

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6609563号  
(P6609563)

(45) 発行日 令和1年11月20日(2019.11.20)

(24) 登録日 令和1年11月1日(2019.11.1)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 1/113	(2006.01)	C07K	1/113	Z N A
A61K 47/50	(2017.01)	A61K	47/50	
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	N
A61K 49/00	(2006.01)	A61K	39/395	C

請求項の数 13 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-554939 (P2016-554939)
(86) (22) 出願日	平成26年11月24日 (2014.11.24)
(65) 公表番号	特表2016-539190 (P2016-539190A)
(43) 公表日	平成28年12月15日 (2016.12.15)
(86) 國際出願番号	PCT/IB2014/066300
(87) 國際公開番号	W02015/079376
(87) 國際公開日	平成27年6月4日 (2015.6.4)
審査請求日	平成29年11月20日 (2017.11.20)
(31) 優先権主張番号	61/909, 236
(32) 優先日	平成25年11月26日 (2013.11.26)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31) 優先権主張番号	62/002, 614
(32) 優先日	平成26年5月23日 (2014.5.23)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	504389991 ノバルティス アーゲー スイス国 バーゼル リヒトシュトーレセ 35
(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(74) 代理人	100095360 弁理士 片山 英二
(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(74) 代理人	100176094 弁理士 箱田 满
(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ケトンで修飾されたポリペプチドをオキシム複合化する方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ケトンで修飾されたポリペプチドをオキシムで修飾されたポリペプチドに変換する方法であって、

還元可能なジスルフィド結合を含むポリペプチド、水性緩衝液、および 1, 3 - ジハロアセトンの混合物を形成し、次いで前記ジスルフィド結合を還元できる還元剤を添加することによって、前記還元可能なジスルフィド結合を含むポリペプチドを、式 [ P P ] - S - C H<sub>2</sub> - C ( = O ) - C H<sub>2</sub> - S - [ P P ] の連結基(式中、各 S は前記ジスルフィド結合に由来する硫黄であり、[ P P ] は前記連結基の末端が前記ポリペプチドに結合している場所を示す)を含むケトンで修飾されたポリペプチドに変換することと、

前記ケトンで修飾されたポリペプチドをアミン系促進剤の存在下で式 R - O - N H<sub>2</sub> の基と少なくとも 1 mg / mL のポリペプチド濃度で接触させることを含み、式 R - O - N H<sub>2</sub> の基が、式 H<sub>2</sub> N - O - L - P L の化合物(式中、L はリンカーを表し、P L はペイロード基を表す)である、前記方法。

## 【請求項 2】

前記 1, 3 - ジハロアセトンが、1, 3 - ジクロロアセトンである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記還元剤が、水溶性のホスフィンまたはホスフィン塩である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

20

## 【請求項 4】

前記ポリペプチドが、抗体または抗体フラグメントである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

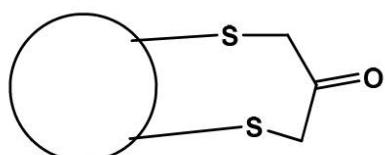
## 【請求項 5】

前記アミン系促進剤が、カルボキシ置換アニリンまたはアシリヒドラジンである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記ケトンで修飾されたポリペプチドが、式：

## 【化 1】



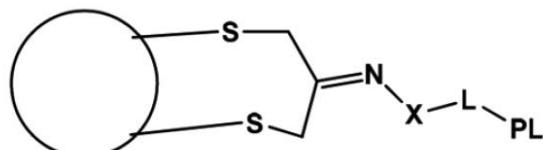
10

(式中、円は前記ポリペプチドを表し、各硫黄原子は、前記ポリペプチドのシステイン残基のスルフィドリルである)のものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

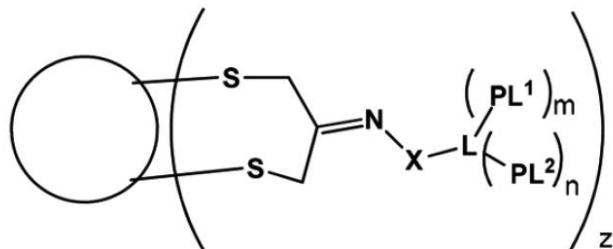
前記オキシムで修飾されたポリペプチドが、式：

## 【化 2】



20

または



30

(式中、X は O であり、L はリンカーを表し、z は 1 ~ 10 の整数であり、m および n はそれぞれ独立に 1 ~ 10 の整数であり、PL、PL<sup>1</sup> および PL<sup>2</sup> は、出現する毎に独立に、ペイロード基を表す)のものである、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記ポリペプチドが抗体である、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記ポリペプチドがワクチン担体である、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

。

## 【請求項 10】

前記ペイロードが、治療薬を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記ペイロードが、検出可能な標識または結合基を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

40

50

L が、開裂可能な連結部分を含む、請求項1\_1に記載の方法。

【請求項 1 3】

L が、

(a) 結合、-O-、-S-、-NH-、-N((C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>)アルキル)H-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-；  
 (b) (C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルキニレン、-Z-(C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>)アルキレン、-Z-(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルケニレン、-Z-(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルキニレン、(C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>)アルキレン-Z-(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルキニレン-Z-(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルキニレン [式中、Zは、-NH-、-N((C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>)アルキル)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-、(C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、フェニレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクレンであり、前記(C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>)アルキレン、前記(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルケニレン、および前記(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルキニレン部分は、それぞれ独立に、前記部分内に散在する1~10個の酸素原子を任意選択で含んでいてもよい]；  
 (c) (C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、(C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>)シクロアルキレン-Y-(C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、-Y-(C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、フェニレン、-Y-フェニレン、フェニレン-Y-フェニレン、ヘテロアリーレン、Y-ヘテロアリーレン、ヘテロアリーレン-Y-ヘテロアリーレン、ヘテロシクレン、-Y-ヘテロシクレン、またはヘテロシクレン-Y-ヘテロシクレン [式中、Yは、(C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルキニレン、-O-、-C(O)-、-S-、-NH-、-N((C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>)アルキル)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、または-NH-C(O)-であり、前記(C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、前記フェニレン、前記ヘテロアリーレン、および前記ヘテロシクレン部分は、それぞれ独立に、ハロ、(C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>)アルキル、またはハロ置換(C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>)アルキルから選択される1~3個の置換基で、任意選択で置換されていてもよい]；  
 (d) -[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub>-または-J-{CH<sub>2</sub>[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub>}<sub>w</sub>- (式中、vは1~2,000であり、wは1~4であり、JはCH<sub>2</sub>またはNHである)；  
 (e) 1~100個のアミノ酸を含むペプチド；および  
 (f) デンドリマー、デンドロン、および超分岐ポリマーを含む樹状高分子から選択される少なくとも1つのスペーサーを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

広範な種類の化学的部分（「ペイロード」）が、酵素、抗体、およびその他の大きなポリペプチドまたはタンパク質に共有結合で結合し、複合体を形成している。ペイロードは、それらが結合しているタンパク質の位置を特定するために（例えば、標識）、タンパク質の物理化学的性質または安定性を改変するために（例えば、PEG化）、タンパク質を別の分子またはタンパク質に結合することを可能にするために（複合体を別の化合物または別の複合体に連結するためのカップリング基）、あるいはペイロードまたはタンパク質の機能または活性を改変するために（例えば、ワクチン複合体）使用することができる。タンパク質は、また、抗体-薬物複合体（ADC）のように、結合したペイロードを特定の組織または細胞型に送達するための担体として作用することができる。タンパク質に有用的に連結させることのできる部類のペイロードとしては、検出可能な部分（標識）、タンパク質を表面または別の化合物に結合するための繫留部分、タンパク質に複合された場合に免疫応答を誘発する抗原、化学相補性カップリングパートナーと容易に反応する（したがって、タンパク質を別の存在物に連結する）カップリング基、および細胞毒およびその他の生物活性薬剤などの治療部分が挙げられる。これらの多様な構造体をタンパク質に、制御されおよび再現性のある様式で結合することは、複合体が正しく機能するために、しばしば決定的に重要である。したがって、多くの種類のペイロードを多くの異なるタン

10

20

30

40

50

パク質またはポリペプチドに結合するための種々の方法が求められている。

#### 【0002】

ペイロードをタンパク質に結合してタンパク質複合体を形成するためのいくつかの方法が開発されている。例えば、Sletten,E.M and Bertozzi,C.R. *Angew.Chem. Int.Ed.* 2009, 48, 6974 ~ 6998、Basile',E., Joubert,N., and Puchault,M. *Chemistry & Biology* 2010, 17, 213 ~ 227を参照されたい。一部のタンパク質複合体において、タンパク質とペイロードを連結する方法は、複合体の活性または関連特性に検知できない影響を及ぼす可能性があり、他の例において、タンパク質とペイロードとの間の連結部の性質が、複合体の活性または特性に重大な影響を及ぼすことがある。時には、例えば、タンパク質当たりのペイロード部分の数を調節すること、またはペイロードがタンパク質の機能を妨害しないようにペイロードが結合する位置を精密に調節することが決定的に重要である。例えば、ADCは、選択性を付与するために、タンパク質が標的細胞上の表面構造体を認識し、それに結合することを必要とし、それゆえ、ペイロードは、抗体が認識しなければならない表面構造体（抗原）への抗体の結合を妨害するように配置されてはならない。例えば、*Expert Opin.Biol.Ther.* 2012, 12, 1191 ~ 1206、*Toxins* 2011, 3, 848 ~ 883、およびLaurent Ducry *Drug Delivery in Oncology:From Basic Research to Cancer Therapy*, 1st Edition Wiley-VC H Verlag GmbH & Co.KGaA, 2012, 12, 355 ~ 374を参照されたい。

10

#### 【0003】

ペイロードをタンパク質に結合するためのほとんどの方法は、タンパク質と注目の特定ペイロードとの間に連結化学構造（リンカー）を付加することを含む。リンカーは、それぞれの部分上の利用可能な官能基を使用して、注目のペイロードをタンパク質に連結するための手段を提供する。リンカーは、しばしば、ペイロードとタンパク質との間の距離を調節することを可能にし、インビオで溶解または分解して、タンパク質からペイロードを放出することのできる開裂性部分を含むこともでき、ここで、該放出は、ペイロードがその目的を達成するために重要である。例えば、ADCにおいて、複合体が所望の効果を有することのできる場所で分解し、ペイロードを放出することが、決定的に重要である可能性がある。ペイロードとタンパク質とを連結する方式に対して様々な要求を提起する多様な部類のタンパク質 - ペイロード複合体のために、ペイロードをタンパク質に堅実および効率的に連結するための新規な方法が、求め続けられている。

20

#### 【0004】

タンパク質複合体を形成するための最も一般的な方法は、多くの天然タンパク質中に天然に存在する特定のアミノ酸の化学反応性に依拠し、リシンおよびシステインは、ペイロードをタンパク質に連結するための反応部位を提供するので、しばしば利用される。リシンは、連結基またはペイロード上の適切な求電子性官能基と反応することのできる遊離アミノ基を有し、システインは、その遊離スルフヒドリル基を介して反応することができる。しかし、これらの天然に存在する反応部位に依拠することは、複雑になることがあり、注目のタンパク質中に特定の種類のアミノ酸が、あまりに多くまたはあまりに少なく存在すると、例えば、タンパク質上へのペイロードのまさに適切な「付加（loading）」を得ることが困難になる。タンパク質表面上でのリシンの高い存在度は、部位およびレギオ選択的複合を困難にし、不均一生成物をもたらす。対照的に、システインは、比較的まばらであり、主として、ジスルフィドで連結された対の状態でタンパク質中に存在する。システインにおける複合化は、しばしば、ジスルフィドの還元、それに続く個々のシステインを別々に標識するための複合試薬（例えば、マレイミド）との反応を必要とする。これはジスルフィド連結部を除去するので、タンパク質の構造および安定性が、この過程によって傷つけられる可能性がある。

30

#### 【0005】

タンパク質は、また、しばしば、結合するペイロードの最適数に比べてより多くのリシンを有し、堅実で均一な生成物を保証するために、利用可能なリシンのすべてを占拠するのに十分なペイロード部分を付加することは、最適な効力に対してあまりに多くのペイロード分子を付加する可能性がある。このことは、リシンの一部のみを複合化のために使用

40

50

することによって回避できるが、このような部分的または不完全な付加は、一般に、種々の理由により問題となる可能性のある不均一生成物を提供し、例えば、最初に商業化されたADCであるMylotarg（商標）の場合、ADC製品の不均一性は、製品の登録を撤回する決定につながった問題の一因になったと思われる。Fuenmayor, et al., Cancers, vol. 3, 3370~93(2011)。また、最適な付加のために十分な個々の種類（例えば、リシン）のアミノ酸基が存在する場合でさえ、タンパク質がその溶液中での立体配座の状態で存在するなら、それらのアミノ酸基の一部または全部は、該タンパク質の内部に「埋蔵」されている可能性があり、効果的にそれらを複合化に利用できないようにするか、あるいはそれらを「部分的」に接近可能にし、このことが複合体の不均一性をもたらすこともある。したがって、リシンは、複合化のために有用な部位であり得るとはいえ、多くの状況下で、それは理想的ではない。 10

#### 【0006】

天然タンパク質中のシスティンの出現頻度は、リシンのそれに比べてより低く、システィンは、適切な数で利用できる複合化のための部位として使用するのに適している可能性があり、存在するシスティンがあまりにも少ないなら、標準的なタンパク質修飾法により、1つまたは複数を、挿入することができる。しかし、しばしば、システィンの挿入による天然タンパク質の配列変更を回避することが好ましく、そのうえ、天然タンパク質中の表面接近可能なシスティンは、しばしば、他のシスティンの近傍に配置され、タンパク質の活性な立体配置を維持するために重要である可能性のあるジスルフィドを形成する。ジスルフィドを還元することによって2つの遊離システィンに変換することは困難ではないが、そうすることは、タンパク質の二次または三次構造を混乱させる可能性がある。 20

#### 【0007】

タンパク質上のジスルフィドを還元することによって形成されるシスティン残基の間にテザー（tether）を挿入することを試みるためのいくつかの方法が報告されている。このような方法の1つは、スルホン置換メタクリレート誘導体を必要とする（米国特許出願公開第2006/0210526号）。この方法は、環化の前に脱離ステップを必要とする反応性中間体を形成し、その複数ステップ法のための条件は、システィン間のリンカー（テザー）の不完全な形成をもたらすことがあり、反応条件は、タンパク質の変性を引き起こすことさえある。別の手段は、マレイミド誘導体を使用する（国際公開第2011/018613号）。しかし、この方法で形成される複合体は、マレイミドへのチオールのマイケル付加が可逆性なので、安定性の問題で苦慮する。したがって、化学的部分を、ジスルフィド連結部を含むタンパク質に複合化してタンパク質複合体を形成するための改善された方法が必要とされている。とりわけ、ジスルフィドの立体配置を制御する効果を放棄することなしに、効率的な複合化、安定性、および一貫したペイロード/タンパク質比も提供しながら、ジスルフィドの構成要素（スルフヒドリル）を利用する方法が求められている。さらに、タンパク質を特定の立体配置に保持するように固定化する方法（例えば、Expert Opin. Drug Discov. (2011), 6(9):937~963、Tetrahedron 55(1999)11711~11743参照）、また、固定化されたタンパク質をペイロードと複合化するための手段を提供する方法が必要とされている。本発明は、ケトンで修飾されたタンパク質またはポリペプチドとアルコキシアミン化合物との間のオキシムを形成するための改善された方法を含むこのような方法を提供する。 30

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

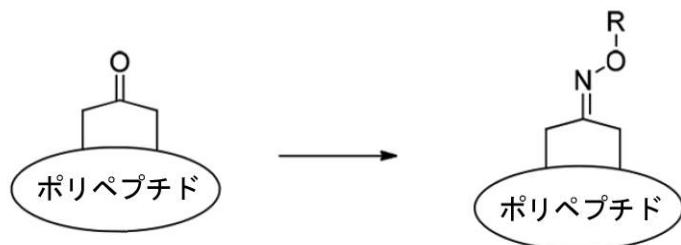
本発明は、下記反応で例示するように、ケトンで修飾されたポリペプチドまたはタンパク質をアミノオキシ化合物（例えば、アルコキシアミンまたはアリールオキシアミン）と複合化して、オキシムで修飾されたポリペプチドまたはタンパク質を形成するための改善された方法を提供する。該方法は、高効率のオキシム形成を促進し、オキシムのより高い収率およびより完全なオキシム形成を提供する条件を選択することを含み、結果として、オキシム形成の収率が改善され、かつ2つ以上のケトンで修飾されたポリペプチドまたは 40

タンパク質に関して生成物の均一性が改善される。該方法は、典型的にはpH 3 ~ 8の緩衝液中での、促進剤としてのアミンまたはアミン塩の使用を含む。一般に、促進剤または緩衝液あるいはその双方は、カルボン酸を含み、例えば、酢酸塩または安息香酸塩の緩衝液を使用することができる。任意選択で、該アミンをカルボン酸塩として使用することができ、あるいは、そのアミンは、双性イオンであってもよいカルボキシ置換アミン化合物でもよい。アニリン、アミノ安息香酸、3, 5-ジアミノ安息香酸、ヒドラジン、および3, 5-ジカルボキシアニリンは、これらの方で使用するのに適したアミンである。

【0009】

【化1】

10



【0010】

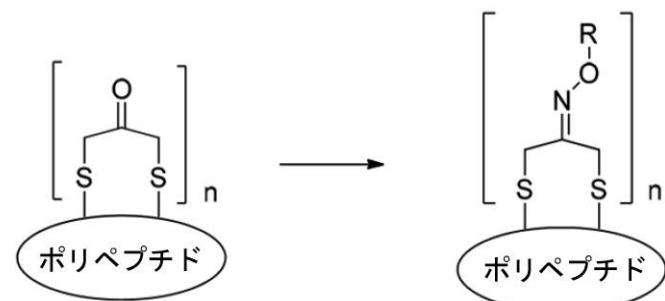
好ましい実施形態において、ケトンで修飾されたポリペプチドおよびオキシムは、下記で示される式のものであり、ここで、その硫黄原子は、ポリペプチド中のシステイン基に由来する：

20

【0011】

【化2】

30



式中、nは、2 ~ 8、好ましくは2または4であり、nは、ポリペプチド上に存在するケトン修飾またはケトン修飾に由来するオキシムの個数を示す。ポリペプチドは、抗体または抗体フラグメントでよく、その2つの硫黄原子は、ポリペプチドの鎖間ジスルフィド結合に由来する。改善された方法は、オキシムの形成効率を高めるので、それらの方法は、nが1を超えるペプチドにおいて、複合生成物の均一性を改善するのでとりわけ有用である。特に、ケトン修飾に利用可能な4つのジスルフィドが典型的には存在する抗体において、改善された方法は、1つの抗体分子につき4つのペイロード基を有する抗体-薬物複合体(ADC)などの複合生成物(DAR = 4)の収率を高める。その不均一性が米国FDAにより最初に承認されたADCの市場からの撤退の一因となったと考えられるMylotarg(登録商標)の顛末によって例示されるように、ADCにおける均一性の重要性は、広く確認されている。

40

【0012】

一態様において、本発明は、タンパク質表面上でジスルフィドを形成する2つのシステイン残基を利用して、ペイロードをタンパク質に連結して、タンパク質複合体を形成する方法を提供する。該方法は、ジスルフィドを還元して2つの遊離チオール基を提供すること、および2つのチオール基を、それらがジスルフィドを形成した場合に占拠するのとほ

50

ぼ同一の場所にそれらを保持するテザーを用いて相互に結び付けることを含む。システイン基をそれらのほぼ同一場所に保持することは、ジスルフィドの還元で生じる可能性のあるタンパク質の立体配置に対するいかなる有害効果をも最小化する。2つのチオール基を相互に連結するために導入されるテザーは、注目のペイロードを結合するのに使用できる反応性官能基を含む。一部の実施形態において、テザーは、外部のアミン基とイミン、オキシム、またはヒドラゾン連結部を形成するのに十分な反応性のあるカルボニル基を含み、ペイロードは、このような連結部を形成することによって活性化タンパク質に複合化される。例えば、還元されたタンパク質は、ジクロロアセトンまたはジブロモアセトンなどの1, 3-ジハロアセトンと反応し、それによって、2つの硫黄原子を相互に連結する3炭素テザーを挿入することができる。このことは、ジスルフィドの効果、すなわち、タンパク質を、ジスルフィドが存在した場合に有したものに極めて類似した立体配置に保持することを適切に模擬している可能性があり、同時に、それは、ジスルフィドに比べてより大きな安定性およびペイロードに結合するための場所も提供する。本発明の方法および組成物中で使用されるテザーは、化学的に反応性のある官能基を提供し、2つのシステインの硫黄原子間にこの種のテザーを含むタンパク質は、本明細書中で活性化タンパク質と呼ばれる。好ましいテザーは、還元されたジスルフィド基を1, 3-ジクロロアセトンと反応させることによって得られるケトンリンカー、すなわち-CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-である。ペイロードは、テザー上の官能基を使用して活性化タンパク質に結合することができる。

## 【0013】

タンパク質のチオールをジハロアセトンと反応させることによって形成されるテザーは、例えば、複合用部位としてカルボニルを提供する。適切なアミンを含むペイロード（アミノ化ペイロード）、好ましくは、本明細書中でさらに説明するような式R-O-NH<sub>2</sub>のアミノオキシを、このような活性化タンパク質に、ペイロードのアミノオキシ官能基とテザーのカルボニル基（ケトン）との間でオキシムを形成することによって容易に複合化することができる。好ましい実施形態において、2つのシステイン残基の間に挿入されたケトンを有する活性化ポリペプチドまたはタンパク質を、アミン系促進剤の存在下でアルコキシアミン（RONH<sub>2</sub>）（ここで、アルコキシ基（R）は、治療薬、または治療薬を結合するのに使用できる反応性基などのペイロードを含む）と接触させる。適切なアミン系促進剤としては、アニリンまたはアニリニウム塩（例えば、酢酸アニリニウム、安息香酸アニリニウムなど）、アシルヒドラジン（例えば、アセチルヒドラジン）、アミノ安息香酸（PABA、3-アミノ安息香酸など）、3, 5-ジアミノ安息香酸、3, 5-ジカルボキシアニリンなどが挙げられる。効率的なオキシム形成を促進するのに適した反応条件は、本明細書中で提供される。

## 【0014】

これらの方法は、1つまたは複数の接近可能なジスルフィド連結部を有する任意のタンパク質に適用することができ、500Daを超える、典型的には2, 000Daを超える分子量を有し、ジスルフィドが本来の形態または活性形態のタンパク質中に存在する、天然タンパク質に対して概して有用である。それらの方法は、1つを超えるジスルフィド、例えば、2~10個、あるいは典型的には6個までのジスルフィド基（その少なくとも1つは、通常的なジスルフィド還元剤によって還元されるように十分に表面に接近できる）を含むタンパク質と共に使用することができる。これらの方法は、利用される各ジスルフィド基に対して少なくとも1つのペイロードを含む複合体をもたらし、テザーは、実質上、タンパク質の本来のまたは活性な立体配置を保持する。

## 【0015】

別の実施形態において、本発明は、2つのシステイン残基を相互に結び付けることによってタンパク質を固定化し、強固な立体配置を提供する手段を提供し、ここで、固定化する方法は、次には固定化されたタンパク質をペイロードに複合化させるのに使用できるケトンを含む連結部を用いて、2つのシステインを相互に結び付ける。固定化は、本明細書中でさらに説明するように、少なくとも2つのシステイン残基を含むタンパク質を1, 3

-ジクロロアセトンまたは1,3-ジプロモアセトンなどのジハロケトンと反応させて、[Cys1]-S-CH<sub>2</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-S-[Cys2]連結部を含む環化タンパク質を形成すること、次いで、該連結部が式H<sub>2</sub>N-O-L-PLのアミノオキシ化合物と反応してオキシムの形成を介して複合体を形成することを可能にすることによって完遂される。本発明は、固定化されたこれらの複合ペプチドの改善された調製方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】ジスルフィドを含むタンパク質から始まり、タンパク質-ペイロード複合体を提供する、本発明の適用(XがOである場合)を説明するスキームを示す図である。

10

【図2】複合体のペイロードとして相補的カップリング基を有する2つのタンパク質-ペイロード複合体のカップリングを説明する図である。

【図3】出発タンパク質、活性化タンパク質、および実施例1のタンパク質複合体に関する質量スペクトルを示す図である。

【図4】実施例1からのアジド置換CRM197構築物のSDS-PAGEゲル分析を示す図である。

【図5】実施例4に関する活性化タンパク質の概略図、および活性化(ケトンで修飾された)タンパク質に関するLC-MSデータを示す図である。

【図6】実施例4に記載のタンパク質-ペイロード複合体の概略図、および生成物に関するLC-MSデータを示す図である。

20

【図7】実施例6、方法Aの複合体および還元型複合体のゲルを、比較のための分子量ラダーを添えて示す図である。図は、さらに、方法Bの生成物のLC-MSを示し、該LC-MSはいくつかの異なる複合体の形成を示している。

【図8】実施例7からの、ステップ1;ステップ2の方法A(PL1);およびステップ2の方法B(PL2)の生成物に関するLC-MSデータを示す図である。

【図9】実施例8の生成物に関するSDS-PAGEゲルおよびLC-MSデータを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

「タンパク質」およびポリペプチドは、本明細書中で使用する場合、アミド(ペプチド)結合により連結された5個以上、典型的には10個以上のアミノ酸残基を含むペプチドを指す。典型的には、本明細書に記載のタンパク質は、天然に存在するアミノ酸を主として含むか、それらのアミノ酸のみを含むが、本発明の方法は、1つまたは複数の非天然アミノ酸を含むポリペプチドに対しても等しく有用である。一般に(しかし必須ではないが)、アミノ酸は、ほとんどが、または完全にL配置を有し、普通の「必須」アミノ酸から選択される。

