

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-532496

(P2020-532496A)

(43) 公表日 令和2年11月12日 (2020. 11. 12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 7/06 (2006. 01)</b>	C O 7 K 7/06 Z N A	4 C O 7 6
<b>A 6 1 P 35/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 35/02 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 35/02	4 C O 8 5
<b>A 6 1 P 19/02 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 19/02	4 C O 8 6
<b>A 6 1 P 29/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 29/00 1 O 1	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-504380 (P2020-504380)	(71) 出願人	520028911
(86) (22) 出願日	平成30年2月17日 (2018. 2. 17)		メインライン バイオサイエンス
(85) 翻訳文提出日	令和2年1月23日 (2020. 1. 23)		アメリカ, ペンシルベニア州 1 9 3 5 5
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/018530		, モルバーン, スイート 1 0 0, 5 グ
(87) 国際公開番号	W02019/050564		レート バレー パークウェイ
(87) 国際公開日	平成31年3月14日 (2019. 3. 14)	(74) 代理人	100088904
(31) 優先権主張番号	62/554, 354		弁理士 庄司 隆
(32) 優先日	平成29年9月5日 (2017. 9. 5)	(74) 代理人	100124453
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 資延 由利子
		(74) 代理人	100135208
			弁理士 大杉 卓也
		(74) 代理人	100163544
			弁理士 平田 緑

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高親和性 C X C R 4 選択的結合抱合体およびその使用方法

## (57) 【要約】

本発明は、標的化された薬物送達、患者のイメージング、または CXCR4 の過剰発現および/または上方調節に関連すると考えられる臨床状態についての被験体の診断のために使用され得る化合物を提供する。特に、本発明は、次の式 (I) の高親和性 CXCR4 選択的結合リガンドペプチド抱合体 (PC) またはその薬学的に許容される塩、ならびにそれらの使用方法および製造方法を提供する：



I

本発明の高親和性 CXCR4 選択的結合リガンドペプチド抱合体 (PC) は、患者の診断、治療またはイメージングに有用である。式 (I) の化合物において、n は 1 ~ (P 中のアミノ酸残基の総数および P のアミノ酸残基中の側鎖官能基の総数) の合計の整数であり；各 A は独立して、診断剤、治療剤、またはイメージング剤であり；L はリンカーまたは不存在であり；および P は高親和性 CXCR4 選択的結合ペプチジルリガンドである。特に、本発明は、癌、HIV 感染、および免疫障害などの CXCR4 の過剰発現および/または上方調節が関係する疾患について、標的化された薬物送達または患者のイメージングまたは患者の診断を提供する。式 (I) のペプチド抱合体を含む組成物およびキット、ならびに式 (I) のペプチド抱合体の使用方法および製造方法は、本明細書中に開示される。

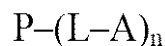
【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次の式 (I) の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体 (PC) またはその薬学的に許容される塩：

## 【化 1】



## I

式中、

nは1～約5の整数または (P中の側鎖官能基の総数) の合計であり

Aは1以上の診断剤、治療剤、またはイメージング剤であり；

Lは二官能性リンカーまたは不存在であり；および

Pは高親和性CXCR4選択的結合ペプチジルリガンドである。

10

## 【請求項 2】

Aは前記ペプチドのN末端もしくはC末端、または前記ペプチドのアミノ酸残基の側鎖上に存在する官能基、またはそれらの位置のいずれか1の組み合わせに結合されている、請求項1に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

## 【請求項 3】

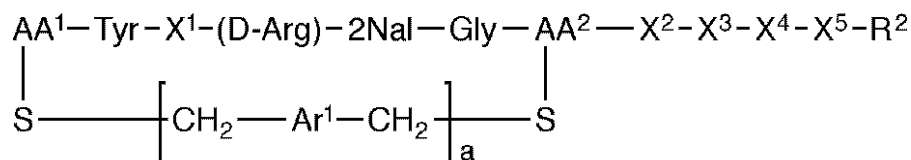
前記高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体は複数のAを含む、請求項1に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

20

## 【請求項 4】

Pは次の式 (II) の高親和性CXCR4結合ペプチジルである、請求項1に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体：

## 【化 2】



(SEQ ID NO:1)

30

## II

配列番号 1

式中、

aは0または1であり；

AA<sup>1</sup>はそれに結合されているイオウ原子と共に、3-メルカプトプロピオン酸、任意に置換されたシステイン、または任意に置換されたホモシステインであり；

AA<sup>2</sup>はそれに結合されているイオウ原子と共に、システインまたはホモシステインであり；

Ar<sup>1</sup>は任意に置換されたアリールであり；

40

X<sup>1</sup>はArg、Dap、Dab、Orn、Lys、Dap (iPr)、Dab (iPr)、Orn (iPr)、またはLys (iPr) であり；

X<sup>2</sup>はArg、Dap、Dab、Orn、Lys、Dap (iPr)、Dab (iPr)、Orn (iPr)、Lys (iPr)、D-Arg、D-Dap、D-Dab、D-Orn、D-Lys、D-Dap (iPr)、D-Dab (iPr)、D-Orn (iPr)、D-Lys (iPr)、または不存在であり；

X<sup>3</sup>はLys、Glyまたは不存在であり；

X<sup>4</sup>はLys、Phe、2Nal、1Nal、それらのD異性体、Gly、または不存在であり；

X<sup>5</sup>はLys、Glyまたは不存在であり；および

R<sup>2</sup>は-OR<sup>4</sup>または-NHR<sup>5</sup>であり、ここでR<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>はH、アルキル、任意に置換されたアリールまたは任意に置換されたアラルキルである。

50

## 【請求項 5】

Aはイメージング剤である、請求項1に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

## 【請求項 6】

前記イメージング剤は前記リンカーに結合した陽電子放出核種であり、および前記陽電子放出核種は、 $^{34}\text{Cl}$ 、 $^{45}\text{Ti}$ 、 $^{51}\text{Mn}$ 、 $^{61}\text{Cu}$ 、 $^{63}\text{Zn}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、および $^{18}\text{F}$ からなる群から選択される、請求項5に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

## 【請求項 7】

前記イメージング剤はキレート基および前記キレート基に配位する放射性金属同位体を含み、および前記放射性金属同位体はテクネチウム、レニウム、ガリウム、ガドリニウム、インジウム、銅およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項5に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

10

## 【請求項 8】

前記イメージング剤は蛍光色素である、請求項5に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

## 【請求項 9】

前記蛍光色素はAlexaFluor色素、Oregon Green色素、フルオレセイン、BODIPY(ホウ素-ジピロメテン)色素、シアニン色素、ローダミン色素、DyLight色素、およびTexas Redからなる群より選択される、請求項8に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

20

## 【請求項 10】

Aは診断剤である、請求項1に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

## 【請求項 11】

前記診断剤はイメージング剤、同位体剤、または放射性薬剤である、請求項10に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

## 【請求項 12】

前記リンカーはインビボでAを放出することができる官能基を含む、請求項1に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

30

## 【請求項 13】

Aは治療剤である、請求項1に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

## 【請求項 14】

前記治療剤はブレオマイシン、カリケアマイシン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキソルビシン、イリノテカン、メルタンシン、モノメチルオーリスチンE、パクリタキセル、SN-38、テシリン、トポテカン、チューブリシン、ピンカアルカロイド、およびそれらの類似体もしくは誘導体、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項13に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

40

## 【請求項 15】

前記高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体は以下である、請求項1に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体：

シクロ [ Phe-Tyr-Lys ( iPr ) - ( D-Arg ) -2NaI-Gly- ( D-Glu ) ] -Lys ( iPr ) - ( mini-PE G6 ) -Cys ( S-パクリタキセル ) -Gly-NH<sub>2</sub> ( 配列番号3 )、ここで環状構造はD-Gluの側鎖に結合したPheの -アミノ間に形成され；

R<sup>a</sup>-シクロ [ Cys-Tyr-Lys ( iPr ) - ( D-Arg ) -2NaI-Gly-Cys ] -Lys ( iPr ) -R<sup>b</sup> ( 配列番号4 )；

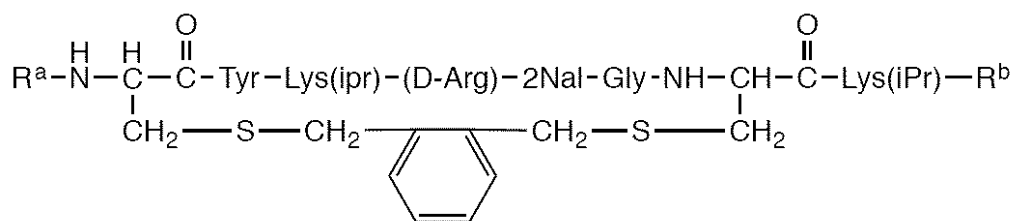
R<sup>a</sup>-シクロ [ hCys-Tyr-Lys ( iPr ) - ( D-Arg ) -2NaI-Gly-Cys ] -Lys ( iPr ) -R<sup>b</sup> ( 配列番号:5 )；

R<sup>a</sup>-シクロ [ Cys-Tyr-Lys ( iPr ) - ( D-Arg ) -2NaI-Gly-hCys ] -Lys ( iPr ) -R<sup>b</sup> ( 配列番号:6 )；

50

号6) ; または

【化3】



(SEQ ID NO:7)

配列番号7

10

、

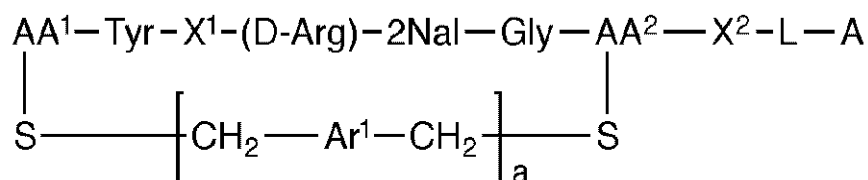
ここでR<sup>a</sup>またはR<sup>b</sup>の少なくとも1つがS-パクリタキセルを含む場合には、

R<sup>a</sup>はアセチル-、アセチル-Cys (S-パクリタキセル)-、またはアセチル-Cys (S-パクリタキセル)-(mini-PEG6)-であり；およびR<sup>b</sup>はグリシルアミド、グリシル-Cys (S-パクリタキセル)-アミド、または(mini-PEG6)-Cys (S-パクリタキセル)-アミドである。

【請求項16】

次の式(III)の請求項1に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体またはその薬学的に許容される塩：

【化4】



III

(SEQ ID NO:2)

配列番号2

20

式中：

aは0または1であり；

AA<sup>1</sup>はそれに結合されているイオウ原子と共に、3-メルカプトプロピオン酸、任意に置換されたシステイン、または任意に置換されたホモシステインであり、ここで、Aは、任意に前記システインまたはホモシステインの - アミノ基に結合され；

AA<sup>2</sup>はそれに結合されているイオウ原子と共に、システインまたはホモシステインであり；

Ar<sup>1</sup>は任意に置換されたアリールであり；

X<sup>1</sup>はArg、Dap、Dab、Orn、Lys、Dap(iPr)、Dab(iPr)、Orn(iPr)、またはLys(iPr)であり；

X<sup>2</sup>はArg、Dap、Dab、Orn、Lys、Dap(iPr)、Dab(iPr)、Orn(iPr)、Lys(iPr)、D-Arg、D-Dap、D-Dab、D-Orn、D-Lys、D-Dap(iPr)、D-Dab(iPr)、D-Orn(iPr)、D-Lys(iPr)、または不存在であり；

Lは任意のリンカーであり；および

Aは請求項1に定義されているものである。

40

【請求項17】

aは0である、請求項16に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

【請求項18】

aは1である、請求項16に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

【請求項19】

AA<sup>1</sup>はそれに結合されているイオウ原子と共に、3-メルカプトプロピオン酸である、請求項16に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

【請求項20】

AA<sup>1</sup>はそれに結合されているイオウ原子と共に、システインである、請求項16に記載の

50

高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

【請求項 2 1】

AA<sup>1</sup>はそれに結合されているイオウ原子と共に、ホモシステインである、請求項16に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

【請求項 2 2】

AA<sup>2</sup>はそれに結合されているイオウ原子と共に、システインである、請求項16に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

【請求項 2 3】

AA<sup>2</sup>はそれに結合されているイオウ原子と共に、ホモシステインである、請求項16に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

10

【請求項 2 4】

Aはイメージング剤である、請求項16に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

【請求項 2 5】

Aは治療剤である、請求項16に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

【請求項 2 6】

前記治療剤はブレオマイシン、カリケアマイシン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキソルビシン、イリノテカン、メルタンシン、モノメチルオーリスタチンE、バクリタキセル、SN - 38、テシリン、トポテカン、チューブリシン、ピンカアルカロイド、およびそれらの類似体もしくは誘導体、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項25に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

20

【請求項 2 7】

Aは診断剤である、請求項16に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

【請求項 2 8】

請求項27に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体を含む診断キット。

【請求項 2 9】

請求項1～27のいずれか1項に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体と、薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤またはそれらの組み合わせとを含む組成物。

30

【請求項 3 0】

画像化に有効な量の請求項5に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体を患者に投与すること、および撮像装置を使用して前記患者中の癌細胞を画像化することを含む、患者中の癌細胞のイメージング方法。

【請求項 3 1】

患者中の癌の治療方法であって、前記方法は、癌患者に治療有効量の請求項16の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体を投与することを含む、方法。

【請求項 3 2】

式(1)のAは診断剤またはイメージング剤である、請求項1に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体(PC)を含む診断キットまたはイメージングキット。

