , 4 - ジヒドロキシ - 2 H - フラン - 5 - オン (1 . 0 M、 9 2 . 0 μ L) および C u S O ₄ (1 . 0 M、 2 7 . 6 μ L) を添加し、 室素雰囲気下、 2 0 ¹⁰ で 2 時間攪拌した。 L C - M S は、 B C Y 6 1 6 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 : 6 0 8 9 . 9 1 実測 m / z : 1 2 1 8 . 4 ([M / 5 + H] ⁺) 、 1 0 1 6 . 0 ([M / 6 + H] ⁺) 、 8 7 0 . 7 ([M / 7 + H] ⁺) を有する 1 つの中ピーカーが検出された。 反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製して、 化合物 B C Y 8 9 4 2 (1 5 . 4 m g、 2 . 4 6 μ m o l、 収率 2 6 . 8 %、 純度 9 7 . 3 %) を白色固体として得た。

【0 1 9 2】

B C Y 8 9 4 3

【0 1 9 3】

【化 2 1】

**BCY00008943**

B C Y 8 9 4 1 を調製する一般的な手順

【0 1 9 4】

10

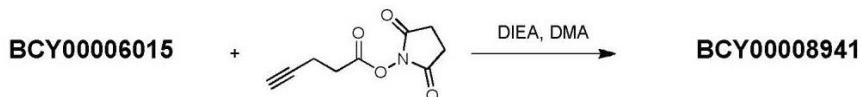
20

30

40

50

【化22】



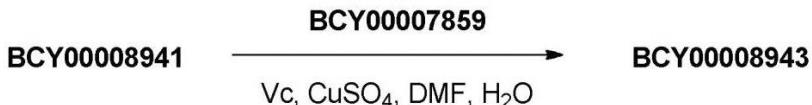
B C Y 6 0 1 5 (P Y A 部分が存在しないことを除いて、B C Y 8 9 4 1 と同一のペプチド；1 0 0 m g、3 2 . 9 $\mu\text{m o l}$) の D M A (2 m L) 中溶液に、D I E A (1 2 . 8 m g、9 8 . 7 $\mu\text{m o l}$ 、1 7 . 2 μL) を添加し、1 0 分間攪拌した。次いで、(2 , 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル) ペンタ - 4 - イノエート (1 2 . 8 m g、6 5 . 8 $\mu\text{m o l}$) を混合物に添加し、引き続いて 2 0 °で 1 6 時間さらに攪拌した。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 / z (計算 M W : 3 1 1 9 . 6 0 、実測 m / z : 1 0 4 0 . 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 H P L C (中性条件) によって精製して、化合物 B C Y 8 9 4 1 (9 0 . 0 m g、2 8 . 9 $\mu\text{m o l}$ 、収率 8 7 . 7 %) を白色固体として得た。

【0195】

B C Y 8 9 4 3 を調製する一般的な手順

【0196】

【化23】



B C Y 7 8 5 9 (B C Y 7 9 8 5 に記載されるように調製され得る；4 0 . 0 m g、1 4 . 2 $\mu\text{m o l}$) および B C Y 8 9 4 1 (4 2 . 0 m g、1 3 . 5 $\mu\text{m o l}$) の D M S O (2 m L 、窒素によって 1 時間予めバージされた) 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 (1 . 0 M 、2 7 0 μL) および C u S O 4 (1 . 0 M 、8 0 . 9 μL) を添加した。混合物を窒素で 3 回バージし、1 5 °で 2 時間攪拌した。L C - M S は、B C Y 8 9 4 1 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 9 4 6 . 7 7 、実測 m / z : 1 1 9 0 . 2 ([M / 5 + H] ^+) 、9 9 1 . 5 ([M / 6 + H] ^+) 、8 4 9 . 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 H P L C (A : H 2 O 中 0 . 0 7 5 % T F A 、B : A C N) によって精製して、化合物 B C Y 8 9 4 3 (1 1 . 5 m g、1 . 9 0 $\mu\text{m o l}$ 、収率 1 4 . 1 % 、純度 9 8 . 1 %) を白色固体として得た。

【0197】

B C Y 9 6 4 7

【0198】

10

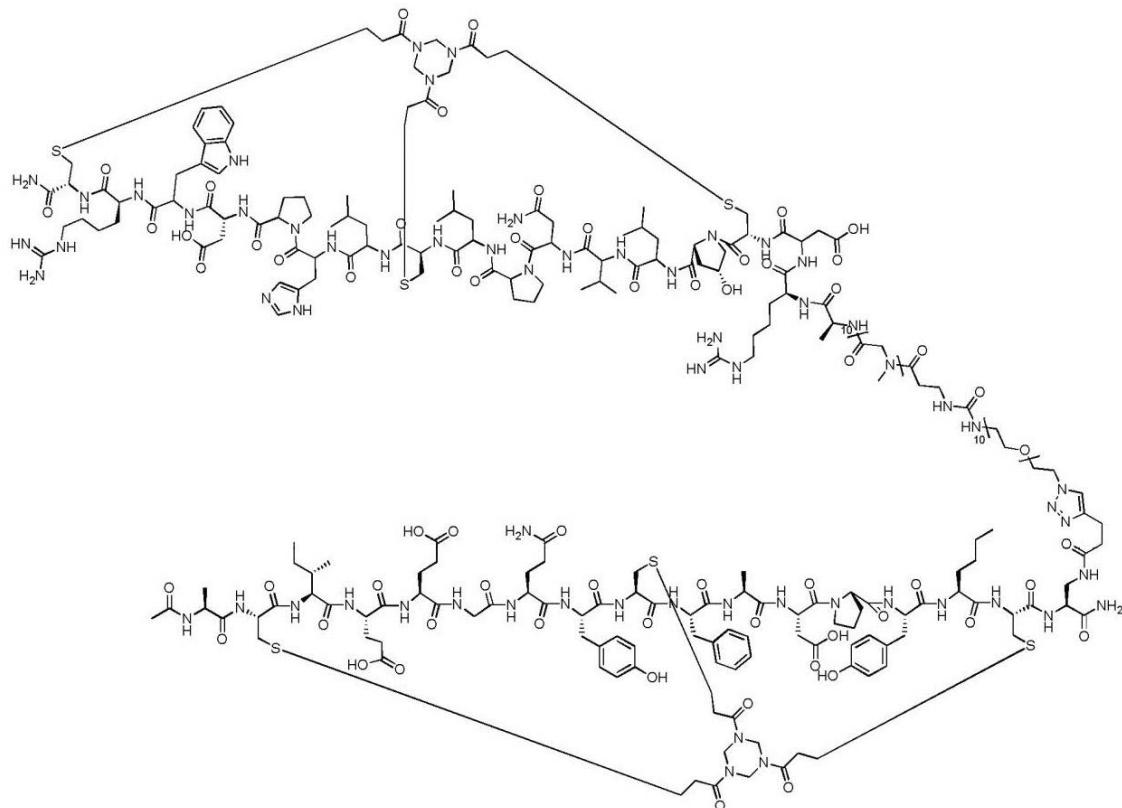
20

30

40

50

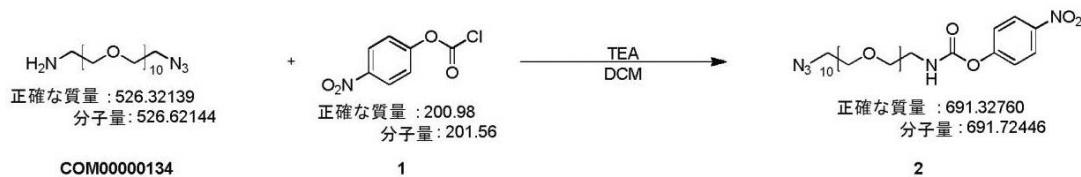
【化 2 4】



化合物 2 を調製する手順

【0199】

【化 2 5】



C O M 1 3 4 (3 0 0 . 0 m g 、 5 7 . 0 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 化合物 1 (1 7 . 2 m g 、 8 5 . 3 μ m o l 、 1 . 5 当量) の D C M (0 . 5 m L) 中溶液に、 T E A (8 . 6 5 m g 、 1 1 . 9 μ L 、 1 . 5 当量) を添加した。混合物を 2 5 度で 1 時間攪拌した。L C - M S は、 C O M 1 3 4 が完全に消費されていることを示し、所望の質量 (計算 M W : 6 9 1 . 7 2 、 実測 m / z : 6 9 2 . 3 ([M + H]⁺) および 7 0 9 . 3 ([M + 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、次いで、凍結乾燥して、粗化合物 2 (3 0 . 5 m g 、 粗) を白色として得た。

【0200】

化合物 3 を調製する手順

【0201】

【化 2 6】



化合物2(10mg、1.0当量)のDMF(1mL)中溶液に、BCY6099(46mg、1.0当量)およびDIEA(5.61mg、7.55μL、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:3735.28 実測m/z:1245.9([M/3+H]⁺)および934.5([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(34mg、収率62.96%、純度100%)を白色固体として得た。

【0202】

BCY9647を調製する手順

10

【0203】

【化27】



3

化合物3(34mg、9.10μmol、1.0当量)、BCY7741(23mg、10.08μmol、1.11当量)およびTHPTA(0.4M、11.4μL、0.5当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、11.4μL、0.5当量)およびVcNa(0.4M、22.8μL、1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、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、および所望のm/z(計算MW:6016.82、実測m/z:1204.1([M/5+H]⁺)、1003.5([M/6+H]⁺)、860.3([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HPLC(TFA条件)によって直接精製した。BCY9647(31.2mg、収率54.67%、純度95.96%)を白色固体として得た。

20

【0204】

BCY9648

30

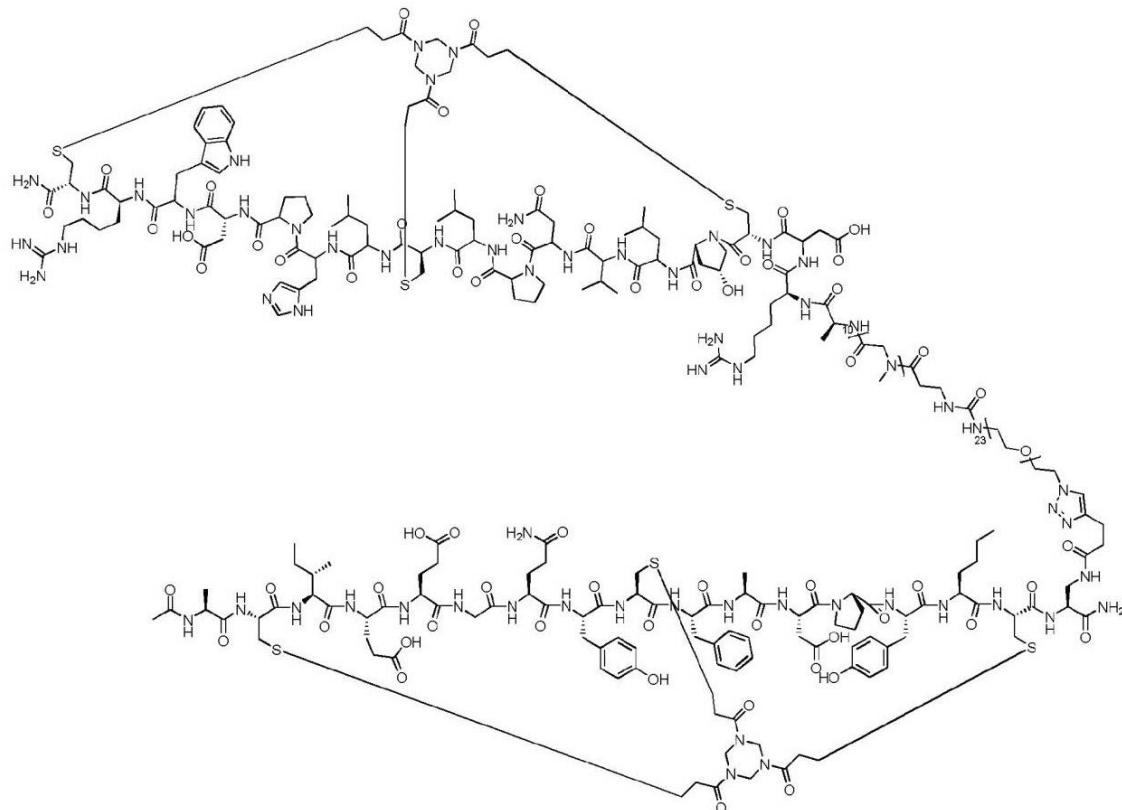
【0205】

30

40

50

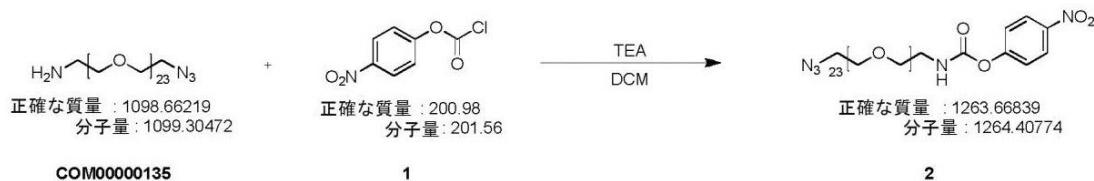
【化28】



化合物2を調製する手順

【0206】

【化29】



C O M 1 3 5 (3 0 m g 、 2 7 . 2 9 μ m o l 、 1 . 0 当量) 、 化合物 1 (8 . 2 5 m g 、 4 0 . 9 4 μ m o l 、 1 . 5 当量) の D C M (0 . 5 m L) 中溶液に、 T E A (4 . 1 4 m g 、 4 0 . 9 4 μ m o l 、 5 . 7 0 μ L 、 1 . 5 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、 C O M 1 3 5 が完全に消費されていることを示し、所望の質量 [計算 M W : 1 2 6 4 . 4 1 、 実測 m / z : 1 2 8 1 . 4 ([M + N H 4]⁺) 、 6 4 9 . 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) によって精製して、化合物 2 (1 8 m g 、 1 4 . 2 μ m o l 、 収率 5 2 . 1 4 %) を得た。

【0207】

化合物3を調製する手順

【0208】

【化30】



化合物3 (9 mg、7.12 μmol、1当量) のDMF (1 mL) 中溶液に、BCY6099 (23 mg、7.23 μmol、1.02当量) およびDIEA (2.76 mg、21.35 μmol、3.72 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: 4307.96 実測m/z: 1436.9 ([M/3+H]⁺)、1077.9 ([M/4+H]⁺)、862.5 ([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HPLC (TFA条件) によって精製した。化合物3 (14.6 mg、収率47.61%、純度100%)を白色固体として得た。

【0209】

BCY9648を調製する手順

【0210】

【化31】



化合物3 (14.6 mg、3.39 μmol、1当量)、BCY7741 (8.5 mg、3.73 μmol、1.1当量) およびTHPTA (0.4 M、4.3 μL、0.5当量) の混合物をt-BuOH/H₂O (1:1、2 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、4.3 μL、0.5当量) およびVcNa (0.4 M、8.6 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、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、および所望のm/z (MW: 6589.50、実測m/z: 1098.8 ([M/6+H]⁺)、942.1 ([M/7+H]⁺)、824.6 ([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HPLC (TFA条件) によって直接精製した。BCY9648 (14.7 mg、収率63.34%、純度96.22%)を白色固体として得た。

【0211】

BCY9655

【0212】

10

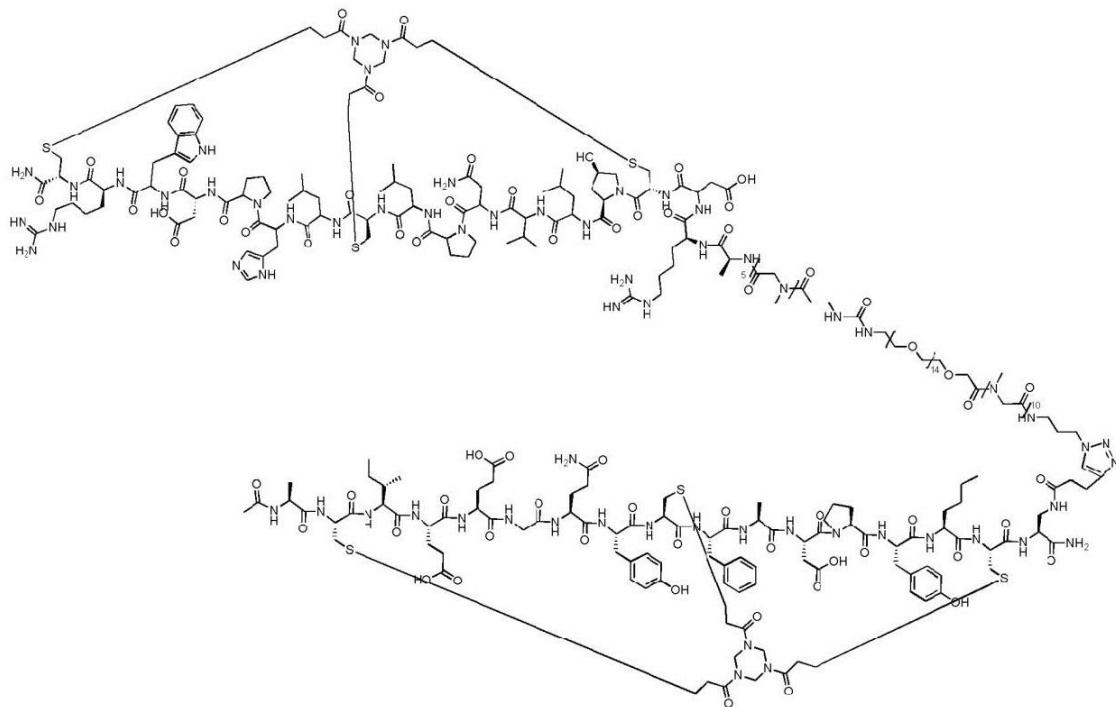
20

30

40

50

【化 3 2】



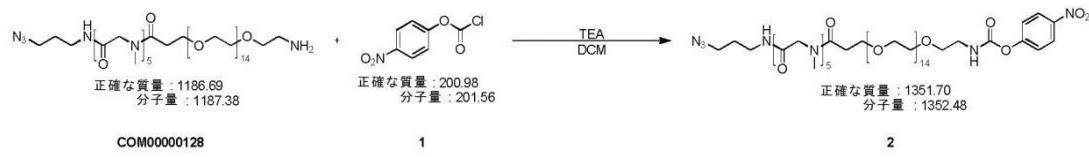
10

20

化合物 2 を調製する手順

【 0 2 1 3 】

【化 3 3】



30

COM128 (120 mg、101.06 μmol、1.0当量)、化合物1 (25 mg、124.03 μmol、1.25当量)のDCM (0.5 mL) 中溶液に、TEA (15.34 mg、151.59 μmol、21.10 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: 1352.48、実測m/z: 676.8 ([M/2 + H]⁺)、1369.3 ([M + NH₄]⁺))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HPLC (中性条件)によって精製した。化合物2 (14 mg、8.99 μmol、収率8.90%、純度86.86%)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】



40

化合物2(7mg、5.18μmol、1.0当量)およびBCY6099(16mg、5.03μmol、1.0当量)のDMF(2mL)中溶液に、DIEA(2.01m

50

g、15.53 μmol、2.70 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(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(11.8mg、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(11.8mg、2.69 μmol、1.0当量)、BCY7741(7.0mg、3.07 μmol、1.14当量)およびTHPTA(0.4M、6.8 μL、1当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回ページした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、6.8 μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、13.6 μL、2.0当量)をN₂下で添加した。0.2M NH₄CO₃(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、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(1.9mg、0.26 μmol、収率9.65%、純度91.15%)を白色固体として得た。

【0218】

BCY9656

【0219】

10

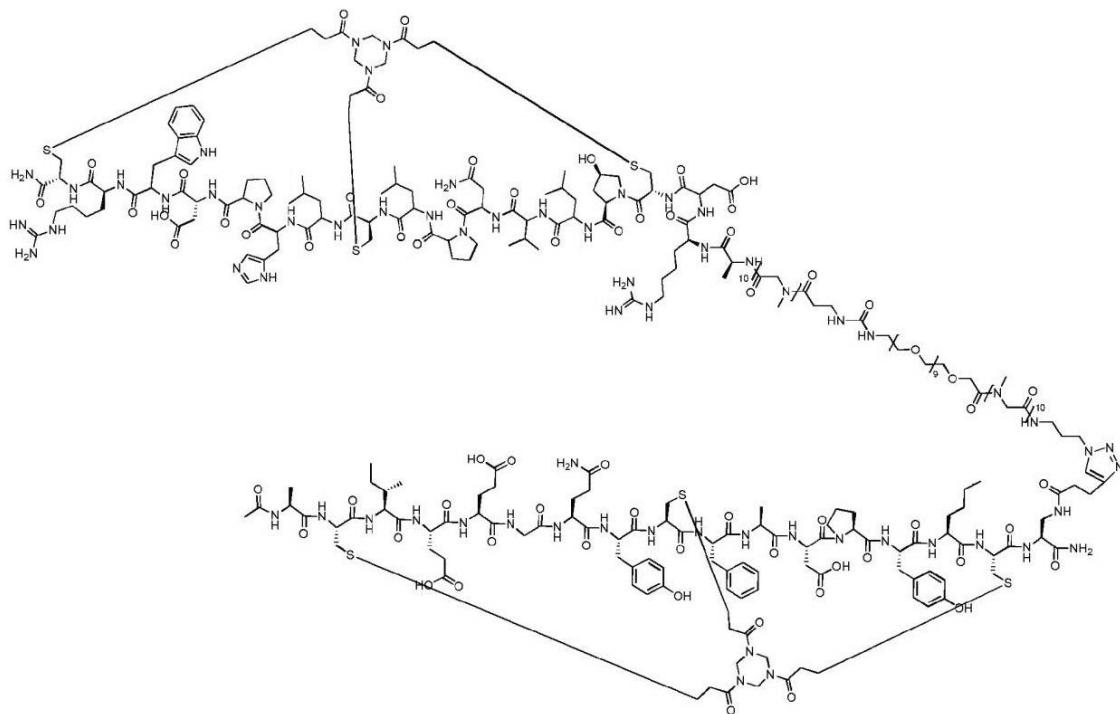
20

30

40

50

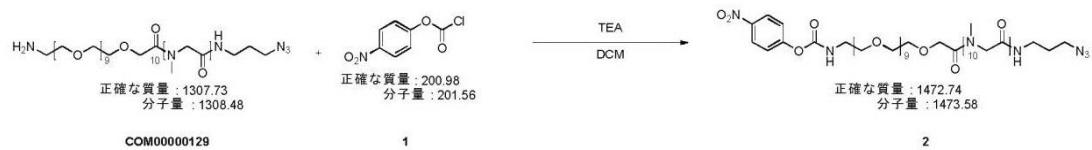
【化 3 6】



化合物 2 を調製する手順

【0220】

【化 3 7】



0 mg、3.14 μmol、0.5当量)のDMF(3mL)中溶液に、TEA(0.7 mg、6.93 μmol、1 μL、1.1当量)を添加した。混合物を脱気し、N₂で3回ページし、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、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: 451.7.12、実測m/z: 1129.8([M/4+H]⁺)、904.1([M/5+H]⁺)、753.7([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(12mg、収率72.36%、純度85.58%)を白色固体として得た。

【0223】

BCY9656を調製する手順

【0224】

【化39】



3

化合物3(11mg、2.44 μmol、1.0当量)、BCY7741(6.0mg、2.63 μmol、1.08当量)およびTHPTA(0.4M、6.1 μL、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回ページした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、6.1 μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、12.2 μL、2.0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、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(計算MW: 6798.66、実測m/z: 1133.8([M/6+H]⁺)、971.9([M/7+H]⁺)、850.7([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。BCY9656(6.8mg、収率37.36%、純度90.97%)を白色固体として得た。

【0225】

BCY9657

【0226】

10

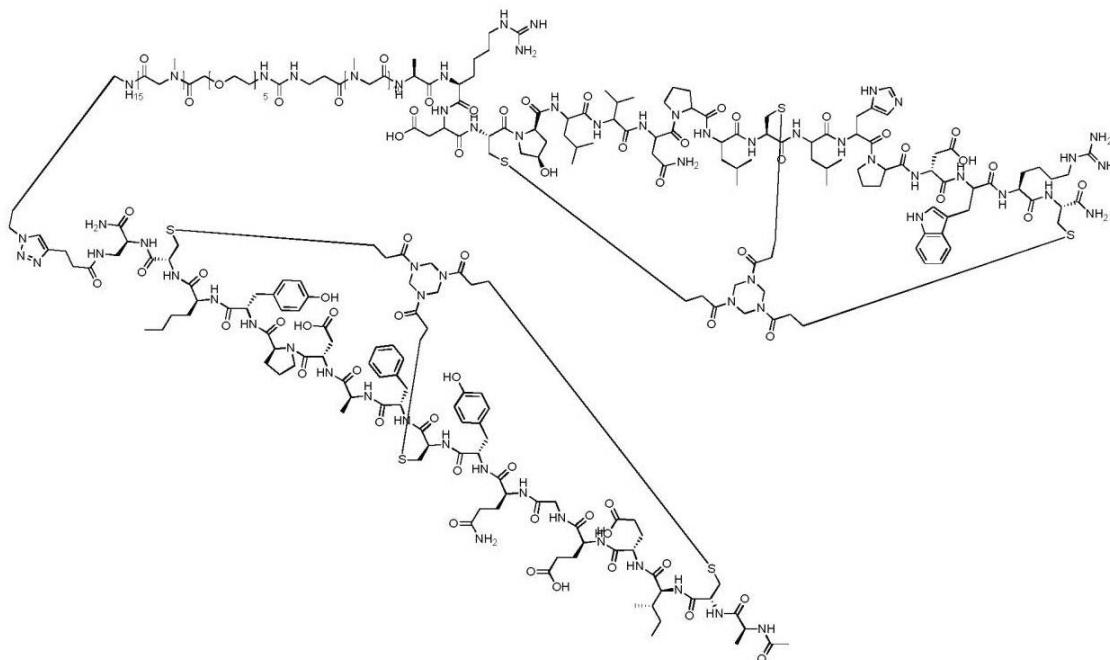
20

30

40

50

【化40】



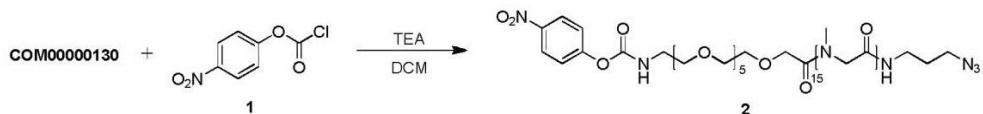
10

20

化合物2を調製する手順

【0227】

【化41】



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 (3mL)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。

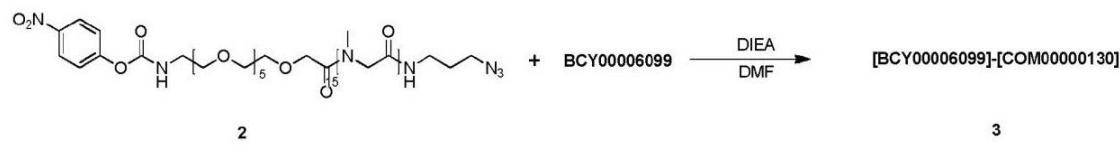
30

【0228】

化合物3を調製する手順

【0229】

【化42】



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 (1mL)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 回バージした) 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 NH₄CO₃ (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: 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 つの主ピーカーが検出された。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。

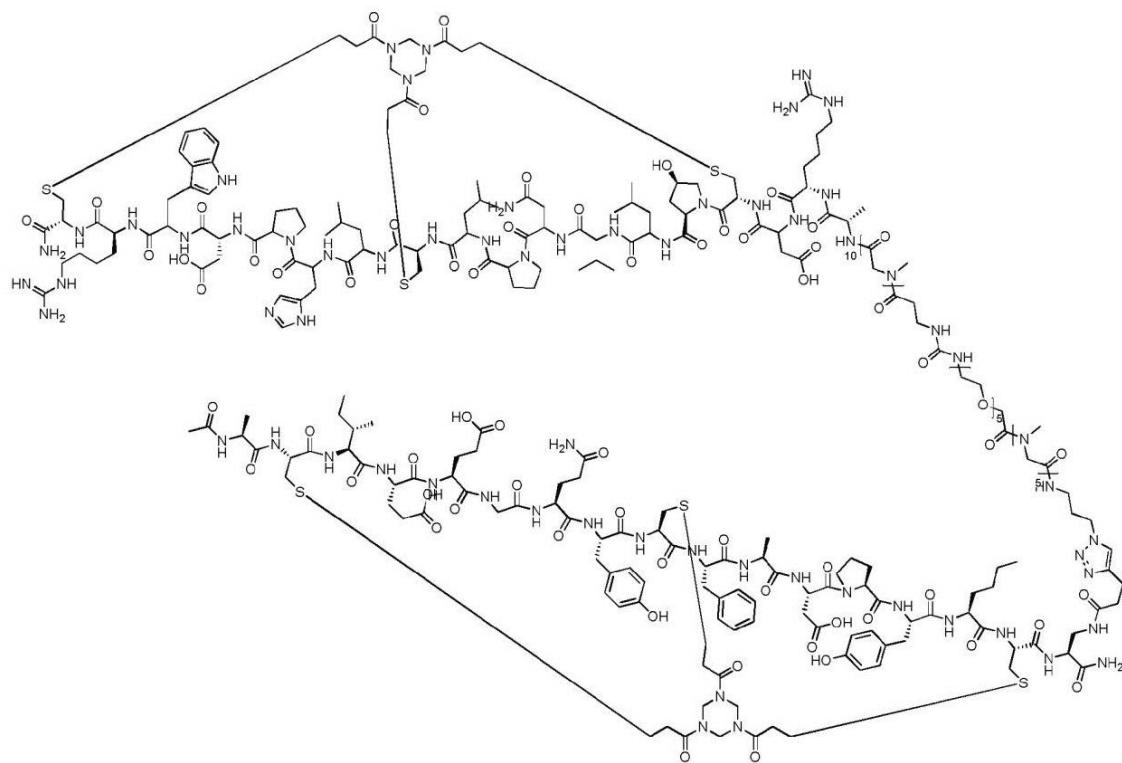
20

【0232】

BCY9658

【0233】

【化44】



30

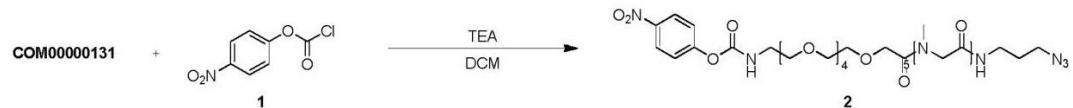
40

50

化合物 2 を調製する手順

【0234】

【化45】



C O M 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。

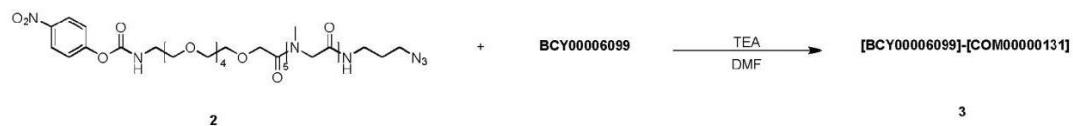
10

【0235】

化合物 3 を調製する手順

【0236】

【化46】



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。

20

【0237】

B C Y 9 6 5 8 を調製する手順

【0238】

【化47】



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 / H₂O (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 O₄ (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 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 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 [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 1 3 . 2 m g 、 収率 50 %) を白色固体として得た。

40

50

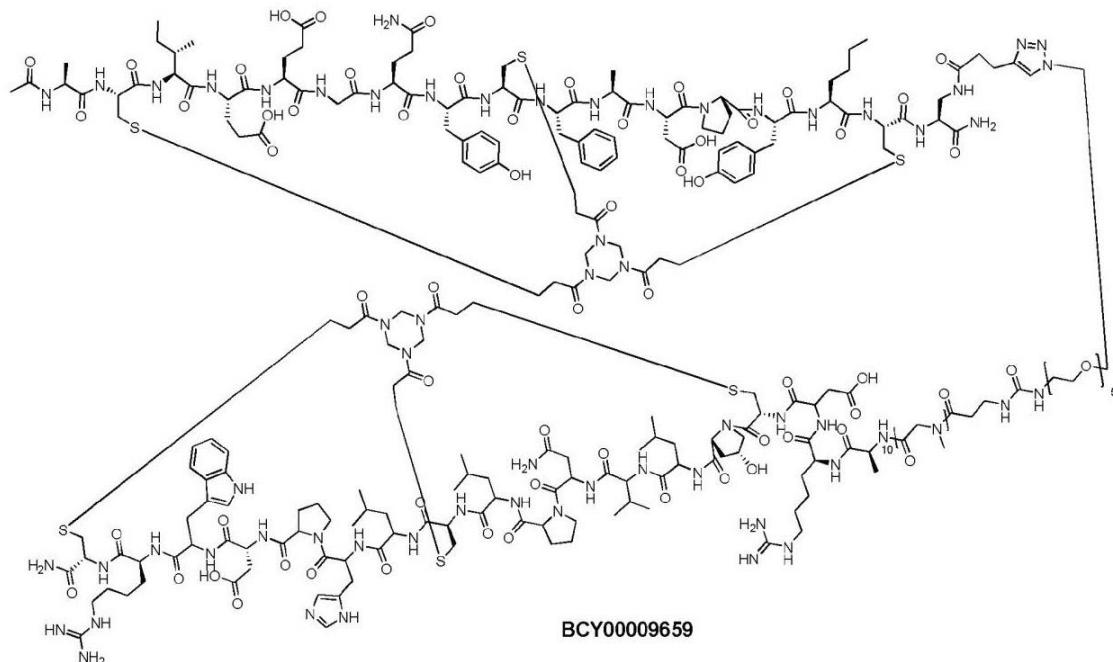
率 21.54%、純度 90.16%) を白色固体として得た。

〔 0 2 3 9 〕

B C Y 9 6 5 9

【 0 2 4 0 】

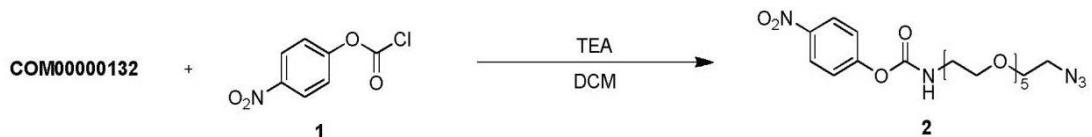
【化 4 8】



化合物 2 を調製する手順

【 0 2 4 1 】

【化 4 9】



C O M 1 3 2 (2 0 . 0 m g 、 6 5 . 2 8 μ m o l 、 1 . 0 当量)、化合物 1 (1 5 . 8 m g 、 7 8 . 3 4 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 μ L 、 5 . 5 当量) を添加した。混合物を 2 5 で 1 時間攪拌した。所望の m / z (M W : 4 7 1 . 4 6 、 実測 m / z : 4 8 9 . 2 ([M + N H₄]⁺)) を有する L C - M S 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 (2 6 m g 、 粗) の無色の油状物を得た。

【 0 2 4 2 】

化合物 3 を調製する手順

【 0 2 4 3 】

【化 5 0】



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

. 33 mg、7.07 μmol、1.5当量)のDMF(3mL)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、2mL、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、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