30

【0018】

<省略形>

D A R	薬物 / 抗体比	
D C M	ジクロロメタン	
D I C	ジイソプロピルカルボジイミド	
D I P E A	ジイソプロピルエチルアミン	
E D T	エタンジチオール	
H B T U	N, N, N', N' - テトラメチル-O-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムヘキサフルオロホスフェート	
M e C N	アセトニトリル	
N M P	N-メチルピロリジノン	
P B S	リン酸緩衝化生理食塩水	
T C E P	トリス(カルボキシエチル)ホスフィン	
T F A	トリフルオロ酢酸	

40

50

## TIPS トライソプロピルシラン

## 【0019】

本発明は、ケトンで修飾されたポリペプチドを置換アルコキシアミンと複合化する場合に、オキシムを形成するための改善された条件を提供する。改善された条件は、オキシムの形成を促進するためにアミン系促進剤を使用し：アニリンも使用できるが、置換アニリン、とりわけ本明細書中で開示されるようなカルボキシ置換アニリンがより適している。アセチルヒドラジンまたはベンゾイルヒドラジドなどのアシルヒドラジドも使用できる。アミン系促進剤は、遊離アミンとして、または任意の適切な対イオンを有するアミン塩として添加することができ、一部の実施形態において、酢酸またはクエン酸などのカルボキシレートの対イオンが好ましい。典型的には、過剰のアミン系促進剤が使用される。

10

## 【0020】

反応は、典型的には、pH 3 ~ 8、好ましくは pH 4 ~ 8 の緩衝液中で実行される。種々の緩衝液、例えば、PBS、Tris、リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、ギ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどを使用して適切な pH を維持することができる。反応に適したポリペプチド濃度は、通常に使用される濃度に比べてより高く、一部の実施形態において、ポリペプチド濃度は、少なくとも 1 mg / mL、または少なくとも 2 mg / mL であり、好ましくは約 5 mg / mL 以上で、溶解が危うくなる濃度まで、例えば約 25 mg / mL までである。

## 【0021】

反応は、典型的にはポリペプチドの構造および機能を維持するのに適した温度で実施され；温度は、通常、4 ~ 70 の間、好ましくは 10 ~ 30 の間である。0.5 ~ 48 時間の反応時間を費やすことができる：妥当な反応時間は、既知の方法で反応の進行を監視することによって容易に決定することができる。約 4 ~ 約 25 の間の温度で、一般には 1 時間未満から約 4 時間までの反応時間で十分である。

20

## 【0022】

一部の実施形態において、該方法は、1,3-ジクロロアセトンの存在下でポリペプチドのジスルフィドを還元することを含む。本明細書中で提供されるデータは、ポリペプチドの緩衝溶液にジクロロアセトンを添加した後にジスルフィド結合を開く還元剤を添加すると、予想外にも、生成物の収率の実質的な改善を示すことを立証している。ジスルフィドの還元を開始する際にジクロロアセトンを存在させることは、ポリペプチド上で 1 つを超えるジスルフィド結合を還元する場合にとりわけ重要である。例えば、ポリペプチドが抗体である場合、TCEP での還元は、4 つの鎖間ジスルフィド結合を還元し、ジクロロアセトンと反応して 4 つのケトン含有テザー基を導入することを可能にする。最初に TCEP を添加して還元ステップを開始した後にジクロロアセトンを添加することによって反応を行うと、完全に修飾された抗体の収率は、約 33 ~ 35 % であった (pH 8.0、緩衝液として 50 mM Tris、外界温度)。ポリペプチド生成物の約 50 % が、軽鎖フラグメントに共有結合で連結された重鎖フラグメントを含んでいた。1,3-ジクロロアセトンをポリペプチド基質と共にブレインキュベートした後に同一条件下で TCEP を添加すると、完全に修飾された抗体の収率は、75 ~ 77 % まで増加した。これらの反応に関する生成物の組成は、マイクロチップ電気泳動 SDS 法によって評価した (参照: Electrophoresis 2012, 33, 765 ~ 772)。HCHC、HCLC、および HCHCHLC フラグメントの検出は、共有結合で繋ぎ留められた注目の生成物 (鎖間ジスルフィドの 1 つまたは 2 つが、ジクロロアセトン由来のテザーで置き換えられている) に対する部分的修飾の存在を示し、(HCH)<sub>2</sub> (LCL)<sub>2</sub> に相当する「インタクトな」抗体は、ジクロロアセトン由来のテザーによって置き代えられた鎖間ジスルフィドのそれぞれを有する完全に修飾された四量体型抗体に対応する。

30

## 【0023】

本発明の適用の実施例を図 1 に示す。図は、露出されたジスルフィド基を有し、円として表現されたタンパク質を描写している。ジスルフィドは、還元され、ジスルフィドに由来する 2 つの遊離チオールを有する還元型タンパク質を形成している。還元型タンパク質

40

50

は、次いで、ジハロアセトンまたは類似のビス - 求電子剤（例えば、1, 3 - ジクロロアセトンまたは1, 3 - ジブロモアセトン）と反応して、活性化タンパク質を形成することができ、ここで、2つのチオールは、官能化されたテザーを介して相互に連結され、この実施例中のテザーは、シップ塩基の形成に対して比較的反応性のあるケトン基を含む。次いで、ペイロード分子は、活性化タンパク質のテザーにシップ塩基の形成を介して連結されて、タンパク質複合体を提供する。実施例中のペイロードは、連結基を介してテザー結合する。式  $H_2N - X - L - PL$  (式中、PLはペイロード化合物である) の化合物は、リンカーラインによってPLに連結されている活性化アミン基 ( $H_2N -$ ) を含み、アミンは、ケトンのカルボニルとPLに結合したアミンとの間でのシップ塩基の形成を促進するアミノオキシまたは類似の活性化アミン、-X-NH<sub>2</sub> (式中、XはOである) を使用することによって特に活性にされる。代わりの実施形態は、図1の還元型タンパク質のような2つの遊離システイン基を有するタンパク質から始まり、それらのシステイン基を使用して、タンパク質を拘束された立体配置に「固定化し」、同時に、固定化されたタンパク質上に複合化されるペイロードのための結合点をも提供する。

#### 【0024】

本発明の方法は、ケトンで修飾された任意のポリペプチドと共に使用するのに適しているが、2つのシステイン間に少なくとも1つのジスルフィド連結部を含む、または1, 3 - ジハロアセトン反応物との反応によって相互に連結され得る2つの遊離システイン残基を含むタンパク質から複合体を形成するのに特に有用である。典型的には、タンパク質は、2つのチオールが、ジクロロアセトンまたはジブロモアセトンと本明細書に記載の条件下で反応して、2つのチオールの少なくとも50%の相互連結をもたらすタンパク質であり、相互連結の程度は、しばしば、少なくとも約70%、80%または90%である。

#### 【0025】

相互に連結される2つのシステインは、単一のポリペプチド上に存在することができ、あるいはタンパク質コンプレックスを形成する別個のポリペプチド上に存在することができる。特定の実施形態において、該方法は、1~6個のジスルフィド連結部または2~6個の遊離システイン残基を有するタンパク質を利用し、これらのジスルフィドの少なくとも1つの還元を必要とする。ジスルフィドを含むタンパク質は、単一のポリペプチド配列内にジスルフィド連結部を含む、またはジスルフィドが1つのポリペプチド配列を別のアミノ酸またはポリペプチドに連結しているタンパク質コンプレックスである、少なくとも5個のアミノ酸残基、好ましくは少なくとも10個のアミノ酸を有する任意のポリペプチドであり得るが、ただし硫黄原子間にテザーを挿入するためにジスルフィドを還元した場合に、複合体は急速には解離しない。本発明の方法中で使用するための典型的なタンパク質としては、約5~約5000個のアミノ酸、典型的には少なくとも10~約1000個までのアミノ酸を含む環状ペプチドおよび線状ペプチド、例えば、酵素または受容体などの機能性タンパク質；少なくとも1つのジスルフィド連結部（しばしば、2つの別個のポリペプチド鎖を連結している）を有するタンパク質コンプレックス；構造タンパク質；ワクチンの足場として使用されるCRM197またはアジュvant活性を有するその他のタンパク質などのタンパク質；ならびに抗体または抗体フラグメントが挙げられる。これらのことから、有用なタンパク質としては、抗体、特に、遺伝子操作された抗体をはじめとするモノクロナール抗体、修飾抗体および抗体フラグメント；CRM197などのワクチン担体タンパク質；および少なくとも1つのジスルフィド連結部または少なくとも2つのシステイン残基を有し、および500~500,000、典型的には1,000~200,000の分子量を有する単鎖タンパク質が挙げられる。抗体またはその他のタンパク質を操作して1つまたは複数のシステイン残基を導入するための、例えば、抗体を修飾するための方法は、当技術分野で周知である。

#### 【0026】

該方法は、少なくとも2つの鎖間ジスルフィドを有する抗体および抗体変異体、例えばIgGおよびFcにとって特に有用である。該方法は、また、ジフテリアトキソイド、ジフテリア毒素(197)の非毒性交差反応性材料(CRM197)、破傷風トキソイド、

10

20

30

40

50

キーホールリンペット・ヘモシアニン、髄膜炎菌 (*N.meningitidis*) 外膜タンパク質、および分類不能型インフルエンザ由来タンパク質Dなどのワクチン担体タンパク質に対して有用である。これらのワクチン担体タンパク質は、既知の方法によっておよび/または本明細書に開示の方法によって、抗原を用いて官能化できる。本発明の方法は、また、TLRアゴニスト (TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8またはTLR9のリガンド) などのアジュバント化合物、例えば、イミキモド、イミダゾキノリン、およびガルジキモド、PRRリガンド、RLRリガンド、NOD2リガンド、環状d<sub>i</sub>-AMP、環状d<sub>i</sub>-GMP、フラゲリン、モノホスホリル脂質A、N-グリコール化ムラムルジペプチド、CpGオリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN)、トリアシル化リポタンパク質、またはポリ (I : C) を結合して、高められた免疫応答を提供するのに使用できる。10

### 【0027】

本発明の方法および組成物中で使用するためのジスルフィド含有タンパク質のジスルフィド連結部は、還元されて2つの遊離チオール基を形成し、このような還元のための方法は、当技術分野で周知である。一部の実施形態において、還元は、タンパク質の周囲の溶媒に容易に接近できるジスルフィド連結部を選択的に還元する還元剤を使用して実施され、1つの適切な還元剤が、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) およびその塩である (Analytical Biochemistry 273, 73~80 (1999) 参照)。その他の公知のジスルフィド還元剤、例えば、ジチオトレイトル、2-メルカプトエタノール、システアミン、ジチオブチルアミン (JM Perkel, Chem. Eng'g News, Feb. 29, 2012, Lukesh, et al., J. Am. Chem. Soc., 134, 4057~59 (2012))、およびトリブチルホスフィンなどのトリアルキルホスフィン (国際公開第2008/157380号) も使用できる。タンパク質中のジスルフィドを還元する方法は、当技術分野で周知である。20

### 【0028】

連結基Lは、ペイロード化合物を-X-NH<sub>2</sub>に連結する任意の適切な有機連結部でよく、ここで、XはOを表す。適切な連結部のいくつかの例としては、[X]-(CH<sub>2</sub>)<sub>1~6</sub>-[PL]、[X]-CH<sub>2</sub>C(=O)-[PL]、[X]-CH<sub>2</sub>C(=O)-NH-[PL]、[X]-CH<sub>2</sub>C(=O)-O-[PL]、[X]-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-[PL]、[X]-フェニル-C(O)NH-[PL]、[X]-(CH<sub>2</sub>)<sub>1~10</sub>-C(=O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2~10</sub>-NH-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>0~10</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>0~10</sub>-(AA)<sub>0~10</sub>-[PL] (AAは、必須アミノ酸のいずれか、例えば、Glu、Gly、Ala、Aspなどでもよい)などが挙げられ、ここで、nは、典型的には、1~20であり、[X]および[PL]は、それぞれ、リンカーの末端がXおよびPLに結合することを示す。一部の実施形態において、リンカーLは、複合体上に付加されるペイロードを増加させるために結合した2つまたは3つのペイロードを有することができ、ここで、1つを超えるペイロードは、所定のリンカーに結合し、ペイロードは同一または異なっていてもよい。適切なリンカーは、また、これらの基の構成要素の組合せを含むことができ：リンカーの性質は、本発明の実施にとって重要ではなく、少なくとも1つのペイロードPLへ結合するための方法の利便性および利用能に、または複合体に対して所望の物理化学的特性に基づくことができる。適切なリンカーの選択は、通常的技術レベルに包含され、ペイロードの構造、およびペイロードをリンカーLに結合するように修飾するのに利用可能な方法に依存する。典型的には、リンカーは、アミドまたはエステル基を介して、一方のまたは双方の末端で結合し；しばしば、リンカーLは、プロテアーゼまたはエステラーゼの活性によるインビオでの溶解を可能にするためのペプチド結合 (例えば、カテプシンBにより開裂されるVal-Citジペプチド、またはカテプシンBによって同様に開裂可能なGly-Phe-Leu-Gly (配列番号1)) またはエステルを含み；任意選択で、リンカーは、1つまたは複数のエチレンオキシド単位 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) を含み；多くの実施形態において、リンカーは、少なくとも1~6つまでのアミノ酸部分を含む。Lの適切な実施形態は、また、1つまたは複数のスペーサーを含むことができ、スペーサーは、次の群：304050

(a) 結合、-O-、-S-、-S-S-、-NH-、-N((C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>)アルキル)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-；

(b) (C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルキニレン、-Z-(C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>)アルキレン、-Z-(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルキニレン-、(C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>)アルキレン-Z-(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルキニレン-Z-(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルキニレン[式中、Zは、-NH-、-N((C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>)アルキル)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-、(C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、フェニレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクレンであり、前記(C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>)アルキレン、前記(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルケニレン、および前記(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルキニレン部分は、それぞれ独立に、酸素原子が、少なくとも1つ、好ましくは2つの炭素原子で隔てられるよう、前記部分内に散在された1つまたは複数の酸素原子を任意選択で含んでいてもよい]、

(c) (C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、(C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>)シクロアルキレン-Y-(C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、-Y-(C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、フェニレン、-Y-フェニレン、フェニレン-Y-フェニレン、ヘテロアリーレン、Y-ヘテロアリーレン、ヘテロアリーレン-Y-ヘテロアリーレン、ヘテロシクレン、-Y-ヘテロシクレン、またはヘテロシクレン-Y-ヘテロシクレン[式中、Yは、(C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>~C<sub>20</sub>)アルキニレン、-O-、-C(O)-、-S-、-NH-、-N((C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>)アルキル)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、または-NH-C(O)-であり、前記(C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、前記フェニレン、前記ヘテロアリーレン、および前記ヘテロシクレン部分は、それぞれ独立に、ハロ、(C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>)アルキル、またはハロ置換(C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>)アルキルから選択される1~3個の置換基で任意選択で置換されていてもよい]、

(d) -[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub>- (式中、vは1~2,000、好ましくは1~10である)、

(e) 1~100個のアミノ酸、好ましくは1~30個、または1~6個のアミノ酸を含むペプチド、

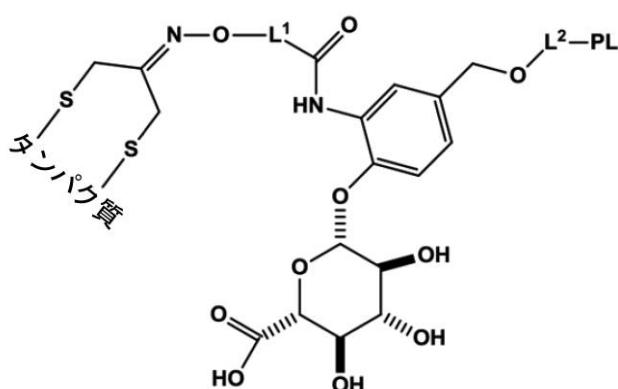
(f) 2、3、4、5または6、あるいは2~10個のペイロード部分を保持できる多価リンカー、から選択することができる。

#### 【0029】

さらに、Lは、Val-Cit(バリン-シトルリン、カテプシンBにより選択的に開裂されるジペプチド)またはVal-Cit-PABC(バリン-シトルリンp-アミノベンジルカルバメート、Bioconjugate Chem.19(10),1960~63(2008)参照)などの開裂可能なリンカー、ジスルフィド、あるいは次式:

#### 【0030】

#### 【化3】



10

20

30

40

50

[式中、タンパク質は、複合化のためのタンパク質を表し、PLは、本明細書に記載のようなペイロードであり、L<sup>1</sup>およびL<sup>2</sup>は、独立に、前に記載したような基Lなどの任意選択のリンカーである(ACS Med.Chem.Letters,vol.1,277~280(2010))]で表されるリンカーのような、グルクロニダーゼによって開裂されるリンカーであるか、あるいはそれらを含むことができる。

【0031】

ペイロード(PL)は、タンパク質に結合するのに有用な任意の部分でよい。タンパク質に有効に結合し得る化合物の多くの例が、当技術分野で周知である。例には、金属イオンに結合して複合体の検出可能性を提供するキレート化剤をはじめとする、使用者がタンパク質を捜し当てるまたは同定することを可能にする標識部分；タンパク質を精製または単離するのを、または表面に貼り付けるのを容易にするビオチンまたはアビジン、ポリヌクレオチド、抗体またはそのフラグメント、5~15個のアミノ酸残基を含むポリ-A r gまたはポリ-Lysなどの結合形成部分；脂肪酸基またはポリエチレングリコール(PEG)などの特性修飾基；特定タイプの細胞または細菌に特有な多糖または細胞表面タンパク質などの抗原性基；修飾型タンパク質またはペプチドが別の分子に結合して二重特異性抗体などのより複雑な複合体を調製することを可能にするカップリング基(図2参照)；RNA、DNA、mRNA、siRNA、およびこれらのフラグメントなどの核酸を含む生物活性化合物；種々の治療薬などの医薬化合物；ならびに所望の効果をもたらすことのできる所望の組織または細胞までタンパク質上に便乗(hitchhike)できる放射性核種および細胞毒が含まれる。これらのヒッチハイキング化合物は、それらがタンパク質またはその一部に複合化されたままで機能を発揮することができるか、あるいは連結基がインビオで容易に開裂できる基であるなら、それらの化合物は、タンパク質から最初に離れることができる。これらの方で使用するのに適した医薬ペイロードとしては、微小管阻害薬、I型トポイソメラーゼ阻害薬、挿入薬、細胞内シグナル伝達経路阻害薬、キナーゼ阻害薬、siRNA、aRNAおよびmiRNAなどの転写阻害薬、ならびにDNA副溝バインダーが挙げられ；これらのペイロードとしては、例えばマイタンシノイド、アウリスタチン、アマニチン、カリチアマイシン、プシンベリン、ジュオカルマイシン、アントラサイクリン、カンプトテシン、ドキソルビシン、タキソール、ピロロベンゾジアゼピンなどの部類の化合物が挙げられる。

【0032】

治療または診断での用途を有するこれらの医薬ペイロードの具体例としては、パクリタキセル、ドセタキセル、エトポシド、テノボシド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルチシン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ミトラマイシン、アクチノマイシン、グルコルチコイド、プロマイシン、エピルビシン、シクロホスファミド、メトトレキサート、シタラビン、f-フルオロウラシル、プラチナ、ストレプトゾトシン、ミノマイシンC、アントラサイクリン、ダクチノマイシンまたはアクチノマイシン、プレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン、ジュオカルマイシン、イフオスファミド、ミトキサントロン、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アニモテリン、メルファラン、エスペラミシン、レキシトロブシン、アウリスタチン(例えば、アウリスタチンE、アウリスタチンF、AEB、AEVB、AEFP、MMAE、MMAF)、エロイトロビン、ネトロブシン、ポドフィロトキシン、マイタンシノイド(マイタンシンおよびDM1を含む)、およびコンブレタスタチン(combretestatin)が挙げられる。

【0033】

ペイロードとして使用できる適切なカップリング基(複合体を別の部分にカップリングするのに使用できる基)としては、マレイミド、チオール、-ハロケトン(例えば、-C(=O)-CH<sub>2</sub>-X、ここで、Xはクロロ、プロモまたはヨードである)、カルボン酸、アミン、ヒドロキシル、アルケン、アルキン(銅不含-遊離「クリック」化学で使用できる環状オクチンを含む)、アジドなどが挙げられる。これらのカップリング基を使用して、本発明の複合体を、相補的カップリング基を有する他の化合物に連結するための方法は、当技術分野で周知であり、チオールのマレイミドへのマイケル付加、チオールの

10

20

30

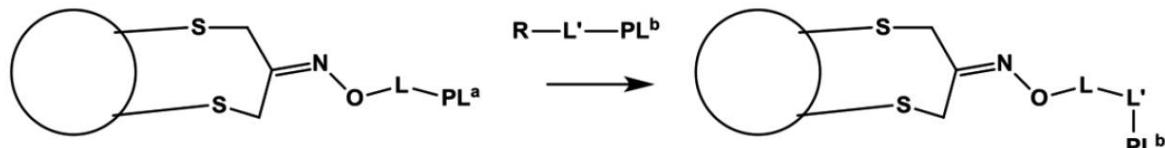
40

50

- ハロケトンでのアルキル化、アミンとカルボン酸との間でのアミド結合の形成、アジドをアルキンに 1 , 2 , 3 - トリアゾール環を形成することによって連結するための「クリック」化学（例えば、Meldal, et al., Chem Rev., vol 108, 2952 ~ 3015(2008) 参照）、および「銅不含クリック」化学（例えば、Meeuwissen, et al. Polymer Chemistry, vol.3.1783 ~ 95(2012) 参照）が挙げられる。「相補的」カップリング基は、容易に化合して共有結合を形成する 2 つのカップリング基、例えば前に言及した対（アミドを形成するためのカルボキシレート + アミン； 1 , 2 , 3 - トリアゾールを形成するためのアジド + アルキン；チオールがマイケル付加を介して二重結合に付加する、マレイミド + チオール；チオールのアルキル化によって - チオケトンを形成する、 - ハロケトン + チオール、など）である。相補的カップリング基を含む第 2 複合体とカップリングするペイロードとしてのカップリング基を含む複合体の描写が、図 2 に示される。特定の例において、ペイロード（PL）として役立つためのカップリング基は、ハロゲン、 - C C H 、 - C = C H 2 、 - O H 、 - S H 、 - S O 2 - C H = C H 2 、 - O - N H 2 、 - N 3 、 - O - P (O) (O H ) 2 、 - C (O) - H 、 - C (O) - C H 3 、 - N H - C (O) - C H 2 - I 、マレイミジル、 3 , 5 - ジオキソ - 1 , 2 , 4 - トリアゾリジン - 4 - イル、 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン - 1 - イル、ピリジン - 2 - イル - ジスルファニル、テトラヒドロ - 1 H - チエノ [ 3 , 4 - d ] イミダゾール - 2 ( 3 H ) - オン - 4 - イル、 1 - カルボニルオキシ - 2 , 5 - ジオキソピロリジン、 1 - カルボニルオキシ - 2 , 5 - ジオキソピロリジン - 3 - スルホン酸ナトリウム、 - S S R 1 、 - C (O) - O R 1 、 - N (R 1 ) H 、および - N H - N (R 1 ) H からなる群から選択され、ここで、 R 1 は、 H または ( C 1 ~ C 6 ) アルキル、および - C (O) - R 2 であり、 R 2 は、 H 、 ( C 1 ~ C 4 ) アルキル、ハロ置換 ( C 1 ~ C 4 ) アルキル、 - C H = C H 2 、 N (R 1 ) H 、または - N H - N (R 1 ) H である。これらのペイロードが、最初のペイロード（PL<sup>a</sup>）として使用される場合、複合体は、第 2 のペイロード（PL<sup>b</sup>）を含む化合物と反応することができ、新たな複合体を形成する際にはさらなるリンカーラン'を導入することができる：

【0034】

【化4】



PL<sup>a</sup>は、カップリング基、例えば、マレイミド、保護されたチオール、N<sub>3</sub>、アルキンであり、  
Rは、PL<sup>a</sup>のための相補的反応基であり、

PL<sup>b</sup>は、新たなペイロード、例えば、標識、またはタンパク質、抗体、si-RNA、毒素などをはじめとする生物活性物質である。

【0035】

これらの反応において、当業者は、L および L' が、新たなペイロード PL<sup>b</sup> を連結するのに使用される反応に応じて、PL<sup>a</sup> および / または R の一部を保持できることに留意されたい。

【0036】

次に挙げる実施形態は、本発明の個々の態様を例示する。

1. ケトンで修飾されたポリペプチドをオキシムで修飾されたポリペプチドに変換する方法であって、ケトンで修飾されたポリペプチドをアミン系促進剤の存在下で式 R - O - N H<sub>2</sub> の基と接触させることを含む方法。

2. アミン系促進剤が、アニリン、置換アニリン、例えば 3 , 5 - ジアミノ安息香酸また

10

20

30

40

50

は 3 , 5 - ジカルボキシアニリン、あるいはアセチルヒドラジドなどのアシルヒドラジドである、実施形態 1 の方法。

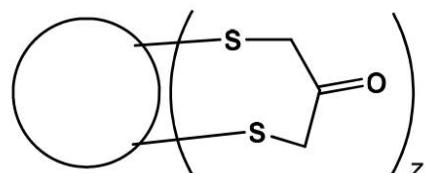
これらの方  
の実施形態において、ケトンで修飾されたポリペプチドは、ジスルフィドからジスルフィドを還元して 2 つの遊離チオールを形成すること、および該遊離チオールを、1 , 3 - ジクロロアセトンまたは 1 , 3 - ジブロモアセトンとの反応によって相互に連結することによって形成される。この方法の特定の実施形態において、還元可能なジスルフィド結合を有するポリペプチドを、限定はされないが T R I S または P B S などの緩衝液中、限定はされないが T C E P などの還元剤および 1 , 3 - ジクロロアセトンと接觸させる。好ましくは、ポリペプチドおよび緩衝液は、還元剤を添加する前に 1 , 3 - ジクロロアセトンと混合され、したがって、還元が行われる際に 1 , 3 - ジクロロアセトンが存在する。 10