40

【請求項 3 3】

関節リウマチ、肺線維症、HIV感染、または癌に罹患している患者の治療方法であって、前記方法は治療有効量の請求項16に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体をその治療を必要とする患者に投与することを含み、ここで前記癌は、乳癌、膵臓癌、黒色腫、前立腺癌、腎臓癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、肺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、多形骨髄腫、多形神経膠芽腫、および慢性リンパ球性白血病からなる群より選択される、方法。

【請求項 3 4】

50

前記治療剤はHIVプロテアーゼ阻害剤、HIV融合阻害剤、HIV逆転写酵素阻害剤、HIVインテグラーゼ阻害剤、HIV侵入阻害剤、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項13に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

【請求項35】

前記治療剤はHIV融合阻害剤エンフビルチドである、請求項34に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

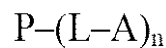
本出願は2017年9月5日に出願された米国仮出願第62/554,354号の優先権の利益を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

[発明の分野]

本発明は、次の式(1)の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体(「PC」)またはその薬学的に許容される塩、ならびにそれらの使用方法および製造方法に関する：

【化1】



I

特に、本発明の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体は、患者の診断、治療またはイメージングに有用である。式(1)の化合物において、各Aは独立して、診断剤、治療剤、またはイメージング剤であり、Lはリンカーまたは不存在であり、およびPは高親和性CXCR4選択的結合ペプチジルリガンドである。特に、本発明は、癌、HIV感染、および免疫障害などのCXCR4の過剰発現および/または上方調節が関係する疾患について、標的化された薬物送達または患者のイメージングまたは患者の診断に関する。このような用途のための組成物、キットおよび方法が本明細書に開示される。

【0003】

[発明の背景]

CXCL12(間質細胞由来因子-1(stromal cell-derived factor-1)またはSDF-1とも称される)およびCXCR4、ケモカインおよびケモカイン受容体対が造血、多段階の腫瘍形成、および胚発生において重要な役割を果たす研究が示されている(Broxmeyer, H.E. et al., Int. J. Hematol. 2001, 74, 9-17; Horuk, R., Nat. Rev. Drug Discov. 2009, 8, 23-33)。例えば、CXCL12によるCXCR4の活性化は、胚発生の間の炎症および前駆細胞移動に応答して、免疫系における白血球走化性に向かうことが示されている。CXCL12によるCXCR4の活性化は、乳癌転移および記憶T細胞移動に関与するシグナル伝達経路を介することも示されている(Orimo, A., et al., Cell 2005, 121, 335-348)。

【0004】

フシンまたはCD184(分化クラスター184)としても知られるGタンパク質共役受容体であるCXCR4は、多用なヒト癌において構成的発現または過剰発現され、局所腫瘍細胞増殖、生存および血管新生を促進する(Huang, E.H., et al., J. Surg. Res. 2009, 155, 231-236)。CXCR4は宿主細胞のHIV侵入および感染のための共受容体であり、潜在的なHIV治療として評価されていることも報告されている(Tamamura, H., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998, 253, 877-882; Oberlin, E. et al., Nature, 1996, 382, 833-835)。

【0005】

CXCR4が多数のヒト癌において過剰発現される報告が確認されている。CXCR4拮抗作用は、腫瘍-間質相互作用を攪乱し、癌細胞を細胞傷害性薬物に感作し、腫瘍増殖および転移負荷(metastatic burden)を減少させることが示されている。したがって、CXCR4は、

癌治療の潜在的な治療介入のためだけでなく、疾患進行の非侵襲的モニタリング、治療ガイドランス、および他の診断目的のための標的である(Chatterjee, S. et al., Adv Cancer Res.2014; 124:31-82)。CXCR4との結合および相互作用は、標的化された薬物送達の潜在的な方法として示唆されている(Wang, Y. et al., Curr Pharmacol Rep (2016) 2:1-10)。

#### 【0006】

したがって、CXCR4に選択的に結合することができる部分を有する化合物(すなわち、CXCR4選択的結合抱合体)は、CXCR4の活性化または過剰発現に関連する広範な臨床状態の治療、患者の診断、および医用イメージングを含むが、これらに限定されない、広範な用途を有し得ると考えられる。

10

#### 【0007】

したがって、CXCR4に選択的に結合することができる抱合体が必要とされている。

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

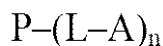
本発明の第1の態様は、高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体(「PC」)を提供する。いくつかの実施形態において、高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体は、活性成分に(任意にリンカーを介して)結合(linked)または結合(attached)されているCXCR4に選択的に結合(binding)するための高親和性を有するペプチジル部分を含む。活性成分は、診断剤、治療剤、またはイメージング剤であり得る。このようにして、ペプチジル部分はCXCR4受容体に選択的に結合し、活性成分を送達する。

20

#### 【0009】

1つの特定の実施形態において、高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体は、次の式(1)の化合物またはその薬学的に許容される塩である：

#### 【化2】



### I

式中、nは1から側鎖官能基を有するP内のアミノ酸残基の総数までの整数であり；Pは高親和性CXCR4選択的結合ペプチド部分であり；各Lは独立して、任意のリンカーであり(すなわち、それは不存在またはポリエチレングリコール部分などのリンカーまたは当業者に知られている他のリンカーであり得る)；および各Aは独立して、診断剤、治療剤、またはイメージング剤などの活性成分である。当業者には容易に明らかであるが、Lが存在の場合、Aは、例えばアミド結合またはエステル結合などの化学結合を介して、Pに直接結合(attached)されていることに留意されたい。1つの特定の実施形態において、式(1)の化合物は、CXCR4の過剰発現または上方調節に関連する臨床状態の診断または治療において使用され、すなわち、Aは診断剤または薬剤である。典型的には、式(1)の化合物は、(1)CXCR4に対して高親和性を有するペプチジルリガンド(すなわち、ペプチド部分)、(2)任意にリンカー、および(3)活性成分、例えば診断剤、治療剤(例えば薬剤)、またはイメージング剤(例えば放射性部分、蛍光部分など)を含む。

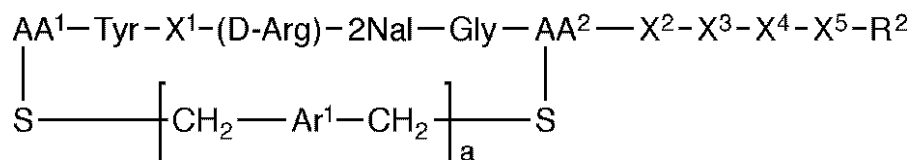
30

40

#### 【0010】

1つの特定の実施形態において、部分P(すなわち、高親和性CXCR4選択的結合ペプチド部分)は、次の式(II)で表される：

## 【化 3】



(SEQ ID NO:1)

## II

配列番号 1

式中、

10

aは0または1であり；

AA<sup>1</sup>はそれに結合（attached）されているイオウ原子と共に、3 - メルカプトプロピオン酸、任意に置換されたシステイン、または任意に置換されたホモシステインであり；

AA<sup>2</sup>はそれに結合（attached）されているイオウ原子と共に、システインまたはホモシステインであり；

Ar<sup>1</sup>は任意に置換されたアリールであり；

X<sup>1</sup>はArg、Dap、Dab、Orn、Lys、Dap（iPr）、Dab（iPr）、Orn（iPr）、またはLys（iPr）であり；

X<sup>2</sup>はArg、Dap、Dab、Orn、Lys、Dap（iPr）、Dab（iPr）、Orn（iPr）、Lys（iPr）、D-Arg、D-Dap、D-Dab、D-Orn、D-Lys、D-Dap（iPr）、D-Dab（iPr）、D-Orn（iPr）、D-Lys（iPr）、または不存在であり；

20

X<sup>3</sup>はLys、Glyまたは不存在であり；X<sup>4</sup>はLys、Phe、2Nal、1Nal、それらのD異性体、Gly、または不存在であり；X<sup>5</sup>はLys、Glyまたは不存在であり；および

R<sup>2</sup>は-OR<sup>4</sup>または-NHR<sup>5</sup>であり、ここでR<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>はH、アルキル、任意に置換されたアリールまたは任意に置換されたアラルキルである。

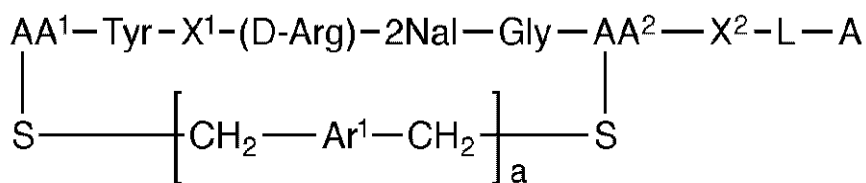
当然のことながら、式（I）の任意のリンカーおよび部分A（すなわち、-L-A部分）は、それらの側鎖に存在する官能基を介して任意のアミノ酸に結合（attached）され得る。

30

## 【0 0 1 1】

さらに他の実施形態において、本発明の化合物は次の式（III）で表される化合物またはその薬学的に許容される塩である；

## 【化 4】



(SEQ ID NO:2)

## III

配列番号 2

40

式中、aは0または1であり；

AA<sup>1</sup>はそれに結合（attached）されているイオウ原子と共に、3 - メルカプトプロピオン酸、任意に置換されたシステイン、または任意に置換されたホモシステインであり；

AA<sup>2</sup>はそれに結合（attached）されているイオウ原子と共に、システインまたはホモシステインであり；

Ar<sup>1</sup>は任意に置換されたアリールであり；

X<sup>1</sup>はArg、Dap、Dab、Orn、Lys、Dap（iPr）、Dab（iPr）、Orn（iPr）、またはLys（iPr）であり；

X<sup>2</sup>はArg、Dap、Dab、Orn、Lys、Dap（iPr）、Dab（iPr）、Orn（iPr）、Lys（iPr）、D-Arg、D-Dap、D-Dab、D-Orn、D-Lys、D-Dap（iPr）、D-Dab（iPr）、D-Orn（iPr）、D-Lys（iPr）、または不存在であり；

50



s、または不存在であり；

LおよびAは、本明細書で定義されている。

【0012】

本発明の別の態様は、本明細書中に開示される高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体、例えばAが診断剤である式(1)の化合物を含む診断キットを提供する。

【0013】

本発明の更に別の態様は、(i)本明細書中に開示される高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体、および(ii)薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、またはそれらの組み合わせを含む組成物を提供する。

【0014】

本発明のまた更に別の態様は、患者における癌細胞のイメージング方法を提供する。このような方法は一般に、画像化に有効な量の本発明の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体、例えば、Aがイメージング剤である式(1)の化合物を患者に投与する工程；および撮像装置を使用して前記患者中の癌細胞を画像化する工程を含む。

【0015】

本発明の更に他の態様は、式中のAが癌の治療剤（すなわち、癌または腫瘍学的薬剤）である式(1)の化合物を含む治療有効量の医薬組成物を投与することによって、患者中の癌の治療方法を提供する。

【0016】

当然のことながら、式(1)の化合物のAが診断剤またはイメージング剤である場合、本発明の化合物は、それぞれ、診断キットまたはイメージングキットにおいて使用され得る。

【0017】

本発明の1つの特定の実施形態において、式(1)の化合物は、関節リウマチ、肺線維症、HIV感染、または癌に罹患している患者の治療において使用される。当該方法は、治療有効量の式(1)の化合物（式中、Aはそれぞれ関節リウマチ、肺線維症、HIV感染、または癌を治療するための治療剤である）を、このような治療を必要とする患者に投与する工程を含む。式(1)の化合物で治療される典型的な癌には、乳癌、膵臓癌、黒色腫、前立腺癌、腎臓癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、肺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、多発性骨髄腫、多形神経膠芽腫、および慢性リンパ球性白血病が含まれるが、これらに限定されない。

【0018】

本発明の別の態様は、CXCR4の過剰発現および/または上方調節に関連する臨床状態のための標的化された薬物送達方法を提供する。例示的な臨床状態には、関節リウマチ、肺線維症、HIV感染、および癌が含まれるが、これらに限定されない。癌の特定の例は、乳癌、膵臓癌、黒色腫、前立腺癌、腎臓癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、肺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、多発性骨髄腫、多形神経膠芽腫、および慢性リンパ球性白血病を含む。

【0019】

本発明の別の態様は、CXCR4の過剰発現および/または上方調節に関連する臨床状態についての疾患診断およびモニタリング方法を提供する。例示的な臨床状態は、関節リウマチ、肺線維症、HIV感染、および癌を含むが、これらに限定されない。特定の癌の例は、乳癌、膵臓癌、黒色腫、前立腺癌、腎臓癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、肺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、多発性骨髄腫、多形神経膠芽腫、および慢性リンパ球性白血病を含む。

【0020】

本発明の別の態様は、CXCR4の過剰発現および/または上方調節に関連する臨床状態についての疾患診断およびモニタリングキットを提供する。例示的な臨床状態は、関節リウマチ、肺線維症、HIV感染、および癌を含むが、これらに限定されない。特定の癌の例は、乳癌、膵臓癌、黒色腫、前立腺癌、腎臓癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、肺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、多発性骨髄腫、多形神経膠芽腫、および慢性リンパ球性白血病を含む。

10

20

30

40

50

む。

【0021】

[発明の詳細な説明]

CXCR4は、癌、ウイルス感染、ならびに関節リウマチなどの自己免疫病理を含む様々な疾患および障害における免疫応答および炎症応答において重要な役割を果たす。本発明は、CXCR4の過剰発現および/または活性化に関連する臨床状態を治療、診断またはイメージングするために、CXCR4の過剰発現または活性化を低減または予防することに少なくとも部分的に基づく。本明細書中で使用される場合、用語「過剰発現および/または活性化」は、それぞれ、その正常（すなわち、コントロール）またはベースラインレベルを超える遺伝子の発現、および/またはその正常、コントロールまたはベースラインレベルを超えるCXCR4の活性化をいう。