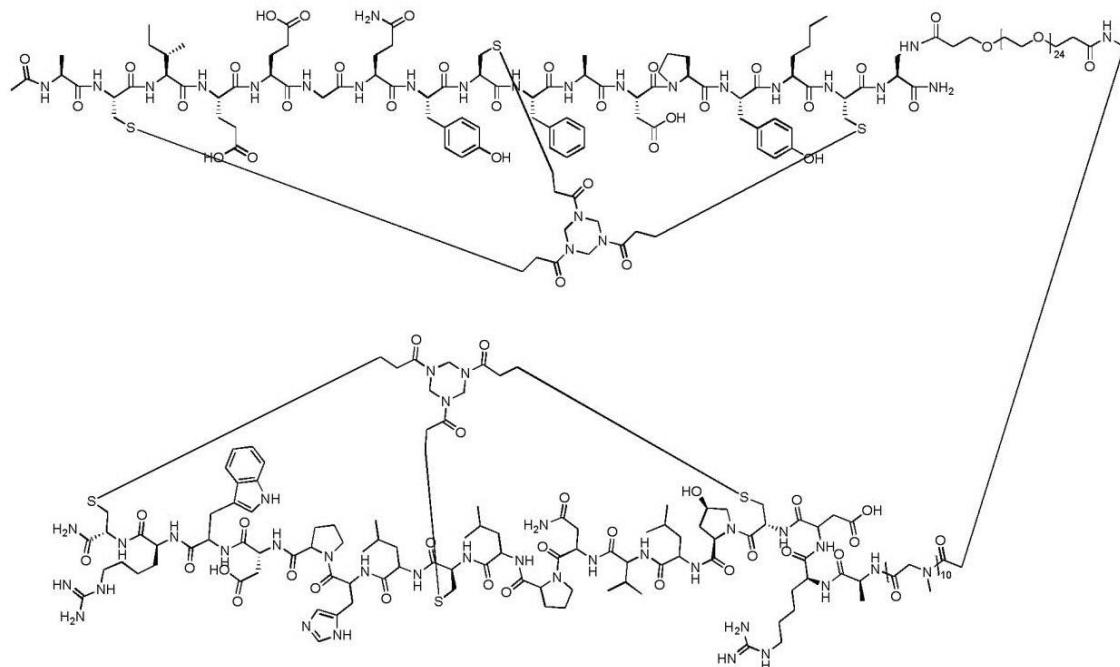
30

【0247】

40

50

【化 5 2】



化合物 2 を調製する手順

【0248】

【化 5 3】



化合物 1 (5.0 mg、3.54 μmol、1.0 当量)、BCY6099 (11.3 mg、3.54 μmol、1.0 当量) の DMF (3 mL) 中溶液に、DIEA (0.9 mg、7.07 μmol、1.2 μL、2.0 当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 20 分間攪拌した。LC - MS は、所望の m/z (MW: 4481.11、実測 m/z : 1101.3 ([M + 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 (15 mg、粗) を白色固体として得た。

【0249】

BCY9758 を調製する手順

【0250】

【化 5 4】



2

化合物 2 (15 mg、3.35 μmol、1.0 当量) および BCY7732 (14.74 mg、6.69 μmol、2.0 当量) の DMF (3 mL) 中溶液に、DIEA (0.9 mg、7.07 μmol、1.2 μL、2.1 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: 6567.48、実測 m/z : 1095.1 ([M + H]⁺)、938.8 ([M + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を濾

30

40

50

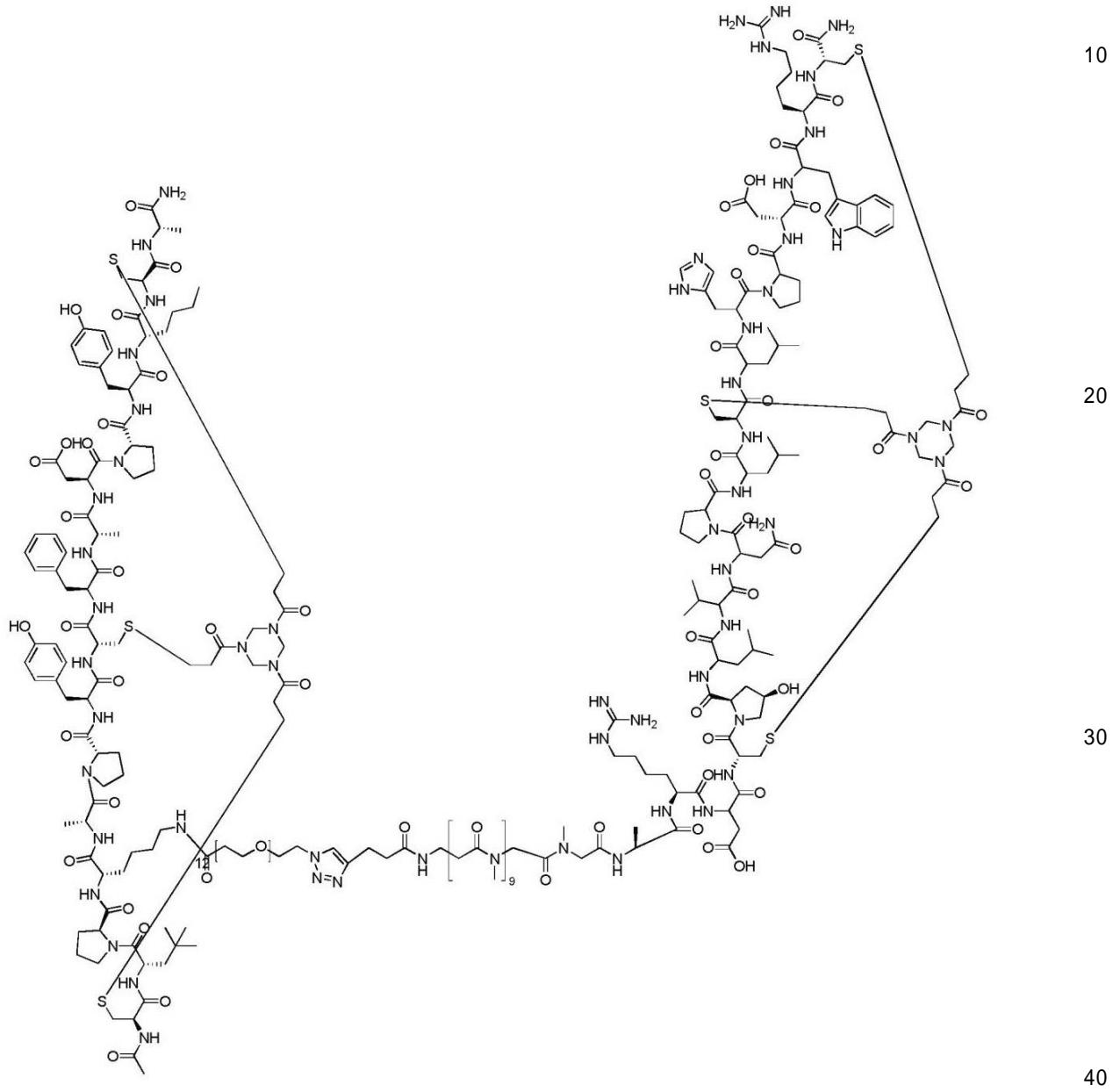
過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を逆相HPLC(TFA条件)によって精製した。BCY9758(5.8mg、収率24.26%、純度91.97%)を白色固体として得た。

【 0 2 5 1 】

B C Y 1 0 5 6 8

【 0 2 5 2 】

【化 5 5】

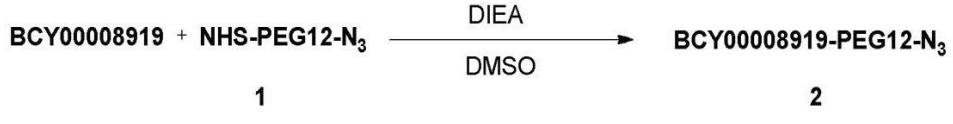


BCY00010568

BCY8919 - PEG12 - N₃を調製する手順

【 0 2 5 3 】

【化 5 6】



B C Y 8 9 1 9 (8 0 . 0 m g、 3 8 . 4 7 μ m o l、 1 . 0 当量) および化合物 1 (2 9 . 6 m g、 4 0 . 0 1 μ m o l、 1 . 0 4 当量) を D M S O (1 m L) に溶解した。次いで、溶液に D I P E A (7 . 4 6 m g、 5 5 . 7 1 μ m o l、 1 0 . 0 μ l、 1 . 5 当量) を添加し、次いで、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 1 9 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 : 2 7 0 5 . 1 6 、 実測 m / z : 1 3 5 3 . 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 H P L C (T F A 条件) によって精製し、化合物 2 (1 8 . 6 m g、 6 . 8 6 μ m o l、 収率 1 7 . 8 3 %、 純度 9 9 . 7 6 %) を白色固体として得た。

【 0 2 5 4 】

B C Y 1 0 5 6 8 を調製する手順

10

【 0 2 5 5 】

【 化 5 7 】



2

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 6 1 6 9 (1 1 . 0 m g、 3 . 3 6 μ m o l、 1 . 0 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、 8 . 3 μ L、 1 . 0 当量) 、 V c N a (1 . 4 m g、 7 . 0 6 μ m o l、 2 . 1 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、 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 回バージした。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 MW : 5 9 6 7 . 9 0 、 実測 m / z : 9 9 5 . 0 0 ([M / 5 + H]⁺) および 1 1 9 4 . 7 0 ([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 8 (1 3 . 4 m g、 2 . 1 6 μ m o l、 収率 6 9 . 4 4 %、 純度 9 6 . 3 %) を白色固体として得た。

20

【 0 2 5 6 】

B C Y 1 0 5 7 0

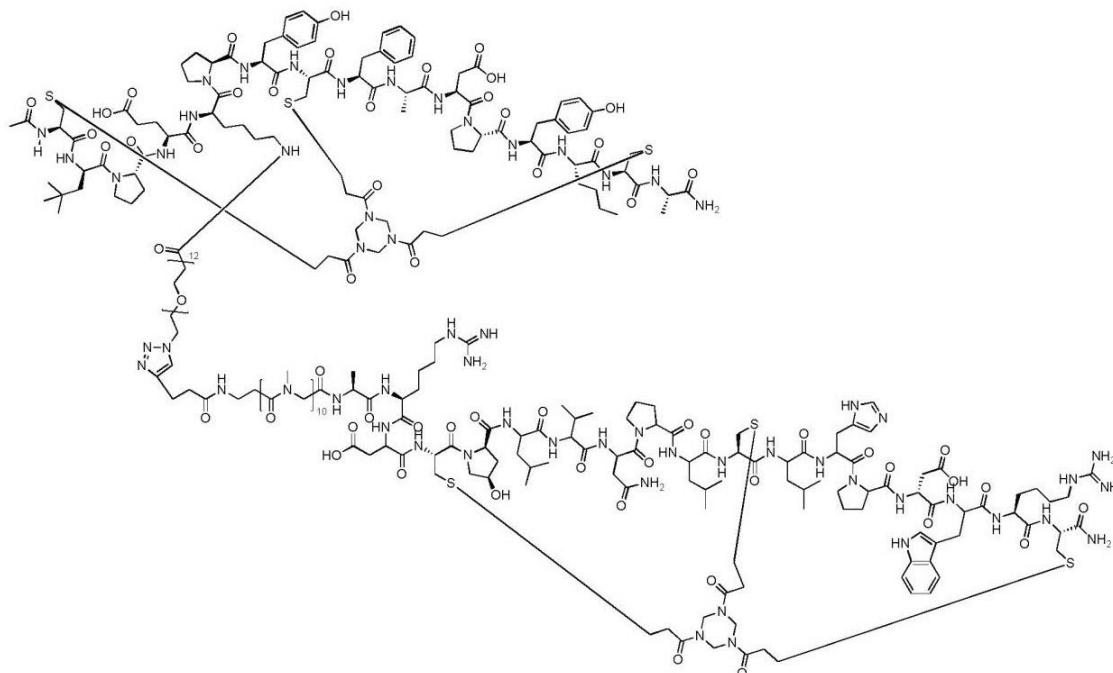
【 0 2 5 7 】

30

40

50

【化 5 8】



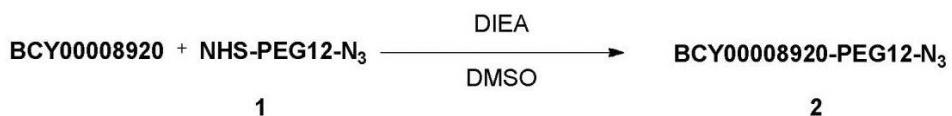
10

20

B C Y 8 9 2 0 - P E G 1 2 - N₃ を調製する手順

[0 2 5 8]

【化 5 9】



B C Y 8 9 2 0 (3 7 m g 、 1 7 . 3 1 μ m o l 、 1 . 0 当量) および化合物 1 (1 5 m g 、 2 0 . 2 5 μ m o l 、 1 . 2 当量) の D M S O (2 m L) 中溶液に、 D I E A (3 . 3 6 m g 、 2 5 . 9 6 μ m o l 、 4 . 5 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、 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 MW : 2 7 6 3 . 2 、 実測 m / z : 6 8 9 . 0 7 ([M / 4 - H⁺])) を有する 1 つの主ピーカーが検出された。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 H P L C (中性条件) によって精製した。化合物 2 (2 2 . 8 m g 、 8 . 1 5 μ m o l 、 収率 4 7 . 0 9 % 、 純度 9 8 . 7 8 %) を白色固体として得た。

[0 2 5 9]

B C Y 1 0 5 7 0 を調製する手順

【 0 2 6 0 】

【化 6 0】



2

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

50

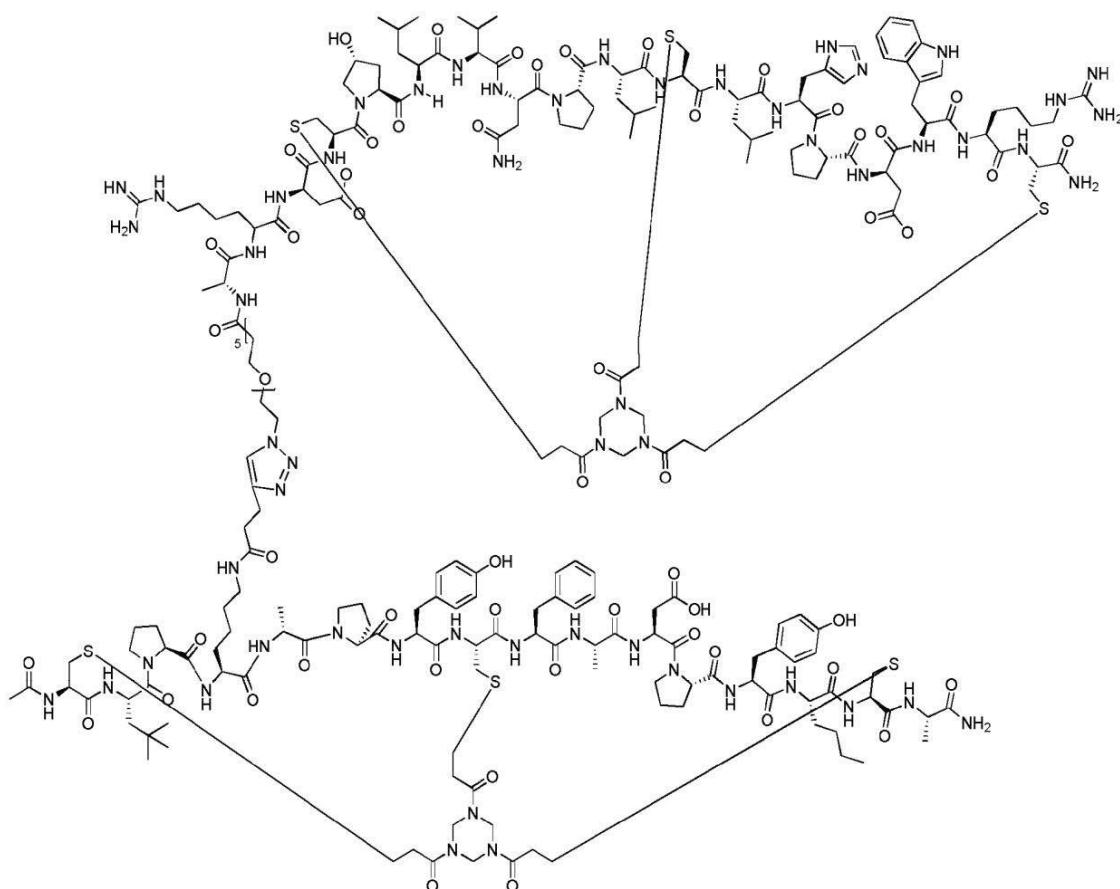
に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、5.4μL、1.0当量)、VcNa(0.4M、10.8μL、2.0当量)およびTHPTA(0.4M、5.4μL、1.0当量)を添加した。最後に、0.2M NH₄HCO₃を添加して、pHを8に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂で3回バージした。反応混合物を、N₂雰囲気下、30度4時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていることを示し、所望のm/z(MS: 6025.93、実測m/z: 1004.56([M/6+H]⁺)および861.48([M/7+H]⁺))を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。粗生成物を分取HPLC(TFA条件)によって精製した。BCY10570(7.2mg、1.17μmol、収率53.9%、純度97.95%)を白色固体として得た。

【 0 2 6 1 】

B C Y 1 0 5 7 4

【 0 2 6 2 】

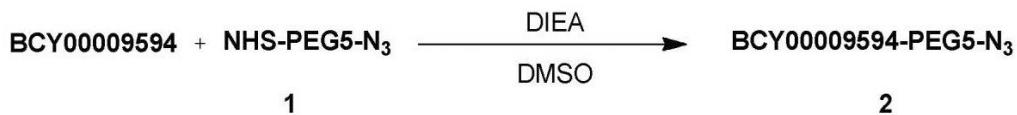
【化 6 1】



化合物 2 を調製する手順

【 0 2 6 3 】

【化 6 2】



B C Y 9 5 9 4 (6 5 m g 、 2 7 . 0 7 μ m o l 、 1 当量)、化合物 1 (1 2 . 0 0 m g 、 2 7 . 7 5 μ m o l 、 1 . 0 2 当量) の D M S O (1 m L) 中溶液に、 D I E A (5 . 2 5 m g 、 4 0 . 6 1 μ m o l 、 7 . 0 7 μ L 、 1 . 5 当量) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3 0 度で 2 時間攪拌した。L C - M S は、 B C Y 9 5 9 4 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)、收率 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】



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-BuOH / H₂O (1:1、2 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、18.4 μL、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、36.8 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 : 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、收率 46.29%、純度 94.40%) を白色固体として得た。

【0266】

BCY10575

【0267】

10

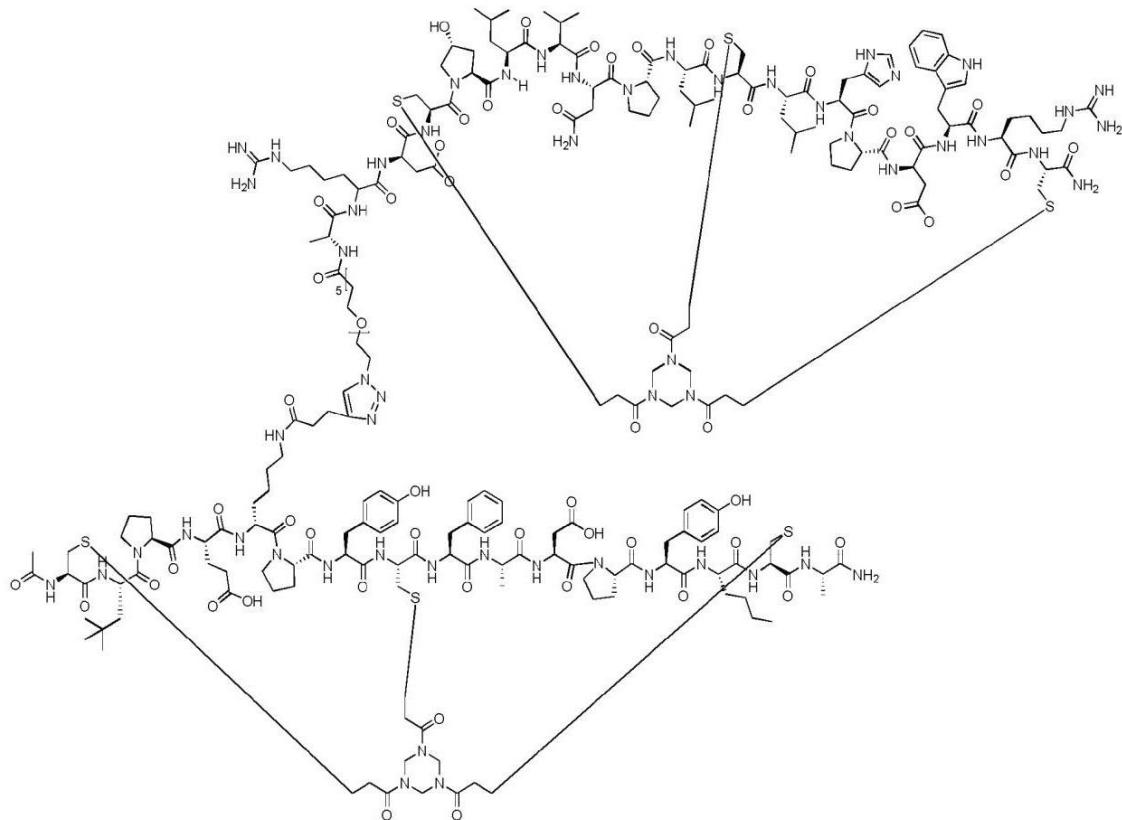
20

30

40

50

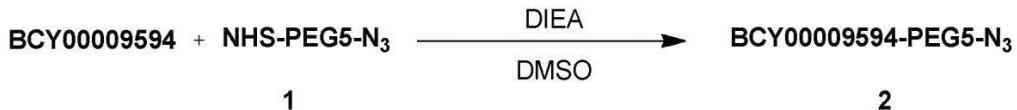
【化 6 4】



化合物 2 を調製する手順

【 0 2 6 8 】

【化 6 5】



B C Y 9 5 9 4 (6 5 m g 、 2 7 . 0 7 μ m o l 、 1 当量) 、 化合物 1 (1 2 . 0 m g 、 2 7 . 7 5 μ m o l 、 1 . 0 2 当量) の D M S O (1 m L) 中溶液に、 D I E A (5 . 2 5 m g 、 4 0 . 6 1 μ m o l 、 7 . 0 7 μ L 、 1 . 5 当量) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3 0 度で 2 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 / z [計算 MW : 2 7 1 8 . 1 3 実測 m / z : 9 0 6 . 0 4 ([M / 3 + H]⁺) および 1 3 5 9 . 0 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 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 2 (4 2 . 6 m g 、 1 5 . 6 7 μ m o l 、 収率 5 7 . 8 9 % 、 純度 1 0 0 %) を白色固体として得た。

【 0 2 6 9 】

B C Y 1 0 5 7 5 を調製する手順

【 0 2 7 0 】

【化 6 6】



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

10

20

30

40

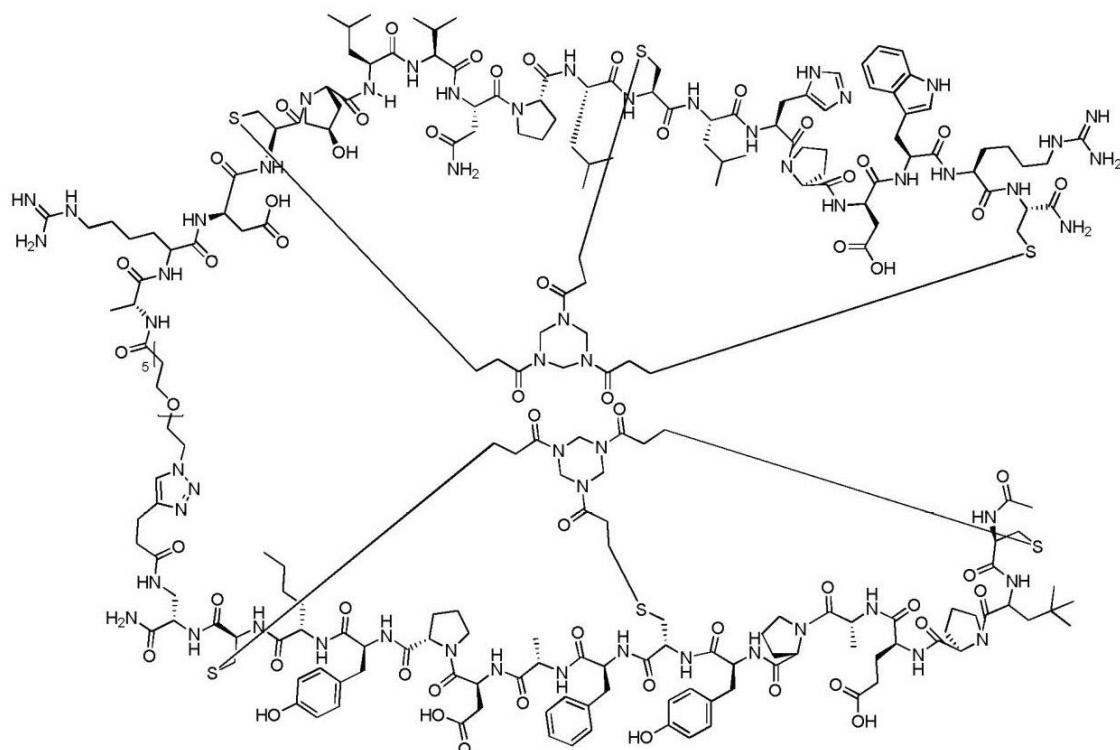
当量)の混合物を t - BuOH / H₂O (1 : 1、2 mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、18.4 μL、1.0当量)およびVcNa (0.4 M、36.8 μL、2.0当量)をN₂下で添加した。0.2 M NH₄HCO₃ (1 : 1 t - BuOH / H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、25~30で12時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていることを示し、所望のm/z [計算MW: 4935.71、実測m/z: 1234.59 ([M/4+H]⁺)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 (1.2 mg、2.37 μmol、収率32.27%、純度97.67%)を白色固体として得た。

【 0 2 7 1 】

B C Y 1 0 5 7 6

【 0 2 7 2 】

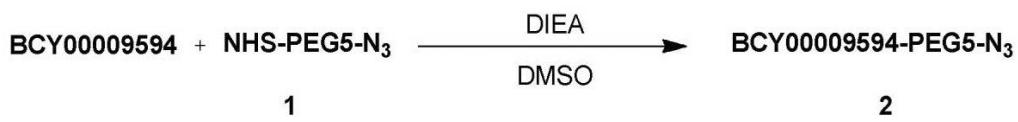
【化 6 7】



化合物 2 を調製する手順

【 0 2 7 3 】

【化 6 8】



B C Y 9 5 9 4 (3 0 . 0 mg、 1 2 . 5 0 μ mol、 1 . 0 当量)、 化合物 1 (5 . 5 4 mg、 1 2 . 8 1 μ mol、 1 . 0 2 当量) の D M S O (1 mL) 中溶液に、 D I E A (2 . 4 2 mg、 1 8 . 7 4 μ mol、 3 . 3 μ L、 1 . 5 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 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 7 1 8 . 1 3 、 実測 m / z : 9 0 6 . 4 5 ([M / 3 + H]⁺) および 1 3 5 9 . 5 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(16mg、5.80μmol、収率46.42%、純度98.54%)を白色固体として得た。

【0274】

BCY10576を調製する手順

【0275】

【化69】



2

10

化合物2(17.0mg、6.25μmol、1.0当量)、BCY11014(13.6mg、6.25μmol、1.0当量)およびTHPTA(0.4M、1.8μL、2.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、15.6μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、1.84μL、2.0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、25~30で12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を示し、所望のm/z[計算MW:4893.63、実測m/z:1224.7([M/4+H]⁺)および980.01([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。BCY10576(20.5mg、4.13μmol、収率66.02%、純度98.57%)を白色固体として得た。

20

【0276】

BCY10577

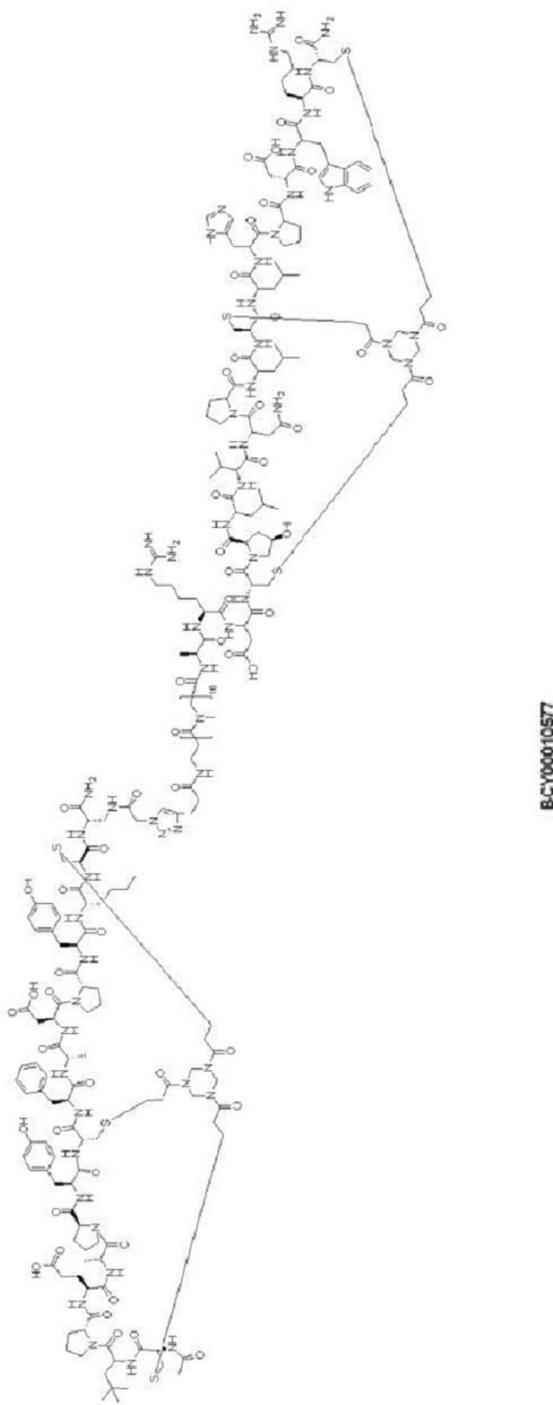
【0277】

30

40

50

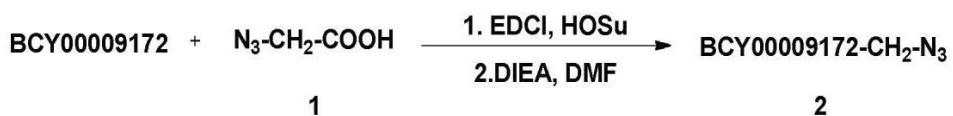
【化 7 0 】



化合物2を調製する手順

〔 0 2 7 8 〕

【化 7 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 HOStu (5.7 mg

、49.5 μmol、1.0当量)を添加した。混合物を25~30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(53mg、25.29 μmol、0.47当量)およびDIEA(3.27mg、25.29 μmol、4.4 μL、0.47当量)を反応混合物に添加した。混合物を25~30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(30mg、13.77 μmol、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(20mg、9.18 μmol、1.0当量)およびBCY6169(32.95mg、10.10 μmol、1.1当量)を最初にt-BuOH/H₂O(1:1)2mLに溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、23 μL、1当量)、VcNa(0.4M、46 μL、2.0当量)およびTHPTA(0.4M、23 μL、1.0当量)を添加した。最後に、1M 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(16.2mg、2.98 μmol、収率32.43%)を白色固体として得た。

20

30

【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

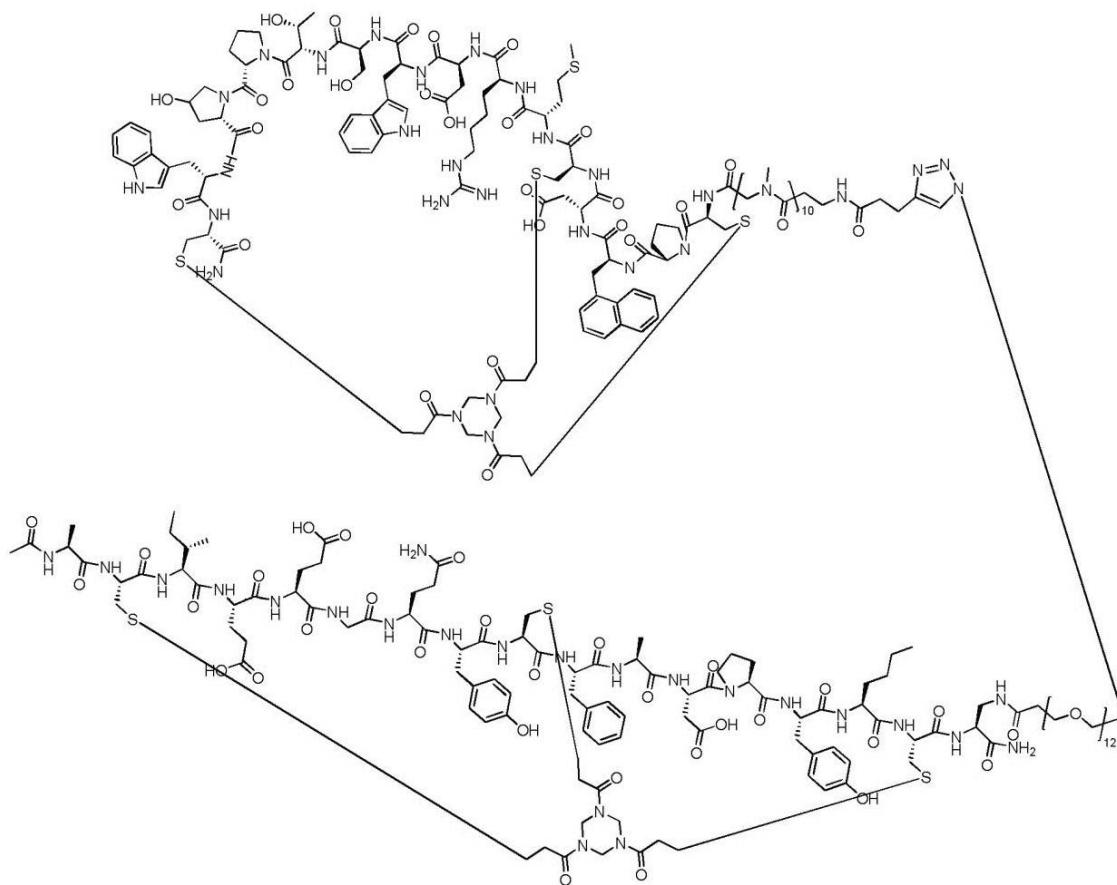
BCY8854

【0282】

40

50

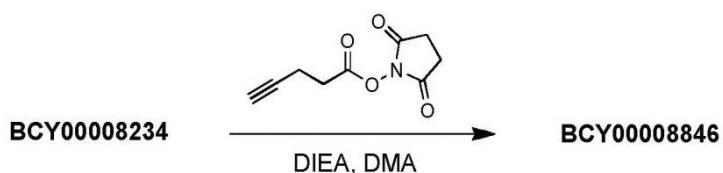
【化73】



B C Y 8 8 4 6 を調製する一般的な手順

【0283】

【化74】



B C Y 8 2 3 4 (P Y A 部分が存在しないことを除いて、 B C Y 8 8 4 6 と同一のペプチド； 3 0 0 m g 、 1 0 2 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M A (3 m L) 中溶液に、 D I E A (5 2 . 5 m g 、 4 0 6 μ m o l 、 7 0 . 8 μ L 、 4 . 0 当量) を添加し、 1 0 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 (2 5 . 8 m g 、 1 3 2 μ m o l 、 1 . 3 当量) をここに添加し、混合物を 2 0 でさらに 1 6 時間、さらに攪拌した。L C - M S は、 B C Y 8 2 3 4 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 : 3 0 3 4 . 4 3 、実測 m / z : 1 0 1 1 . 8 ([M / 3 + H] ⁺) 、 1 5 1 7 . 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 H P L C (中性条件) によって精製して、化合物 B C Y 8 8 4 6 (2 9 0 m g 、 9 5 . 6 μ m o l 、収率 9 4 . 1 %) を白色固体として得た。