3 . 式  $R - O - NH_2$  の基が、式  $H_2N - O - L - PL$  の化合物（ここで、L はリンカーを表し、PL はペイロード基を表す）である実施形態 1 または 2 の方法。

4 . ケトンで修飾されたポリペプチドが式：

【0037】

【化 5】



20

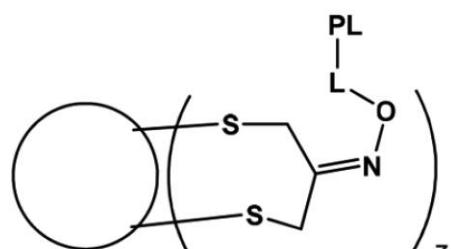
（式中、円はポリペプチドを表し、各硫黄原子は、ポリペプチドのシステイン残基のスルフヒドリルであり、z は 1 ~ 10 の整数である）のものである、実施形態 1 の方法。

5 . タンパク質 - ペイロード複合体が式：

【0038】

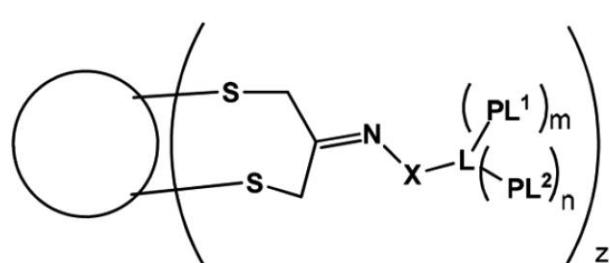
【化 6】

30



または

40



50

(式中、XはOであり、Lはリンカーを表し、PL、PL<sup>1</sup>およびPL<sup>2</sup>は、出現する毎に独立に、ペイロード基を表し、mおよびnは、それぞれ独立に1～10であり、zは、mおよびnが双方とも0であることはないとの前提で、1～10、好ましくは1～5である)のものである、前記実施形態のいずれかの方法。

6. ポリペプチドが抗体(例えば、IgG、FabまたはF(ab)<sub>2</sub>、Fc)である、前記実施形態のいずれかの方法。

7. ポリペプチドがワクチン担体である、実施形態1～5のいずれかの方法。

8. ペイロードが、治療薬を含む、実施形態1～8のいずれかの方法。

9. ペイロードが、検出可能な標識、または相補的反応性基を含むペイロード基を結合するのに適した反応性基を含む、実施形態1～7のいずれかの方法。

10. Lが開裂可能な連結部分を含む、実施形態8の方法。

11. Lが、

(a) 結合、-O-、-S-、-NH-、-N((C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル)H-、-NH-

H-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-；

(b) (C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)

アルキニレン、-Z-(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、-Z-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニ

レン、-Z-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン-、(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン-Z-(C

<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン-Z-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケ

ニレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン-Z-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン[式中、Z

は、-NH-、-N((C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル)-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)

-NH-、-NH-C(O)-、(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、フェニレン、ヘテ

ロアリーレン、またはヘテロシクレンであり、前記(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、前記(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン、および前記(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン部分は、それ

ぞれ独立に、前記部分内に散在する1～10個の酸素原子を任意選択で含んでいてよい]；

(c) (C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン-Y-(C

<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、-Y-(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、フェニレン、

-Y-フェニレン、フェニレン-Y-フェニレン、ヘテロアリーレン、Y-ヘテロアリーレン、ヘテロアリーレン-Y-ヘテロアリーレン、ヘテロシクレン、-Y-ヘテロシクレン

、またはヘテロシクレン-Y-ヘテロシクレン[式中、Yは、(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキ

レン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン、-O-、-C(O)

-、-S-、-NH-、-N((C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル)H-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、または-NH-C(O)-であり、前記(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シク

ロアルキレン、前記フェニレン、前記ヘテロアリーレン、および前記ヘテロシクレン部分は、それぞれ独立に、ハロ、(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルキル、またはハロ置換(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルキルから選択される1～3個の置換基で任意選択で置換されていてよい]；

(d) -[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub>-、-X{CH<sub>2</sub>[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub>}<sub>w</sub>(式中、v

は1～2,000であり、wは1～4であり、XはCまたはNである)；

(e) 1～100個のアミノ酸を含むペプチド；および

(f) デンドリマー、デンドロン、および超分岐ポリマーを含む樹状高分子

から選択される少なくとも1つのスペーサーを含む、実施形態1～10のいずれか1つの方法。

12. 還元可能なジスルフィド結合を含むポリペプチドを、式[PP]-S-CH<sub>2</sub>-C

(=O)-CH<sub>2</sub>-S-[PP]の基(ここで、各Sはジスルフィド結合に由来する硫黄

であり、[PP]は連結基の末端がポリペプチドに結合している場所を示す)を含むケト

ンで修飾されたポリペプチドに変換する方法であって、還元可能なジスルフィド結合を含むポリペプチド、水性緩衝液、および1,3-ジハロアセトンの混合物を形成し、次いでジスルフィド結合を還元できる還元剤を添加することを含む方法。

13. 1,3-ジハロアセトンが1,3-ジクロロアセトンである、実施形態12の方法

10

20

30

40

50

。

14. 還元剤が水溶性のホスフィンまたはホスフィン塩である、実施形態12または13の方法。TCEPは適切な還元剤である。

15. ポリペプチドが抗体または抗体フラグメントである、実施形態12～14のいずれかの方法。適切には、ポリペプチドは、モノクロナールでよく、かつヒト化されていてもよい抗体である。がん細胞に特有な抗原に対する抗体は、適切なポリペプチドである。

16. ケトンで修飾されたポリペプチドをオキシムで修飾されたポリペプチドに変換する方法であって、ケトンで修飾されたポリペプチドをアミン系促進剤の存在下で少なくとも約1mg/mLのポリペプチド濃度で式R-O-NH<sub>2</sub>の基と接触させることを含む方法。典型的には、これらの方法におけるRは、本明細書中に記載のようなペイロードおよびリンカーを含む。適切なペイロードとしては、マイタンシノイド（例えば、DM1、DM4）、アウリスタチン（例えば、MMAE、MMAG）、アマニチン、カリチアマイシン、ブシンベリン、ジュオカルマイシン、アントラサイクリン、カンプトテシン、ドキソルビシン、タキソール、ピロロベンゾジアゼピンなどが挙げられる。

17. ケトンで修飾されたポリペプチドが、実施形態12～16のいずれかの方法によって調製される、請求項5の方法。

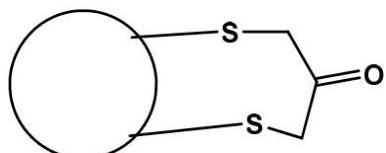
18. アミン系促進剤が、カルボキシ置換アニリンまたはアシリヒドラジンである、実施形態17の方法。

19. 式R-O-NH<sub>2</sub>の基が、式H<sub>2</sub>N-O-L-PLの化合物（ここで、Lはリンカーを表し、PLはペイロード基を表す）である、実施形態12～17のいずれかの方法。

20. ケトンで修飾されたポリペプチドが式：

【0039】

【化7】



10

20

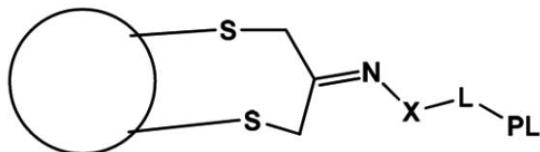
30

（式中、円はポリペプチドを表し、各硫黄原子は、ポリペプチドのシステイン残基のスルフヒドリルである）のものである、実施形態16の方法。

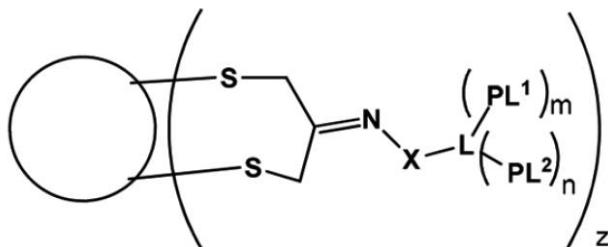
21. タンパク質-ペイロード複合体が、式：

【0040】

【化 8】



または



10

(式中、XはOであり、Lはリンカーを表し、zは1～10の整数であり、PL、PL<sup>1</sup>およびPL<sup>2</sup>は、出現する毎に独立に、ペイロード基を表す)のものである、実施形態1 20 6～20のいずれかの方法。

22. ポリペプチドが抗体である、実施形態12～21のいずれかの方法。

23. ポリペプチドがワクチン担体である、実施形態12～21のいずれかの方法。

24. ペイロードが治療薬を含む、実施形態16～23のいずれかの方法。

25. ペイロードが検出可能な標識または結合基を含む、実施形態16～24のいずれかの方法。

26. Lが開裂可能な連結部分を含む、実施形態25の方法。

27. Lが、

(a) 結合、-O-、-S-、-NH-、-N((C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル)H-、-N 30 H-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-；

(b) (C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン、-Z-(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、-Z-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン、-Z-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン-、(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン-Z-(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン-Z-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン [式中、Zは、-NH-、-N((C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル)H-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-、(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、フェニレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクレンであり、前記(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、前記(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン、および前記(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン部分は、それぞれ独立に、前記部分内に散在する1～10個の酸素原子を任意選択で含んでいてよい]；

(c) (C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン-Y-(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、-Y-(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、フェニレン、-Y-フェニレン、フェニレン-Y-フェニレン、ヘテロアリーレン、Y-ヘテロアリーレン、ヘテロアリーレン-Y-ヘテロアリーレン、ヘテロシクレン、-Y-ヘテロシクレン、またはヘテロシクレン-Y-ヘテロシクレン [式中、Yは、(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン、-O-、-C(O)-、-S-、-NH-、-N((C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル)H-、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、または-NH-C(O)-であり、前記(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、前記フェニレン、前記ヘテロアリーレン、および前記ヘテロシクレン部分

40

50

は、それぞれ独立に、ハロ、(C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub>)アルキル、またはハロ置換(C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub>)アルキルから選択される1 ~ 3個の置換基で任意選択で置換されていてもよい] ;

(d) - [OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub> - または - J - {CH<sub>2</sub>[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub>}<sub>w</sub> - (式中、vは1 ~ 2, 000であり、wは1 ~ 4であり、JはCH<sub>2</sub>またはNHである) ;

(e) 1 ~ 100個のアミノ酸を含むペプチド；および

(f) デンドリマー、デンドロン、および超分岐ポリマーを含む樹状高分子から選択される少なくとも1つのスペーサーを含む、実施形態16 ~ 26のいずれか1つの方法。

#### 【0041】

本発明の方法は、図1に要約するように、修飾される予定のタンパク質のジスルフィドを還元すること、2つの遊離チオール基を含む還元型タンパク質を形成することを含む。還元型タンパク質を、還元型タンパク質上の双方の遊離チオールと反応する能力のある官能化されたテザー形成化合物と接触させて、テザー上にペイロードを結合するのに適した少なくとも1つの官能基も保持しながら、遊離チオールを相互につなぐ。一部の実施形態において、テザー上の官能基はカルボニル基、例えば、遊離チオールが1, 3-ジハロケトンと反応することが可能である場合に得られるケトンである。遊離チオールは、強力に求核性があるので、それらのチオールは、ハロゲン化アルキルまたはトシリ酸アルキルなどの求電子剤と、脱離基の置換および硫黄-炭素共有結合の形成を含む非可逆反応を介して容易に反応する。官能化されたカルボニル含有テザー形成化合物のいくつかの適切な例としては、1, 3-ジクロロアセトンおよび1, 3-ジブロモアセトンが挙げられる。これらの試薬は、スルフィドリルを相互につなぐことによって小さな環状ペプチド中のジスルフィド部分の安定化を提供するのに使用されてきた。例えば、国際公開第2008/157380号(ジクロロアセトンと還元型環状ペプチドとの反応、それに続くカルボニルの還元)を参照されたい。1, 3-ジヒドロキシアセトンのスルホン酸エステル(例えば、メシル酸エステル、トリフル酸エステル、フェニルスルホン酸エステル、トシリ酸エステルなど)も使用することができる。これらの試薬は、還元型タンパク質の遊離チオールに対して十分に反応性であり、適度に迅速な反応を提供して、相互に繋ぎ留められた2つのシステイン残基を備えた活性化タンパク質を形成し、ここで、それぞれの遊離チオールは、官能化されたテザー基に共有結合で結合している。

#### 【0042】

還元型タンパク質および官能化されたテザー形成化合物は、テザー形成化合物と還元型タンパク質の2つの遊離チオールとの間の反応を促進するのに適した条件下で、とりわけ以前にはジスルフィド結合で連結されていた双方の遊離チオールを、今や直接的ジスルフィド結合に代わってそれらを連結する短いテザーを用いてもう一度相互に結び付けるようにテザー形成化合物の單一分子と反応させるのに有利である濃度および温度の条件下で接触させる。この反応は、図1に例示するように、2つの硫黄原子間に官能化されたテザー[-CH<sub>2</sub>C(O)-CH<sub>2</sub>-]を有する活性化タンパク質を形成する。図1のテザーは、明瞭および効率的なシップ塩基形成化学を介してペイロードを効率的に結合するのに使用することができるカルボニルを含む。

#### 【0043】

本考察中で、タンパク質は、たとえそれが円または球として描かれていても、10個よりも少ないアミノ酸からなる小さなポリペプチド、あるいは大きな酵素または2つ以上のサブユニットまたは別個のタンパク質からなる複合体でよいと解釈される。ジスルフィドの2つの硫黄原子は、多重複合体の1つのサブユニット上に存在することができるか、あるいは異なるサブユニット上に存在することができる。本明細書に記載の変換に関するジスルフィドに加えて、タンパク質は、また、還元され官能化され得るか、あるいはタンパク質内でのそれらの位置により、還元される可能性のないその他のジスルフィド連結部を含むことができる。單一のジスルフィド、テザー基、または複合のみが示されているが、1つのこのようなジスルフィド、テザー基、または複合を含むポリペプチドまたはタンパク質は、また、1つを超えるこれらを含むことができると解釈される。本発明の方法は

10

20

30

40

50

、公知の方法を利用して、タンパク質の全体的形状および機能を維持するために、または相互に連結された2つのサブユニットを複数サブユニット複合体中に保持するために必須である可能性のある「埋蔵」ジスルフィドをしばしば還元することなしに、折りたたまれたタンパク質の表面近傍の溶媒に接近可能なジスルフィドを選択的に還元することができる。単純化のために1つのみを典型的に描写しているが、実施例が例示するように、タンパク質またはポリペプチドは、1つを超える官能化されたテザー基を含むことができ、かくして、1つを超える複合部位を含むことができる。

#### 【0044】

一旦、活性化タンパク質が形成されると、ペイロードを官能化されたテザーに結合することができる。例えば、アミンを含む(アミノ化)ペイロードをジハロアセトンから形成されたテザーに、ペイロードのアミンとテザーのケトンとの間でシップ塩基を形成することによって結合することができる。適切なペイロード化合物は、接近可能で反応性のあるNH<sub>2</sub>アミン基を含み、好ましい実施形態において、アミンは、シップ塩基の形成に向けて活性化されているアミンである。適切なアミンの例としては、例えば、オキシアミン(X=O)、チオアミン(X=S)、およびヒドラジン(X=NH)が挙げられ、これらのヘテロ原子置換アミンは、図1に示すように、ジハロアセトンから形成された活性化タンパク質のテザー上のケトンのようなケトンと容易に縮合することができている。

10

#### 【0045】

典型的には、活性化タンパク質を、活性化タンパク質の精製または単離なしに、アミノ含有ペイロードと接触させる。利用可能なら、ペイロード(PL)上の遊離NH<sub>2</sub>基を使用することができ、利用できないなら、図1および実施例中で例示するように、連結基を介して遊離NH<sub>2</sub>基を付加することができる。一部の実施形態において、一旦、活性化タンパク質が生成されたら、アミノ-ペイロードを反応混合物に添加し、そこで、活性化タンパク質が、所望のシップ塩基の形成を促進する条件下で形成される。アミノ-ペイロードは、次いで、図1に例示するように、そのアミノ基を介して、活性化タンパク質のカルボニルと反応し、それによって、所望のタンパク質-ペイロード複合体(式中、Xは、O、NHまたは置換されたNであり、Lは連結基であり、PLはペイロードを表す)を形成する。

20

#### 【実施例】

##### 【0046】

30

<以下の実施例では、次のHPLC法が使用される>

方法A：溶離液A：水+0.1%ギ酸、溶離液B：アセトニトリル+0.08%ギ酸、グラジエント：2分間でBを3%から80%へ、流速：1.0mL/分、カラム：Proswiftn Monolith 4.6×50mm、40

方法B：溶離液A：水+0.1%ギ酸、溶離液B：アセトニトリル+0.04%ギ酸、グラジエント：2分間でBを3%から80%へ、流速：1.0mL/分、カラム：Proswiftn Monolith 4.6×50mm、40

方法C：溶離液A：水+3.75mM酢酸アンモニウム+2%アセトニトリル、溶離液B：アセトニトリル、グラジエント：1.7分間でBを2%から98%へ、流速：1.0mL/分、カラム：Acuity CSH 2.1×50mm、50

40

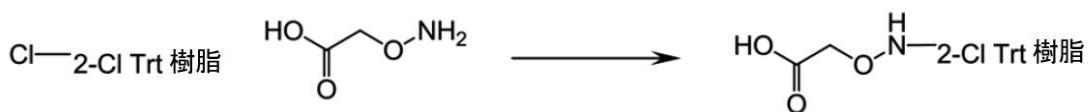
方法D(HRMS)：溶離液A：水+0.05%ギ酸+3.75mM酢酸アンモニウム、溶離液B：アセトニトリル+0.04%ギ酸、グラジエント：4.4分間でBを2%から98%へ、流速：1.0mL/分、カラム：Acuity CSH 2.1×50mm、50

##### 【0047】

<リンカーの合成>

##### 【0048】

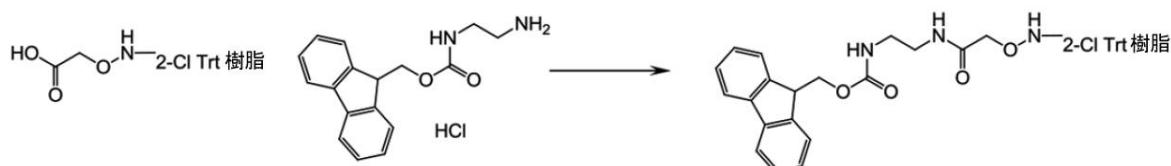
## 【化9】



100 mL のガラス器具中で、2-クロロトリチルクロリド樹脂 (1.55 mmol / g) (0.500 g, 0.775 mmol) を DCM (20 mL) で 30 分間膨潤させ、  
10 DCM を排出した。樹脂に、2-(アミノオキシ)酢酸ヘミ塩酸塩 (0.338 g, 3.10 mmol) および DIPEA (1.354 mL, 7.75 mmol) の NMP (7 mL) / DCM (4 mL) 懸濁液を添加し、5 時間振盪した。溶媒を排出した。樹脂を、DCM / MeOH / DIPEA (17 / 2 / 1, 40 mL)、DCM (50 mL)、NMP (50 mL)、および DCM (50 mL) でそれぞれすすぎ洗った。得られた樹脂を、KOH / NaOH で終夜乾燥した。

## 【0049】

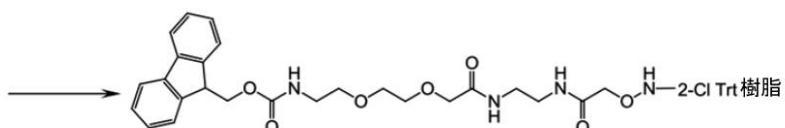
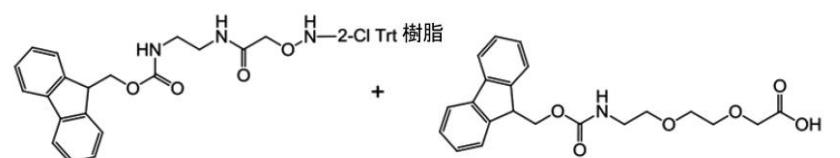
## 【化10】



100 mL のガラス器具中で、樹脂 (0.775 mmol) を DCM (20 mL) で 30 分間膨潤させ、DCM を排出した。2-アミノエチルカルバミン酸 (9H-フルオレン-9-イル) メチル塩酸塩 (0.081 g, 0.775 mmol)、HOAt (0.422 g, 3.10 mmol) および DIPEA (1.354 mL, 7.75 mmol) の NMP (8 mL) 懸濁液中に、HB TU (1.176 g, 3.10 mmol) の NMP (2.5 mL) 溶液を添加し、室温で 2 時間振盪した。溶媒を排出し、樹脂を、NMP (10 mL) および DCM (10 mL) で逐次的にすすぎ洗った。得られた樹脂を、終夜乾燥した。

## 【0050】

## 【化11】



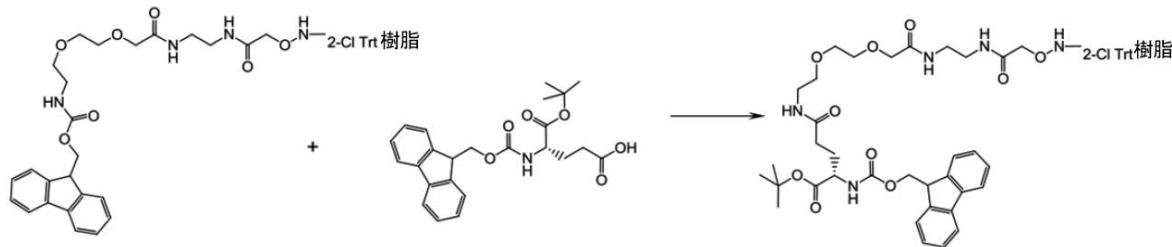
樹脂 (0.775 mmol) を反応容器中に仕込んだ。10 mL の 20 % ピペリジン / 50

NMP (v/v) を添加し、懸濁液を、室温で5分間かき混ぜた。溶媒を排出した後、さらなる10mLの20%ピペリジン/NMP (v/v) を添加し、室温で20分間かき混ぜた。HOAt (0.316g、2.325mmol) および1-(9H-フルオレン-9-イル)-3-オキソ-2,7,10-トリオキサ-4-アザドデカン-12-酸 (0.896g、2.325mmol) のNMP (8mL) 溶液を樹脂に添加し、DIC (0.362mL、2.325mmol) のNMP (1mL) 溶液を添加した。反応混合物を室温で2時間かき混ぜ、樹脂を濾別し、NMP (10mL) で4回すすぎ洗った。得られた樹脂を終夜乾燥した。

【0051】

【化12】

10



20

樹脂 (0.775mmol) を反応容器中に仕込んだ。10mLの20%ピペリジン/NMP (v/v) を樹脂に添加し、懸濁液を、室温で5分間かき混ぜた。溶媒を排出した後、さらなる10mLの20%ピペリジン/NMP (v/v) を添加し、室温で20分間かき混ぜた。HOAt (0.316g、2.325mmol) およびFmoc-Glu-OtBu (0.989g、2.325mmol) のNMP (8mL) 溶液を樹脂に添加し、DIC (0.362mL、2.325mmol) のNMP (2.00mL) 溶液を添加した。反応混合物を室温で2時間かき混ぜた。樹脂を濾別し、NMP (10mL) で4回すすぎ洗った。得られた樹脂を終夜乾燥した。

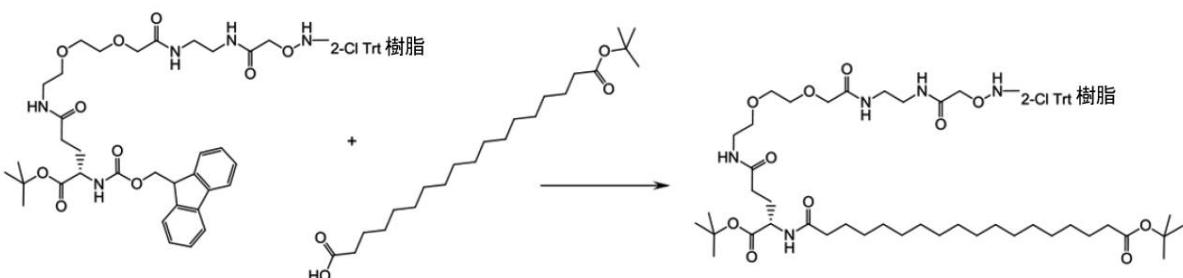
【0052】

&lt;リンカーヘのペイロードの結合&gt;

30

【0053】

【化13】



40

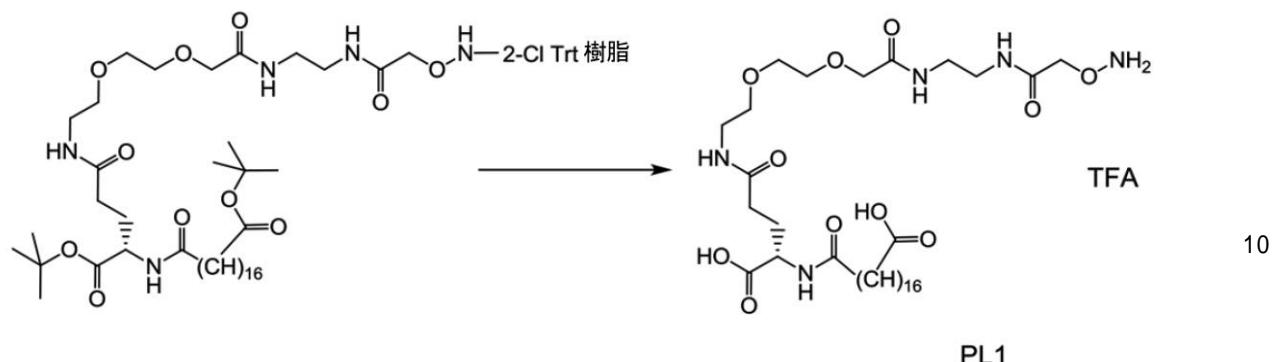
樹脂 (2-クロロトリチルクロリド樹脂、0.775mmol) を反応容器中に仕込んだ。10mLの20%ピペリジン/NMP (0.775mmol、v/v) を樹脂に添加し、懸濁液を、室温で5分間かき混ぜた。溶媒を排出した後、さらなる10mLの20%ピペリジン/NMP (0.775mmol) を添加し、室温で20分間かき混ぜた。18-tert-ブトキシ-18-オキソオクタデカン酸 (0.862g、2.325mmol) およびHOAt (0.316g、2.325mmol) のNMP (8mL) 溶液を樹脂に添加し、DIC (0.362mL、2.325mmol) のNMP (2.00mL) 溶液を添加した。反応混合物を室温で4時間かき混ぜた。樹脂を濾別し、NMP (10m

