

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-515306

(P2024-515306A)

(43)公表日 令和6年4月8日(2024.4.8)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 4/00 (2006.01)	C 0 7 K 4/00	Z N A 4 C 0 8 4
C 0 7 K 17/02 (2006.01)	C 0 7 K 17/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全49頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-564219(P2023-564219)	(71)出願人	519226757 バイスケルテクス・リミテッド イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエス ケンブリッジ グレート アビントン グ ランタ パーク ポートウェイ ビルディ ング ブロックス エーアンドビー
(86)(22)出願日	令和4年4月20日(2022.4.20)	(74)代理人	100145403 弁理士 山尾 憲人
(85)翻訳文提出日	令和5年12月18日(2023.12.18)	(74)代理人	100156144 弁理士 落合 康
(86)国際出願番号	PCT/GB2022/050995	(74)代理人	100103230 弁理士 高山 裕貢
(87)国際公開番号	WO2022/223969	(72)発明者	マクドネル, ケビン 英国シービー 2 1 6 ジーエス、ケンブ リッジ、グレート・アビントン、グラン
(87)国際公開日	令和4年10月27日(2022.10.27)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	63/177,185		
(32)優先日	令和3年4月20日(2021.4.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 P - セレクチンに特異的な二環式ペプチドリガンド

(57)【要約】

P-セレクチンに特異的な二環式ペプチドリガンド

本発明は、2つまたはそれ以上のペプチドループが分子足場への結合点の間に内在するように該分子足場に共有結合しているポリペプチドに関する。特に、本発明は、P-セレクチンに結合するペプチドを記載する。本発明はまた、2つまたはそれ以上のペプチドループがP-セレクチンの結合剤である分子足場への結合点の間に内在するように該分子足場に共有結合しているポリペプチドの多量体結合複合体に関する。本発明はまた、1つまたはそれ以上のエフェクター基および/または官能基にコンジュゲートされた、前記ペプチドおよび複合体を含む薬物コンジュゲート、前記ペプチドリガンド、複合体および薬物複合体を含む医薬組成物、ならびに血管閉塞性クライシスおよび鎌状赤血球症関連状態、癌、またはCOVID-19を含む、細胞接着分子、例えばP-セレクチンによって媒介される疾患または障害の予防、抑制または処置における前記ペプチドリガンドおよび薬物コンジュゲートの使用を含む。

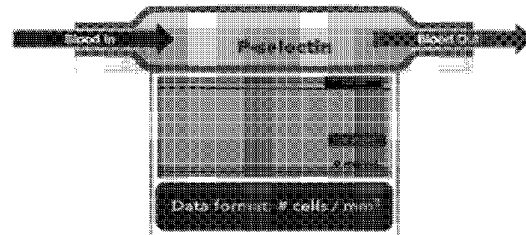


FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つの反応基を含むポリペプチドおよび該ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する分子足場を含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子足場上に形成される、P-セレクチンに特異的なペプチドリガンド。

【請求項2】

前記反応基が、システイン残基を含む、請求項1に記載のペプチドリガンド。

【請求項3】

ペプチドリガンドが、モチーフWC_iDV、またはその修飾誘導体を含む、請求項1または請求項2に記載のペプチドリガンド。 10

【請求項4】

前記ループ配列が、4つまたは6つのアミノ酸を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のペプチドリガンド。

【請求項5】

前記ループ配列が、4つのアミノ酸からなる第一のループ配列および6つのアミノ酸からなる第二のループ配列である2つのループ配列によって隔てられた3つのシステイン残基を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のペプチドリガンド。

【請求項6】

前記ペプチドリガンドが、
C_i-X₁-X₂-X₃-X₄-C_{ii}-D-V-X₅-X₆-X₇-X₈-C_{iii}(配列番号:1) 20

[配列中、

- X₁は、DまたはYを示し;
- X₂は、AまたはMを示し;
- X₃は、DまたはEを示し;
- X₄は、W、1NaIまたはTrp(Me)を示し;
- X₅は、PまたはTを示し;
- X₆は、SまたはDを示し;
- X₇は、LまたはYを示し;
- X₈は、PまたはGを示し;

30

(ここで、

1NaIは、1-ナフチルアラニンを示し、

Trp(Me)は、メチル-トリプトファンを示す)、そして、

C_i、C_{ii}およびC_{iii}はそれぞれ、第一のシステイン残基、第二のシステイン残基および第三のシステイン残基を示す]

のアミノ酸配列またはその修飾誘導体、またはそれらの薬学的に許容できる塩、を含む、請求項5に記載のペプチドリガンド。

【請求項7】

X₄が、Wを示す、請求項6に記載のペプチドリガンド。

【請求項8】

40

C_i-X₁-X₂-X₃-X₄-C_{ii}-D-V-X₅-X₆-X₇-X₈-C_{iii}(配列番号:1)のペプチドリガンドが、

C_iDAD[1NaI]C_{ii}DVPSLPC_{iii}(配列番号:2);

C_iDADWC_{ii}DVPSLPC_{iii}(配列番号:3);

C_iYME[1NaI]C_{ii}DVTDYGC_{iii}(配列番号:4);

C_iYME[Trp(Me)]C_{ii}DVTDYGC_{iii}(配列番号:5);および

C_iYMEWC_{ii}DVTDYGC_{iii}(配列番号:6);

[配列中、C_i、C_{ii}およびC_{iii}はそれぞれ、第一のシステイン残基、第二のシステイン残基および第三のシステイン残基を示す]

から選択されるアミノ酸配列またはその修飾された誘導体、またはそれらの薬学的に許容できる塩を含む、請求項6または請求項7に記載のペプチドリガンド、例えば:

50

A-(配列番号:2)-A(本明細書では、BCY12027と称する);
 H₂N-A-(配列番号:2)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY12026と称する);
 A-(配列番号:3)-A(本明細書では、BCY11648と称する);
 H₂N-A-(配列番号:3)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY12025と書する);
 Ac-A-(配列番号:4)-A(本明細書では、BCY11279と称する);
 A-(配列番号:4)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY11890と称する);
 Ac-A-(配列番号:5)-A(本明細書では、BCY11281と称する);
 Ac-(配列番号:6)(本明細書では、BCY9717と称する);
 A-(配列番号:6)-A(本明細書では、BCY10194と称する);
 A-(配列番号:6)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY18041と称する);
 [PYA]-A-(配列番号:6)-A-NH₂(本明細書では、BCY10910と称する);および
 Ac-A-(配列番号:6)-[K(PYA)]-NH₂(本明細書では、BCY10911と称する)、
 [配列中、PYAは、プロパルギル-酸を示す]、

10

特に:

A-(配列番号:2)-A(本明細書では、BCY12027と称する);
 H₂N-A-(配列番号:2)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY12026と称する);
 H₂N-A-(配列番号:3)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY12025と称する);および
 A-(配列番号:3)-A(本明細書では、BCY11648と称する);より詳しくは:
 A-(配列番号:2)-A(本明細書では、BCY12027と称する);および
 H₂N-A-(配列番号:2)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY12026と称する);最も詳しく

20

は;

A-(配列番号:2)-A(本明細書では、BCY12027と称する)。

【請求項 9】

分子足場が、1,1',1''-(1,3,5-トリアジナン-1,3,5-トリイル)トリプロップ-2-エン-1-オン(TATA)および1,1',1''-(1,4,7-トリアゾナン-1,4,7-トリイル)トリス(2-クロロエタン-1-オン)(TCAZ)またはプロモ誘導体1,1',1''-(1,4,7-トリアゾナン-1,4,7-トリイル)トリス(2-プロモエタン-1-オン)(TBAZ)から選択される、請求項1~8のいずれか一項に記載のペプチドリガンド。

【請求項 10】

前記薬学的に許容できる塩が、遊離酸またはナトリウム塩、カリウム塩、カルシウムエン塩またはアンモニウム塩から選択される、請求項1~9のいずれか一項に記載のペプチドリガンド。

30

【請求項 11】

少なくとも2つのペプチドリガンドを含む多量体結合複合体であって、ここで、少なくとも1つのペプチドリガンドは、請求項1~10のいずれか1項に記載の、P-セレクチンに特異的なペプチドリガンドであり、前記ペプチドリガンドは、同じであっても異なってもよく、それぞれは、少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つの反応基を含むポリペプチドおよび該ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する分子足場を含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子足場上に形成される、多量体結合複合体。

40

【請求項 12】

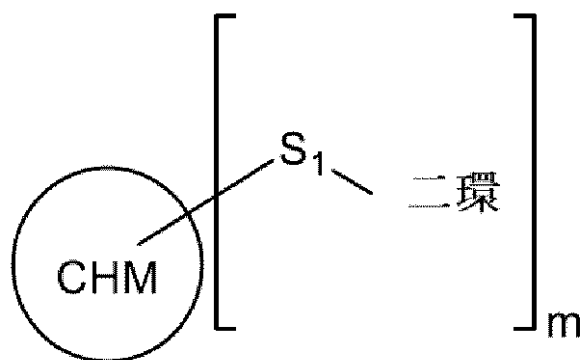
各ペプチドリガンドが、スペーサー基によって中央ヒンジ部分に結合されている、請求項11に記載の多量体結合複合体。

【請求項 13】

式(I):

50

【化 1】



10

[式中、

CHMは、中央ヒンジ部分を示し；

S₁は、スペーサー基を示し；

二環は、請求項1～10のいずれか一項に記載のペプチドリガンドを示し；そして、

mは、2～10から選択される整数を示す]

20

の化合物を含む、請求項11または請求項12に記載の多量体結合複合体。

【請求項14】

前記ペプチドリガンドが、同じ標的、特にP-セレクチンに特異的である、請求項11～13のいずれか一項に記載の多量体結合複合体。

【請求項15】

前記多量体結合複合体が、少なくとも2つの同一のペプチドリガンドを含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の多量体結合複合体。

【請求項16】

前記多量体結合複合体が、2つの同一のペプチドリガンドを含み、BCY5454、BCY5455、BCY5456、BCY5457、BCY12257、BCY12258、BCY19243およびBCY19240から選択され、例えば、BCY5454、BCY5455、BCY5456、BCY5457、BCY12257およびBCY12258から選択される、請求項15に記載の多量体結合複合体。

30

【請求項17】

前記多量体結合複合体が、3つの同一のペプチドリガンドを含み、BCY5458、BCY5459、BCY5460、BCY5461、BCY12259、BCY12260、BCY19242およびBCY19239から選択され、例えば、BCY5458、BCY5459、BCY5460、BCY5461、BCY12259およびBCY12260から選択される、請求項15に記載の多量体結合複合体。

【請求項18】

前記多量体結合複合体が、4つの同一のペプチドリガンドを含み、BCY5462、BCY5463、BCY5464、BCY5465、BCY12261、BCY12262、BCY11903およびBCY19238から選択され、例えば、BCY5462、BCY5463、BCY5464、BCY5465、BCY12261およびBCY12262から選択される、請求項15に記載の多量体結合複合体。

40

【請求項19】

前記多量体結合複合体が、少なくとも2つの異なるペプチドリガンドを含む、請求項1～18のいずれか一項に記載の多量体結合複合体。

【請求項20】

1つまたはそれ以上のエフェクター基および/または官能基とコンジュゲートされた、請求項1～10のいずれか1項に記載のペプチドリガンド、または請求項11～19のいずれか1項に記載の多量体結合複合体、を含む薬物コンジュゲート。

【請求項21】

50

請求項1～10のいずれか一項に記載のペプチドリガンド、請求項11～19のいずれか一項に記載の多量体結合複合体、または請求項20に記載の薬物コンジュゲートを、1つまたはそれ以上の薬学的に許容できる賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物。

【請求項22】

細胞接着分子によって媒介される疾患または障害の予防、抑制または処置に使用するための、請求項1～10のいずれか一項に記載のペプチドリガンド、請求項11～19のいずれか一項に記載の多量体結合複合体または請求項20に記載の薬物コンジュゲート。

【請求項23】

前記細胞接着分子が、P-セレクチンである、請求項22に記載の使用のためのペプチドリガンド、多量体結合複合体または薬物コンジュゲート。

10

【請求項24】

前記疾患または障害が、血管閉塞性クライシスである、請求項22または請求項23に記載の使用のためのペプチドリガンド、多量体結合複合体または薬物コンジュゲート。

【請求項25】

前記疾患または障害が、鎌状赤血球症または鎌状赤血球貧血に関するものである、請求項22～24のいずれか一項に記載の使用のためのペプチドリガンド、多量体結合複合体または薬物コンジュゲート。

【請求項26】

癌の予防、抑制または処置に使用するための、請求項1～10のいずれか一項に記載のペプチドリガンド、請求項11～19のいずれか一項に記載の多量体結合複合体または請求項20に記載の薬物コンジュゲート。

20

【請求項27】

前記癌の予防、抑制または処置が、癌または癌細胞転移のブロック、予防または抑制を含む、請求項26に記載の使用のためのペプチドリガンド、多量体結合複合体または薬物コンジュゲート。

【請求項28】

前記疾患または障害が、COVID-19である、請求項22～24のいずれか一項に記載の使用のためのペプチドリガンド、多量体結合複合体または薬物コンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、2つまたはそれ以上のペプチドループが分子足場への結合点の間に内在するように該分子足場に共有結合しているポリペプチドに関する。特に、本発明には、P-セレクチンに結合するペプチドが記載されている。本発明はまた、2つまたはそれ以上のペプチドループがP-セレクチンの結合剤である分子足場への結合点の間に内在するように該分子足場に共有結合しているポリペプチドの多量体結合複合体に関する。さらに、本発明は、1つまたはそれ以上のエフェクターおよび/または官能基にコンジュゲートされた、前記ペプチドおよび複合体を含む薬物コンジュゲート、前記ペプチドリガンド、複合体および薬物コンジュゲートを含む医薬組成物、ならびに血管閉塞性クライシスおよび鎌状赤血球症関連状態、癌またはCOVID-19を含む、P-セレクチンなどの細胞接着分子によって媒介される疾患または障害を予防、抑制または処置するための、前記ペプチドリガンドおよび薬物コンジュゲートの使用を含む。

40

【背景技術】

【0002】

環状ペプチドは、高い親和性と特異性をもって標的タンパク質に結合することができるため、治療薬の開発におい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は、例えば、抗菌ペプチドであるバンコマイシン、免疫抑制薬であるシクロスポリン、または抗癌薬であるオクトレオチドとしてすでに臨床的に使用され、成功を収めている(Drivers et al. (2008), Nat. Rev. Drug. Discov. 7(7), 608-24)。良好な結合特性は、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だけでなく、環状構造

50

における低い構造柔軟性に起因する。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(400 2; Wu et al. (2007), Science 330, 1066-71)、インテグリン Vb3に結合する Arg-Gly-Aspモチーフをもつ環状ペプチド(355 2)(Xiong et al. (2002), Science 296(5565), 151-5)、またはウロキナーゼ型 プラスミノゲンアクティベーターに結合する環状ペプチド阻害剤 upain-1(603 2; Zhao et al. (2007), J. Struct. Biol. 160(1), 1-10)のように、大環状分子は、数百平方オングストロームの表面に結合する。

【0003】

ペプチド大環状分子は、環状配置のため、直鎖ペプチドに比べて柔軟性が低く、これにより、標的との結合時に失われるエントロピーが小さくなり、結合親和性が高くなる。柔軟性の低下はまた、標的特異的なコンフォメーションをロックすることにつながり、これは、直鎖ペプチドに比べて結合特異性を増加させる。この効果は、その環が開いたときに、他の MMP に対するその選択性を失うマトリックスメタロプロテアーゼ 8 (MMP-8) の強力で選択的な阻害剤によって例示されている (Cherney et al. (1998), J. Med. Chem. 41(11), 1749-51)。大環状化によって達成される有利な結合特性は、例えば、バンコマイシン、ナイシンおよびアクチノマイシンなどのような、複数のペプチド環を有する多環状ペプチドではさらに顕著である。

10

【0004】

これまでも様々な研究チームが、システイン残基を有するポリペプチドを合成分子構造に繋いでいる (Kemp and McNamara (1985), J. Org. Chem; Timmerman et al. (2005), ChemBioChem)。Meloan および共同研究者らは、トリス(プロモメチル)ベンゼンおよび関連分子をタンパク質表面の構造模倣用の合成足場上での複数のペプチドループの迅速かつ定量的な環化に使用した (Timmerman et al. (2005), ChemBioChem)。候補薬物化合物(ここで、該記化合物は、システイン含有ポリペプチドを、例えば 1,1',1''-(1,3,5-トリアジナン-1,3,5-トリイル)トリプロブ-2-エン-1-オン(TATA) のような分子足場に結合させることによって作製される)の作製方法 (Heinis et al. (2014) Angewandte Chemie, International Edition 53(6) 1602-1606)。

20

【0005】

目的の標的に対する二環式ペプチドの大規模なライブラリーを作製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きた (Heinis et al. (2009), Nat. Chem. Biol. 5(7), 502-7 and WO 2009/098450)。簡単に説明すると、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つの領域を含む直鎖ペプチド(Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys)のコンビナトリアルライブラリーをファージ上に提示させ、システイン側鎖を低分子の足場に共有結合させることによって環化させた。