【0284】

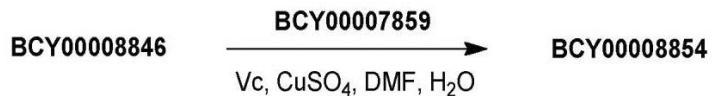
B C Y 8 8 5 4 を調製する一般的な手順

【0285】

40

50

【化75】



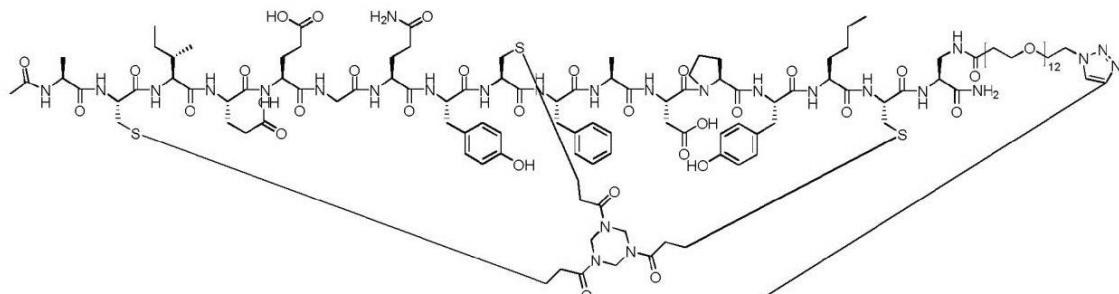
B C Y 8 8 4 6 (2 3 4 m g 、 7 7 . 1 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M F (5 m L) 中溶液に、 B C Y 7 8 5 9 (B C Y 7 9 8 5 に記載されるように調製され得る ; 2 2 0 m g 、 7 7 . 8 μ m o l 、 1 . 0 当量) を添加し、引き続いて (2 R) - 2 - [(1 S) - 1 , 2 - ジヒドロキシエチル] - 3 , 4 - ジヒドロキシ - 2 H - フラン - 5 - オン (0 . 8 0 M 、 9 6 3 μ L 、 1 . 0 当量) および C u S O 4 (0 . 8 0 M 、 2 8 9 μ L 、 0 . 3 当量) を添加した。混合物を 2 0 で 2 時間攪拌した。L C - M S は、 B C Y 8 8 4 6 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 8 6 1 . 5 9 、 実測 m / z : 8 3 7 . 9 ([M / 7 + H] ⁺) 、 9 7 7 . 6 ([M / 6 + H] ⁺) 、 1 1 7 3 . 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 H P L C (A : H 2 O 中 0 . 0 7 5 % T F A 、 B : A C N) によって精製して、化合物 B C Y 8 8 5 4 (2 9 2 m g 、 4 6 . 8 μ m o l 、 収率 6 0 . 8 % 、 純度 9 5 . 9 % 、 T F A) を白色固体として得た。

【0286】

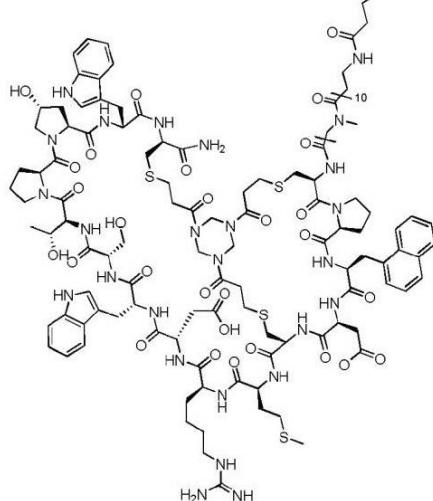
B C Y 9 3 5 0

【0287】

【化76】



10



20

30

40

B C Y 8 7 8 2 - P Y A を調製する一般的な手順

【0288】

50

【化77】



BCY8782 (PYA部分が存在しないことを除いて、BCY11942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、BCY8782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、BCY11942 (20.0 mg、6.00 μmol、収率88.6%、純度91.0%)を白色固体として得た。

【0289】

BCY9350を調製する一般的な手順

【0290】

【化78】



BCY11942 (20 mg、6.59 μmol、1.0当量)およびBCY7859 (BCY7985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、(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 (0.4 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、BCY8782-PYA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、BCY9350 (14.5 mg、2.40 μmol、収率36.5%、純度97.2%)を白色固体として得た。

【0291】

BCY9351

【0292】

10

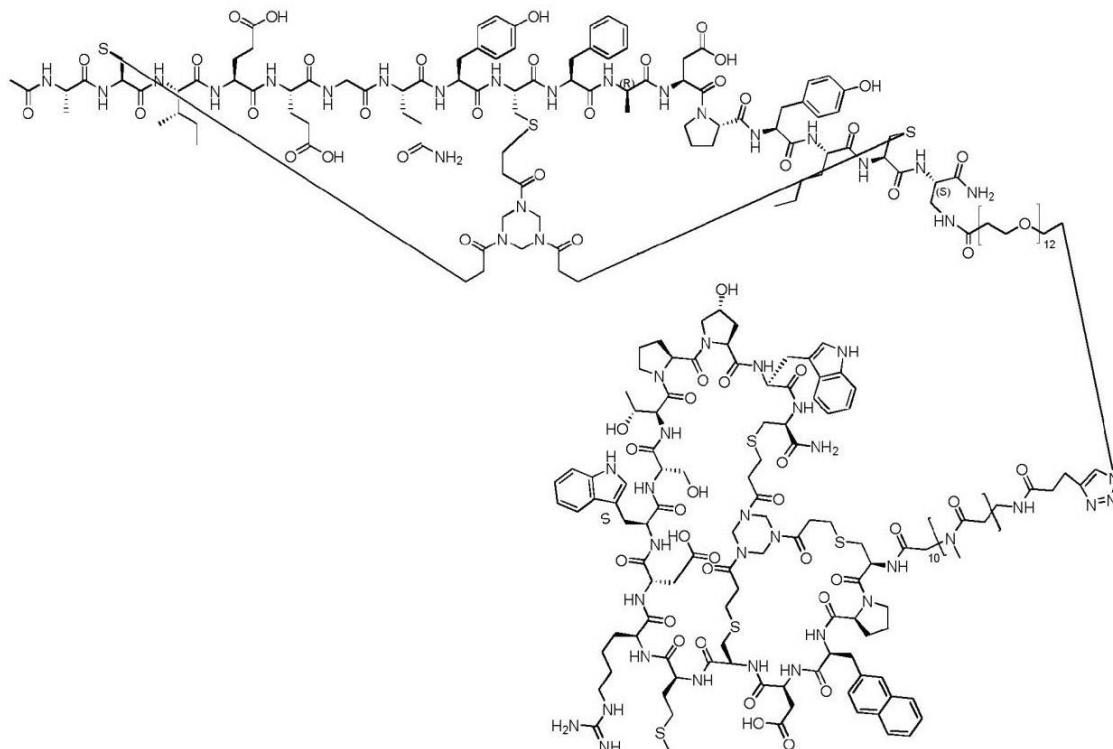
20

30

40

50

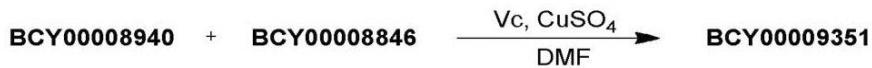
【化 7 9】



B C Y 9 3 5 1 を調製する一般的な手順

【0 2 9 3】

【化 8 0】



B C Y 8 9 4 0 (B C Y 8 9 4 2 に記載されるように調製され得る ; 9 . 4 m g 、 3 . 33 μ m o l 、 1 . 0 1 当量) および B C Y 8 8 4 6 (1 0 . 0 m g 、 3 . 3 0 μ m o l 、 1 . 0 当量) の D M F (1 m L) 中溶液に、窒素雰囲気下で、 V c (0 . 4 M 、 1 6 5 μ L 、 2 0 . 0 当量) および C u S O 4 (0 . 4 M 、 4 9 . 4 μ L 、 6 . 0 当量) を添加した。混合物を 2 5 °C で 1 時間攪拌した。L C - M S は、 B C Y 8 9 4 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 : 5 8 6 1 . 5 9 、 実測 m / z : 9 7 5 . 4 [M / 6 + H] + 、 1 1 7 2 . 3 [M / 5 + H] +) を有する 1 つの主ピーカーが検出された。反応混合物を分取 H P L C (A : H 2 O 中 0 . 0 7 5 % T F A 、 B : A C N) によって精製して、 B C Y 9 3 5 1 (5 . 3 0 m g 、 0 . 9 0 4 μ m o l 、 収率 2 6 . 3 % 、 純度 9 6 . 0 %) を白色固体として得た。

【0 2 9 4】

B C Y 9 3 9 9

【0 2 9 5】

30

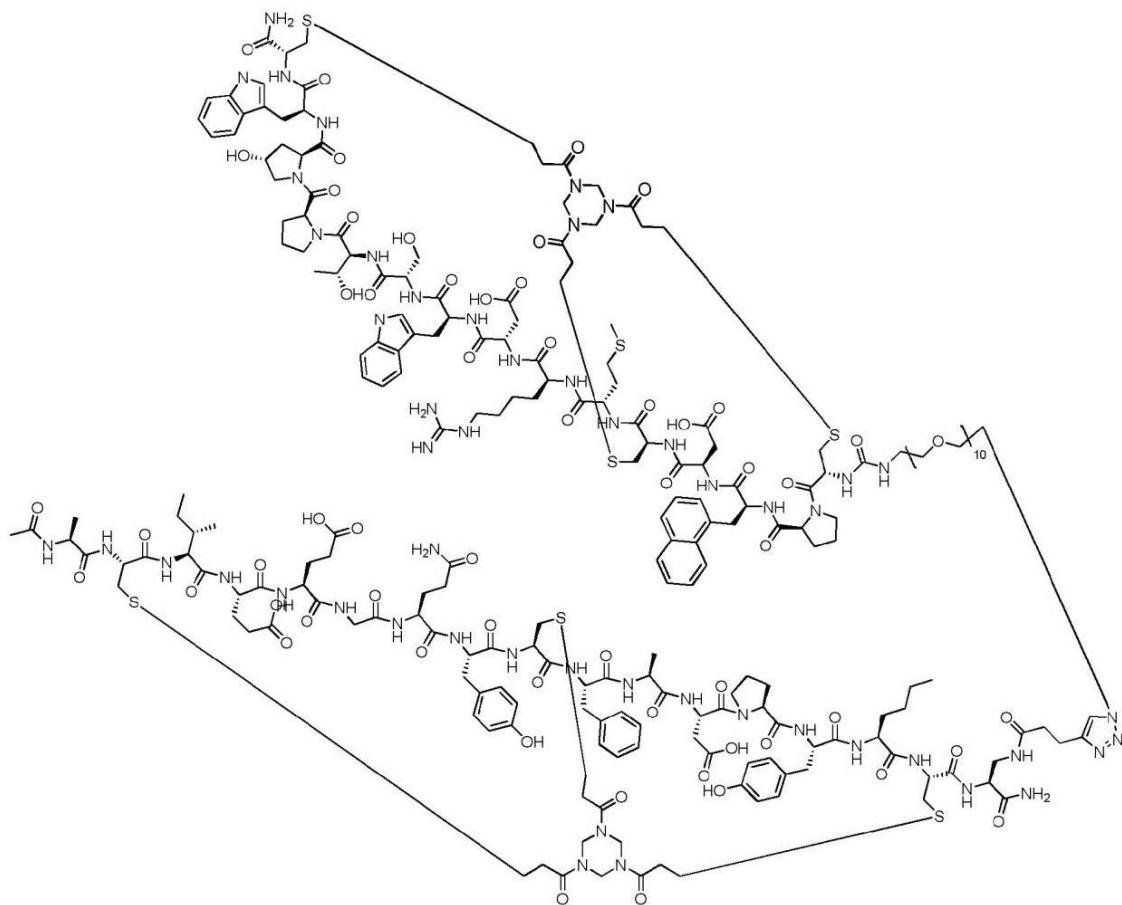
20

40

40

50

【化 8 1】



化合物 2 を調製する手順

【0296】

【化 8 2】



COM134 (30 mg、56.97 μmol)、化合物1 (17.22 mg、85.45 μmol、11.9 μL) 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、COM134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+NH₄]⁺)) 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。

【0297】

化合物3を調製する手順

【0298】

10

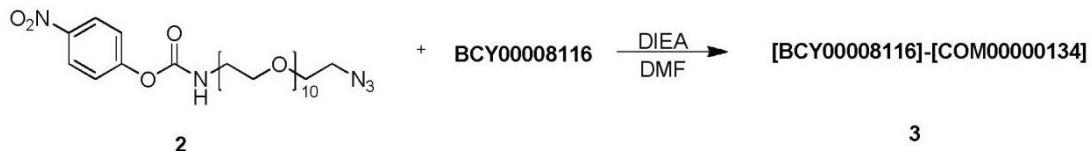
20

30

40

50

【化83】



化合物2(15mg、21.68μmol)およびBCY8116(47mg、21.68μmol)のDMF(1mL)中溶液に、DIET(8.41mg、65.05μmol、11.33μL)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(20mg、収率33.41%、純度98.71%)を白色固体として得た。

【0299】

BCY9399を調製する手順

【0300】

【化84】



3

化合物3(20.0mg、5.35μmol、1.0当量)、BCY7741(13.0mg、5.70μmol、1.01当量)およびTHPTA(0.4M、13.4μL、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、13.4μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、26.8μL、2.0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、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。BCY9399(9.1mg、収率27.20%、純度96.29%)を白色固体として得た。

【0301】

BCY9400

【0302】

10

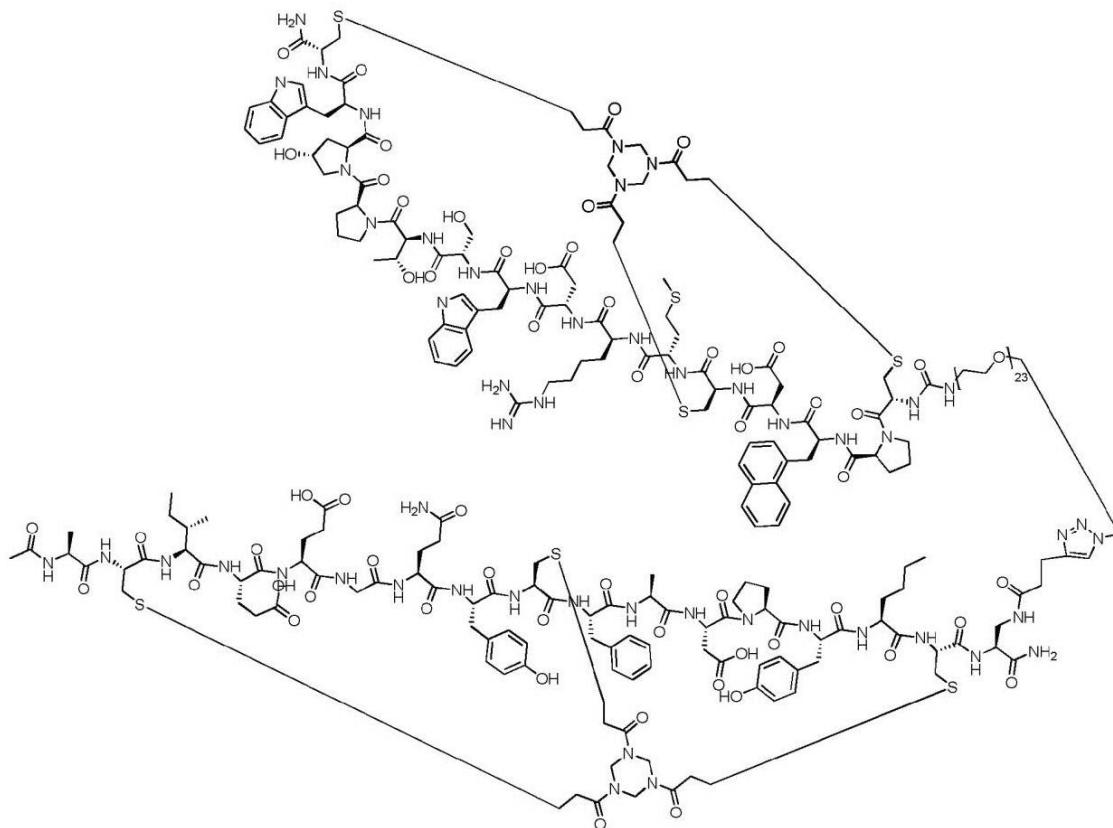
20

30

40

50

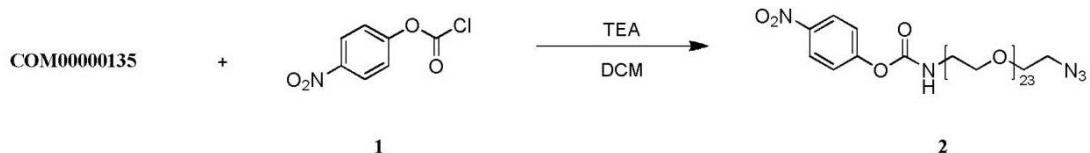
【化 8 5】



化合物 2 を調製する手順

【0303】

【化 8 6】



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+NH₄]⁺)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)によって精製して、化合物2(18 mg)を白色固体として得た。

40

【0304】

化合物を調製する手順

【0305】

【化 8 7】



50

化合物 2 (15 . 5 mg、7 . 12 μ mol) および BCY8116 (9 mg、7 . 12 μ mol) の DMF (2 mL) 中溶液に、DIEA (1 . 4 mg、10 . 68 μ mol 、1 . 9 μ 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 (MW : 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 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 3 (19 . 5 mg、5 . 91 μ mol 、収率 33 . 41 % 、純度 83 . 07 %) を白色固体として得た。

【0306】

BCY9400 を調製する手順

10

【0307】

【化88】



化合物 3 (19 . 5 mg、5 . 91 μ mol) 、 BCY7741 (14 mg、6 . 14 μ mol 、1 . 01 当量) および THPTA (0 . 4 M、15 μ L 、1 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、15 μ L 、1 当量) および VcNa (0 . 4 M、30 μ L 、2 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 : 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 HPLC (TFA 条件) によって直接精製した。BCY9400 (13 . 9 mg、2 . 33 μ mol 、収率 27 . 20 % 、純度 93 . 56 %) を白色固体として得た。

20

【0308】

BCY9401

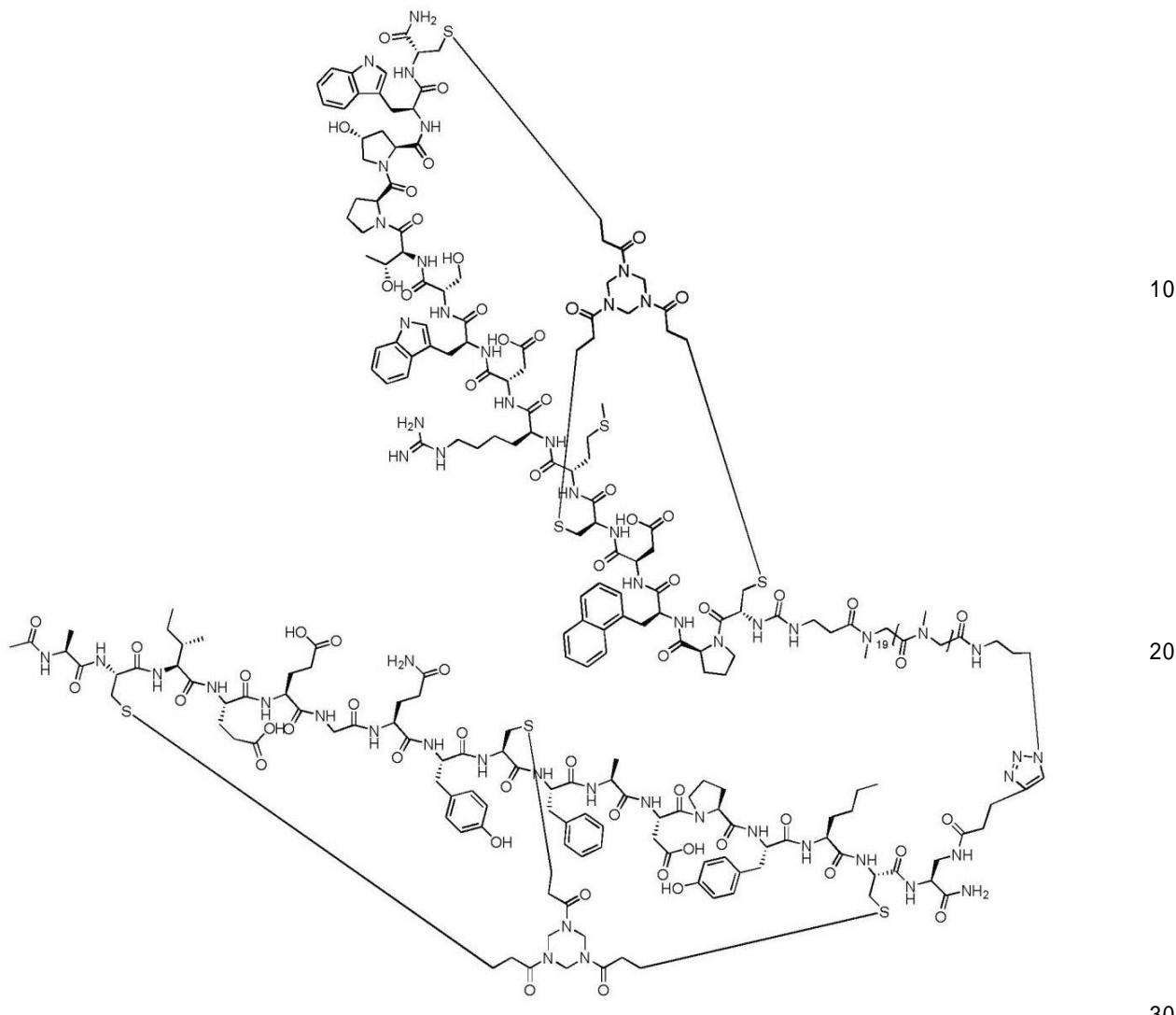
30

【0309】

40

50

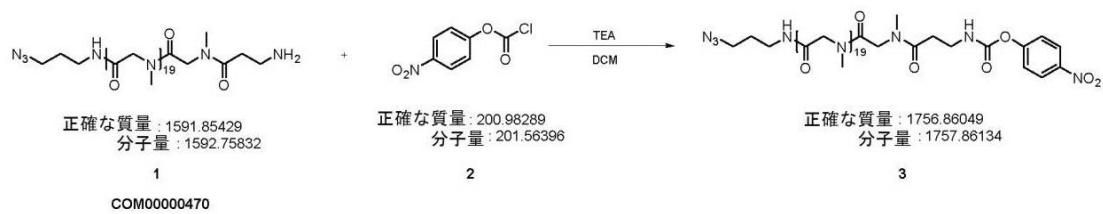
【化 8 9】



化合物 3 を調製する手順

【0310】

【化 9 0】



化合物 1 (50.0 mg、31.39 μmol、1 当量)、化合物 2 (6.6 mg、3.2.96 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。

【0311】

化合物 4 を調製する手順

【0312】

【化91】



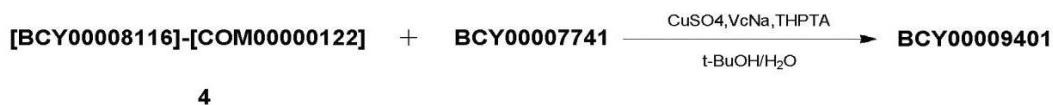
化合物 3 (20 mg、11.38 μmol、1当量)、BCY8116 (25 mg、1.51 μmol、1.01当量) の DMF (4 mL) 中溶液に、DIEA (2.2 mg、1.7.07 μmol、2.97 μL、1.5当量) を添加した。混合物を 25 ~ 30 で 12 時間攪拌した。LC - MS は、化合物 3 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z (MW: 3791.23、実測 m/z : 1263.2 ([M + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応物を分取 HPLC (中性条件) によって直接精製した。化合物 4 (10 mg、2.43 μmol、収率 21.33%、純度 92%) を無色の油状物として得た。

【0313】

BCY9401 を調製する手順

【0314】

【化92】



化合物 4 (10 mg、2.43 μmol、0.9 当量)、BCY7741 (6.32 mg、2.77 μmol、1.0 当量) および THPTA (0.4 M、6.7 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 回バージした) に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.4 M、6.7 μL、1.0 当量) および VcNa (0.4 M、13.4 μL、2.0 当量) を N₂ 下で添加した。0.2 M NH₄CO₃ (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 4 が完全に消費されていることを示し、所望の m/z [MW: MW: 6072.77、実測 m/z : 1012.00 ([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 HPLC (TFA 条件) によって直接精製した。BCY9401 (8.4 mg、1.56 μmol、収率 59.31%、純度 95.52%) を白色固体として得た。

【0315】

BCY9403

【0316】

10

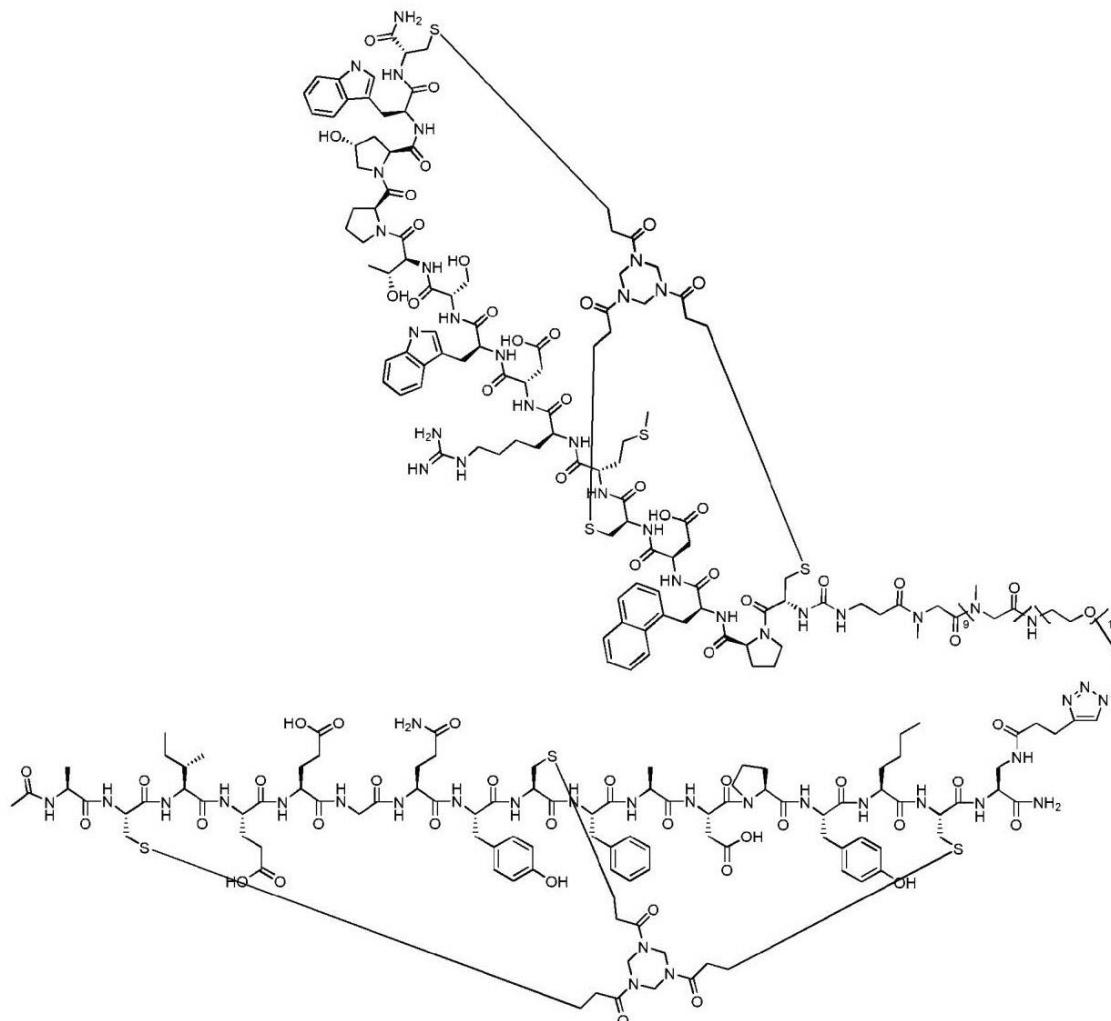
20

30

40

50

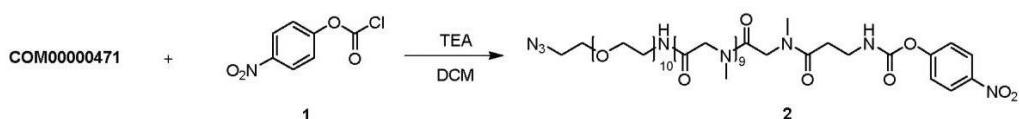
【化93】



化合物2を調製する手順

【0317】

【化94】



COM471(100.0mg、76.42μmol、1.0当量)、4-ニトロフェニルクロロホルメート(16.2mg、80.25μmol、1.05当量)のDCM(10mL)中溶液に、TEA(11.6mg、114.64μmol、16.0μL、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、COM471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つの主ビーグが検出された。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(62.8mg、42.67μmol、収率55.84%、純度48.37%)を白色の油状物として得た。

【0318】

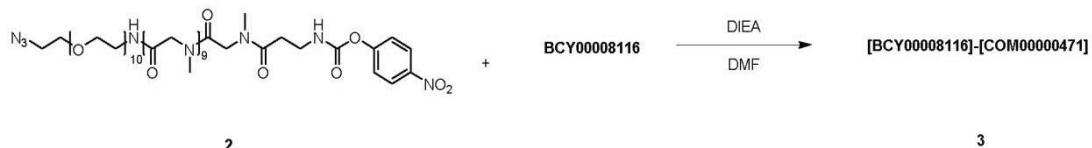
化合物3を調製する手順

【0319】

40

50

【化 9 5】



化合物2(44mg、29.46μmol、1.0当量)、BCY8116(63mg、29.18μmol、1.0当量)のDMF(2mL)中溶液に、DIEA(5.66mg、43.77μmol、7.62μL、1.5当量)を添加した。混合物を40℃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(MW:3506.95、実測m/z:1168.58([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HPLC(TFA条件)によって精製した。化合物3(20mg、5.42μmol、収率18.57%、純度95.04%)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】



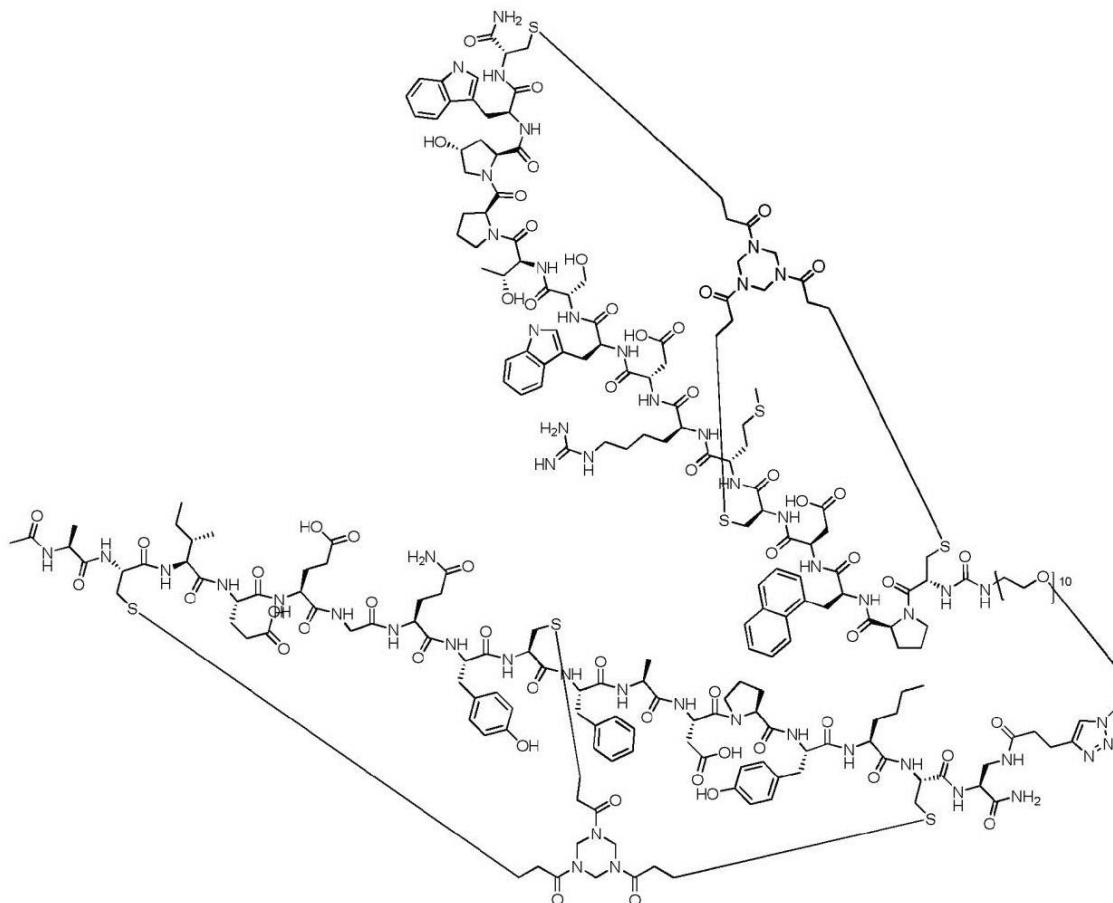
化合物3(10.0mg、2.71μmol、1.0当量)およびTHPTA(0.4M、7μL、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、7μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、14μL、2.0当量)をN₂下で添加した。0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、25~30℃で12時間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていることを示し、所望のm/z [MW: 578.8, 49, 実測m/z: 1157.00 ([M/5+H]⁺)および964.60 ([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。BCY9403(2.1mg、0.34μmol、収率11.93%、純度93.80%)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]

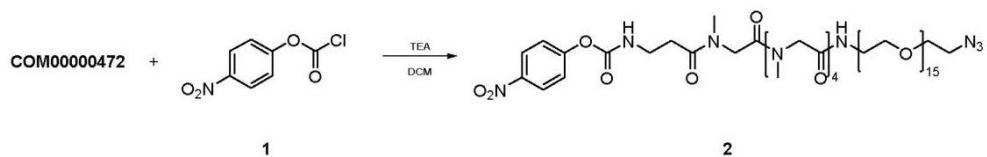
【化 9 7】



化合物 2 を調製する手順

【 0 3 2 4 】

【化 9 8】



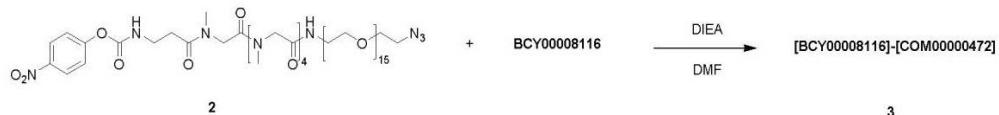
C O M 4 7 2 (4 4 . 7 m g 、 3 8 . 1 μ m o l) 、 化合物 1 (9 . 2 m g 、 4 5 . 7 2 μ m o l) の D C M (4 m L) 中溶液に、 T E A (5 . 8 m g 、 5 7 . 1 4 μ m o l 、 8 μ L) を添加した。混合物を 2 5 度で 2 時間攪拌した。L C - M S は、 C O M 4 7 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (M W : 1 3 3 8 . 4 5 、 実測 m / z : 6 8 6 . 2 3 ([M / 2 + N H 4⁺])) を有する 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 】

【化99】



化合物2(20mg、14.94μmol)およびBCY8116(38.96mg、17.93μmol)のDMF(4mL)中溶液に、DIEA(1.9mg、14.94μmol、2.6μL)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:3371.82、実測m/z:1123.94([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(10mg、収率99.07%、純度19.66%)を白色固体として得た。

10

【0327】

BCY9405を調製する手順

【0328】

【化100】



20

化合物3(10.0mg、2.97μmol、1.0当量)、BCY7741(7.4mg、3.26μmol、1.1当量)およびTHPTA(1.3mg、2.97μmol、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、7.5μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、151μL、2.0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、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:5653.36、実測m/z:1130.47([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。BCY9405(7.8mg、収率46.08%、純度97.8%)を白色固体として得た。