50

L) で 4 回すすぎ洗った。得られた樹脂を終夜乾燥した。

【0054】

【化14】



前記ステップからの樹脂 (0.775 mmol) を 20 mL の開裂用カクテル液 (TFA / TIPS / 水 = 95 / 2.5 / 2.5, v/v) と共に室温で 1.5 時間処理した。樹脂を、濾過により除去し、TFA ですすぎ洗った。濾液を真空下で濃縮した。15~50% MeCN / 水 (+ 0.1% TFA) で溶離する C18 カラムでの逆相 HPLC により、2,2,2-トリフルオロ酢酸を 1:1 で含む (S)-1-(アミノオキシ)-19-カルボキシ-2,7,16,21-テトラオキソ-9,12-ジオキサ-3,6,15,20-テトラアザオクタトリアコンタン-38-酸を得た (207 mg, 0.294 mmol, 収率 37.9%) (PL1)。HRMS [M+1] (方法 D) ; 704.4459 (実測値)、704.4486 (予測値)。

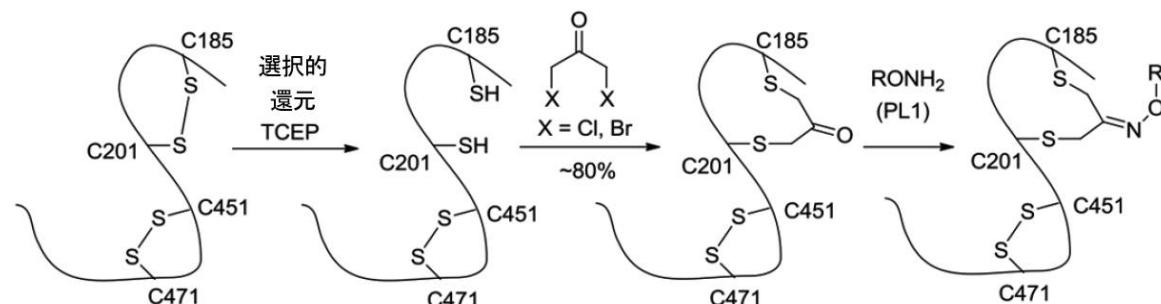
【実施例 1】

【0055】

CRM197 (G.Giannini and R.Rappuoli, Nucleic Acids Res., 1984, 25, 4063 参照) を TCEP (xx) で処理し、C451-C471 ジスルフィドをほとんどまたは全く還元することなしに、C201-C185 ジスルフィドを還元した (実施例 3 参照)。還元された CRM197 を 1,3-ジクロロアセトンで処理して、インタクトな C451-C471 ジスルフィドを有し、C201 が -CH<sub>2</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>- 連結部を介して C185 に繋ぎ留められた活性化タンパク質を得た。この活性化タンパク質を、アミノオキシ基を含むアミノ化脂肪酸誘導体 (その調製は前に記載されている) である PL1 と接触させて、脂肪酸誘導体をタンパク質に連結するオキシムを形成した。結合した脂肪酸基を含む複合体は、腎クリアランスを低下させ、かくして、循環している CRM197 タンパク質の半減期を延長し、複合ワクチンにおける担体としてのその有用性を高めると予想される。本来のタンパク質 (図 3 A、方法 A を使用)、活性化タンパク質 (図 3 B)、およびタンパク質複合体 (図 3 C) に関する質量スペクトルデータを、図 3 に示す。

【0056】

【化15】



## 【0057】

&lt;部位限定型アジド化合物を所持するCRM197の合成&gt;

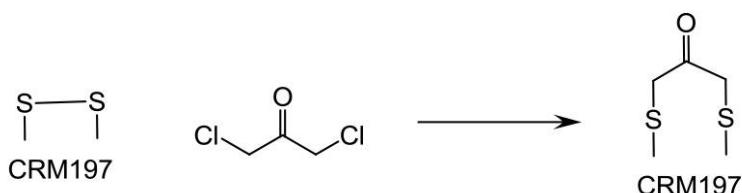
方法A -

溶離液A：水 + 0.1% ギ酸、溶離液B：アセトニトリル + 0.1% ギ酸、グラジエン  
 ト：2分間でBを3%から80%へ、流速：1.8 mL/分、カラム：AcQuity  
 BEH300 SEC 4.6 × 30 mm、50  
 SDA PAGE ゲル分析 - NuPAGE 4~12% Bis-Tris ゲル；1.5  
 mm × 10 ウェル

## 【0058】

## 【化16】

10



20

CRM197のリン酸ナトリウム緩衝液(230 μL、pH 7.4)溶液(32.5 mg/mL、185 μL、0.103 μmol)に、TCEP HCl水溶液(3 mg/mL、水、58.9 μL、0.616 μmol)を添加した。反応物を室温で16時間攪拌し、続いて1,3-ジクロロプロパン-2-オンのDMSO溶液(20 mg/mL、13.04 μL、2.054 μmol)を添加した。反応物を3.5時間攪拌し、次いで、0.5 mLのZeba(商標)回転サイズ排除カラム(Thermo Scientificからの7K MWCO)に通過させ、緩衝液を0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6)に交換して、ケトンを保持するCRM197(6.78 mg/mL、1.3 mL、ナノドロップ法)を得た。LCMS [M+1] = 58465。

## 【0059】

## 【化17】

30



40

ケトンで修飾されたCRM197のリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6)溶液(6.78 mg/mL、1.3 mL、0.151 μmol)に、O-(2-(2-(2-(2-アジドエトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)ヒドロキシリアルアミンのDMSO溶液(300 mg/mL、0.044 mL、0.045 mmol)を添加した。反応混合物を23で36時間かき混ぜ、次いで、PBS(pH 7.4)で溶離する5 mLのZeba(商標)回転カラムに通し、標題化合物を得た(4.41 mg/mL、1.6 mL、収率80%、ナノドロップ法)。LCMS [M+1] = 58682.5

図4に、標題化合物である修飾されたCRM197に関するSDS PAGEを示す。

## 【実施例2】

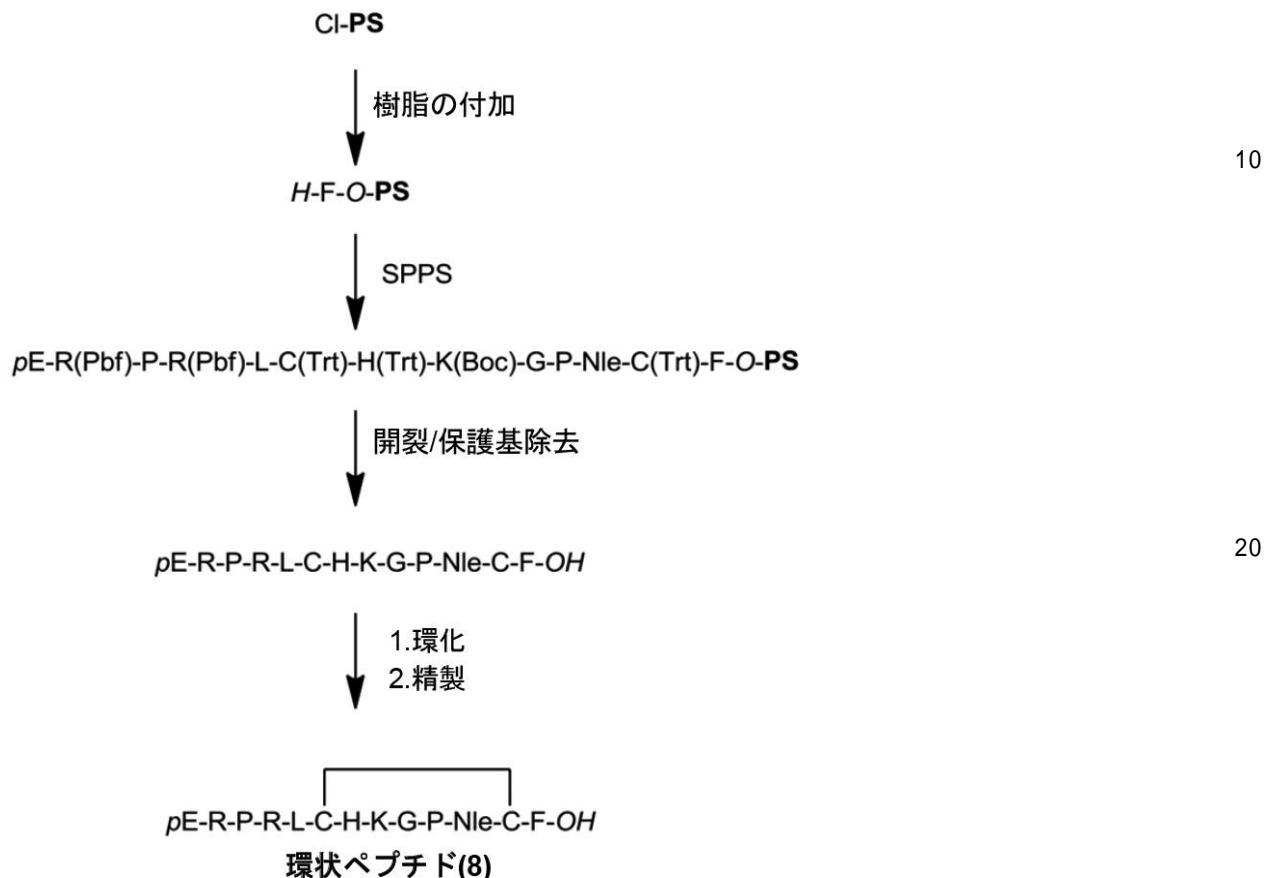
## 【0060】

50

出発材料の調製：p E - R - P - R - L - C - H - K - G - P - N l e - C - F - O H (ジスルフィド C<sup>6</sup> - C<sup>1</sup> <sup>2</sup>) (配列番号 2) (8) の合成。以下の配列は、記載順にそれぞれ配列番号 3、4 および 2 として開示されている。

【0061】

【化18】



【0062】

・中間体 8 a の調製

(F m o c - F - O H を用いる 2 - クロロトリチルクロリド樹脂の付加、F m o c 除去、および樹脂付加量の測定)

2 - クロロトリチルクロリド樹脂 (40.0 g, 64.0 mmol) を DCM (3 ×) で洗浄した。F m o c - F - O H (24.8 g, 64.0 mmol) の DCM (400 mL) 溶液および D I P E A (44.7 mL, 256 mmol) を添加し、懸濁液を室温で 22 時間振盪した。樹脂を、DCM / MeOH / D I P E A (17 : 2 : 1) (3 ×)、DCM (3 ×)、DMA (3 ×)、DCM (3 ×) で徹底的に洗浄した。次いで、樹脂を、ピペリジン / DMA (1 : 4) の混合物 (400 mL) で 10 分間処理することを 4 回繰り返し、続いて、DMA (2 × 180 mL) で洗浄した。ピペリジン / DMA 溶液および DMA 洗浄溶液を、樹脂の付加量を求めるために捕集した。合わせた溶液の 1 mL を、MeOH で 500 mL まで希釈すると、299.8 nm での UV 吸収は、A = 0.368 と測定された。これは、46.2 mmol の F m o c 量に相当する。樹脂を、DCM (3 ×)、DMA (3 ×)、DCM (3 ×) で徹底的に洗浄し、真空下で乾燥して、中間体 8 a を得た (50.7 g、付加量 = 0.91 mmol / g)。

【0063】

・中間体 8 b の調製 (線状ペプチドの組み立て)

中間体 8 a (2.64 g, 2.40 mmol) を、P r e l u d e (商標) ペプチド合

40

50

成装置での固相ペプチド合成に供した。カップリングは次のように実施した。

【0064】

【表1】

カップリング	AA	カップリング回数 ×反応時間	合成サイクル
1	C(Trt)	2 x 30 分	D
2	Nle	2 x 15 分	A
3	P	2 x 15 分	A
4	G	2 x 30 分	A
5	K(Boc)	2 x 15 分	A
6	H(Trt)	2 x 15 分	A
7	C(Trt)	2 x 60 分	D
8	L	2 x 15 分	A
9	R(Pbf)	4 x 1 時間	A
10	P	2 x 15 分	A
11	R(Pbf)	4 x 1 時間	A
12	pE	2 x 15 分	A

10

20

【0065】

・中間体8cの調製(保護基の除去を伴う樹脂からの開裂)

30

中間体8b(2.40 mmol)をDCM(4×)で注意して洗浄した。95%水性TFA/EDT/TIPS(95:2.5:2.5)の混合物(50mL)を添加し、懸濁液を室温で1時間振盪した。開裂溶液を濾別し、新たな開裂溶液(35mL)を添加した。懸濁液を室温で1時間振盪し、次いで開裂溶液を濾別した。新たな溶液(35mL)を添加し、懸濁液を室温で1時間振盪した。開裂溶液を濾別した。合わせた開裂溶液を、冷ヘプタン/ジエチルエーテル(1:1)の搅拌された混合物(500mL)上に徐々に注ぎ入れ、沈殿物を得た。懸濁液を、室温で2時間搅拌し、次いで、沈殿物を沈降させた。上澄み液を、フリットを用いて吸引除去した。残留物を、冷ヘプタン/ジエチルエーテル(1:1)(2×100mL)で洗浄し、上澄み液を、フリットを用いて吸引除去した。固体を高真空中で乾燥して、類白色固体として中間体8cを得た(3.75g、1.88mmol)。

40

【0066】

<環状ペプチド8の調製>(環化および精製)

中間体8c(3.75g、1.88mmol)をH<sub>2</sub>O(375mL)に溶解した。I<sub>2</sub>のAcOH溶液(50mM、45.1mL、2.26mmol)を、搅拌された溶液に一度に添加し、溶液を室温で10分間搅拌した。アスコルビン酸水溶液(0.5M、5.64mL、2.82mmol)を添加して、過剰のI<sub>2</sub>を失活させた。溶液を、乾固近くまで濃縮した。反応は、2つの温度(two poroom temperatureions):0.188mmolの規模および1.69mmolの規模で実施した。精製のために粗製物を合わせた。粗製物を、分取HPLCで精製し、ACN/H<sub>2</sub>Oから凍結乾燥して、白色固体として化合

50

物 8 を得た ( 1 . 5 3 g 、 0 . 7 6 7 mmol ) 。

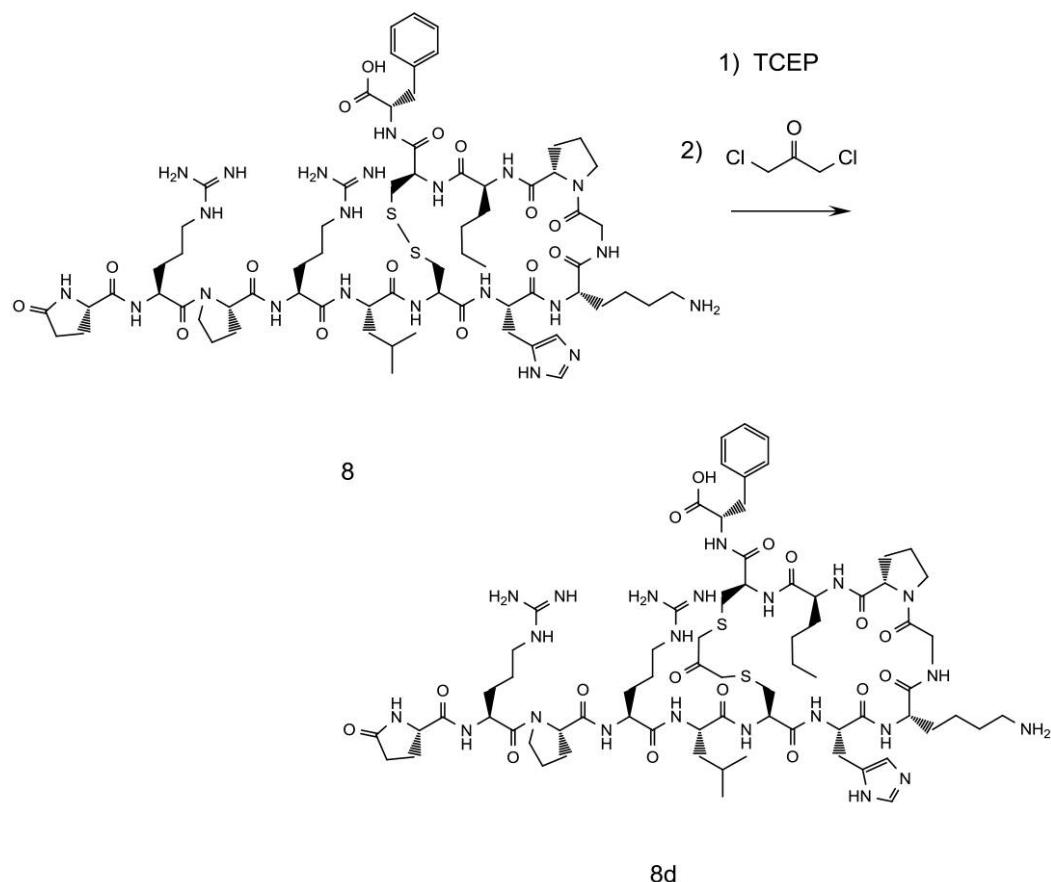
純粋な生成物を、分析 H P L C ( 分析法 C :  $t_R = 3 . 4 3$  分 ) および U P L C - M S ( 分析方法 B ; 測定値 [  $M + 3$  ] / 3 = 5 1 2 . 4 、 計算値 [  $M + 3$  ] / 3 = 5 1 2 . 6 ) で分析した。

【 0 0 6 7 】

この実施例は、環状ペプチド 8 から出発する活性化タンパク質の形成を例示する。

【 0 0 6 8 】

【 化 1 9 】



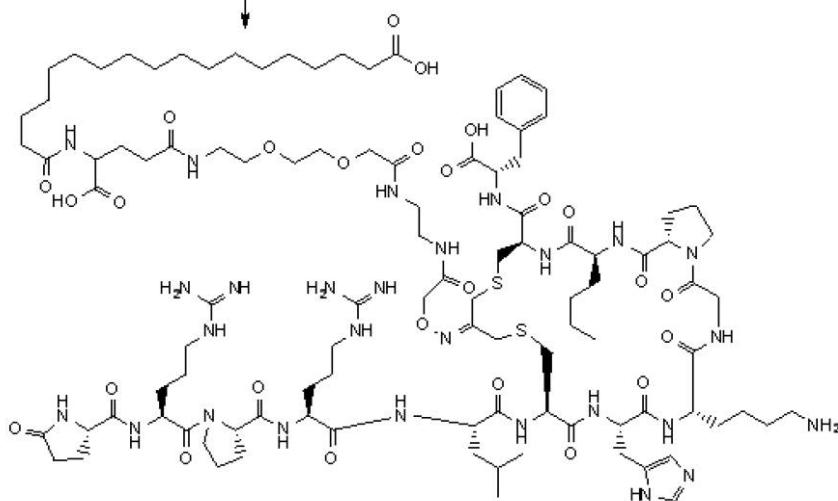
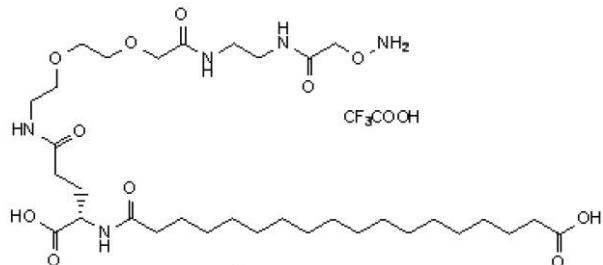
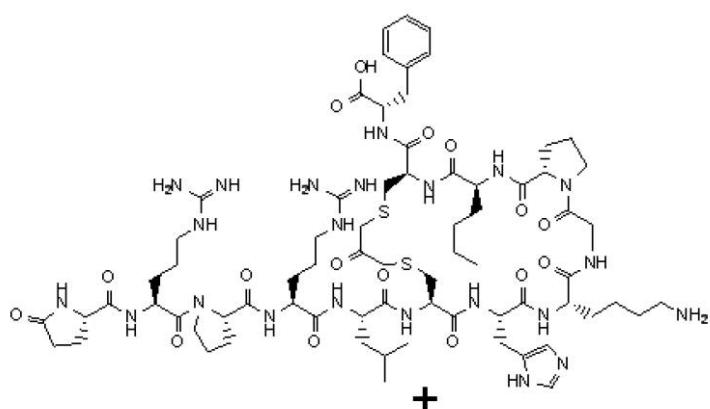
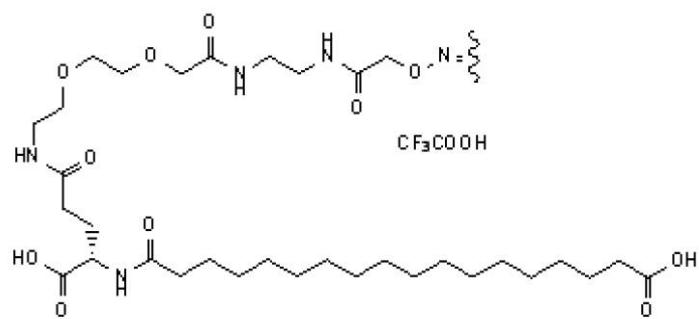
環状ペプチド 8 ( 1 2 m g 、 6 . 7 6  $\mu$ mol ) をリン酸ナトリウム緩衝液 ( 5 0 mM 、 pH 6 . 5 、 1 . 5 mL ) に溶解し、この溶液に T C E P - H C l ( 2 . 9 1 m g 、 1 0 . 1 3  $\mu$ mol ) を室温で添加した。この反応混合物を室温で 1 時間攪拌した。上記溶液に 1 , 3 - ジクロロプロパン - 2 - オン ( 4 . 2 9 m g 、 0 . 0 3 4 mmol ) を室温で添加し、室温で 3 0 分間攪拌した。15 ~ 6 0 % M e C N / 水 ( + 0 . 1 % T F A ) で溶離する逆相 H P L C により、活性化タンパク質 8 d を得た ( 6 m g 、 2 . 9 3  $\mu$ mol 、 収率 4 3 . 4 % ) 。 H R M S [  $M + 1$  ] ( 方法 D ) ; 1 5 9 0 . 7 9 1 1 ( 実測値 ) 、 1 5 9 0 . 7 9 1 2 ( 予測値 ) 。

【 0 0 6 9 】

6 位および 12 位 ( C<sup>6</sup> - C<sup>12</sup> ) の 2 つのシステイン間に - S - C H<sub>2</sub> - C ( = Z ) - C H<sub>2</sub> - S - 連結部を有し、 Z が、

【 0 0 7 0 】

【化 2 0】



である、p E - R - P - R - L - C - H - K - G - P - N 1 e - C - F - O H (配列番号 2)。

化合物 8 すなわち ( ( S ) - 2 - ( ( 3 S , 6 R , 14 R , 17 S , 20 S , 28 a S

)-17-((1H-イミダゾール-5-イル)メチル)-20-(4-アミノブチル)-3-ブチル-14-((S)-2-((S)-5-グアニジノ-2-((S)-1-((S)-5-グアニジノ-2-((S)-5-オキソピロリジン-2-カルボキサミド)ペンタノイル)ピロリジン-2-カルボキサミド)ペンタノアミド)-4-メチルペントンアミド)-1,4,10,15,18,21,24-ヘプタオキソヘキサコサヒドロピロロ[2,1-i][1,23,4,7,10,13,16,19]ジチアヘキサアザシクロヘキサコシン-6-カルボキサミド)-3-フェニルプロパン酸(11.5mg、5.62μmol)、および2,2,2-トリフルオロ酢酸と1:1で一緒になった(S)-1-(アミノオキシ)-19-カルボキシ-2,7,16,21-テトラオキソ-9,12-ジオキサ-3,6,15,20-テトラアザオクタトリアコンタン-38-酸化合物(9.19mg、0.011mmol)の100nMリン酸Na緩衝液(pH6.0、1mL)中溶液に、アニリン(2.051μL、0.022mmol)を室温で添加した。DMSO(50μL)を添加すると均一溶液が得られた。この反応混合物を室温で2時間攪拌した。15~60%MeCN/水(+0.1%TFA)で溶離する逆相HPLCにより、予想される複合体すなわち(1-((Z)-((3S,6R,14R,17S,20S,28aS)-17-((1H-イミダゾール-5-イル)メチル)-20-(4-アミノブチル)-3-ブチル-6-((S)-1-カルボキシ-2-フェニルエチルカルバモイル)-14-((S)-2-((S)-5-グアニジニノ-2-((S)-1-((S)-5-グアニジニノ-2-((S)-5-オキソピロリジン-2-カルボキサミド)ペンタノイル)ピロリジン-2-カルボキサミド)ペンタノアミド)-4-メチルペントンアミド)-1,4,15,18,21,24-ヘキサオキソドコサヒドロピロロ[2,1-i][1,23,4,7,10,13,16,19]ジチアヘキサアザシクロヘキサコシン-10(1H,9H,11H)-イリデン)アミノオキシ)-19-カルボキシ-2,7,16,21-テトラオキソ-9,12-ジオキサ-3,6,15,20-テトラアザオクタトリアコンタン-38-酸が得られた(4.5mg、1.646μmol、収率29.3%)。HRMS(方法D)[(M+3)/3];759.7487(実測値)、759.7462(予測値)。保持時間:4.12分。