30

【発明の概要】

【0006】

本発明の第一の態様によれば、本明細書では、少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つの反応基を含むポリペプチドおよび該ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する分子足場を含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子足場上に形成される、P-セレクチンに特異的なペプチドリガンドが提供される。

40

【0007】

本発明のさらなる態様によれば、本明細書では、少なくとも2つのペプチドリガンドを含む多量体結合複合体であって、ここで、少なくとも1つのペプチドリガンドは、本明細書で定義される、P-セレクチンに特異的なペプチドリガンドであり、前記ペプチドリガンドは、同一であっても異なってもよく、それぞれは、少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つの反応基を含むポリペプチドおよび該ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する分子足場を含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子足場上に形成される、多量体結合複合体が提供される。

【0008】

50

本発明のさらなる態様によれば、本明細書では、1つまたはそれ以上のエフェクター基および/または官能基にコンジュゲートされた、本明細書で定義されるペプチドリガンドまたは多量体結合複合体を含む薬物コンジュゲートが提供される。

【0009】

本発明のさらなる態様によれば、本明細書では、本明細書で定義されるペプチドリガンド、多量体結合複合体または薬物コンジュゲートを1つまたはそれ以上の薬学的に許容できる賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。

【0010】

本発明のさらなる態様によれば、本明細書では、P-セレクトインによって媒介される疾患または障害の予防、抑制または処置に使用するための、本明細書で定義されるペプチドリガンド、多量体結合複合体、薬物コンジュゲートまたは医薬組成物が提供される。

10

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】P-セレクトイン・フロー接着アッセイの略図。

【0012】

【図2】P-セレクトイン上への単離白血球のフロー接着に対するBCY12262の効果。AI(接着指数:細胞/mm²)のベースライン(無薬物対照、グラフには表示されていない)からの倍数変化。3点のデータの平均値を表示し、エラーバーは標準偏差を示す。破線は表示された試料の平均を示す。

20

【0013】

本発明の詳細な説明
ペプチドリガンド

本発明の第一の態様によれば、本明細書では、少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つの反応基を含むポリペプチドおよび該ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する分子足場を含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子足場上に形成される、P-セレクトインに特異的なペプチドリガンドが提供される。

【0014】

一実施態様において、前記反応基は、システイン残基を含む。

【0015】

さらなる実施態様において、前記ペプチドリガンドはモチーフWCDVを含む。WCDVアミノ酸モチーフは、直鎖ペプチドリガンドのP-セレクトインへの結合を与えることが以前に示されている。しかし、本発明者らは、驚くべきことに、そのようなモチーフおよびその修飾誘導体の結合親和性が、本明細書に記載の二環式ペプチド内に組み込まれた場合に強化されることを見出した。なおさらなる実施態様において、前記ペプチドリガンドは、モチーフWCDVの修飾誘導体を含む。

30

【0016】

さらなる実施態様において、前記ループ配列は4つまたは6つのアミノ酸を含む。

【0017】

一実施態様において、前記ループ配列は、2つのループ配列(第一のループ配列は4つのアミノ酸からなり、第二のループ配列は6つのアミノ酸からなる)によって隔てられた3つのシステイン残基を含む。

40

【0018】

一実施態様において、ペプチドリガンドは、

C_i-X₁-X₂-X₃-X₄-C_{ii}-D-V-X₅-X₆-X₇-X₈-C_{iii}(配列番号:1)

[配列中、

X₁は、DまたはYを示し;

X₂は、AまたはMを示し;

X₃は、DまたはEを示し;

X₄は、W、1NaIまたはTrp(Me)を示し;

X₅は、PまたはTを示し;

50

X₆は、SまたはDを示し;

X₇は、LまたはYを示し;

X₈は、PまたはGを示し;

(ここで、1NaIは1-ナフチルアラニンを示し、Trp(Me)はメチル-トリプトファンを示す)、そして、

C_i、C_{ii}およびC_{iii}はそれぞれ、第一のシステイン残基、第二のシステイン残基および第三のシステイン残基を示す]

のアミノ酸配列またはその修飾誘導体、またはそれらの薬学的に許容できる塩を含む。

【0019】

さらなる実施態様において、X₄はWを示す。

10

【0020】

なおさらなる実施態様において、C_i-X₁-X₂-X₃-X₄-C_{ii}-D-V-X₅-X₆-X₇-X₈-C_{iii}(配列番号:1)のペプチドリガンドは、

C_iDAD[1NaI]C_{ii}DVPSLPC_{iii}(配列番号:2);

C_iDADWC_{ii}DVPSLPC_{iii}(配列番号:3);

C_iYME[1NaI]C_{ii}DVTDYGC_{iii}(配列番号:4);

C_iYME[Trp(Me)]C_{ii}DVTDYGC_{iii}(配列番号:5);および

C_iYMEWC_{ii}DVTDYGC_{iii}(配列番号:6);

[配列中、C_i、C_{ii}およびC_{iii}はそれぞれ、第一のシステイン残基、第二のシステイン残基および第三のシステイン残基を示す]から選択されるアミノ酸配列、またはその修飾誘導体、またはそれらの薬学的に許容できる塩、を含む。

20

【0021】

さらなる実施態様において、ペプチドリガンドは、N末端および/またはC末端の付加を含み、

A-(配列番号:2)-A(本明細書では、BCY12027と称する);

H₂N-A-(配列番号:2)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY12026と称する);

A-(配列番号:3)-A(本明細書では、BCY11648と称する);

H₂N-A-(配列番号:3)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY12025と称する);

Ac-A-(配列番号:4)-A(本明細書では、BCY11279と称する);

A-(配列番号:4)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY11890と称する);

30

Ac-A-(配列番号:5)-A(本明細書では、BCY11281と称する);

Ac-(配列番号:6)(本明細書では、BCY9717と称する);

A-(配列番号:6)-A(本明細書では、BCY10194と称する);

A-(配列番号:6)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY18041と称する);

[PYA]-A-(配列番号:6)-A-NH₂(本明細書では、BCY10910と称する);および

Ac-A-(配列番号:6)-[K(PYA)]-NH₂(本明細書では、BCY10911と称する);

[配列中、PYAは4-ペンチン酸を示す]

から選択される。

【0022】

なおさらなる実施態様において、ペプチドリガンドは、N末端および/またはC末端の付加を含み、

40

A-(配列番号:2)-A(本明細書で、BCY12027と称する);

H₂N-A-(配列番号:2)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY12026と称する);

A-(配列番号:3)-A(本明細書で、BCY11648と称する);

H₂N-A-(配列番号:3)-A-[K(PYA)](本明細書では、BCY12025と称する);

Ac-A-(配列番号:4)-A(本明細書では、BCY11279と称する);

Ac-A-(配列番号:5)-A(本明細書では、BCY11281と称する);

Ac-(配列番号:6)(本明細書では、BCY9717と称する);

A-(配列番号:6)-A(本明細書では、BCY10194と称する);

[PYA]-A-(配列番号:6)-A-NH₂(本明細書では、BCY10910と称する);および

50

Ac-A-(配列番号:6)-[K(PYA)]-NH₂(本明細書では、BCY10911と称する) :

[配列中、PYAは4-ペンチン酸を示す]

から選択される。

【0023】

本実施態様のペプチドは、P-セレクチンに対して良好な結合性を示す(表6参照)。

【0024】

特定の実施態様において、ペプチドリガンドは、BCY11648、BCY12027、BCY12025およびBCY12026から選択される。さらなる実施態様において、ペプチドリガンドは、BCY12027およびBCY12026から選択される。これらの実施態様のペプチドはP-セレクチンに対して非常に良好な結合を示し、例えば、BCY12027は、P-セレクチンに

10

【0025】

さらなる実施態様において、薬学的に許容できる塩は、遊離酸またはナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩またはアンモニウム塩から選択される。

【0026】

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべ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技術など、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。分子生物学的、遺伝学的および生化学的方法には標準的な技術(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.を参照のこと)(これらは、引用により本明細書に包含される)が使用される。

20

【0027】

番号付け

本発明のペプチド内のアミノ酸残基の位置を称する場合、システイン残基(C_i、C_{ii}およびC_{iii})は不変であるため、番号付けから省略され、従って、本発明のペプチド内のアミノ酸残基の番号付けは以下のように称する :

-C_i-D₁-A₂-D₃-1NaI₄-C_{ii}-D₅-V₆-P₇-S₈-L₉-P₁₀-C_{iii}-(配列番号:2)。

【0028】

分子フォーマット

二環式コア配列に対するN末端またはC末端の伸長は、ハイフンで区切って配列の左側または右側に追加される。例えば、N末端ビオチン-G-Sar₅テールは、次のように示される :

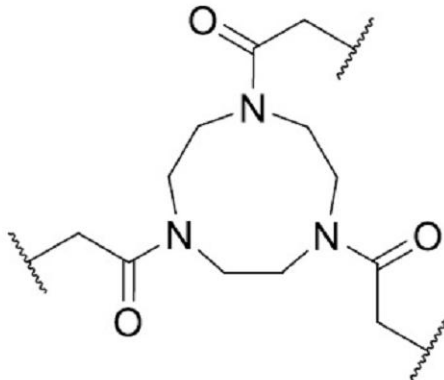
[Biot]-G-[Sar₅]-A-(配列番号:X)

【0029】

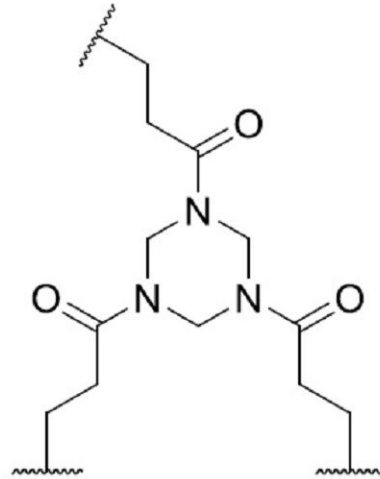
この説明の目的上、すべての二環式ペプチドは、1,1',1''-(1,3,5-トリアジン-1,3,5-トリイル)トリプロップ-2-エン-1-オン(TATA)または1,1',1''-(1,4,7-トリアゾナン-1,4,7-トリイル)トリス(2-クロロエタン-1-オン)(TCAZ)またはプロモ誘導体1,1',1''-(1,4,7-トリアゾナン-1,4,7-トリイル)トリス(2-プロモエタン-1-オン)(TBAZ) :

40

【化 1】



TCAZ/TBAZ



TATA

10

20

のいずれかで環化され、3置換構造をもたらすと仮定されている。しかしながら、本明細書に示した本発明の説明から明らかなように、環化は、少なくとも2つのポリペプチドループが形成されるように、ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する任意の適切な分子足場を用いて行うことができる。環化は C_i 、 C_{ii} および C_{iii} 上で起こる。

【0030】

一実施態様において、分子足場はTATAであり、二環式ペプチドは、BCY11279、BCY11281、BCY9717、BCY10194、BCY10910およびBCY10911から選択される。

【0031】

代替の実施態様において、分子足場はTCAZであり、二環式ペプチドは、BCY12027、BCY11648、BCY12025およびBCY12026から選択される。

30

【0032】

逆ペプチド配列

Nair et al. (2003) J. Immunol. 170(3), 1362-1373の開示に照らすと、本明細書に開示されているペプチド配列は、そのレトロ-インベルソ形態においても有用性を見出すことが想定される。例えば、配列は逆であり(すなわち、N末端はC末端になり、逆もまた同様である)、その立体化学もまた逆である(すなわち、D-アミノ酸はL-アミノ酸になり、逆もまた同様である)。

【0033】

ペプチドリガンドの定義

本明細書で称するペプチドリガンドとは、分子足場に共有結合しているペプチド、ペプチド性またはペプチド模倣体を意味する。典型的には、このようなペプチド、ペプチド性またはペプチド模倣体は、天然アミノ酸または非天然アミノ酸、足場と共有結合を形成することができる2つまたはそれ以上の反応基(すなわち、システイン残基)、および、ペプチド、ペプチド性またはペプチド模倣体が足場に結合したときにループを形成することからループ配列と称される、前記反応基の間に内在する配列を有するペプチドを含む。この場合、ペプチド、ペプチド性またはペプチド模倣体は、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} と称する)を含み、足場上に少なくとも2つのループを形成する。

40

【0034】

ペプチドリガンドの利点

50

本発明の特定の二環式ペプチドは、注射、吸入、経鼻投与、眼投与、経口投与または局所投与に適した薬物様分子と考えることができる多くの有利な性質を有する。そのような有利な性質には以下が含まれる：

- 種交差反応性。これは、前臨床薬力学および薬物動態評価の典型的な要件である；
- プロテアーゼ安定性。二環式ペプチドリガンドは、ほとんどの場合、血漿プロテアーゼ、上皮プロテアーゼ(「膜固定型」プロテアーゼ)、胃プロテアーゼ、腸プロテアーゼ、肺表面プロテアーゼ、細胞内プロテアーゼなどに対する安定性を示すべきである。プロテアーゼの安定性は、二環式ペプチドのリード候補が動物モデルで開発されるだけでなく、ヒトに安心して投与できるように、異なる生物種間で維持されるべきである；
- 望ましい溶解度プロファイル。これは、製剤化および吸収目的で重要である、荷電性残基、親水性残基と疎水性残基の割合、および分子内/分子間H-結合の関数である；そして

-循環における最適な血漿中半減期。臨床的適応と治療レジメンに応じて、慢性または急性の疾患状態の管理のための、インピボでの曝露時間が短いまたは長い二環式ペプチドを開発する必要がある。最適な曝露時間は、(治療効率を最大にするための)持続的曝露の要求と、薬剤への持続的曝露から生じる毒物学的影響を最小にするための短い曝露時間の要求によって決定される。

【0035】

薬学的に許容できる塩

塩の形態は本発明の範囲内であり、ペプチドリガンドへの言及は前記リガンドの塩の形態を含むことが理解される。

【0036】

本発明の塩は、従来の化学的方法、例えば、Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002に記載の方法によって、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。一般に、このような塩は、これらの化合物の遊離酸または塩基の形態を、水中、有機溶媒中、または両者の混合物中で、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。

【0037】

酸付加塩(モノ-塩またはジ-塩)は、無機および有機の多種多様な酸で形成することができる。酸付加塩の例としては、酢酸、2,2-ジクロロ酢酸、アジピン酸、アルギン酸、アスコルビン酸(例えば、L-アスコルビン酸)、L-アスパラギン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、4-アセトアミド安息香酸、ブタン酸、(+)-ショウノウ酸、カンファースルホン酸、(+)-(1S)-カンファー-10-スルホン酸、カプリン酸、カプロン酸、カプリル酸、桂皮酸、クエン酸、シクラミン酸、ドデシル硫酸、エタン-1,2-ジスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ギ酸、フマル酸、ガラクトール酸、ゲンチシン酸、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)、イセチオン酸、乳酸(例えば、(+)-L-乳酸、(±)-DL-乳酸)、ラクトビオン酸、マレイン酸、リンゴ酸、(-)-L-リンゴ酸、マロン酸、(±)-DL-マンデル酸、メタンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ナフタレン-1,5-ジスルホン酸、1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸、ニコチン酸、硝酸、オレイン酸、オロチン酸、シュウ酸、パルミチン酸、パモ酸、リン酸、プロピオン酸、ピルビン酸、L-ピログルタミン酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸、セバシン酸、ステアリン酸、コハク酸、硫酸、タンニン酸、(+)-L-酒石酸、チオシアン酸、p-トルエンスルホン酸、ウンデシレン酸、吉草酸、ならびにアシル化アミノ酸およびカチオン交換樹脂などからなる群から選択される酸と形成されるモノ-塩またはジ-塩を含む。

【0038】

1つの特定の塩群は、酢酸、塩酸、ヨウ化水素酸、リン酸、硝酸、硫酸、クエン酸、乳

10

20

30

40

50

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、トルエンルホン酸、硫酸、メタンスルホン酸(メシレート)、エタンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、吉草酸、プロピオン酸、ブタン酸、マロン酸、グルクロン酸およびラクトピオン酸から形成される塩からなる。特定の塩の1つは塩酸塩である。別の特定の塩は酢酸塩である。

【0039】

化合物がアニオン性であるか、またはアニオン性であってもよい官能基(例えば、-COOHは-COO⁻であってもよい)を有する場合には、有機塩基または無機塩基を用いて塩を形成し、適切なカチオンを生成してもよい。適当な無機カチオンの例としては、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、およびAl³⁺またはZn²⁺などの他のカチオンが挙げられるが、これらに限定されない。適当な有機カチオンの例としては、アンモニウムイオン(すなわちNH₄⁺)および置換アンモニウムイオン(例えば、NH₃R⁺、NH₂R₂⁺、NHR₃⁺、NR₄⁺)が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの適当な置換アンモニウムイオンの例としては、メチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、プロピルアミン、ジシクロヘキシルアミン、トリエチルアミン、ブチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジン、ベンジルアミン、フェニルベンジルアミン、コリン、メグルミンおよびトロメタミンならびにアミノ酸、例えばリシンおよびアルギニンから誘導されるものがある。一般的な第4級アンモニウムイオンの例はN(CH₃)₄⁺である。