30

【0329】

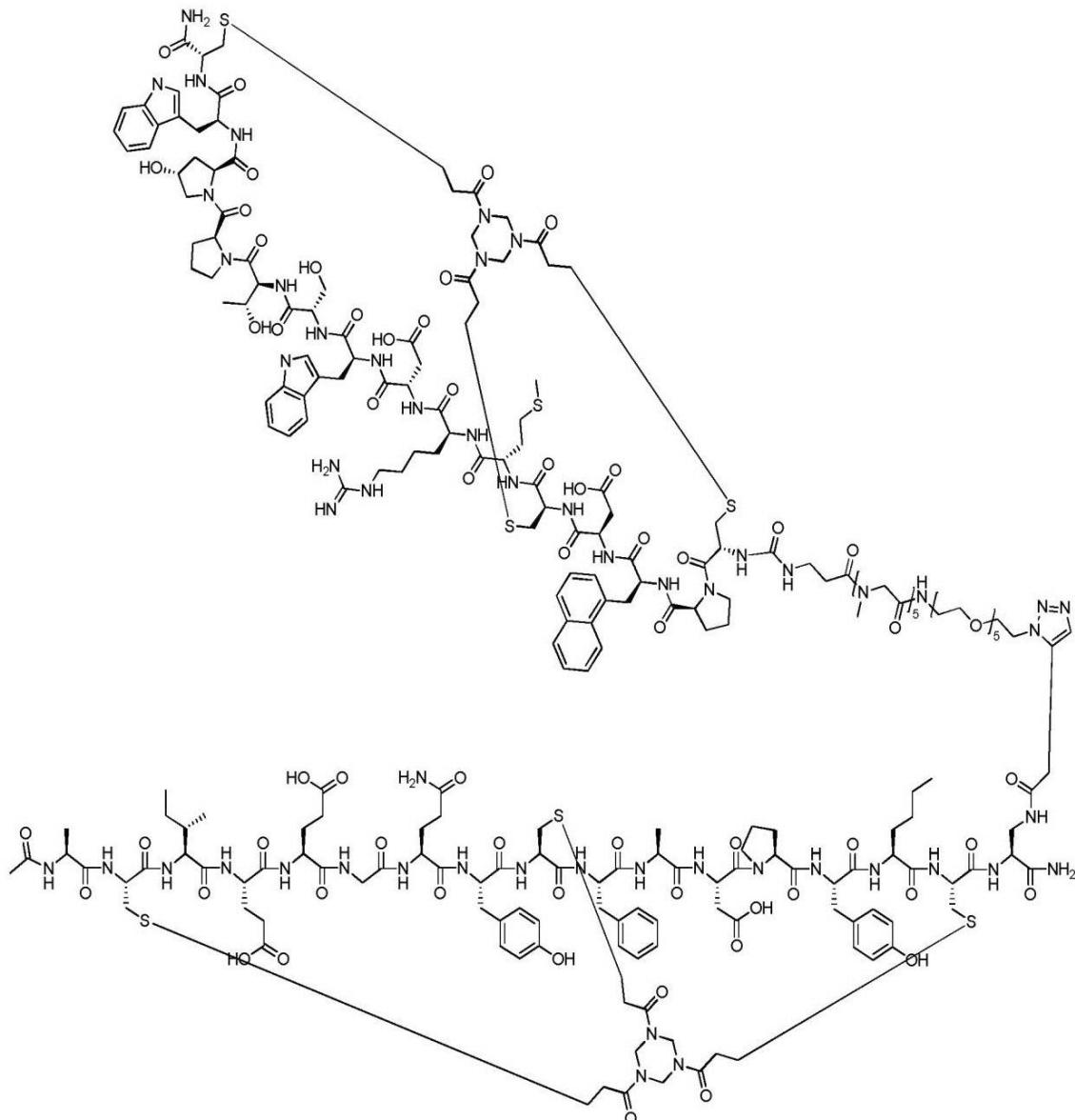
BCY9406

【0330】

40

50

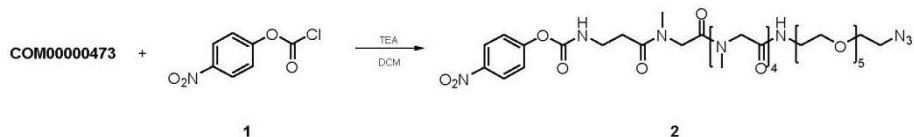
【化101】



化合物2を調製する手順

【0331】

【化102】



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、37 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+NH4]⁺))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。

40

50

【0332】

化合物3を調製する手順

【0333】

【化103】



化合物2(10mg、11.14μmol、1当量)、BCY8116(25mg、1.51μmol、1.03当量)のDMF(2mL)中溶液に、DIET(2.16mg、16.71μmol、2.91μL、1.5当量)を添加した。混合物を25~30で12時間攪拌した。LC-MSは、所望のm/z(MW: 2931.30、実測m/z: 977.00([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HPLC(FTA条件)によって精製した。化合物3(15mg、5.12μmol、収率45.79%、純度99.66%)を白色固体として得た。

【0334】

BCY9406を調製する手順

【0335】

【化104】



化合物3(15mg、5.12μmol、1.0当量)およびTHPTA(0.4M、12.8μL、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、12.8μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、25.6μL、2.0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、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: 5212.84 実測m/z: 1042.74([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。BCY9406(14.4mg、2.57μmol、収率50.21%、純度93.01%)を白色固体として得た。

【0336】

BCY9407

【0337】

10

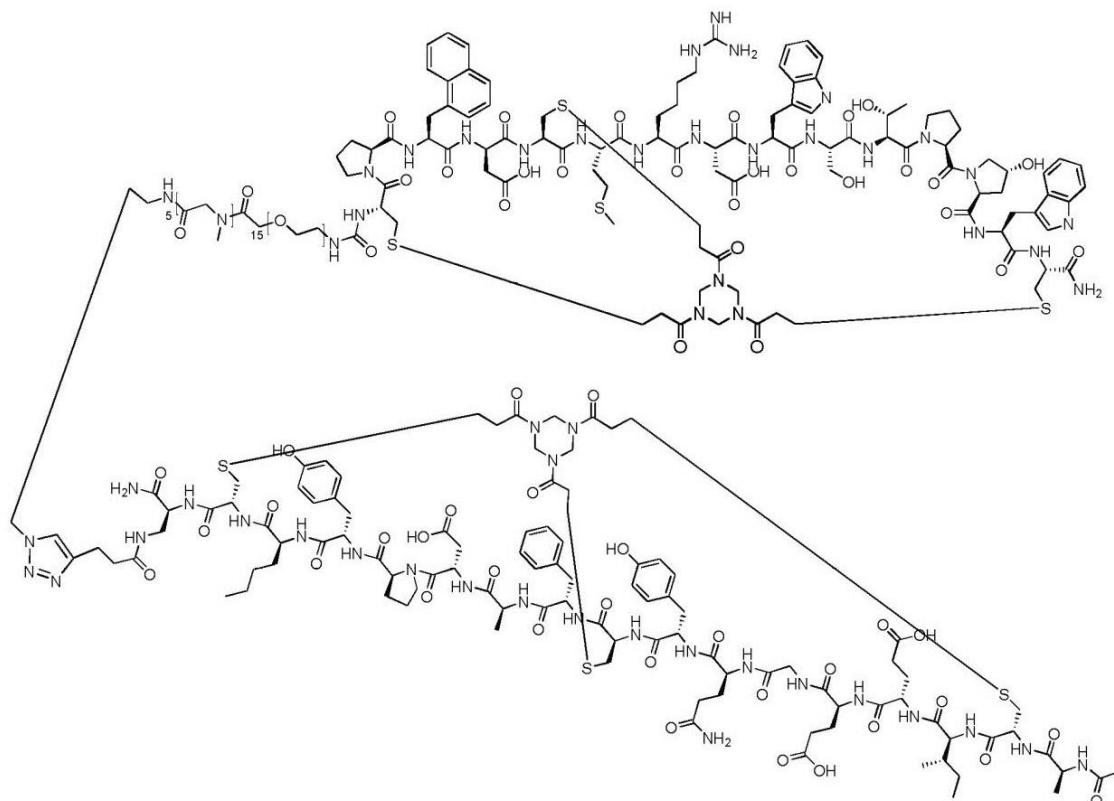
20

30

40

50

【化105】

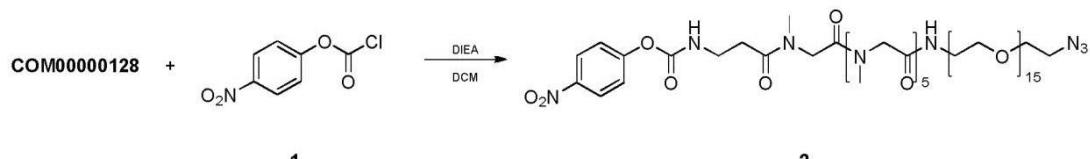


BCY00009407

化合物2を調製する手順

【0338】

【化106】



COM128 (60 mg、50.53 μmol、1.0当量)、化合物1 (13 mg、64.50 μmol、1.28当量)、DIPEA (9.80 mg、75.80 μmol、13.20 μL、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 μmol、収率17.56%) を無色の油状物として得た。

【0339】

[BCY8116] - [COM128]を調製する手順

【0340】

10

20

30

40

50

【化107】



化合物2(7mg、5.18μmol、1.0当量)およびBCY8116(11mg、5.06μmol、1.0当量)、DIEA(2.01mg、15.53μmol、2.70μL、3.0当量)のDMF(3mL)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、所望のm/z(計算MW:3385.85、実測m/z:1129.3([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HPLC(TFA条件)によって精製した。[BCY8116]-[COM128](15.6mg、4.46μmol、収率86.13%、純度96.75%)を白色固体として得た。

【0341】

BCY9407を調製する手順

【0342】

【化108】



[BCY8116]-[COM128](15.6mg、4.61μmol、1.0当量)、BCY7741(11mg、4.82μmol、1.05当量)およびTHPTA(0.8M、5.8μL、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、1.6μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、23.2μL、2.0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、25～30℃で12時間攪拌した。LC-MSは、所望のm/z(計算MW:5667.39、実測m/z:945.6([M/6+H]⁺)および1134.2([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HPLC(TFA条件)によって直接精製した。BCY9407(1.3mg、0.23μmol、収率4.33%、純度86.90%)を白色固体として得た。

【0343】

BCY9408

【0344】

10

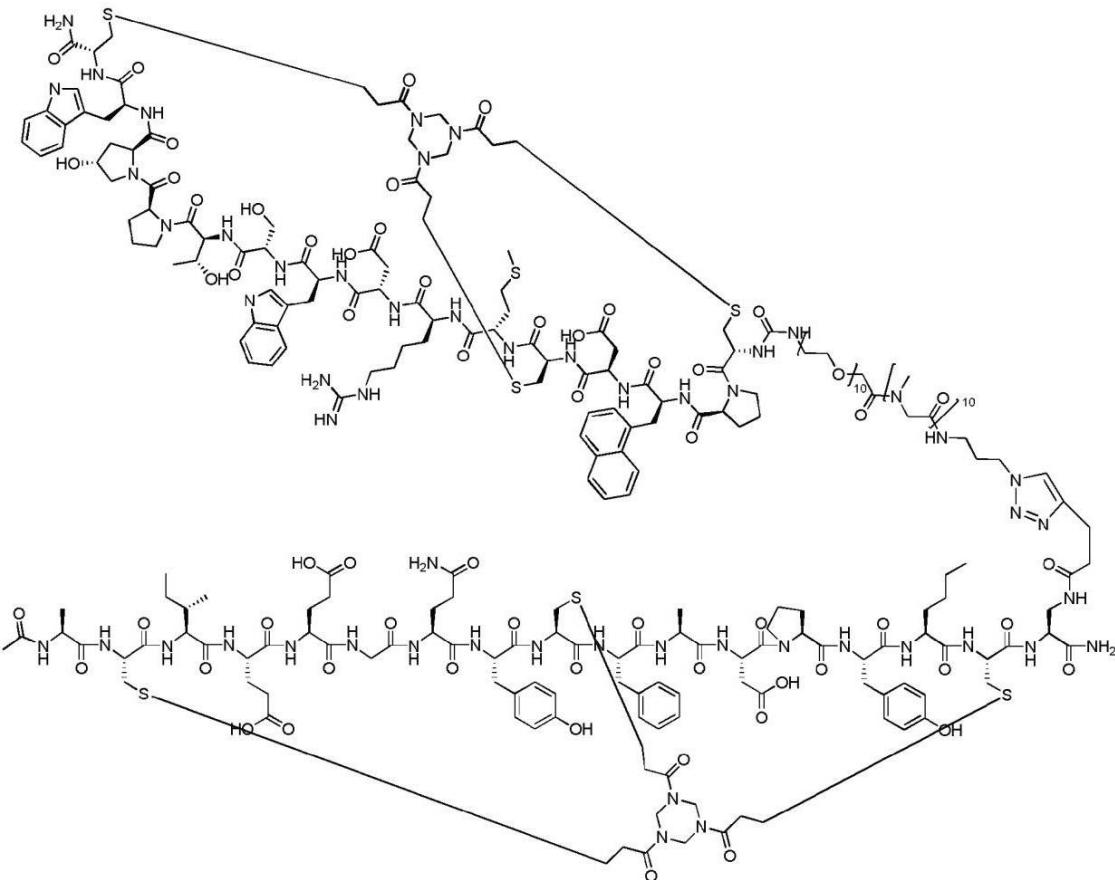
20

30

40

50

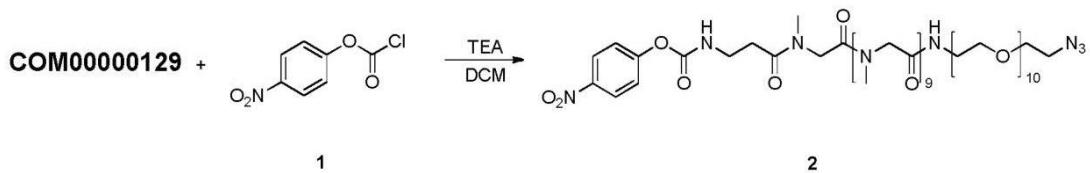
【化 1 0 9】



化合物 2 を調製する手順

【 0 3 4 5 】

【化 1 1 0】



C O M 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、 N₂ 霧囲気下、 2 5 ~ 3 0 ℃ 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。

【 0 3 4 6 】

化合物 3 を調製する手順

【 0 3 4 7 】

【化111】



化合物2(9.0mg、6.11μmol、1.0当量)およびBCY8116(13.3mg、6.11μmol、1.0当量)のDMF(3mL)中溶液に、DIEA(2.4mg、18.32μmol、3.2μL、3.0当量)を添加した。全ての溶媒を脱気し、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、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: 3506.95、実測m/z: 877.4([M/4+H]⁺)およびm/z: 1169.6([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HPLC(TFA条件)によって精製した。化合物3(7.2mg、2.05μmol、収率31.93%、純度95%)を白色固体として得た。

【0348】

BCY9408を調製する手順

【0349】

【化112】



3

化合物3(7.2mg、2.05μmol、1.0当量)、BCY7741(5.0mg、2.19μmol、1.03当量)およびTHPTA(0.4M、5.1μL、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、5.1μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、10.2μL、2.0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、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: 5788.49 実測m/z: 968.9([M/6+H]⁺)および1158.0([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HPLC(TFA条件)によって直接精製した。BCY9408(3.1mg、4.97e-1μmol、収率24.23%、純度92.87%)を白色固体として得た。

【0350】

BCY9409

【0351】

10

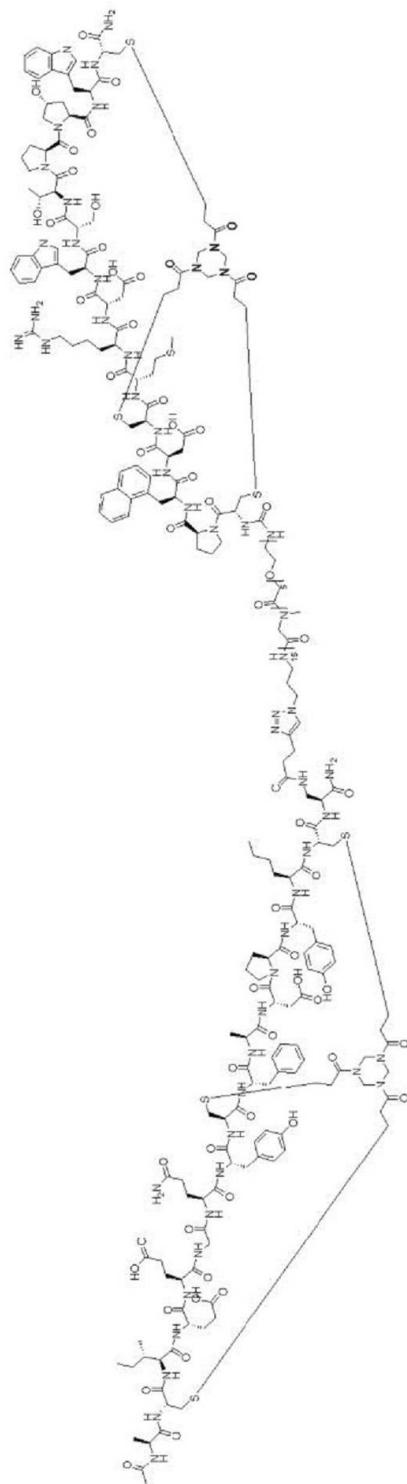
20

30

40

50

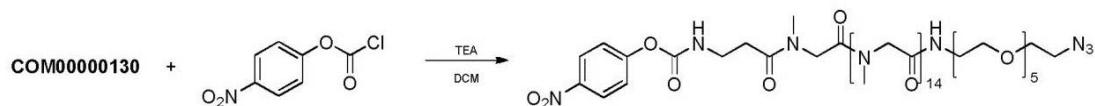
【化 1 1 3】



化合物 2 を調製する手順

【0 3 5 2】

【化 1 1 4】



1

2

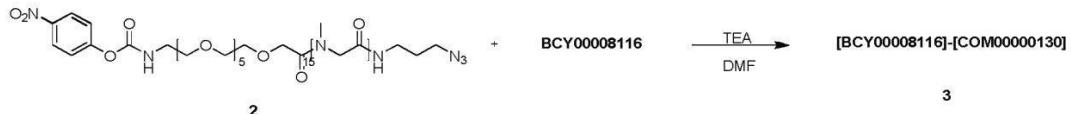
化合物 1 (30 mg、20.78 μmol)、COM130 (6.28 mg、31.17 μmol) のDCM (3 mL) 中溶液に、TEA (3.15 mg、31.17 μmol、4.34 μL、1.5当量) を添加した。混合物を25~30で1時間攪拌した。LC-MSは、化合物1が完全に消費されていることを示し、所望のm/z (MW: 1608.70 実測m/z: 804.8 ([M/2+H]+))を有する1つの主ピークが検出された。反応混合物を減圧下で濃縮し、次いで、凍結乾燥して、化合物2 (10.2 mg、粗) を白色固体として得た。

【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、DIET (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回バージした) 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

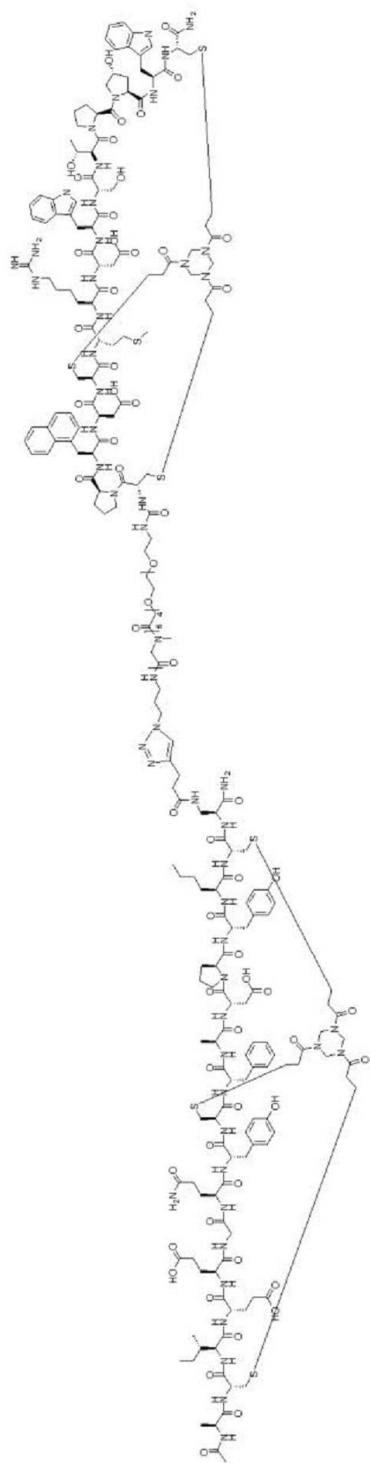
20

30

40

50

【化117】



10

20

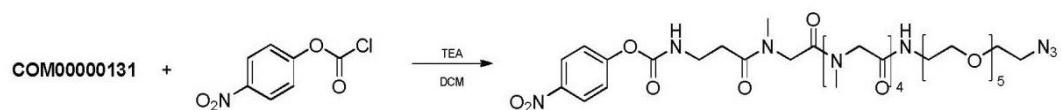
30

40

化合物2を調製する手順

【0359】

【化118】



1

2

50

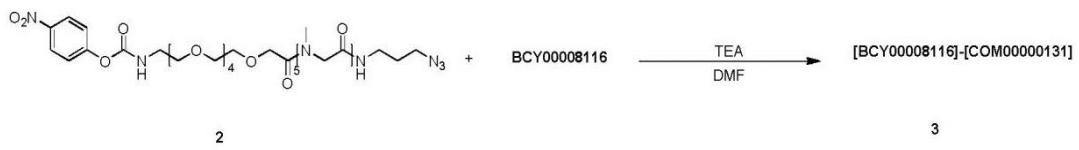
COM131 (167.0 mg, 227.89 μmol, 1.0当量)、化合物1 (5.0 mg, 272.87 μmol, 1.2当量)のDCM (5 mL) 中溶液に、TEA (36.4 mg, 359.23 μmol, 50.0 μL, 1.6当量)を添加した。混合物を25~30℃で1時間攪拌した。LC-MSは、所望のm/z (MW: 897.93) 実測920.3 ([M + Na⁺])を有する1つの主ピークが検出されることを示した。反応混合物を減圧下で濃縮して、溶媒を除去して、残留物を得た。残留物を分取HPLC (TFA条件)によって精製した。化合物2 (35 mg, 33.74 μmol, 収率14.81%、純度86.56%)を無色の油状物として得た。

〔 0 3 6 0 〕

化合物 3 を調製する手順

[0 3 6 1]

【化 1 1 9】



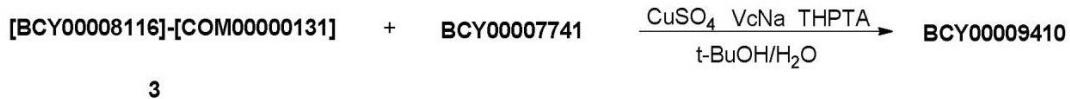
化合物2(20mg、22.27μmol、1.0当量)およびBCY8116(48mg、22.09μmol、1.0当量)のDMF(2mL)中溶液に、DIEA(8.64mg、66.82μmol、11.64μL、3.0当量)を添加した。混合物を30で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていることを示し、所望のm/z(MW:2931.32、実測m/z:977.7([M+H]⁺))を有する1つの主ピークが検出された。残留物を分取HPLC(TFA条件)によって精製した。化合物3(40mg、13.08μmol、収率58.7%、純度95.82%)を白色固体として得た。

〔 0 3 6 2 〕

B C Y 9 4 1 0 を調製する手順

【 0 3 6 3 】

【化 1 2 0】



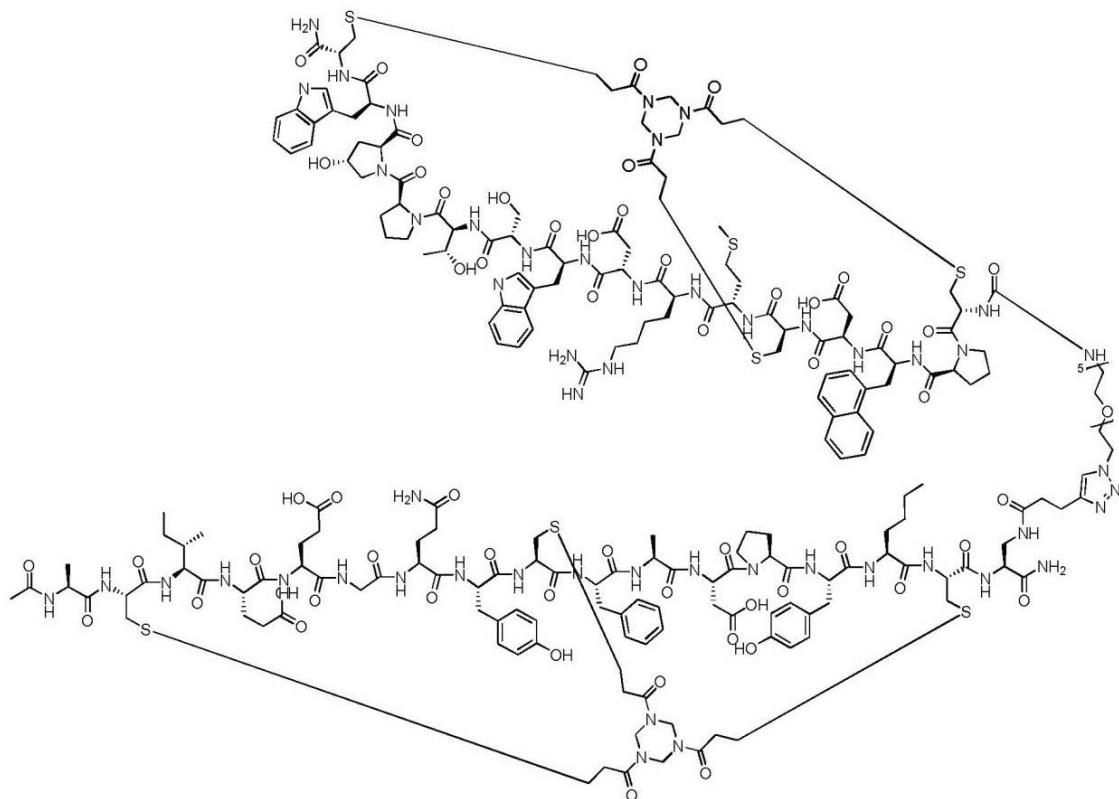
化合物3(40mg、13.08μmol、1.0当量)およびTHPTA(0.4M、34μL、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、34μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、68μL、2.0当量)をN₂下で添加した。0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、25~30℃で12時間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていることを示し、所望のm/z [MW: 5212.85、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(38.6mg、6.78μmol、収率49.71%、純度91.6%)を白色固体として得た。

【 0 3 6 4 】

B C Y 9 4 1 1

【 0 3 6 5 】

【化121】



化合物2を調製する手順

【0366】

【化122】



COM132 (5 mg、16.32 μmol、1当量)、化合物1 (4 mg、19.85 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+NH4]+))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

【0367】

化合物3を調製する手順

【0368】

【化123】



化合物 2 (3.3 mg、6.9 μmol、1.5 当量) および BCY8116 (10.0 mg、4.6 μmol、1.0 当量) の DMF (5 mL) 中溶液に、DIEA (0.7 mg、6.90 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 (計算 MW : 2504.83、実測 m/z : 1252.3 ([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 HPLC (TFA 条件) によって精製した。化合物 3 (4.2 mg、1.51 μmol、収率 32.78%、純度 90%) を白色固体として得た。

【0369】

BCY9411 を調製する手順

10

【0370】

【化124】



化合物 3 (4.2 mg、1.68 μmol、1.0 当量)、BCY7741 (4.0 mg、1.75 μmol、1.05 当量) および THPTA (0.04 M、84 μL、2.0 当量) の混合物を t-BuOH / H₂O (1:1、2 mL、予め脱気し、N₂ で 3 回ページした) に溶解し、次いで、CuSO₄ (0.04 M、84 μL、2.0 当量) および VcNa (0.04 M、168 μL、4.0 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 : 4786.37、実測 m/z : 1596.2 ([M/3 + H]⁺)、1196.9 ([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 HPLC (TFA 条件) によって直接精製した。BCY9411 (4.1 mg、0.86 μmol、収率 50.20%、純度 98.26%) を白色固体として得た。

20

【0371】

BCY9759

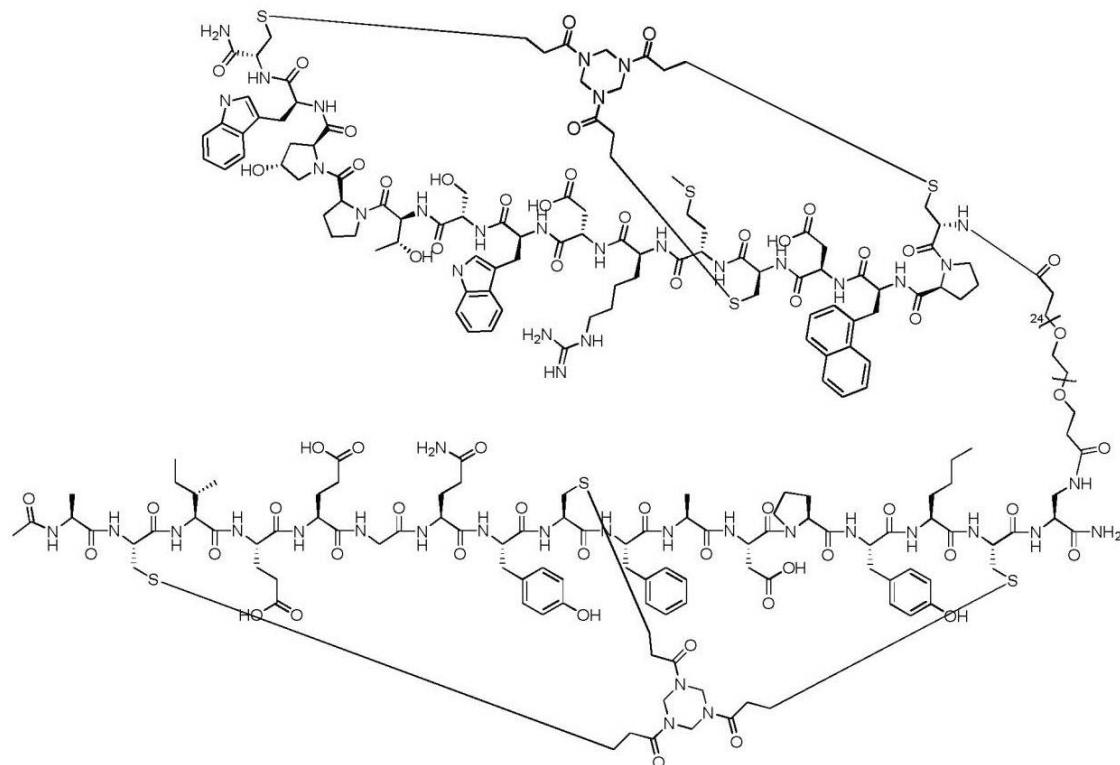
30

【0372】

40

50

【化125】



化合物2を調製する手順

【0373】

【化126】



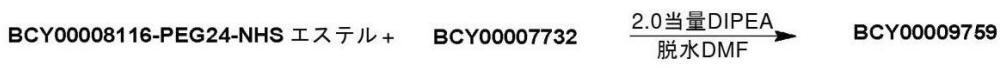
化合物1(5.0mg、3.54μmol、1.0当量)、BCY8116(7.7mg、3.54μmol、1.0当量)のDMF(3mL)中溶液に、DIPEA(0.9mg、7.07μmol、1.2μL、2.0当量)を添加した。混合物を0℃で20分間攪拌した。LC-MSは、NHS基が脱落している化合物2に対応する質量(計算MW:3470.95、加水分解MW:3373.81、実測m/z:1125.0([M+H]⁺)を検出した。反応混合物を濾過し、減圧下で濃縮し、凍結乾燥して、化合物2(15mg、粗)を白色固体として得た。

【0374】

BCY9759を調製する手順

【0375】

【化127】



2

化合物2(20mg、5.76μmol、1.0当量)およびBCY7732(12.7mg、5.76μmol、1.0当量)のDMF(3mL)中溶液に、DIPEA(1.5mg、11.52μmol、2.0μL、2.0当量)を添加した。混合物を25~3

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 ($[M + H]^+$) および 1112.2 ($[M + H]^+$)) 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。

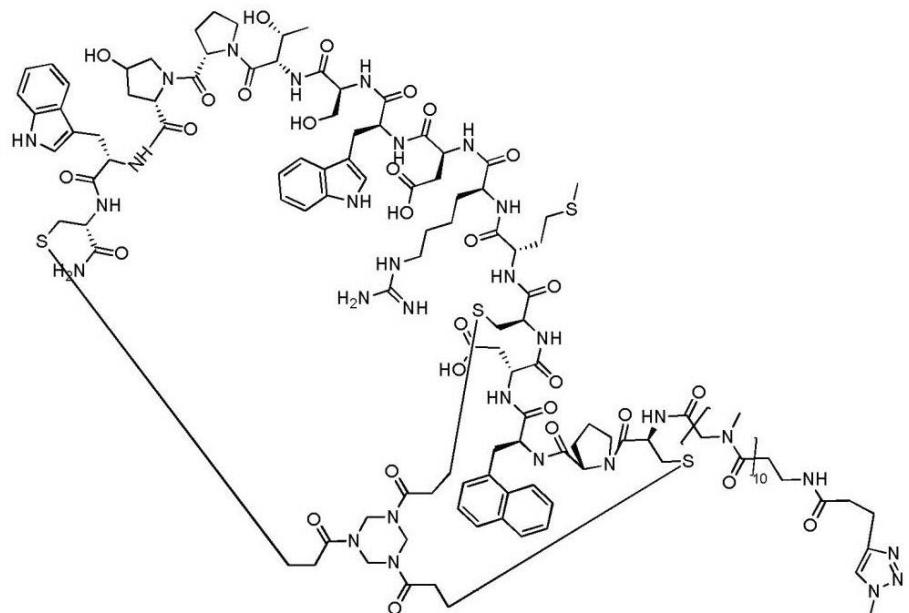
(0 3 7 6)

B C Y 1 0 0 0 0

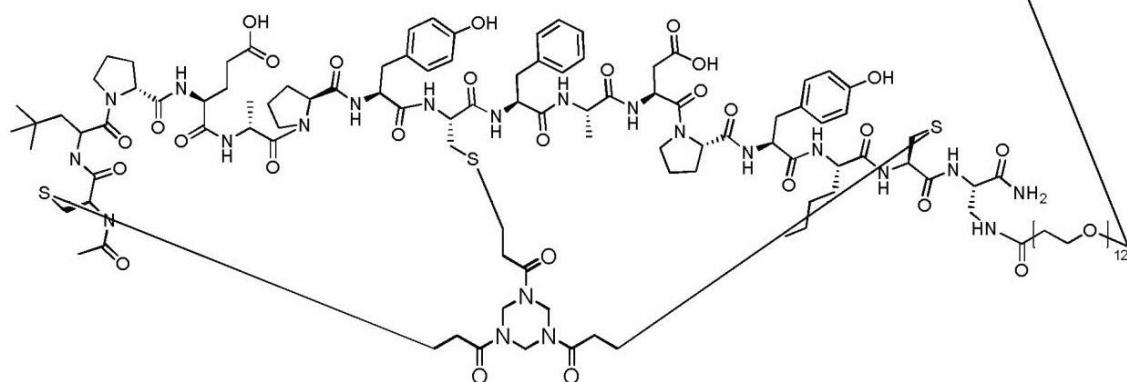
【 0 3 7 7 】

【化 1 2 8】

10



20



30

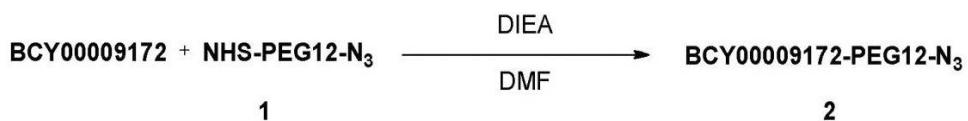
BCY00010000

B C Y 9 1 7 2 - P E G 1 2 - N₃を調製する手順

[0 3 7 8]

【化 1 2 9】

40



B C Y 9 1 7 2 (5 2 0 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D M F (5 mL)に溶解し、次いで、混合物にD I E A (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。L C - M Sは、B C Y 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 (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H P L C (T F A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】

B C Y 1 0 0 0 0 を調製する手順

【0380】

【化130】



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B C Y 8 8 4 6 (157 mg、51.74 μmol、1.0当量)を最初にt - B u O H / H ₂ O (1 : 1) 10 mLに溶解し、次いで、C u S O ₄ (0.4 M、130.5 μL、1.0当量)、V c N a (0.4 M、261.0 μL、2.0当量)およびT H P T A (0.4 M、130.5 μL、1.0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、30で12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 : 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H P L C (T F A条件)によって精製し、B C Y 1 0 0 0 0 (314.9 mg、51.99 μmol、収率49.82%、純度95.03%)を白色固体として得た。