10

【0022】

用語「正常」、「ベースラインレベル」および「コントロールレベル」は、本明細書中で交換可能に使用され、および本明細書中に開示されるもののような、CXCR4の過剰発現および/または活性化に関連する疾患または臨床状態を有さない被験体中のCXCR4の発現および/または活性レベルをいう。いくつかの実施形態において、ベースラインレベルは正常レベルであり得、これはCXCR4の過剰発現および/または活性化（または活性）に関連する臨床状態を有さない正常な対象由来のサンプル中のレベルを意味する。これは、CXCR4発現またはその生物学的活性のベースラインレベルに基づく決定、すなわち、疾患または臨床状態について試験または評価されるサンプルがベースラインレベルと比較して、CXCR4発現または活性化において測定可能な増加、減少、または実質的に変化を有さないかどうかの決定を可能にする。

20

【0023】

当然のことながら、CXCR4の過剰発現および/または活性化は、サンプル結果を陽性対照と比較することによっても決定され得る。本明細書で使用される「陽性対照」という用語は、対象からのサンプルまたは個体の集団からのサンプルにおいて確立されたCXCR4発現および/または活性化（または活性）のレベルをいい、ここで該サンプルはそのサンプルからのデータに基づいて、CXCR4の過剰発現および/または活性化に関連する疾患または臨床状態（例えば、癌、関節リウマチなどの自己免疫疾患、およびHIV感染などのウイルス感染）を有すると考えられた。

30

【0024】

他の実施形態において、ベースラインレベルは試験される対象からの以前のサンプルから確立され得、その結果、対象の疾患の進行または退行は経時的にモニターされ得、および/または治療の効力が評価され得る。

【0025】

本発明のいくつかの態様は診断剤、治療剤またはイメージング剤に、任意にリンカーを介して結合されるCXCR4に対して高い親和性を有する化合物を提供する。このような化合物は、CXCR4結合部分および活性成分を含む。本発明はまた、例えば、CXCR4の過剰発現および/または活性化によって顕在化するか、またはそれに関連する臨床状態を治療するための治療薬の標的化された送達における、同化合物の使用方法も提供する。本明細書で使用されるように、用語「高親和性」は、CXCR4に結合する化合物または部分が約10nM以下、典型的には約3 nM以下、しばしば1 nM以下の結合定数 ( $K_b$ ) を有することを意味する。あるいは、用語「高親和性」は、CXCR4に結合する化合物または部分が約30nM以下、典型的には約10 nM以下、しばしば約3 nM以下の50%結合阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) を有することを意味する。結合定数および  $IC_{50}$  の決定方法は、当業者に周知である。例えば、本発明の譲受人に譲渡された2016年9月6日に出願された米国仮特許出願第62/384,132号、および2017年5月11日に出願された米国仮特許出願第62/505,064号、および本発明の譲受人に譲渡された2017年9月5日に出願されたPCT特許出願番号PCT/US17/50106号を参照されたい。これらの全ては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。特に、 $K_b$  および  $IC_{50}$  の値は、上記の参照された仮特許出願に記載されたCXCR4/<sup>125</sup>I-SDF-1 結合実験を用いて決

40

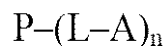
50

定される。用語「約」は、数値を指す場合、該数値の±20%、典型的には±10%、およしばしば±5%をいう。

【0026】

本発明の1つの特定の態様において、高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体（「PC」）は、次の式（I）またはその薬学的に許容される塩である：

【化5】



I

10

式中、nは1から（P中のアミノ酸の総数および側鎖官能基の総数）の合計までの整数であり、典型的にはnは1からP中のアミノ酸の数であり、またはnは1から官能基を有する側鎖を有するP中のアミノ酸の数であり、しばしば、nは1から5の整数であり、より多くの場合、nは1から3の整数であり；

Aは、1以上の診断剤、治療剤、またはイメージング剤であり；

各Lは独立して二官能性リンカーまたは不存在であり；Lが不存在の場合、Aは例えば、アミド結合またはエステル結合などの化学結合を介してPに結合（attached）されていて；およびPは高親和性CXCR4選択的結合ペプチジルリガンド（すなわち、CXCR4に選択的に結合するペプチド部分）である。

20

【0027】

変数nは、1から（P中のアミノ酸の総数および側鎖官能基の総数）の合計までの整数である。典型的には、nは1～7、しばしば1～5、より多くの場合1～3、最も多くの場合1または2の整数である。例えば、P中に全部で7アミノ酸残基が存在し、（側鎖官能基-NH<sub>2</sub>を有する）2つのリシン基を有する場合、nは1から9まで（Pの7個のアミノ酸残基+2個の側鎖官能基）の整数であり得る。このようにして、Pの全ての官能基は、-L-A部分に結合（attached）され得る。

【0028】

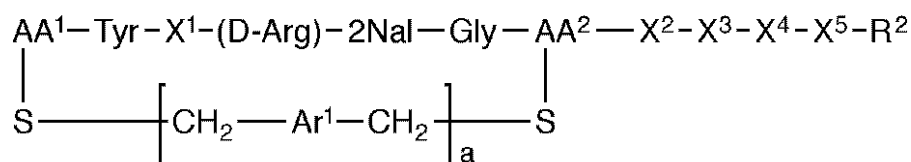
式（I）の化合物中の部分Aは、P部分の任意の部分に結合（attached）され得る。典型的には、A部分は、前記ペプチド（P部分）のN末端またはC末端、または前記ペプチドのアミノ酸残基の側鎖上に存在する官能基、またはそれらの位置のいずれか1つの組み合わせに結合（attached）されている。いくつかの実施形態において、式（I）の化合物は、複数のA部分を有する。

30

【0029】

1つの特定の実施形態において、Pは次の式（II）の高親和性CXCR4結合ペプチジルである：

【化6】



40

(SEQ ID NO:1)

II

配列番号 1

式中：

aは0または1であり；

AA<sup>1</sup>はそれに結合（attached）されているイオウ原子と共に、3-メルカプトプロピオン酸、任意に置換されたシステイン、または任意に置換されたホモシステインであり；

AA<sup>2</sup>はそれに結合（attached）されているイオウ原子と共に、システインまたはホモシステインであり；

50

Ar<sup>1</sup>は任意に置換されたアリールであり；

X<sup>1</sup>はArg、Dap、Dab、Orn、Lys、Dap (iPr)、Dab (iPr)、Orn (iPr)、またはLys (iPr)であり；

X<sup>2</sup>はArg、Dap、Dab、Orn、Lys、Dap (iPr)、Dab (iPr)、Orn (iPr)、Lys (iPr)、D-Arg、D-Dap、D-Dab、D-Orn、D-Lys、D-Dap (iPr)、D-Dab (iPr)、D-Orn (iPr)、D-Lys (iPr)または不存在であり；

X<sup>3</sup>はLys、Glyまたは不存在であり；

X<sup>4</sup>はLys、Phe、2NaI、1NaI、そのD-異性体、Gly、または不存在であり；

X<sup>5</sup>はLys、Glyまたは不存在であり；および

R<sup>2</sup>は-OR<sup>4</sup>または-NHR<sup>5</sup>であり、ここでR<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>はH、アルキル、任意に置換されたアリール、または任意に置換されたアラルキルである。 10

式(1)の化合物の部分-L-Aは、AA<sup>1</sup>(例えば、システインまたはホモシステインの-アミノ基)および/またはR<sup>4</sup>および/またはR<sup>5</sup>に結合(attached)され得、またはR<sup>4</sup>およびR<sup>5</sup>は-L-Aであり得、ここでLは任意にリンカーであり、およびAは治療剤、治療剤、またはイメージング剤である。また更に、部分-L-Aは、ペプチジル部分のN末端アミノ酸の-アミノ基または任意のアミノ酸の側鎖の官能基に結合(attached)され得る。

#### 【0030】

更に他の実施形態において、Aはイメージング剤である。本発明の有用なイメージング剤の1つの特定の例は、<sup>34</sup>Cl、<sup>45</sup>Ti、<sup>51</sup>Mn、<sup>61</sup>Cu、<sup>63</sup>Zn、<sup>68</sup>Ga、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O、および<sup>18</sup>Fなどの陽電子(ポジトロン)放出核種を含む。典型的には、陽電子放出核種は、リンカーに結合(attached)されているか、または該リンカーの一部(L部分)として結合されている。 20

#### 【0031】

有用なイメージング剤の別の例は、キレート基に配位された(すなわち、キレート化された)放射性金属同位体を含む。特に有用な放射性金属同位体は、テクネチウム、レニウム、ガリウム、ガドリニウム、インジウム、銅およびそれらの組み合わせを含む。特定の放射性金属同位体のための適切なキレート基は、当業者に周知である。例えば、フェロセンおよびその誘導体、エチレンジアミン四酢酸(「EDTA」)、その誘導体、ペプチジル部分Dap-Asp-Cysおよびその誘導体(米国特許第7,128,893号を参照のこと)、ならびに当技術分野で公知の他のものである。 30

#### 【0032】

有用なイメージング剤の更に別の例は、造影剤を含む。造影剤は、例えば核磁気共鳴画像法(MRI)において、広く使用されている。ガドペンエート、ガドブトロール、ガドジアミド、ガドホスベセート、ガドペンテテート、ガドテレート、ガドテリドール、ガドベルセタミド、ガドキセテート、および酸化鉄を含む多種多様な造影剤が当業者に知られている。

#### 【0033】

有用なイメージング剤のさらに別の例は、フルオレニルメチルオキシカルボニル(FMOC)およびその誘導体などの蛍光色素、AlexaFluor色素、Oregon Green色素、フルオレセイン、BODIPY(ホウ素-ジピロメテン)色素、シアニン色素、ローダミン色素、DyLight色素、およびTexas Redを含む。 40

#### 【0034】

他の実施形態では、Aは診断剤である。本発明の化合物において使用され得る例示的な診断剤は、イメージング剤、同位体剤、または放射性薬剤を含む。

#### 【0035】

さらに他の実施形態では、リンカーLがインビボでAを放出することができる官能基を含む。このようにして、部分Aはインビボで放出される。Aを放出することができる適切な官能基は、リンカーに結合(linked)される部分A上の官能基の性質に依存する。例えば、A上の官能基が水酸基(すなわち-OH)またはアミノ基(-NH<sub>2</sub>)である場合、L上の官能基は、A及びLの間にそれぞれエステル結合またはアミド結合が形成されるようなカルボキ 50

シレートであり得る。A上の官能基がカルボン酸である場合、L上の対応する官能基は、それぞれエステル結合またはアミド結合を形成するための水酸基またはアミノ基であり得る。インビボでAを放出することができるL上の他の適切な官能基は、ジスルフィド結合 (disulfide bond linkage)、エステル結合 (ester linkage)、チオール - マレイミド結合 (thiol-maleimide linkage) などを含む当業者に周知なものである。

【0036】

さらに他の実施形態では、Aは治療剤である。適切な治療剤は、癌、自己免疫疾患（例えば、関節リウマチ）、ウイルス感染（例えば、HIV感染）などの治療のための当業者に公知のものを含む。本発明の化合物において有用である例示的な治療剤は、プレオマイシン、ダウノルピシン、ドキソルピシン、ドセタキセル、イリノテカン、モノメチルオーリスタチンE、メルタンシン、パクリタキセル、SN-38、テシリン、チューブリシン、ピンカアルカロイド、およびそれらの類似体または誘導体、HIVプロテアーゼ阻害剤、HIV融合阻害剤、HIV逆転写酵素阻害剤、HIVインテグラーゼ阻害剤、HIV侵入阻害剤、および自己免疫疾患の治療薬を含むが、これらに限定されない。

【0037】

本発明の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体の特定の例は次のものが含まれるが、これらに限定されない：

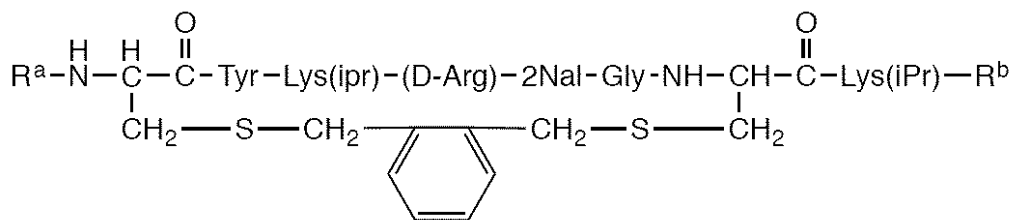
シクロ [ Phe-Tyr-Lys (iPr) - (D-Arg) -2Nal-Gly- (D-Glu) ] -Lys (iPr) - (mini-PEG6) -Cys (S-パクリタキセル) -Gly-NH<sub>2</sub>、ここで当該環状構造は、D-Glu(配列番号3)の側鎖に連結されたPheの -アミノ間に形成される；または

R<sup>a</sup>-シクロ [ Cys-Tyr-Lys (iPr) - (D-Arg) -2Nal-Gly-Cys ] -Lys (iPr) -R<sup>b</sup> (配列番号4)；

R<sup>a</sup>-シクロ [ hCys-Tyr-Lys (iPr) - (D-Arg) -2Nal-Gly-Cys ] -Lys (iPr) -R<sup>b</sup> (配列番号5)；

R<sup>a</sup>-シクロ [ Cys-Tyr-Lys (iPr) - (D-Arg) -2Nal-Gly-hCys ] -Lys (iPr) -R<sup>b</sup> (配列番号6)；および

【化7】



(SEQ ID NO:7)