10

【0040】

本発明のペプチド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反応させることにより、第4級アンモニウム塩を形成し得る。このような第4級アンモニウム化合物は、本発明のペプチドの範囲内である。

20

【0041】

修飾誘導体

本明細書で定義されるペプチドリガンドの修飾誘導体は本発明の範囲内であることが理解される。このような適当な修飾誘導体の例としては、以下から選択される1つまたはそれ以上の修飾が挙げられる：N末端および/またはC末端の修飾；1つまたはそれ以上のアミノ酸残基の1つまたはそれ以上の非天然アミノ酸残基による置換(例えば、1つまたはそれ以上の極性アミノ酸残基の1つまたはそれ以上の等配電子アミノ酸または等電子アミノ酸による置換；1つまたはそれ以上の非極性アミノ酸残基の他の非天然等配電子アミノ酸または等電子アミノ酸による置換)；スペーサー基の付加；1つまたはそれ以上の酸化感受性アミノ酸残基の1つまたはそれ以上の酸化耐性アミノ酸残基による置換；1つまたはそれ以上のアミノ酸残基の1つまたはそれ以上の置換アミノ酸、例えばアラニンによる置換；1つまたはそれ以上のL-アミノ酸残基の1つまたはそれ以上のD-アミノ酸残基による置換；二環式ペプチドリガンド内の1つまたはそれ以上のアミド結合のN-アルキル化；1つまたはそれ以上のペプチド結合のサロゲート結合(surrogate bond)による置換；ペプチド骨格長の修飾；1つまたはそれ以上のアミノ酸残基の α -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基化するような、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での修飾；および、官能基化に適した直交反応性を導入するアミノ酸例えば、アルキンまたはアジドを有する部分での官能基化をそれぞれ可能にするアジドまたはアルキン基を有するアミノ酸などの導入または置換。

30

40

【0042】

一実施態様において、修飾誘導体は、N末端および/またはC末端の修飾を含む。さらなる実施態様において、修飾誘導体は、適当なアミノ反応性化学を用いたN末端修飾、および/または適当なカルボキシ反応性化学を用いたC末端修飾を含む。さらなる実施態様において、前記N末端またはC末端の修飾は、細胞毒性剤、放射性キレート剤または発色団を含むがこれらに限定されないエフェクター基の付加を含む。

【0043】

50

さらなる実施態様において、修飾誘導体は、N末端修飾を含む。さらなる実施態様において、N末端修飾は、N-末端アセチル基を含む。この実施態様において、N末端残基は、N末端アセチル化分子をもたらすペプチド合成の間に、無水酢酸または他の適切な試薬でキャップされる。この実施態様は、アミノペプチダーゼの潜在的な認識点を除去し、二環式ペプチドの分解の可能性を回避するという利点を提供する。

【0044】

代替の実施態様において、N末端修飾は、エフェクター基のコンジュゲーションを容易にし、二環式ペプチドのその標的に対する効力を保持する分子スペーサー基の付加を含む。

【0045】

さらなる実施態様において、修飾誘導体は、C末端修飾を含む。さらなる実施態様において、C末端修飾はアミド基を含む。この実施態様において、C末端残基は、C末端アミド化分子をもたらすペプチド合成の間にアミドとして合成される。この実施態様は、カルボキシペプチダーゼの潜在的な認識点を除去し、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という利点を提供する。

【0046】

一実施態様において、修飾誘導体は、1つまたはそれ以上のアミノ酸残基の1つまたはそれ以上の非天然アミノ酸残基による置換を含む。この実施態様において、非天然アミノ酸は、分解性プロテアーゼによって認識されず、標的効力に悪影響を及ぼさない等配電子/等電子(isosteric/isoelectronic)側鎖を有するものが選択され得る。

【0047】

あるいは、近くのペプチド結合のタンパク質分解による加水分解が構造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を使用することもできる。特に、これらは、プロリンアナログ、かさ側鎖、C^β-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(単純な誘導体はアミノ-シクロプロピルカルボン酸)に関係する。

【0048】

一実施態様において、修飾誘導体は、スペーサー基の付加を含む。さらなる実施態様において、修飾誘導体は、N末端システイン(C_i)および/またはC末端システイン(C_{iii})へのスペーサー基の付加を含む。

【0049】

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

【0050】

一実施態様において、修飾誘導体は、1つまたはそれ以上の荷電性アミノ酸残基の1つまたはそれ以上の疎水性アミノ酸残基による置換を含む。代替の実施態様において、修飾誘導体は、1つまたはそれ以上の疎水性アミノ酸残基の1つまたはそれ以上の荷電性アミノ酸残基による置換を含む。荷電性アミノ酸残基と疎水性アミノ酸残基の正しいバランスは、二環式ペプチドリガンドの重要な特徴である。例えば、疎水性アミノ酸残基は血漿タンパク質の結合の程度に影響し、したがって血漿中の遊離利用可能な画分の濃度に影響し、荷電性アミノ酸残基(特にアルギニン)は細胞表面のリン脂質膜とペプチドの相互作用に影響する可能性がある。この2つの組み合わせは、ペプチド薬の半減期、分布容積および曝露に影響を与え得て、臨床エンドポイントに応じて目的に合わせることができる。さらに、荷電性アミノ酸残基と疎水性アミノ酸残基の適切な組み合わせと数は、注射部位での刺激を軽減し得る(ペプチド薬が皮下投与された場合)。

【0051】

一実施態様において、修飾誘導体は、1つまたはそれ以上のL-アミノ酸残基の1つまた

10

20

30

40

50

はそれ以上のD-アミノ酸残基による置換を含む。この実施態様は、立体障害および、D-アミノ酸の γ -ターンコンフォメーションを安定化させる性質によって、タンパク質分解安定性を増加させると考えられている(Tugyi et al. (2005) PNAS, 102(2), 413-418)。

【0052】

一実施態様において、修飾誘導体は、アミノ酸残基の除去、D-アラニンなどのアラニンによる置換を含む。この実施態様は、重要な結合残基を同定し、潜在的なタンパク質分解攻撃部位を除去するという利点を提供する。

【0053】

上述の修飾はそれぞれ、ペプチドの効力または安定性を意図的に改善する役割を果たすことに留意すべきである。修飾に基づく更なる効力の改善は、以下のメカニズムによって達成され得る：

- より高い親和性が達成されるように、疎水性効果を利用し、より低い解離速度をもたらす疎水性部分を取り込むこと；

- 長距離イオン相互作用を利用する荷電基を取り込むことで、より速い速度で、より高い親和性に至ること(例えば、Schreiber et al., Rapid, electrostatically assisted association of proteins (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31を参照)；および

- 例えば、標的との結合時にエントロピーの損失が最小になるようにアミノ酸の側鎖を正しく拘束すること、標的との結合時にエントロピーの損失が最小になるように骨格のねじれ角を拘束すること、および同じ理由で分子に付加的な環化を導入することによって、ペプチドに付加的な拘束を取り込むこと。

(レビューについては、Gentilucci et al., Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203, and Nestor et al., Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418を参照)。

【0054】

同位体のバリエーション

本発明は、1つまたはそれ以上の原子が、同じ原子番号を有するが、自然界に通常見出される原子質量または質量番号とは異なる原子質量または質量番号を有する原子によって置換されている、本発明のすべての薬学的に許容される(放射)同位体標識ペプチドリガンド、および、関連する(放射)同位体を保持することができる金属キレート基が結合された(「エフェクター」と称する)本発明のペプチドリガンド、および、特定の官能基が関連する(放射)同位体または同位体標識された官能基によって共有結合的に置換されている本発明のペプチドリガンド、を含む。

【0055】

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、水素の同位体、例えば ^2H (D)および ^3H (T)、炭素の同位体、例えば ^{11}C 、 ^{13}C および ^{14}C 、塩素の同位体、例えば ^{36}Cl 、フッ素の同位体、例えば ^{18}F 、ヨウ素の同位体、例えば ^{123}I 、 ^{125}I および ^{131}I 、窒素の同位体、例えば ^{13}N および ^{15}N 、酸素の同位体、例えば ^{15}O 、 ^{17}O および ^{18}O 、リンの同位体、例えば ^{32}P 、硫黄の同位体、例えば ^{35}S 、銅の同位体、例えば ^{64}Cu 、ガリウムの同位体、例えば ^{67}Ga または ^{68}Ga 、イットリウムの同位体、例えば ^{90}Y 、および、ルテチウムの同位体、例えば ^{177}Lu 、および、ビスマスの同位体、例えば ^{213}Bi がある。

【0056】

本発明の特定の同位体標識ペプチドリガンド、例えば放射性同位体を取り込んだペプチドリガンドは、薬物および/または基質の組織分布研究、および疾患組織上のDLL3標的の存在および/または非存在の臨床的評価に有用である。本発明のペプチドリガンドは、さらに、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同定するために使用できるという点で貴重な診断特性を有することができる。検出または同定方法は、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、イクオリンおよびルシフェラーゼ)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。放射性同位元素であるトリチウム、すなわち³H(T)、および炭素-14、すなわち¹⁴Cは、取り込みの容易さおよび検出手段の準備の容易さの観点から、この目的に特に有用である。

【0057】

重水素、すなわち²H(D)のような重い同位体による置換は、より高い代謝安定性、例えばインビボでの半減期の増加または必要投与量の減少から生じる特定の治療上の利点をもたらす可能性があり、したがって状況によっては好まれる可能性がある。

【0058】

¹¹C、¹⁸F、¹⁵Oおよび¹³Nなどの陽電子放出同位体による置換は、陽電子放射断層撮影(PET)研究において、標的の占有率を調べるのに有用である。 10

【0059】

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、当業者に公知の従来技術によって、または以前に採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用いて添付の実施例に記載のと類似のプロセスによって調製することができる。

【0060】

分子足場

一実施態様において、分子足場は非芳香族分子足場を含む。本明細書でいう「非芳香族分子足場」とは、芳香族(すなわち不飽和)炭素環式またはヘテロ環式環系を含まない、本明細書で定義される任意の分子足場を意味する。 20

【0061】

非芳香族分子足場の適当な例は、Heinis et al. (2014) *Angewandte Chemie, International Edition* 53(6) 1602-1606に記載されている。

【0062】

前述の文献に記載されているように、分子足場は、小分子、例えば有機小分子であってもよい。

【0063】

一実施態様において、分子足場は高分子であってもよい。一実施態様において、分子足場は、アミノ酸、ヌクレオチドまたは炭水化物からなる高分子である。

【0064】

一実施態様において、分子足場は、ポリペプチドの官能基と反応して共有結合を形成することができる反応基を含む。 30

【0065】

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

【0066】

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)トリプロップ-2-エン-1-オン(TATA)である(*Angewandte Chemie, International Edition* (2014), 53(6), 1602-1606)。 40

【0067】

多量体結合複合体

本発明の一態様によれば、本明細書では、少なくとも2つのペプチドリガンドを含む多量体結合複合体であって、ここで、少なくとも1つのペプチドリガンドは、本明細書で定義されるP-セレクチンに特異的なペプチドリガンドであり、前記ペプチドリガンドは、同じであっても異なってもよく、それぞれは、少なくとも2つのループ配列によって隔てられた少なくとも3つの反応基を含むポリペプチドおよび該ポリペプチドの反応基と共有結合を形成する分子足場を含み、その結果、少なくとも2つのポリペプチドループが該分子足場上に形成される、多量体結合複合体が提供される。 50

【0068】

本発明は、広範囲の効力および有効性で標的(P-セレクトインなど)に結合してそれを活性化する、前記二環式ペプチド内の様々な結合部位を用いる、様々な長さおよび剛性の様々な化学リンカーおよびヒンジを有する一連の多量体化二環式ペプチドについて記載する。

【0069】

本発明の概念は、多重配列(多量体)二環式ペプチドが、単一の二環式ペプチドを含む対応する単量体結合複合体と比較して、前記多量体結合複合体の結果として生じる性質のおかげで、相乗的な利点を提供するという認識であることが、当業者には理解される。例えば、本発明の多量体結合複合体は、典型的には、それらの単量体対応物よりも大きなレベルの結合効力または機能活性(本明細書においてEC₅₀値によって測定される)を有する。さらに、本発明の多量体結合複合体は、腎臓で除去されるのに十分な大きさに設計される。

10

【0070】

本発明の複合体は、細胞接着分子によって媒介されるような、細胞接着分子に関連する疾患および障害の処置に特に有用である。このような疾患および障害には、血液の疾患および障害、例えば鎌状赤血球症または鎌状赤血球貧血および血管閉塞性クライシスが含まれる。一実施態様において、疾患または障害は鎌状赤血球症に関連するものである。別の実施態様において、疾患または障害は癌である。さらなる実施態様において、疾患または障害は癌転移である。一実施態様において、細胞接着分子はP-セレクトインである。さらなる実施態様において、細胞接着分子はE-セレクトインおよび/またはL-セレクトインである。

20

【0071】

特定の実施態様において、前記ペプチドリガンドの少なくとも1つはP-セレクトインに特異的であり、前記さらなるペプチドリガンドの少なくとも1つはP-セレクトインに結合する。したがって、一実施態様において、前記ペプチドリガンドの少なくとも2つがP-セレクトインに結合する。さらなる実施態様において、前記2つまたはそれ以上のP-セレクトイン分子は、異なる標的細胞上に存在する。別の実施態様において、前記2つまたはそれ以上のP-セレクトイン分子は同じ標的細胞上に存在する。

【0072】

したがって、特定の実施態様において、本発明の多量体化ペプチドは、P-セレクトインに特異的な少なくとも2つのペプチドリガンドを含む。さらなる実施態様において、多量体化ペプチドは、P-セレクトインに特異的な3つのペプチドリガンドを含む。別の実施形態において、多量体化ペプチドは、P-セレクトインに特異的な4つのペプチドリガンドを含む。

30

【0073】

さらなる実施態様において、細胞は赤血球などの血液細胞から選択される。特定の実施態様において、細胞は、鎌状赤血球症または鎌状赤血球貧血に罹患した赤血球である。したがって、一実施態様において、細胞は鎌状赤血球である。

【0074】

理論に束縛されることなく、多量体化ペプチドは細胞接着分子のような細胞表面分子をブロックできると考えられる。したがって、一実施態様において、前記ペプチドリガンドは同じ標的に特異的である。さらなる実施態様において、多量体結合複合体は、少なくとも2つの同一のペプチドリガンドを含む。「同一」とは、同じアミノ酸配列を有するペプチドを意味し、最も決定的なことは、同じアミノ酸配列は前記ペプチドの結合部分を意味する(例えば、配列は結合位置に応じて変動し得る)。この実施態様において、多量体結合複合体内のペプチドはそれぞれ、同じ標的上の全く同じエピトープに結合する-したがって、結果として生じる標的結合複合体は、ホモ二量体(多量体複合体が2つの同一のペプチドを含む場合)、ホモ三量体(多量体複合体が3つの同一のペプチドを含む場合)またはホモ四量体(多量体複合体が4つの同一のペプチドを含む場合)などを生成する。

40

【0075】

50

代替の実施態様において、多量体結合複合体は、少なくとも2つの異なるペプチドリガンドを含む。「異なる」とは、違うアミノ酸配列を有するペプチドを意味する。この実施態様において、多量体結合複合体内の異なるペプチドリガンドは、同じ標的上の異なるエピトープに結合する-したがって、結果として生じる標的結合複合体は、バイパラトピック(biparatopic)(多量体結合複合体が2つの異なるペプチドを含む場合)、トリパラトピック(triparatopic)(多量体結合複合体が3つの異なるペプチドを含む場合)またはテトラパラトピック(tetraparatopic)(多量体結合複合体が4つの異なるペプチドを含む場合)などを生成する。

【0076】

多量体化ペプチドは、細胞表面分子、例えば、異なる細胞接着分子をブロックまたは抑制できることがさらに理解される。したがって、一実施態様において、前記ペプチドリガンドは異なる標的に特異的である。この実施態様において、多量体結合複合体は、少なくとも2つの異なるペプチドリガンド(すなわち、異なるアミノ酸配列を有するペプチドリガンド)を含むことが理解される。この実施態様において、多量体結合複合体内のペプチドはそれぞれ、異なる標的上の異なるエピトープに結合する-したがって、結果として生じる標的結合複合体は、二重特異性多量体結合複合体(多量体結合複合体が2つの異なるペプチドを含む場合)、三重特異性多量体結合複合体(多量体結合複合体が3つの異なるペプチドを含む場合)、四重特異性多量体結合複合体(多量体結合複合体が4つの異なるペプチドを含む場合)などを生成する。さらなる実施態様において、異なるエピトープおよび/または標的はそれぞれ、同じ細胞上に存在する。

【0077】

本発明の多量体結合複合体は、受容体のような様々な異なる標的に結合できるように設計されることが理解される。したがって、前述の二重特異性、三重特異性、および四重特異性の多量体結合複合体の場合、ペプチドは少なくとも2つの異なる細胞(血管の細胞、内皮細胞または他の血液細胞、例えば他の赤血球)上の標的に結合し得ることが理解される。