【0381】

B C Y 1 0 5 6 7

【0382】

10

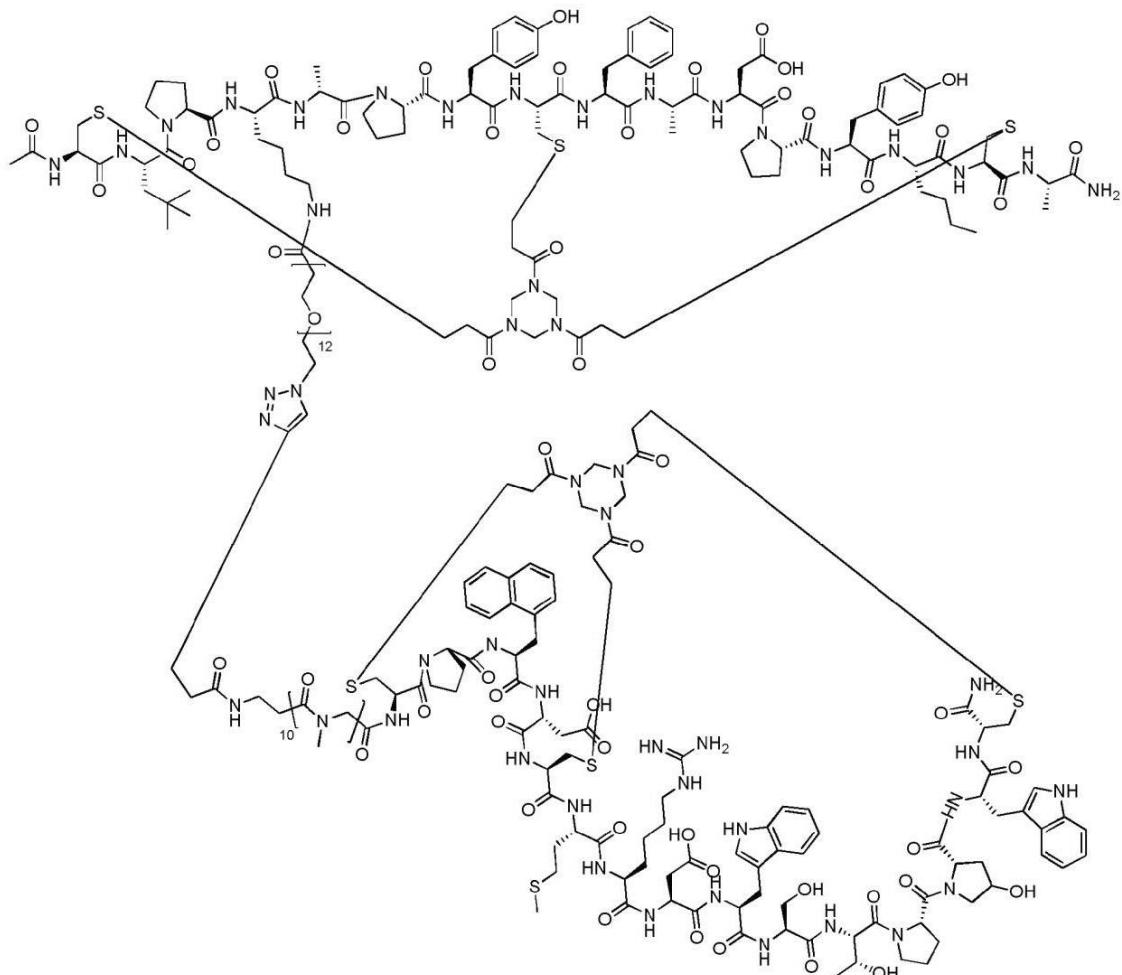
20

30

40

50

【化 1 3 1】

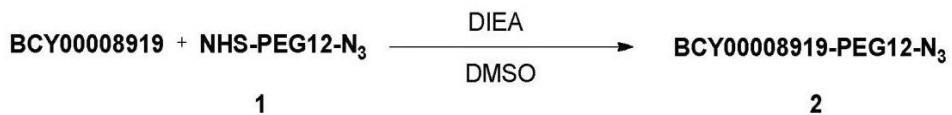


BCY00010567

B C Y 8 9 1 9 - P E G 1 2 - N₃ を調製する手順

(0 3 8 3)

【化 1 3 2】



B C Y 8 9 1 9 (6 0 . 0 m g 、 2 8 . 8 5 μ m o l 、 1 . 0 当量) および化合物 1 (2 2 . 2 m g 、 3 0 . 0 1 μ m o l 、 1 . 0 4 当量) を D M S O (1 m L) に溶解した。溶液に D I P E A (5 . 6 m g 、 4 3 . 2 8 μ m o l 、 7 . 6 μ l 、 1 . 5 当量) を添加し、次いで、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 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 7 0 5 . 1 6 、 実測 m / z : 1 3 5 3 . 1 5 ([M / 2 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピーカーが検出された。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 2 (B C Y 8 9 1 9 - P E G 1 2 - N₃ 、 1 8 . 5 m g 、 6 . 7 7 μ m o l 、 収率 2 3 . 4 7 % 、 純度 9 9 . 0 4 %) を白色固体として得た。

(0 3 8 4)

B C Y 1 0 5 6 7 を調製する手順

【 0 3 8 5 】

【化133】



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(9.0mg、3.33μmol、1.0当量)およびBCY8846(10.1mg、3.33μmol、1.0当量)を最初にt-BuOH/H₂O(1:1)2mLに溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、8.3μL、1.0当量)、VcN(1.3mg、6.56μmol、2.0当量)およびTHPTA(1.4mg、3.22μmol、1.0当量)を添加した。最後に、0.4M 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MS: 5739.58、実測m/z: 956.75([M+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、BCY10567(6.85mg、1.18μmol、収率35.48%、純度98.91%)を白色固体として得た。

【0386】

BCY10569

【0387】

10

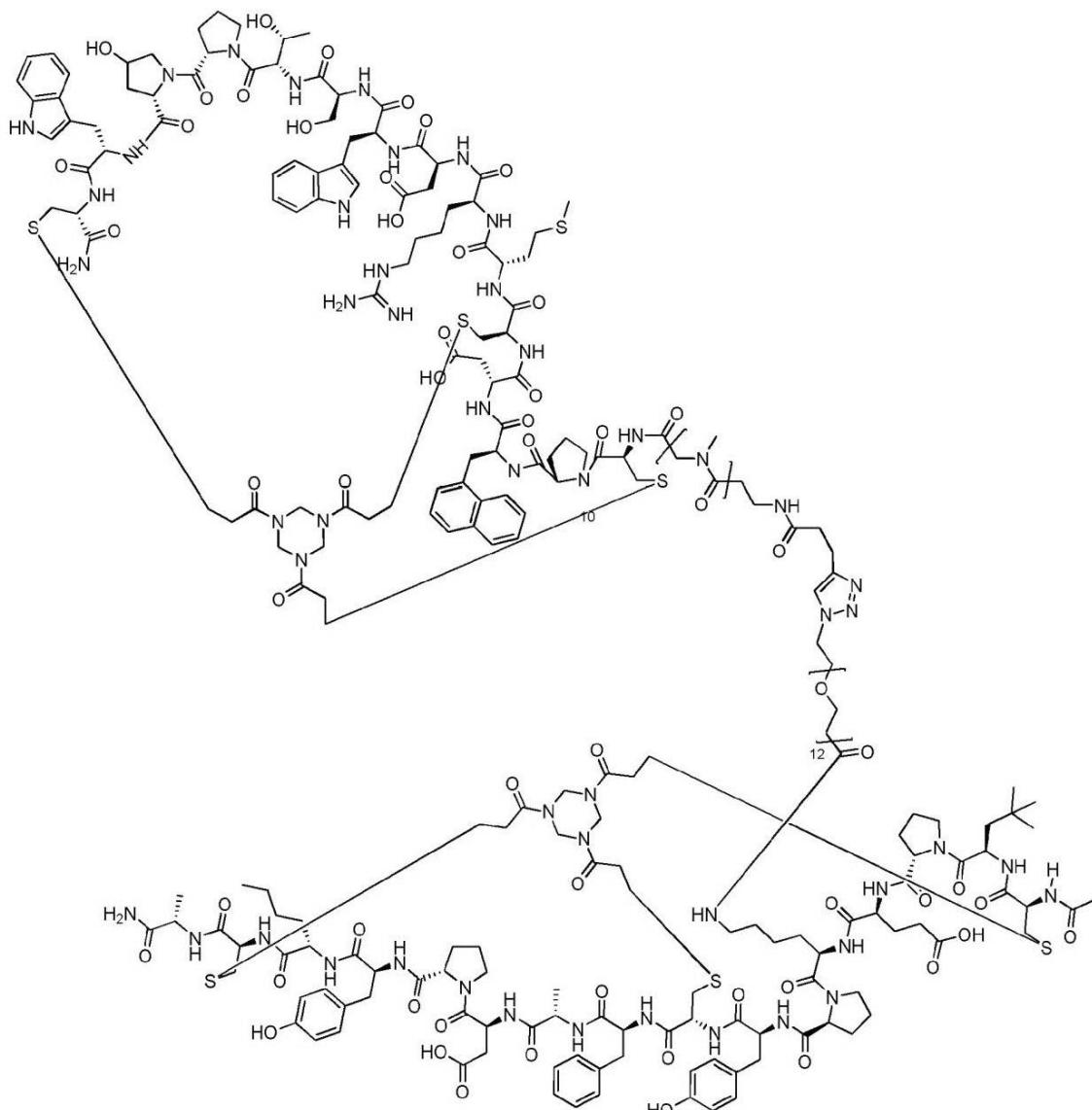
20

30

40

50

【化134】

**BCY00010569**

化合物3を調製する手順

【0388】

【化135】



化合物BCY8920(40.0mg、18.71μmol、1.0当量)、化合物2(16.0mg、21.6μmol、1.15当量)およびDIEA(5.0μL、28.0μmol、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: 2763.2、実測m/z: 912.17([M - 28]/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40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(23.4mg、8.47μmol、収率45.25%、純度99.0%)を白色固体として得た。

50

【0389】

B C Y 1 0 5 6 9 を調製する手順

【0390】

【化136】



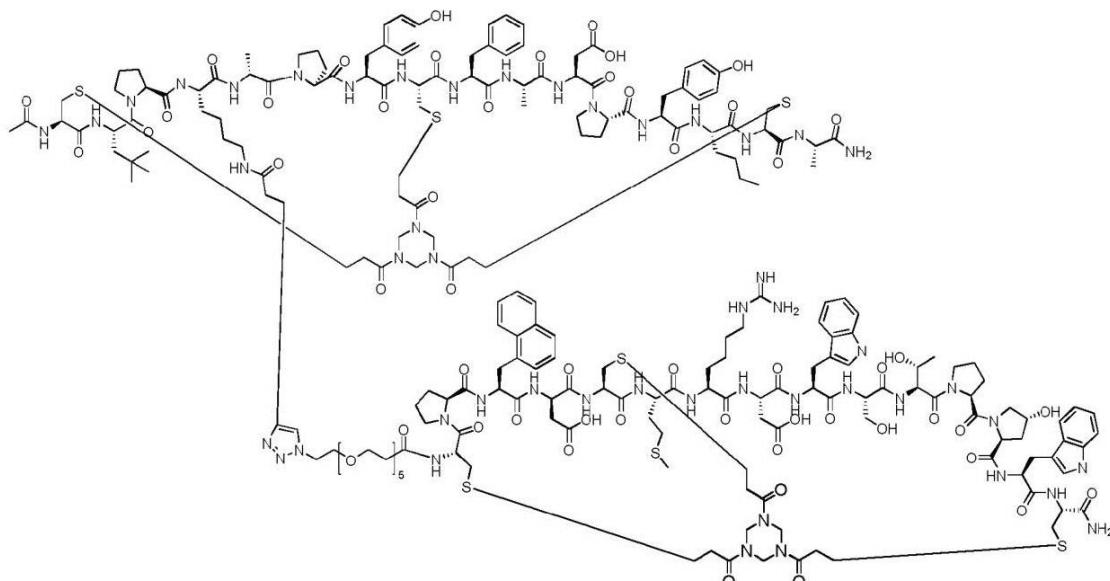
化合物3(5.0 mg、1.81 μmol、1.0当量)、BCY8846(5.8 mg、1.9 μmol、1.05当量)およびTHPTA(1.0 mg、2.3 μmol、1.3当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、1 mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4 M、5.0 μL、1.0当量)およびVcNa(0.4 M、5.0 μL、1.0当量)をN₂下で添加した。0.2 M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、40°で2時間攪拌した。LC-MS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: 5797.62、実測m/z: 1160.7([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HPLC(TFA条件)によって精製し、BCY10569(5.7 mg、1.18 μmol、収率52.25%、純度96.16%)を白色固体として得た。

【0391】

B C Y 1 0 5 7 1

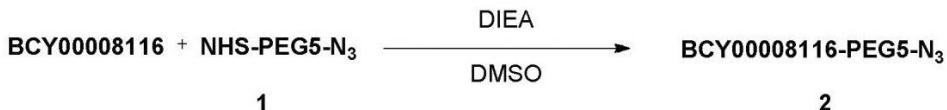
【0392】

【化137】

B C Y 8 1 1 6 - P E G 5 - N₃ を調製する手順

【0393】

【化138】



B C Y 8 1 1 6(60 mg、27.62 μmol、1.0当量)および化合物1(12

10

20

30

40

50

.0 mg、27.75 μmol、1.0当量)を最初にDMSO(1mL)に溶解し、次いで、混合物にDEA(5.4mg、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(48mg、19.28 μmol、収率69.80%、純度100%)を白色固体として得た。

【0394】

BCY10571を調製する手順

10

【0395】

【化139】



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(10mg、4.02 μmol、1.0当量)およびBCY8927(9mg、4.17 μmol、1.04当量)を最初にt-BuOH/H₂O(1:1)2mLに溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、10.0 μL、1.0当量)、VcNa(0.4M、20.1 μL、2.0当量)およびTHPTA(0.4M、10.0 μL、1当量)を添加した。最後に、0.4M 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: 4649.36、実測m/z: 1162.57([M/4+H]⁺)、1549.69([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HPLC(TFA条件)によって精製した。BCY10571(13mg、2.79 μmol、収率34.88%、純度96.48%)を白色固体として得た。

20

【0396】

BCY10572

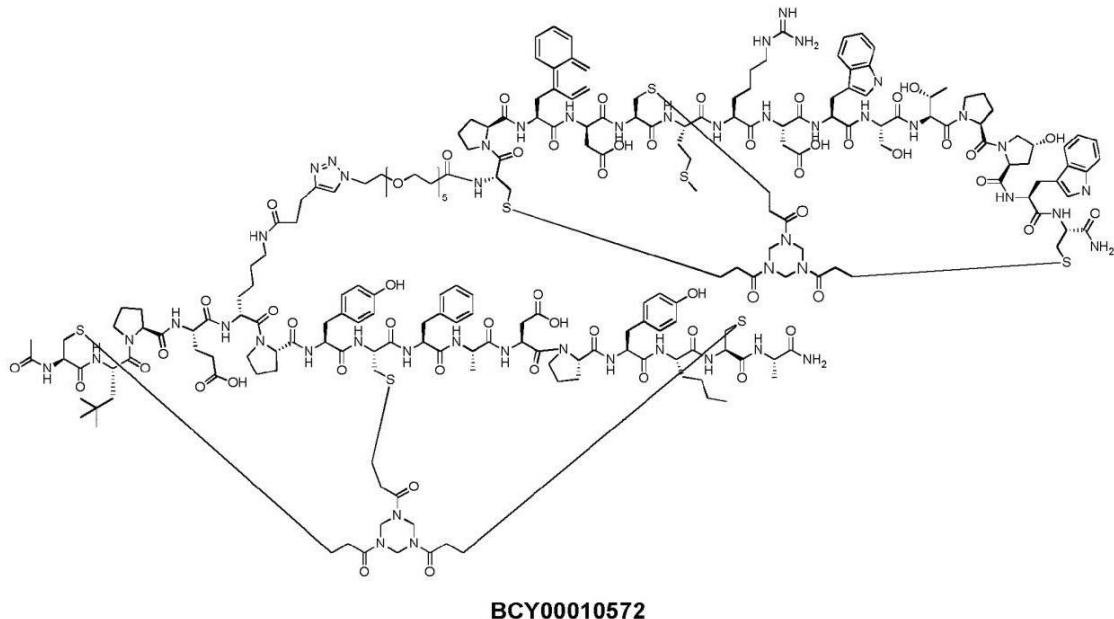
30

【0397】

40

50

【化140】



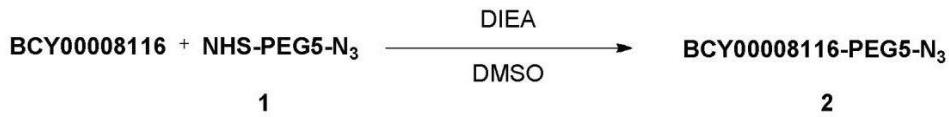
10

B C Y 8 1 1 6 - P E G 5 - N₃ を調製する手順

20

【0398】

【化141】



B C Y 8 1 1 6 (6 0 m g、 2 7 . 6 2 μ m o l、 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 °C 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。

30

【0399】

B C Y 1 0 5 7 2 を調製する手順

【0400】

【化142】



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 (1 0 m g、 4 . 0 2 μ m o l、 1 . 0 当量) および B C Y 8 9 2 8 (9 m g、 4 . 0 6 μ m o l、 1 . 0 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 0 . 1 μ L、 1 当量) 、 V c N a (0 . 4 M、 2 0 . 2 μ L、 2 . 0 当量) および T H P T A (0 . 4 M、 1 0 . 1 μ L、 1 . 0 当量) を添加した

50

。最後に、0.4M 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雾囲気下、30℃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 (MW : 4707.40、実測m/z : 1568.29 ([M/3 + H]⁺) および 1176.83 ([M/4 + H]⁺))を有する1つの主ピーカーが検出された。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 (21mg、4.46 μmol、収率55.7%、純度97.51%)を白色固体として得た。

[0 4 0 1]

B C Y 1 0 5 7 3

【 0 4 0 2 】

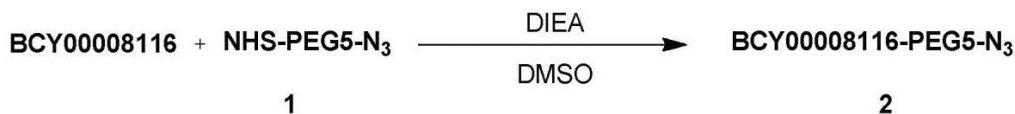
【化 1 4 3】

BCY00010573

化合物 2 を調製する手順

[0 4 0 3]

【化 1 4 4】



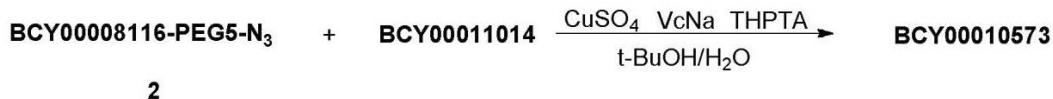
B C Y 8 1 1 6 (3 5 m g 、 1 6 . 1 1 μ m o l 、 1 当量) 、 化合物 1 (7 . 0 0 m g 、 1 6 . 1 9 μ m o l 、 1 当量) の D M S O (1 m L) 中溶液に、 D I E A (3 . 1 2 m g 、 2 4 . 1 7 μ m o l 、 4 . 2 1 μ L 、 1 . 5 当量) を添加した。混合物を 2 5 ~ 3 0 で 2 時間攪拌した。L C - M S は、 B C Y 8 1 1 6 の大部分が消費されていることを示し、所望の m / z (計算 MW : 2 4 8 9 . 8 2 、 実測 m / z : 1 2 4 5 . 3 7 ([M / 2 + H]⁺) および 8 3 0 . 2 5 ([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 (2 6 . 8 m g 、 1 0 . 7 6 μ m o l 、 収率 6 6 . 8 1 % 、 純度 1 0 0 %) を白色固体として得た。

【 0 4 0 4 】

B C Y 1 0 5 7 3 を調製する手順

【0405】

【化145】



化合物2(15mg、6.02μmol、1.0当量)、BCY11014(13.50mg、6.21μmol、1.03当量)およびTHPTA(0.4M、15.1μL、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、15.1μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、30.2μL、2.0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、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 [MW: 4665.32、実測m/z: 1167.50 ([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)によって直接精製した。BCY10573(11.5mg、2.42μmol、収率40.14%、純度98.11%)を白色固体として得た。

【0406】

BCY10578

【0407】

10

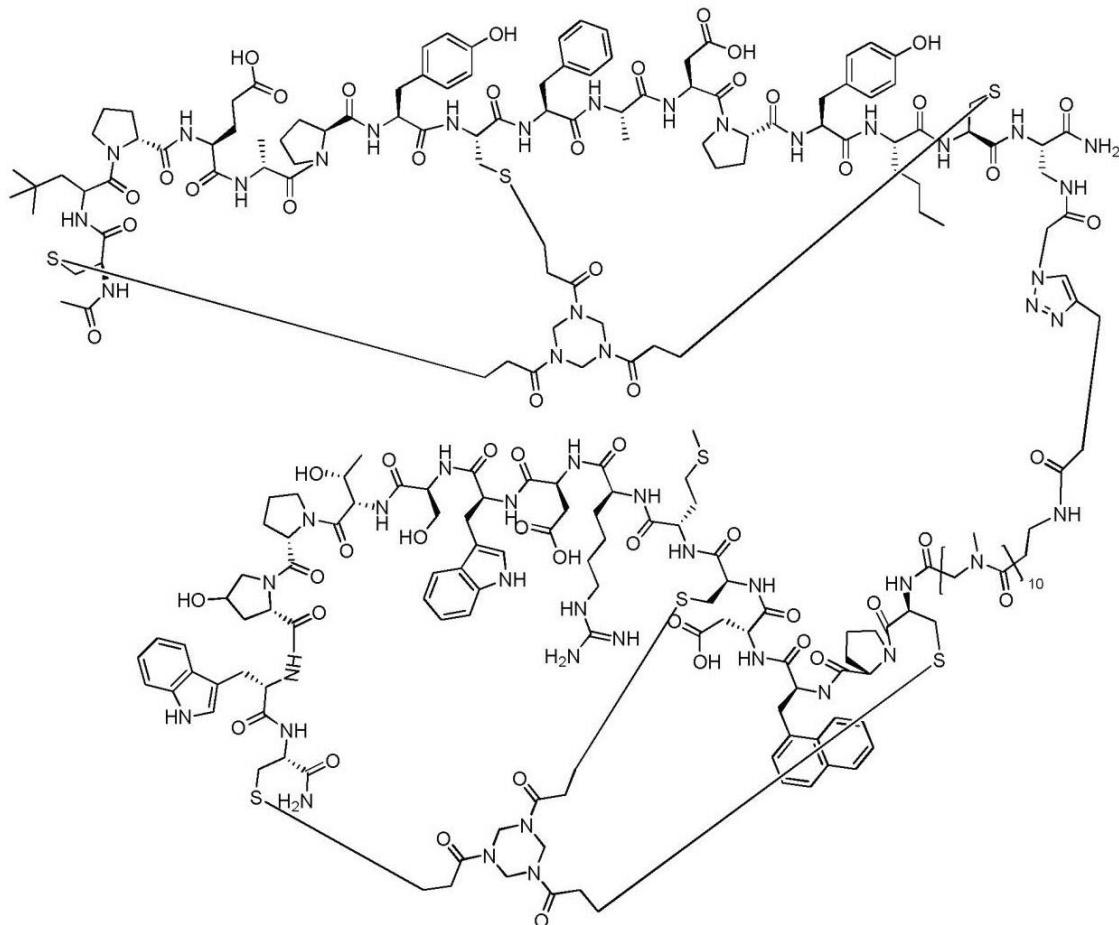
20

30

40

50

【化 1 4 6】

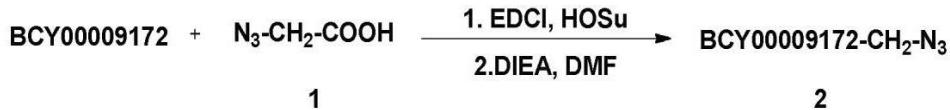


BCY00010578

化合物 2 を調製する手順

【 0 4 0 8 】

【化 1 4 7】



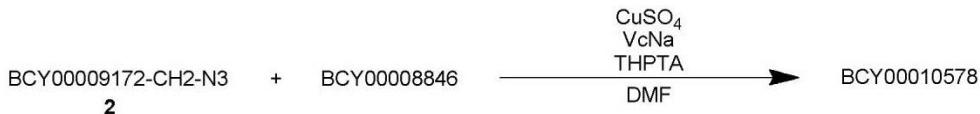
化合物1(5.0mg、49.5μmol、1.0当量)を最初にEDCI(8.5mg、54.8μmol、1.1当量)およびHOSu(5.7mg、49.5μmol、1.0当量)と混合することによって活性化した。混合物を25~30で30分間攪拌した。TLCは、化合物1が完全に消費されており、1つの新たなスポットが形成されたことを示した。次いで、化合物BCY9172(80.0mg、38.18μmol、0.8当量)およびDIEA(6.3mg、8.5μL、49.5μmol、1.0当量)をこの混合物に添加し、LC-MSが、所望のm/z(計算MW:2178.46、実測m/z:1089.44([M/2+H]⁺)を有する1つの主ピークが検出されることを示すまで、40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2(15mg、6.88μmol、収率18.66%、純度73.3%)を白色固体として得た。

【 0 4 0 9 】

B C Y 1 0 5 7 8 を調製する手順

【 0 4 1 0 】

【 化 1 4 8 】



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 10 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 + H]⁺)) を有する 1 つの主ビーグが検出された。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。

【 0 4 1 1 】

B C Y 1 0 9 1 7

【 0 4 1 2 】

10

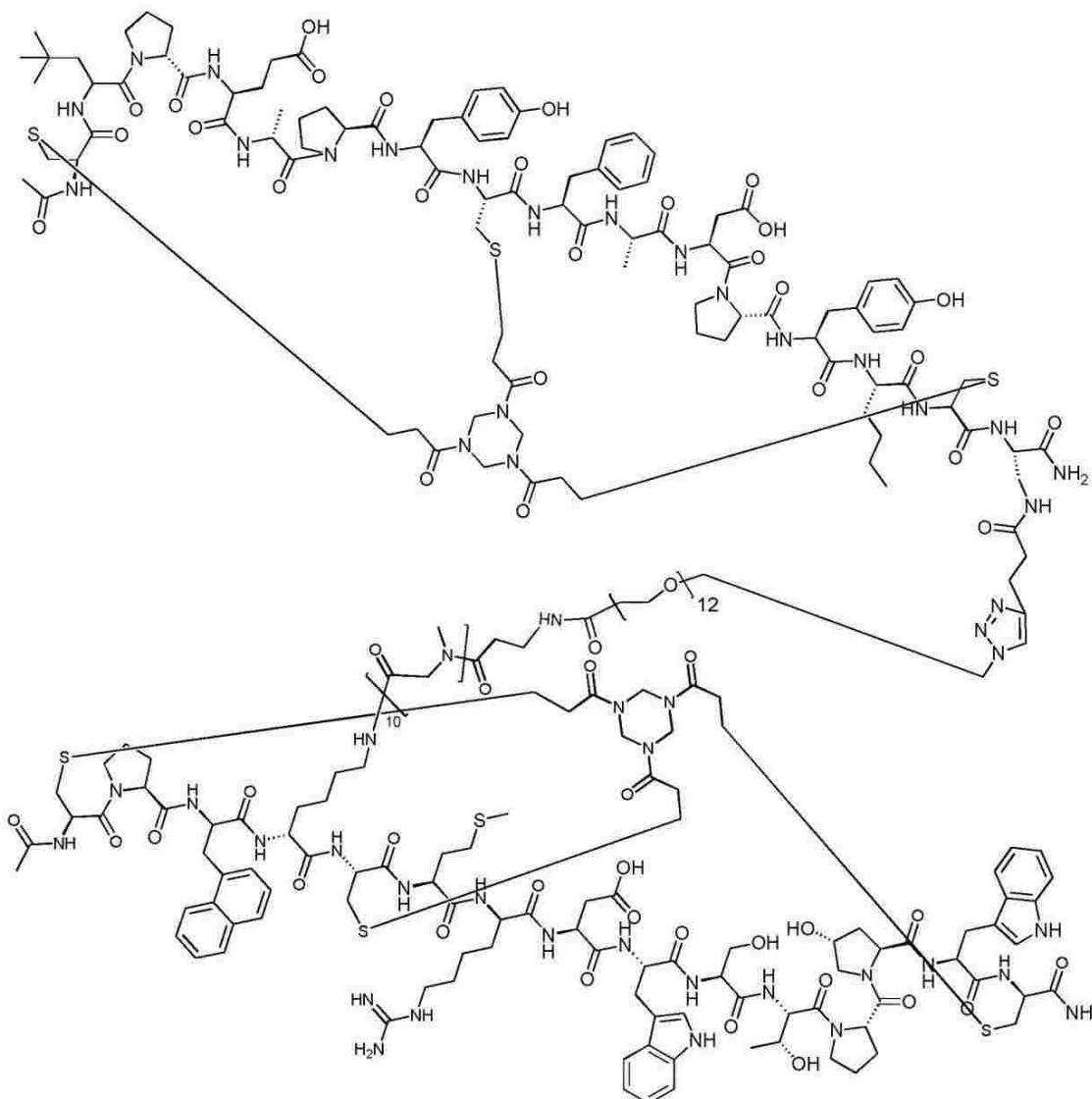
20

30

40

50

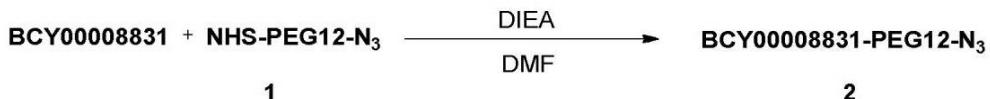
【化 1 4 9】



B C Y 8 8 3 1 - P E G 1 2 - N₃ を調製する手順

【 0 4 1 3 】

【化 1 5 0】



B C Y 8 8 3 1 (4 0 . 0 m g、 1 3 . 2 9 μ m o l、 1 . 0 当量) および化合物 1 (1 0 . 5 m g、 1 4 . 1 7 μ m o l、 1 . 0 7 当量) を D M F (1 m L) に溶解した。溶液に D I P E A (2 . 6 m g、 2 0 . 0 9 μ m o l、 3 . 5 μ l、 1 . 5 当量) を添加し、次いで、混合物を 3 0 度で 1 6 時間攪拌した。L C - M S は、B C Y 8 8 3 1 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 : 3 6 3 5 . 1 6 実測 m / z : 1 2 1 2 . 0 ([M / 3 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピーカーが検出された。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 2 (2 2 . 0 m g、 5 . 8 3 μ m o l、 収率 4 3 . 8 5 %、 純度 9 6 . 3 9 %) を白色固体として得た。

【0414】

BCY10917を調製する手順

【0415】

【化151】



2

10

注：2つのバッチを作り、最初のも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: 5810.66 実測m/z: 1163.0([M+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

【0416】

BCY11020

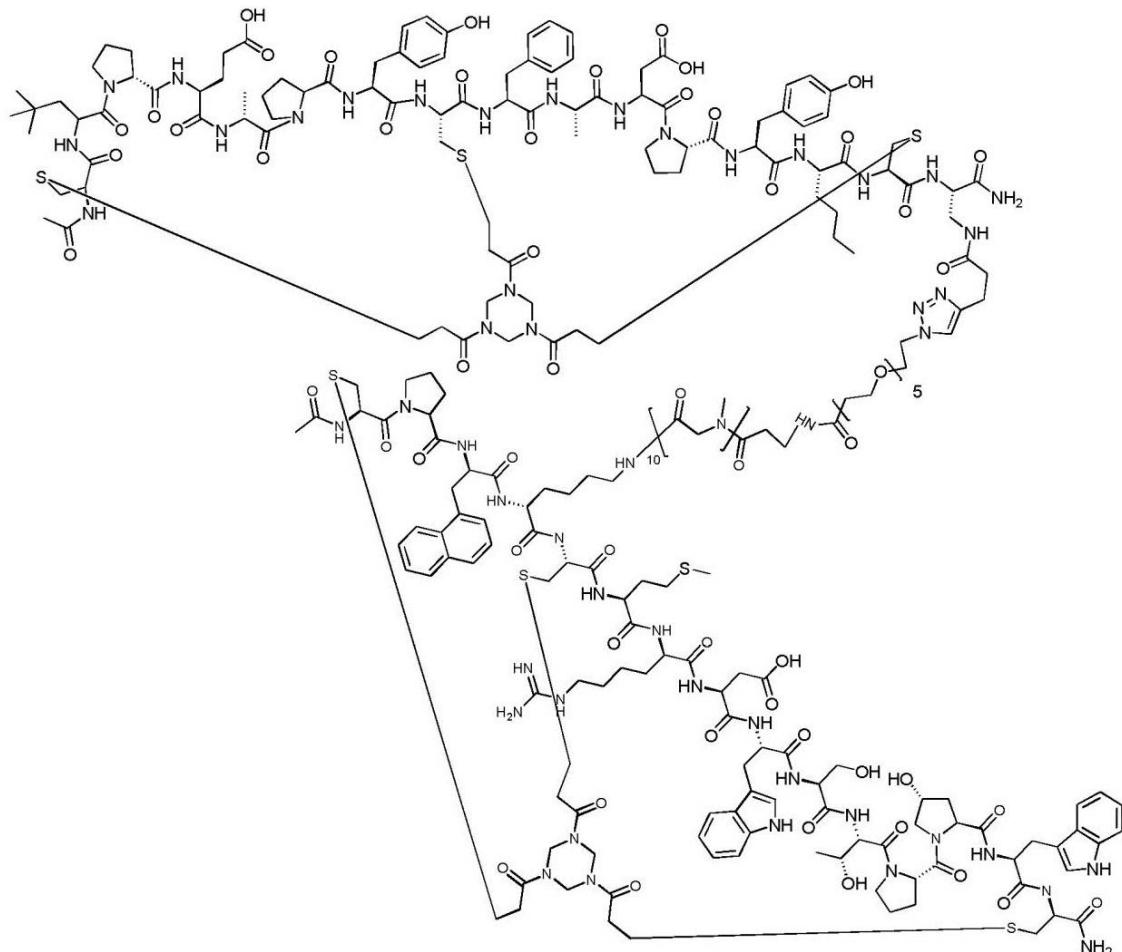
【0417】

30

40

50

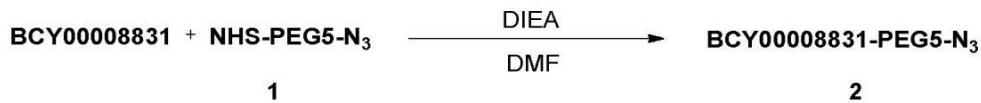
【化 1 5 2】



B C Y 8 8 3 1 - P E G 5 - N₃ を調製する手順

【 0 4 1 8 】

【化 1 5 3】



B C Y 8 8 3 1 (2 5 . 0 m g 、 8 . 3 1 μ m o l 、 1 . 0 当量) および化合物 1 (3 . 9 m g 、 9 . 0 2 μ m o l 、 1 . 0 9 当量) を D M F (1 m L) に溶解した。溶液に D I P E A (1 . 6 m g 、 1 2 . 4 6 μ m o l 、 2 . 2 μ l 、 1 . 5 当量) を添加し、次いで、混合物を 3 5 度 2 時間攪拌した。L C - M S は、B C Y 8 8 3 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 : 3 3 2 6 . 7 9 実測 m / z : 1 1 0 9 . 6 6 ([M / 3 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製し、化合物 2 (7 . 3 m g 、 2 . 0 9 μ m o l 、 収率 2 5 . 2 0 % 、 純度 9 5 . 4 1 %) を白色固体として得た。

【 0 4 1 9 】

B C Y 1 1 0 2 0 を調製する手順

【 0 4 2 0 】

【化154】



2

化合物2(7.3mg、2.19μmol、1.0当量)およびBCY11014(4.8mg、2.19μmol、1.0当量)を最初にt-BuOH/H₂O(1:1)2mLに溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、5.5μL、1.0当量)、VcNa(1.0mg、5.05μmol、2.3当量)およびTHPTA(1.0mg、2.30μmol、1.0当量)を添加した。最後に、1M 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: 5502.29、実測m/z: 1101.74([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HPLC(TFA条件)によって精製し、BCY11020(3.3mg、0.577μmol、収率26.30%、純度96.24%)を白色固体として得た。