配列番号7

ここでR<sup>a</sup>またはR<sup>b</sup>の少なくとも1つがS-パクリタキセルを含む場合には、

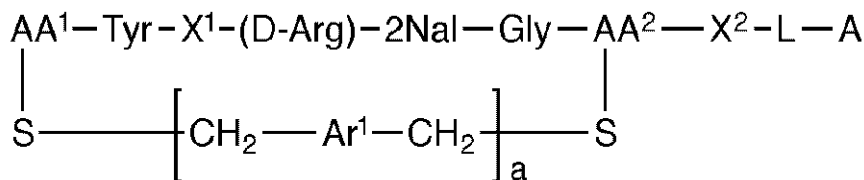
R<sup>a</sup>はアセチル-、アセチル-Cys (S-パクリタキセル) -、またはアセチル-Cys (S-パクリタキセル) - (mini-PEG6) -であり；および

R<sup>b</sup>はグリシルアミド、グリシル-Cys (S-パクリタキセル) -アミド、または (mini-PEG6) -Cys (S-パクリタキセル) -アミドである。

【0038】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物は、次の式 (III) の化合物またはその薬学的に許容される塩である：

## 【化 8】



## III

(SEQ ID NO:2)

配列番号 2

式中：

aは0または1であり；

10

AA<sup>1</sup>は、それに結合（attached）されているイオウ原子と共に、3 - メルカプトプロピオン酸、任意に置換されたシステイン、または任意に置換されたホモシステインであり、ここでAは、前記システインまたはホモシステインの - アミノ基に任意に結合され；

AA<sup>2</sup>は、それに結合（attached）されているイオウ原子と共に、システインまたはホモシステインであり；

Ar<sup>1</sup>は、任意に置換されたアリールであり；

X<sup>1</sup>は、Arg、Dap、Dab、Orn、Lys、Dap（iPr）、Dab（iPr）、Orn（iPr）、またはLys（iPr）であり；

X<sup>2</sup>は、Arg、Dap、Dab、Orn、Lys、Dap（iPr）、Dab（iPr）、Orn（iPr）、Lys（iPr）、D-Arg、D-Dap、D-Dab、D-Orn、D-Lys、D-Dap（iPr）、D-Dab（iPr）、D-Orn（iPr）、D-Lys、または不存在であり；

20

Lは任意にリンカーであり；および

Aは治療剤、診断剤またはイメージング剤である。

## 【0039】

これらの実施形態において、いくつかの例において、aは0である。さらに他の例において、aは1である。さらに他の例において、AA<sup>1</sup>は、それに結合（attached）されているイオウ原子と共に、3 - メルカプトプロピオン酸である。さらに他の例において、AA<sup>1</sup>は、それに結合（attached）されているイオウ原子と共に、システインである。他の例において、AA<sup>1</sup>は、それに結合（attached）されているイオウ原子と共に、ホモシステインである。

30

## 【0040】

さらに他の実施形態において、AA<sup>2</sup>は、それに結合（attached）されているイオウ原子と共に、システインである。さらに他の実施形態において、AA<sup>2</sup>は、それに結合（attached）されているイオウ原子と共に、ホモシステインである。

## 【0041】

さらに他の実施形態において、式（III）の化合物中のAはイメージング剤である。

## 【0042】

他の実施形態において、式（III）の化合物中のAは治療剤である。式（III）の化合物内の例示的な治療剤は、ブレオマイシン、カリケアマイシン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキソルビシン、イリノテカン、メルタンシン、モノメチルオーリスチンE、パクリタキセル、SN - 38、テシリン、トポテカン、チューブリシン、ピンカアルカロイド、およびそれらの類似体もしくは誘導体、ならびにそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

40

## 【0043】

Lは、例えばH<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> -(PEG)m-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> -COOH、HOOC-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> -(PEG)m-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> -COOH、もしくはH<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> -(PEG)m-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> -NH<sub>2</sub>の形態のポリエチレングリコール（PEG）、天然および非天然アミノ酸またはポリアミノ酸（PAA）などの任意の生体適合性二官能性リンカーであり得、ここでmは、0 ~ 100、典型的には1 ~ 50、しばしば1 ~ 25、より多くの場合1 ~ 10の整数である。一般に、Lがポリマー（例えば、PEG、PAA）である場合、鎖内のモノマーの総数は約1（すなわち、モノマー） ~ 約20、典型的には約1 ~ 約10、およびし

50

ばしば約1~6である。

【0044】

さらに他の実施形態において、式(III)の化合物中のAは、放射性薬剤、蛍光剤などの診断剤である。このようなイメージング剤は、当業者に周知である。例えば、磁気共鳴イメージング剤、超音波造影剤、および放射線造影剤のための造影剤である。例えば、[en.wikipedia.org/wiki/Contrast\\_agent](https://en.wikipedia.org/wiki/Contrast_agent) を参照されたい。

【0045】

また更に、本明細書に記載される様々な群の組み合わせは、他の実施形態を形成することができる。このようにして、種々の化合物が本発明の範囲内で具体化される。

【0046】

本発明の別の態様は、式(1)の化合物のAが診断剤である本明細書に記載の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体を含む診断キットを提供する。

【0047】

本発明のさらに別の態様は、式(1)の化合物および薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。薬学的に許容される担体は、希釈剤、賦形剤、香味剤、アジュバント、バインダー、安定剤、着色剤、またはそれらの組み合わせを含むことができる。一般に、「薬学的に許容される担体」は、一般に安全で、無毒であり、生物学的にもその他の点でも望ましくないものでない(neither biologically nor otherwise undesirable)医薬組成物を調製するのに有用な任意の賦形剤をいい、獣医用途およびヒト医薬用途に許容される賦形剤を含む。

【0048】

本発明は、本発明の少なくとも1つの化合物、または個々の異性体、ラセミもしくは非ラセミの異性体混合物またはそれらの薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物を、少なくとも1つの薬学的に許容される担体、および任意に他の治療および/または予防成分と共に含む医薬組成物を含む。

【0049】

一般に、本発明の化合物は、類似の有用性を果たす薬剤について許容される任意の投与様式により治療有効量で投与される。適切な用量範囲は、治療される疾患の重症度、対象の年齢および相対的健康状態、使用される化合物の効能、投与の経路および形態、投与が指示される適応症、ならびに関与する医師の好みおよび経験などの多数の因子に応じて、典型的には1~500 mg/日、典型的には1~100 mg/日、およびしばしば1~30 mg/日である。このような疾患を治療する当業者は、典型的には過度の実験なしに、そして個人の知識および本出願の開示に依拠して、本発明の化合物の治療有効量を確かめることができる。

【0050】

典型的には、本発明の化合物は、経口(頬および舌下を含む)、直腸、経鼻、局所、肺、膺、または非経口(筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、皮下および静脈内を含む)投与に適したものを含む医薬製剤として、または吸入または吹送による投与に適した形態で投与される。典型的な投与方法は一般に、苦痛の程度に応じて調節され得る便宜的な1日用量レジメンを使用する経口投与である。

【0051】

本発明の1つまたは複数の化合物は、1以上の従来のアジュバント、担体、または希釈剤と共に、医薬組成物および単位用量の形態にされ得る。医薬組成物および単位剤形は、追加の活性化合物または原則の有無にかかわらず、従来の割合の従来の成分を含まれ得、単位剤形は、使用される意図された1日用量範囲に見合った任意の適切な有効量の活性成分を含み得る。医薬組成物は、錠剤もしくは充填カプセルなどの固体、半固体、散剤、徐放性製剤、または液剤、懸濁剤、乳剤、エリキシル剤などの液体、または経口使用のための充填カプセルとして使用され得；または直腸投与もしくは膺投与のための坐剤の形態で使用され得；または非経口使用のための滅菌注射溶液の形態で使用され得。錠剤当たり約1ミリグラムの活性成分または、より広くは、約0.01~約100ミリグラムの活性成分を含有する製剤が、適切な代表的な単位剤形である。

## 【0052】

本発明の化合物は、多種多様な経口投与剤形で製剤化することができる。医薬組成物および剤形は、活性成分として本発明の1つまたは複数の化合物またはそれらの薬学的に許容される塩を含むことができる。薬学的に許容される担体は、固体または液体のいずれかであり得る。固形製剤には、散剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、カシェ剤、坐剤、および分散性顆粒剤が含まれる。固体担体は、希釈剤、香味剤、可溶化剤、滑剤、懸濁剤、結合剤、防腐剤、錠剤崩壊剤、またはカプセル化材料としても作用し得る1以上の物質であり得る。散剤において、担体は一般に、微粉化された活性成分との混合物である微粉化された固体である。錠剤において、活性成分は一般に、必要な結合能力を有する担体と適切な割合で混合され、所望の形状および大きさに圧縮される。散剤および錠剤は、好ましくは約1~約70%の活性化化合物を含有する。適切な担体は、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、糖、ラクトース、ペクチン、デキストリン、デンプン、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、低融点ワックス、カカオバターなどを含むが、これらに限定されない。用語「製剤」は、担体を含むまたは含まない活性成分がそれに付随する担体により囲まれているカプセルを提供する、担体としてのカプセル化材料を用いた活性化化合物の製剤を含むことを意図している。同様に、カシェ剤およびトローチ剤が含まれる。錠剤、散剤、カプセル剤、丸剤、カシェ剤、およびトローチ剤は、経口投与に適切な固体形態であり得る。

10

## 【0053】

経口投与に適した他の形態は、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤、水溶液、水性懸濁液を含む液体形態の製剤、または使用直前に液体形態の製剤に変換されることが意図される固体形態の製剤を含む。乳剤は、例えば、水性プロピレングリコール溶液中などの溶液中で調製され得るか、または例えば、レシチン、ソルビタンモノオレート、またはアカシアなどの乳化剤を含んでもよい。水溶液は、活性成分を水に溶解し、適切な着色剤、香味剤、安定剤、および増粘剤を添加することにより調製され得る。水性懸濁液は、天然または合成ガム、樹脂、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および他の周知の懸濁剤などの粘性材料を用いて、水中に微粉化された活性成分を分散させることにより調製され得る。固形製剤は、液剤、懸濁剤、および乳剤を含み、活性成分に加えて、着色剤、香味剤、安定剤、緩衝剤、人工および天然甘味剤、分散剤、増粘剤、可溶化剤などを含み得る。

20

30

## 【0054】

本発明の化合物はまた、非経口投与（例えば、注射、例えば、ボラス注射または連続注入による）のために製剤化され得、アンプル、予め充填されたシリンジ、小容量輸液、または防腐剤を添加された複数回投与用容器において、単位用量形態で提供され得る。組成物は、油性もしくは水性ビヒクル中の懸濁剤、液剤、または乳剤、例えば水性ポリエチレングリコール中の液剤などの形態をとることができる。油性または非水性の担体、希釈剤、溶媒またはビヒクルの例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、および注射用有機エステル（例えば、オレイン酸エチル）を含み、保存剤、湿潤剤、乳化剤または懸濁剤、安定化剤および/または分散剤などの製剤化剤を含み得る。あるいは、活性成分は、滅菌固体の無菌単離によって得られる、または使用前に適切なビヒクル、例えば、滅菌水、パイロジェンフリー水で構成するために溶液から凍結乾燥することによって得られる粉末形態であり得る。

40

## 【0055】

本発明の化合物は、軟膏剤、クリーム剤もしくはローション剤として、または経皮パッチ剤として表皮への局所投与用に製剤化され得る。軟膏剤およびクリーム剤は、例えば、適切な増粘剤および/またはゲル化剤を添加して、水性基剤または油性基剤を用いて製剤化され得る。ローション剤は、水性基剤または油性基剤を用いて製剤化され得、および一般に、1以上の乳化剤、安定化剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、または着色剤も含有するであろう。口腔内への局所投与に適した製剤は、風味を付けた基剤中、通常はスクロースおよびアラビアガム（アカシア）またはトラガカント中に活性薬剤を含むトローチ（loze

50



nges) ; ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアラビアガムなどの不活性塩基中に活性成分を含むトローチ (pastilles) ; および活性成分を適切な液体担体中に含む口腔洗浄剤を含む。

【0056】

本発明の化合物は、坐剤として投与するために製剤化され得る。脂肪酸グリセリドまたはカカオバターの混合物などの低融点ワックスが最初に溶融され、そして活性成分が例えば攪拌により均質に分散される。次いで、溶融した均質混合物を都合のよい大きさの型に注ぎ入れ、冷却し、そして固化させる。

【0057】

本発明の化合物は腔内投与用にも製剤化され得る。ペッサリー、タンポン、クリーム剤、ゲル化剤、ペースト剤、フォーム剤またはスプレー剤は、活性成分に加えて、当技術分野において適切であることが知られているような担体を含む。

【0058】

本発明の化合物は経鼻投与用に製剤化され得る。液剤または懸濁剤は、例えば点滴器、ピペットまたはスプレーを用いる通常の手段によって鼻腔に直接適用される。製剤は単回投与形態または複数回投与形態で提供され得る。点滴器またはピペットの後者の場合、これは、患者が適切な所定量の液剤または懸濁剤を投与されることによって達成され得る。スプレーの場合、これは、例えば計量噴霧 (metering atomizing) スプレーポンプによって達成され得る。

【0059】

本発明の化合物は、鼻腔内投与を含む、特に気道へのエアロゾル投与用に製剤化され得る。化合物は、一般に、例えば5ミクロン以下のオーダーの小さい粒径を有するであろう。そのような粒径は、当技術分野において公知の手段によって、例えば微粒子化によって得られ得る。活性成分は、クロロフルオロカーボン (CFC)、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、もしくはジクロロテトラフルオロエタン、または二酸化炭素もしくは他の適切な気体などの適切な噴射剤と共に加圧バックで提供される。エアロゾルは、レシチンなどの界面活性剤も便宜上含むことができる。薬物の投与量は計量バルブによって制御され得る。あるいは、活性成分は、乾燥粉末、例えば、ラクトース、デンプン、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのデンプン誘導体およびポリビニルピロリジン (PVP) などの適切な粉末基剤中の化合物の粉末混合物の形態で提供され得る。粉末担体は、典型的には鼻腔内でゲルを形成する。粉末組成物は、例えばゼラチンまたは粉末が吸入器によって投与され得るプリスターバックの例えばカプセルまたはカートリッジ中の単位用量形態で提供され得る。