【0078】

本発明の多量体結合複合体内のペプチドは、多くの異なるオプションを介して組み立てることができる。例えば、中央ヒンジ部分または分岐部分と、そのヒンジまたは分岐点から放射状に伸びるスペーサーまたはアーム要素があり、それぞれがペプチドを含む。あるいは、円形の支持部材が、内側または外側に突出した多数のペプチドを保持し得ることが予想される。

【0079】

一実施態様において、各ペプチドリガンドは、スペーサー基によって中央ヒンジ部分に結合される。

【0080】

スペーサー基は直鎖状であってもよく、単一のペプチドを中央ヒンジ部位と結合されていてもよいことが理解される。したがって、一実施態様において、多量体結合複合体は、式(I):

10

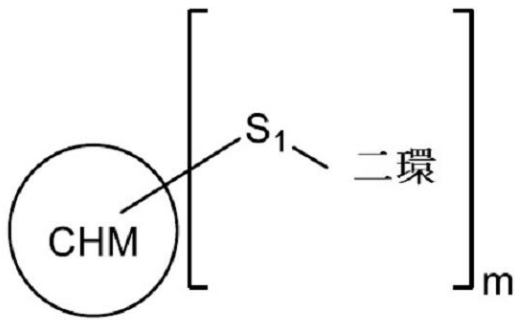
20

30

40

50

【化2】



10

[式中、

CHMは、中央ヒンジ部分を示し；

 S_1 は、スペーサー基を示し；

二環(Bicycle)は、本明細書で定義されるペプチドリガンドを示し；そして

mは、2～10の整数を示す]

20

の化合物を含む。

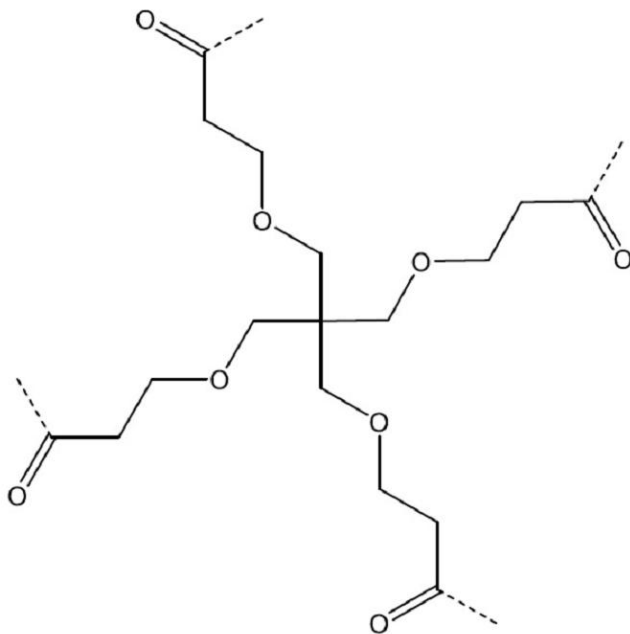
【0081】

一実施態様において、mは、2～4の整数を示す。さらなる実施態様において、mは、2、3または4から選択される整数を示す。

【0082】

mが4を示す場合、中央ヒンジ部分は、4つの結合点を必要とすることが理解される。したがって、一実施態様において、mは4を示し、CHMは、式(A)：

【化3】



(A)

30

40

[ここで、「-----」は、各 S_1 基への結合点を示す]

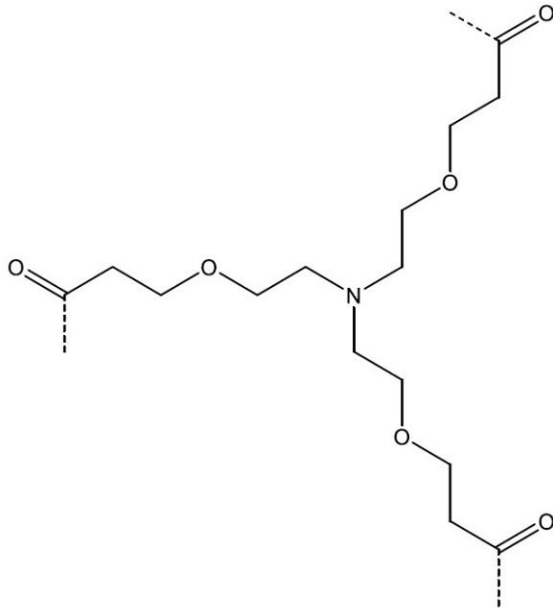
50

のモチーフ(本明細書では、Tetと称する)である。

【0083】

mが3を示す場合、中央ヒンジ部分は、3つの結合点を必要とすることが理解される。したがって、一実施態様において、mは3を示し、CHMは、式(B)：

【化4】



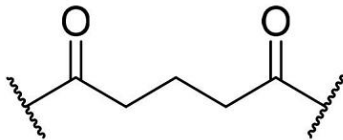
(B)

[ここで、「-----」は、各 S_1 基への結合点を示す]のモチーフ(本明細書では、TCAと称する)である。

【0084】

mが2を示す場合、中央ヒンジ部分は、2つの結合点を必要とすることが理解される。したがって、一実施態様において、mは2を示し、CHMは、式(C)：

【化5】



(C)

[式中、
【化6】

“~~~~~”

は、各 S_1 基への結合点を示す]のモチーフ(本明細書では、GTAと称する)である。

【0085】

当業者には、mの値に応じて、どのように代替的な中央ヒンジ部分を構成することができるかは容易に明らかであろう。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 6 】

スペーサー(S₁)は、ペプチド中央ヒンジ部分をペプチドに結合させるための任意の適当な構造であってよいことが理解される。一実施態様において、スペーサー(S₁)はトリアゾリル部分を含む。この実施態様の利点は、トリアゾリル部分が、一般に入手可能な「クリック」化学を用いて合成内に取り込まれ得ることである。適当なスペーサー(S₁)基の例としては、1つまたはそれ以上のPEG部分、ペプチド配列、炭水化物、脂質などがある。

【 0 0 8 7 】

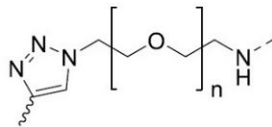
さらなる実施態様において、スペーサー(S₁)は、1つまたはそれ以上のPEG部分を含む。本明細書において「PEG」への言及は、一般構造：(CH₂CH₂O)_n(ここで、nは、1～30などの任意の数を示す)の規則的な繰り返し単位を有する直鎖ポリマーを示す。

10

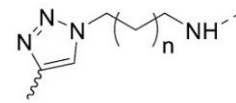
【 0 0 8 8 】

したがって、さらなる実施態様において、スペーサー(S₁)は、スペーサーS₁A、S₁B、S₁C、S₁D、S₁E、S₁F、S₁GおよびS₁H：

【 化 7 】

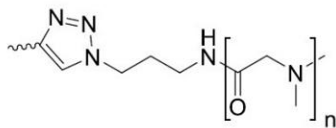


S₁A
n = 5, 10および23

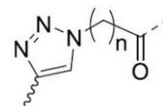
S₁E

n = 1

20

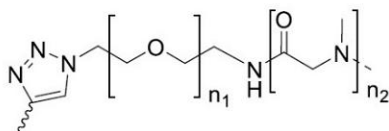


S₁B
n = 5, 10

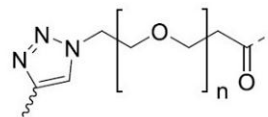
S₁F

n = 1

30

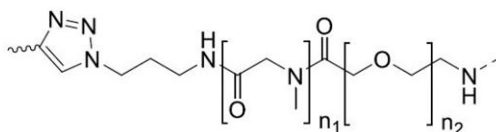


S₁C
n₁ = 5, n₂ = 5
n₁ = 10, n₂ = 10

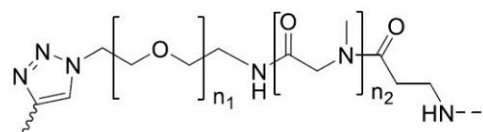
S₁G

n = 5および10

40



S₁D
n₁ = 5, n₂ = 5
n₁ = 10, n₂ = 10

S₁H

n₁ = 5, n₂ = 5
n₁ = 10, n₂ = 10

[ここで、

50

「-----」は、CHM基への結合点を示し；そして
【化8】

“~~~~~”

は、二環式基への結合点を示す]
のいずれか1つから選択される。

【0089】

さらなる実施態様において、スペーサー(S_1)は S_1A である。さらなる実施態様において、 n は、5、10または23を示す。

【0090】

四量体結合複合体

一実施態様において、多量体結合複合体は、以下の表1Aおよび1Bに記載の四量体結合複合体を含む：

【0091】

【表1】

表1A:本発明の四量体結合複合体の例示

多量体化合物番号	対応する単量体	単量体の数	中央ヒンジ部分	スペーサー分子	結合点
BCY5462	BCY10910	4	A (Tet)	$S_1A: n = 10$	N末端 Pya
BCY5463	BCY10910	4	A (Tet)	$S_1A: n = 23$	N末端 Pya
BCY5464	BCY10911	4	A (Tet)	$S_1A: n = 10$	C末端 K(Pya)
BCY5465	BCY10911	4	A (Tet)	$S_1A: n = 23$	C末端 K(Pya)
BCY12261	BCY12025	4	A (Tet)	$S_1A: n = 23$	C末端 K(Pya)
BCY12262	BCY12026	4	A (Tet)	$S_1A: n = 23$	C末端 K(Pya)
BCY11903	BCY11890	4	A (Tet)	$S_1A: n = 23$	C末端 K(Pya)
BCY19238	BCY18041	4	A (Tet)	$S_1A: n = 23$	C末端 K(Pya)

【0092】

一実施態様において、多量体結合複合体は、BCY11903および/またはBCY19238以外の四量体結合複合体を含む。

【0093】

【表2】

表1B:本発明の四量体結合複合体好ましい例示

多量体化合物番号	対応する単量体	単量体の数	中央ヒンジ部分	スペーサー分子	結合点
BCY5462	BCY10910	4	A (Tet)	$S_1A: n = 10$	N末端 Pya
BCY5463	BCY10910	4	A (Tet)	$S_1A: n = 23$	N末端 Pya
BCY5464	BCY10911	4	A (Tet)	$S_1A: n = 10$	C末端 K(Pya)
BCY5465	BCY10911	4	A (Tet)	$S_1A: n = 23$	C末端 K(Pya)
BCY12261	BCY12025	4	A (Tet)	$S_1A: n = 23$	C末端 K(Pya)
BCY12262	BCY12026	4	A (Tet)	$S_1A: n = 23$	C末端 K(Pya)

【0094】

表1Bの四量体結合複合体がP-セレクチンに対して、親和性KD値が100nM未満または0.02nM未満である良好な結合を示しているデータを本明細書に示す(表6参照)。本明細

書のデータでは、図2において、特に、BCY12262は陽性対照抗体(クリザンリズマブ(crizanlizumab))と比較して、白血球の接着を有意に阻害することが示されている。

【0095】

一実施態様において、多量体結合複合体は、それぞれが本明細書で定義されるBCY10910である4つの二環式ペプチドを含む四量体を含み、これらは、N末端Pya部分を介して、nが10または23を示すスペーサー分子(S_1A)に結合され、ここで、(S_1A)は、本明細書において定義される(A)である中央ヒンジ部分に結合される。本実施態様による多量体結合複合体を、本明細書ではそれぞれBCY5462およびBCY5463と称する。

【0096】

さらなる実施態様において、多量体結合複合体は、それぞれが本明細書で定義されるBCY10911である4つの二環式ペプチドを含む四量体を含み、これらは、C末端Lys(Pya)部分を介して、nが10または23を示すスペーサー分子(S_1A)に結合され、ここで、(S_1A)は、本明細書において定義されている(A)である中央ヒンジ部分に結合される。本実施態様による多量体結合複合体を、本明細書ではそれぞれBCY5464およびBCY5465と称する。

【0097】

一実施態様において、多量体結合複合体は、本明細書で定義されるBCY12025またはBCY12026である4つの二環式ペプチドを含む四量体を含み、これらの二環式ペプチドは、C末端Lys(Pya)部分を介して、スペーサー分子(S_1A) [ここで、nは23を示す]に結合され、ここで、(S_1A)は、本明細書で定義される(A)である中央ヒンジ部分に結合される。これらの多量体結合複合体は、本明細書中ではそれぞれBCY12261およびBCY12262と称する：

10

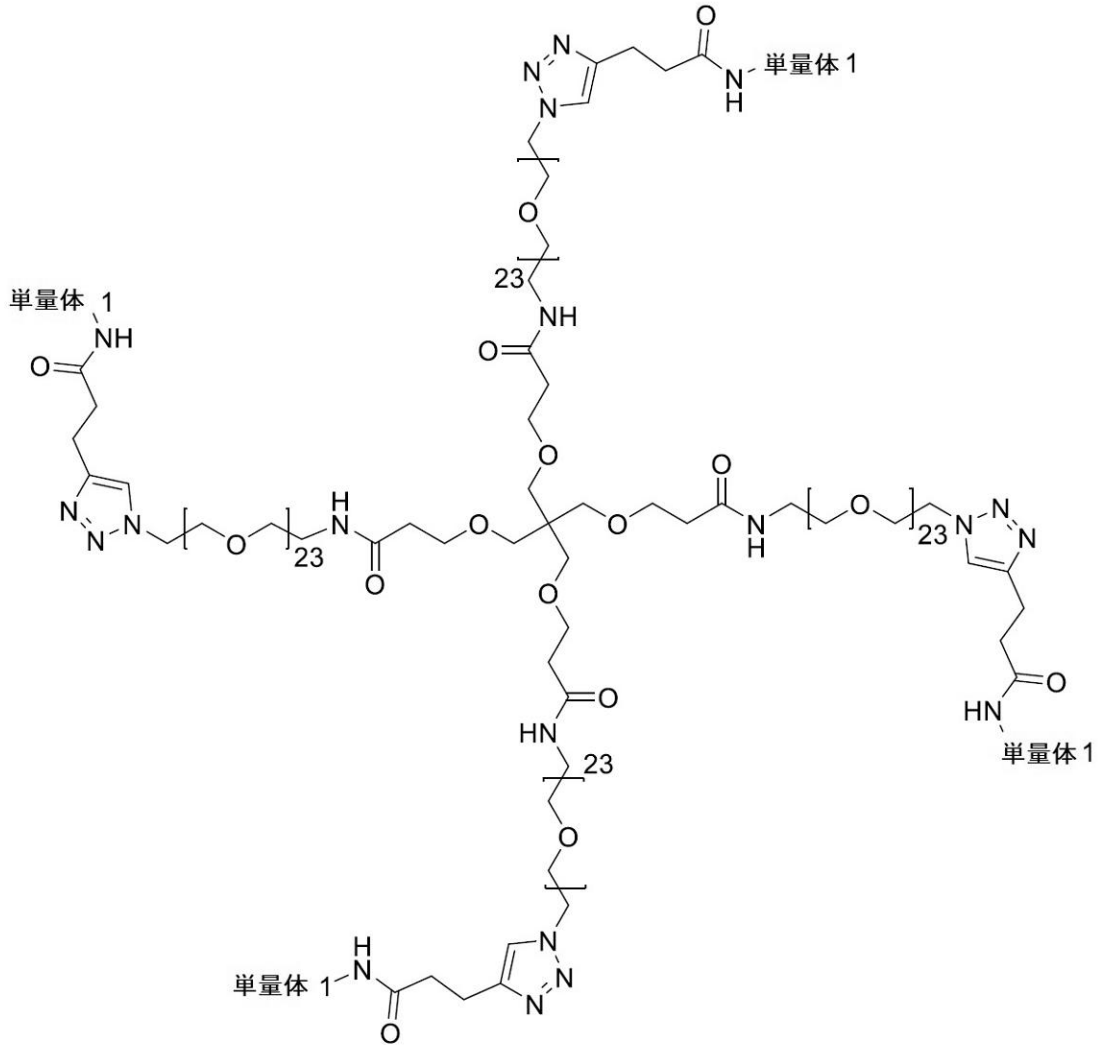
20

30

40

50

【化 9】



BCY12261またはBCY12262

[ここで、単量体 1 はそれぞれ、BCY12025 または BCY12026 を示す]

【 0 0 9 8 】

本明細書のデータでは、表6において、BCY12261およびBCY12262はそれぞれ0.019nMおよび0.017nMの親和性 K_D 値でP-セレクトインと結合することが示されている。

【 0 0 9 9 】

代替の配置において、スペーサー基は分岐していてもよく、したがって単一のスペーサー基が複数のペプチドを中央ヒンジ部分で結合されていてもよい。したがって、代替の実施態様において、多量体結合複合体は、式(II):