【実施例3】

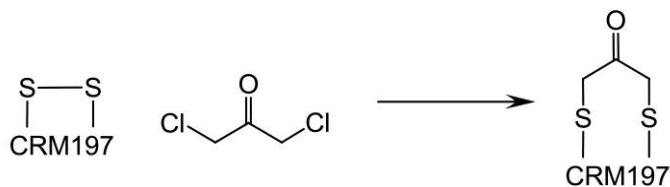
【0071】

【化21】

10

20

30



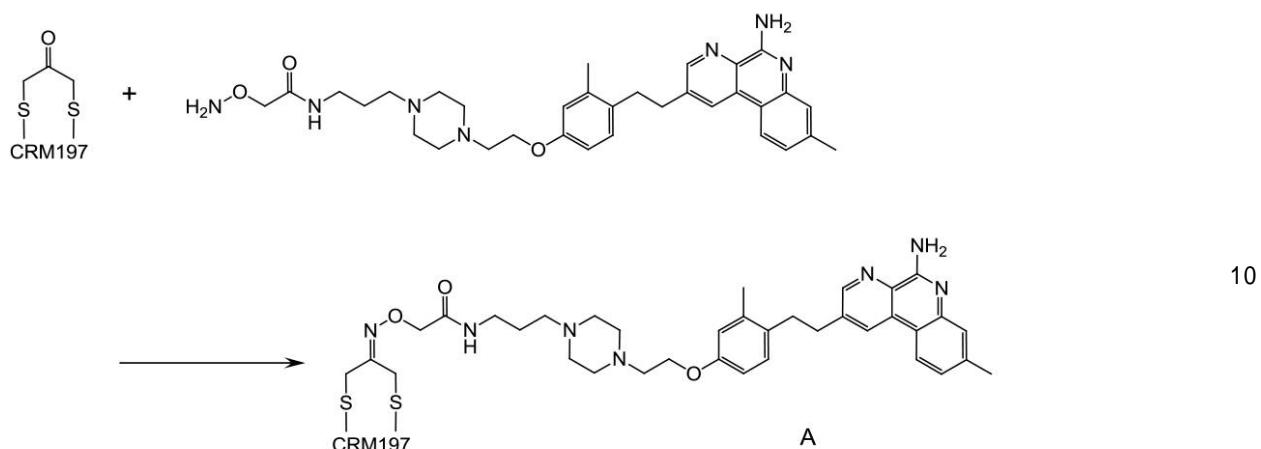
40

CRM197(200μg、6.2μL、0.0034μmol)のリン酸Na緩衝液(50mM、pH7.4、10μL)溶液に、TCEP-HCl(5.89μg、0.021μmol)の水溶液を添加した。この反応混合物を室温で15時間放置した。混合物に1,3-ジクロロプロパン-2-オン(4.58μg、0.034μmol、10当量)を添加した。この反応物を室温で2時間放置した。粗製物を、Zeba(商標)サイズ排除カラムに通した。LCMS; [M+1]=58465。この活性化タンパク質を、TLR作動薬などのアミノ化ペイロードと反応させて、担体タンパク質に付加された任意の抗原に対する免疫応答を高める可能性のある化合物と複合化された担体タンパク質を形成することができる。

【0072】

50

## 【化22】



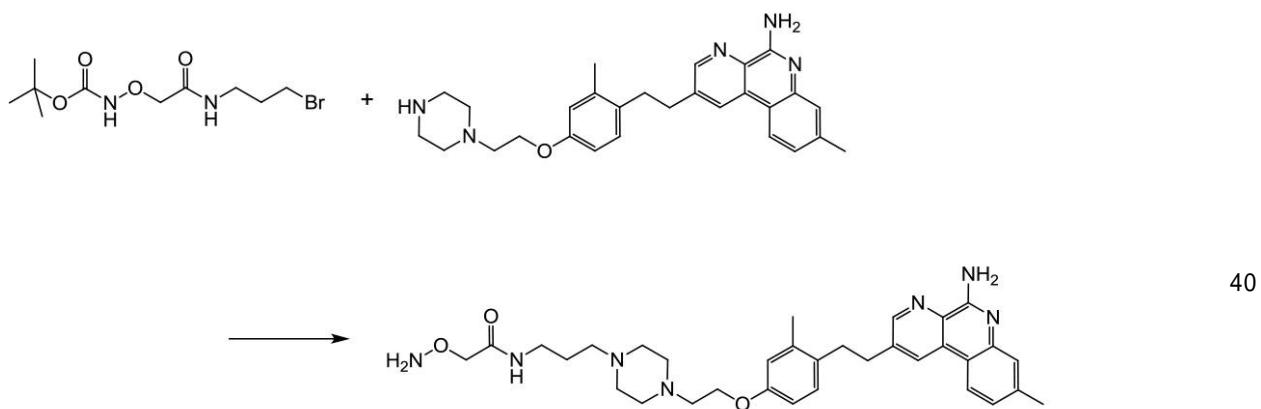
ケトンで修飾されたCRM197のリン酸Na緩衝液(pH 6.0)中溶液(5mg/mL、50μg、0.00086μmol)に、N-(3-(4-(2-(4-(2-(5-アミノ-8-メチルベンゾ[*f*][1,7]ナフチリジン-2-イル)エチル)-3-メチルフェノキシ)エチル)ピペラジン-1-イル)プロピル)-2-(アミノオキシ)アセトアミド(66.8μg、0.064μmol)およびアニリン(0.0020μL、0.021μmol)を添加した。LCMS分析によれば、この反応物を23で14時間放置すると、所望の複合体Aが生成した。反応混合物を、PBS緩衝液(pH 7.2)で溶離する0.5mLのZeba(商標)サイズ排除カラムに通した。LCMS; [M+1] = 59032。

【0073】

&lt;PLの合成&gt;

【0074】

【化23】



2-(3-プロモプロピルアミノ)-2-オキソエトキカルバミン酸tert-ブチル(53.3mg、0.171mmol)および8-メチル-2-(2-メチル-4-(2-ピペラジン-1-イル)エトキシ)フェネチル)ベンゾ[*f*][1,7]ナフチリジン-5-アミン(52mg、0.114mmol)のDMF(0.5mL)溶液に、炭酸

50

カリウム (39.4 mg、0.285 mmol) を室温で添加し、室温で24時間攪拌した。水およびEtOAcを添加した。有機層を分離した。水層をEtOAcで抽出した。合わせた有機層を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥し、濾過し、真空下で濃縮して、Bocで保護された物質の粗製物を得た。これをDMF (0.5 mL) に溶解し、TFA (0.5 mL、6.49 mmol) を添加し、室温で30分間攪拌した。溶媒を除去した後、15~60% MeCN/水 (+0.1% TFA) で溶離する逆相HPLCにより精製し、N-(3-(4-(2-(4-(5-アミノ-8-メチルベンゾ[*f*][1,7]ナフチリジン-2-イル)エチル)-3-メチルフェノキシ)エチル)ピペラジン-1-イル)プロピル)-2-(アミノオキシ)アセトアミドを得た (25 mg、0.024 mmol、收率21.02%)。LCMS; [M+1] = 586。 10

## 【実施例4】

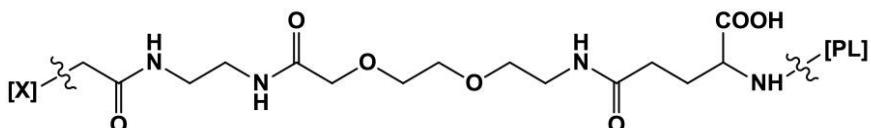
## 【0075】

次の実施例では、抗-VEGF抗体フラグメント(VEGF-Fab)、および該抗体フラグメントの血清中半減期を増加させるために付加される脂肪酸誘導体を使用する。いくつかのより接近し難い鎖内ジスルフィド連結部の存在下での鎖間ジスルフィドの選択的還元は、pH 7のPBS中でTCEPを使用して達成される。還元されたタンパク質をジハロアセトン(ジブロモアセトンまたはジクロロアセトン)と反応させて、硫黄原子を相互に連結する3炭素テザー-CH<sub>2</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-を有する活性化タンパク質を得る。活性化タンパク質を、反応性部分としてアミノオキシを有するリンカー-ペイロード部分と接触させて、ジハロアセトンに由来するケトンとのオキシムを形成する。 20

実施例における連結基Lは、

## 【0076】

## 【化24】

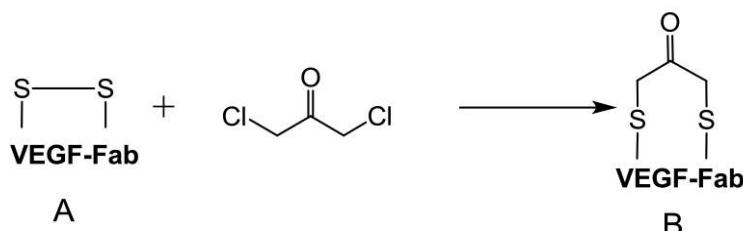


30

(式中、[X]および[PL]は、それぞれ-X-NH<sub>2</sub>およびペイロードPLに対する結合箇所を示し、ペイロードはC18脂肪酸基である。実施例において、Xは-O-NH<sub>2</sub>であり、それは、活性化タンパク質のアセトニルケトンのカルボニルとのオキシムを形成する。図5に、この実施例に関する活性化タンパク質の形成を図示し、その形成に関する証拠を質量スペクトルで示す。)

## 【0077】

## 【化25】



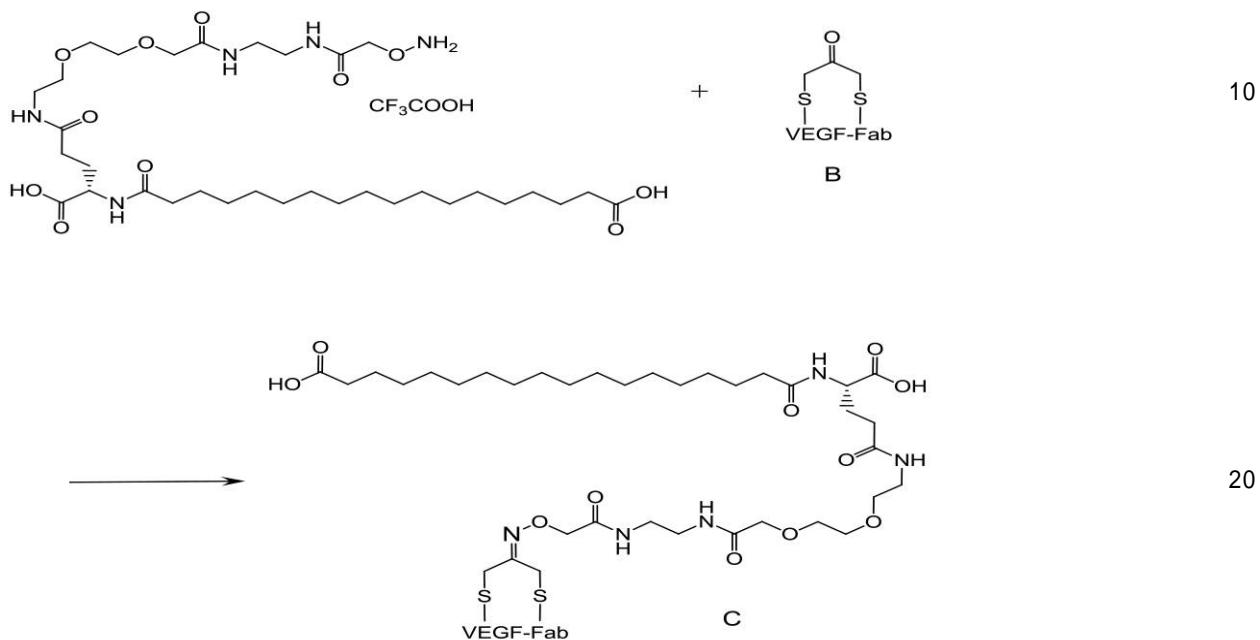
40

A (72.72 μg、6.0 uL、0.0015 μmol) のPBS (pH 7.4、8 μL) 溶液にTCEP-HCl (2.63 μg、0.0092 μmol) を添加した。こ 50

の反応混合物を室温で3時間放置した。1,3-ジクロロプロパン-2-オン(1.945  $\mu$ g、0.015  $\mu$ mol)を添加し、反応物を室温で1時間静置した。Aは、消費され、所望の生成物Bに変換された。粗製物を、サイズ排除カラムに通した。LCMS; [M+1] = 47538。

【0078】

【化26】

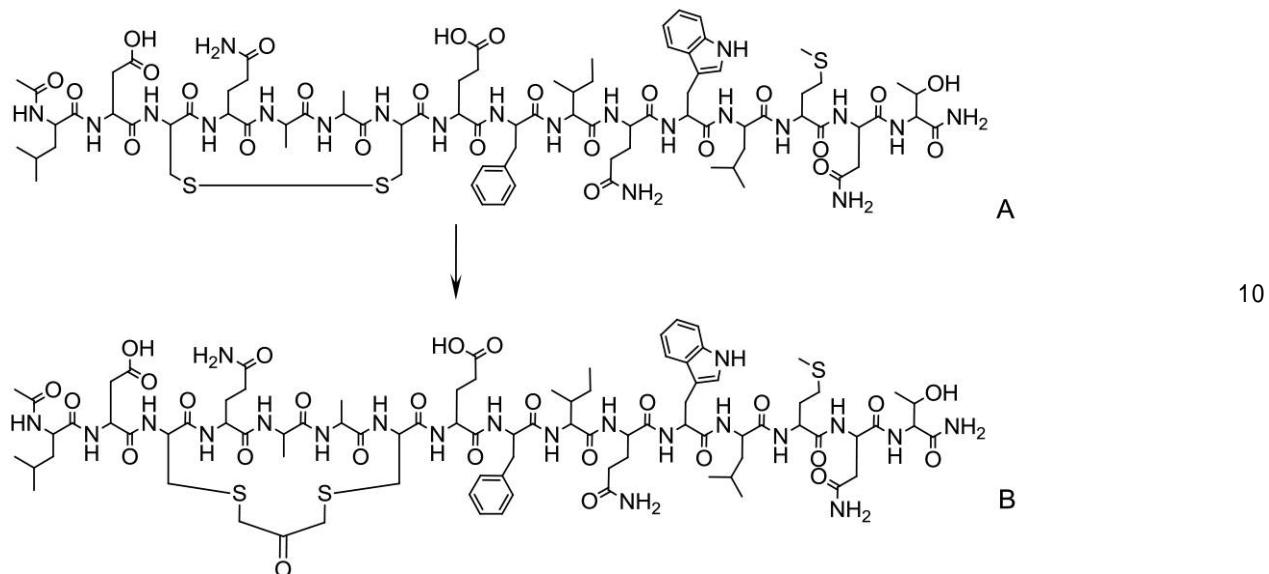


B(36.36  $\mu$ g、0.00076  $\mu$ mol)のPBS(pH 7.4、22.5  $\mu$ L)溶液に、2,2,2-トリフルオロ酢酸と1:1で一緒になった(S)-1-(アミノオキシ)-19-カルボキシ-2,7,16,21-テトラオキソ-9,12-ジオキサ-3,6,15,20-テトラアザオクタトリアコンタン-38-酸化合物(64.33  $\mu$ g、0.079  $\mu$ mol)およびアニリン(0.00105  $\mu$ L、0.011  $\mu$ mol)を室温で添加し、23で14時間攪拌した。Bは、消費され、所望の生成物Cに変換された。粗製物を、Zeba(商標)回転脱塩カラム、7K MWCOThermoScientificからの)に通過させた。LCMS; [M+1](方法A)=48222。図6に、タンパク質複合体の形成を図示し、複合体の形成に関する証拠を質量スペクトルで示す。

【実施例5】

【0079】

## 【化27】



20

ペプチドA (1 mg、0.519  $\mu\text{mol}$ ) を緩衝液 (2.5 mL、pH 6.5の50 mMリン酸ナトリウム緩衝液を1.5 mL、40% MeCNを0.9 mL、2.5% DMFを0.1 mL) に溶解し、TCEP HCl (0.164 mg、0.571  $\mu\text{mol}$ ) を室温で添加した。この反応混合物を60分間攪拌した。反応混合物に1,3-ジブロモアセトン (0.164 mg、0.571  $\mu\text{mol}$ ) のDMF (0.1 mL) 溶液を室温で添加した。3分間攪拌した後、LCMS分析により、アセトン付加体Bが、定量的変換率で形成されたことが観察された。LCMS (方法C) [M + 2] / 2 = 991。

## 【実施例6】

## 【0080】

抗HER2抗体-薬物複合体の調製

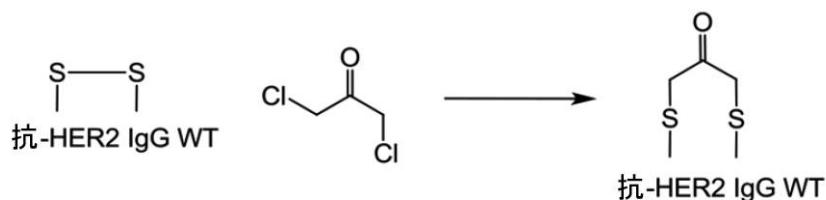
30

方法A：

ステップ1。

## 【0081】

## 【化28】



ステップ1：

抗-HER2 IgGの0.1 M Tris/HCl中溶液 (20.36 mg/mL、30  $\mu\text{L}$ 、610.8  $\mu\text{g}$ 、0.0041  $\mu\text{mol}$ ) および1,3-ジクロロプロパン-2-オン (66.1  $\mu\text{g}$ 、0.495  $\mu\text{mol}$ ) に、TCEP HCl (14.17  $\mu\text{g}$ 、0.049  $\mu\text{mol}$ ) を添加し、4で16時間かき混ぜた。反応混合物を、PBS緩衝液 (pH 7.2) で溶離する0.5 mLのZeba (商標) 回転カラムに通した。4つの鎖間ジスルフィドの修飾が、反応溶液から採取されたサンプルを用いて実施されるPNGアーゼF (New England Biolab)、エンドプロテイナーゼLyse -

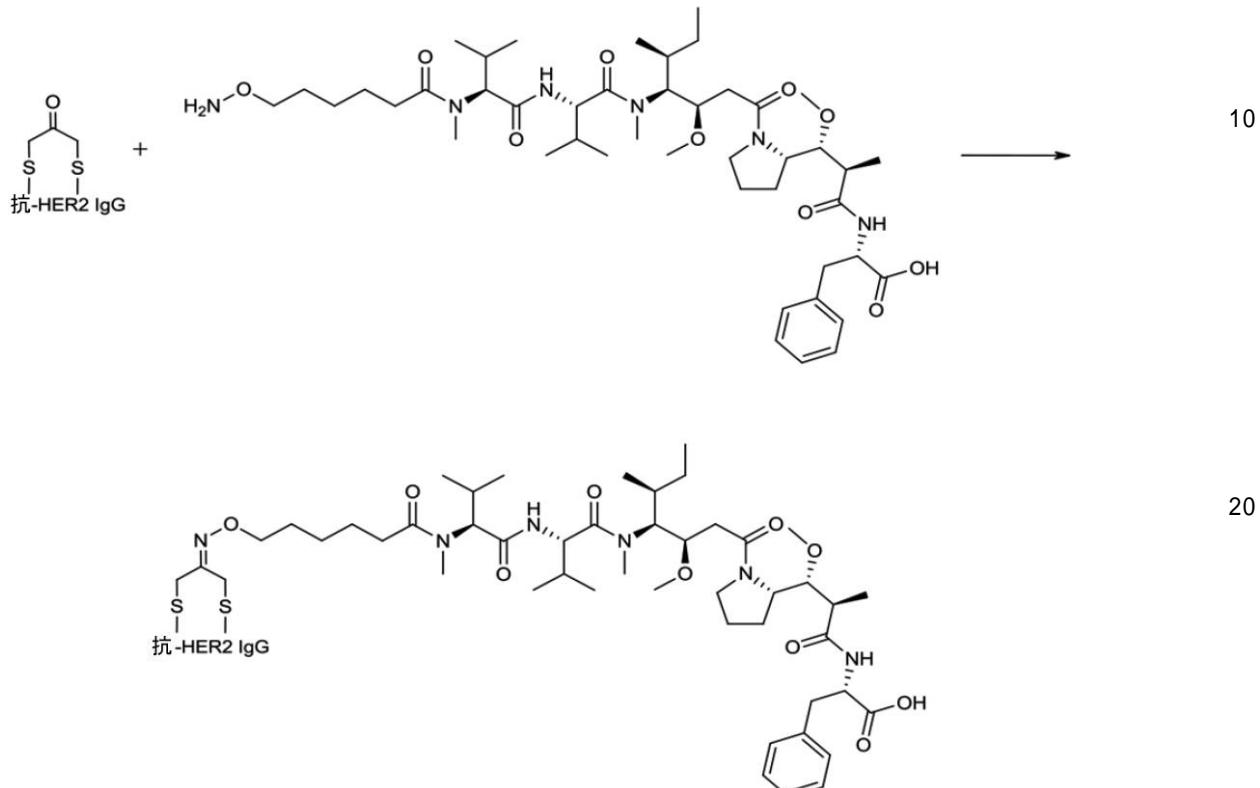
50

C (Roche) および非還元 / 還元 SDS PAGE (4 ~ 12% Bis - Tris ゲル、コロイダルブルー染色) を用いる分析によって確認された。LCMS (方法B) ; 145394 (PNGアーゼFでの脱グリコシル化の後で)。

ステップ2:

【0082】

【化29】



30

ステップ1で調製された修飾型抗-HER2 IgGの100mMアニリン酢酸緩衝液中溶液 (7.14mg/mL、pH 4.8、600μg、0.0040μmol) に、(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(アミノオキシ)-N-メチルヘキサンアミド)-3-メチルブタンアミド)-N,3-ジメチルブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-3-フェニルプロパン酸 (30mg/mL、104μg、0.121μmol) を室温で添加した。生じた混合物を室温で19時間かき混ぜた。混合物を、PBS緩衝液 (pH 7.2) で一度に溶離する0.5mLのZeba (商標) 回転カラムに通した。ケトンの修飾は、反応溶液から採取されたサンプルを用いて実施されるPNGアーゼF (New England Biolab)、エンドプロテイナーゼLys-C (Roche) および非還元 / 還元 SDS PAGE (4 ~ 12% Bis - Tris ゲル、コロイダルブルー染色、下記) を用いる分析によって確認された。DAR (薬物 - 抗体比) は3.2であった。LCMS (方法B) ; 148770 (脱グリコシル化後)。

【0083】

図7に、複合体および還元後の複合体を示す (後記参照)。SeeBlue Plus 2 (登録商標) 事前染色標準 (Invitrogen) を、見かけ分子量ラダーとして使用した。これは、複合生成物中に非複合抗体が、ほとんどまたは全く存在しないことを立証しており、非複合抗体は、ジスルフィド結合のみで相互に保持されていた抗体の還元による解離のため、より低分子量のバンドをもたらす。-S-CH<sub>2</sub>-C(=X)-CH<sub>2</sub>

40

50

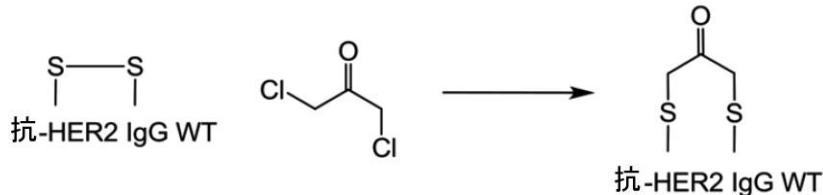
- S - 連結部を介して共有結合で連結されたフラグメントを有する複合体は、還元で解離できない。

方法 B :

ステップ 1 :