【0060】

所望により、製剤は、有効成分の持続放出投与または制御放出投与に適合した腸溶性コーティングを用いて調製され得る。例えば、本発明の化合物は、経皮薬物送達デバイスまたは皮下薬物送達デバイス中で製剤化され得る。これらの送達システムは、化合物の持続放出が必要または望ましいとき、および治療レジメンに対する患者の服薬遵守が重要であるときに有利である。経皮送達システム中の化合物は、しばしば皮膚接着性固体支持体に結合 (attached) されている。目的の化合物はまた、浸透促進剤、例えば、アゾン (1 - ドデシルアザシクロヘプタン - 2 - オン) と組み合わせられ得る。持続放出送達システムは、外科手術または注射によって皮下層に皮下挿入され得る。皮下インプラントは、例えばシリコーンゴム、または生分解性ポリマー、例えばポリ乳酸などの脂溶性膜中に化合物をカプセル化する。

【0061】

医薬製剤は、典型的には単位剤形である。そのような形態では、製剤はしばしば適切な量の活性成分を含有する単位用量に細分される。単位剤形は、パッケージされた製剤であり得、該パッケージは、包装された (packeted) 錠剤、カプセル剤、およびバイアルまたはアンプル中の粉末などの、分離量の製剤を含む。また、単位剤形は、カプセル剤、錠剤、カシェ剤、もしくはトローチ剤それ自体であり得るか、または包装形態の適切な数のこ

10

20

30

40

50

れらのいずれかであり得る。

【0062】

他の適切な医薬担体およびそれらの製剤は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, edited by E.W. Martin, Mack Publishing Company, 19th edition, Easton, Paに記載されている。

【0063】

治療に使用するために、治療有効量の式(1)の化合物、ならびにそれらの薬学的に許容される塩が未処理の化学物質として投与され得る場合、活性成分を医薬組成物として提供することが可能である。すなわち、本開示は、治療有効量の式(1)の化合物もしくはそれらの薬学的に許容される塩もしくはそれらのプロドラッグ、ならびに1以上の薬学的に許容される担体、希釈剤もしくは賦形剤を含む医薬組成物をさらに提供する。組み合わせが適用される場合、この用語は、組み合わせて、連続的に、または同時に投与されるかにかかわらず、治療効果をもたらす活性成分の組み合わせ量をいう。式(1)の化合物およびそれらの薬学的に許容される塩は、上記の通りである。担体、希釈剤、または賦形剤は、製剤の他の成分と適合性があり、そのレシピエントに有害ではないという意味で許容されるものでなければならない。本開示の別の態様によれば、式(1)の化合物、またはその薬学的に許容される塩、またはそれらのプロドラッグを1以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と混合することを含む医薬製剤の製造方法も提供される。

10

【0064】

本開示の組成物が本開示の化合物と1以上の追加の治療薬または予防薬との組み合わせを含む場合、化合物および追加の薬剤の両方は、単独療法レジメンにおいて通常投与される用量の通常約10～150%の間、より典型的には約10～80%の間の用量レベルで提供される。

20

【0065】

本発明のさらに別の態様は、画像化に有効な量の式中、Aはイメージング剤である式(1)の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体を患者に投与すること、および撮像装置を使用して前記患者中の癌細胞を画像化することを含む、患者中の癌細胞のイメージング方法を提供する。使用される撮像装置は、式(1)の化合物のイメージング剤Aの性質に依存する。例えば、Aが陽電子放出核種である場合、使用される撮像装置はPETスキャンであり、Aが造影剤である場合、撮像装置はコンピュータトポグラフィ装置またはMRI装置であり得る。Aが放射性同位元素である場合、撮像装置は、X線機械または他の類似のデバイスであり得る。

30

【0066】

本発明の1つの特定の態様は、患者中の癌の治療方法を提供する。該方法は、治療有効量の式(1)の化合物(式中、Aは癌治療薬(cancer drug)である)または式(1)の化合物(式中、Aは癌治療薬である)を含む医薬組成物を癌患者に投与することを含む。

【0067】

本発明の別の特定の態様は、式中、Aはそれぞれ、診断剤またはイメージング剤である式(1)の高親和性CXCR4選択的結合リガンドペプチド抱合体(PC)を含む診断キットまたはイメージングキットを提供する。

40

【0068】

本発明のさらに別の特定の態様は、関節リウマチ、肺線維症、HIV感染、または癌に罹患している患者の治療方法を提供する。該方法は、治療有効量の式(1)の化合物を、その治療を必要とする患者に投与することを含む。この方法において、式(1)の化合物のAは、治療を受ける特定の臨床状態を治療するために使用され得る治療剤である。本発明の化合物を用いて治療され得る癌の一部は、乳癌、膵臓癌、黒色腫、前立腺癌、腎臓癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、肺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、多発性骨髄腫、多形神経膠芽腫、および慢性リンパ球性白血病を含むが、これらに限定されない。

【0069】

本発明の更なる目的、利点、および新規の特徴は、限定することを意図しない以下の実

50

施例を検討することによって当業者に明らかになるであろう。実施例において、実施するために構造的に簡潔にされた手順は現在時制で記載されており、実験室で行われた手順は過去時制で記載されている。

# 【実施例】

## 【0070】

以下の略語が使用されている：Ac：アセチル；Boc：tert - ブチルオキシカルボニル；BOP：（ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシ） - トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート；Bz：ベンゾイル；Bzl：ベンジル；Dab：1, 4 - ジアミノ酪酸；Dap：1, 3 - ジアミノプロピオン酸；DCC：ジシクロヘキシルカルボジイミド；DCM：ジクロロメタン；DIC：ジイソプロピルカルボジイミド；DIEA：ジイソプロピル - エチルアミン；DMAP：4 - （N, N - ジメチルアミノ）ピリジン；DMF：N, N - ジメチルホルムアミド；DMSO：ジメチルスルホキシド；EDT：1, 2 - エタンジチオール；Et：エチル；Fmoc：9 - フルオロ - エニルメトキシカルボニル；HATU：N - [（ジメチルアミノ） - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾロ [4, 5 - b] ピリジン - 1 - イルメチレン] - N - メチルメタンアミニウムヘキサフルオロホスフェート N - オキシド；HBTU：O - ベンゾ - トリアゾリル - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート；HCTU：1 H - ベンゾトリアゾリウム 1 - [ビス（ジメチルアミノ）メチレン] - 5 - クロロ - 3 - オキシドヘキサフルオロホスフェート；HOBt：ヒドロキシベンゾトリアゾール；hCys：ホモシステイン；iPr：イソプロピル；IPA：イソプロピルアルコール；Me：メチル；Mmt：4 - メトキシトリチル；Mpa：3 - メルカプトプロピオン酸；2NaI：2 - ナフチルアラニン；1NaI：1 - ナフチルアラニン；NMM：N - メチルモルホリン；NMP：N - メチルピロリドン；Orn：オルニチン；Pbf：2, 2, 4, 6, 7 - ペンタメチル - ジヒドロベンゾフラン - 5 - スルホニル；PBS：リン酸緩衝食塩水；PyBOP：（ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシ） - トリス（ピロリジノ） - ホスホニウムヘキサフルオロ - ホスフェート；PyBrOP：ブromotris（ピロリジノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート；tBu：tert - ブチル；TFA：トリフルオロ酢酸；TFE：トリフルオロエタノール；THF：テトラヒドロフラン；TIS：トリイソプロピルシラン；Trt：トリチル；mini-PEG6：エチレングリコールの6量体（6-mer）；すべての一般的なアミノ酸は、3文字の記号として表現されるか、または他の方法で特定される。

10

20

30

## 【0071】

質量分析（MS）分析：以下の実施例に記載の本発明の化合物の調製は、限定的ではなく例示的であることが意味される。これらの実施例のそれぞれにおいて、観察された分子量は逆畳み込み値（de-convoluted value）として報告される。該逆畳み込み値は、式  $MW$ （実測値）=  $n(m/z) - n$  から導き出され、式中、 $m/z$  は荷電イオン（正モード）を表し、 $n$  は特定の種の電荷数である。質量スペクトル中に複数の荷電種が存在する場合、実測された分子量は平均として報告される。

## 【0072】

ペプチド合成、環状構造形成、および塩交換の一般的な方法：ペプチドは、当技術分野で公知の固相ペプチド合成化学を用いて合成された。これらのペプチドの環状構造は、ジスルフィドについては、空気酸化を使用することによって、または酸性酸の存在下でのヨウ素酸化を使用することによって、またはビスチオエーテル環については、15 mM重炭酸アンモニウム溶液などの塩基の存在下で、ビス（ハロメチル）アリアル化合物を用いて、典型的には1.3当量のビス（ブromoメチル）アリアル化合物を用いて求核置換によって確立された。

40

## 【0073】

同位体または放射性標識アセトン、種々の製造元から商業的に入手可能である。同位体または放射性標識アセトンのカスタム調製の必要性がある場合、方法は公知の技術、例えば Rolf Voges, et al., Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14 (John Wiley & Sons (2009)) において見出され得る。

## 【0074】

50

種々のリンカーを有するペプチド - 薬物抱合体の調製は、当技術分野で公知である (G. T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2<sup>nd</sup> Ed., Academic PressElsevier, 2008)。例えば、システイン側鎖のチオールを介する抱合 (すなわち、ペプチドの結合 (linkage) または結合 (attachment)) に関する手順は、Backerおよび共同研究者らによって報告されている (M. V. Backer, et al., pp 275-294 in Methods in Molecular Biology, vol. 494: Peptide-Based Drug Design, edited by L. Otvos, Humana Press, NewYork, NY, 2008)。

#### 【0075】

パクリタキセル活性化 2' - マレイミド - パクリタキセルの調製：1グラムのパクリタキセル (1.2ミリモル) を160 mLのDCMに溶解し、0.12ミリモルのDMAPを添加し、そして反応混合物を0℃に冷却する。冷却した反応混合物に、2.4ミリモルの3 - マレイミドプロピオン酸、続いて1.2ミリモルのDICが攪拌下で添加された。次いで、反応混合物はゆっくりと室温まで温められ、そしてカップリング反応は、連続攪拌下、室温で18時間進行させられた。2' - マレイミド - パクリタキセルの粗生成物は、純度 > 90%まで精製され、そして環状CXCR4アンタゴニストペプチドへの抱合に使用された。

10

#### 【0076】

高親和性CXCR4結合リガンドペプチド抱合体にコンジュゲートされる癌治療として本明細書中に開示される薬物のほとんどは、当業者に公知の類似の方法で活性化および組み込まれ得る。

20

#### 【0077】

精製、塩形態変換、および最終生成物の特徴付け：最終生成物は、逆相HPLCによって精製され、そして分析用HPLCおよび質量分析によって更に特徴付けられた。逆相HPLCから精製されたペプチドは、通常、トリフルオロ酢酸 (TFA) 形態であった。この塩は、典型的には、酢酸塩形態または塩酸塩形態のような、より薬学的に都合の良い塩の形態に変換された。TFA塩中のペプチドを塩酸塩に変換することは、希塩酸溶液中でTFA塩中のペプチドを繰り返し凍結乾燥することによって達成され得た。TFA塩中のペプチドを酢酸塩に変換するために、典型的には以下の方法が使用された。強陰イオン交換樹脂 (塩化物形態、置換3ミリモル/g、含水量50%、ペプチド1グラム当たり2グラムの樹脂を使用) は、最初にミリQ水で3回洗浄され、次いで1 N NaOH溶液で3回、5分/1回洗浄され、次いでミリQ水で5回、5分/1回洗浄された。樹脂は、pHが約7.4に達するまで75%エタノール水で更に洗浄された。樹脂は、10%酢酸溶液で3回、各回5分間処理された。樹脂は、次いで1%酢酸溶液で3回、各回5分間洗浄された。樹脂は、精製ペプチドの塩変換の準備ができた。

30

#### 【0078】

精製された凍結乾燥ペプチドは、1%酢酸溶液に溶解され、そして上記の調製された樹脂に添加された。混合物は、室温で1時間攪拌または磁気的に攪拌された。上清は分離された。樹脂は1%酢酸溶液で3回洗浄された。上清と洗浄液は混合され、0.22 mmの膜を通して濾過され、そして凍結乾燥されて酢酸塩中のペプチドが得られた。

#### 【0079】

実施例 1：(MLB - 1707) の合成

40

#### 【0080】

ペプチド鎖構築：Cys (Mmt) - Tyr (tBu) - Lys (iPr, Boc) - (D - Arg (Pbf)) - 2Nal - Gly - Cys (Mmt) - Lys (iPr, Boc) - (mini - PEG6) - Cys (Trt) (配列番号8) のペプチド鎖は、Rink AM樹脂を使用して標準的なFmoc化学によって構築された。簡単に説明すると、0.8 gのRink AM樹脂は、DCM中で14時間膨潤され、次いでDMFで4回洗浄された。Fmocの除去は、DMF中の20%ピペリジン中、室温で20分間行われ、そしてDMFで数回洗浄された。ニンヒドリン試験は陰性であった。段階的鎖構築は、線状ペプチドのC末端からFmoc - Cys (Trt) - OHを用いて開始した。3当量の保護アミノ酸Fmoc - Cys (Trt) - OHは、DMF中のDIC/HOBtで活性化され、そして室温で2時間、上記で調製されたFmoc除去Rink AM樹脂にカップリングされた。ニンヒドリン試験は陰性であった。未反応アミノ基のキャビン

50

グは、5 mLの無水酢酸/DIEA/DCMの1:1:2の体積比の混合物を用いて30分間行われた。これに続いて、20分間、DMF中の20%ピペリジンを使用してFmocの除去が行われた。以下の残基は、カップリングされずに連続してカップリングされた：Fmoc-mini-PEG6-OH、Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH、Fmoc-Cys(Mmt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-2Nal-OH、Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、およびFmoc-Cys(Mmt)-OH。Fmoc保護は、最後の残基Fmoc-Cys(Mmt)のカップリング後、20分間、DMF中の20%ピペリジンを使用して再び除去された。N末端アセチル化は、5 mLの無水酢酸/DIEA/DMF(1:1:4、v/v/v)の混合物を用いて、室温で30分間行われた。樹脂は、次いでDMFで3回洗浄され、次いでDCMで2回洗浄され、真空下で乾燥された。

#### 【0081】

10

Cys残基上のMmt保護の除去および固相上での環化：Cys側鎖のMmt保護は、樹脂1 g当たり30 mLの切断カクテル（TFA/EDT/TIS/DCM、3:1.5:1.5:100、v/v）を使用して除去された。この脱保護手順は、3回、各回10分間、室温で繰り返された。樹脂は、次いでDCMで3回洗浄され、そしてDMFで10回洗浄され、残留TFAの完全な除去を確実にされた。十分に洗浄された樹脂に、樹脂1 g当たり10 mLのDMFおよび2 mLのDIEAを添加し、続いて1.2当量の1, 2-ビス（プロモメチル）ベンゼンをゆっくりと滴下した。環化反応は、室温で1時間進行させられた。試験切断およびMSにより環化の完了が確認された。反応混合物は、次いで樹脂から排出され、そして樹脂は更にDMFで3回洗浄され、そしてDCMで2回洗浄された。樹脂は、次いで切断前に真空下で乾燥された。

#### 【0082】

20

固体支持体からのペプチド切断および側鎖脱保護：完成したペプチドは、室温で70分間、10 mL/g樹脂で切断カクテル（TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O/チオアニソール/フェノール、溶液100 mL当たり、81.5 mLのTFA、2.5 mLのEDT、1.0 mLのTIS、5.0 mLのH<sub>2</sub>O、5.0 mLのチオアニソール、および5.0 gのフェノールを含む）を使用して、脱保護され、および乾燥樹脂から切り離された。樹脂は、濾過により除去され、そして数ミリリットルの切断カクテルで洗浄された。切断混合物に8容量のメチルト-ブチルエーテルが添加された。粗ペプチド沈殿物は、3000 rpmで3分間の遠心分離によって分離された。粗ペプチド沈殿物は、メチルト-ブチルエーテルで3回洗浄された。粗ペプチドは、分取HPLCで純度 > 90%に精製され、そして凍結乾燥された。

#### 【0083】

30

パクリタキセルの抱合：精製環状ペプチドは、1:1.2のモル比で先に調製された2'-マレイミド-パクリタキセルと混合され、そして30%アセトニトリル水溶液を添加されて10 mg/mLの最終ペプチド濃度が得られた。0.5 mol/LのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液は、反応混合物をpH 7.5に調整するために使用された。抱合反応は、MSによって確認されたように、約30分で完了された。最終生成物は、逆相分取カラムDaisogel（50 × 250 mm、8 mm）；移動相 - 溶媒A：0.1% TFA水；溶媒B：0.1% TFAアセトニトリルを使用して精製された。標的生成物を含有する画分は、混合され、そして凍結乾燥された（TFA塩）。

#### 【0084】

上記のような塩交換により、酢酸塩中のペプチドが得られた。最終ペプチド生成物の分析HPLC純度95.14%；MW計算値（cal.）：2725.56；MW観測値（obs.）：2724.75。

40

#### 【0085】

実施例2：（MLB-1708）の合成

#### 【0086】

ペプチド鎖構築：Cys(Trt)-Cys(Mmt)-Tyr(tBu)-Lys(iPr, Boc)-(D-Arg(Pbf))-2Nal-Gly-Cys(Mmt)-Lys(iPr, Boc)-Gly(配列番号9)のペプチド鎖は、Rink AM樹脂を使用して標準的なFmoc化学によって構築された。簡単に説明すると、3.6 gのRink AM樹脂は、DCM中で14時間膨潤され、次いでDMFで4回洗浄された。Fmocの除去は、DMF中の20%ピペリジン中、室温で20分間行われ、そしてDMFで数回洗浄された。ニンヒドリン試験は陰性であった。段階的鎖構築は、線状ペプチドのC末端からFmoc-Gly-OHを用いて開始した。3当量の保護アミノ酸Fmoc-Gly-OHは、DMF中のDIC/HOBtで活性化され

50

、そして室温で2時間、上記で調製されたFmoc除去Rink AM樹脂にカップリングされた。ニンヒドリン試験は陰性であった。未反応アミノ基のキャッピングは、20 mLの無水酢酸/DIEA/DCMの1:1:2の体積比の混合物を用いて、30分間行われた。これに続いて、20分間、DMF中の20%ピペリジンを使用してFmocの除去が行われた。以下の残基は、キャッピングされずに連続してカップリングされた：Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH、Fmoc-Cys(Mmt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-2Nal-OH、Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Cys(Mmt)-OH、およびFmoc-Cys(Trt)-OH。Fmoc保護は、最後の残基Fmoc-Cys(Trt)-OHのカップリング後、20分間、DMF中の20%ピペリジンを使用して再び除去された。N末端アセチル化は、20 mLの無水酢酸/DIEA/DMF(1:1:4、v/v/v)の混合物を用いて、室温で30分間行われた。樹脂は、次いでDMFで3回洗浄され、次いでDCMで2回洗浄され、真空下で乾燥された。

10

#### 【0087】

Cys残基上のMmt保護の除去および固相上での環化：Cys側鎖のMmt保護は、樹脂1 g当たり30 mLの切断カクテル(TFA/EDT/TIS/DCM、3:1.5:1.5:100、v/v)を使用して除去された。脱保護手順は、3回、各回10分間、室温で繰り返された。樹脂は、次いでDCMで3回洗浄され、そしてDMFで10回洗浄され、残留TFAの完全な除去を確実にされた。十分に洗浄された樹脂に、樹脂1 g当たり10 mLのDMFおよび2 mLのDIEAが添加された。環化反応は、室温で1時間進行させられた。試験切断およびMSにより環化の完了が確認された。反応混合物は、次いで樹脂から排出され、そして樹脂は更にDMFで3回洗浄され、そしてDCMで2回洗浄された。樹脂は、次いで切断前に真空下で乾燥された。

20

#### 【0088】

固体支持体からのペプチド切断および側鎖脱保護：完成したペプチドは、室温で70分間、10 mL/g樹脂で切断カクテル(TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O/チオアニソール/フェノール、溶液100 mL当たり、81.5 mLのTFA、2.5 mLのEDT、1.0 mLのTIS、5.0 mLのH<sub>2</sub>O、5.0 mLのチオアニソール、および5.0 gのフェノールを含む)を使用して、脱保護され、および乾燥樹脂から切り離された。樹脂は、濾過により除去され、そして数ミリリットルの切断カクテルで洗浄された。切断混合物に8容量のメチルト-ブチルエーテルが添加された。粗ペプチド沈殿物は、3000 rpmで3分間の遠心分離によって分離された。粗ペプチド沈殿物は、メチルト-ブチルエーテルで3回洗浄された。粗ペプチドは、分取HPLCで純度>90%に精製され、そして凍結乾燥された。

30

#### 【0089】

パクリタキセルの抱合：精製環状ペプチドは、1:1.2のモル比で先に調製された2'-マレイミド-パクリタキセルと混合され、そして30%アセトニトリル水溶液を添加されて10 mg/mLの最終ペプチド濃度が得られた。0.5 mol/LのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液は、反応混合物をpH 7.5に調整するために使用された。抱合反応は、MSによって確認されたように、約30分で完了された。最終生成物は、逆相分取カラムDaisogel(50×250 mm、8 mm)；移動相-溶媒A：0.1% TFA水；溶媒B：0.1% TFAアセトニトリルを使用して精製された。標的生成物を含有する画分は、混合され、そして凍結乾燥された(TFA塩)。

#### 【0090】

上記のような塩交換により、酢酸塩中のペプチドが得られた。最終ペプチド生成物の分析HPLC純度95.71%；MW計算値：2343.70；MW観測値：2342.85。

40

#### 【0091】

実施例3：(MLB-1710)の合成

#### 【0092】

ペプチド鎖構築：Cys(Trt)-Cys(Mmt)-Tyr(tBu)-Lys(iPr, Boc)-(D-Arg(Pbf))-2Nal-Gly-Cys(Mmt)-Lys(iPr, Boc)-Gly(配列番号9)のペプチド鎖は、Rink AM樹脂を使用して標準的なFmoc化学によって構築された。簡単に説明すると、3.6 gのRink AM樹脂は、DCM中で14時間膨潤され、次いでDMFで4回洗浄された。Fmocの除去は、DMF中の20%ピペリジン中、室温で20分間行われ、そしてDMFで数回洗浄された。ニンヒドリン試験は陰性であった。段階的鎖構築は、線状ペプチドのC末端からFmoc-Gly-OHを

50

用いて開始した。3当量の保護アミノ酸Fmoc - Gly - OHは、DMF中のDIC/HOBtで活性化され、そして室温で2時間、上記で調製されたFmoc除去Rink AM樹脂にカップリングされた。ニンヒドリン試験は陰性であった。未反応アミノ基のキャッピングは、20 mLの無水酢酸/DIEA/DCMの1:1:2の体積比の混合物を用いて、30分間行われた。これに続いて、20分間、DMF中の20%ピペリジンを使用してFmocの除去が行われた。以下の残基は、キャッピングされずに連続してカップリングされた：Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH、Fmoc-Cys(Mmt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-2Nal-OH、Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Cys(Mmt)-OH、およびFmoc-Cys(Trt)-OH。Fmoc保護は、最後の残基Fmoc - Cys ( Trt ) - OHのカップリング後、20分間、DMF中の20%ピペリジンを使用して再び除去された。N末端アセチル化は、20 mLの無水酢酸/DIEA/DMF(1:1:4、v/v/v)の混合物を用いて、室温で30分間行われた。樹脂は、次いでDMFで3回洗浄され、次いでDCMで2回洗浄され、真空下で乾燥された。

10

#### 【0093】

Cys残基上のMmt保護の除去および固相上での環化：Cys側鎖のMmt保護は、樹脂1 g当たり30 mLの切断カクテル (TFA/EDT/TIS/DCM、3:1.5:1.5:100、v/v) を使用して除去された。脱保護手順は、3回、各回10分間、室温で繰り返された。樹脂は、次いでDCMで3回洗浄され、そしてDMFで10回洗浄され、残留TFAの完全な除去を確実にされた。十分に洗浄された樹脂に、樹脂1 g当たり10 mLのDMFおよび2 mLのDIEAを添加し、続いて1.2当量の1,2-ビス(プロモメチル)ベンゼンをゆっくりと滴下した。環化反応は、室温で1時間進行させられた。試験切断およびMSにより環化の完了が確認された。反応混合物は、次いで樹脂から排出され、そして樹脂は更にDMFで3回洗浄され、そしてDCMで2回洗浄された。樹脂は、次いで切断前に真空下で乾燥された。

20

#### 【0094】

固体支持体からのペプチド切断および側鎖脱保護：完成したペプチドは、室温で70分間、10 mL/g樹脂で切断カクテル (TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O/チオアニソール/フェノール、溶液100 mL当たり、81.5 mLのTFA、2.5 mLのEDT、1.0 mLのTIS、5.0 mLのH<sub>2</sub>O、5.0 mLのチオアニソール、および5.0 gのフェノールを含む) を使用して、脱保護され、および乾燥樹脂から切り離された。樹脂は、濾過により除去され、そして数ミリリットルの切断カクテルで洗浄された。切断混合物に8容量のメチルト-ブチルエーテルが添加された。粗ペプチド沈殿物は、3000 rpmで3分間の遠心分離によって分離された。粗ペプチド沈殿物は、メチルト-ブチルエーテルで3回洗浄された。粗ペプチドは、分取HPLCで純度>90%に精製され、そして凍結乾燥された。

30

#### 【0095】

パクリタキセルの抱合：精製環状ペプチドは、1:1.2のモル比で先に調製された2'-マレイミド-パクリタキセルと混合され、そして30%アセトニトリル水溶液を添加されて10 mg/mLの最終ペプチド濃度が得られた。0.5 mol/LのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液は、反応混合物をpH 7.5に調整するために使用された。抱合反応は、MSによって確認されたように、約30分で完了された。最終生成物は、逆相分取カラムDaisogel (50 x 250 mm、8 mm)；移動相-溶媒A：0.1% TFA水；溶媒B：0.1% TFAアセトニトリルを使用して精製された。標的生成物を含む画分は、混合され、そして凍結乾燥された (TFA塩)。

40

#### 【0096】

上記のような塩交換により、酢酸塩中のペプチドが得られた。最終ペプチド生成物の分析HPLC純度95.07%；MW計算値：2446.96；MW観測値：2446.50。

#### 【0097】

実施例4：(MLB-1711)の合成

#### 【0098】

ペプチド鎖構築：Cys(Trt) - (mini-PEG6) - Cys(Mmt) - Tyr(tBu) - Lys(iPr, Boc) - (D-Arg(Pbf)) - 2Nal - Gly - Cys(Mmt) - Lys(iPr, Boc) - Gly (配列番号10)のペプチド鎖は、Rink AM樹脂を使用して標準的なFmoc化学によって構築された。簡単に説明すると、3.6 gのRink AM樹脂は、DCM中で14時間膨潤され、次いでDMFで4回洗浄さ

50

れた。Fmocの除去は、DMF中の20%ピペリジン中、室温で20分間行われ、そしてDMFで数回洗浄された。ニンヒドリン試験は陰性であった。段階的鎖構築は、線状ペプチドのC末端からFmoc - Gly - OHを用いて開始した。3当量の保護アミノ酸Fmoc - Gly - OHは、DMF中のDIC/HOBtで活性化され、そして室温で2時間、上記で調製されたFmoc除去Rink AM樹脂にカップリングされた。ニンヒドリン試験は陰性であった。未反応アミノ基のキャッピングは、20mLの無水酢酸/DIEA/DCMの1:1:2の体積比の混合物を用いて、30分間行われた。これに続いて、20分間、DMF中の20%ピペリジンを使用してFmocの除去が行われた。以下の残基は、キャッピングされずに連続してカップリングされた：Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH、Fmoc-Cys(Mmt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-2NaI-OH、Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Cys(Mmt)-OH、Fmoc-(mini-PEG6)-OH、およびFmoc-Cys(Trt)-OH。Fmoc保護は、最後の残基Fmoc - Cys (Trt) - OHのカップリング後、20分間、DMF中の20%ピペリジンを使用して再び除去された。N末端アセチル化は、20 mLの無水酢酸/DIEA/DMF(1:1:4、v/v/v)の混合物を用いて、室温で30分間行われた。樹脂は、次いでDMFで3回洗浄され、次いでDCMで2回洗浄され、真空下で乾燥された。

10

20

30

40

#### 【0099】

Cys残基上のMmt保護の除去および固相上での環化：Cys側鎖のMmt保護は、樹脂1 g当たり30 mLの切断カクテル（TFA/EDT/TIS/DCM、3:1.5:1.5:100、v/v）を使用して除去された。脱保護手順は、3回、各回10分間、室温で繰り返された。樹脂は、次いでDCMで3回洗浄され、そしてDMFで10回洗浄され、残留TFAの完全な除去を確実にされた。十分に洗浄された樹脂に、樹脂1 g当たり10 mLのDMFおよび2 mLのDIEAが添加され、続いて1.2当量の1,2 - ビス（プロモメチル）ベンゼンをゆっくりと滴下された。環化反応は、室温で1時間進行させられた。試験切断およびMSにより環化の完了が確認された。反応混合物は、次いで樹脂から排出され、そして樹脂は更にDMFで3回洗浄され、そしてDCMで2回洗浄された。樹脂は、次いで切断前に真空下で乾燥された。

#### 【0100】

固体支持体からのペプチド切断および側鎖脱保護：完成したペプチドは、室温で70分間、10 mL/g樹脂で切断カクテル（TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O/チオアニソール/フェノール、溶液100 mL当たり、81.5 mLのTFA、2.5 mLのEDT、1.0 mLのTIS、5.0 mLのH<sub>2</sub>O、5.0 mLのチオアニソール、および5.0 gのフェノールを含む）を使用して、脱保護され、および乾燥樹脂から切り離された。樹脂は、濾過により除去され、そして数ミリリットルの切断カクテルで洗浄された。切断混合物に8容量のメチルト - ブチルエーテルが添加された。粗ペプチド沈殿物は、3000 rpmで3分間の遠心分離によって分離された。粗ペプチド沈殿物は、メチルト - ブチルエーテルで3回洗浄された。粗ペプチドは、分取HPLCで純度 > 90%に精製され、そして凍結乾燥された。

#### 【0101】

パクリタキセルの抱合：精製環状ペプチドは、1:1.2のモル比で先に調製された2' - マレイミド - パクリタキセルと混合され、そして30%アセトニトリル水溶液を添加されて10mg/mLの最終ペプチド濃度が得られた。0.5 mol/LのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液は、反応混合物をpH 7.5に調整するために使用された。抱合反応は、MSによって確認されたように、約30分で完了された。最終生成物は、逆相分取カラムDaisogel（50 × 250 mm、8 mm）；移動相 - 溶媒A：0.1% TFA水；溶媒B：0.1% TFAアセトニトリルを使用して精製された。標的生成物を含有する画分は、混合され、そして凍結乾燥された（TFA塩）。

#### 【0102】

上記のような塩交換により、酢酸塩中のペプチドが得られた。最終ペプチド生成物の分析HPLC純度95.10%；MW計算値：2781.25；MW観測値：2781.75。

#### 【0103】

実施例5：（MLB - 1713）の合成

#### 【0104】

ペプチド鎖構築：Phe - Tyr (tBu) - Lys (iPr, Boc) - (D - Arg (Pbf)) - 2NaI - Gly - (D - Glu (OAll)) - Lys (iPr, Boc) - (mini - PEG6) - Cys (Trt) - Gly（配列番号11

50



）のペプチド鎖は、Rink AM樹脂を使用して標準的なFmoc化学によって構築された。簡単に説明すると、1.0 gのRink AM樹脂は、DCM中で14時間膨潤され、次いでDMFで4回洗浄された。Fmocの除去は、DMF中の20%ピペリジン中、室温で20分間行われ、そしてDMFで数回洗浄された。ニンヒドリン試験は陰性であった。段階的鎖構築は、線状ペプチドのC末端からFmoc - Gly - OHを用いて開始した。3当量の保護アミノ酸Fmoc - Gly - OHは、DMF中のDIC/HOBtで活性化され、そして室温で2時間、上記で調製されたFmoc除去Rink AM樹脂にカップリングされた。ニンヒドリン試験は陰性であった。未反応アミノ基のキャッピングは、6mLの無水酢酸/DIEA/DCMの1:1:2の体積比の混合物を用いて、30分間行われた。これに続いて、20分間、DMF中の20%ピペリジンを使用してFmocの除去が行われた。以下の残基は、キャッピングされずに連続してカップリングされた：Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-(mini-PEG 10 6)-OH、Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH、Fmoc-D-Glu(OAll)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-2Nal-OH、Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、およびFmoc-Phe-OH。樹脂は、最後の残基Fmoc - Phe - OHのカップリング後、次いでDMFで3回洗浄された。PheのFmoc保護基は、この段階で除去されなかった。

#### 【0105】

OAll保護の除去、Fmoc保護の除去、および固相上での環化：D Gluのアリルエステル側鎖保護は、ジクロロメタン中、24当量のフェニルシランの存在下で0.1当量のPd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>を用いて除去された。この手順は、アリル側鎖脱保護の完全な除去のために、1回繰り返された。N末端のFmoc保護基は、次いでDMF中の20%ピペリジンで20分間除去された。D Gluの脱保護側鎖カルボン酸は、次いでPyBOP((ベンゾトリアゾール 1 イルオキシ) トリス(ピロリジノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート)/DIEAで活性化され、そして樹脂上のPhe残基の アミノ基に環化された。環化は、試験切断後にMSによって確認されたように、2時間以内に完了された。

#### 【0106】

固体支持体からのペプチド切断および側鎖脱保護：完成したペプチドは、室温で70分間、10 mL/g樹脂で切断カクテル(TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O/チオアニソール/フェノール、溶液10 0 mL当たり、81.5 mLのTFA、2.5 mLのEDT、1.0 mLのTIS、5.0 mLのH<sub>2</sub>O、5.0 mLのチオアニソール、および5.0 gのフェノールを含む)を使用して、脱保護され、および乾燥樹脂から切り離された。樹脂は、濾過により除去され、そして数ミリリットルの切断カクテルで洗浄された。切断混合物に8容量のメチルト - ブチルエーテルが添加された。粗ペプチド沈殿物は、3000 rpmで3分間の遠心分離によって分離された。粗ペプチド沈殿物は、メチルト - ブチルエーテルで3回洗浄された。粗ペプチドは、分取HPLCで純度 > 90%に精製され、そして凍結乾燥された。

#### 【0107】

パクリタキセルの抱合：精製環状ペプチドは、1:1.2のモル比で先に調製された2' - マレイミド - パクリタキセルと混合され、そして30%アセトニトリル水溶液を添加されて10mg/mLの最終ペプチド濃度が得られた。0.5 mol/LのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液は、反応混合物をpH 7.5に調整するために使用された。抱合反応は、MSによって確認されたように、約30分で完了された。最終生成物は、逆相分取カラムDaisogel(50 × 250 mm、8 mm)；移動相 - 溶媒A：0.1% TFA水；溶媒B：0.1% TFAアセトニトリルを使用して精製された。標的生成物を含む画分は、混合され、そして凍結乾燥された(TFA塩)。

#### 【0108】

上記のような塩交換により、酢酸塩中のペプチドが得られた。最終ペプチド生成物の分析HPLC純度95.03%；MW計算値：2690.40；MW観測値：2690.25。

#### 【0109】

実施例6：(MLB - 1703)の合成

#### 【0110】

ペプチド鎖構築：Cys(Mmt) - Tyr(tBu) - Lys(iPr, Boc) - (D - Arg(Pbf)) - 2Nal - Gly - Cys(Mmt) - Lys(iPr, Boc) - Gly - Cys(Trt)(配列番号12)のペプチド鎖は、Rink AM樹脂を使用して標準的なFmoc化学によって構築された。簡単に説明すると、0.8 50

gのRink AM樹脂は、DCM中で14時間膨潤され、次いでDMFで4回洗浄された。Fmocの除去は、DMF中の20%ピペリジン中、室温で20分間行われ、そしてDMFで数回洗浄された。ニンヒドリン試験は陰性であった。段階的鎖構築は、線状ペプチドのC末端からFmoc-Cys(Trt)-OHを用いて開始した。3当量の保護アミノ酸Fmoc-Cys(Trt)-OHは、DMF中のDIC/HOBtで活性化され、そして室温で2時間、上記で調製されたFmoc除去Rink AM樹脂にカップリングされた。ニンヒドリン試験は陰性であった。未反応アミノ基のキャッピングは、5 mLの無水酢酸/DIEA/DCMの1:1:2の体積比の混合物を用いて、30分間行われた。これに続いて、20分間、DMF中の20%ピペリジンを使用してFmocの除去が行われた。以下の残基は、キャッピングされずに連続してカップリングされた：Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH、Fmoc-Cys(Mmt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-2Nal-OH、Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Lys(iPr, Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、およびFmoc-Cys(Mmt)-OH。Fmoc保護は、最後の残基Fmoc-Cys(Mmt)-OHのカップリング後、20分間、DMF中の20%ピペリジンを使用して再び除去された。N末端アセチル化は、5 mLの無水酢酸/DIEA/DMF(1:1:4、v/v/v)の混合物を用いて、室温で30分間行われた。樹脂は、次いでDMFで3回洗浄され、次いでDCMで2回洗浄され、真空下で乾燥された。

10

#### 【0111】

Cys残基上のMmt保護の除去および固相上での環化：Cys側鎖のMmt保護は、樹脂1 g当たり30 mLの切断カクテル(TFA/EDT/TIS/DCM、3:1.5:1.5:100、v/v)を使用して除去された。脱保護手順は、3回、各回10分間、室温で繰り返された。樹脂は、次いでDCMで3回洗浄され、そしてDMFで10回洗浄され、残留TFAの完全な除去を確実にされた。十分に洗浄された樹脂に、樹脂1 g当たり10 mLのDMFおよび2 mLのDIEAを添加し、続いて1.2当量の1,2-ビス(プロモメチル)ベンゼンをゆっくりと滴下した。環化反応は、室温で1時間進行させられた。試験切断およびMSにより環化の完了が確認された。反応混合物は、次いで樹脂から排出され、そして樹脂は更にDMFで3回洗浄され、そしてDCMで2回洗浄された。樹脂は、次いで切断前に真空下で乾燥された。

20

#### 【0112】

固体支持体からのペプチド切断および側鎖脱保護：完成したペプチドは、室温で70分間、10 mL/g樹脂で切断カクテル(TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O/チオアニソール/フェノール、溶液100 mL当たり、81.5 mLのTFA、2.5 mLのEDT、1.0 mLのTIS、5.0 mLのH<sub>2</sub>O、5.0 mLのチオアニソール、および5.0 gのフェノールを含む)を使用して、脱保護され、および乾燥樹脂から切り離された。樹脂は、濾過により除去され、そして数ミリリットルの切断カクテルで洗浄された。切断混合物に8容量のメチルト-ブチルエーテルが添加された。粗ペプチド沈殿物は、3000 rpmで3分間の遠心分離によって分離された。粗ペプチド沈殿物は、メチルト-ブチルエーテルで3回洗浄された。粗ペプチドは、分取HPLCで純度>90%に精製され、そして凍結乾燥された。

30

#### 【0113】

パクリタキセルの抱合：精製環状ペプチドは、1:1.2のモル比で先に調製された2'-マレイミド-パクリタキセルと混合され、そして30%アセトニトリル水溶液を添加されて10 mg/mLの最終ペプチド濃度が得られた。0.5 mol/LのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液は、反応混合物をpH 7.5に調整するために使用された。抱合反応は、MSによって確認されたように、約30分で完了された。最終生成物は、逆相分取カラムDaisogel(50×250 mm、8 mm)；移動相-溶媒A：0.1% TFA水；溶媒B：0.1% TFAアセトニトリルを使用して精製された。標的生成物を含む画分は、混合され、そして凍結乾燥された(TFA塩)。

40

#### 【0114】

上記のような塩交換により、酢酸塩中のペプチドが得られた。最終ペプチド生成物の分析HPLC純度95.13%；MW計算値：2447.86；MW観測値：2446.95。

#### 【0115】

ヒトCXCR4/<sup>125</sup>I-SDF-1 結合阻害アッセイ：(EUROFINS CEREP SA, Le Bois l'Eveque, 86600 Celle L'Evescault, Franceによって実施された)：Chem-1細胞において発現されたヒトケモカイン受容体CXCR4は、改変HEPES緩衝液pH 7.4中で使用された。0.5 μg(膜タ

50

ンパク質はロットごとに変化する可能性があり、使用される濃度は必要に応じて調整されるであろう)、一定分量は、0.03 nMの[<sup>125</sup>I] SDF-1 と共に25 で90分間インキュベートされた。非特異的結合は、30nMのSDF-1 の存在下で推定された。膜は濾過され、そして洗浄され、フィルターは次いで特異的に結合した[<sup>125</sup>I] SDF-1 を決定するためにカウントされた。化合物は、11点希釈で10 μMから開始してスクリーニングされた (Valenzuela-Fernandez A, et al. J Biol Chem. 277(18):15677, 2002)。C X C R 4 結合データは、それらの物理的特徴付けと共に以下の表に示される。

表1：例示的なペプチドの特徴付けおよび結合活性

【表 1】

実施例番号	MLB番号	計算値MW (Da)	観測値 MW (Da)	HPLC純度 (%)	CXCR4 IC <sub>50</sub> (nM)	CXCR4 K <sub>b</sub> (nM)
1	MLB-1707	2725.56	2724.75	95.14	2.30	0.70
2	MLB-1708	2343.70	2342.85	95.71	9.40	2.80
3	MLB-1710	2446.96	2446.50	95.07	16.0	4.90
4	MLB-1711	2781.25	2781.75	95.10	3.90	1.20
5	MLB-1713	2690.40	2690.25	95.03	0.96	0.29
6	MLB-1703	2447.86	2446.95	95.13	n/a*	n/a*

\*n/a：利用できない。

【0116】

本明細書中に開示される高親和性CXCR4結合リガンドペプチド薬物抱合体に加えて、他の高親和性CXCR4結合リガンドペプチドの調製および特徴付けは、次の米国仮特許出願において見出され得る：2016年9月6日出願の第62/384,132号、および2017年5月11日出願の第62/505,064号（以下の表2を参照されたい）。

【0117】

同位体または放射性標識アセトン、種々の製造元から商業的に入手可能である。同位体または放射性標識アセトンのカスタム調製の必要性がある場合、方法は公知の技術、例えば、Rolf Voges, et al., Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14 (John Wiley & Sons (2009))において見出され得る。

【0118】

種々のリンカーを有するペプチド - 薬物抱合体の調製は、当技術分野で公知である (G. T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press/Elsevier, 2008)。システイン側鎖のチオールを介するペプチド抱合体（例えば、ペプチドへの活性成分の結合 (linkage) または結合 (attachment)）を調製するための手順の例は、Backer, et al., pp 275-294 in Methods in Molecular Biology, vol. 494: Peptide-Based Drug Design, edited by L. Otvos, Humana Press, New York, NY, 2008に開示されている。

表2：他の高親和性CXCR4結合リガンドペプチド

10

20

30

【表 2】

エン トリー	MLB番号	計算値MW (Da)	観測値MW (Da)	HPLC純度 (%)	CXCR4 IC <sub>50</sub> (nM)	結合K <sub>b</sub> (nM)
1	MLB-001	1353.49	1353.45	96.64	24.0	7.3
2	MLB-002	1366.93	1367.70	98.78	0.92	0.28
3	MLB-003	1381.35	1381.80	98.14	0.98	0.30
4	MLB-004	1366.83	1367.25	97.02	0.70	0.21
5	MLB-005	1353.49	1353.00	96.05	>>1000	>>1000
6	MLB-006	1408.69	1409.10	96.54	1.50	0.45
7	MLB-007	1204.51	1205.25	95.71	0.64	0.19
8	MLB-008	1430.43	1431.00	96.44	0.95	0.29
9	MLB-009	1451.84	1452.60	96.38	0.61	0.18
10	MLB-010	1247.61	1248.00	96.13	0.56	0.17
11	MLB-021	1310.64	1310.70	95.98	0.42	0.13
12	MLB-022	1310.64	1310.55	95.64	0.71	0.21
13	MLB-023	1296.61	1296.75	97.04	3.40	1.00
14	MLB-024	1338.69	1338.9	97.59	1.30	0.39
15	MLB-025	1324.67	1324.65	95.67	0.84	0.25
16	MLB-026	1276.62	1276.65	95.03	0.89	0.27
17	MLB-027	1318.70	1318.80	95.50	0.48	0.15
18	MLB-028	1458.97	1458.75	96.42	8.20	2.50
19	MLB-029	1515.08	1515.00	95.31	11.0	3.20
20	MLB-030	1400.76	1400.85	95.60	1.30	0.39
21	MLB-031	1309.69	1309.20	96.54	n/a*	n/a*
22	MLB-032	1338.70	1338.60	97.59	0.40	0.12
23	MLB-033	1338.82	1338.45	95.23	3.30	0.99

\*n/a：利用できない。

## 【0 1 1 9】

前述された本発明の説明は、例示および説明の目的で提示されている。前述は、本発明を本明細書に開示された形態に限定することを意図するものではない。本発明の説明は、1以上の実施形態ならびに特定の変化された実施形態および改変された実施形態の説明を含んでおり、例えば本開示の理解後の当業者の技術および知識の範囲内であってもよい他の変化された実施形態および改変された実施形態は本発明の範囲内である。特許請求されたものと代替の、交換可能な、および/または均等な構造、機能、範囲または工程を含む、許可される範囲の代替の実施形態を含む権利を取得することを意図するものであり、そのような代替の、交換可能な、および/または均等な構造、機能、範囲、または工程が、本明細書に開示されているかどうかにかかわらず、特許性のある主題を公に捧げることを意図するものではない。本明細書中に引用された全ての参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。

## 【配列表】

2020532496000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/18530

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

----- see extra sheet to continue -----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-4, 10-12, 29 (in part) and 32, limited to the structure of Formula II (SEQ ID NO: 1)

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/18530

**Box No. IV** Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

This disclosure provides a peptide conjugate (PC) that can be used for targeted drug delivery, imaging a patient, or diagnosing a subject for a condition associated with overexpression and/or upregulation of CXCR4, including cancers, HIV infection, and immune disorders. The disclosure provides a high affinity CXCR4 selective binding ligand PC of Formula: P-(L-A)<sub>n</sub> (I) or a pharmaceutically acceptable salt, and PC kits and compositions. The high affinity CXCR4 selective binding ligand peptide conjugate (PC) is useful in diagnosing, treating or imaging a patient. In compound of Formula (I), n is an integer from 1 to the sum of (number of amino acid residues in P and the number of side-chain functional group in the amino acid residue of P); each A is independently a diagnostic agent, a therapeutic agent, or an imaging agent; L is a linker or absent; and P is a high affinity CXCR4 selective binding peptidyl ligand.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 18/18530

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC(8) - C07K 7/06, C07K 7/50, C07K 5/12 (2018.01)  
CPC - C07K 7/64, A61K 51/08, A61K 51/02, A61K 47/62, A61K 38/04

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)

See Search History Document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History Document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History Document

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- A	US 2011/0027175 A1 (WESTER et al.) 3 February 2011 (03.02.2011) abstract, para [0008], [0023]-[0028], [0035], [0036], [0042], [0049], [0059], [0061], [0148], Tables 2-4	1-3, 10-12, 29/(1-3, 10-12), 32  4, 29/4
A	US 2015/0050351 A1 (GONZALEZ) 19 February 2015 (19.02.2015) para [0053], [0144], Fig. 1	4, 29/4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 June 2018

Date of mailing of the international search report

14 JUN 2018

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450  
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300  
PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/18530

Continuation of Box No. III, Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-29, 32 and 34-35 drawn to a high affinity CXCR4 selective binding ligand peptide conjugate (PC) of the Formula P-(L-A)<sub>n</sub>, and to kits and compositions comprising said high affinity CXCR4 selective binding ligand peptide conjugate.

The high affinity CXCR4 selective binding ligand peptide conjugate will be searched to the extent that it encompasses the Formula P-(L-A)<sub>n</sub>, or a salt thereof, n is an integer (1-5, or the sum of side chain functional groups within P), A is one or more diagnostic agents; L is a bifunctional linker; and P is structure II, wherein a is 0, AA.sup.1 is 3-mercaptopropionic acid, AA.sup.2 is cysteine, X.sup.1- X.sup.5 is Arg Arg Lys Lys Lys (SEQ ID NO: 1), R.sup.2 is -OR.sup.4. It is believed that claims 1-4, 10-12, 29 (in part) and 32, limited to the structure of Formula II (claim 4), wherein A is a diagnostic agent; L is a bifunctional linker; and P is structure II, wherein a is 0, AA.sup.1 is 3-mercaptopropionic acid, AA.sup.2 is cysteine, X.sup.1- X.sup.5 is Arg Arg Lys Lys Lys (SEQ ID NO: 1), R.sup.2 is -OR.sup.4, encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass said first named high affinity CXCR4 selective binding ligand peptide conjugate. Additional high affinity CXCR4 selective binding ligand peptide conjugate will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected muscle cell ligands. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "\*" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a high affinity CXCR4 selective binding ligand peptide conjugate (PC) of the Formula P-(L-A)<sub>n</sub>, or a salt thereof, n is an integer (1-5, or the sum of side chain functional groups within P), A is one or more therapeutic agents; L is a bifunctional linker; and P is cyclo(Phe-Tyr-Lys(IPr)-(D-Arg)-2Nal-Gly-(D-Glu))-Lys(IPr)-(mini-PEG6)-Cys(Spadlaxel)-Gly-NH2 (SEQ ID NO: 3), wherein the cyclic structure is formed between the amino of Phe connected to the side chain of D-Glu (claims 1-3, 12-13, 15, 29 (in part), and 34-35).

Group II: Claims 30-31 and 33, drawn to a method of imaging and/or treating cancer in a patient with a high affinity CXCR4 selective binding ligand peptide conjugate.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

## Special Technical Features

Group I+ requires a composition comprising an isolated CXCR4 selective binding ligand peptide conjugate, not required by Group II.

Group II requires a method for imaging and/or treating a patient, not required by Group I+.

## Common Technical Features

No technical features are shared between the isolated high affinity CXCR4 selective binding ligand peptide conjugate of Group I+ accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Group I+ (and II) were considered to share the technical feature of a high affinity CXCR4 selective binding ligand peptide conjugate (PC) of the Formula P-(L-A)<sub>n</sub>, or a salt thereof, n is an integer (1-5, or the sum of side chain functional groups within P), A is one or more diagnostic agents, therapeutic agents, or imaging agents; L is a bifunctional linker or absent; and P is a high affinity CXCR4 selective binding peptidyl ligand, this shared technical features previously disclosed by US 2011/0027175 A1 to Wester et al. (hereinafter "Wester"). Wester teaches a high affinity CXCR4 selective binding ligand peptide conjugate (PC) (abstract "A compound, or a pharmaceutically acceptable salt or ester thereof, comprises a ligand for the chemokine receptor CXCR4 ... the ligand having a binding affinity for the CXCR4 receptor, measured as IC<sub>50</sub> in the presence of .sup.125I-CPCR4, of 250 nM or lower, wherein the ligand comprises a cyclic oligopeptide moiety") of the Formula P-(L-A)<sub>n</sub>, A is one or more diagnostic agents, therapeutic agents, or imaging agents; L is a bifunctional linker (para [0001] "The present invention relates to the imaging and treatment of cancer ... to compositions suitable for the targeting of radionuclides to cells expressing the chemokine receptor CXCR4 for the purposes of imaging and treatment thereof", para [0036] "agents may be bound to appropriate side chains of the amino acids of the cyclic oligopeptides of the invention, or to linker groups bound to appropriate side chains of the amino acids"), and P is a high affinity CXCR4 selective binding peptidyl ligand (para [0011] "In certain preferred embodiments, the cyclic oligopeptide moiety has the sequence: TABLE-US-00001 cyclo[D-Tyr(Me)D-Tyr-B-Arg(Me)Arg-Z-(Ala).sub.n-X]", para [0028] "The cyclic pentapeptide cyclo(D-Tyr-Arg-Arg-Nal-Gly) ... binds to CXCR4 with high affinity." numerous other peptidyl variants are taught by Wester (Tables 2-4)).

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I+ and II therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード ( 参考 )
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	31/18 (2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 K	47/62 (2017.01)	A 6 1 K	47/62	
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	31/337 (2006.01)	A 6 1 K	31/337	
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	51/08 (2006.01)	A 6 1 K	51/08	2 0 0
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00	

(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,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,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,NE,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,JO,JP,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,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(72)発明者 チャン , ユンゲ

アメリカ , ペンシルベニア州 1 9 3 5 5 , モルバーン , 2 1 6 ラップ ロード

(72)発明者 ヤン , リャン ツェン

アメリカ , インディアナ州 4 6 0 3 3 , カーメル , 1 2 4 2 0 スプリングブルック ラン

F ターム(参考) 4C076 AA95 CC09 CC15 CC27 CC35 CC41 EE41 EE59

4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA19 BA23 BA41 BA42 DC50 NA13

ZA961 ZB151 ZB331 ZC202 ZC412 ZC551

4C085 HH03 HH11 KA27 KA29 KB02 KB07 KB09 KB10 KB12 KB15

KB17 KB20 KB52 KB55 KB82 LL18

4C086 AA01 AA02 AA03 BA02 MA01 MA04 NA13 ZA59 ZA96 ZB15

ZB26 ZB27 ZB33 ZC55

4H045 AA10 AA20 AA30 BA15 BA16 BA50 EA28 EA51 FA33