10

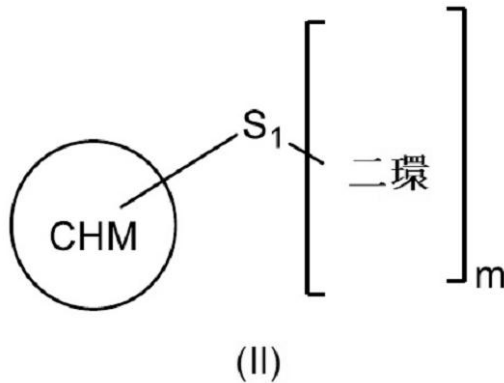
20

30

40

50

【化10】



10

[式中、

CHMは、中央ヒンジ部分を示し；

S₁は、スペーサー基を示し；

二環は、本明細書で定義されるペプチドリガンドを示し；そして、

mは、2～10の整数を示す]

で示される化合物を含む。

【0100】

20

ペプチドリガンドは、多くの手段を介してスペーサーに結合され得ることが理解される。一実施態様において、ペプチドリガンドは結合対(binding pair)の一方の半分にコンジュゲートされ、結合対の他方の半分がそれぞれのペプチドをスペーサーに結合させる。

【0101】

一実施態様において、前記結合対はビオチンおよびストレプトアビジンを含む。したがって、各ペプチドリガンドはビオチンにコンジュゲートされ、ストレプトアビジンを介してスペーサーに結合される。

【0102】

三量体結合複合体

一実施態様において、多量体結合複合体は、以下の表2Aおよび表2Bに記載の三量体結合複合体を含む；

30

【表3】

表2A:本発明の例示的三量体結合複合体

多量体化合物の番号	対応する単量体	単量体の数	中央ヒンジ部分	スペーサー分子	結合点
BCY5458	BCY10910	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 10	N末端 Pya
BCY5459	BCY10910	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 23	N末端 Pya
BCY5460	BCY10911	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 10	C末端 K(Pya)
BCY5461	BCY10911	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)
BCY12259	BCY12025	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)
BCY12260	BCY12026	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)
BCY19242	BCY11890	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)
BCY19239	BCY18041	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)

40

【0103】

一実施態様において、多量体結合複合体は、BCY19242および/またはBCY19239以外の三量体結合複合体を含む。

【0104】

50

【表 4】

表2B:本発明の好ましい例示的三量体結合複合体

多量体化合物の 番号	対応する単 量体	単量体の数	中央ヒンジ部分	スペーサー分子	結合点
BCY5458	BCY10910	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 10	N末端 Pya
BCY5459	BCY10910	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 23	N末端 Pya
BCY5460	BCY10911	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 10	C末端 K(Pya)
BCY5461	BCY10911	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)
BCY12259	BCY12025	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)
BCY12260	BCY12026	3	B (TCA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)

10

【0105】

本明細書のデータでは、表2Bの四量体結合複合体がP-セレクトインに対して親和性K_D値が500nM未満または0.5nM未満である良好な結合を示している(表6参照)。

【0106】

一実施態様において、多量体結合複合体は、それぞれが本明細書で定義されるBCY10910である3つの二環式ペプチドを含む三量体を含み、これらの二環式ペプチドは、N末端Pya部分を介して、スペーサー分子(S₁A) [ここで、nは10または23を示す]に結合され、ここで、(S₁A)は、本明細書で定義される(B)である中央ヒンジ部分に結合される。本実施態様による多量体結合複合体を、本明細書ではそれぞれBCY5458およびBCY5459と称する。

20

【0107】

さらなる実施態様において、多量体結合複合体は、それぞれが本明細書で定義されるBCY10911である3つの二環式ペプチドを含む三量体を含み、これらの二環式ペプチドは、C末端Lys(Pya)部分を介して、スペーサー分子(S₁A) [ここで、nは10または23を示す]に結合され、ここで、(S₁A)は、本明細書で定義される(B)である中央ヒンジ部分に結合される。本実施態様による多量体結合複合体を、本明細書ではそれぞれBCY5460およびBCY5461と称する。

30

【0108】

一実施態様において、多量体結合複合体は、本明細書で定義されるBCY12025またはBCY12026である3つの二環式ペプチドを含む三量体を含み、これらの二環式ペプチドは、C末端Lys(Pya)部分を介して、スペーサー分子(S₁A) [ここで、nは23を示す]に結合され、ここで、(S₁A)は、本明細書で定義される(B)である中央ヒンジ部分に結合される。これらの多量体結合複合体を、本明細書ではそれぞれBCY12259およびBCY12260と称する。

【0109】

本明細書のデータでは、表6において、BCY12259およびBCY12260はそれぞれ0.233nMおよび0.109nMの親和性K_D値でP-セレクトインに結合することが示されている。

40

【0110】

タンデム結合複合体(Tandem Binding Complex)

一実施態様において、多量体結合複合体は、以下の表3Aおよび3Bに記載のタンデム結合複合体を含む：

【0111】

50

【表 5】

表3A:本発明の例示的タンデム結合複合体

多量体化合物の番号	対応する単量体	単量体の数	中央ヒンジ部分	スペーサー分子	結合点
BCY5454	BCY10910	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 10	N末端 Pya
BCY5455	BCY10910	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 23	N末端 Pya
BCY5456	BCY10911	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 10	C末端 K(Pya)
BCY5457	BCY10911	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)
BCY12257	BCY12025	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)
BCY12258	BCY12026	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)
BCY19243	BCY11890	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)
BCY19240	BCY18041	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)

10

【0112】

一実施態様において、多量体結合複合体は、BCY19243および/またはBCY19240以外の二量体結合複合体を含む。

【0113】

【表 6】

表3B:本発明のタンデム結合複合体の好ましい例示

多量体化合物の番号	対応する単量体	単量体の数	中央ヒンジ部分	スペーサー分子	結合点
BCY5454	BCY10910	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 10	N末端 Pya
BCY5455	BCY10910	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 23	N末端 Pya
BCY5456	BCY10911	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 10	C末端 K(Pya)
BCY5457	BCY10911	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)
BCY12257	BCY12025	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)
BCY12258	BCY12026	2	C (GTA)	S ₁ A: n = 23	C末端 K(Pya)

20

30

【0114】

本明細書のデータでは、表3Bの二量体結合複合体がP-セレクトインに対して、親和性K_D値が約1200nM、1000nM未満、500nM未満または0.5nM未満で、良好な結合を示すことが示されている(表6参照)。

【0115】

一実施態様において、多量体結合複合体は、それぞれが本明細書で定義されるBCY10910である2つの二環式ペプチドを含むタンデムを含み、これらの二環式ペプチドは、N末端PYA部分を介して、スペーサー分子(S₁A) [ここで、nは10または23を示す]に結合され、ここで、(S₁A)は、本明細書で定義される(C)である中央ヒンジ部分に結合される。本実施態様による多量体結合複合体を、本明細書ではそれぞれBCY5454およびBCY5455と称する。

40

【0116】

さらなる実施態様において、多量体結合複合体は、それぞれが本明細書で定義されるBCY10911である2つの二環式ペプチドを含むタンデムを含み、これらの二環式ペプチドは、C末端Lys(Pya)部分を介して、スペーサー分子(S₁A) [ここで、nは10または23を示す]に結合され、ここで、(S₁A)は、本明細書で定義される(C)である中央ヒンジ部分に結合される。本実施態様による多量体結合複合体を、本明細書ではそれぞれBCY5456およびBCY5457と称する。

50

【0117】

一実施態様において、多量体結合複合体は、それぞれが本明細書で定義されるBCY12025またはBCY12026である2つの二環式ペプチドを含むタンデムを含み、これらの二環式ペプチドは、C末端Lys(Pya)部分を介して、スペーサー分子(S₁A) [ここで、nは23を示す] に結合され、ここで、(S₁A)は、本明細書で定義される(C)である中央ヒンジ部分に結合される。これらの多量体結合複合体を、本明細書中ではそれぞれBCY12257およびBCY12258と称する。

【0118】

本明細書のデータでは、表6において、BCY12257およびBCY12258が、それぞれ11.6nMおよび0.409nMの親和性K_D値でP-セレクトインに結合することが示されている。

10

【0119】

リンカー

P-セレクトインペプチドリガンドは、任意の適当なリンカーを介して第二のペプチドリガンドにコンジュゲートされていてもよいことが理解される。典型的には、前記リンカーは、2つの二環式ペプチドが、単独で、あるいは同時に両方の標的受容体に結合しながら、それぞれの標的に邪魔されずに結合できるような方式で存在するように設計される。さらに、リンカーは、所望の機能的結果をもたらす標的細胞または受容体の間の適切な距離を維持しながら、両方の標的への結合を同時に可能にすべきである。リンカーの性質は、所望の機能的結果を最適化するために、長さ、剛性、または溶解性を増加させるように調節することができる。リンカーはまた、同じ標的に複数の二環を結合できるように設計され得る。どちらかの結合ペプチドの価数を上げることにより、標的細胞に対する複合体の親和性を向上させるか、標的細胞表面分子の一方または両方をブロックするのに役立つことができる。

20

【0120】

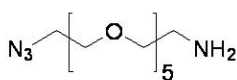
一実施態様において、リンカーは、以下の配列から選択される：-CH₂-、-PEG₅-、-PEG₁₀-、-PEG₁₂-、-PEG₂₃-、-PEG₂₄-、-PEG₁₅-Sar₅-、-PEG₁₀-Sar₁₀-、-PEG₅-Sar₁₅-、-PEG₅-Sar₅-、-B-Ala-Sar₂₀-、-B-Ala-Sar₁₀-PEG₁₀-、-B-Ala-Sar₅-PEG₁₅-および-B-Ala-Sar₅-PEG₅-。

【0121】

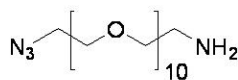
適切なリンカーの構造表現を以下に詳しく説明する：

30

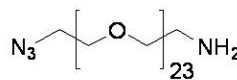
【化11】



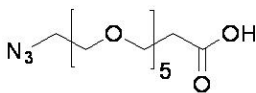
H2N-Peg5-N3
COM00000132



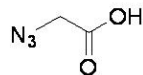
H2N-Peg10-N3
COM00000134



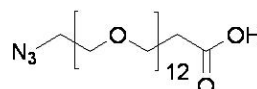
H2N-Peg23-N3
COM00000135



N3-PEG5-COOH
COM00000467

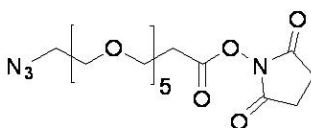


N3-CH2-COOH
COM00000468

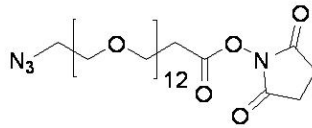


N3-PEG12-COOH
COM00000466

40



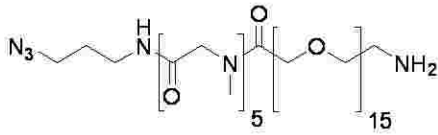
NHS-PEG5-N3



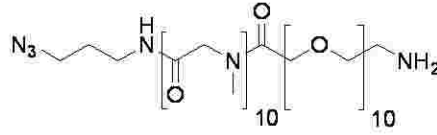
NHS-PEG12-N3

50

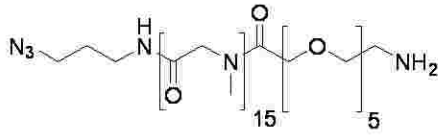
【化 1 2】



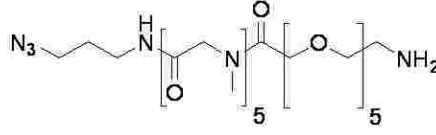
H2N-PEG15-SAR5-N3
COM00000128



H2N-PEG10-SAR10-N3
COM00000129

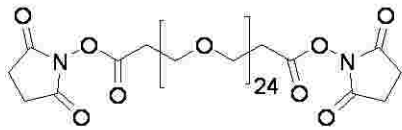


H2N-PEG5-SAR15-N3
COM00000130

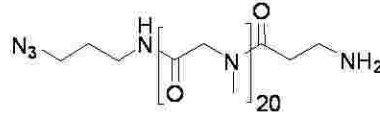


H2N-PEG5-SAR5-N3
COM00000131

10

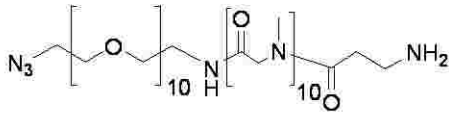


NHS-PEG24-NHS
COM00000469

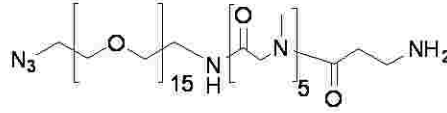


H2N-(B-Ala)-SAR20-N3
COM00000470

20

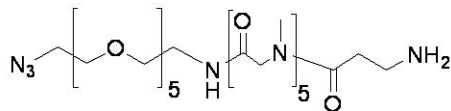


H2N-(B-Ala)-SAR10-PEG10-N3
COM00000471



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

【化 1 3】



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

30

【0 1 2 2】

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し、次いで、インビトロで分子足場と反応させることができる。その際、標準的な化学反応を用いることができる。これにより、さらなる下流の実験または検証のための可溶性材料の迅速な大量調製が可能となる。このような方法は、Timmerman et al.(上記)に開示されているような従来の化学的手法で達成することができる。

40

【0 1 2 3】

従って、本発明はまた、本明細書で規定されるように選択されたポリペプチドまたはコンジュゲートの製造に関し、この製造は、以下に説明されるような任意選択のさらなる工程を含む。一実施態様において、これらの工程は、化学合成により製造された最終生成物であるポリペプチド/コンジュゲートに対して実施される。

【0 1 2 4】

目的のポリペプチドにおけるアミノ酸残基は、コンジュゲートまたは複合体を製造する際に、場合により置換されていてもよい。

50

【0125】

ペプチドを伸長させて、例えば、別のループを取り込むことで、複数の特異性を導入することもできる。

【0126】

ペプチドを伸長させるためには、標準的な固相化学または溶液相化学を用いて、直交性に保護されたリジン(およびアナログ)を用いて、そのN末端もしくはC末端でまたはループ内で単に化学的に伸長させることができる。標準的な(バイオ)コンジュゲーション技術を用いて、活性化されたまたは活性化可能なN末端またはC末端を導入してもよい。あるいは、付加は、例えば(Dawson et al. 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science 266:776-779)に記載されている断片縮合またはネイティブ・ケミカル・ライゲーションによるか、または例えば、(Chang et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 20; 91(26):12544-8 or in Hikari et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003)に記載されているサブチリガーゼを用いて、酵素により行われてもよい。

10

【0127】

あるいは、ペプチドは、ジスルフィド結合を介するさらなるコンジュゲーションによって伸長または修飾されてもよい。これは、第一のペプチドおよび第二のペプチドが細胞の還元的環境内で互いに解離することを可能にするという追加の利点を有する。この場合、分子足場(例えば、TATAまたはTCAZ)は、3つのシステイン基と反応するように、第一のペプチドの化学合成中に付加することができ; その結果、さらなるシステインまたはチオールが第一のペプチドのN末端またはC末端に付加することで、このシステインまたはチオールが第二のペプチドの遊離システインまたはチオールとのみ反応して、ジスルフィド結合した二環式ペプチド-ペプチドコンジュゲートを形成することができる。

20

【0128】

同様の技術は、四重特異性分子を潜在的に生じさせる、2つの二環式二重特異性大環状分子の合成/カップリングにも同様に適用される。

【0129】

さらに、他の官能基またはエフェクター基の付加は、適切な化学的方法、N末端またはC末端で、または側鎖を介してカップリングさせて、同じ方式で達成されてもよい。一実施態様において、カップリングは、いずれの実体の活性もブロックしないような方式で実施される。

30

【0130】

薬物コンジュゲート

本発明のさらなる態様によれば、1つまたはそれ以上のエフェクター基および/または官能基にコンジュゲートされた、本明細書で定義されるペプチドリガンドまたは多量体結合複合体を含む薬物コンジュゲートが提供される。

【0131】

エフェクター基および/または官能基は、例えば、ポリペプチドのN末端および/またはC末端、ポリペプチド内のアミノ酸、あるいは分子足場に結合させてもよい。

40

【0132】

適切なエフェクター基には、抗体およびその一部または断片が含まれる。例えば、エフェクター基は、1つまたはそれ以上の定常領域ドメインに加えて、抗体軽鎖定常領域(CL)、抗体CH1重鎖ドメイン、抗体CH2重鎖ドメイン、抗体CH3重鎖ドメイン、またはそれらのいずれかの組み合わせを含むことができる。エフェクター基はまた、抗体のヒンジ領域(このような領域は通常、IgG分子のCH1ドメインとCH2ドメインの間に見出される)を含み得る。

【0133】

本発明のこの態様のさらなる実施態様において、本発明によるエフェクター基はIgG分子のFc領域である。有利には、本発明によるペプチドリガンド-エフェクター基は、1日

50

以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上または7日以上 $t_{1/2}$ 半減期を有するペプチドリガンドFc融合体を含むか、またはそれからなる。最も有利には、本発明によるペプチドリガンドは、1日以上 $t_{1/2}$ 半減期を有するペプチドリガンドFc融合体を含むか、またはそれからなる。