【 0 0 8 4 】

【 化 3 0 】



10

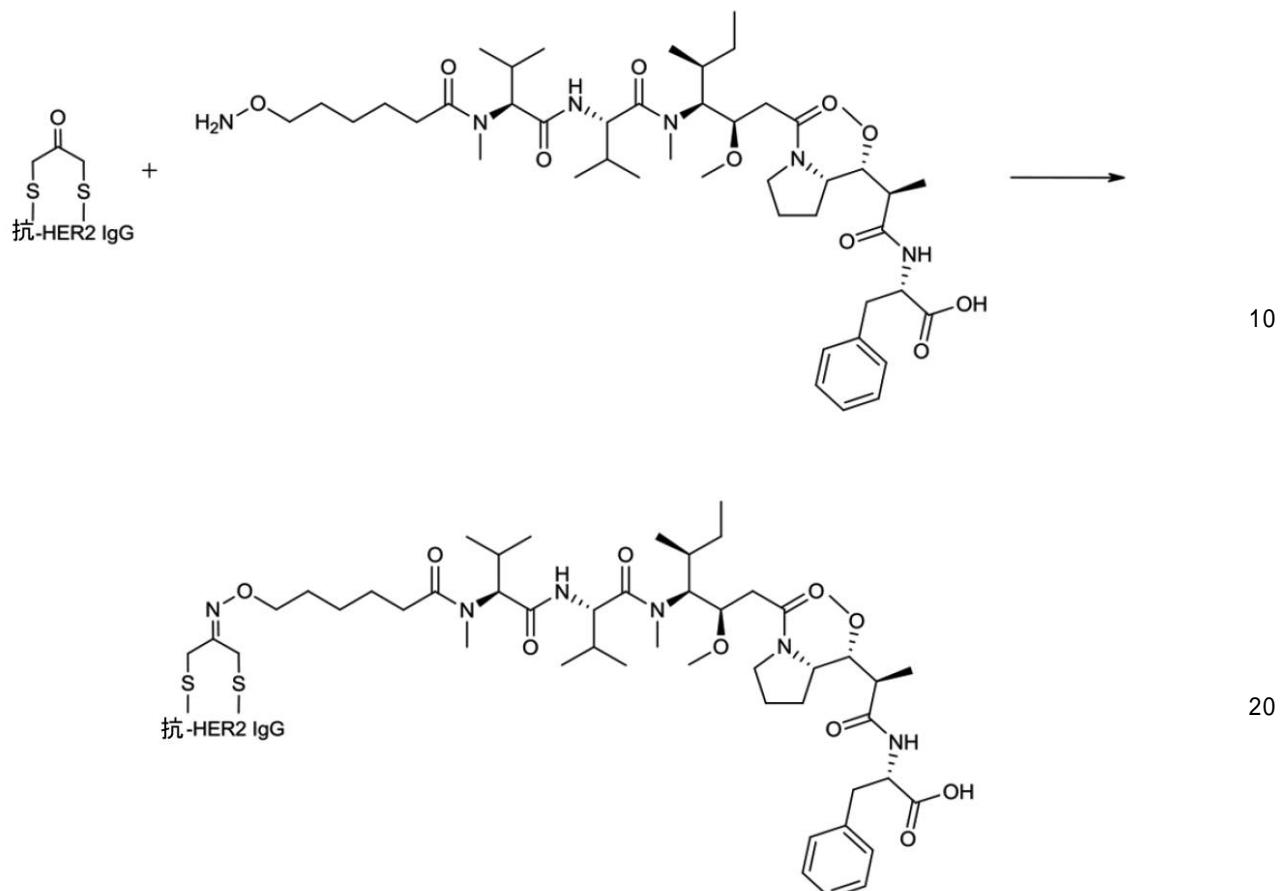
抗 - H E R 2 I g G の 0 . 1 M T r i s / H C l 中 溶 液 ( 2 0 . 3 6 m g / m L 、 3 0 u L 、 6 1 0 . 8  $\mu$  g 、 0 . 0 0 4 1  $\mu$  mol ) お よ び 1 , 3 - ジ ク ロ ロ プ ロ パ ン - 2 - オ ン ( 6 6 . 1  $\mu$  g 、 0 . 4 9 5  $\mu$  mol ) に 、 T C E P H C l ( 1 4 . 1 7  $\mu$  g 、 0 . 0 4 9  $\mu$  mol ) を 添加 し 、 4 で 1 6 時 間 か き 混 ゼ た 。 反 応 混 合 物 を 、 P B S ( p H 7 . 2 ) で 溶 離 す る 0 . 5 m L の Z e b a ( 商 標 ) 回 転 カ ラ ム に 通 し た 。 4 つ ア セ ト ン 形 成 に 由 る 鎮 間 ジ ス ル フ ィ ド の 成 功 裡 の 修 飾 は 、 反 応 溶 液 か ら 採 取 さ れ た サ ン プ ル を 用 い て 実 施 さ れ た P N G ア - ゼ F ( N e w E n g l a n d B i o l a b ) 、 エ ン ド プ ロ テ イ ナ - ゼ L y s - C ( R o c h e ) お よ び 非 還 元 / 還 元 S D S P A G E ( 4 ~ 1 2 % B i s - T r i s ゲ ル 、 コ ロ イ ダ ル ブ ル - 染 色 ) を 用 い る 分 析 に よ つ て 確 認 さ れ た 。 L C M S ( 方 法 B ) ; 1 4 5 3 9 4 ( 脱 グ リ コ シ ル 化 後 ) 。 S D S P A G E の た め の 還 元 サ ン プ ル は 、 前 に 記 載 の 手 順 に 従 つ て 調 製 さ れ た 。

20

ステップ 2 :

【 0 0 8 5 】

【化 3 1】



修飾された抗 - H E R 2 I g G の 1 0 0 m M 酢酸アニリン緩衝液中溶液 ( 7 . 1 4 m g / m L 、 pH 4 . 8 、 6 0 0  $\mu$  g 、 0 . 0 0 4 0  $\mu$  mol ) に、 ( S ) - 2 - ( ( 2 R , 3 R ) - 3 - ( ( S ) - 1 - ( ( 3 R , 4 S , 5 S ) - 4 - ( ( S ) - 2 - ( ( S ) - 2 - ( 6 - ( アミノオキシ ) - N - メチルヘキサンアミド ) - 3 - メチルブタンアミド ) - N , 3 - ジメチルブタンアミド ) - 3 - メトキシ - 5 - メチルヘプタノイル ) ピロリジン - 2 - イル ) - 3 - メトキシ - 2 - メチルプロパンアミド ) - 3 - フェニルプロパン酸 ( 3 0 m g / m L 、 1 0 4  $\mu$  g 、 0 . 1 2 1  $\mu$  mol ) を室温で添加し、室温で 1 9 時間かき混ぜた。生じた混合物を、 P B S ( pH 7 . 2 ) で一度に溶離する 0 . 5 m L の Z e b a ( 商標 ) 回転カラムに通した。ケトンの成功裡の修飾は、反応溶液から採取されたサンプルを用いて実施された P N G アーゼ F ( N e w E n g l a n d B i o l a b ) 、エンドプロテイナーゼ L y s - C ( R o c h e ) および非還元 / 還元 S D S P A G E ( 4 ~ 1 2 % B i s - T r i s ゲル、コロイダルブルー染色、図 8 に示す ) を用いる分析によって確認された。 D A R は 3 . 8 であった。 L C M S ( 方法 B ) ; 1 4 8 7 7 0 ( 脱グリコシル化後 ) 。 S e e B l u e P l u s 2 ( 商標 ) 事前染色標準 ( I n v i t r o g e n ) を、見かけ分子量ラダーとして使用した。 S D S P A G E のための還元サンプルは、前に記載の手順に従って調製された。 S D S P A G E を図 8 に示す。

【実施例 7】

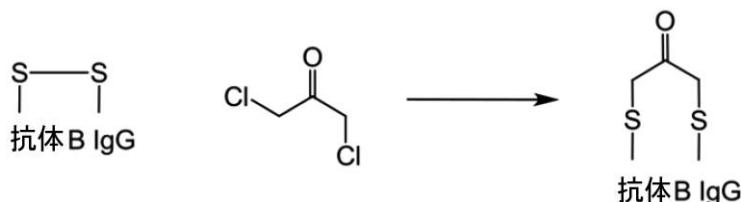
【 0 0 8 6 】

抗体 B - D M 1 複合体の調製

ステップ 1 :

【 0 0 8 7 】

## 【化32】



10

ジクロロアセトン (7.35 mg、0.055 mmol、368 uL) のTriis緩衝液 (4800 uL) 中溶液に、抗体B IgG (抗体B IgGは、Her 2と異なる抗原を認識する、68.2 mg、0.458 μmol、400 uL) を添加し、4に60分間冷却した。TCEP-HCl (1.576 mg、5.50 μmol、524 uL) を4で添加し、4の部屋で16時間放置した。混合物を10 K Amicon (登録商標) 膜濾過を介して濃縮し、PBSで希釈した。このサイクルを2回繰り返した。濾過後、サンプルを、5 mLのZeba (商標) 脱塩カラムに通した。4つアセトン形成による鎖間ジスルフィドの成功裡の修飾は、反応溶液から採取されたサンプルを用いて実施されたPNGアーゼF (New England Biolab) および非還元/還元SDS PAGE (4~12% Bis-Triisゲル、コロイダルブルー染色) を用いる分析によって確認された。LCMS (方法B) ; 146020 (脱グリコシル化後)。SDS PAGEのための還元サンプルは、前に記載の手順に従って調製された。

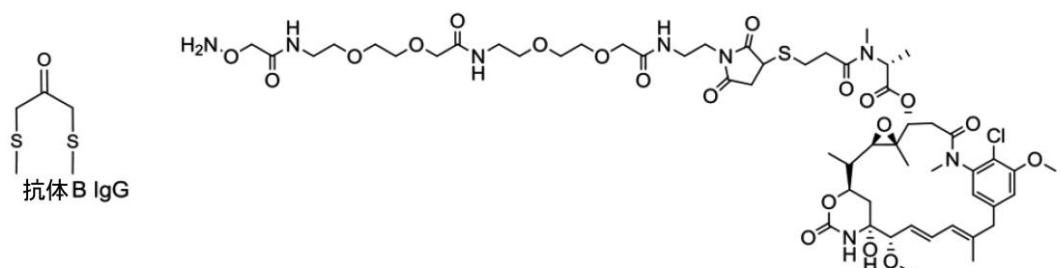
20

ステップ2:

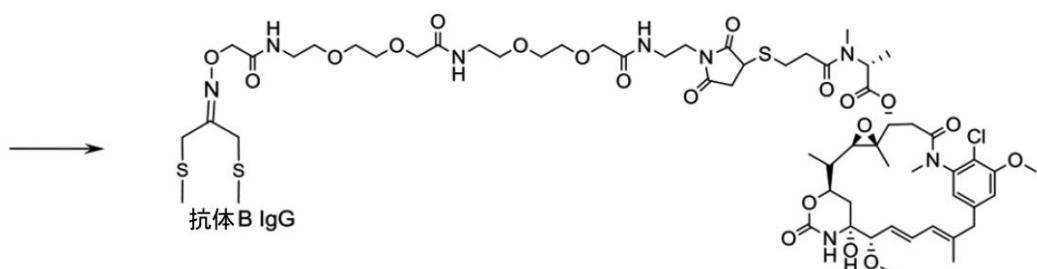
PL1 (方法A):

【0088】

## 【化33】



30



40

修飾された抗体B IgG (4.8 mg、0.322 μmol、1.2 mL) の溶液に、DM-1誘導体 (10.00 mg、8.05 μmol、67 uL) および3,5-ジアミノ安息香酸 (14.70 mg、0.097 mmol、30 uL) のDMSO溶液を添加し

50

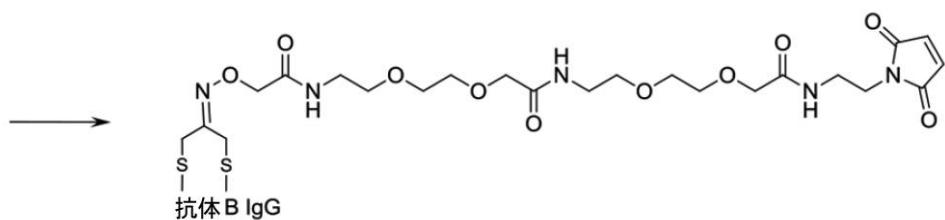
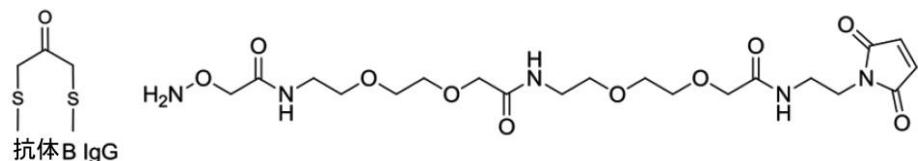
、23で15時間攪拌した。混合物を10K Amicon(登録商標)膜濾過を介して濃縮し、PBSで希釈した。このサイクルを3回繰り返した。濾過後、サンプルを、5mLのZeba(商標)脱塩カラムに通した。ケトンの成功裡の修飾は、PNGアーゼF(New England Biolab)を用いる分析によって確認された。LCMSによればDARは4であった。LCMS(方法B)；150915(脱グリコシル化後)。

PL1(方法B)：

【0089】

【化34】

10



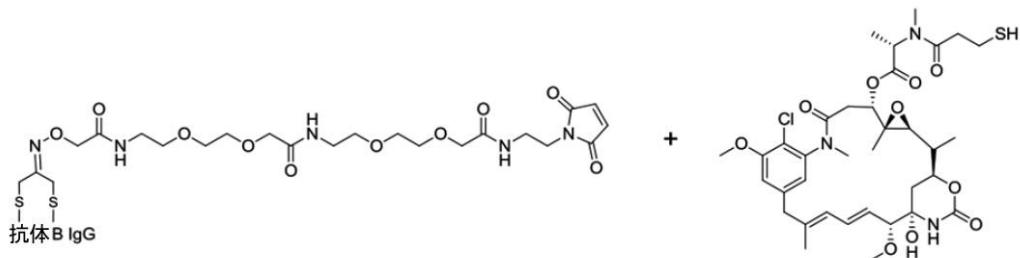
20

修飾された抗体B IgG(679μg、0.0046μmol)の0.1Mリン酸Na(pH6.0)中溶液に、2-(アミノオキシ)-N-(1-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-4,13-ジオキソ-6,9,15,18-テトラオキサ-3,12-ジアザイコサン-20-イル)アセトアミド(563μg、0.911μmol、2.25uL)のDMSO溶液を室温で添加し、23で20時間攪拌した。反応混合物を、EDTAを含む100mM HEPESで溶離する0.5mLの脱塩カラムに3回通した。3.8のマレイミドリンカー/抗体(DAR=3.8)の導入が、LCMSで確認された。LCMS(方法B)；147968(PNGアーゼF(New England Biolab)を用いる脱グリコシル化の後)。

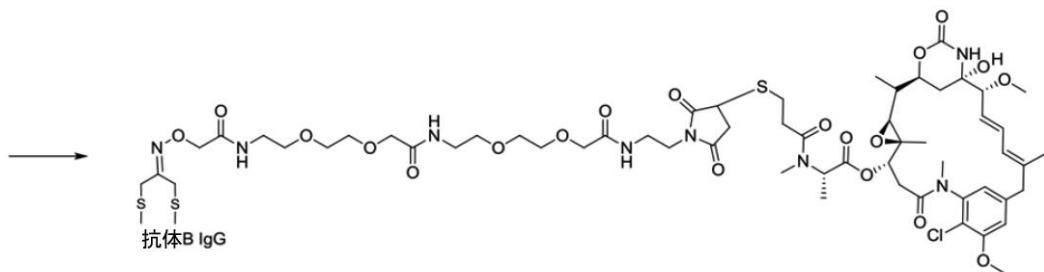
【0090】

30

【化35】



10



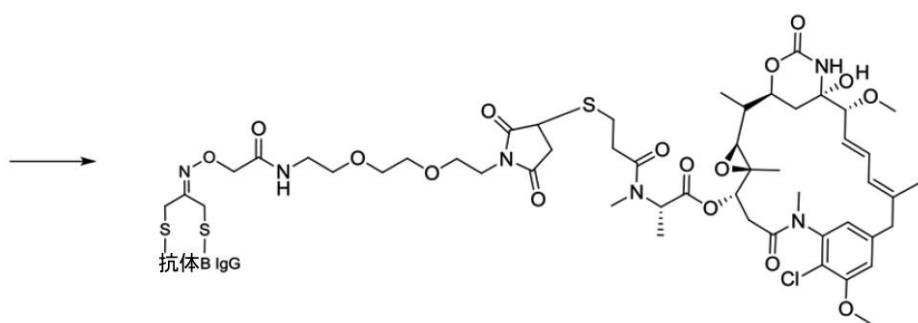
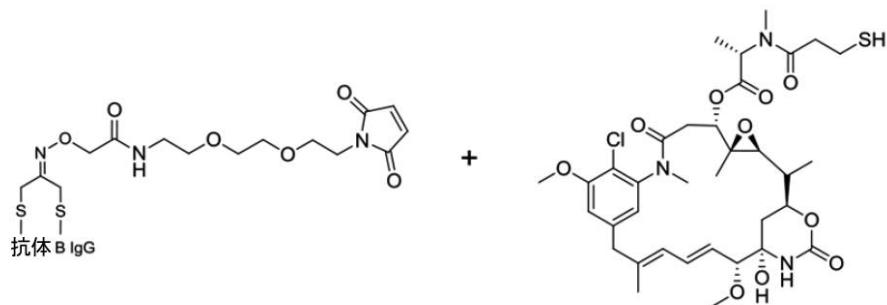
20

修飾された抗体 B IgG (177  $\mu$ g、0.0012  $\mu$ mol) の EDTA を 10 mM で含む 100 mM HEPES 緩衝液中溶液に、DM-1 (8.65  $\mu$ g、0.012  $\mu$ mol、0.288 uL) の DMSO 溶液を室温で添加し、23 で 6 時間かき混ぜた。反応溶液に N-メチルマレイミドの DMSO 溶液 (1.3 mg / mL、2.083  $\mu$ g、0.019  $\mu$ mol) を添加し、10 分間かき混ぜた。反応混合物を、100 mM HEPES 緩衝液で溶離する 0.5 mL の脱塩カラムに通した。LCMS によれば DAR は 3.7 であった。LCMS (方法 B) ; 153967 (DAR 4) (グリコシル化後)。

PL2 :

【0091】

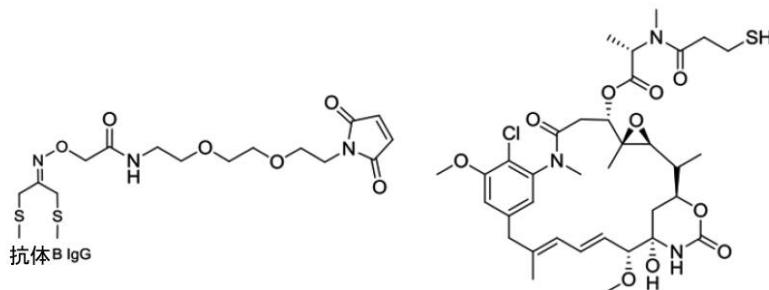
## 【化 3 6】



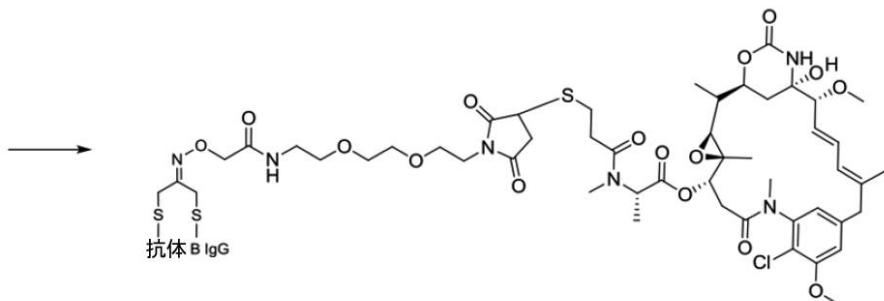
修飾された抗体 B IgG (420  $\mu$ g、0.0028  $\mu$ mol) の EDTA を 10 mM で含む HEPES 緩衝液中溶液に、DM-1 (10.61  $\mu$ g、0.014  $\mu$ mol、0.55  $\mu$ L) の DMSO 溶液を室温で添加し、室温で 8 時間かき混ぜた。反応混合物を、EDTA を含む 100 mM HEPES で溶離する 0.5 mL の脱塩カラムに 3 回通した。反応混合物を、100 mM HEPES 緩衝液で溶離する 0.5 mL の脱塩カラムに通した。LCMS によれば DAR は 3.6 であった。LCMS (方法 B) ; 150101 (DAR4) (PNGアーゼ F (New England Biolab) を用いる脱グリコシル化後)。

【0092】

## 【化37】



10



20

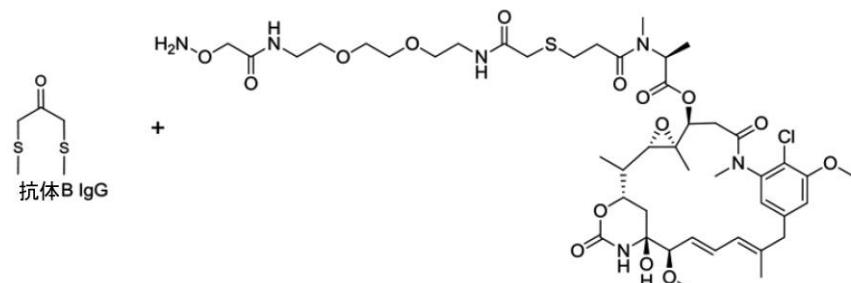
修飾された抗体 B IgG (420 μg、0.0028 μmol) の EDTA を 10 mM で含む HEPES 緩衝液中溶液に、DM-1 (10.61 μg、0.014 μmol、0.55 uL) の DMSO 溶液を室温で添加し、室温で 8 時間かき混ぜた。反応混合物を、EDTA を含む 100 mM HEPES で溶離する 0.5 mL の脱塩カラムに 3 回通した。反応混合物を、100 mM HEPES 緩衝液で溶離する 0.5 mL の脱塩カラムに通した。LCMS によれば DAR は 3.6 であった。LCMS (方法 B) ; 150101 (DAR 4) (PNGアーゼ F (New England Biolab) を用いる脱グリコシル化後)。

PL3 :

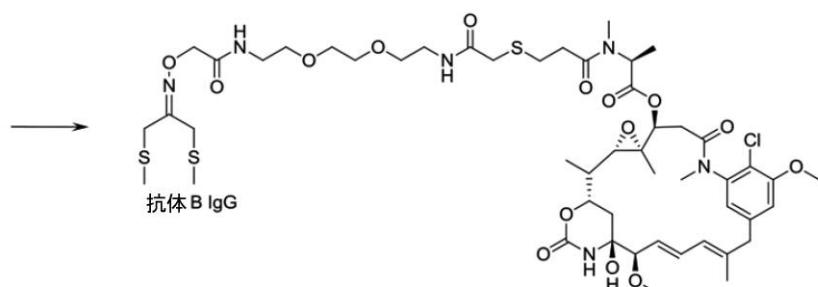
30

## 【0093】

## 【化38】



40



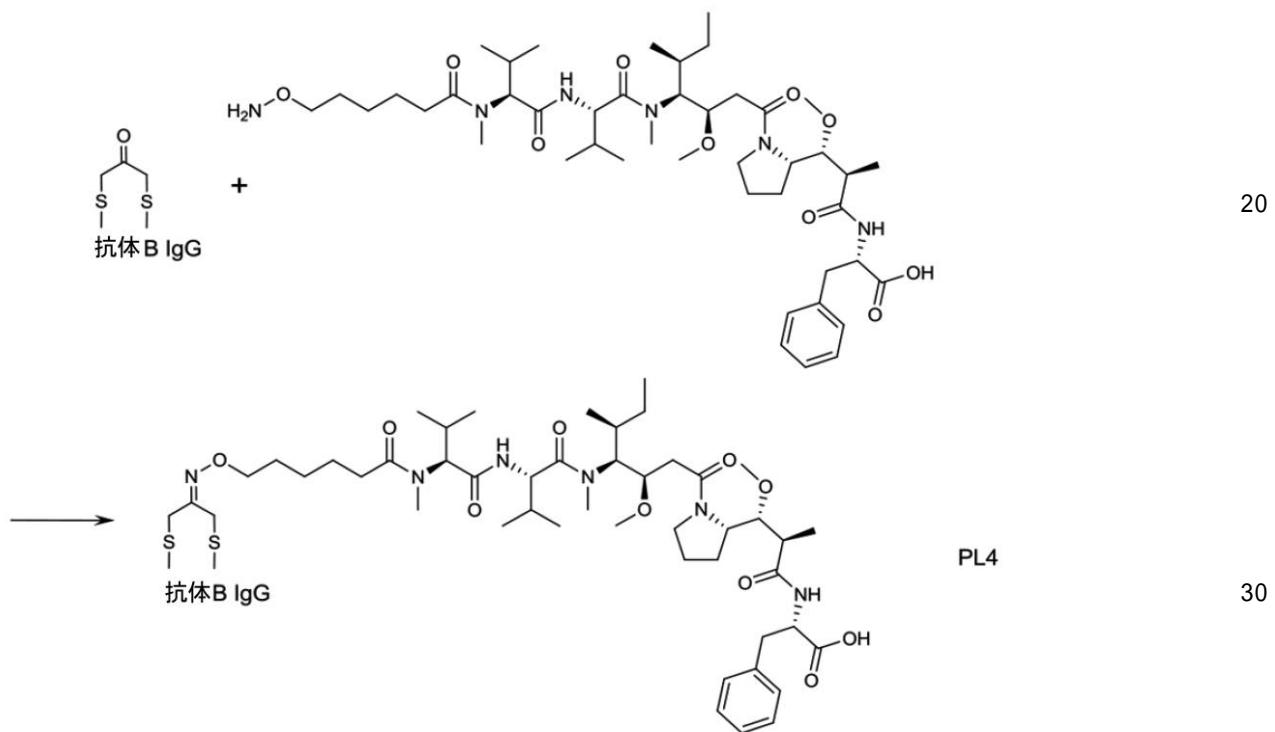
50

修飾された抗体 B IgG (47.3 mg, 0.317 μmol, 1.1 mL) の溶液に、DM-1 誘導体 (6.34 mg, 6.35 μmol, 42.3 uL) および 3,5-ジアミノ安息香酸 (13.52 mg, 0.089 mmol, 27 uL) の DMSO 溶液を添加し、23 で 15 時間攪拌した。混合物を 10 K Amicon (登録商標) 膜濾過を介して濃縮し、PBS で希釈した。このサイクルを 2 回繰り返した。濾過後、サンプルを、5 mL の Zeba (商標) 脱塩カラムに通した。ケトンの成功裡の修飾は、PNG アーゼ F (New England Biolab) を用いる分析によって確認された。LCMS によれば DAR は 4 であった。LCMS (方法 B) ; 150910 (脱グリコシル化後)。 10

PL4 :

【0094】

【化39】



修飾された抗体 B IgG (250 μg, 0.0017 μmol, 10 uL) の PBS 溶液に、上に示した所要のアルコキシアミン (21.66 μg, 0.025 μmol, 0.245 uL) および 3,5-ジアミノ安息香酸 (383 μg, 2.52 μmol, 0.43 uL) を室温で添加し、23 で 24 時間かき混ぜた。反応混合物を、PBS で溶離する 0.5 mL の脱塩カラムに 2 回通した。LCMS によれば DAR は 4 であった。LCMS (方法 B) ; 152446 (グリコシル化後)。 40

PL1 の合成 :