【0421】

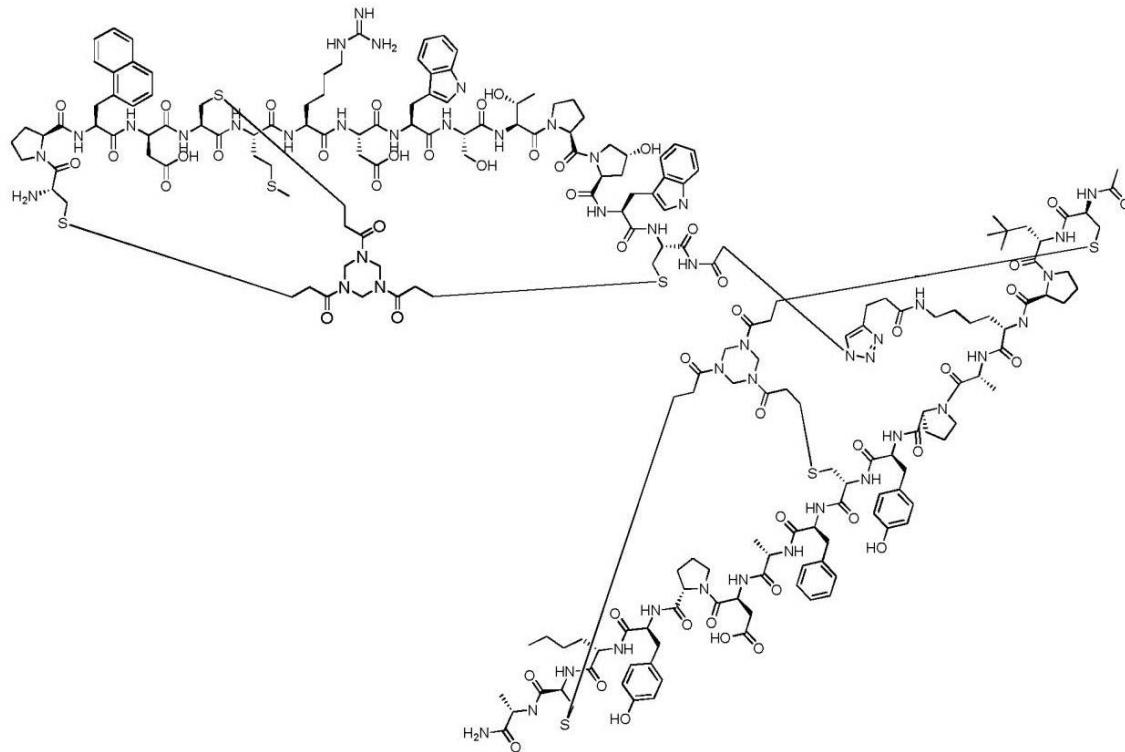
BCY11373

10

【0422】

【化155】

20



30

BCY00011373

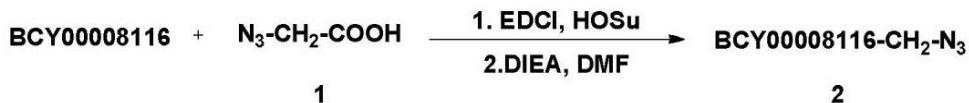
40

化合物2を調製する手順

【0423】

50

【化 1 5 6】



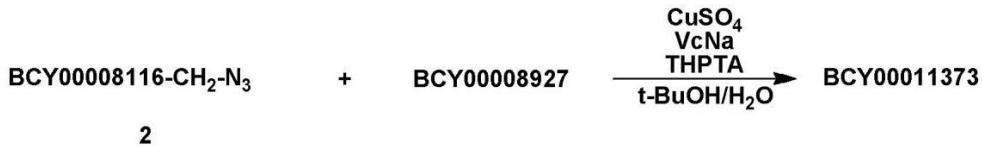
化合物1(5.0 mg、49.5 μ mol、1.0当量)のDMF(1mL)中溶液に、EDCI(8.5 mg、54.8 μ mol、1.1当量)およびHOSt(5.7 mg、49.5 μ mol、1.0当量)を添加した。混合物を25~30で30分間攪拌した。TLCは、化合物1が完全に消費されており、1つの新たなスポットが形成されたことを示した。次いで、この混合物0.3 mLにBCY8116(30.0 mg、13.81 μ mol、0.28当量)およびDIEA(2.4 μ L、13.81 μ mol、0.28当量)を添加し、25~30で2時間攪拌した。LC-MSは、BCY8116が完全に消費されていることを示し、所望のm/z(計算MW: 2255.53、実測m/z: 1128.34([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(21 mg、8.9 μ mol、収率64.43%、純度95.56%)を白色固体として得た。

(0 4 2 4)

B C Y 1 1 3 7 3 を調製する手順

(0 4 2 5)

【化 1 5 7】



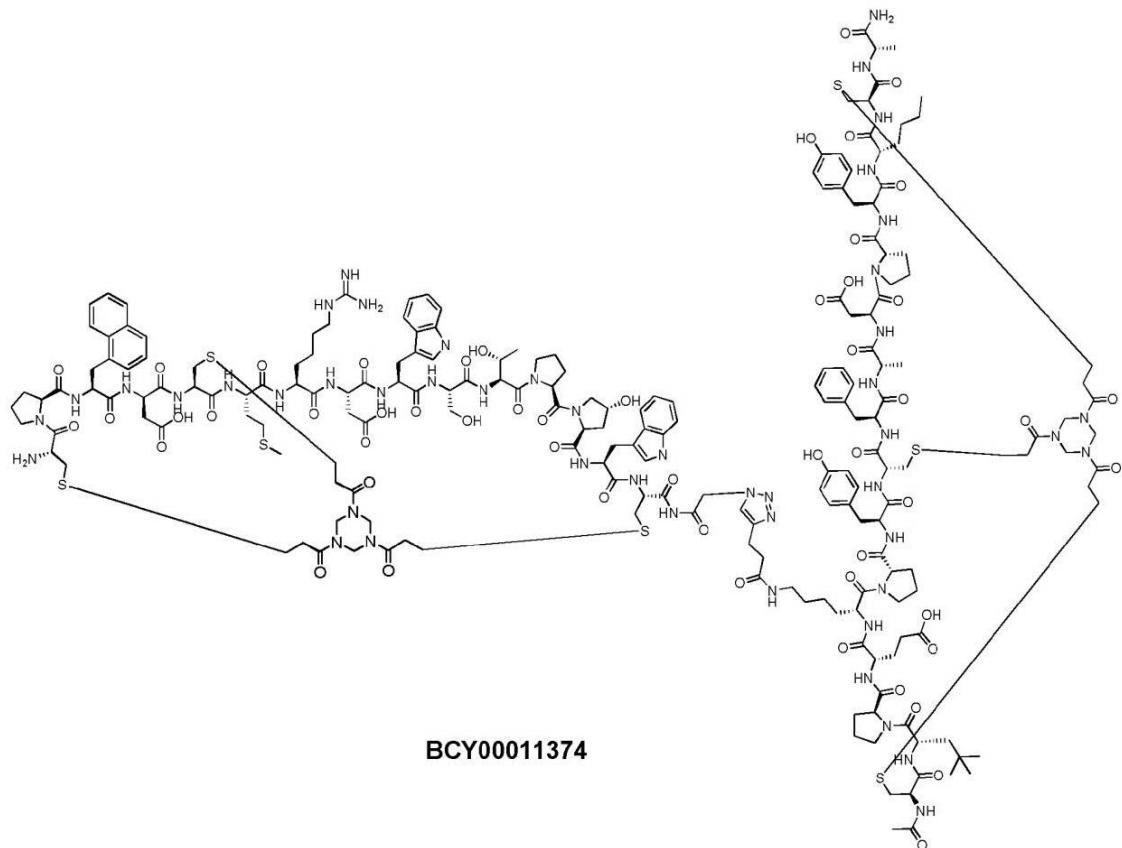
化合物2(5mg、2.22μmol、1.0当量)、BCY8928(4.79mg、2.22μmol、1.0当量)およびTHPTA(1.0mg、2.30μmol、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、1mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、5.6μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、5.6μL、1.0当量)をN₂下で添加した。0.2M NH₄CO₃(1:1 t-BuOH/H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、40℃で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていることを示し、所望のm/z(計算MW:4415.07、実測m/z:1471.5([M/3+H]⁺および1103.8([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、BCY11373(4.9mg、1.03μmol、収率46.26%、純度92.4%)を白色固体として得た。

(0 4 2 6)

B C Y 1 1 3 7 4

(0 4 2 7)

【化158】



B C Y 1 1 3 7 4 を調製する手順

【0428】

【化159】



化合物2（B C Y 1 1 3 7 3を調製する手順に記載されるように調製され得る；5 m g、2 . 2 2 μ m o l、1 . 0 当量）、B C Y 8 9 2 8（4 . 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回バージした）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雾囲気下、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 7 3 . 1 1、実測m / z : 1 4 9 1 . 5 ([M / 3 + H] + および1 1 1 8 . 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H P L C（T F A条件）によって精製し、B C Y 1 1 3 7 4（4 . 1 m g、1 . 2 7 μ m o l、収率3 8 . 0 4 %、純度9 2 . 0 %）を白色固体として得た。

【0429】

B C Y 1 1 3 7 5

【0430】

10

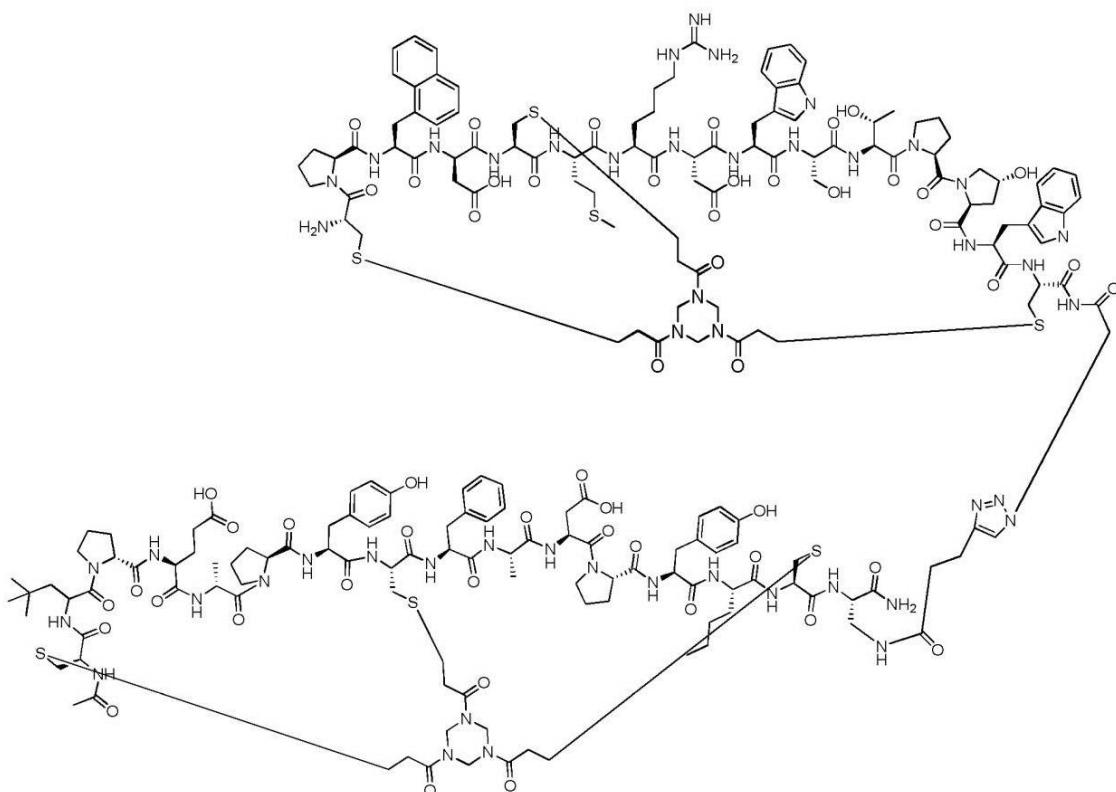
20

30

40

50

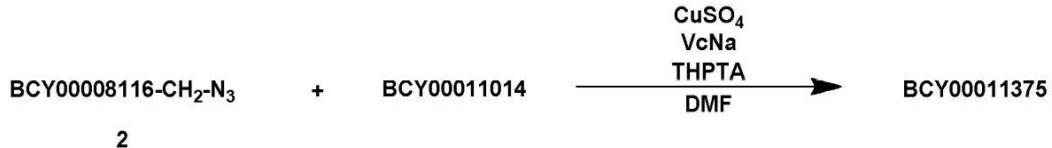
【化160】

**BCY00011375**

B C Y 1 1 3 7 5 を調製する手順

【0431】

【化161】



化合物2（B C Y 1 1 3 7 3に記載されるように調製され得る；5 mg、2.22 μm o l、1.0当量）、B C Y 1 1 0 1 4（4.8 mg、2.22 μmol、1.0当量）およびT H P T A（0.5 mg、2.30 μmol、1.0当量）の混合物をt - B u O H / 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、C u S O₄（0.4 M、5.6 μL、1.0当量）およびV c N a（0.4 M、5.6 μL、1.0当量）をN₂下で添加した。0.2 M N H₄H 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雾囲気下、40 °Cで2時間攪拌した。L C - M Sは、いくつかの所望のm/z（計算M W : 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H P L C（T F A条件）によって精製し、B C Y 1 1 3 7 5（6 mg、1.31 μmol、収率59.13%、純度96.8%）を白色固体として得た。

【0432】

B C Y 1 1 6 1 6

10

20

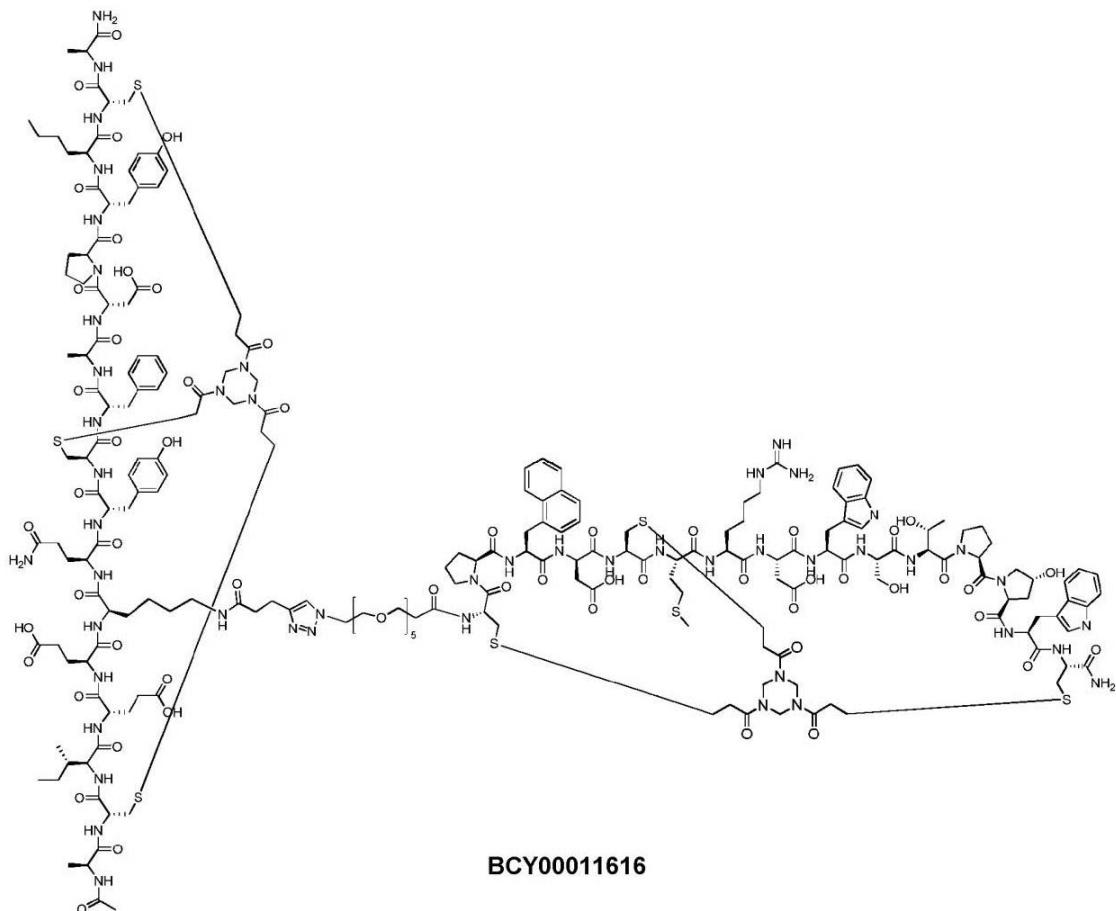
30

40

50

【0433】

【化162】



10

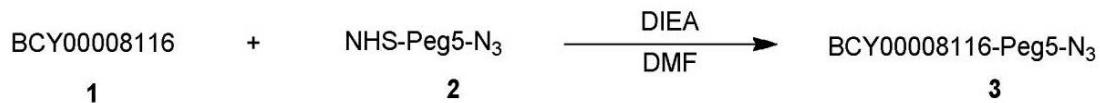
20

化合物3を調製する手順

【0434】

【化163】

30



化合物BCY8116(30.0mg、13.81μmol、1.0当量)、化合物2(6.0mg、13.88μmol、1.0当量)およびDIEA(2.4μL、13.82μmol、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: 2489.82、実測m/z: 1245.4([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40℃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(27mg、10.29μmol、収率74.52%、純度94.9%)を白色固体として得た。

40

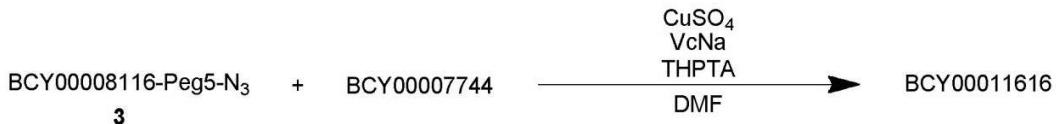
【0435】

BCY11616を調製する手順

【0436】

50

【化164】



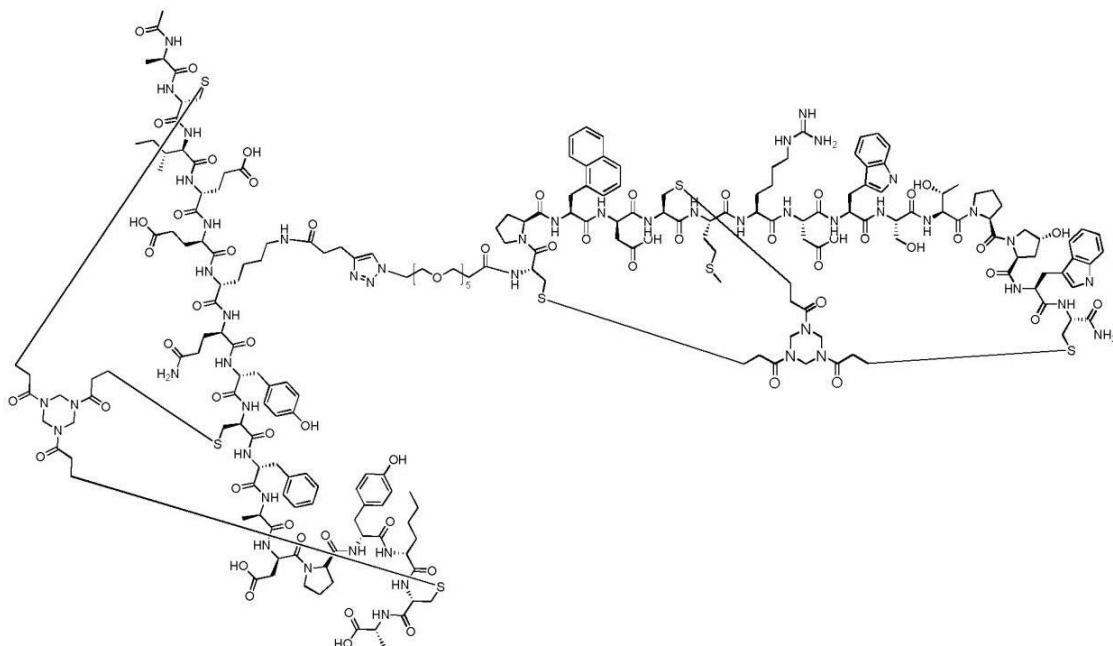
化合物3(5mg、2.01μmol、1.0当量)、BCY7744(5.2mg、2.21μmol、1.1当量)およびTHPTA(1.0mg、2.30μmol、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、1mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、5.0μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、5.0μL、1.0当量)をN₂下で添加した。0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、40℃で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていることを示し、所望のm/z(計算MW: 4827.46、実測m/z: 1207.12([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(4.7mg、1.0μmol、収率48.48%、純度94.7%)を白色固体として得た。

【0437】

BCY11617

【0438】

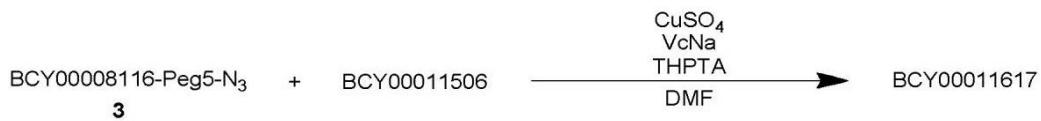
【化165】



BCY11617を調製する手順

【0439】

【化166】



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; 5mg、2.01μmol、1.0当量)、BCY11506(5.2mg、2.21μmol

10

20

30

40

50

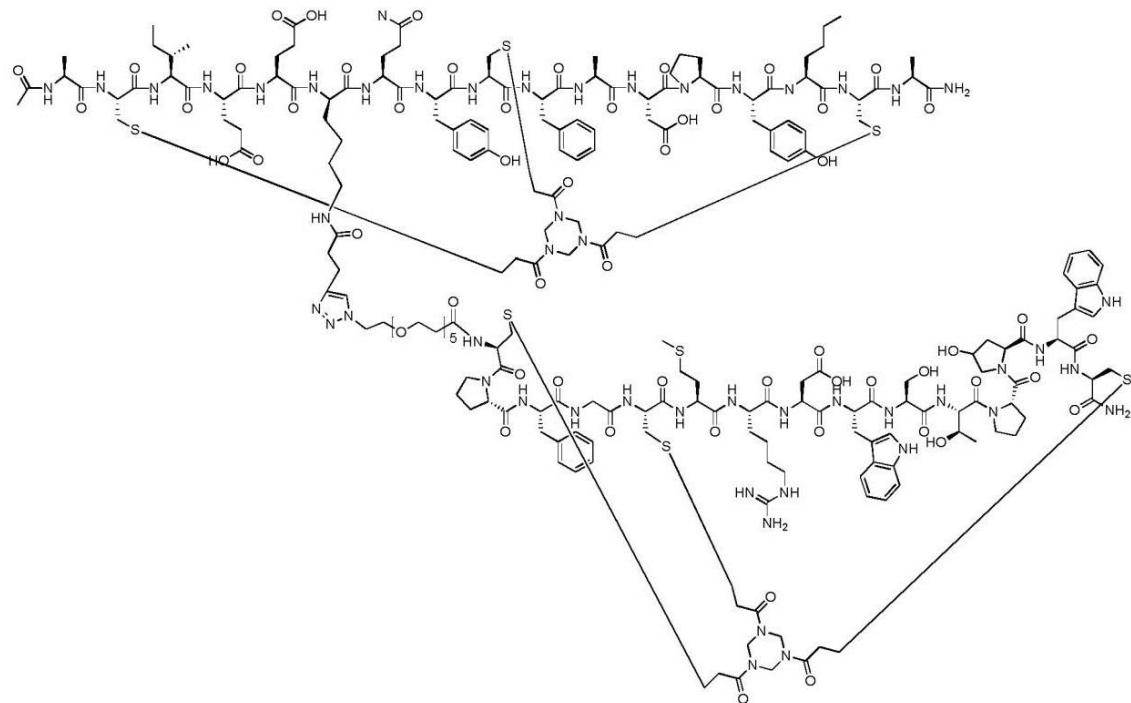
、1.1当量)およびTHPTA(1.0mg、2.30μmol、1.1当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、1mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、5.0μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、5.0μL、1.0当量)をN₂下で添加した。0.2M NH₄HCO₃(1:t-BuOH/H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、40℃で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていることを示し、所望のm/z(計算MW:482.45、実測m/z:1206.97([M/4+H]⁺)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、0.63μmol、収率31.37%、純度95.05%)を白色固体として得た。

$\begin{bmatrix} 0 & 4 & 4 & 0 \end{bmatrix}$

B C Y 1 1 8 5 7

【 0 4 4 1 】

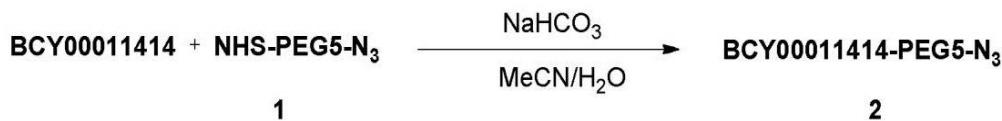
【化 1 6 7】



B C Y 1 1 4 1 4 - P E G 5 - N₃を調製する手順

[0 4 4 2]

【化 1 6 8】



B C Y 1 1 4 1 4 (6 0 . 0 mg、 2 9 . 0 6 μ mol、 1 . 0 当量) および化合物 1 (1 3 . 0 mg、 3 0 . 0 6 μ mol、 1 . 0 3 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 2 5 ~ 3 0 で 2 時間攪拌した。 LC - M S は、 所望の m / z (計算 MW : 2 3 8 1 . 7 2 、 実測 m / z : 1 1 9 1 . 0 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。 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】



10

2

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)2mL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+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

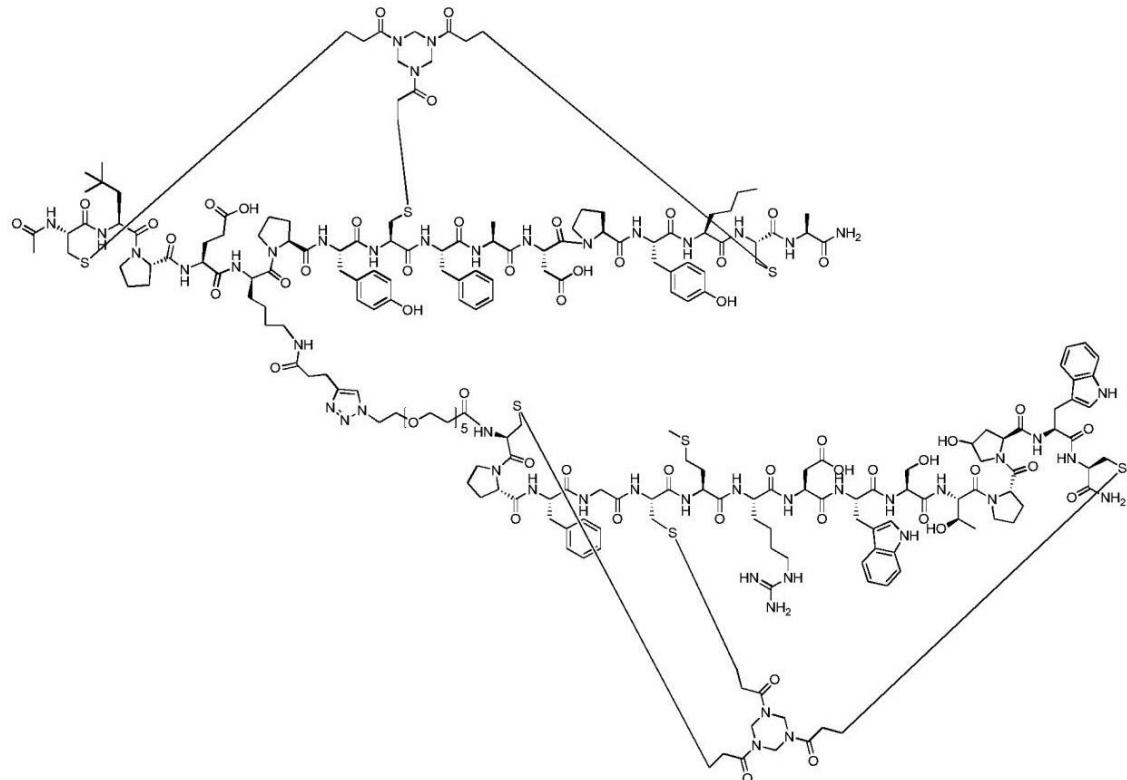
【0446】

30

40

50

【化 1 7 0】



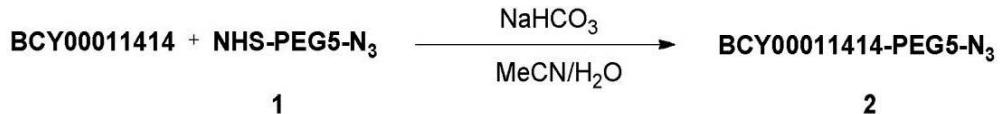
10

20

B C Y 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】



30

B C Y 1 1 4 1 4 (6 0 . 0 mg、 2 9 . 0 6 μ mol、 1 . 0 当量) および化合物 1 (1 3 . 0 mg、 3 0 . 0 6 μ mol、 1 . 0 3 当量) を M e C N / H₂O (1 : 1) 2 mL に溶解した。 N a H C O₃ (0 . 4 M) で pH を 8 に調整し、 次いで、 混合物を 2 5 ~ 3 0 で 2 時間攪拌した。 L C - M S は、 所望の m / z (計算 MW : 2 3 8 1 . 7 2 、 実測 m / z : 1 1 9 1 . 0 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。 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 2 (3 8 . 0 mg、 1 5 . 9 μ mol、 収率 5 4 . 7 1 %、 純度 9 7 . 3 5 %) を白色固体として得た。

40

[0 4 4 8]

B C Y 1 1 8 5 8 を調製する手順

【 0 4 4 9 】

【化 1 7 2】



2

50

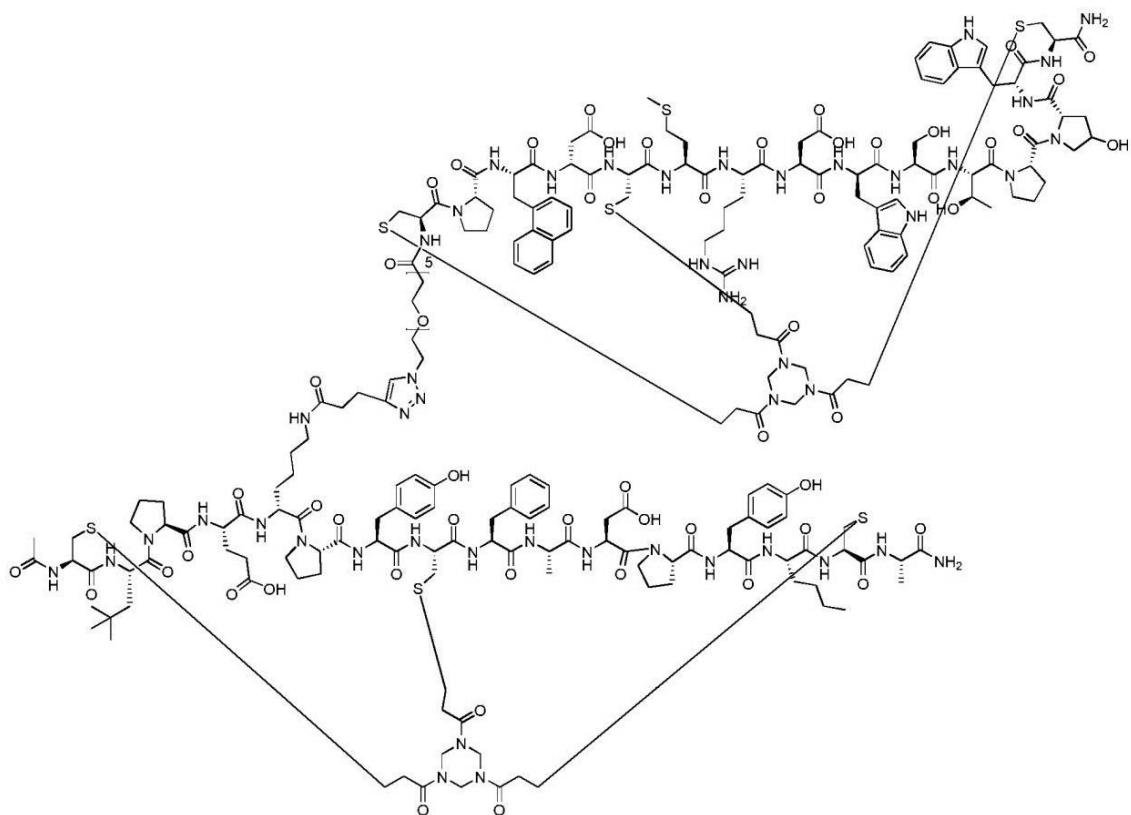
化合物2(20.0 mg、8.40 μmol、1.0当量)およびBCY8928(22.0 mg、9.92 μmol、1.1当量)を最初にt-BuOH/H₂O(1:1)2 mLに溶解し、次いで、CuSO₄(0.4 M、21.0 μL、1.0当量)、VCN(4.0 mg、20.19 μmol、2.4当量)およびTHPTA(4.0 mg、9.20 μmol、1.1当量)を添加した。最後に、0.4 M NH₄HCO₃を添加して、pHを8に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂で3回バージした。反応混合物を、N₂雰囲気下、30 °Cで16時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていること、および所望のm/z(計算MW: 4599.30、実測m/z: 920.38([M/5+H]⁺)、1150.79([M/4+H]⁺)、1533.35([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、BCY11858(16.9 mg、3.67 μmol、収率43.43%、純度99.25%)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 〕

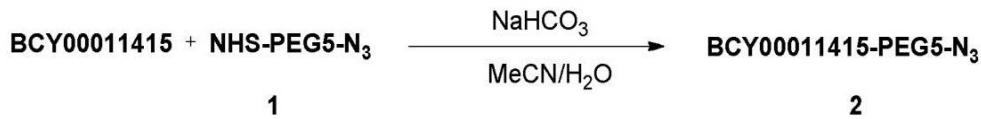
【化 1 7 3】



B C Y 1 1 4 1 5 - P E G 5 - N₃ 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(0.4M)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: 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たことを示した。反応混合物を分取HPLC(TFA条件)によって精製し、化合物2(24.0mg、9.63μmol、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(20.0mg、8.03μmol、1.0当量)およびBCY8928(21.0mg、9.47μmol、1.1当量)を最初にt-BuOH/H₂O(1:1)2mLに溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、21.0μL、1.0当量)、VcNa(4.0mg、2.5当量)およびTHPTA(4.0mg、1.1当量)を添加した。最後に、1M 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: 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(19.2mg、4.01μmol、収率49.87%、純度98.22%)を白色固体として得た。

20

【0455】

【実施例4】

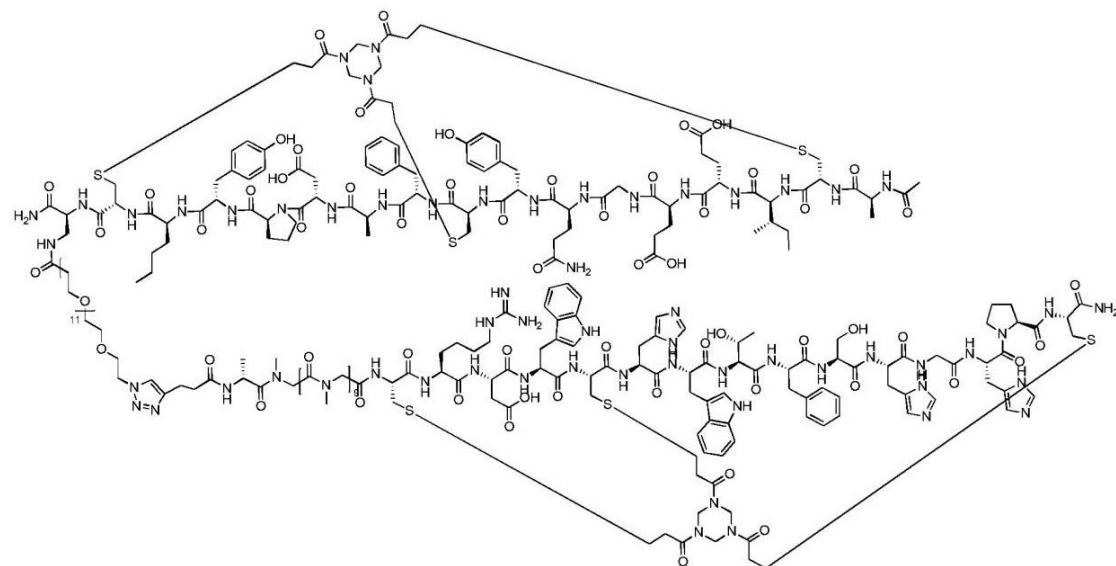
30

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】



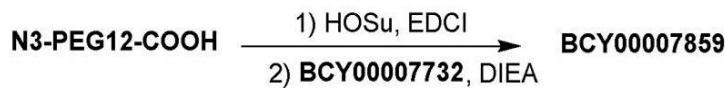
40

50

BCY8939を調製する一般的な手順

【0457】

【化177】



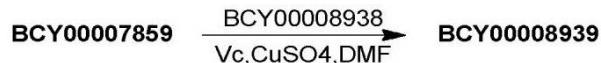
N3-PEG12-COOH (250 mg、388 μmol) およびHOSe (67.0 mg、583 μmol) のDMA (4.5 mL) およびDCM (1.5 mL) 中溶液に、EDCI (89.3 mg、466 μmol) を添加し、20 で16時間攪拌した。LC-MSは、所望の中間体が完全に形成されていることを示した。BCY7732 (854.97 mg、388.37 μmol、1当量) およびDIEA (186 mg、1.44 mol、250 μL) を混合物に添加し、20 でさらに5時間、さらに攪拌した。LC-MSは、BCY7732が完全に消費されていることを示し、所望の質量を有する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]⁺。

【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-ジヒドロキシリル-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。LC-MS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]⁺

【0460】

BCY10580

【0461】

10

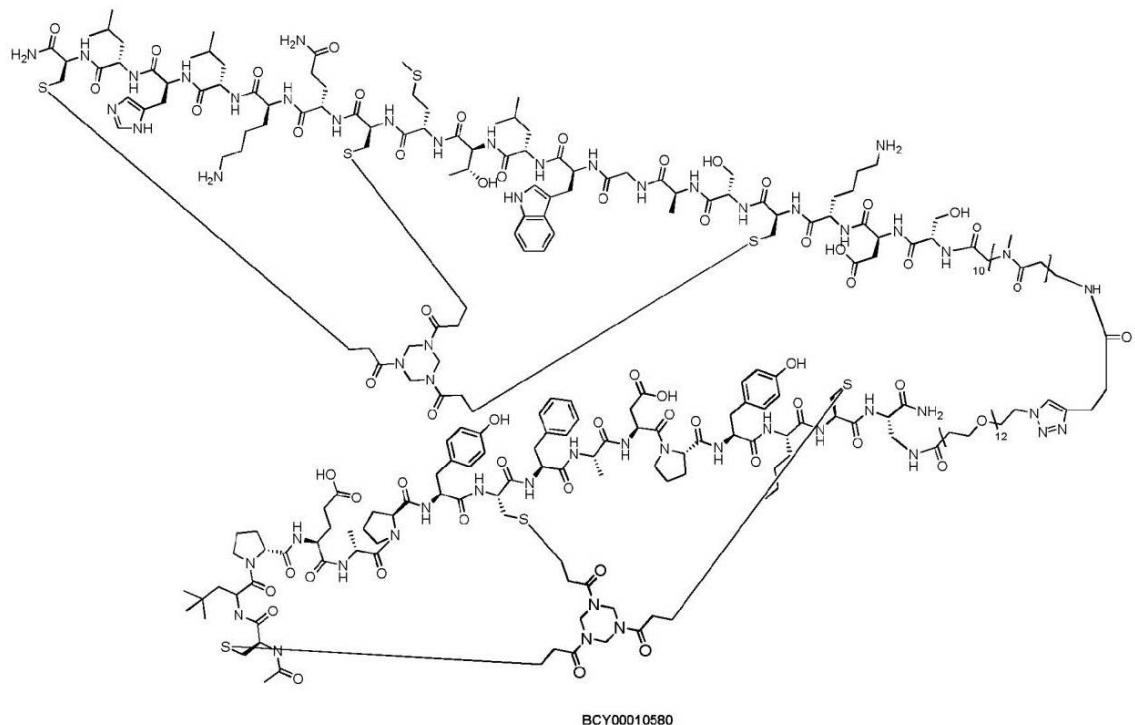
20

30

40

50

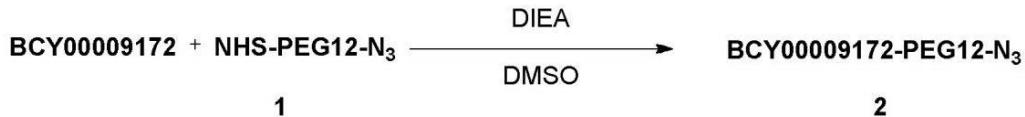
【化 1 7 9】



B C Y 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 BCY9172 (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、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 ([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 】

B C Y 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 BCY10043 (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、1.84 μL、1.0 当量)、VcNa

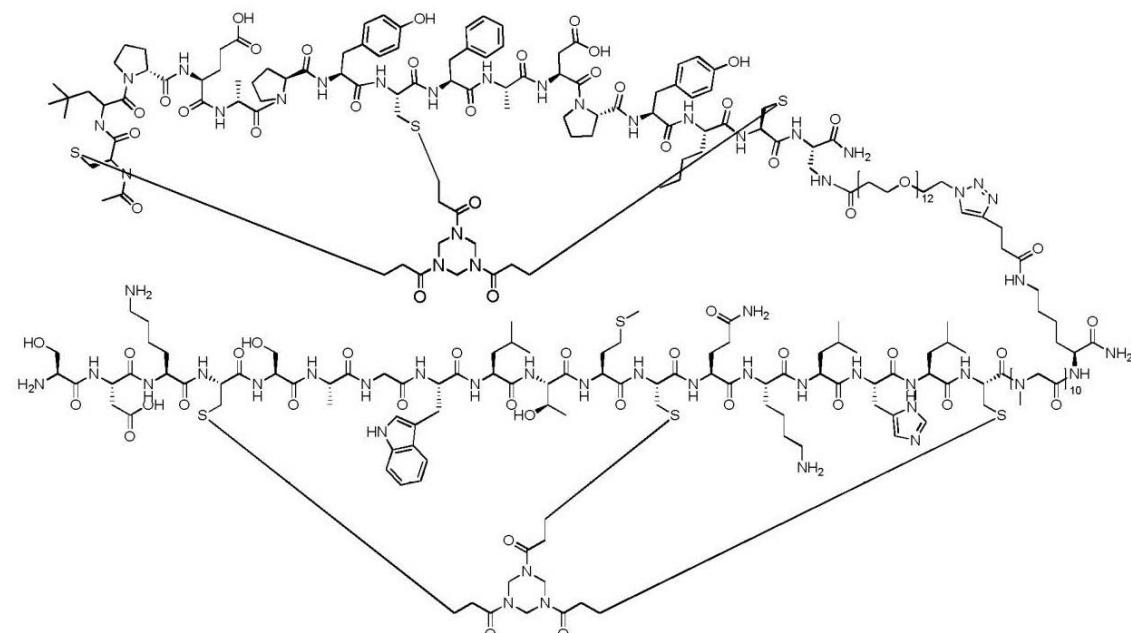
(0.4M、36.8 μL、2.0当量)およびTHPTA(0.4M、18.4 μL、1.0当量)を添加した。最後に、1M NH₄HCO₃を添加して、pHを8に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂で3回バージした。反応混合物を、N₂雰囲気下、30で4時間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていることを示し、所望のm/z(MW: 5855.74 実測m/z: 976.40([M/6+H]⁺)および1171.67([M/5+H]⁺)を有する1つの主ピークが検出された。残留物を分取HPLC(TFA条件)によって精製した。BCY10580(29mg、4.85 μmol、収率65.95%、純度97.879%)を白色固体として得た。

【 0 4 6 5 】

B C Y 1 0 5 8 1

【 0 4 6 6 】

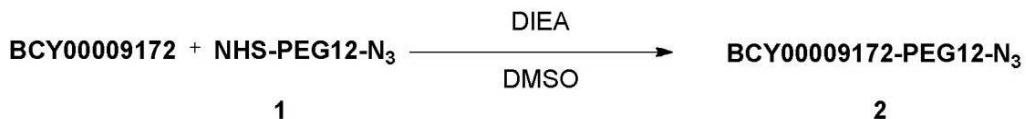
【化 1 8 2】



B C Y 9 1 7 2 - P E G 1 2 - N₃を調製する手順

[0 4 6 7]

【化 1 8 3】



D M S O (2 m L) 中 B C Y 9 1 7 2 (1 0 0 m g 、 4 7 . 7 2 μ m o l 、 1 当量) および化合物 1 (4 0 . 0 0 m g 、 5 4 . 0 0 μ m o l 、 1 . 1 3 当量) に、 D I E A (9 . 2 5 m g 、 7 1 . 5 8 μ m o l 、 1 2 . 4 7 μ L 、 1 . 5 当量) を添加した。混合物を 3 0 度で 1 2 時間攪拌した。L C - M S は、 B C Y 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 (M W : 2 7 2 1 . 1 2 、 実測 m / z : 1 3 6 1 . 0 7 ([(M / 2 + H⁺])) を有する 1 つの主ピーカーが検出された。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 H P L C (中性条件) によって精製した。化合物 2 (4 8 m g 、 1 7 . 4 4 μ m o l 、 収率 4 5 . 6 8 % 、 純度 9 8 . 8 7 %) を白色固体として得た。

[0 4 6 8]

B C Y 1 0 5 8 1 を調製する手順

【0469】

【化184】



2

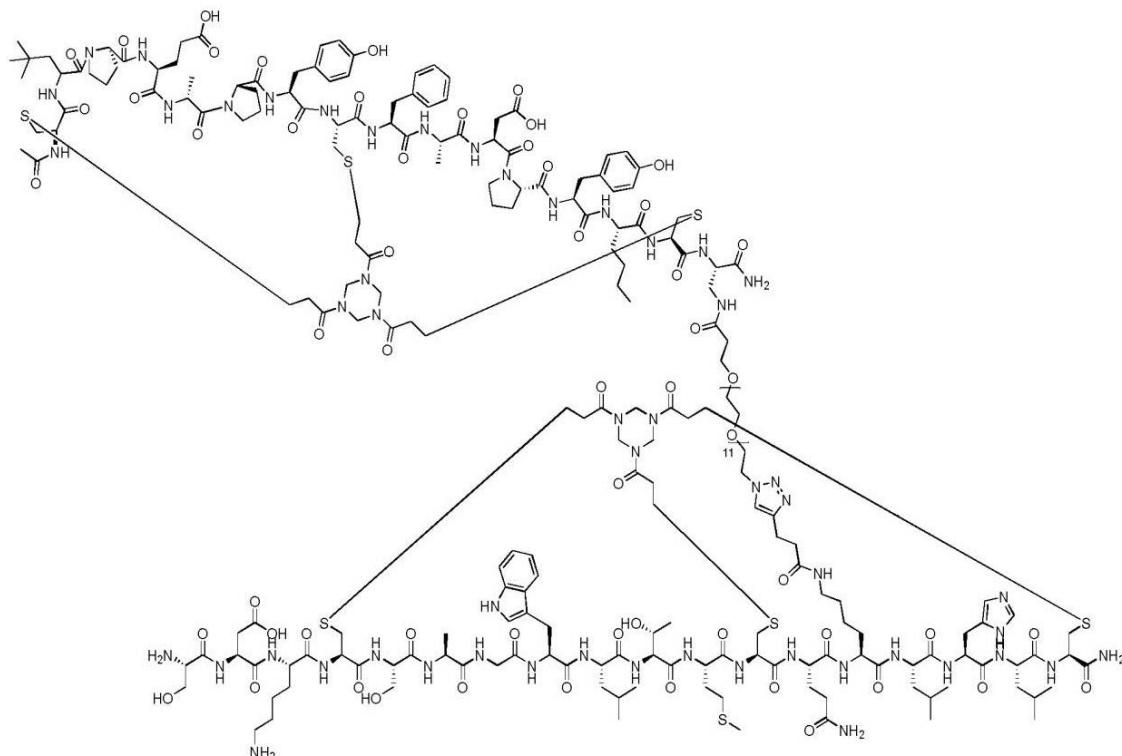
化合物2(12mg、4.41μmol、1当量)およびBCY10044(14.08mg、4.41μmol、1当量)を最初にt-BuOH/H₂O(1:1)2mLに溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、11.02μL、1当量)、VcNa(0.4M、22.05μL、2当量)およびTHPTA(0.4M、10.04μL、1当量)を添加した。最後に、1M NH₄HCO₃を添加して、pHを8に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂で3回バージした。反応混合物を、N₂雰囲気下、30℃で4時間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていることを示し、所望のm/z(MW: 5912.84、実測m/z: 985.90([M+6+H]⁺)および1183.28([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HPLC(TFA条件)によって精製した。BCY10581(9.3mg、1.47μmol、収率33.36%、純度93.541%)を白色固体として得た。

【0470】

BCY10582

【0471】

【化185】



化合物2を調製する手順

【0472】

10

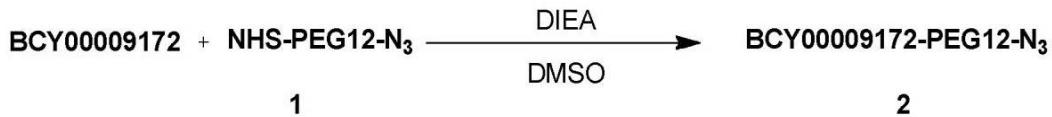
20

30

40

50

【化 1 8 6】



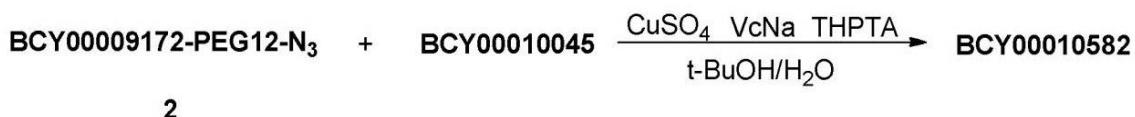
B C Y 9 1 7 2 (1 0 0 . 0 m g 、 4 7 . 7 μ m o l 、 1 . 0 当量)、化合物 1 (4 0 . 0 m g 、 5 4 . 0 μ m o l 、 1 . 1 3 当量) の D M S O (2 m L) 中溶液に、D I E A (9 . 2 m g 、 7 1 . 6 μ m o l 、 1 2 . 5 μ L 、 1 . 5 当量) を添加した。混合物を 3 0 で 1 2 時間攪拌した。L C - M S は、B C Y 9 1 7 2 が完全に消費されていることを示し、所望の m / z (計算 MW : 2 7 2 1 . 1 2 、 実測 m / z : 1 3 6 1 . 0 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 H P L C (T F A 条件) によって精製した。化合物 2 (3 7 m g 、 1 3 . 6 0 μ m o l 、 収率 2 8 . 4 9 %) を白色固体として得た。

(0 4 7 3)

B C Y 1 0 5 8 2 を調製する手順

(0 4 7 4)

【化 1 8 7】



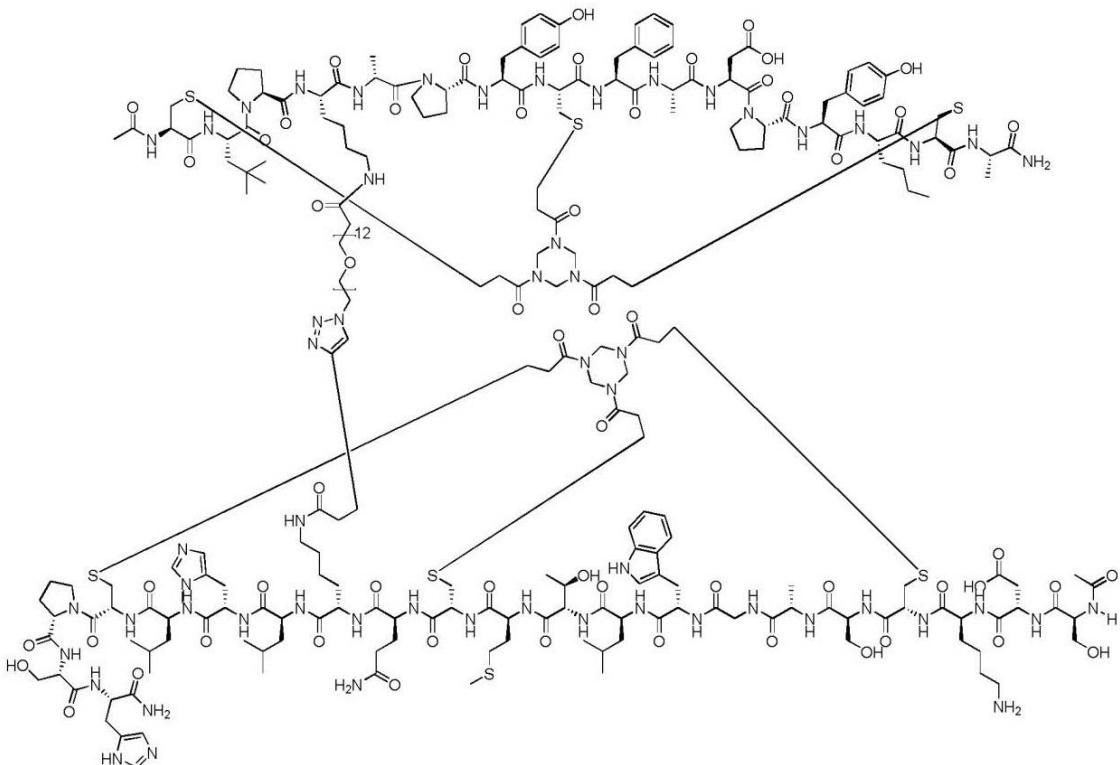
化合物2(16.0mg、5.9μmol、1.0当量)、BCY10045(14.0mg、6.0μmol、1.01当量)およびTHPTA(0.4M、14.7μL、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、14.7μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、29.4μL、2.0当量)をN₂下で添加した。0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、25~30℃で12時間攪拌した。LC-MSは、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(10mg、1.92μmol、収率32.58%、純度97.21%)を白色固体として得た。

〔 0 4 7 5 〕

B C Y 1 1 0 1 7

(0 4 7 6)

【化188】

**BCY00011017**

B C Y 1 1 0 1 7 を調製する手順

【0477】

【化189】



2

化合物2（B C Y 1 0 5 6 7 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B C Y 1 0 8 6 1（7.03 mg、2.59 μmol、1.0当量）を最初にt - BuOH / H₂O（1：1）2mL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、1M NH₄HCO₃を添加して、pHを8に調整した。ここで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、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+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、B C Y 1 1 0 1 7（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】

B C Y 1 1 0 1 8

【0479】

10

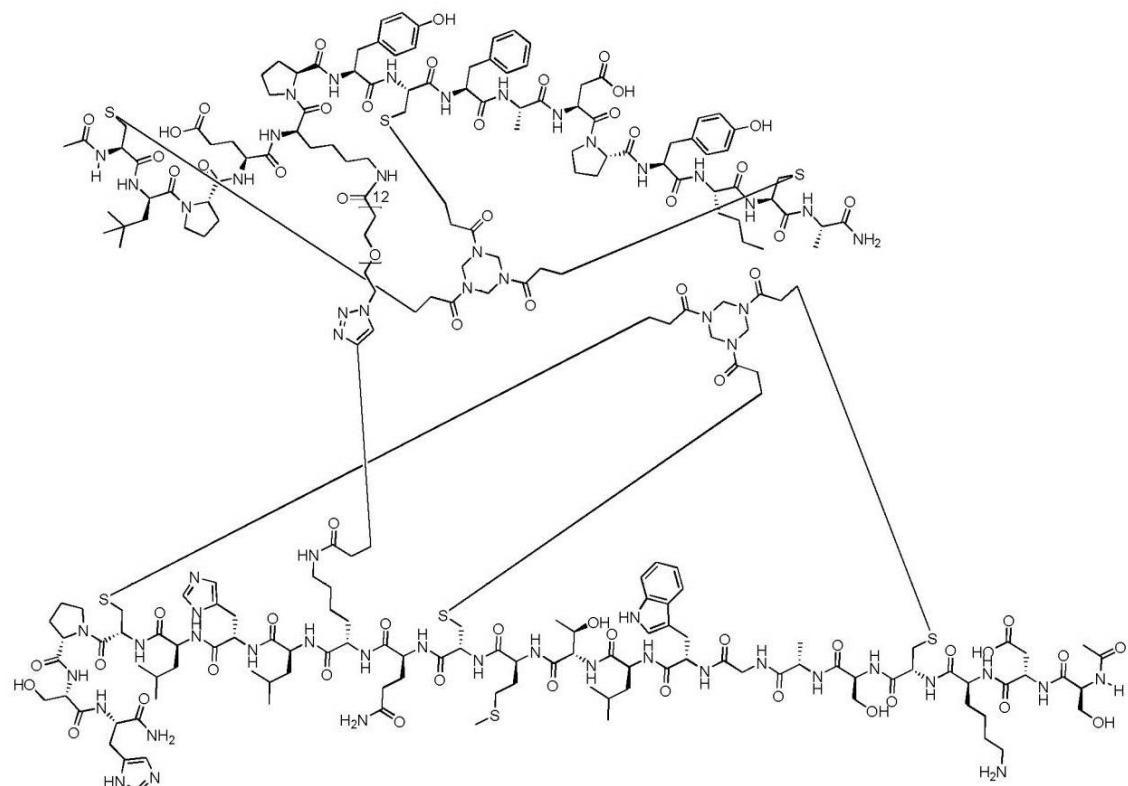
20

30

40

50

【化190】



B C Y 1 1 0 1 8 を調製する手順

【0480】

【化191】

**2**

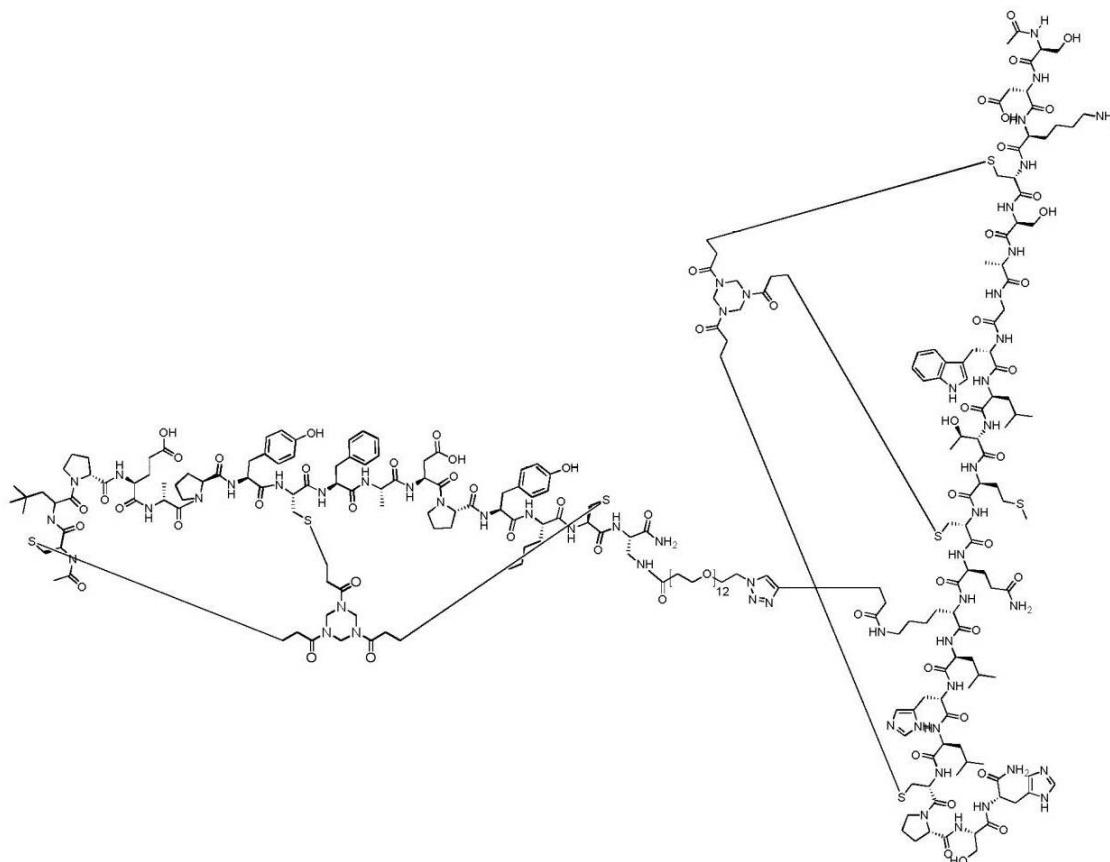
化合物2（B C Y 1 0 5 7 0 を調製する手順に記載されるように調製され得る；6.0 mg、2.17 μmol、1.0当量）およびB C Y 1 0 8 6 1（5.9 mg、2.17 μmol、1.0当量）を最初にt - BuOH / H₂O（1 : 1）2 mLに溶解し、次いで、CuSO₄（0.4 M、11.0 μL、2.0当量）、VcNa（1.0 mg、2.3当量）およびTHPTA（1.1 mg、1.0当量）を添加した。最後に、1 M NH₄HCO₃を添加して、pHを8に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂で3回バージした。反応混合物を、N₂雰囲気下、35 °Cで16時間攪拌した。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 + H]⁺））を有する1つの主ピーカーを示した。反応混合物を分取HPLC（TFA条件）によって精製し、B C Y 1 1 0 1 8（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】

B C Y 1 1 0 1 9

【0482】

【化192】



BCY00011019

B C Y 1 1 0 1 9 を調製する手順

【0483】

【化193】

30



化合物2 (B C Y 1 0 5 8 1 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 . 9 4 μ mol、1 . 0 当量) および B C Y 1 0 8 6 1 (8 . 0 mg、2 . 9 5 μ mol、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、1 4 . 7 μ L、2 . 0 当量)、VcNa (1 . 2 mg、6 . 0 5 μ mol、2 . 0 当量) および THPTA (1 . 3 mg、2 . 9 9 μ mol、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 雾囲気下、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 つの主ピーカーを示した。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 μ mol、収率 46 . 09%、純度 96 . 95 %) を白色固体として得た。

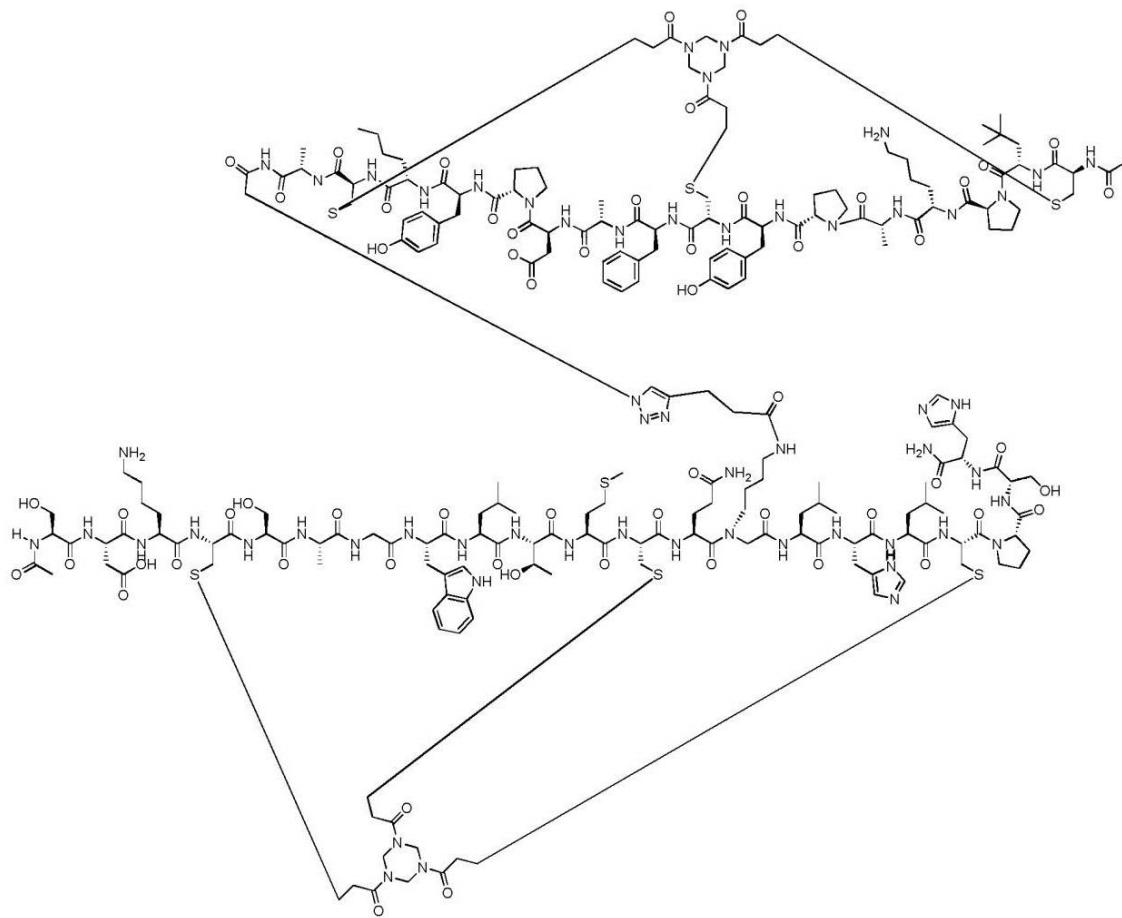
【0484】

B C Y 1 1 3 7 6

50

【 0 4 8 5 】

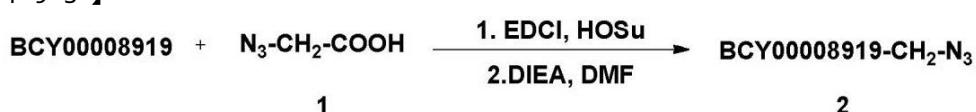
【化 1 9 4】



化合物 2 を調製する手順

【0486】

【化 195】



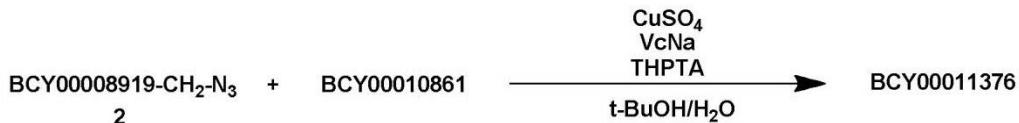
化合物1(5.0 mg、49.5 μ mol、1.0当量)のDMF(1mL)中溶液に、EDCI(8.5 mg、54.8 μ mol、1.1当量)およびHOSt(5.7 mg、49.5 μ mol、1.0当量)を添加した。混合物を25~30で30分間攪拌した。TLCは、化合物1が完全に消費されており、1つの新たなスポットが形成されたことを示した。次いで、この混合物0.2 mLにBCY8919(20.0 mg、9.62 μ mol)およびDIEA(1.7 μ L、9.62 μ mol)を添加した。混合物を25~30で2時間攪拌した。LC-MSは、BCY8919が完全に消費されていることを示し、所望のm/z(計算MW: 2162.51、実測m/z: 1081.8([M+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(12 mg、5.55 μ mol、収率56.28%、純度97.54%)を白色固体として得た。

(0 4 8 7)

B C Y 1 1 3 7 6 を調製する手順

【 0 4 8 8 】

【化196】



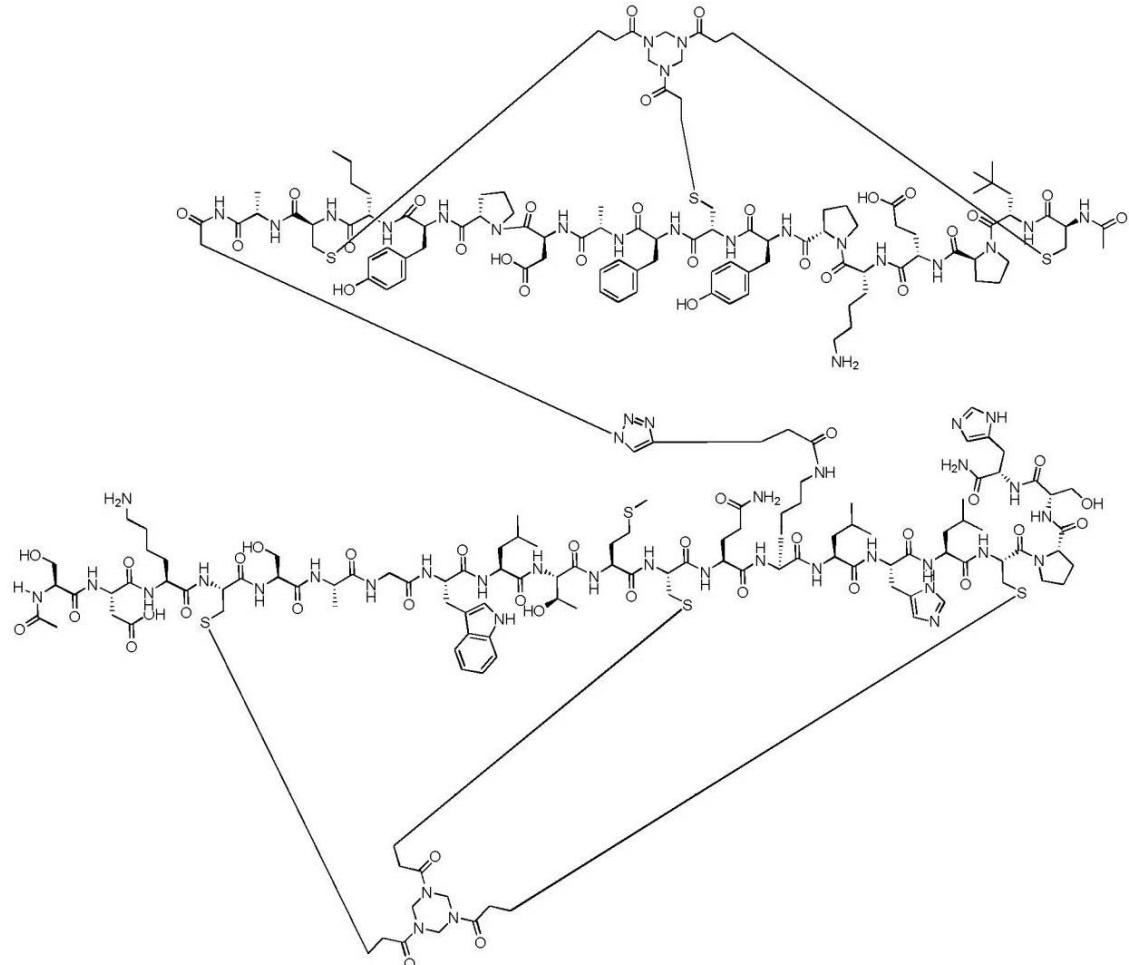
化合物2(3mg、1.39μmol、1.0当量)、BCY10861(3.8mg、1.40μmol、1.0当量)およびTHPTA(1.2mg、2.76μmol、2.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、1mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、3.5μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、3.5μL、1.0当量)をN₂下で添加した。0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、40℃で2時間攪拌した。LC-MSは、BCY10861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(1.9mg、1.0μmol、収率27.01%、純度96.2%)を白色固体として得た。

【0489】

BCY11377

【0490】

【化197】

**BCY00011377**

化合物2を調製する手順

10

20

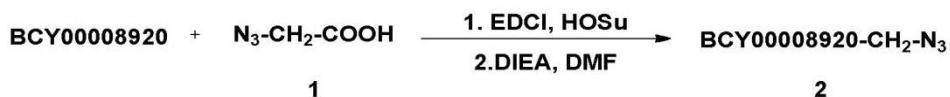
30

40

50

【 0 4 9 1 】

【化 198】



化合物1(5.0mg、49.5μmol、1.0当量)のDMF(1mL)中溶液に、EDCI(8.5mg、54.8μmol、1.1当量)およびHOSt(5.7mg、49.5μmol、1.0当量)を添加した。混合物を25~30℃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0.2mLにBCY8920(20.0mg、9.36μmol)およびDIEA(1.2mg、9.36μmol)を添加した。混合物を25~30℃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:2220.54、実測m/z:1110.90([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(12mg、5.15μmol、収率56.28%、純度95.3%)を白色固体として得た。