【0134】

官能基には、一般に、結合基、薬物、他の実体を結合させるための反応基、大環状ペプチドの細胞への取り込みを助ける官能基などが含まれる。

【0135】

ペプチドが細胞に浸透する能力により、ペプチドは細胞内標的に対して効果を発揮することができる。細胞に浸透する能力を持つペプチドがアクセスできる標的には、転写因子、チロシンキナーゼなどの細胞内シグナル伝達分子、アポトーシス経路に關与する分子などが含まれる。細胞の侵入を可能にする官能基には、ペプチドまたはペプチドもしくは分子足場のいずれかに付加された化学基が含まれる。例えば、Chen and Harrison, Biochemical Society Transactions (2007) Volume 35, part 4, p821; Gupta et al. in Advanced Drug Discovery Reviews (2004) Volume 57 9637に記載の、VP22、HIV-Tat、ドロソフィラ(Drosophila)のホメオボックスタンパク質(アンテナペディア)などに由来するペプチドなどのペプチド。原形質膜を通過するのに効率的であることが示されている短いペプチドの例としては、ドロソフィラ(Drosophila)のアンテナペディアタンパク質由来の16アミノ酸ペネトラチンペプチド(Derossi et al. (1994) J Biol. Chem. Volume 269 p10444)、18アミノ酸の「モデル両親媒性ペプチド」(Oehlke et al. (1998) Biochim Biophys Acts Volume 1414 p127)、およびHIV TATタンパク質のアルギニンリッチ領域がある。非ペプチド性アプローチには、生体分子に容易に結合できる小分子模倣物またはSMOCの使用が含まれる(Okuyama et al. (2007) Nature Methods Volume 4 p153)。分子にグアニジニウム基を付加する他の化学的戦略も細胞透過を増強する(Elson-Scwab et al. (2007) J Biol Chem Volume 282 p13585)。ステロイドなどの低分子量分子を分子足場に付加して、細胞への取り込みを向上させることができる。

10

20

【0136】

ペプチドリガンドに結合し得る官能基の1つのクラスには、抗体およびその結合断片、例えばFab、Fvまたは単ドメイン断片が含まれる。特に、ペプチドリガンドのインビボでの半減期を増加させることができるタンパク質に結合する抗体が使用され得る。

30

【0137】

一実施態様において、本発明によるペプチドリガンド-エフェクター基は、以下からなる群から選択される $t_{1/2}$ 半減期を有する：12時間以上、24時間以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、13日以上、14日以上、15日以上または20日以上。有利には、本発明によるペプチドリガンド-エフェクター基または組成物は、12~60時間の範囲の $t_{1/2}$ 半減期を有する。さらなる実施態様において、それは1日以上 $t_{1/2}$ 半減期を有する。さらなる実施態様において、それは12~26時間の範囲である。

【0138】

本発明の特定の一実施態様において、官能基は、医薬に関連する金属放射性同位元素を錯化するのに適した金属キレート剤から選択される。

40

【0139】

可能なエフェクター基には酵素、例えば、酵素/薬物療法に使用されるカルボキシペプチダーゼG2も含まれ、この場合、ADEPTではペプチドリガンドが抗体の代わりとなる。

【0140】

一実施態様において、本発明の多量体結合複合体は、ジスルフィド結合またはプロテアーゼ感受性結合などの切断可能な結合を含む。理論に束縛されることなく、このような切断可能な部分は、腫瘍微小環境に到達するまで複合体を不活性化すると考えられる。この実施態様の利点は、標的への結合後に複合体のサイズが減少することである。さらなる実

50

施態様において、ジスルフィド結合に隣接する基を修飾して、ジスルフィド結合の阻害を制御し、これによって開裂の速度とそれに伴う結合剤の放出を制御する。

【0141】

公開された研究では、ジスルフィド結合のいずれかの側に立体障害を導入することによって、還元に対するジスルフィド結合の感受性を改変できる可能性が確立されている(Kellogg et al. (2011) Bioconjugate Chemistry, 22, 717)。立体障害の度合いが大きくなると、細胞内グルタチオンだけでなく細胞外(全身)還元剤による還元速度も低下し、その結果、細胞の内外の両方で毒素が放出される容易性が低下する。

【0142】

従って、循環におけるジスルフィドの安定性(毒素の望ましくない副作用を最小限にする)と細胞内環境における効率的な放出(治療効果を最大にする)の最適の選択は、ジスルフィド結合のいずれかの側における阻害の程度を注意深く選択することによって達成することができる。

【0143】

ジスルフィド結合の両側の障害は、標的実体(ここでは二環式ペプチドリガンド)に1つまたはそれ以上のメチル基を導入することによって修飾される。

【0144】

医薬組成物

本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義されるペプチドリガンド、多量体結合複合体または薬物コンジュゲートを、1つまたはそれ以上の薬学的に許容できる賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。

【0145】

一般に、本発明のペプチドリガンドは、薬理的に適切な賦形剤または担体とともに精製された形態で利用される。典型的には、これらの賦形剤または担体には、生理食塩水および/または緩衝化培地を含む、水性またはアルコール性/水性溶液、乳状液または懸濁液が含まれる。非経腸ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸化リンガーなどが挙げられる。適当な生理学的に許容できるアジュバントは、ポリペプチド複合体を懸濁状態に保つために必要な場合、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチンおよびアルギナートのような増粘剤から選択されてもよい。

【0146】

静脈内ビヒクルには、液体および栄養補充剤および電解質補充剤、例えば、リンガーデキストロースを基礎とするものが含まれる。防腐剤並びに他の添加物、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガスが存在してもよい(Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition)。

【0147】

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、あるいは他の薬剤と組み合わせて使用されてもよい。これらには、抗体、抗体断片、および様々な免疫療法薬、例えばシクロスポリン、メトトレキサート、アドリアマイシンまたはシスプラチナム、および免疫毒素が含まれ得る。さらに、本発明のペプチドリガンドと別々に、あるいは組み合わせ投与できる他の薬剤の例としては、サイトカイン、リンパカイン、他の造血因子、血栓溶解因子、抗血栓因子などがある。医薬組成物は、本発明のタンパク質リガンドと組み合わせた種々の細胞毒性剤または他の剤の「カクテル(cocktail)」を含むことができ、あるいは投与前にプールされるか否かにかかわらず、異なる標的リガンドを用いて選択されたポリペプチドなど、異なる特異性を有する本発明による選択されたポリペプチドの組み合わせも含むことができる。

【0148】

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であってもよい。療法のために、本発明のペプチドリガンドは、標準的な技術に従って任意の患者に投与することができる。投与は、非経腸、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮的、肺経路を介

10

20

30

40

50

するもの、また好適に、カテーテルを用いる直接注入によるものを含め、任意の適切な様式によるものであることができる。好ましくは、本発明による医薬組成物は静脈内投与される。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、禁忌および臨床医が考慮すべき他のパラメーターに依存する。

【0149】

本発明のペプチドリガンドは、保存のために凍結乾燥し、使用前に適当な担体中で再構成することができる。この技術は有効であり、当技術分野で公知の凍結乾燥および再構成技術を採用することができることが示されている。当業者であれば、凍結乾燥および再構成は様々な程度の活性損失を引き起こす可能性があり、それを補うためにレベルを上方に調整する必要がある可能性があることを理解するであろう。

10

【0150】

本発明のペプチドリガンドまたはそのカクテルを含む組成物は、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。特定の治療的適用において、選択される細胞の集団の少なくとも部分的な阻害、抑制、調節、殺傷、または他の何らかの測定可能なパラメーターを達成するのに十分な量は、「治療的に有効な用量」として定義される。この用量を達成するために必要な量は、疾患の重症度に依存するが、一般的には体重1kgあたり0.005~5.0mgの選択されたペプチドリガンドが使用され、0.05~2.0mg/kg/回の用量がより一般的に使用される。予防的適用のために、本発明の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、同様またはわずかに低い用量で投与されてもよい。

【0151】

本発明によるペプチドリガンドを含有する組成物は、哺乳動物における選択的標的細胞集団の変化、不活性化、殺傷または除去を補助するための、予防的および治療的設定において利用され得る。さらに、本明細書に記載のペプチドリガンドは、体外でまたはインビトロで選択的に用いて、異種細胞の集合体から標的細胞集団を死滅させ、枯渇させ、さもなければ効果的に除去することができる。哺乳動物からの血液は、選択されたペプチドリガンドと体外で結合させることができ、それにより、標準的な技術に従って、望ましくない細胞が殺されるか、または血液から除去されて哺乳動物に戻される。

20

【0152】

治療的使用

本発明の二環式ペプチドは、P-セレクチン結合剤として特異的な有用性を有する。本発明のさらなる態様によれば、P-セレクチン、E-セレクチンおよびL-セレクチンなどの細胞接着分子によって媒介される疾患または障害の予防、抑制または処置に使用するための、本明細書で定義されるペプチドリガンド、多量体結合複合体、薬物コンジュゲートまたは医薬組成物が提供される。

30

【0153】

P-セレクチンは活性化内皮細胞および血小板の表面上で発現する細胞接着分子である。活性化されていない内皮細胞および血小板において、P-セレクチンは顆粒に貯蔵される。P-セレクチンは炎症時の白血球の動員や血管傷害時の血小板の凝集に参与している。トロンピンによって血小板が活性化されると、 α -顆粒と濃顆粒が放出され、その内壁が細胞の外側に露出する「膜の反転(membrane flipping)」が起こる。血小板凝集は、血小板-フィブリンおよび血小板-血小板結合を介してP-セレクチンにより促進される。

40

【0154】

P-セレクチンはまた、E-セレクチンと同様に腫瘍転移に役割を持つことが示されている(Kohler et al., British Journal of Cancer 2010, 102:3)。活性化内皮細胞および血小板の表面におけるP-セレクチンの発現はまた、癌細胞の血流への浸潤を助ける。血管系での活性化血小板と腫瘍細胞との複合体の形成により、マクロファージによる腫瘍細胞の認識を妨げ、免疫系による認識から腫瘍細胞を遮蔽する。循環血小板の減少が癌転移を減少させることが示されている(Gasic GL, Cancer Metastasis Reviews 1984, 3:2)。さらに、関連する細胞接着分子であるE-セレクチンは骨髄内皮の表面に恒常的に発現していることが示されており、これは、腫瘍細胞が骨に優先的に転移する経路を

50

示している。

【0155】

心臓の炎症および線維化、冠動脈性心疾患、高血圧および心房細動などの心血管系疾患におけるP-セレクチンの役割も報告されている(Liu et al., *Molecular Medicine Reports* 2016, 13(6) and Blann et al., *European Heart Journal* 2003, 24(24))。例えば、P-セレクチンの発現の増加は活動性の動脈硬化プラークで証明されており、P-セレクチンを欠損した動物は動脈硬化プラークを形成する傾向が低下することが認められている。さらに、P-セレクチンアンタゴニストであるインクラクマブ(inclacumab)は、非ST上昇型(non-ST-segment elevation)心筋梗塞患者における経皮冠動脈介入後の心筋損傷を軽減し、血小板-白血球凝集を阻害した(Stahli et al., *Journal of the American Heart Association* 2016, 16:5(11) and Schmitt et al., *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2015, 65(6))。したがって、P-セレクチンのアンタゴニズムまたはブロックは、治療上有益であると考えられる。

【0156】

一実施態様において、P-セレクチンは、哺乳類P-セレクチンである。さらなる実施態様において、哺乳類P-セレクチンは、ヒトP-セレクチンである。

【0157】

P-セレクチンペプチドは、主に、P-セレクチンまたは関連する細胞接着分子(例えばE-セレクチンおよび/またはL-セレクチン)をアゴニスティックにブロックし、結果的に、内皮細胞および血小板の活性化に(しかし、それだけに限定されない)使用される。このようなアンタゴニズムは、血管閉塞性クライシスまたは鎌状赤血球症もしくは鎌状赤血球貧血に関連する他の疾患/障害の予防、抑制および/または処置に特に有用であることが理解される。

【0158】

P-セレクチンペプチドはまた、癌細胞または癌上に発現する糖タンパク質または糖脂質リガンドに結合するP-セレクチンまたは関連細胞接着分子(例えばE-セレクチンおよび/またはL-セレクチン)をアゴニスティックにブロックし、結果的に、前記癌細胞または癌の転移または腫瘍浸潤をブロックするのに使用することもできる。このような癌には、非小細胞肺癌(NSCLC)、三種陰性乳癌(TNBC)を含む乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、尿路上皮癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、頭頸部扁平上皮癌(SCCHN)、黒色腫、膵臓癌などの固形腫瘍、および他の進行性固形腫瘍を含む、早期または後期のヒト悪性腫瘍が含まれるが、これらに限定されるものではない。癌はまた、血液癌から選択されることもある。

【0159】

本明細書で使用される用語「固形腫瘍」とは、液体の塊をあまり含まない組織の異常成長として定義され、一方、非固形腫瘍は一般に、固体の塊を全く含まないか、または有意な固体の塊を含まない分散型癌である。固形腫瘍の例としては、癌腫、肉腫およびリンパ腫がある。血液癌(白血病)、例えば急性骨髄性白血病(AML)、急性リンパ球性(またはリンパ芽球性)白血病(ALL)は非固形腫瘍である。本明細書で定義されるP-セレクチンペプチドまたは複合体は、腫瘍細胞の転移をブロック、予防または減少させるために、前述の癌の適応症において単剤療法剤として使用することができる。癌における単剤療法剤としての使用に加えて、本明細書で定義されるP-セレクチンペプチド、ならびにその複合体およびコンジュゲートは、抗PD-1剤および抗CTLA4剤などの免疫療法剤と組み合わせ使用することができる。P-セレクチンペプチド、その複合体およびコンジュゲートのさらなる治療的適用としては、単剤療法、または放射線癌治療との組み合わせ療法、および癌ワクチンがあるが、これらに限定されない。P-セレクチンペプチドの単剤療法または組み合わせ療法としての非癌性治療的適用としては、鎌状赤血球症/貧血、例えば、血管閉塞性クライシスに関連する疾患および障害があるが、これらに限定されない。

【0160】

P-セレクチンペプチドは、P-セレクチンまたは関連する細胞接着分子(例えばE-セレク

チンおよび/またはL-セレクチン)によって媒介される細胞間接着を特徴とする状態の処置に有用であることが理解される。このような状態には、虚血後白血球介在性組織損傷(再灌流傷害)、例えば、心筋梗塞または移植に関連するもの;心筋梗塞;細菌感染またはウイルス感染;転移状態;炎症性障害、例えば関節炎;急性呼吸促迫症候群(ARDS);喘息;気腫;遅延型過敏反応;全身性エリテマトーデス(SLE);熱傷;自己免疫性甲状腺炎;実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE);多発性硬化症(MS);外傷に続発する多臓器損傷症候群;糖尿病;レイノー症候群;好中球性皮膚症(スイート症候群);炎症性腸疾患(IBD);グレーブス病;糸球体腎炎;歯肉炎;歯周炎;溶血性尿毒症症候群;潰瘍性大腸炎;クローン病;壊死性腸炎;顆粒球輸血関連症候群;およびサイトカイン誘導性毒性が含まれるが、これらに限定されない。P-セレクチンペプチドが有用であると考えられる状態または処置のさらなる例としては、臓器移植(移植前の臓器の準備や移植拒絶反応の軽減を含む);血液透析;および白血球除去などがある。

10

【0161】

従って、一実施態様において、本発明の二環式ペプチドは、血管閉塞性クライシスの処置において有用性を見出し、そして処置に使用され得る。さらなる実施態様において、二環式ペプチドは、転移の処置または予防に使用され得る。さらなる実施態様において、二環式ペプチドは、心臓炎症、線維症および動脈硬化プラークの処置または予防に使用され得る。

【0162】

内皮細胞上のP-セレクチンなどの細胞接着分子に結合する少なくとも1つのペプチドリガンドを含む、本明細書で定義される多量体結合複合体はまた、癌および非癌性疾患および障害、例えば、血管閉塞性クライシス、心臓炎症、線維症および動脈硬化プラークの処置にも有用であることが理解される。

20

【0163】

内皮細胞上のP-セレクチンなどの細胞接着分子に結合する少なくとも1つのペプチドリガンドを含む、本明細書で定義される多量体結合複合体はまた、COVID-19の処置にも有用であることが理解される。

【0164】

COVID-19は主に呼吸器疾患であるが、多臓器疾患とも考えられている。SARS-CoV-2ウイルスがアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)受容体を発現する臓器および組織(心臓、腎臓、肝臓、膵臓、消化管、脳、および内皮細胞を含む)を攻撃し、その後、炎症カスケードおよび血液凝固を引き起こすことが多くの証拠から明らかになっている。COVID-19は重度の血管合併症を引き起こすことがあり、その結果、内皮機能不全、サイトカインの過剰産生、および病的な細胞間相互作用を引き起こす。赤血球(RBC)は血液中の最も豊富な細胞成分であり、酸素の運搬、老廃物の除去、および人体全体への栄養素の運搬を担っている。先行研究では、SARS-CoV-2感染はまた、RBC膜を損傷し、ヘモグロビン(Hb)濃度を低下させ、赤血球(RBC)の形成を妨げ、このことから、重篤な貧血症および不可逆的な臓器損傷を引き起こすことが示唆されている。したがって、「COVID後症候群」のもっともらしい発症メカニズムの1つは、赤血球の異常と炎症性因子の蓄積の組み合わせであり、その結果、COVID患者のかなりの部分で観察される症状(酸素供給の不十分、凝固亢進、および血管合併症を引き起こし、慢性疲労、切除不耐性(excise intolerance)、関節痛、胸痛、脳霧を含む)の長期化に、少なくとも部分的には寄与する。P-セレクチンの調節不全はCOVID-19の病理の重要な因子であることから、炎症に起因するP-セレクチンが介在する血球細胞の内皮への接着を阻害することは、この疾患に罹患している何百万もの人々の有害な症状を緩和し、機能回復を促進し、長期的な健康を改善する有望な治療戦略となり得る。

30

40

【0165】

本明細書において「予防」という用語は、疾患の誘導前の保護性組成物の投与を含む。「抑制」とは、誘導事象の後の、疾患の臨床的出現前の組成物の投与を意味する。「処置」は、疾患の症状が顕在化した後の保護組成物の投与を含む。

50

【0166】

疾患からの保護または処置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のに使用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、本発明によって促進され、ヒトおよび動物の標的と交差反応できるポリペプチドリガンドの開発が可能となり、動物モデルの使用が可能になる。

【0167】

以下の実施例を参照して、本発明をさらに以下に説明する。

【実施例】

【0168】

材料および方法

単量体二環式ペプチドリガンドの調製(一般的な方法)

二環ペプチドは、標準的なFmoc(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)固相ペプチド合成を用い、手動カップリング(大規模用)またはBiotage Syroll自動ペプチド合成機(小規模用)を用いてRinkアミド樹脂上で合成した。樹脂からのTFAに基づく切断後、ペプチドをジエチルエーテルで沈殿させ、50:50のアセトニトリル/水に溶解した。次に、粗製のペプチド(約1mM濃度)を、重炭酸アンモニウム(100mM)を塩基として用いて、1.3等量の足場で環化した。環化の完了は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間法(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight、MALDI-TOF)またはLC-MSで判定した。環化反応が完了したら、N-アセチルスチニン(ペプチドに対して10等量)を用いて環化反応をクエンチし、溶液を凍結乾燥させた。残留物を適切な溶媒に溶解し、RP-HPLCにより精製した。十分な純度と正しい分子量のペプチド画分(MALDI-TOFおよびHPLCまたはLC-MSで確認)をプールし、凍結乾燥させた。濃度は、Trp/Tyr含量に基づく280nmでの消衰係数を用いたUV吸収により決定した。

【0169】

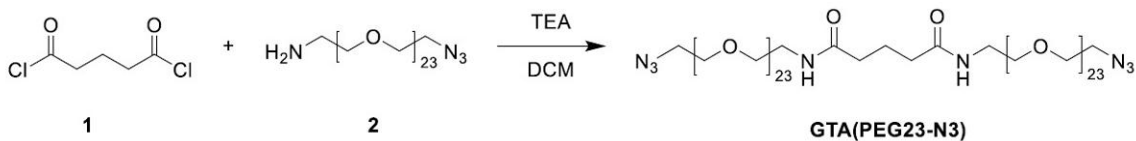
特に断りのない限り、すべてのアミノ酸はL-配置で使用した。

【0170】

二量体/タンデム結合複合体の調製(BCY5455で例示)

ヒンジGTA(PEG23-N3)の合成:

【化14】



【0171】

DCM(2mL)中の化合物1(10mg、59.17 μ mol、7.58 μ L、1eq)の溶液に、トリエチルアミン(17.96mg、177.51 μ mol、24.71 μ L、3eq)を添加した。次に、化合物2(132.0mg、120.08 μ mol、2.03eq.)を添加した。混合物を30 $^{\circ}$ Cで2hr攪拌した。LC-MSでは、化合物1が完全に消費され、所望のm/zを有する1つのメインピークが検出されたことが示された。反応混合物を減圧下で濃縮して溶媒を除去することで残留物を得た。残留物を分取HPLCにより精製した。GTA(PEG23-N3)(82mg、35.02 μ mol、59.19%収率、98%純度)を白色固体として得た。(MW: 2294.69。観察されたm/z: 1156.31 [M+H₃O+H]²⁺)。

【0172】

BCY5455の調製:

10

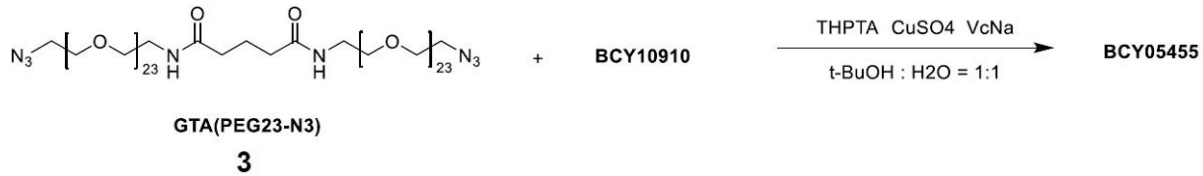
20

30

40

50

【化15】



【0173】

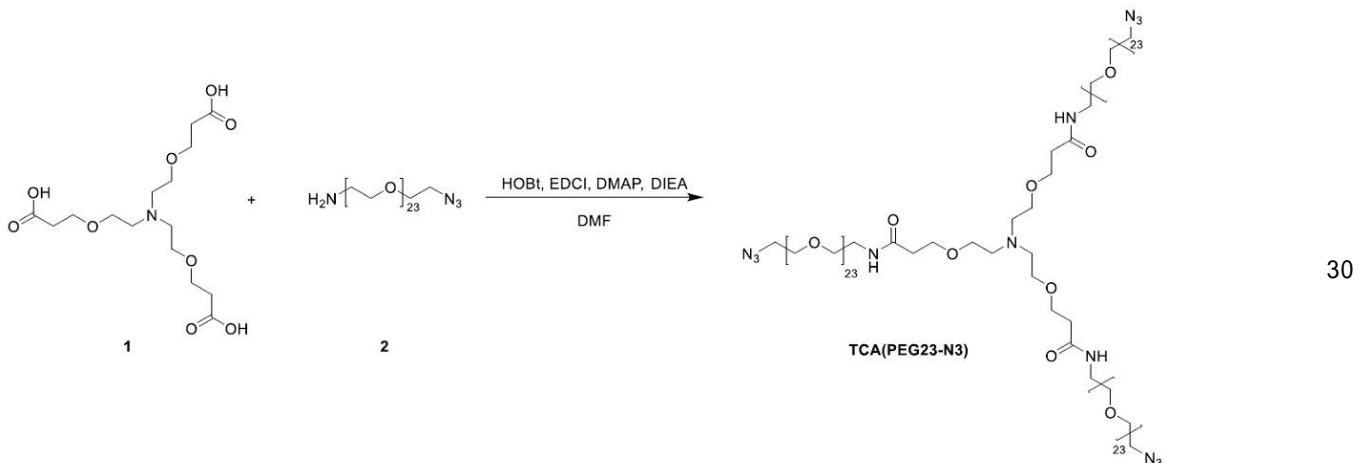
GTA(PEG23-N3)(10mg、4.36 μmol 、1eq.)、BCY10910(20.00mg、9.72 μmol 、2.23eq.)およびTHPTA(0.4M、10.89 μL 、1eq.)をt-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予備脱気、そしてN₂で3回パージ)に溶解したの溶液に、CuSO₄(0.4M、10.89 μL 、1eq.)およびVcNa(0.4M、21.79 μL 、2eq.)をN₂下で添加した。この溶液のpHを、0.2MのNH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O中)の滴下添加により8に調整し、溶液は淡黄色に変化した。反応混合物をN₂雰囲気下、40℃で12時間撹拌した。LC-MSでは、化合物3が完全に消費され、所望のm/zのメインピークが1つ検出されたことが示された。残留物を分取HPLCにより精製した。BCY5455(13.6mg、2.07 μmol 、47.56%収率、97.70%純度)を白色の固体として得た(MW: 6411.26 観察されたm/z: 1603.1 [M+4H]⁴⁺, 1282.4 [M+5H]⁵⁺, 1068.95 [M+6H]⁶⁺)。 10

【0174】

三量体結合複合体の調製(BCY12259で例示) 20

ヒンジTCA(PEG23-N3)の合成:

【化16】



【0175】

DMF(2mL)中の化合物1(32mg、79.63 μmol 、1.0eq、HCl)および化合物2(264.00mg、240.15 μmol 、3.02eq.)の溶液に、HOBt(35.84mg、265.24 μmol 、3.33eq.)、EDCI(51.20mg、267.08 μmol 、3.35eq.)、DMAP(29.19mg、238.90 μmol 、3.0eq.)およびDIPEA(61.75mg、477.81 μmol 、83.23 μL 、6.0eq.)を添加した。混合物を25~30℃で12hr撹拌した。LC-MSでは、化合物1が完全に消費され、所望のm/zの1つのメインピークが検出されたことが示された。反応混合物を減圧下で濃縮し、溶媒を除去することで残留物を得た。残留物を分取HPLCにより精製した。TCA(PEG23-N3)(214mg、53.36 μmol 、67.01%収率、90%純度)を淡黄色のオイルとして得た(MW: 3609.23 観察されたm/z: 1214 [M+2H₃O+H]³⁺)。 40

【0176】

BCY12259の調製:

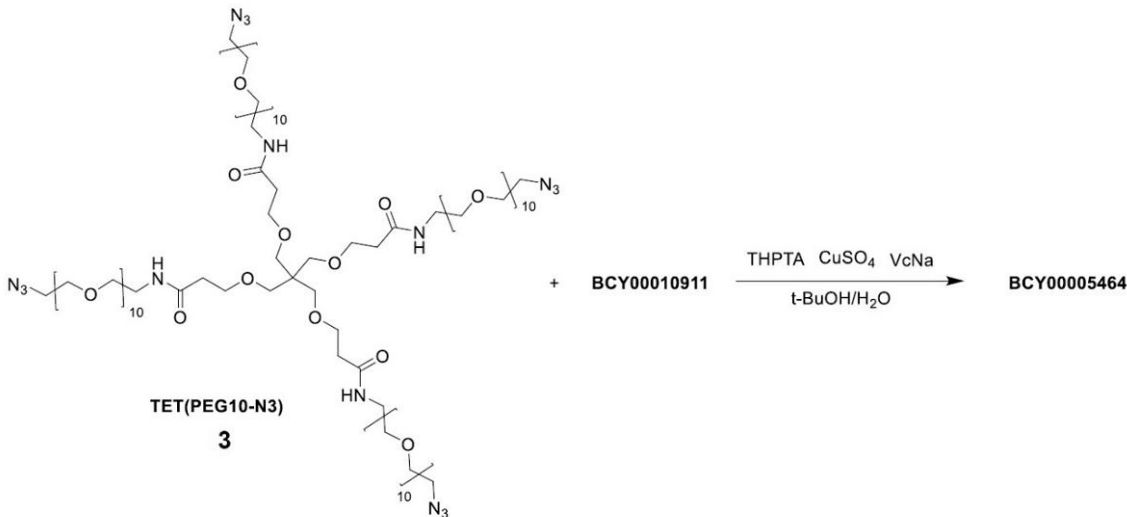
4.23eq.)、EDCI(117.5mg、612.64 μmol 、5.0eq.)およびHOBT(72.8mg、539.12 μmol 、4.08eq.)の混合物をDMF(2mL)に溶解し、次に、DIPEA(126.7mg、980.22 μmol 、170.74 μL 、8.0eq.)を添加し、溶液をよく混合した。得られた混合物を25℃で12hr撹拌した。LC-MSでは、所望のm/zの1つのメインピークが示された。反応混合物を減圧下で濃縮して溶媒を除去することで残留物を得た。残留物を分取HPLCにより精製した。TET(PEG10-N3)(147.8mg、55.79 μmol 、45.53%収率、92.81%純度)を白色の固体として得た。(MW: 2458.81. 観察されたm/z: 810.7 [M-28+3H]³⁺).

【0180】

BCY5464の調製:

10

【化19】



20

【0181】

t-BuOH/H₂O(1:1、2mL、予め脱気、そしてN₂でパージ)中のTET(PEG10-N3)(5mg、2.03 μmol 、1eq.)、BCY10911(19mg、8.81 μmol 、4.33eq.)およびTHPTA(0.4M、5.0 μL 、1eq.)の溶液を調製した。CuSO₄(0.4M、5.0 μL 、1eq.)およびVcNa(0.4M、10.0 μL 、2eq.)をN₂下で添加した。この溶液のpHを、0.2MのNH₄HCO₃(1:1 t-BuOH/H₂O中)の滴下添加により8に調整し、溶液は淡黄色に変化した。反応混合物をN₂雰囲気下、40℃で16hr撹拌した。LC-MSでは、化合物3が完全に消費され、所望のm/zの1つのメインピークが検出されたことが示された。粗製の反応物を一緒にし、分取HPLCにより精製した。BCY5464(12.6mg、92.6%純度)を白色の固体として得た(MW: 11088.49 観察されたm/z: 1233.6 [M+9H]⁹⁺, 1387.2 [M+8H]⁸⁺).

30

【0182】

一般に、本発明のすべての多量体結合複合体は、適切な二環式ペプチドリガンドを用いて、これらの方法に従って調製できることが理解される。

40

【0183】

分析データ

以下の本発明の多量体結合複合体を質量分析およびHPLCを用いて分析し、そのデータを以下の表4および5に示す。

【0184】

HPLCの設定は以下の通り:

メソッドA、BおよびE:

移動相: A: H₂O中0.1%TFA B: ACN中0.1%TFA

フロー: 1.0ml/min

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

50

装置 : Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)

勾配 :

【表 7】

メソッド	勾配の説明
A	25~55% B 20分で
B	20~50% B 20分で
E	30~60% B 20分で

10

【0185】

メソッドC :

移動相 : A : H₂O中0.1%TFA B : ACN中0.1%TFA

フロー : 0.4ml/min

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

装置 : Agilent UPLC 1290

カラム温度 : 30

勾配 :

【表 8】

時間(min)	% A	% B
0	75	25
10	45	55
10.01	10	90
12	10	90

20

【0186】

メソッドD :

移動相 : 0.1% TFA AcN/水

フロー : 1.00ml/min

カラム : KINETEXPSC18

装置 : Agilent LC2

勾配 : 15.5分で5~95%B

30

40

50

【表 9】

表4:本発明の単量体二環性ペプチドリガンドのHPLCおよびマスマスペクトロメトリーデータ

単量体ID	分子量	マスマスペクトロメトリー観察されたm/z	HPLC保持時間(min)	メソッド
BCY12027	1825.05	912.6 [M+2H] ²⁺	9.82	B
BCY11648	1814.03	907.58 [M+2H] ²⁺	8.42	B
BCY11279	2031.25	1016.64 [M+2H] ²⁺	6.30	D
BCY11281	2034.26	1018.03 [M+2H] ²⁺	6.20	D
BCY09717	1878.08	939.75 [M+2H] ²⁺	5.95	D
BCY10194	1978.21	989.4 [M+2H] ²⁺	10.08	B
BCY10910	2058.29	1029.14 [M+2H] ²⁺	14.03	B
BCY10911	2157.42	1079.65 [M+2H] ²⁺	10.31	A
BCY12025	2022.28	1011.16 [M+2H] ²⁺	9.58	B
BCY12026	2033.31	1016.64 [M+2H] ²⁺	10.91	B
BCY11890	2197.5	732.9 [M+3H] ³⁺ , 1099.4 [M+2H] ²⁺	9.47	A
BCY18041	2186.5	729.5 [M+3H] ³⁺ , 1093.9 [M+2H] ²⁺	11.10	B