【0095】

## 【化40】

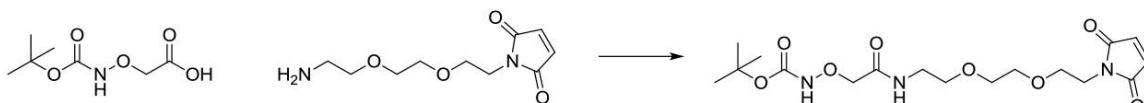


10

2 - ( ( 2 - ( 2 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) エトキシ ) エトキシ ) エチル ) カルバミン酸 *t* *e* *r* *t* - ブチル ( 245 mg, 0 . 746 mmol ) を 4 N HCl / ジオキサン ( 2 mL, 8 . 00 mmol ) に 室温で 溶解し、室温で 1 時間 搅拌した。溶媒を 除去した後、粗製物を、さらなる 精製なしに、次の反応に 使用した。

## 【0096】

## 【化41】



20

2 - ( ( ( *t* *e* *r* *t* - ブトキシカルボニル ) アミノ ) オキシ ) 酢酸 ( 185 mg, 0 . 970 mmol ) および T E A ( 0 . 520 mL, 3 . 73 mmol ) の D C M ( 8 mL ) 溶液に、 E D C ( 172 mg, 0 . 895 mmol ) および H O B T ( 114 mg, 0 . 746 mmol ) を 室温で 添加し、室温で 5 分間 搅拌した。上記反応混合物に、 1 - ( 2 - ( 2 - ( 2 - アミノエトキシ ) エトキシ ) エチル ) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオノン ( 197 mg, 0 . 746 mmol ) の D C M ( 4 mL ) 溶液を 添加した。1 時間 搅拌した後、 D C M および 水を 添加した。有機層を 分離し、水層を D C M で 抽出した。合わせた有機層を、 N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> 上で 乾燥し、 濾過し、 真空下で 濃縮した。 15 ~ 65 % M e C N / 水 ( + 0 . 1 % T F A ) で 溶離する 逆相 H P L C で 精製して、 2 - ( ( 2 - ( 2 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) エトキシ ) エチル ) アミノ ) - 2 - オキソエトキシカルバミン酸 *t* *e* *r* *t* - ブチルを 無色オイルとして 得た ( 62 mg, 0 . 154 mmol, 収率: 2ステップで 20 . 70 % )。 E S I - M S ( 方法 A ) m / z : 402 [ M + 1 ] + 、 保持時間 : 1 . 60 分。 <sup>1</sup>H-NMR ( C D C l <sub>3</sub> - d, 400 MHz); 1.48 (s, 9H), 3.49-3.75 (m, 14H), 6.71 (s, 2H). 30

## 【0097】

## 【化42】



40

50

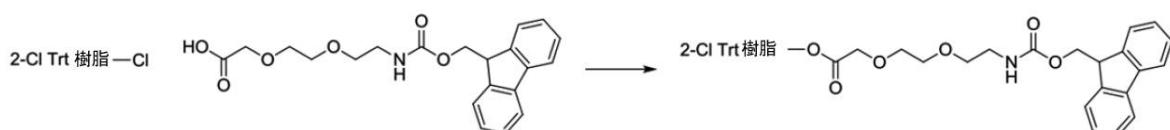
2 - ( ( 2 - ( 2 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) エトキシ ) エトキシ ) エチル ) アミノ ) - 2 - オキソエトキシカルバミン酸 *t* *e* *r* *t* - ブチル ( 62 mg, 0.154 mmol ) の DCM ( 400  $\mu$ L ) 溶液に、 TFA ( 400  $\mu$ L ) を室温で添加し、室温で 1 時間攪拌した。溶媒を除去した後、粗製物を、さらなる精製なしに使用される O.N. のために真空下に貯蔵した。 ESI - MS ( 方法 A ) m/z : 302 [M + 1] <sup>+</sup>。

PL2 の合成 :

【0098】

【化43】

10

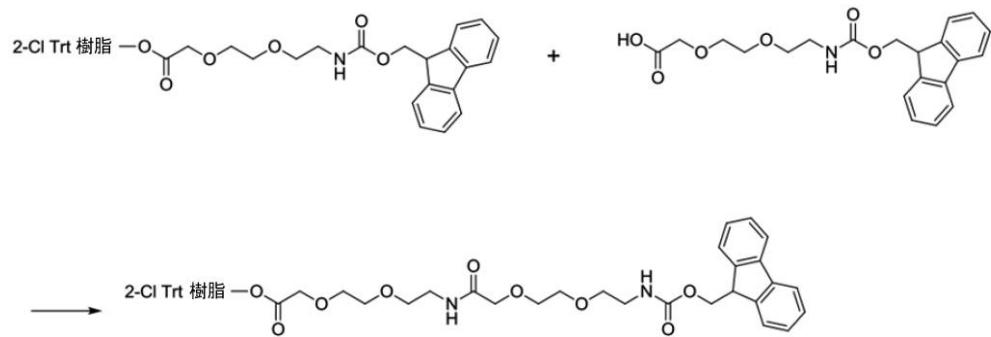


2 - C1 Trt 樹脂 ( 1.70 mmol / g, 0.086 g, 1.7 mmol ) および 1 - ( 9H - フルオレン - 9 - イル ) - 3 - オキソ - 2 , 7 , 10 - トリオキサ - 4 - アザドデカン - 12 - 酸 ( 2 g, 5.19 mmol ) の DCM ( 8 mL ) / DMF ( 4 mL ) 懸濁液中に、 DIPPEA ( 2.67 mL, 15.30 mmol ) を滴加し、室温で 15 時間攪拌した。溶媒を排出した。樹脂を、 DCM / MeOH / DIPPEA ( 17 / 2 / 1 、 40 mL ) 、 DCM ( 8 mL  $\times$  2 ) 、 DMF ( 8 mL  $\times$  2 ) 、 DCM ( 8 mL  $\times$  2 ) ですすぎ洗い、真空下で乾燥した。

【0099】

【化44】

20



30

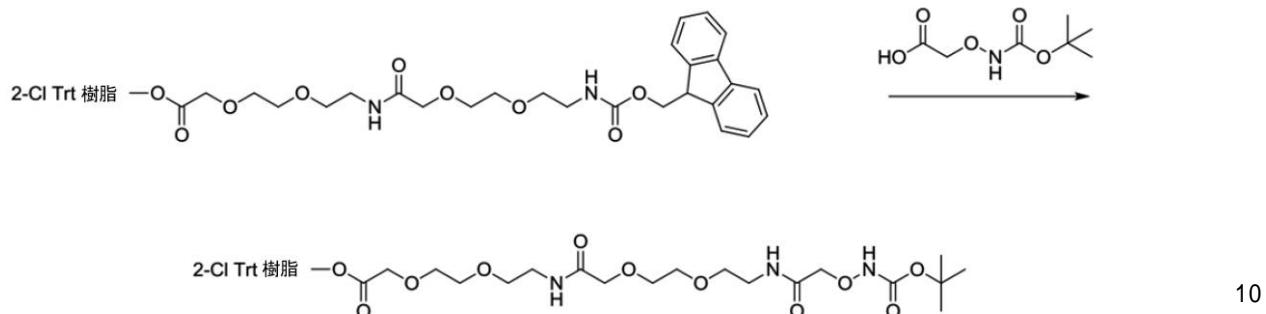
反応容器に樹脂 ( 0.679 g, 1.7 mmol ) を仕込んだ。 5 mL の 20 % ピペリジン / DMF が、添加され、 1 分間穩やかに攪拌され、除去された。新たな 10 mL の 20 % ピペリジン / DMF が、添加され、間欠的に攪拌しながら 20 分間放置され、除去された。 DMF ( 10 mL ) が、添加され、 15 秒間攪拌され、真空濾過で除去された。このステップを 4 回繰り返した ( Kaiser 試験でチェック、陽性、紫 - 深青 )。樹脂に、 HOAt ( 0.463 g, 3.40 mmol ) および 2 - ( ( *t* *e* *r* *t* - ブトキシカルボニル ) アミノ ) オキシ ) 酢酸 ( 0.650 g, 3.40 mmol ) の DMF ( 8 mL ) 溶液を添加し、 DIC ( 0.530 mL, 3.40 mmol ) の DMF ( 4 mL ) 溶液を添加した。反応混合物を室温で 1.5 時間かき混ぜた。樹脂を、濾別し、 DMF ( 10 mL ) で 4 回すすぎ洗い、真空下で乾燥した。

【0100】

40

50

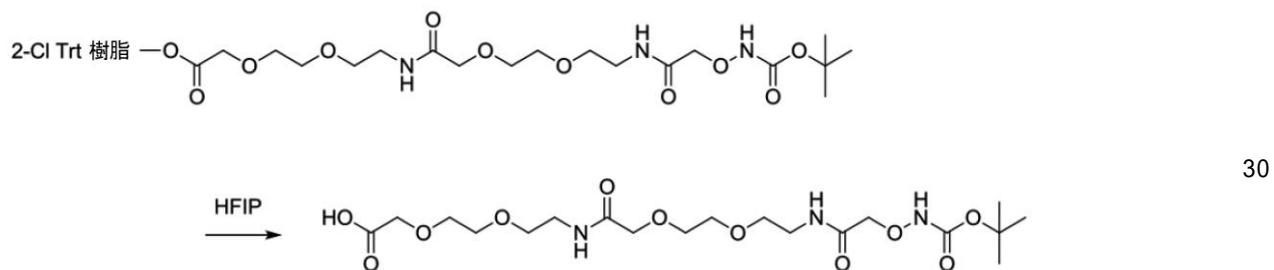
## 【化45】



反応容器に樹脂 (0.926 g、1.7 mmol) を仕込んだ。5 mL の 20% ピペリジン / DMF が、添加され、1 分間穏やかに攪拌され、除去された。新たな 10 mL の 20% ピペリジン / DMF が、添加され、間欠的に攪拌しながら 20 分間放置され、除去された。DMF (10 mL) が、添加され、15 秒間攪拌され、真空濾過で除去された。このステップを 4 回繰り返した (K a i s e r 試験でチェック、陽性、紫 - 深青)。樹脂に、HOAt (0.463 g、3.40 mmol) および 2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)オキシ酢酸 (0.650 g、3.40 mmol) の DMF (8 mL) 溶液を添加し、DIC (0.530 mL、3.40 mmol) の DMF (4 mL) 溶液を添加した。反応混合物を室温で 1.5 時間かき混ぜた。樹脂を、濾別し、DMF (10 mL) で 4 回すすぎ洗い、真空下で乾燥した。

## 【0101】

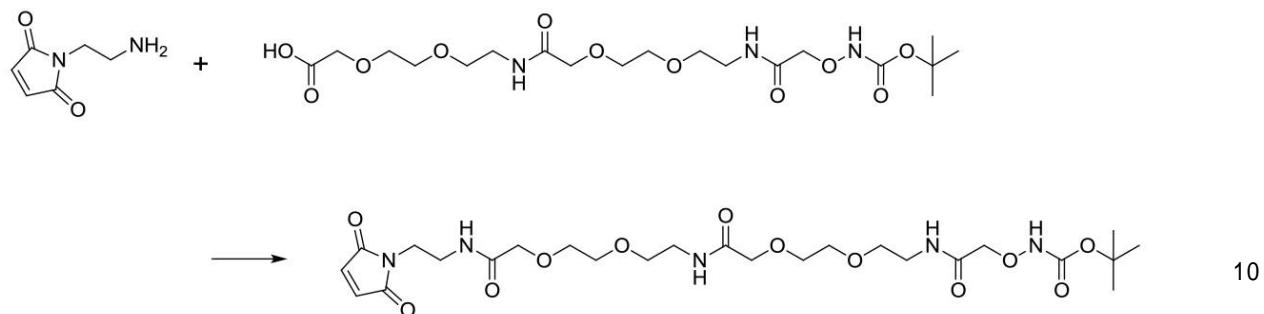
## 【化46】



樹脂を、30% HFIP (ヘキサフルオロイソプロパノール) / CHCl<sub>3</sub> (20 mL、1.700 mmol) に懸濁し、室温で 2 時間かき混ぜた。排出された溶媒を濃縮して、粗の 2,2-ジメチル-4,8,17-トリオキソ-3,6,12,15,21,24-ヘキサオキサ-5,9,18-トリアザヘキサコサン-26-酸を得た (1.13 g、2.347 mmol、収率 138%)。これを、さらなる精製なしに次の反応に使用した。ESI-MS m/z: 482 [M + 1]<sup>+</sup>、保持時間：1.10 分 (方法 B)。

## 【0102】

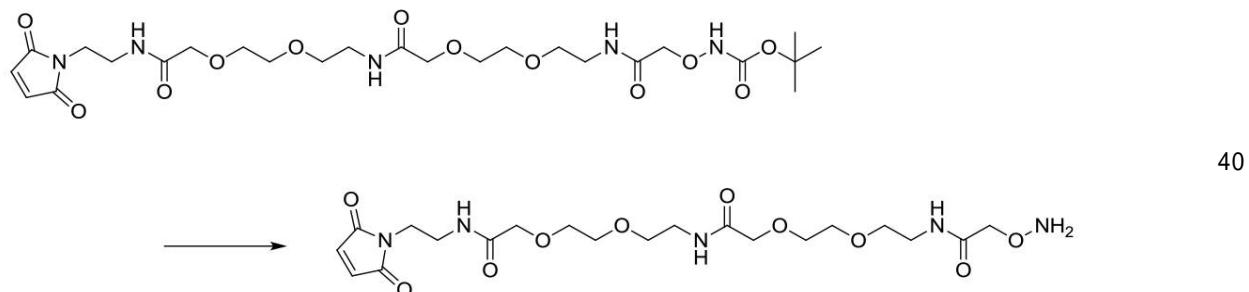
## 【化47】



2,2-ジメチル-4,8,17-トリオキソ-3,6,12,15,21,24-ヘキサオキサ-5,9,18-トリアザヘキサコサン-26-酸(819mg、1.7mmol)のD M F (6mL)溶液に、H O A t (463mg、3.40mmol)およびD I C (0.530mL、3.40mmol)をそれぞれ室温で添加し、室温で5分間攪拌した。上記混合物に1-(2-アミノエチル)-1H-ピロール-2,5-ジオン(518mg、2.040mmol)およびD I P E A (ジイソプロピルエチルアミン、0.594mL、3.40mmol)を室温で添加し、室温で1時間攪拌した。反応混合物を水およびE t O A c (酢酸エチル)で希釈した。有機層を分離した。水層をE t O A c で抽出した。合わせた有機層を、N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> 上で乾燥し、濾過し、真空下で濃縮した。L C M Sによれば、所望の化合物は、大部分水層中に存在した。水層を凍結乾燥した後、粗製物を、15~70%M e C N /水(+0.1%T F A)で溶離する逆相H P L Cにより精製して、23-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-2,11,20-トリオキソ-6,9,15,18-テトラオキサ-3,12,21-トリアザトリコシル)オキシカルバミン酸tert-ブチルを得た(600mg、0.994mmol、收率58.5%)。E S I - M S m/z: 604 [M+1] +、保持時間: 1.14分(方法B)。<sup>1</sup>H-NMR (C D C l 3-d, 400 MHz); 1.48 (s, 7.5H), 1.55 (s, 1.5H), 3.47-3.71 (m, 20H), 3.97 (s, 2H), 4.04 (s, 2H), 4.37 (s, 1.65 H), 4.47 (s, 0.35H), 6.72 (s, 2H). 20

## 【0103】

## 【化48】

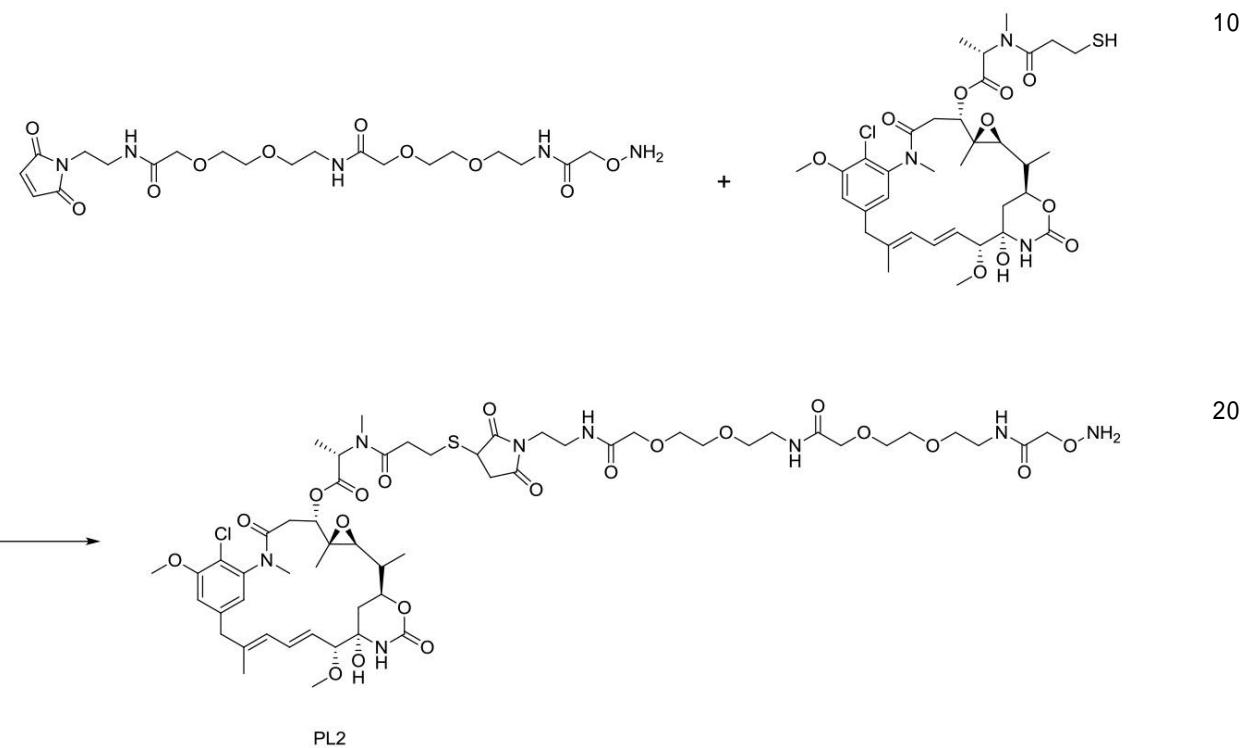


23-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)-2,11,20-トリオキソ-6,9,15,18-テトラオキサ-3,12,21-トリアザトリコシル)オキシカルバミン酸tert-ブチル(8.4mg、0.014mmol) 50

の D C M ( 1 0 0  $\mu$  L ) 溶液に T F A ( 1 0 0  $\mu$  L ) を室温で添加し、室温で 1 時間かき混ぜた。溶媒を除去して、2 - ( アミノオキシ ) - N - ( 1 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) - 4 , 1 3 - ジオキソ - 6 , 9 , 1 5 , 1 8 - テトラオキサ - 3 , 1 2 - ジアザイコサン - 2 0 - イル ) アセトアミドを得た。これを、さらなる精製なしで次の反応に使用した。E S I - M S m / z : 5 0 4 [ M + 1 ] + 、保持時間 : 0 . 6 9 分 ( 方法 A ) 。

【 0 1 0 4 】

【 化 4 9 】



P L 3 の合成 : 2 - ( アミノオキシ ) - N - ( 1 - ( 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 1 - イル ) - 4 , 1 3 - ジオキソ - 6 , 9 , 1 5 , 1 8 - テトラオキサ - 3 , 1 2 - ジアザイコサン - 2 0 - イル ) アセトアミド ( 2 2 . 7 9 m g 、 0 . 0 3 1 m m o l ) の D M A ( 0 . 6 m L ) 溶液に、 D M - 1 ( 2 3 m g 、 0 . 0 3 1 m m o l ) および p H 7 . 4 の 1 0 0 m M リン酸 N a ( 0 . 6 0 0 m L ) を 5 で添加した。D I P E A ( 1 0 . 8 8  $\mu$  L 、 0 . 0 6 2 m m o l ) を同一温度で添加した。この反応混合物を、室温まで戻し、1 . 5 時間攪拌した。反応混合物を D C M および重炭酸ナトリウム飽和水溶液で希釈した。有機層を、 N H <sub>4</sub> C l 饱和水溶液およびブラインで洗浄した。合わせた有機層を、 N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> 上で乾燥し、濾過し、真空下で濃縮した。0 ~ 1 5 % M e O H / D C M で溶離するシリカゲルクロマトグラフィーにより、所望の化合物を得た ( 2 1 m g 、 0 . 0 1 7 m m o l 、 収率 5 4 . 3 % ) 。E S I - M S m / z : 1 2 4 2 [ M + 1 ] + 、 保持時間 : 1 . 0 0 分 ( 方法 A ) 。<sup>1</sup>H-NMR ( C D C I 3 - d , 4 0 0 M H z ) ; 0 . 8 0 ( s , 3 H ) , 1 . 2 1 - 1 . 3 3 ( m , 9 H ) , 1 . 4 1 - 1 . 5 1 ( m , 1 H ) , 1 . 5 6 - 1 . 5 9 ( m , 1 H ) , 2 . 3 1 - 2 . 3 9 ( m , 1 H ) , 2 . 5 7 - 2 . 6 5 ( m , 2 H ) , 2 . 7 9 - 2 . 8 8 ( m , 1 H ) , 2 . 8 6 ( s , 3 H ) , 2 . 9 1 - 3 . 1 3 ( m , 5 H ) , 3 . 1 6 - 3 . 2 4 ( m , 1 H ) , 3 . 2 0 ( s , 3 H ) , 3 . 3 6 ( s , 3 H ) , 3 . 4 3 - 3 . 7 6 ( m , 2 5 H ) , 3 . 9 0 ( d , J = 3 . 6 H z , 2 H ) , 3 . 9 8 ( s , 3 H ) , 4 . 0 2 ( s , 2 H ) , 4 . 1 7 ( s , 2 H ) , 4 . 2 5 - 4 . 3 2 ( m , 1 H ) , 4 . 7 7 - 4 . 8 0 ( m , 1 H ) , 5 . 3 0 - 5 . 3 7 ( m , 1 H ) , 5 . 6 2 - 5 . 6 9 ( m , 1 H ) , 6 . 2 6 ( s , 1 H ) , 6 . 3 8 - 6 . 4 5 ( m , 1 H ) , 6 . 6 3 - 6 . 6 8 ( m , 2 H ) , 6 . 8 2 - 6 . 8 4 ( m , 1 H ) , 6 . 9 2 ( b r s , 1 H ) , 7 . 1 4 - 7 . 2 4 ( 2 H ) .

40  
50

【0105】  
【化50】



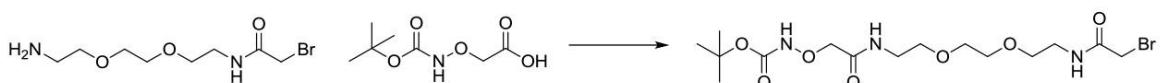
2 - ( 2 - ( 2 - アミノエトキシ ) エトキシ ) エチル ) カルバミン酸 *t e r t* - ブチル ( 320mg、1.289mmol ) の DCM ( 3mL ) 溶液に、2 - ブロモアセチルブロミド ( 0.225mL、2.58mmol ) および DIPPEA ( 0.563mL、3.22mmol ) を 5 分で添加し、15分間攪拌して、室温に戻した。溶媒を除去した後、0 ~ 40 ~ 100% EtOAc / ヘプタンで溶離するシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、2 - ( 2 - ( 2 - ブロモアセトアミド ) エトキシ ) エトキシ ) エチル ) カルバミン酸 *t e r t* - ブチルを得た ( 317mg、0.858mmol、収率 66.6% )。ESI-MS m/z : 269 [M + 1 - Boc] +、保持時間 : 1.41分 (方法A)。H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 1.45 (s, 9H), 3.34 (brs, 2H), 3.48-3.52 (m, 2H), 3.53-3.60 (m, 4H), 3.63 (s, 4H), 3.88 (s, 2H). 10

【0106】  
【化51】



2 - ( 2 - ( 2 - ( 2 - ブロモアセトアミド ) エトキシ ) エトキシ ) エチル ) カルバミン酸 *t e r t* - ブチル ( 317mg、0.858mmol ) の DCM ( 1mL ) 溶液に TFA ( 1mL ) を添加し、室温で 30 分間攪拌した。溶媒を除去した後、得られた粗製物を、さらなる精製なしに次の反応に使用した。 20

【0107】  
【化52】



N - ( 2 - ( 2 - ( 2 - アミノエトキシ ) エトキシ ) エチル ) - 2 - ブロモアセトアミド ( 329mg、0.858mmol ) の DCM ( 1.5mL ) 溶液に、事前活性化エヌテル [ DMF ( 1.5mL ) 中、2 - (( *t e r t* - ブトキシカルボニル ) アミノ ) オキシ ) 酢酸 ( 328mg、1.716mmol ) 、HOAt ( 175mg、1.287mmol ) および DIC ( 0.267mL、1.716mmol ) から室温で 5 分間攪拌して調製された ] および DIPPEA ( 0.749mL、4.29mmol ) を 5 分で添加し、 30

20分間攪拌して室温に戻した。EtOAcおよび水を添加した。有機層を分離した。水層をEtOAcで抽出した。合わせた有機層を、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥し、濾過し、真空下で濃縮した。0~5%MeOH/DCMで溶離するシリカゲルクロマトグラフィーで精製して、14-ブロモ-2,13-ジオキソ-6,9-ジオキサ-3,12-ジアザテトラデシル)オキシカルバミン酸tert-ブチルを得た(150mg、0.339mmol、収率39.5%)。ESI-MS m/z: 343 [M+1-Boc]<sup>+</sup>、保持時間: 1.30分(方法A)。H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz); 1.49 (s, 9H), 3.47-3.55 (m, 4H), 3.59-3.63 (m, 4H), 3.65 (s, 4H), 3.88 (s, 2H), 4.34 (s, 2H).