【 0 4 9 2 】

B C Y 1 1 3 7 7 を調製する手順

【 0 4 9 3 】

【化 1 9 9】



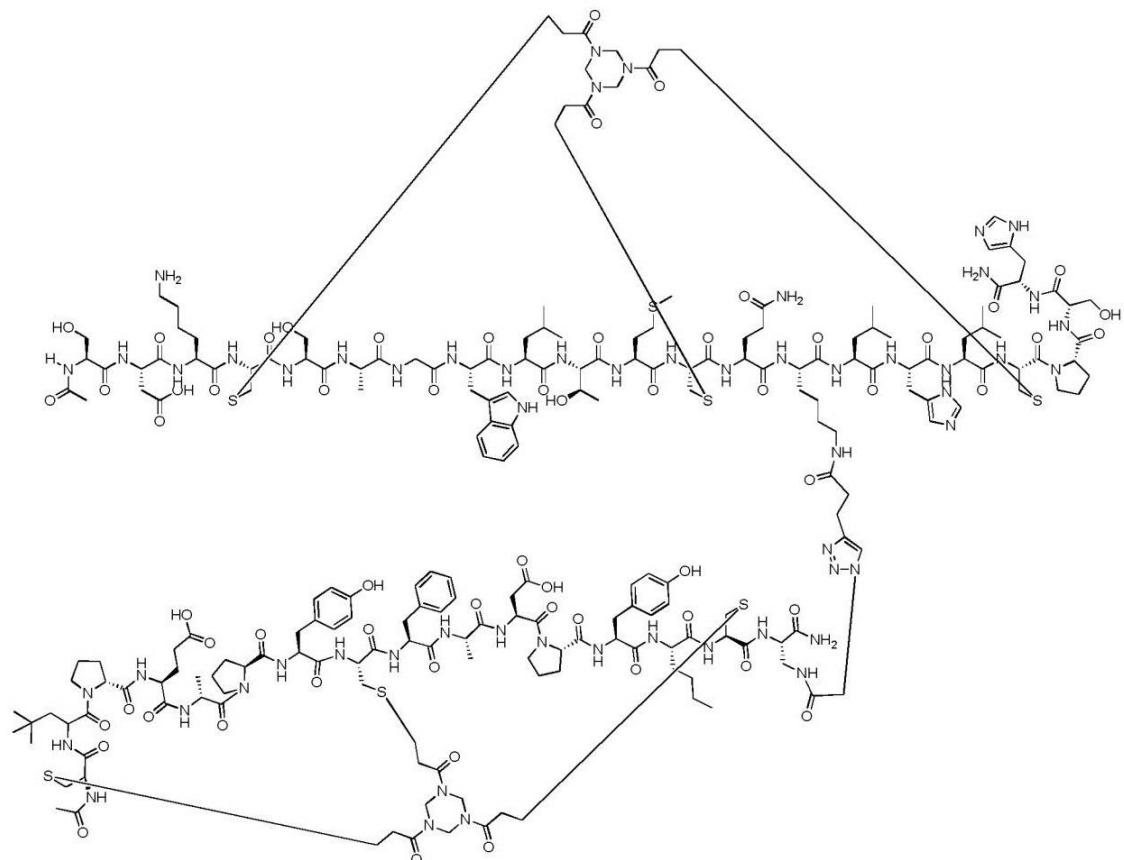
化合物2(3mg、1.35μmol、1.0当量)、BCY10861(3.8mg、1.35μmol、1.0当量)およびTHPTA(0.6mg、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、1mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、3.4μL、1当量)およびVcNa(0.4M、3.4μL、1当量)をN₂下で添加した。0.2M NH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、40℃で2時間攪拌した。LC-MSは、所望のm/z(計算MW:4936.68、実測m/z:1234.9([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HPLC(TFA条件)によって精製し、BCY11377(3.5mg、0.66μmol、収率48.86%、純度93.1%)を白色固体として得た。

(0 4 9 4)

B C Y 1 1 3 7 8

(0 4 9 5)

【化 2 0 0】



10

20

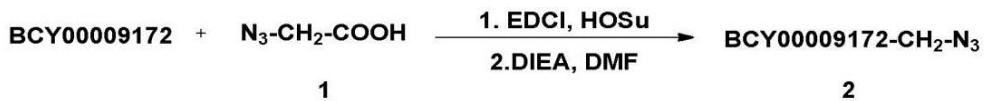
BCY00011378

化合物 2 を調製する手順

【 0 4 9 6 】

【化 2 0 1】

30



化合物1(5.0 mg、49.5 μmol、1.0当量)のDMF(1mL)中溶液に、EDCI(8.5 mg、54.8 μmol、1.1当量)およびHOSt(5.7 mg、49.5 μmol、1.0当量)を添加した。混合物を25~30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つの主ピーカーが検出された。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。

40

(0 4 9 7)

B C Y 1 1 3 7 8 を調製する手順

【 0 4 9 8 】

【化202】



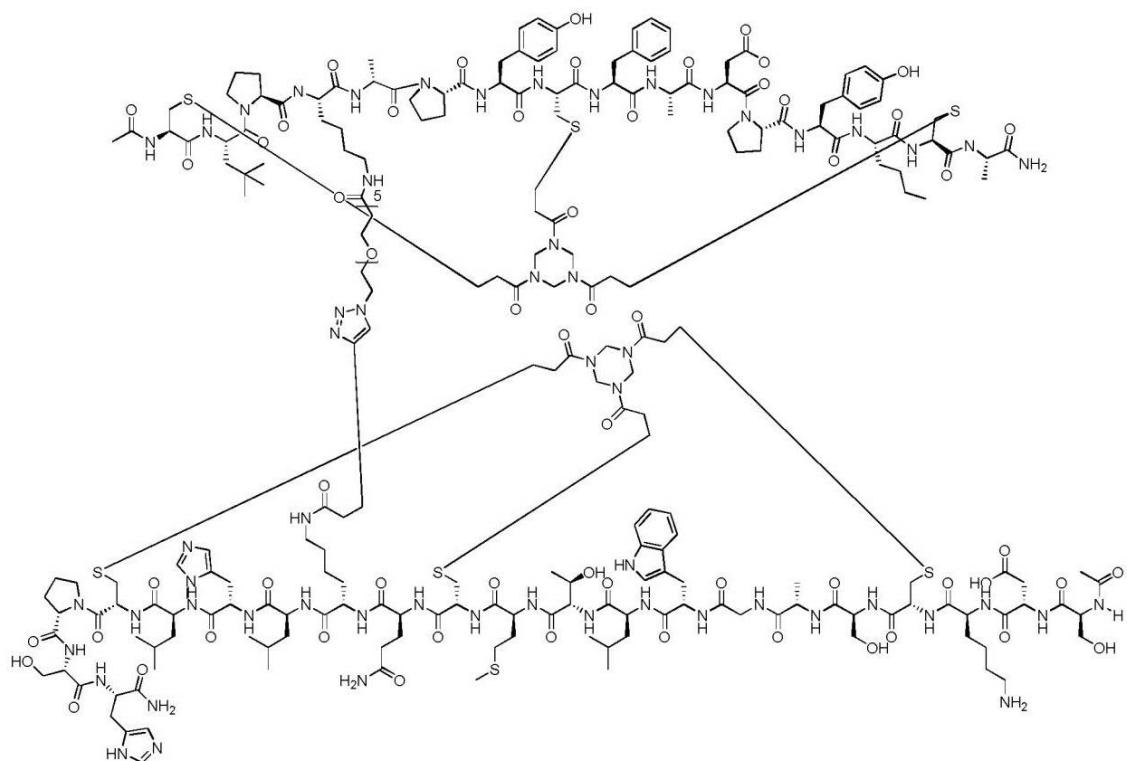
化合物2(5mg、2.30μmol、1.0当量)、BCY10861(6.24mg、2.30μmol、1.0当量)およびTHPTA(1.0mg、1.0当量)の混合物をt-BuOH/H₂O(1:1、1mL、予め脱気し、N₂で3回バージした)に溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、5.8μL、1.0当量)およびVcNa(0.4M、5.8μL、1.0当量)をN₂下で添加した。0.2M NH₄HCO₃(1:t-BuOH/H₂O中)を滴加することによって、この溶液のpHを8に調整すると、溶液が淡黄色になった。反応混合物を、N₂雰囲気下、40で2時間攪拌した。LC-MSは、化合物3が完全に消費されていること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

【0499】

BCY11379

【0500】

【化203】



BCY00011379

BCY8919-P EG5-N₃を調製する手順

【0501】

10

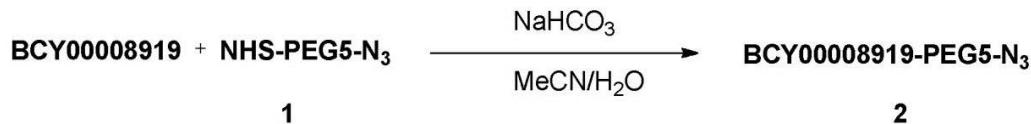
20

30

40

50

【化 2 0 4】



B C Y 8 9 1 9 (3 0 . 0 mg、 1 4 . 4 3 μ mol、 1 . 0 当量) および化合物 1 (6 . 3 mg、 1 4 . 5 7 μ mol、 1 . 0 1 当量) を、 M e C N (1 mL) と H₂O (1 mL) の混合物に溶解した。溶液に 1 M N a H C O₃ を添加して、 pH を 8 に調整し、 次いで、 混合物を 3 5 ℃ で 2 時間攪拌した。L C - M S は、 B C Y 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 3 9 6 . 7 9 、 実測 m / z : 1 1 9 8 . 7 4 ([M / 2 + H]⁺) および 7 9 9 . 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) によって精製し、 化合物 2 (2 0 mg、 8 . 0 7 μ mol、 収率 5 5 . 9 2 %、 純度 9 6 . 6 8 %) を白色固体として得た。

【 0 5 0 2 】

B C Y 1 1 3 7 9 を調製する手順

【 0 5 0 3 】

【化 2 0 5 】



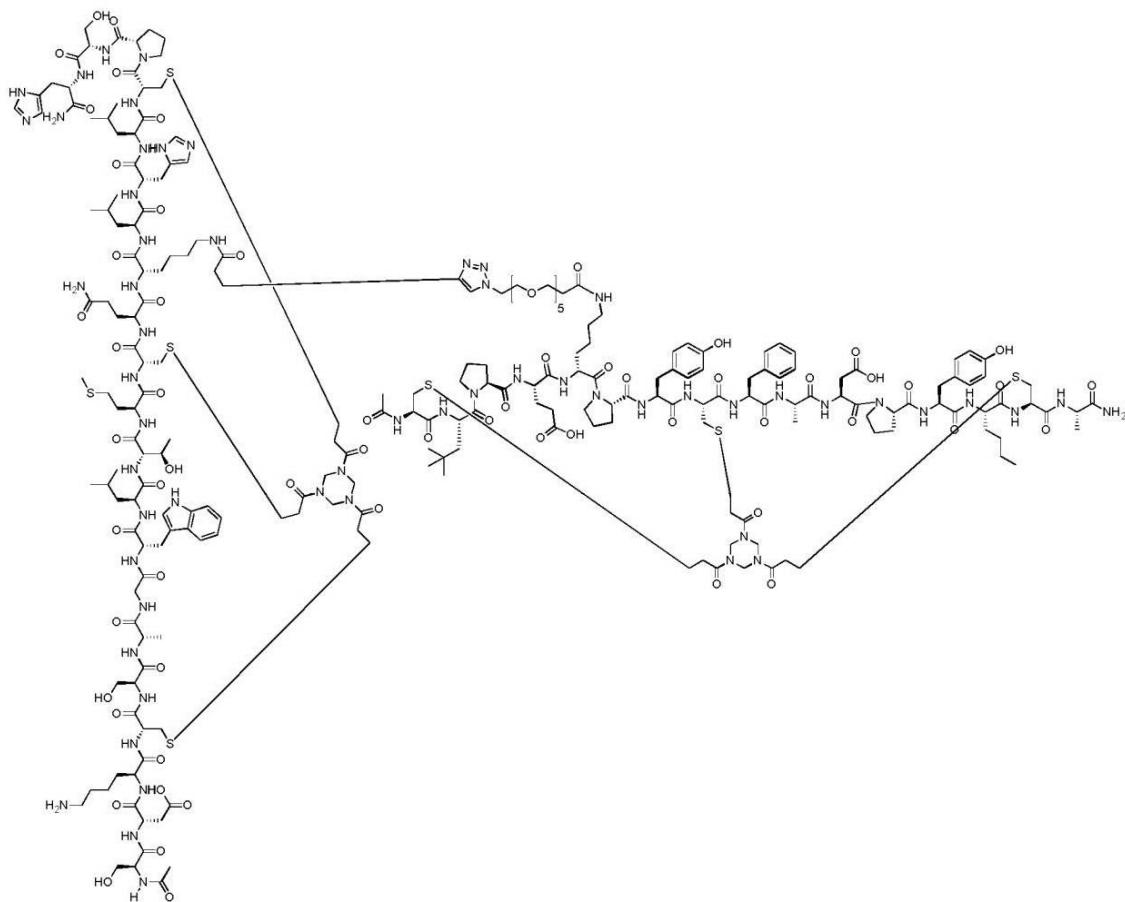
化合物2(3.0 mg、1.25 μmol、1.0当量)およびBCY10861(3.4 mg、1.25 μmol、1.0当量)を最初にt-BuOH/H₂O(1:1)2mLに溶解し、次いで、CuSO₄(0.4 M、7 μL、2.24当量)、VcNa(1 mg、5.04 μmol、4.03当量)およびTHPTA(1 mg、2.30 μmol、1.84当量)を添加した。最後に、1 M NH₄HCO₃を添加して、pHを8に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂で3回バージした。反応混合物を、N₂雰囲気下、25~30℃で16時間攪拌した。LC-MSは、化合物2が完全に消費されていること、および所望のm/z(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つの主ピーケーを示した。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。

(0 5 0 4)

B C Y 1 1 3 8 0

【 0 5 0 5 】

【化 2 0 6】

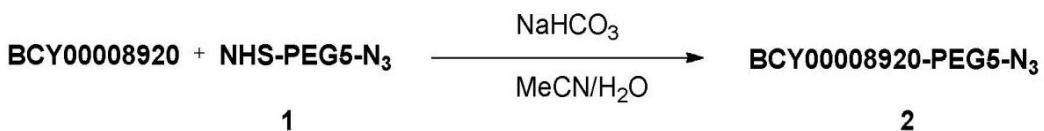


BCY00011380

B C Y 8 9 2 0 - P E G 5 - N₃ を調製する手順

【 0 5 0 6 】

【化 2 0 7】



B C Y 8 9 2 0 (3 0 . 0 m g、 1 4 . 0 4 μ m o l、 1 . 0 当量) および化合物 1 (6 . 1 m g、 1 4 . 1 1 μ m o l、 1 . 0 1 当量) を、 M e C N (1 m L) と H ₂ O (1 m L) の混合物に溶解した。溶液に 1 M N a H C O ₃ を添加して、 p H を 8 に調整し、 次いで、混合物を 3 5 ℃ 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 MW : 2 4 5 4 . 8 3 、 実測 m / z : 1 2 2 7 . 6 3 ([M / 2 + H] ⁺) および 8 1 8 . 6 6 ([M / 3 + H] ⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 H P L C (T F A 条件) によって精製し、 化合物 2 (2 0 m g、 8 . 0 3 μ m o l、 収率 5 7 . 2 1 %、 純度 9 8 . 5 6 %) を白色固体として得た。

【 0 5 0 7 】

B C Y 1 1 3 8 0 を調製する手順

(0 5 0 8)

【化208】



2

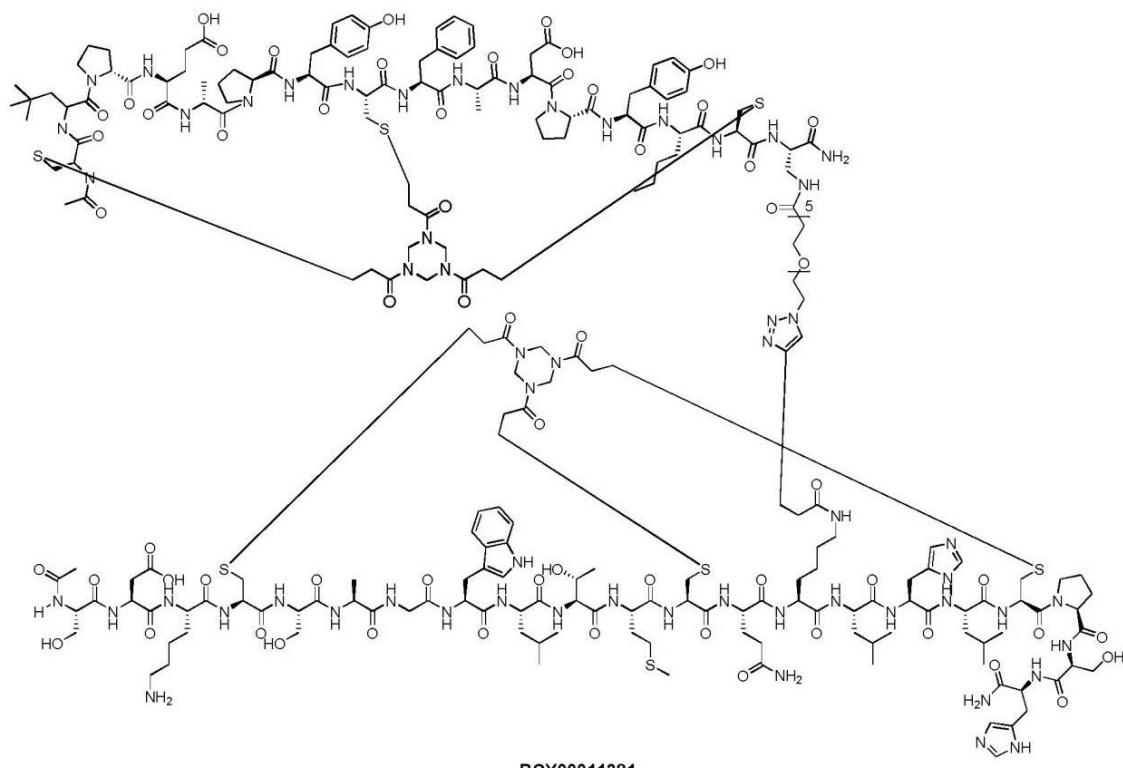
化合物2(3.5mg、1.43μmol、1.0当量)およびBCY10861(3.9mg、1.44μmol、1.0当量)を最初にt-BuOH/H₂O(1:1)2mLに溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、8μL、2.24当量)、VcNa(1mg、5.04μmol、3.52当量)およびTHPTA(1mg、2.30μmol、1.61当量)を添加した。最後に、1M NH₄HCO₃を添加して、pHを8に調整した。ここでは全ての溶媒を脱気し、N₂で3回バージした。反応混合物を、N₂雰囲気下、25~30で16時間攪拌した。LC-MSは、化合物2の大部分が消費されていること、および所望のm/z(計算MW:5170.97、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(1.6mg、0.296μmol、収率20.77%、純度96.77%)を白色固体として得た。

【0509】

BCY11381

【0510】

【化209】

BCY8920-PEG5-N₃を調製する手順

【0511】

10

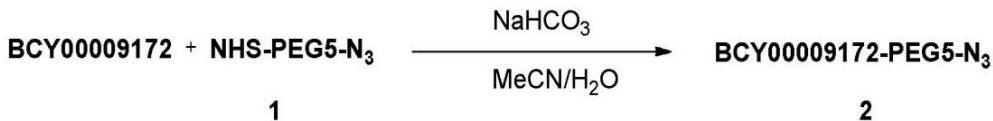
20

30

40

50

【化 2 1 0】



B C Y 9 1 7 2 (3 0 . 0 mg、 1 4 . 3 2 μ mol、 1 . 0 当量) および化合物 1 (6 . 2 mg、 1 4 . 3 4 μ mol、 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 °C で 2 時間攪拌した。LC - MS は、 B C Y 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 (計算 MW : 2 4 1 2 . 7 5 、 実測 m / z : 1 2 0 6 . 7 2 ([M / 2 + H]⁺)) を有する 1 つの主ピークが検出された。反応混合物を分取 HPLC (TFA 条件) によって精製し、化合物 2 (1 5 mg、 6 . 1 4 μ mol、 収率 4 2 . 8 7 %、 純度 9 8 . 7 5 %) を白色固体として得た。

(0 5 1 2)

B C Y 1 1 3 8 1 を調製する手順

【 0 5 1 3 】

【化 2 1 1】



化合物2(3.0mg、1.24μmol、1.0当量)およびBCY10861(3.4mg、1.25μmol、1.01当量)を最初にt-BuOH/H₂O(1:1)2mLに溶解し、次いで、CuSO₄(0.4M、7μL、2.25当量)、VcNa(1mg、5.04μmol、4.06当量)およびTHPTA(1mg、2.30μmol、1.1.85当量)を添加した。最後に、1M 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、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(1.6mg、0.295μmol、収率23.73%、純度94.59%)を白色固体として得た。

(0 5 1 4)

[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 2 8 8 6 3 8 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 Expression System (Thermo Fisher Scientific) を使用して発現させた。抗体をプロテイン A アフィニティーコロマトグラフによって精製し、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 μg / 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。

【0515】

生物学的データ

1. C D 1 3 7 Biacore 実験説明

Biacore 実験を実施して、ヒト C D 1 3 7 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 C D 1 3 7 (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 - N H S - L C - L C - 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 T 2 0 0 または Bia core 3 0 0 機器を Xantec CMD 5 0 0 D チップと共に使用した。ストレプトアビシンを、泳動緩衝液として H B S - N (10 mM HEPES、0.15 M NaCl、pH 7.4) を用いて、25°C 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。ストレプトアビシ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、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 C D 1 3 7 を 270 ~ 1500 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 500 nM 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 μl / 分の流速で、25°C で行った。各サイクル後に、再生ステップ (10 mM グリシン pH 2 10 μl) 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、プ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

10

20

30

40

【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。g p 67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Excel-420培地(Sigma)中 1×10^6 個 m^{-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

50

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時間バッヂ結合し、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2mlに濃縮し、1ml/分で、PBS中S200 Superdex[®]カラム(GE Healthcare)上にロードした。2ml画分を回収し、ネクチン-4タンパク質を含有する画分を16mg/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。

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(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タン表面を、10 µl/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、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、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、ビオチン化ネクチン-4を1200~1800RU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100nM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、プ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。

【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】

10

20

30

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、4 mM 酢酸ナトリウム、100 mM NaCl、pH 5.4 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。ストレプトアビシンを、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。ストレプトアビシ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、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) : 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 μMまでのタンパク質の希釈を使用して、ビオチン化EphA2を500~1500 RU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100 nM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 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した。

30

【0523】

40

50

本発明の一定のヘテロタンデムペプチドをEphA2結合アッセイで試験し、結果を以下の表3に示す。

【0524】

【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

10

20

30

40

【0525】

4. 腫瘍細胞とのCD137レポーターアッセイ共培養

1% FBSをRPMI-1640(PromegaキットCS196005の成分)に添加することによって、R1培地と呼ばれる培養培地を調製する。R1中の試験物の系列希釈を滅菌96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25μlの試験物またはR1(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、R1培地に400000個細胞/mLの濃度で再懸濁する。25(25)μL/ウェルの腫瘍細胞を白色細胞培養プレートで使用する。Jurkat細胞(PromegaキットCS196005、0.5mL)を水浴中で解凍し、次いで、5mL予熱R1培地に添加する。25(25)μL/ウェルのJurkat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37°C、5%CO₂で6時間インキュベートする。6時間の終わりに、75μl/ウェルのBio-Glo(商標)(Promega)を添加し、10分間インキュベートした後、プレートリーダー(Clariostar、BMG)で発光を読み取る。細胞(Jurkat細胞+共培養で使用した細胞株)に対する変化倍率を計算し、対数(アゴニスト)対応答としてGraphPad Prismでプロットして、EC50(nM)およびバックグラウンドに対する誘導倍率(最大)を決定する。

【0526】

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。

【0527】

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】

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見たデータが図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見たデータが図4に示される。

【0530】

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見たデータが図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見たデータが図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。

【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

10

20

30

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

【0533】

5. 初代ヒトT細胞 - A549共培養（腫瘍細胞殺傷）

3人の健康なドナーからPBM Cを単離し、2つの濃度で、抗CD3刺激の存在下、2つの規定比で、Nucleight Red標識腫瘍標的細胞（ヒト肺癌細胞A549（登録商標）、ATCC CCL-185（商標））に添加した。腫瘍細胞：PBM 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PBM Cの非存在下で、腫瘍細胞に蒔いた。経時的に生存Nucleight red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Incucyte S3機械を使用して、培養物を72時間画像化した。各条件を3連で確立した。

【0534】

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CD137 mAbアゴニストを対照として使用する。

【0535】

6. ヒトPBM C - 4T1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4T1-1（4T1-親）およびマウスネクチン-4過剰発現4T1（4T1-D02）を、10%熱失活ウシ胎児血清、100IU/mlペニシリンおよび100IU/mlストレプトマイシン、20mM HEPES、1×非必須アミノ酸および2mM L-グルタミンを補充した RPMI1640（RPMI作業培地）で培養した。健康なヒトドナー由来の凍結PBM Cを解凍し、室温PBS中で1回洗浄し、次いで、RPMI作業培地に再懸濁した。腫瘍細胞およびPBM C共培養物について、10000個PBM Cおよび2000個腫瘍細胞（5:1）を混合し、384ウェルプレートの

10

20

30

40

50

各ウェルに蒔いた。ヒトP B M Cを刺激するために、1 2 5 n g / m l の可溶性抗C D 3 m A b (クローンO K T 3) 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1 0 0 μ l にした。プレートを5 % C O₂で、3 7 ℃ 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4 8 時間後に回収し、H T R F アッセイを使用して、ヒトI L - 2 およびI F N - γ を検出した。E x c e 1 またはP r i s m 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P B M Cを使用した1つの試験を表す。

【0 5 3 6】

図7に示されるデータは、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 共培養アッセイで堅牢な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実証している。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 についての非結合対照である。

10

【0 5 3 7】

ヒトP B M C - 4 T 1 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 / C D 1 3 7 ヘテロタンデムペプチドによって誘導されるE C 5 0 (n M) および最大I F N - γ サイトカイン分泌(p g / m l)の概要を以下の表6に報告する。

【0 5 3 8】

【表9】

表6:ヒトPBMC-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

20

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1 μ M
BCY9351	4T1-D02 (ネクチン4+)	-	活性なし～最大1 μ M
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

30

【0 5 3 9】

7 . エキソビオ培養プロトコル

D i s c o v e r y L i f e S c i e n c e s (D L S) 製の初代患者由来腫瘍細胞を、B e n z o n a s e を新たに添加した1 0 m L 予熱洗浄培地中で穩やかに解凍する。G r e i n e r 製の3 Dスフェロイドキット(カタログ番号6 5 5 8 4 0)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ブルーで計数する。細胞を1 5 0 0 r p m で5分間遠心分離して洗浄し、ペレットを、 1×10^6 個細胞当たり1 0 0 μ LのN 3 D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1 5 0 0 r p m 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D T C 培地(D L S)に再懸濁

40

50

して、 $100 \mu L$ / ウェルで 1 ウェル当たり 50000 ~ 100000 個の細胞を得る。Greiner 製のセルリペレント (cell-repelent) 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、試料を薄く前に $70 \sim 100 \mu m$ 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、 $100 \mu L$ / ウェルのこれらの 2 × 薬物溶液をプレートマップによって記載され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℃、5% CO₂ 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 製のカスタムビルトサイトカイン / 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オ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（ビヒクリルに対して正規化）および CD8⁺ Ki67⁺ 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、25 mM ヒスチジン HC1、10% スクロース pH 7 に製剤化された 2 mg / kg の各二環多量体を投与した。各時点で、頸下または伏在静脈を介して、連続出血（約 $80 \mu L$ 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 $2 \mu L$ K2-EDTA (0.5 M) 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℃、3000 g 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、12000 rpm、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℃ 以下で保管した。上清試料 $7.5 \mu L$ 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。C0、C1、Vdss、T1/2、AUC(0-last)、AUC(0-inf)、MRT(0-last)、MRT(0-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 mg / 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

50

【表 10】

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	T _{1/2} (時間)	C _{lp} (ml/分/kg)	V _{dss} (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】

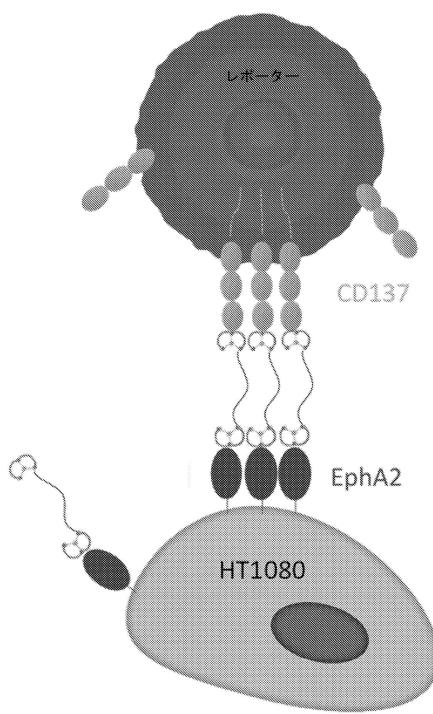


FIGURE 1

【図 2】

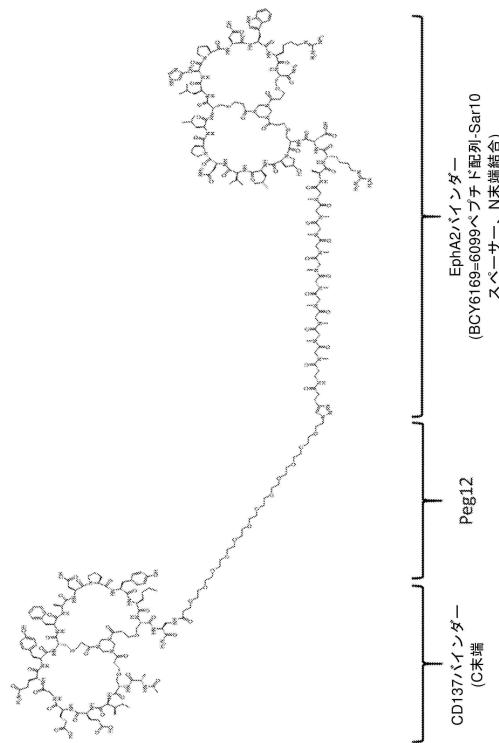


FIGURE 2

10

20

30

40

50

【図3】

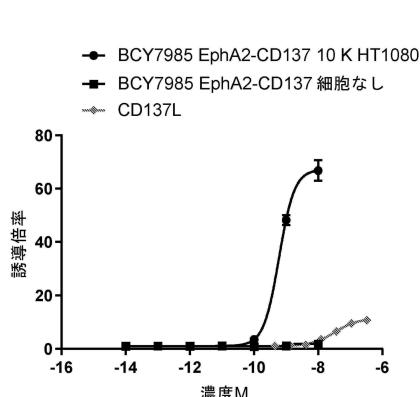


FIGURE 3

【図4】

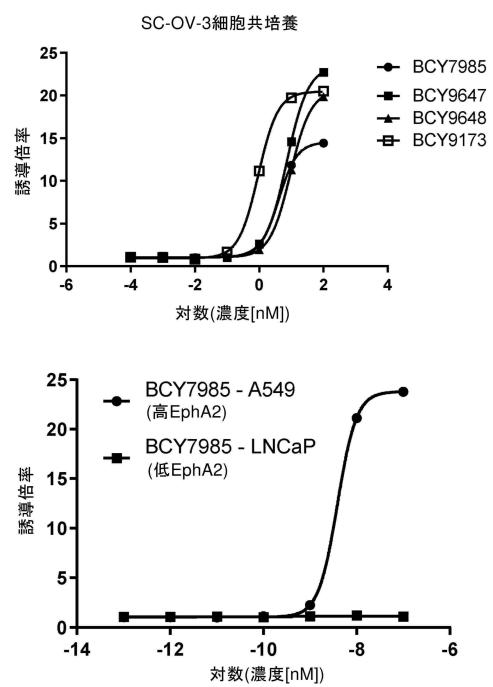


FIGURE 4

【図5】

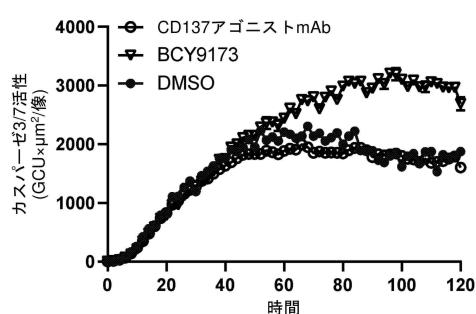


FIGURE 5

【図6】

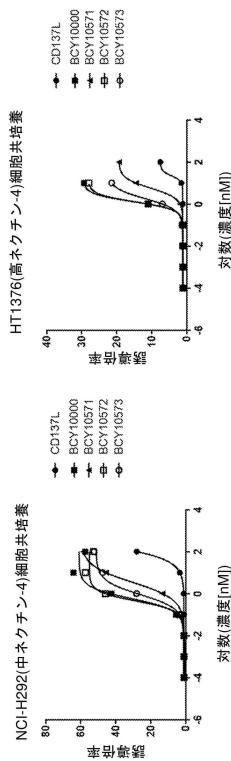


FIGURE 6

【 四 7 】

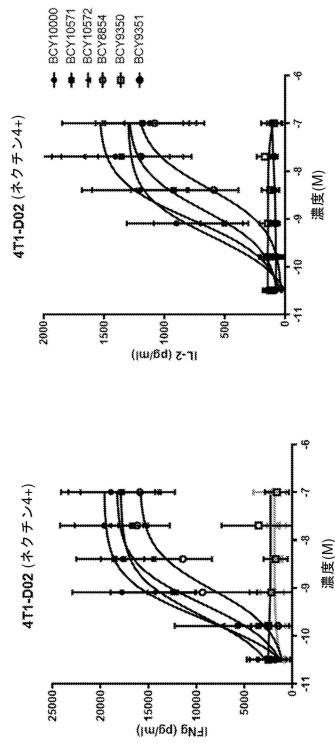


FIGURE 7

【図8】

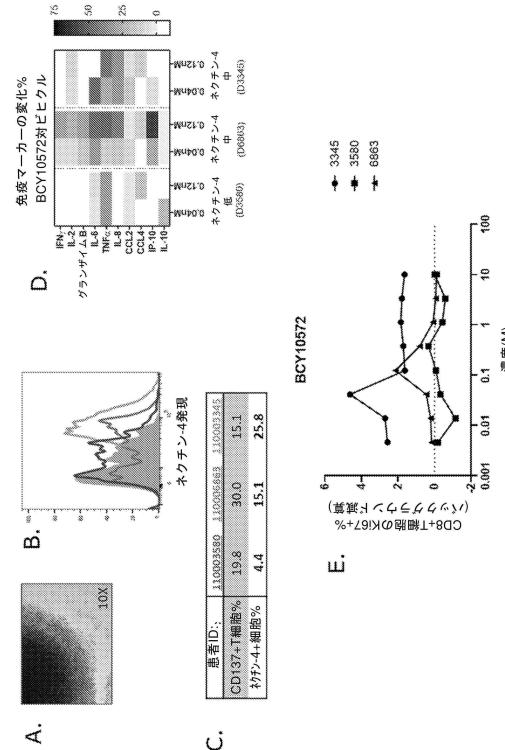


FIGURE 8

〔 9 〕

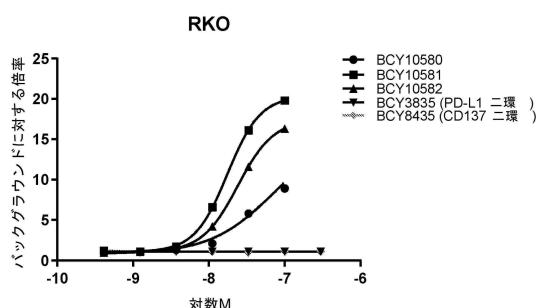


FIGURE 9

(四 10)

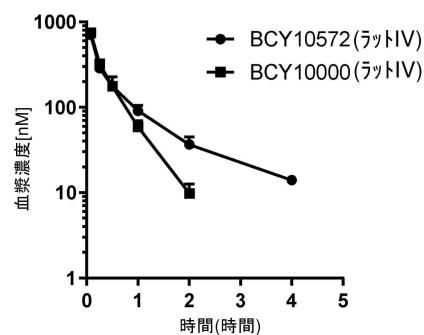


FIGURE 10

【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 900, バイスクリテクス・リミテッド内

(72) 発明者 マクドナル, ケヴィン

イギリス国, シービー 22・3エイティー, 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 900, バイスクリテクス・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 22・3エイティー, 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 900, バイスクリテクス・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 22・3エイティー, 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 900, バイスクリテクス・リミテッド内

(72) 発明者 マッド, ジエンマ

イギリス国, シービー 22・3エイティー, 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 900, バイスクリテクス・リミテッド内

審査官 吉門 沙央里

(56) 参考文献 特表 2018 - 502825 (JP, A)

国際公開第 2017 / 182672 (WO, A1)

特表 2013 - 518807 (JP, A)

特表 2016 - 527180 (JP, 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., DB名)

C 07 K 1 / 00 - 19 / 00

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