10

20

【 0 1 8 7 】

30

40

50

【表 10】

表5:本発明の多量体結合複合体のHPLCおよびマスペクトロメトリーデータ

複合体ID	分子量	マスペクトロメトリー観察されたm/z	HPLC保持時間(min)	メソッド
BCY5454	5265.91	1754.7 [M+3H] ³⁺ , 1316.4 [M+4H] ⁴⁺ , 1053.6 [M+5H] ⁵⁺	12.32	A
BCY5455	6411.28	1603.1 [M+4H] ⁴⁺ , 1282.4 [M+5H] ⁵⁺ , 1068.95 [M+6H] ⁶⁺	13.06	A
BCY5456	5464.18	1822.4 [M+3H] ³⁺ , 1367.2 [M+4H] ⁴⁺ , 1093.5 [M+5H] ⁵⁺	5.89	C
BCY5457	6609.54	1322.3 [M+5H] ⁵⁺ , 1101.9 [M+6H] ⁶⁺ , 944.65 [M+7H] ⁷⁺	12.78	A
BCY12257	6339.26	1584.6 [M+4H] ⁴⁺ , 1267.7 [M+5H] ⁵⁺ , 1056.5 [M+6H] ⁶⁺ , 905.6 [M+7H] ⁷⁺	9.04	A
BCY12258	6361.31	1273.1 [M+5H] ⁵⁺ , 1063.7 [M+6H] ⁶⁺ , 909.5 [M+7H] ⁷⁺	13.43	B
BCY5458	8066.07	1345.0 [M+6H] ⁶⁺ , 1153.14 [M+7H] ⁷⁺	12.63	A
BCY5459	9784.12	1223.3 [M+8H] ⁸⁺ , 1087.6 [M+9H] ⁹⁺	13.32	A
BCY5460	8363.47	1674.2 [M+5H] ⁵⁺ , 1394.4 [M+6H] ⁶⁺	12.73	A
BCY5461	10081.52	1262.83 [M+8H] ⁸⁺ , 1124.36 [M+9H] ⁹⁺	13.25	A
BCY12259	9676.1	1382.2 [M+7H] ⁷⁺ , 1209.3 [M+8H] ⁸⁺ , 1075.1 [M+9H] ⁹⁺ , 967.3 [M+10H] ¹⁰⁺	9.03	A
BCY12260	9709.16	1386.5 [M+7H] ⁷⁺ , 1213.3 [M+8H] ⁸⁺ , 1078.4 [M+9H] ⁹⁺ , 970.9 [M+10H] ¹⁰⁺	10.03	A
BCY5462	10691.99	1188.41 [M+9H] ⁹⁺	14.14	A
BCY5463	12996.75	1855.2 [M+7H] ⁷⁺ , 1299.4 [M+10H] ¹⁰⁺	14.76	A
BCY5464	11088.51	1585.6 [M+7H] ⁷⁺	14.32	A
BCY5465	13379.35	1673.4 [M+8H] ⁸⁺	14.56	A
BCY12261	12838.69	1427.4 [M+9H] ⁹⁺ , 1286.6 [M+10H] ¹⁰⁺ , 1169.6 [M+11H] ¹¹⁺	9.91	A
BCY12262	12882.78	1611.3 [M+8H] ⁸⁺ , 1432.3 [M+9H] ⁹⁺ , 1290.6 [M+10H] ¹⁰⁺ , 1173.5 [M+11H] ¹¹⁺	10.95	A
BCY11903	13539	13557 (TOFデコンボリューションされた質量)	12.58	A
BCY19238	13495	13495 (TOFデコンボリューションされた質量)	11.14	A
BCY19242	10202	10202 (TOFデコンボリューションされた質量)	8.78	E
BCY19239	10169	10169 (TOFデコンボリューションされた質量)	13.73	B
BCY19243	6689.7	6689 (TOFデコンボリューションされた質量)	11.44	A
BCY19240	6667.6	6668 (TOFデコンボリューションされた質量)	13.63	B

10

20

30

40

【0188】

生物学的データ

1. SPR結合アッセイ

Biacore実験を行って、ヒトセレクチンタンパク質に結合する単量体ペプチドのka(M⁻¹s⁻¹)、kd(s⁻¹)、KD(nM)値を測定した。組換えビオチン化ヒトP-セレクチンタンパク質を使用した。結合の分析には、CM5センサーチップ(GE Healthcare)を搭載したBiacore 3000またはS200装置を使用した。センサーチップ表面の調製には、HBS-N(10mM HEPES、0.15MのNaCl、pH 7.4)をランニング緩衝液とし、25℃で標準的なアミン-カップリング化学を用いてストレプトアビジンをチップ上に固定化した。0.4Mの1

50

-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロライド(EDC)/0.1MのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を1:1の割合で10 μ l/minの流速で12分間注入して、カルボキシメチルデキストラン表面を活性化した。ストレプトアビジンを捕捉するために、タンパク質を10mMの酢酸ナトリウム(pH4.5)で0.2mg/mlに希釈し、活性化チップ表面に70 μ l注入して捕捉した。残存する活性化基を、1Mのエタノールアミン(pH8.5)を7分間注入してブロックした。ビオチン化タンパク質ストックをHBS-Nで1:100に希釈し、1000~1500RUのレベルまで5 μ l/分で1つのフローセルに捕捉した。緩衝液をPBS/0.05%ツイーン20に変更し、最終DMSO濃度0.5%のこの緩衝液でペプチドの希釈系列を調製した。分析物の最高濃度は、予測される親和性の相互作用によって200nMから50 μ Mまで変化した。すべての場合において、7つの2倍希釈液または5つの3倍希釈液で滴定を行った。SPR分析は25 $^{\circ}$ Cで、50~80 μ l/min流速、60秒の会合および適切な解離期間(100~900秒)で行った。データはDMSOを除いた体積効果を補正したものである。すべてのデータは、標準的な処理手順を使用して、ブランク注入と参照表面について二重参照し、データ処理と速度論的フィッティングは、Scrubberソフトウェア、バージョン2.0c(BioLogicソフトウェア)を用いて実行した。データは、必要に応じて物質移動効果を考慮した物質移動モデルを用いてフィッティングした。

10

【0189】

【表11】

表6:SPRによる親和性 K_D 値

ペプチド番号	K_D (nM)
BCY12027	5.36
BCY11648	128
BCY11279	690
BCY11281	2020
BCY9717	7600
BCY10194	9500
BCY5454	400
BCY5455	1250
BCY5456	500
BCY5457	969
BCY5458	400
BCY5459	169
BCY5460	239
BCY5461	230
BCY5462	88.0
BCY5463	53.0
BCY5464	37.3
BCY5465	140
BCY12257	11.6
BCY12258	0.409
BCY12259	0.233
BCY12260	0.109
BCY12261	0.019
BCY12262	0.017

20

30

40

【0190】

2.受容体リガンド阻害アッセイ

50

二環性試験試料、SelG1(Crizanlizumab)をアッセイ緩衝液(25mMのHEPES、121mMのNaCl、5.4mMのKCl、0.8mMのMgCl₂、1.8mMのCaCl₂、6mMのNaHCO₂、5.5mMのグルコース、1% BSA、pH7.4)中で0.5% DMSOを維持したまま連続希釈し、384ウェル透明な底プレート(clear bottom plate)(Corning, 3712)に最終容量6μLで移した。イメージング緩衝液(25mMのHEPES、121mMのNaCl、5.4mMのKCl、0.8mMのMgCl₂、1.8mMのCaCl₂、6mMのNaHCO₂、5.5mMのグルコース、pH7.4)中のP-セレクチン6μLを、最終濃度5nMになるように添加し、室温で15分インキュベートした。1μg/mLの遠赤色標識小麦胚芽アグルチニン(WGA、ThermoFisher W21404)および1μg/mLのAlexaFluor 488-ストレプトアビジン(Invitrogen S11223)と混合したHL-60細胞(ATCC、CCL-240)をプレートに添加し、光のない室温で2時間インキュベートした。染色および抗体結合は、ミラーボール型マイクロプレートサイトメーターの488nmおよび640nmのレーザーでマイクロプレートを同時にスキャンし、FL2のAF488をFL4のAF647-WGAにトリガーすることにより定量した。データは、4パラメーターのロジスティックフィットを使用してドットマティクス(Dotmatics)で分析し、IC₅₀値と応答率を生成した。阻害パーセントは、最高濃度での100-%応答を用いて計算した。選択されたペプチドをこのアッセイで試験し、その結果(IC₅₀および%阻害データ)を表7に示す。ここで、示すデータはn=3の幾何平均である。

10

【0191】

【表12】

表7:P-セレクチン:PSGL1相互作用に対するP-セレクチン結合二環の効果

20

BCY番号	IC ₅₀ (nM)	最高濃度での阻害(%)
SelG1	4.75	96
BCY9717	>10875	20
BCY11279	>3539	24
BCY11648	>117	37
BCY12027	>36.8	36
BCY12257	>78.4	54
BCY12258	>97.7	57
BCY12259	14.4	61
BCY12260	9.62	64
BCY12261	10.4	68
BCY12262	3.29	68

30

【0192】

3. BCY12262の細胞接着バイオアッセイ特徴づけ

背景

フロー接着アッセイ(図1)では、マイクロフルーイディクチャンネル(microfluidic channel)を、目的の特異的結合受容体(P-セレクチンなど)を含む内皮を模倣したタンパク質でコーティングする。次に、細胞および試験物の試料を生理学的に適切な流れ条件でチャンネルに流し、チャンネル表面に付着した細胞の数を定量する。P-セレクチンは、活性化内皮細胞の表面にある細胞接着分子である。白血球(WBC)は、全血中のP-セレクチンへの接着に実質的に寄与している。白血球を血液試料から単離し、濃度は500万/mLに正規化する。

40

【0193】

方法論

市販のウェルプレートマイクロ流体フロー接着システム、BioFlux 1000Z(Fluxion Bio, San Francisco, CA, USA)を利用した。1人の回復期COVID-19患者からの単離したWBC懸濁液(Hank's Balanced Salt Solution緩衝液中、500万個/ml)を、P-セ

50

レクチン(5 μg/ml)でコーティングしたマイクロ流体チャンネル(幅350 μm × 高さ70 μm)を通して、パルス性(1 ~ 67Hz)シアストレス(1dyne/cm²)を用いて灌流し、同じ流速の緩衝液で洗浄することで非付着細胞を除去した。画像は高解像度CCDカメラで取得し、Montageイメージングソフトウェア(Molecular Devices, Downingtown, PA, USA)で分析した。各試料について、標準観察領域内の接着細胞を定量化することにより、接着指数(AI)を設定した(細胞/mm²)。

【 0 1 9 4 】

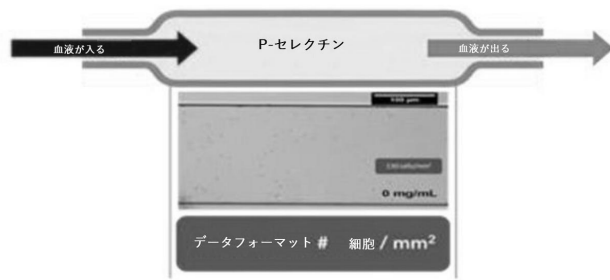
結果

この分析の結果が示される図2において、BCY12262では陽性対照抗体(クリザンリズマブ)と比べて白血球接着の有意な阻害が観察されたことを確認することができる。BCY12262は強い用量反応関係を示し、より高い用量(100nM ~ 10 μM)で約70パーセントの阻害に達した。P-セレクチンに結合しない陰性対照ペプチドBCY17800は、1 μMでのフロー接着アッセイにおいて阻害を示さなかった。

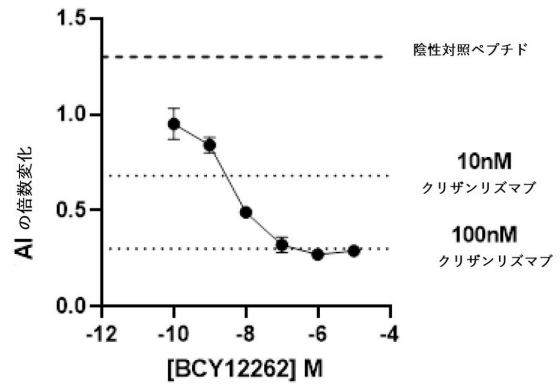
10

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 】



20

【 配 列 表 】

2024515306000001.app

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/050995

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K7/08 A61K47/64 A61P35/00		
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAYCIE DEYLE ET AL: "Phage Selection of Cyclic Peptides for Application in Research and Drug Development", ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH, vol. 50, no. 8, 18 July 2017 (2017-07-18), pages 1866-1874, XP055562233, US ISSN: 0001-4842, DOI: 10.1021/acs.accounts.7b00184 the whole document ----- -/--	1-28
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 25 August 2022		Date of mailing of the international search report 02/09/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cervigni, S

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2022/050995

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KALE SANGRAM S ET AL: "Cyclization of peptides with two chemical bridges affords large scaffold diversities", NATURE CHEMISTRY, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 10, no. 7, 30 April 2018 (2018-04-30), pages 715-723, XP036530421, ISSN: 1755-4330, DOI: 10.1038/S41557-018-0042-7 [retrieved on 2018-04-30] the whole document</p> <p>-----</p>	1-28
X	<p>WO 2018/197509 A1 (BICYCLERD LTD [GB]) 1 November 2018 (2018-11-01) the whole document</p> <p>-----</p>	1-28
X	<p>WO 2020/084305 A1 (BICYCLETX LTD [GB]) 30 April 2020 (2020-04-30) the whole document</p> <p>-----</p>	1-28
X	<p>WO 2018/197893 A1 (BICYCLETX LTD [GB]) 1 November 2018 (2018-11-01) the whole document</p> <p>-----</p>	1-28
X	<p>WO 2019/162682 A1 (BICYCLETX LTD [GB]) 29 August 2019 (2019-08-29) the whole document</p> <p>-----</p>	1-28
X	<p>WO 03/020753 A1 (YAMANOUCI EUROP BV [NL]; MOLENAAR THOMAS JACOBUS MARIA [NL] ET AL.) 13 March 2003 (2003-03-13) the whole document page 23; claim 1</p> <p>-----</p>	1-28
X	<p>MOLENAAR T J M ET AL: "Specific inhibition of P-selectin-mediated cell adhesion by phage display-derived peptide antagonists", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 100, no. 10, 15 November 2002 (2002-11-15), pages 3570-3577, XP002223456, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2002-02-0641 the whole document table 1</p> <p>-----</p>	1-28
X	<p>WO 2004/105783 A1 (YAMANOUCI PHARMA CO LTD [JP] ET AL.) 9 December 2004 (2004-12-09) the whole document</p> <p>-----</p>	1-28

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2022/050995

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

- 1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
- 2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
- 3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2022/050995

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 2018197509	A1	01-11-2018	EP 3615942 A1	04-03-2020			
			US 2020407709 A1	31-12-2020			
			WO 2018197509 A1	01-11-2018			
WO 2020084305	A1	30-04-2020	CN 112955459 A	11-06-2021			
			EP 3870597 A1	01-09-2021			
			JP 2022512779 A	07-02-2022			
			US 2020131228 A1	30-04-2020			
			US 2021147484 A1	20-05-2021			
			WO 2020084305 A1	30-04-2020			
WO 2018197893	A1	01-11-2018	EP 3615550 A1	04-03-2020			
			US 2018311300 A1	01-11-2018			
			US 2021046145 A1	18-02-2021			
			WO 2018197893 A1	01-11-2018			
WO 2019162682	A1	29-08-2019	AU 2019224659 A1	15-10-2020			
			BR 112020014576 A2	08-12-2020			
			CA 3091775 A1	29-08-2019			
			CN 111902429 A	06-11-2020			
			EP 3755725 A1	30-12-2020			
			IL 276803 A	29-10-2020			
			JP 2021514953 A	17-06-2021			
			KR 20200128518 A	13-11-2020			
			SG 11202007678Q A	29-09-2020			
			US 2019263866 A1	29-08-2019			
			US 2021101933 A1	08-04-2021			
			WO 2019162682 A1	29-08-2019			
			WO 03020753	A1	13-03-2003	AT 446311 T	15-11-2009
						BR 0212219 A	21-09-2004
CA 2459230 A1	13-03-2003						
CN 1549824 A	24-11-2004						
EP 1288222 A1	05-03-2003						
EP 1423413 A1	02-06-2004						
ES 2337663 T3	28-04-2010						
HR P20040127 A2	30-06-2004						
HU 0401728 A2	29-11-2004						
JP 4227520 B2	18-02-2009						
JP 2005501544 A	20-01-2005						
MX PA04002055 A	08-07-2004						
US 2005004035 A1	06-01-2005						
WO 03020753 A1	13-03-2003						
ZA 200400956 B	18-04-2005						
WO 2004105783	A1	09-12-2004	AT 341337 T	15-10-2006			
			CA 2527438 A1	09-12-2004			
			DE 602004002699 T2	16-08-2007			
			EP 1481683 A1	01-12-2004			
			EP 1638588 A1	29-03-2006			
			ES 2273260 T3	01-05-2007			
			JP 4771291 B2	14-09-2011			
			JP 2007500200 A	11-01-2007			
			US 2007185348 A1	09-08-2007			
			WO 2004105783 A1	09-12-2004			

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 31/14 (2006.01) A 6 1 P 31/14
 A 6 1 K 38/12 (2006.01) A 6 1 K 38/12

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,J
 P,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,N
 A,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,
 TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

タ・パーク、ポートウェイ・ビルディング、ブックス・エイ・アンド・ピー、パイスクルテクス
 ・リミテッド内

(72)発明者

マッド, ジェマ

英国シービー21・6ジーエス、ケンブリッジ、グレート・アピントン、グランタ・パーク、ポー
 トウェイ・ビルディング、ブックス・エイ・アンド・ピー、パイスクルテクス・リミテッド内

(72)発明者

スカイナー, マイケル

英国シービー21・6ジーエス、ケンブリッジ、グレート・アピントン、グランタ・パーク、ポー
 トウェイ・ビルディング、ブックス・エイ・アンド・ピー、パイスクルテクス・リミテッド内

(72)発明者

ワッチャム, ソフィー

英国シービー21・6ジーエス、ケンブリッジ、グレート・アピントン、グランタ・パーク、ポー
 トウェイ・ビルディング、ブックス・エイ・アンド・ピー、パイスクルテクス・リミテッド内

F ターム (参考)

4C084 AA02 BA01 BA18 BA24 NA14 ZA361 ZA551 ZB261 ZB331
 4H045 AA10 AA30 BA16 BA60 BA62 EA20