【0108】

【化53】

10

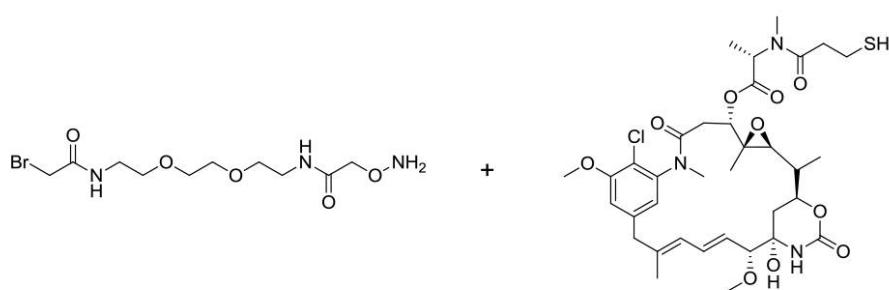


(14-ブロモ-2,13-ジオキソ-6,9-ジオキサ-3,12-ジアザテトラデシル)オキシカルバミン酸tert-ブチル(150mg、0.339mmol)をDCM(容積: 1mL、比率: 1.000)に溶解し、TFA(容積: 1、比率: 1.000)を室温で添加した。この反応混合物を室温で30分間攪拌した。溶媒を除去した後、10~25%MeCN/水(+0.1%TFA)で溶離する逆相HPLCにより、2-(アミノオキシ)-N-(2-(2-(2-ブロモアセトアミド)エトキシ)エトキシ)エチル)アセトアミドを得た(110mg、0.241mmol、収率71.1%)。ESI-MS m/z: 344 [M+2]<sup>+</sup>、保持時間: 0.44分(方法A)。

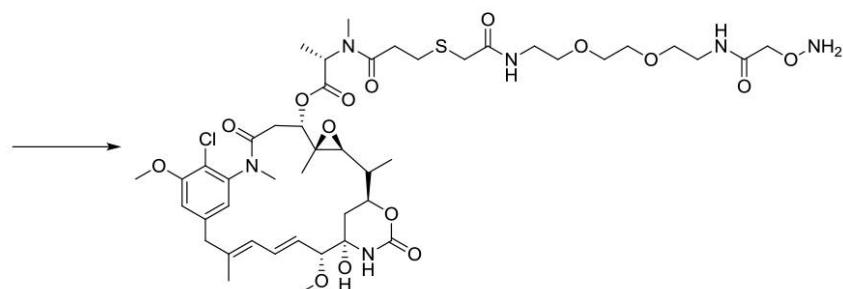
【0109】

【化54】

20



30



40

PL3

50

2-(アミノオキシ)-N-(2-(2-(2-(2-ブロモアセトアミド)エトキシ)エトキシ)エチル)アセトアミド(42.9mg、0.075mmol)のDMA(1mL)溶液に、DM-1(37mg、0.050mmol)および75mMリン酸Na(pH8.5、1mL)を5℃で添加した。Dipea(0.026mL、0.150mmol)を同一温度で添加した。この反応混合物を室温まで戻し、1時間攪拌した。反応混合物を、DCMおよび重炭酸ナトリウム飽和水溶液で希釈し、有機層をNH<sub>4</sub>Cl飽和水溶液およびブラインで洗浄した。合わせた有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥し、濾過し、真空中で濃縮した。0~15%MeOH/DCMで溶離するシリカゲルクロマトグラフィーにより、所望の化合物を得た(31mg、0.031mmol、収率61.9%)。ESI-MS m/z: 1000 [M+1]<sup>+</sup>、保持時間: 1.61分(方法A)。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>-d, 400 MHz); 0.79 (s, 3H), 1.20-1.33 (m, 9H), 1.41-1.50 (m, 2H), 2.17-2.22 (m, 1H), 2.50-2.63 (m, 2H), 2.70-2.81 (m, 2H), 2.86-2.94 (m, 3H), 2.99-3.01 (m, 1H), 3.10-3.13 (m, 1H), 3.18-3.20 (m, 4H), 3.36 (s, 3H), 3.45-3.62 (m, 14H), 3.98 (s, 3H), 4.17 (s, 2H), 4.25-4.31 (m, 1H), 4.78-4.82 (m, 1H), 5.30-5.35 (m, 1H), 5.63-5.69 (m, 1H), 6.27 (s, 1H), 6.39-6.45 (m, 1H), 6.61-6.64 (m, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.87 (brs, 1H).

## 【実施例8】

## 【0110】

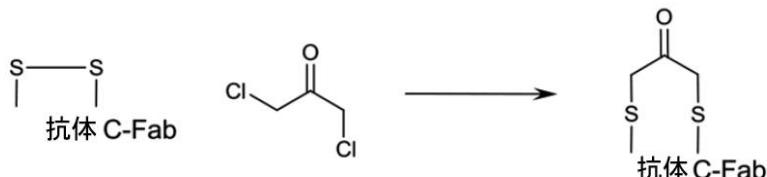
抗体C Fab 複合体

20

ステップ1:

## 【0111】

## 【化55】



30

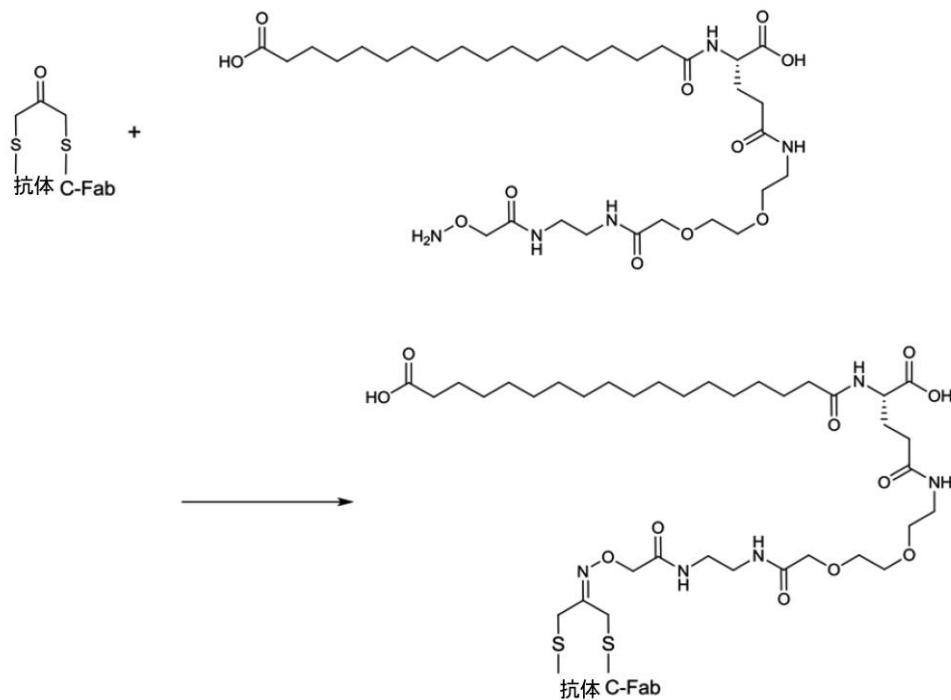
抗体C Fab (抗体CはHer2および抗体Bと異なる標的抗原に結合する: 166.8 μg、0.035 μmol、120 μL)のEDTA含有100mMリン酸Na(pH7.4)中溶液に、TCEP-HCl(35.2 μg、0.123 μmol、11.73 μL)を室温で添加し、23℃で1.5時間かき混ぜた。反応混合物に1,3-ジクロロプロパン-2-オン(117 μg、0.878 μmol、5.85 μL)を添加し、23℃で40分間かき混ぜた。LCMSにより1つのアセトン橋での修飾が観察された。反応混合物を、100mM NaOAc緩衝液(pH5.2)で溶離する0.5脱塩カラムに通した。LCMS(方法B); 47554。

ステップ2:

40

## 【0112】

## 【化 5 6】



修飾された抗体 C-Fab (1668  $\mu$ g、0.035  $\mu$ mol、148 uL) の、100 mM NaOAc 緩衝液 (pH 5.2) 中溶液および示したアミノオキシ置換脂肪酸 (1852  $\mu$ g、2.63  $\mu$ mol) に、3,5-ジアミノ安息香酸 (694  $\mu$ g、4.56  $\mu$ mol、5.34 uL) を室温で添加し、23 で 20 時間かき混ぜた。混合物にさらなるアミノオキシ-脂肪酸 (1852  $\mu$ g、2.63  $\mu$ mol) を添加し、室温で 24 時間かき混ぜた。反応混合物を、PBS (pH 7.4) で溶離する 5 mL の脱塩カラムに通し、予想される抗体 C-Fab-脂肪酸複合体を得た (収率 30%)。LCMS (方法 B) ; 48238。

30

## 【0113】

複合体に関する SDS-PAGE 画像および質量スペクトルを図 9 に示す。

## 【実施例 9】

## 【0114】

## ジクロロアセトンおよび TCEP の添加順序の効果

すべての反応は、25 で 50 mM 緩衝液 (特記しない限り T R I S ) を使用して pH 8.0 で実行した。反応は、ウェル中で、(58.8  $\mu$ L) および緩衝液 (20  $\mu$ L の 1 M 緩衝液) を用い、次いで I g G 1 (6.6  $\mu$ L の 170.5 mg / mL 含有溶液) および TCEP (8.6  $\mu$ L の 3 mg / mL TCEP 水溶液) を添加して実行した。示した時間放置した後、1,3-ジクロロアセトン (6  $\mu$ L の 20 mg / mL DMSO 溶液) を添加した。

40

## 【0115】

最初の実験系列では、反応を、最初に還元剤 (TCEP-HCl) を添加すること、1 時間後に 1,3-ジクロロアセトンを添加することによって実行した。生成混合物を DTT または TCEP で還元した後、生成物の分布をマイクロチップ電気泳動 - SDS 法によって分析した (Electrophoresis 2012, vol. 33, 765~772)。結果を次表に示す : LC = 軽鎖、HC = 重鎖、HL = 重鎖 + 軽鎖、HH = 重鎖 + 重鎖、HHL = HC + HC + LC、および LHHHL = LC + HC + HC + LC。データは、任意の残留ジスルフィドを開裂するための還元後で、主要生成物が HC-LC (重鎖 - 軽鎖) 付加物であることを示す。このことは、これらの条件下では部分的な反応が起こるにすぎないことを立証している。この

50

データは、反応が本質的に最初の半時間以内に行われたことも立証している。

【0116】

【表2】

サンプル名称	相対面積	相対面積	相対面積	相対面積	相対面積	相対面積
	% LC	% HC	% HL	% HH	% HHL	% LHHL
TCEPを先に、t=0.5h	3.3	5.4	50.9	0.6	6.5	33.3
TCEPを先に、t=1h	3.2	4.7	51.9	0.8	5.9	33.6
TCEPを先に、t=1.5h	2.9	4.6	50.1	0.6	6.4	35.5
TCEPを先に、t=2h	3.0	4.5	51.8	0.7	6.0	33.9
TCEPを先に、t=3h	2.9	4.0	52.2	0.6	6.1	34.2
TCEPを先に、t=17h	2.7	4.5	50.6	0.8	6.4	35.0

10

20

【0117】

次の実験セットは、ポリペプチド / 緩衝液の反応混合物に 1, 3 - ジクロロアセトンを添加した後に還元剤を添加したこと以外は、同一条件下で実行した。これらの実験からの結果を次表に示すが、表は、L H H L 有意な増加を示し、この増加は、抗体の 4 つのジスルフィドの中の少なくとも 3 つのジスルフィドの、1, 3 - ジクロロアセトンとジスルフィド由来の双方の硫黄原子との反応によって形成される共有連結部への変換に対応している。さらに、反応は、本質的に 30 分以内に完了していると思われる。

【0118】

【表3】

サンプル名称	相対面積	相対面積	相対面積	相対面積	相対面積	相対面積
	% LC	% HC	% HL	% HH	% HHL	% LHHL
ジクロロアセトンを先に、t=0.5h	2.83	0.82	7.13	0.98	13.01	75.23
ジクロロアセトンを先に、t=1h	2.95	0.72	6.94	1.17	13.42	74.81
ジクロロアセトンを先に、t=1.5h	2.64	0.61	6.42	1.09	13.61	75.63
ジクロロアセトンを先に、t=2h	2.63	0.61	6.43	1.08	13.49	75.77
ジクロロアセトンを先に、t=3h	2.38	0.51	6.4	1.07	13.41	76.23
ジクロロアセトンを先に、t=17h	2.47	0.56	5.94	1.04	13.39	76.59

30

40

【0119】

50

これらの実験は、ジクロロアセトンを添加した後にジスルフィドの還元を開始すると、スルフヒドリルからスルフヒドリルへの架橋反応の効率が驚くほど大きく増大することを立証している。緩衝液としてPBSを用いると、生成物の収率はより低かった。

#### 【0120】

別の実験で、使用するジクロロアセトンの量を10倍に増加すると反応が阻害されると、ならびにpHを7.40、7.10、6.80および6.60に低下させるとLHH-L生成物の収率は、同様であるかわずかに向上することが立証された。

#### 【実施例10】

#### 【0121】

緩衝液の選別

10

反応は、1,3-ジクロロアセトンと1gGとの緩衝液(100mM)中の事前混合溶液に還元剤(TCEP-HCL)を室温で添加することによって実行した。7時間後に生成混合物をDTTまたはTCEPで還元した後に、マイクロチップ電気泳動-SDS法によって生成物の分布を分析した。結果を次表に示す: LC = 軽鎖、HC = 重鎖、HL = 重鎖+軽鎖、HH = 重鎖+重鎖、HHL = HC + HC + LC、および「インタクトな」 = (HC)<sub>2</sub>(LC)<sub>2</sub>、LHHL = LC + HC + HC + LC。収率は、LHHLの割合から求めた。

#### 【0122】

【表4】

測定されたpH	緩衝液	反応収率[%]
7	Bis-TRIS	87.7
6.9	ビス-TRIS-プロパン	87.4
6.5	コハク酸塩	75.8
6.8	ADA	86.2
6.8	イミダゾール	85.5
7.4	TRIS	86.5
6.6	MES	85.0
6.6	クエン酸塩	79.6
6.6	PIPES	83.3
6.6	MOPS	86.9
7.2	トリシン	86.8
6.3	TES	85.9
6.3	HEPES	82.7
7.1	EPPS	84.3
7.1	ビシン	86.5
7	PBS50/TRIS50	86.5
7.1	TAPS	85.1
6.8	グリシルグリシン	86.6
6.5	PBS75/TRIS25	86.1
6.1	PBS90/TRIS10	84.7
8.7	炭酸塩	67.8

本発明は、以下の態様を含む。

[1]

還元可能なジスルフィド結合を含むポリペプチドを、式 [PP] - S - CH<sub>2</sub> - C(=O) - CH<sub>2</sub> - S - [PP] の基（式中、各 S は前記ジスルフィド結合に由来する硫黄であり、[PP] は連結基の末端が前記ポリペプチドに結合している場所を示す）を含むケトンで修飾されたポリペプチドに変換する方法であって、

還元可能なジスルフィド結合を含むポリペプチド、水性緩衝液、および 1,3-ジハロアセトンの混合物を形成し、次いで前記ジスルフィド結合を還元できる還元剤を添加することを含む、前記方法。

[2]

前記 1,3-ジハロアセトンが、1,3-ジクロロアセトンである、[1] に記載の方法。

[3]

10

20

30

40

50

前記還元剤が、水溶性のホスフィンまたはホスフィン塩である、[1]または[2]に記載の方法。

[4]

前記ポリペプチドが、抗体または抗体フラグメントである、[1]から[3]のいずれか一項に記載の方法。

[5]

ケトンで修飾されたポリペプチドをオキシムで修飾されたポリペプチドに変換する方法であって、前記ケトンで修飾されたポリペプチドをアミン系促進剤の存在下で式R-O-NH<sub>2</sub>の基と少なくとも約1mg/mLのポリペプチド濃度で接触させることを含む、前記方法。

10

[6]

前記ケトンで修飾されたポリペプチドが、[1]から[4]のいずれか一項に記載の方法で調製される、[5]に記載の方法。

[7]

前記アミン系促進剤が、カルボキシ置換アニリンまたはアシリヒドラジンである、[6]に記載の方法。

[8]

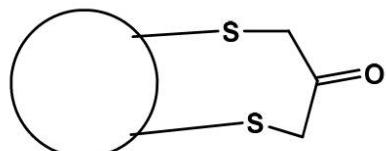
式R-O-NH<sub>2</sub>の基が、式H<sub>2</sub>N-O-L-PLの化合物（式中、Lはリンカーを表し、PLはペイロード基を表す）である、[5]から[7]のいずれか一項に記載の方法。

20

[9]

前記ケトンで修飾されたポリペプチドが、式：

【化57】



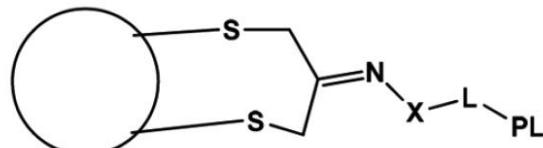
30

（式中、円は前記ポリペプチドを表し、各硫黄原子は、前記ポリペプチドのシステイン残基のスルフヒドリルである）のものである、[5]に記載の方法。

[10]

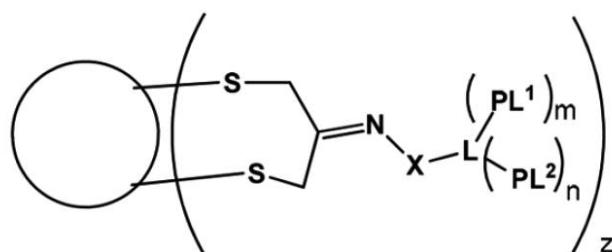
前記タンパク質-ペイロード複合体が、式：

【化58】



または

40



50

(式中、XはOであり、Lはリンカーを表し、zは1～10の整数であり、PL、PL<sup>1</sup>およびPL<sup>2</sup>は、出現する毎に独立に、ペイロード基を表す)のものである、[5]から[9]のいずれか一項に記載の方法。

[11]

前記ポリペプチドが抗体である、[5]から[10]のいずれか一項に記載の方法。

[12]

前記ポリペプチドがワクチン担体である、[5]から[10]のいずれか一項に記載の方法。

[13]

10

前記ペイロードが、治療薬を含む、[5]から[12]のいずれか一項に記載の方法。

[14]

前記ペイロードが、検出可能な標識または結合基を含む、[5]から[13]のいずれか一項に記載の方法。

[15]

Lが、開裂可能な連結部分を含む、[14]に記載の方法。

[16]

Lが、

(a) 結合、-O-、-S-、-NH-、-N((C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル)H-、-N  
H-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-；

20

(b) (C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン、-Z-(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、-Z-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン、-Z-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン、(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン-Z-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン-Z-(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン [式中、Zは、-NH-、-N(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル)、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、-NH-C(O)-、(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、フェニレン、ヘテロアリーレン、またはヘテロシクレンであり、前記(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、前記(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン、および前記(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン部分は、それぞれ独立に、前記部分内に散在する1～10個の酸素原子を任意選択で含んでいてもよい]；

30

(c) (C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン-Y-(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、-Y-(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、フェニレン、-Y-フェニレン、フェニレン-Y-フェニレン、ヘテロアリーレン、Y-ヘテロアリーレン、ヘテロアリーレン-Y-ヘテロアリーレン、ヘテロシクレン、-Y-ヘテロシクレン、またはヘテロシクレン-Y-ヘテロシクレン [式中、Yは、(C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>)アルキレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルケニレン、(C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>)アルキニレン、-O-、-C(O)-、-S-、-NH-、-N((C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル)、-NH-C(O)-NH-、-C(O)-NH-、または-NH-C(O)-であり、前記(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)シクロアルキレン、前記フェニレン、前記ヘテロアリーレン、および前記ヘテロシクレン部分は、それぞれ独立に、ハロ、(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルキル、またはハロ置換(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルキルから選択される1～3個の置換基で、任意選択で置換されていてもよい]；

40

(d) -[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub>-または-J-{CH<sub>2</sub>[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub>}<sub>w</sub>- (式中、vは1～2,000であり、wは1～4であり、JはCH<sub>2</sub>またはNHである)；

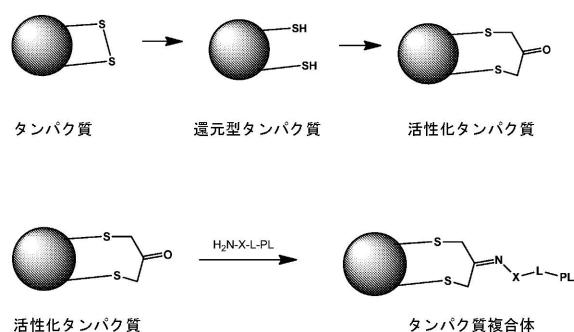
(e) 1～100個のアミノ酸を含むペプチド；および

(f) デンドリマー、デンドロン、および超分岐ポリマーを含む樹状高分子から選択される少なくとも1つのスペーサーを含む、[5]から[15]のいずれか一項に記載の方法

。

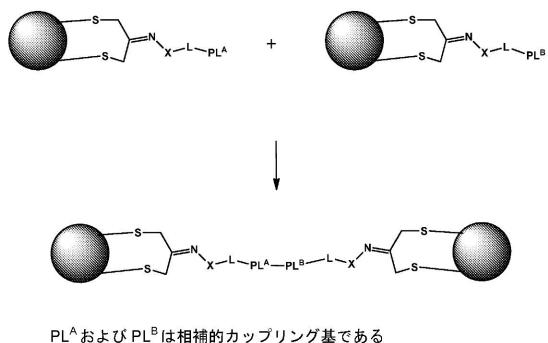
【図1】

図1



【図2】

図2.相補的カップリング基を有する2つの複合体のカップリング



【図3】

図3

図3A

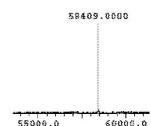


図3B

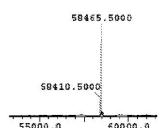
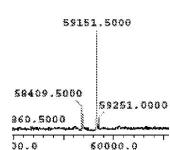


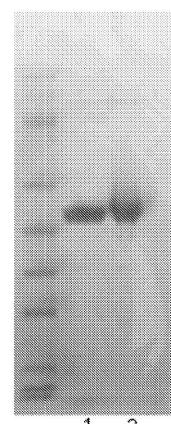
図3C



【図4】

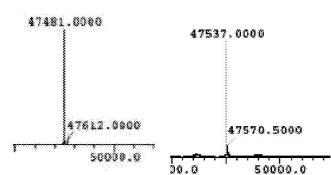
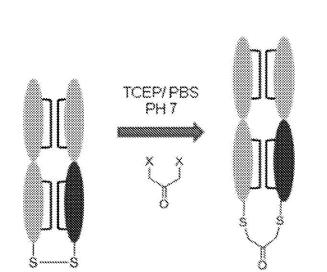
図4

部位限定型アジド化合物を保持するCRM197のSDS PAGEゲル分析

1-ケトン修飾型 CRM-197  
2-オキシム修飾型 CRM-197

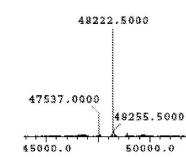
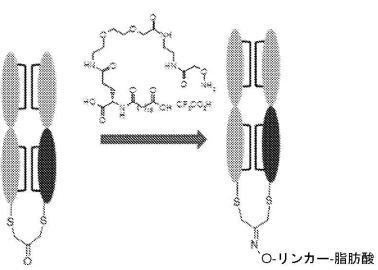
【図5】

図5



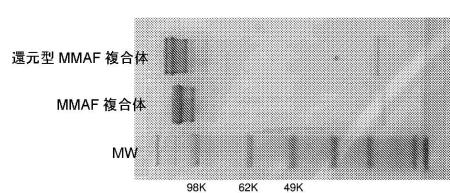
【図6】

図6

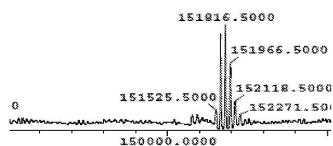


【図7】

図7



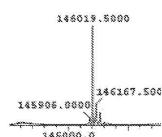
実施例6中の方法Bによる生成物のLC-MS



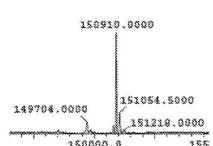
【図8】

図8

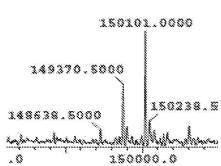
実施例7、ステップ1:



実施例7、ステップ2、PL1、方法A:

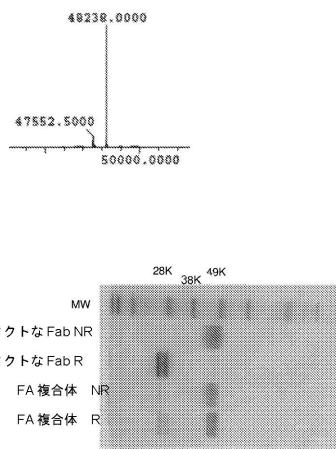


実施例7、ステップ2、PL2、方法B:



## 【図9】

図9



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/385
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	A 6 1 K 49/00
A 6 1 K	47/10	(2006.01)	A 6 1 K 47/42
A 6 1 K	47/30	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
			C 0 7 K 16/00
			A 6 1 K 47/10
			A 6 1 K 47/30

(72)発明者 フ , キ - イン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー  
- 250, ノバルティス インスティチューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコ  
ーポレイテッド内

(72)発明者 今瀬 英智

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー  
- 250, ノバルティス インスティチューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコ  
ーポレイテッド内

審査官 高山 敏充

(56)参考文献 米国特許出願公開第2013/0196899 (U.S., A1)

BIOCHEMISTRY, 2007年12月 1日, VOL. 46, NO. 48, pp.13711-13719, U R L, <http://dx.doi.org/10.1021/bi701042e>

ACS NANO, 2012年 8月28日, Vol. 6, No. 8, pp.6675 - 6680, U R L, <http://dx.doi.org/10.1021/nn301134z>

MOLECULAR DIVERSITY, 2004年 9月 1日, VOL.8, No. 2, pp.301-310, U R L, <http://dx.doi.org/10.1023/B:MODI.0000036238.42200.3d>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )