(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117916251 A
(43)申请公布日 2024.04.19

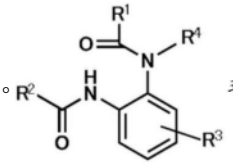
(21)申请号 202280060866.4
(22)申请日 2022.09.08
(30)优先权数据
2021-146504 2021.09.08 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.03.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/033713 2022.09.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/038082 JA 2023.03.16
(71)申请人 国立大学法人鹿儿岛大学
地址 日本鹿儿岛县
申请人 胜肽研究所股份有限公司
(72)发明人 伊东祐二 吉矢拓 津田修吾
(74)专利代理机构 北京唐颂永信知识产权代理有限公司 11755
专利代理师 刘伟
(51)Int.Cl.
C07K 7/08(2006.01)
C07K 14/00(2006.01)
C07K 16/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)

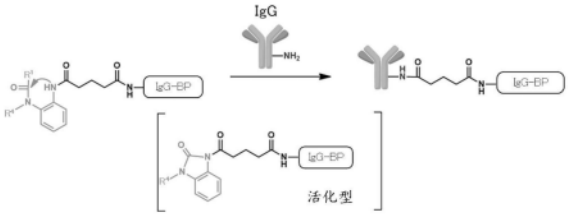
权利要求书2页 说明书29页
序列表（电子公布） 附图16页

(54)发明名称

化合物、化合物的盐、抗体修饰试剂、修饰抗体的制造方法及修饰抗体

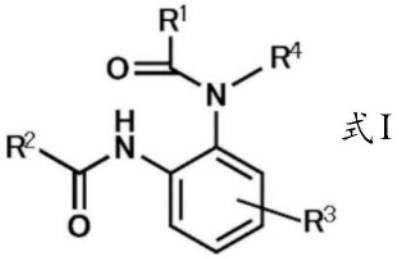
(57)摘要

一种化合物或其盐，该化合物由下述式I表示。式I式I中，R^1为R^1-H的pKa达到4～14的取代基，R^2和R^3之一具有与IgG的Fc区特异性结合的IgG结合肽，R^4为H或者经取代或未经取代的碳原子数为1～8的烷基。



CN 117916251 A

1.一种化合物或其盐,该化合物由下述式I所示,



式I

式I中,R^1为R^1-H的pKa达到4～14的取代基;

R^2和R^3之一具有与IgG的Fc区特异性结合的IgG结合肽;

在R^2具有所述IgG结合肽时,R^3不存在,或者选自由经取代或未经取代的碳原子数为1～8的烷基、经取代或未经取代的碳原子数为2～8的烯基、经取代或未经取代的碳原子数为2～8的炔基、硝基、卤素、甲酰胺基所组成的组;

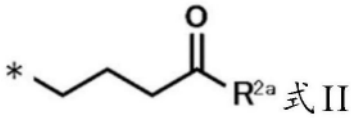
在R^3具有所述IgG结合肽时,R^2为选自由经取代或未经取代的碳原子数为1～8的烷基、经取代或未经取代的碳原子数为2～8的烯基、经取代或未经取代的碳原子数为2～8的炔基、氨基酸残基数为2～50的经取代或未经取代的肽链、聚合度为2～50的经取代或未经取代的聚合物链及其组合所组成的组;

R^4为H或者经取代或未经取代的碳原子数为1～8的烷基。

2.如权利要求1所述的化合物或其盐,其中,R^1为硝基苯氧基。

3.如权利要求1或2所述的化合物或其盐,其中,R^2具有所述IgG结合肽,R^3不存在。

4.如权利要求1或2所述的化合物或其盐,其中,R^2为以所述IgG结合肽作为R^{2a},由下述式II表示,



式II

式II中,*表示式I的羰基的碳。

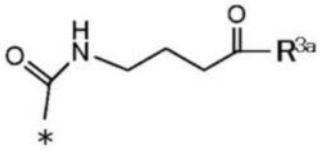
5.如权利要求3所述的化合物或其盐,其中,所述IgG结合肽经药物、反应性官能团或标记物质修饰。

6.如权利要求4所述的化合物或其盐,其中,所述IgG结合肽经药物、反应性官能团或标记物质修饰。

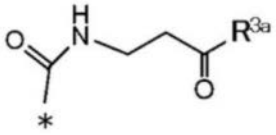
7.如权利要求1所述的化合物或其盐,其中,R^3具有所述IgG结合肽,R^2具有药物、反应性官能团或标记物质。

8.如权利要求2所述的化合物或其盐,其中,R^3具有所述IgG结合肽;R^2具有药物、反应性官能团或标记物质。

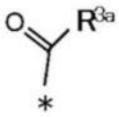
9.如权利要求1或2所述的化合物或其盐,其中,R^3为以所述IgG结合肽作为R^{3a},由下述式III、式IV及式V中的任一个表示,



式III



式IV



式V

式III、式IV及式V中,*表示式I的苯环的碳。

10.如权利要求1或2所述的化合物或其盐,其中,所述IgG结合肽的氨基酸序列为序列号1至115中的任一个所示的氨基酸序列。

11.如权利要求7所述的化合物或其盐,其中,所述IgG结合肽的氨基酸序列为序列号116至151中的任一个所示的氨基酸序列。

12.一种抗体修饰试剂,其包含如权利要求1或2的化合物或其盐。

13.一种修饰抗体的制造方法,其包括使如权利要求12所述的抗体修饰试剂与IgG进行反应的反应步骤。

14.一种修饰抗体,其具有:经由包含Lys-Gly-Gly的原子团以一价或二价结合至IgG的Fc区的Lys的药物、反应性官能团或标记物质。

15.如权利要求14所述的修饰抗体,其中,所述原子团中所含的Lys的侧链的氨基被取代为所述药物、反应性官能团或标记物质。

16.如权利要求14或15所述的修饰抗体,其中,所述反应性官能团为叠氮基。

17.如权利要求14或15所述的修饰抗体,其中,所述IgG为人IgG。

18.如权利要求14或15所述的修饰抗体,其中,所述IgG为托珠单抗或曲妥珠单抗。

化合物、化合物的盐、抗体修饰试剂、修饰抗体的制造方法及修饰抗体

【技术领域】

[0001] 本发明涉及一种化合物、化合物的盐、抗体修饰试剂、修饰抗体的制造方法及修饰抗体。

【背景技术】

[0002] 业界正在开发通过添加药物而使功能得到增强的抗体医药,例如抗体药物偶联物(ADC)等。在修饰抗体时使用氨基的随机修饰法及铰链位点的硫醇修饰法等各种方法。

[0003] 专利文献1至3中公开了一种CCAP(Chemical Conjugation by Affinity Peptide,亲和性肽化学偶联)法,其为用以制备抗体与药物等的偶联物(复合体)的位点特异性修饰法。

[0004] CCAP法中,使具有与IgG的Fc区特异性结合的IgG结合肽(IgG-BP)的抗体修饰试剂与抗体进行反应。IgG-BP的规定的氨基酸残基被N,N'-二琥珀酰亚胺戊二酸酯(disuccinimidyl glutarate;DSG)或3,3'-二硫代二丙酸二(N-琥珀酰亚胺)酯(dithiobis(succinimidyl propionate);DSP)修饰,具有N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基。在抗体修饰试剂与抗体的反应中,IgG-BP经由NHS基结合至Fc区的特定区域。

[0005] CCAP法中,在使抗体修饰试剂与抗体反应时,IgG-BP会残存在修饰抗体中,因此在应用在医药品等时,体内施用后残存的肽的抗原性成为问题。对此,专利文献4中公开了一种IgG-BP不会残留在最终产物中的CCAP法。

[0006] [现有技术文献]

[0007] [专利文献]

[0008] [专利文献1]国际公开第2016/186206号

[0009] [专利文献2]国际公开第2017/217347号

[0010] [专利文献3]国际公开第2018/230257号

[0011] [专利文献4]国际公开第2018/199337号

【发明内容】

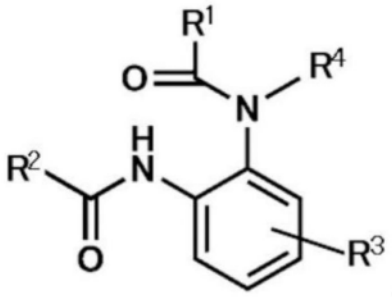
[0012] [发明所要解决的问题]

[0013] 专利文献1至4中所公开的CCAP法中所使用的抗体修饰试剂的NHS基容易被水解而不稳定,不耐长期保存。为了将CCAP法应用在产业上,而需要提升抗体修饰试剂的稳定性。

[0014] 本发明为鉴于上述实际情况而完成,其目的在于提供一种化学上稳定且可长期保存的化合物、化合物的盐、抗体修饰试剂、及使用该抗体修饰试剂的修饰抗体的制造方法。进而,本发明的目的在于提供一种新的修饰抗体。

[0015] [解决问题的技术手段]

[0016] 本发明的第1观点的化合物由下述式I表示。

[0017] 

式I

[0018] 式I中,R^1为R^1-H的pKa达到4～14的取代基;

[0019] R^2和R^3之一具有与IgG的Fc区特异性结合的IgG结合肽;

[0020] 在R^2具有上述IgG结合肽时,R^3不存在,或者选自由经取代或未经取代的碳原子数为1～8的烷基、经取代或未经取代的碳原子数为2～8的烯基、经取代或未经取代的碳原子数为2～8的炔基、硝基、卤素、甲酰胺基所组成的组;

[0021] 在R^3具有上述IgG结合肽时,R^2为选自由经取代或未经取代的碳原子数为1～8的烷基、经取代或未经取代的碳原子数为2～8的烯基、经取代或未经取代的碳原子数为2～8的炔基、氨基酸残基数为2～50的经取代或未经取代的肽链、聚合度为2～50的经取代或未经取代的聚合物链及其组合所组成的组;

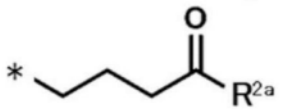
[0022] R^4为H或者经取代或未经取代的碳原子数为1～8的烷基。

[0023] 本发明的第2观点的化合物的盐为上述本发明的第1观点的化合物的盐。

[0024] R^1可为硝基苯氧基。

[0025] R^2可具有上述IgG结合肽,R^3可不存在。

[0026] R^2可以上述IgG结合肽作为R^{2a},由下述式II表示。

[0027] 

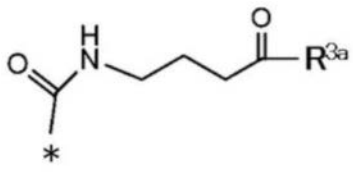
式II

[0028] 式II中,*表示式I的羰基的碳。

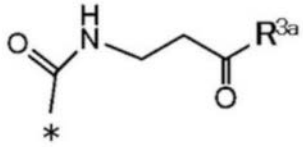
[0029] 在R^2具有上述IgG结合肽时,IgG结合肽可经药物、反应性官能团或标记物质修饰。

[0030] R^3可具有上述IgG结合肽,R^2可具有药物、反应性官能团或标记物质。

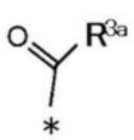
[0031] R^3可以上述IgG结合肽作为R^{3a},由下述式III、式IV及式V中的任一个表示。



式III

[0032] 

式IV



式V

[0033] 式III、式IV及式V中,*表示式I的苯环的碳。

[0034] 本说明书中记载的IgG结合肽的氨基酸序列也可为序列号1至115中的任一个所示的氨基酸序列。

[0035] 上述IgG结合肽的氨基酸序列可为序列号116至151中的任一个所示的氨基酸序列。

[0036] 本发明的第3观点的抗体修饰试剂包含:上述本发明的第1观点的化合物或上述本发明的第2观点的化合物的盐。

[0037] 本发明的第4观点的修饰抗体的制造方法包括如下反应步骤:使上述本发明的第3观点的抗体修饰试剂与IgG进行反应。

[0038] 本发明的第5观点的修饰抗体具有经由包含Lys-Gly-Gly的原子团以一价或二价结合至IgG的Fc区的Lys的药物、反应性官能团或标记物质。

[0039] 上述原子团中所包含的Lys的侧链的氨基可被取代为上述药物、反应性官能团或标记物质。

[0040] 上述反应性官能团可为叠氮基。

[0041] 上述IgG可为人IgG。

[0042] 上述IgG可为托珠单抗或曲妥珠单抗。

[0043] [发明的效果]

[0044] 本发明的化合物、化合物的盐及抗体修饰试剂在化学上稳定,可长期保存。根据本发明,提供一种使用该抗体修饰试剂的修饰抗体的制造方法。根据本发明,提供一种新的修饰抗体。

【附图说明】

[0045] 图1为示意性地表示通过本发明的实施方式的化合物以IgG-BP来修饰抗体的反应的图。

[0046] 图2为示意性地表示通过本发明的实施方式的化合物来修饰抗体的反应的图。

[0047] 图3为表示实施例3中将实施例1的化合物与IgG的反应溶液利用液相层析质谱仪(LC-MS)进行分析所得结果的图。(A)、(B)、(C)及(D)为分别表示pH值5.5、7.0、8.0及8.9的反应溶液的洗脱色谱图的图。

[0048] 图4为表示实施例3中将实施例1的化合物与IgG的反应溶液利用LC-MS进行分析所得结果的图。(A)、(B)、(C)及(D)为分别表示对pH值5.5、7.0、8.0及8.9的反应溶液中的IgG的波峰进行质谱分析所得结果的图。

[0049] 图5为表示实施例3中将实施例2的化合物与IgG的反应溶液利用LC-MS进行分析所得结果的图。(A)、(B)、(C)及(D)为分别表示pH值5.5、7.0、8.0及8.9的反应溶液的洗脱色谱图的图。

[0050] 图6为表示实施例3中将实施例2的化合物与IgG的反应溶液利用LC-MS进行分析所得结果的图。(A)、(B)、(C)及(D)为分别表示对pH值5.5、7.0、8.0及8.9的反应溶液中的IgG的波峰进行质谱分析所得结果的图。

[0051] 图7为表示实施例4中实施例2的化合物与小鼠IgG的反应溶液的利用LC-MS进行分析所得结果的图。(A)、(B)及(C)为分别表示添加化合物之前的pH值8.0的抗体溶液、反应2

小时后pH值8.0的溶液及反应2小时后的pH值8.9的溶液的洗脱色谱图的图。

[0052] 图8为表示实施例4中实施例2的化合物与小鼠IgG的反应溶液的利用LC-MS进行分析所得结果的图。(A)、(B)及(C)为分别表示对添加化合物之前的pH值8.0的抗体溶液、反应2小时后的pH值8.0的溶液及反应2小时后的pH值8.9的溶液中的IgG的波峰进行质谱分析所得结果的图。

[0053] 图9为表示实施例5中实施例2的化合物与兔IgG的反应溶液的利用LC-MS进行分析所得结果的图。(A)及(B)为分别表示添加化合物之前的pH值8.0的抗体溶液及反应24小时后的pH值8.0的溶液的洗脱色谱图的图。

[0054] 图10为表示实施例5中实施例2的化合物与兔IgG的反应溶液的利用LC-MS进行分析所得结果的图。(A)及(B)为分别表示对添加化合物的前的pH值8.0的抗体溶液及反应24小时后的pH值8.0的溶液中的IgG的波峰进行质谱分析所得结果的图。

[0055] 图11为表示实施例8中实施例6的化合物与人IgG的反应溶液的利用LC-MS进行分析所得结果的图。(A)、(B)、(C)及(D)为分别表示pH值5.5、7.0、8.0及8.9的反应溶液的洗脱色谱图的图。

[0056] 图12为表示实施例8中实施例6的化合物与人IgG的反应溶液的利用LC-MS进行分析所得结果的图。(A)、(B)、(C)及(D)为分别表示对pH值5.5、7.0、8.0及8.9的反应溶液中的IgG的波峰进行质谱分析所得结果的图。

[0057] 图13为表示实施例9中实施例7的化合物与人源化IgG的反应溶液的LC-MS的结果的图。(A)、(B)及(C)为分别表示添加化合物之前的抗体溶液、反应24小时后的pH值8.0的溶液及反应24小时后的pH值8.9的溶液的洗脱色谱图的图。

[0058] 图14为表示实施例9中实施例7的化合物与人源化IgG的反应溶液的LC-MS结果的图。(A)、(B)及(C)为分别表示对添加化合物之前的抗体溶液、反应24小时后的pH值8.0的溶液及反应24小时后的pH值8.9的溶液中的IgG的波峰进行质谱分析所得结果的图。

[0059] 图15为表示试验例2中与实施例2的化合物反应的曲妥珠单抗的肽谱图(peptide map)的结果的图。

[0060] 图16为表示对试验例2中与实施例2的化合物反应的曲妥珠单抗中洗脱的波峰的串联质谱分析(MS/MS)的结果的图。

[0061] 图17为表示实施例10中的LC-MS的结果的图。(A)、(B)、(C)及(D)为分别表示曲妥珠单抗(未修饰抗体)、经实施例2的化合物修饰的叠氮化曲妥珠单抗(叠氮化KGG修饰抗体)、抗癌剂与叠氮化曲妥珠单抗的反应物及叠氮化曲妥珠单抗与荧光剂的反应物的洗脱色谱图的图。

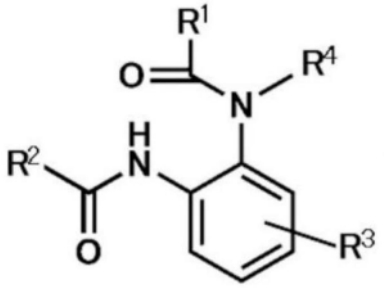
[0062] 图18为表示实施例10中的LC-MS的结果的图。(A)、(B)、(C)及(D)为分别表示对未修饰抗体、叠氮化KGG修饰抗体、抗癌剂与叠氮化曲妥珠单抗的反应物及叠氮化曲妥珠单抗与荧光剂的反应物中洗脱的抗体的波峰进行质谱分析所得结果的图。

【具体实施方式】

[0063] 参照附图对本发明的实施方式进行说明。需要说明的是,本发明并不受下述实施方式及附图限定。需要说明的是,在下述实施方式中,「具有」、「包含」或「含有」这些表达也包含「包括」或「由…构成」的含义。

[0064] (化合物及其盐)

[0065] 本实施方式的化合物由下述式I表示。

[0066]  式I

[0067] 式I中,R^1为R^1-H的酸解离常数(pKa)达到4～14、4～12或4～10、优选为5～9的取代基。此处的pKa为室温(例如25℃)下的pKa。上述化合物因R^1的消除而成为活化中间体。R^1-H的pKa决定了消除的难易程度、即转变为活化中间体的难易程度。当pKa高时,不易转变为活化中间体,当pKa低时,容易转变为活化中间体,但当pKa过低时,化合物可能因不稳定而水解。优选地,R^1-H为酚类。R^1-H可列举例如:水杨酸、苯酚、4-氟苯酚、4-硝基苯酚、2,6-二氯苯酚、N-羟基琥珀酰亚胺、2,3,5,6-四氟苯酚、五氟苯酚、氨基苯酚及二硝基苯酚等。优选地,R^1-H为4-硝基苯酚,R^1为硝基苯氧基。

[0068] R^2和R^3之一具有与IgG的Fc区特异性结合的IgG-BP。「IgG」可为哺乳动物、例如人及黑猩猩等灵长类;大鼠、小鼠及兔等实验动物;猪、牛、马、绵羊及山羊等家畜动物;以及狗及猫等宠物的IgG,优选为人IgG(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。IgG优选为人IgG1、IgG2或IgG4、或者兔IgG,特别优选为人IgG1、IgG2或IgG4。典型地,「IgG的Fc区」是指以IgG的蛋白水解酶木瓜蛋白酶处理物的形式获得的C末端侧的片段。

[0069] 在R^2具有IgG-BP时,R^3不存在,或者选自由经取代或未经取代的碳原子数为1～8的烷基、经取代或未经取代的碳原子数为2～8的烯基、经取代或未经取代的碳原子数为2～8的炔基、硝基、卤素、甲酰胺基所组成的组。在R^2具有IgG-BP时,优选为R^3不存在。

[0070] 「烷基」意指饱和烃基。烷基包含满足碳原子数条件的环式(包含稠合双环)烷基、直链及支链烷基、以及经环式烷基取代的直链或支链烷基。作为烷基的示例,可列举如:甲基、乙基、正丙基、异丙基、环丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-乙基丙基、正己基、环己基、环辛基、及1-甲基-2-乙基丙基。

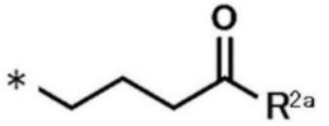
[0071] 「烯基」是指具有至少1个双键的烃基。烯基包含直链烯基及支链烯基这两者。作为烯基的示例,可列举如:乙烯基、正丙烯基、异丙烯基、正丁烯基、异丁烯基、仲丁烯基、叔丁烯基、正戊烯基、1,1-二甲基丙烯基、1,2-二甲基丙烯基、2,2-二甲基丙烯基、1-乙基丙烯基、2-乙基丙烯基、正己烯基及1-甲基-2-乙基丙烯基。

[0072] 「炔基」是指具有至少1个三键的烃基。炔基包含直链炔基及支链炔基这两者。作为炔基的示例,可列举如:乙炔基、正丙炔基、异丙炔基、正丁炔基、异丁炔基、仲丁炔基、叔丁炔基及正戊炔基等。

[0073] 在R^2具有IgG-BP时,R^2可为IgG-BP。另外,R^2还可具有连接基(Linker),以*作为式I的羰基的碳,R^2可为*-(连接基)-(IgG-BP)。连接基并无特别限定,只要维持化合物对Fc区的特异性结合能力即可,例如选自由-NH-、-O-、-S-、-C(=O)-NH-、-NH-C(=O)-、-O-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-、-S-、-C(=O)-、聚氧化烯基、氨基酸残基、肽链、聚乙二醇(PEG)链及其

组合所组成的组。

[0074] 优选地,R^2由式II表示并以IgG-BP作为R^{2a}。

[0075]  式II

[0076] R^2中的IgG-BP为经由主链或任意的氨基酸残基的侧链结合至式I的羰基的碳或连接基。优选地,R^2中的IgG-BP为经由N末端的主链或侧链的氨基结合至式I的羰基的碳或连接基。

[0077] R^2中的IgG-BP可经药物、反应性官能团或标记物质修饰。作为药物,例如可列举如:澳瑞他汀E等澳瑞他汀、美登素、美坦辛(emtansine)、多柔比星、博来霉素或其衍生物等抗癌剂、与血脑屏障的受体结合而促进向中枢神经转移的药物、或者与癌细胞等结合而使IgG能够向细胞内转移的药物等的靶向制剂。

[0078] 作为反应性官能团,可列举如:咪唑基、羟基、氨基、硫醇基、卤素原子、磺酸酯基、环氧基、异氰酸基、叠氮基、乙烯基、马来酰亚胺基、硫氢基、乙炔基(-C≡CH)、二烯、炔烃、双环[6.1.0]壬炔(BCN)、二苯并环辛炔(DBCO)基、反式环辛烯(TCO)、四嗪等。优选地,反应性官能团为叠氮基,通过与炔烃或DBCO基等的点击反应而可利用所需分子来修饰IgG-BP。

[0079] 标记物质并无限定,例如为荧光色素、化学发光色素、放射性同位素、发光蛋白、生物素(Biotin)、绿色荧光蛋白等荧光蛋白、及过氧化物酶等酶等。优选地,标记物质为荧光素(FAM)及FITC等荧光素衍生物、若丹明及四甲基若丹明等若丹明衍生物、以及得克萨斯红等荧光色素。

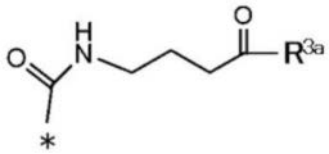
[0080] 利用R^2具有IgG-BP的本实施方式的化合物对IgG进行修饰的反应如图1所示。该化合物由于具有式I所示的活性酯前驱体,因此在中性条件、优选为弱碱性条件下经由活化型化合物,而将IgG-BP附加在IgG的规定的氨基酸残基,尤其是Lys残基。

[0081] 继而,对R^3具有IgG-BP的情形进行说明。在R^3具有IgG-BP时,R^2为选自由经取代或未经取代的碳原子数为1~8的烷基、经取代或未经取代的碳原子数为2~8的烯基、经取代或未经取代的碳原子数为2~8的炔基、氨基酸残基数为2~50的经取代或未经取代的肽链、聚合度为2~50的经取代或未经取代的聚合物链及其的组合所组成的组。肽链中的氨基酸残基数优选为2~30、2~20、2~10或2~5,更优选为3。作为具体的肽链,可列举如Lys-Gly-Gly。聚合物链并无特别限定,只要为公知的聚合物链即可,例如可列举如PEG等。需要说明的是,经取代的肽链包含在主链或侧链上结合有取代基的肽链。经取代的聚合物链包含在主链或侧链上结合有取代基的聚合物链。

[0082] 在R^3具有IgG-BP时,R^3可为IgG-BP。另外,R^3与上述R^2同样地,可具有连接基。

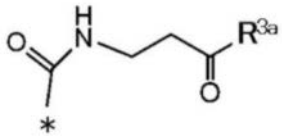
[0083] R^3中的IgG-BP为经由主链或任意的氨基酸残基的侧链结合至式I的苯环的碳或连接基。优选地,R^3中的IgG-BP经由N末端的主链或侧链的氨基结合至式I的羰基的碳或连接基。

[0084] 优选地,R^3由式III、式IV及式V中的任一个表示并以IgG-BP作为R^{3a}。需要说明的是,式III、式IV及式V中,*表示式I的苯环的碳。

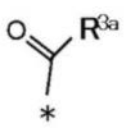


式III

[0085]



式IV



式V

[0086] 在R^3具有IgG结合肽时,R^2可具有上述药物、反应性官能团或标记物质。R^2中的药物、反应性官能团或标记物质例如结合在烷基、烯基、炔基、肽链或聚合物链。在R^2例如具有Lys-Gly-Gly作为肽链时,可将肽链的Lys的侧链的氨基取代为药物、反应性官能团或标记物质。

[0087] 利用R^3具有IgG-BP的本实施方式的化合物对IgG进行修饰的反应如图2所示。该化合物具有式I所示的活性酯前驱体,因此经由活化型化合物与IgG结合。R^3具有IgG-BP的该化合物与R^2具有IgG-BP的情形不同,包含R^2的取代基被附加到IgG规定的氨基酸残基上,包含IgG-BP的R^3未被附加到IgG上。因此,在R^3具有IgG-BP的情形时,较佳为R^2具有上述的药物、反应性官能团或标记物质。如此,可容易利用药物、反应性官能团或标记物质来修饰IgG。

[0088] 上述专利文献4等中所公开的在IgG中不会残留IgG-BP的CCAP法在修饰IgG后需要IgG-BP的消除反应。另一方面,若使用本实施方式的化合物,则在修饰IgG的同时,IgG-BP的消除反应结束。

[0089] IgG-BP优选为与Fc中的选自依照Eu编号(Eu numbering)的Lys248、Lys246、Lys338、Lys288、Lys290、Lys360、Lys414及Lys439的位点或其邻近区域、优选为Lys248或其近接区域结合,或者与蛋白A的结合区域结合的肽。例如IgG-BP也可为具有Fc结合能力的蛋白A的部分肽或其变异体。此种肽的具体示例为记载在国际公开第2008/054030号、国际公开第2013/027796号、上述专利文献1～3等中。IgG-BP可依照公知的肽的合成法、例如肽固相合成法或各文献中记载的方法来适当制备。

[0090] 更具体地,R^2及R^3可列举如以下的(i)～(iii)。

[0091] (i)包含下述式(PI)所表示的IgG-BP的取代基

[0092] NH_2-(连接基)-$(X^1{}_{1-3})$-C-(X^2)-(X^3)-(X^4)-(X^5)-G-(X^6)-L-(X^7)-W-C-$(X^8{}_{1-3})$-连接基)・・・式(PI)

[0093] [式(PI)中,各(连接基)独立地为相同或不同的连接基,或者不存在,此处,连接基为RRRGS、EEGGS、$(GSGGS)_{1-3}$或者$(PEG)_{1-10}$,优选为$(PEG)_{1-8}$或$(PEG)_{2-10}$,更优选为$(PEG)_4$,

[0094] 1～3个X^1、X^2、X^3、X^4、X^5、X^6、X^7、及1～3个X^8各自彼此独立地表示相同或不同的氨基酸残基,

[0095] 各X^1、X^2、X^3及各X^8彼此独立地表示相同或不同的C以外的任意的氨基酸残基,

[0096] X^4为H、R、S或D,

[0097] X^5为选自K、C、D、E、R、V、F、L、2-氨基辛二酸、Dpr、Orn、AcOrn、AcDab、Dab、Nle、Nva、Tle、Ala(t-Bu)、及Cha中的1个氨基酸残基,

[0098] X^6为E、N、R或D,

[0099] X^7为I或V。

[0100] 需要说明的是,Dab、Tle及Cha分别是指2,4-二氨基丁酸、叔白胺酸及β-环己基-L-丙胺酸。另外,Ac及t-Bu分别是指具有乙酰基及叔丁基]

[0101] 式(PI)中,可在式(PI)的C末端氨基酸残基的末端(-COOH)上结合氨基而成为(-C(=O)NH_2)基,以进行结合。另外,在式(PI)中,N末端的氨基可被乙酰化。在该情形时,可在连接基中的N末端附近的适当位置处导入Lys残基。

[0102] 作为式(PI)所表示的取代基中所包含的IgG-BP,优选地列举以下的肽。

[0103] [1]X^1_{1-3}为(S、G、F或无)-(D、G、A、S、P、Hcy或无)-(S、D、T、N、E或R)所表示的氨基酸序列。

[0104] [2]X^1_{1-3}为D、GPD、R、GPR、SPD、GDD、GPS、SDD、RGN、G-Hcy-D、RGP或GPD。

[0105] [3]X^1_{1-3}为D或GPD。

[0106] [4]X^2为A、S或T。

[0107] [5]X^2为A或T。

[0108] [6]X^2为A。

[0109] [7]X^3为Y或W。

[0110] [8]X^3为Y。

[0111] [9]X^4为H。

[0112] [10]X^5为选自A、R、K、C、D、E、L、2-氨基辛二酸、Dpr、R、F、2-氨基辛二酸、Dpr、AcOrn、AcDab、Dab、Nle、Nva、Ala(t-Bu)、及Cha中的1个氨基酸残基。

[0113] [11]X^5为K、R、AcOrn。

[0114] [12]X^5为选自V、Dab、F、R、L、Nva、Nle、Ala(t-Bu)、及Cha中的1个氨基酸残基。

[0115] [13]X^5为选自F、R、L、Nva、Nle、Ala(t-Bu)、及Cha中的1个氨基酸残基。

[0116] [14]X^5为选自L、Ala(t-Bu)、及Cha中的1个氨基酸残基。

[0117] [15]X^6为E或N。

[0118] [16]X^6为E。

[0119] [17]X^7为V。

[0120] [18]X^8_{1-3}为(S、T或D)-(H、G、Y、T、N、D、F、Hcy或无)-(Y、F、H、M或无)。

[0121] [19]X^8_{1-3}为T、TFH、S、SFH、THH、TFY、TYH或T-Hcy-H。

[0122] [20]X^8_{1-3}为T或TFH。

[0123] 作为式(PI)所表示的取代基中所包含的IgG-BP,可为以上条件的任意1个或2个以上的组合,例如可为满足以下所记载的条件的肽:[8]与[9]、[8]与[17]、[9]与[17]、[8]与[9]与[17]、或者它们与[10]~[14]中的任一个的组合。

[0124] 更具体地,作为IgG-BP,可列举以下的肽(X^5与上述相同,可在N末端具有NH_2-(连接基)-基,也可在C末端具有-NH_2基或-(连接基)-NH_2基):

[0125] 1)DCAYHX^5GELVWCT(序列号1)

[0126] 2)GPDCAYHX^{5}GELVWCTFH(序列号2)

[0127] 3)RCAYHX^{5}GELVWCS(序列号3)

[0128] 4)GPRCAYHX^{5}GELVWCSFH(序列号4)

[0129] 5)SPDCAYHX^{5}GELVWCTFH(序列号5)

[0130] 6)GDDCAYHX^{5}GELVWCTFH(序列号6)

[0131] 7)GPSCAYHX^{5}GELVWCTFH(序列号7)

[0132] 8)GPDCAYHX^{5}GELVWCSFH(序列号8)

[0133] 9)GPDCAYHX^{5}GELVWCTHH(序列号9)

[0134] 10)GPDCAYHX^{5}GELVWCTFY(序列号10)

[0135] 11)SPDCAYHX^{5}GELVWCTFY(序列号11)

[0136] 12)SDDCAYHX^{5}GELVWCTFY(序列号12)

[0137] 13)RGNCAYHX^{5}GQLVWCTYH(序列号13)

[0138] 14)G-Hcy-DCAYHX^{5}GELVWCT-Hcy-H(序列号14)

[0139] 15)RRGPDCAYHX^{5}GELVWCTFH(序列号15)

[0140] 16)DCTYHX^{5}GNLVWCT(序列号16)

[0141] 17)DCAYHX^{5}GNLVWCT(序列号17)

[0142] 18)DCTYHX^{5}GELVWCT(序列号18)

[0143] 19)DCAWHX^{5}GELVWCT(序列号19)

[0144] 20)DCTYTX^{5}GNLVWCT(序列号20)

[0145] 21)DCAYTX^{5}GNLVWCT(序列号21)

[0146] 22)DCSYTX^{5}GNLVWCT(序列号22)

[0147] 23)DCTWTX^{5}GNLVWCT(序列号23)

[0148] 24)DCTYHX^{5}GNLVWCT(序列号24)

[0149] 25)DCTYRX5GNLVWCT(序列号25)

[0150] 26)DCTYSX^{5}GNLVWCT(序列号26)

[0151] 27)DCTYTX^{5}GNLVWCT(序列号27)

[0152] 28)DCTYTX^{5}GELVWCT(序列号28)

[0153] 29)DCTYTX^{5}GRLVWCT(序列号29)

[0154] 30)DCTYTX^{5}GDLVWCT(序列号30)

[0155] 31)DCTYTX^{5}GNLIWCT(序列号31)

[0156] 32)DCAYHRGELVWCT(序列号32)

[0157] 33)GPDCAYHRGELVWCTFH(序列号33)

[0158] 34)RCAYHRGELVWCS(序列号34)

[0159] 35)GPRCAYHRGELVWCSFH(序列号35)

[0160] 36)SPDCAYHRGELVWCTFH(序列号36)

[0161] 37)GDDCAYHRGELVWCTFH(序列号37)

[0162] 38)GPSCAYHRGELVWCTFH(序列号38)

[0163] 39)GPDCAYHRGELVWCSFH(序列号39)

[0164] 40)GPDCAYHRGELVWCTHH(序列号40)

[0165] 41)GPDCAYHRGELVWCTFY(序列号41)

[0166] 42)SPDCAYHRGELVWCTFY(序列号42)

[0167] 43)SDDCAYHRGELVWCTFY(序列号43)

[0168] 44)DCTYHRGNLVWCT(序列号44)

[0169] 45)DCAYHRGNLVWCT(序列号45)

[0170] 46)DCTYHRGELVWCT(序列号46)

[0171] 47)DCAWHRGELVWCT(序列号47)

[0172] 48)DCTYTNGNLVWCT(序列号48)

[0173] 49)DCAYTNGNLVWCT(序列号49)

[0174] 50)DCSYTNGNLVWCT(序列号50)

[0175] 51)DCTWTNGNLVWCT(序列号51)

[0176] 52)DCTYHNGNLVWCT(序列号52)

[0177] 53)DCTYRNGNLVWCT(序列号53)

[0178] 54)DCTYSNGNLVWCT(序列号54)

[0179] 55)DCTYTRGNLVWCT(序列号55)

[0180] 56)DCTYTNGELVWCT(序列号56)

[0181] 57)DCTYTNGRLVWCT(序列号57)

[0182] 58)DCTYTNGDLVWCT(序列号58)

[0183] 59)DCTYTNGNLIWCT(序列号59)

[0184] 作为R^2及R^3的示例,可列举具有以下结构的取代基。

[0185] 60)GSGGS-GPDCAYHRGELVWCTFH-NH_2(序列号60)

[0186] $(PEG)_4$-GPDCAYHRGELVWCTFH-NH_2(序列号33)

[0187] 61)GSGGS-DCAYHRGELVWCT-NH_2(序列号61)

[0188] $(PEG)_4$-DCAYHRGELVWCT-NH_2(序列号32)

[0189] 本说明书中肽及IgG-BP包含结合有官能团Z的肽。例如式(PI)所表示的取代基可在(连接基)之前结合官能团Z。作为此种取代基,可列举以下的取代基。

[0190] 62)乙酰基-K(Z)-RRRGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH_2(序列号62)

[0191] 63)乙酰基-K(Z)-EEGGS-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH_2(序列号63)

[0192] 64)乙酰基-K(Z)-$(PEG)_4$-GPDCAYHKGELVWCTFH-NH_2(序列号64)

[0193] R^2及R^3可为在以下肽的N末端或PEG上结合有马来酰亚胺基、DBCO基、四嗪基、TCO基的取代基,也可为在C末端上结合有NH_2基的取代基。

[0194] 65)RRRGS-GPDCAYHKGELVWCTFH(序列号65)

[0195] 66)EEGGS-GPDCAYHKGELVWCTFH(序列号66)

[0196] $(PEG)_4$-GPDCAYHKGELVWCTFH(序列号64)

[0197] 另外,作为在(连接基)之前结合有官能团Z的取代基,可列举以下的肽。

[0198] 67)乙酰基-K(Z)RRRGS-DCAYHKGELVWCT-NH_2(序列号67)

[0199] 68)乙酰基-K(Z)EEGGS-DCAYHKGELVWCT-NH_2(序列号68)

[0200] 69)乙酰基-K(Z)-$(PEG)_4$-DCAYHKGELVWCT-NH_2(序列号69)

[0201] R^2及R^3可为在以下肽的N末端或PEG上键结有马来酰亚胺基、DBCO基、四嗪基、TCO基

的取代基,也可在C末端上结合有NH2基的取代基。

[0202] 70)RRRGS-DCAYHKGELVWCT(序列号70)

[0203] 71)EEGGS-DCAYHKGELVWCT(序列号71)

[0204] $(PEG)_4$-DCAYHKGELVWCT(序列号69)

[0205] (ii)包含下述式(PII)所表示的IgG-BP的取代基、或包括由如下氨基酸序列组成的IgG-BP的取代基,该氨基酸序列为在(PII)的氨基酸序列中,在除X^9～X^{14}以外的位置处附加、缺失、及/或取代1个或者数个氨基酸而成

[0206] $X^9{}_{1-2}$NMQX^{10}QX^{14}RFYEALHDPNLNEEQRNAX^{11}IX^{12}SIRDDX^{13}-(连接基2)-$CONH_2$・・・(PII)

[0207] [式(PII)中,(连接基2)为$(GSGGS)_{1-3}$、$(SGSGS)_{1-3}$、或者$(PEG)_{2-10}$-Lys(优选为$(PEG)_4$-Lys)、SGSGSK、SRRCR、SRRK(Z)R、SRRCRRCRRC、SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)、或者$(PEG)_{1-8}$-Lys(优选为$(PEG)_4$-Lys),或者不存在,

[0208] $X^9{}_{1-2}$为选自由GF、AF、VF、LF、IF、MF、PF、FF、WF、KF、Orn-F、CF、DF、EF、β丙胺酸-F、2-氨基辛二酸-F、Dpr-F、NH_2-(PEG)n-CO(此处,n＝1-50)-F、F、K、Orn、C、D、E、2-氨基辛二酸、Dpr、及乙酰基-K所组成的组,

[0209] X^{10}为C或Q,

[0210] X^{11}及X^{12}分别独立地选自由R、H、D、E、S、T、N、Q、Y、及C所组成的组,

[0211] X^{13}为C或P,或不存在,

[0212] X^{14}为R、C、K、或K(Z)]。

[0213] 式(PII)的N末端氨基酸的末端(-NH_2)可乙酰化而成为(CH_3-C(＝O)-NH-)基。另外,连接基中所包含的Cys残基(C)可视需要,经由马来酰亚胺基而结合其他功能性分子。

[0214] 作为式(PII)所表示的取代基中所包含的IgG-BP,可优选地列举以下的肽。

[0215] [21]X^{9}为选自由GF、AF、βAlaF、NH_2-$(PEG)_n$-CO(n＝2-10)-F、F、K、Orn、C、Dpr、及乙酰基-K所组成的组。

[0216] [22]X^{9}为选自由GF、F、K、及乙酰基-K所组成的组。

[0217] [23]X^{10}为Q。

[0218] [24]X^{11}及X^{12}分别独立地选自由R、H、及E所组成的组。

[0219] [25]X^{11}为R。

[0220] [26]X^{12}为R或K(Z)(优选地,Z为叠氮基)。

[0221] 作为式(PII)所表示的取代基,更具体地,可列举以下的取代基(其中,所包含的Lys残基也可视需要结合官能团)。

[0222] 72)FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(序列号72)

[0223] 73)GFNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(序列号73)

[0224] 74)KNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(序列号74)

[0225] 75)GFNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(序列号75)

[0226] 76)KNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(序列号76)

[0227] 77)FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD(序列号77)

[0228] 78)GKNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(序列号78)

[0229] 79)乙酰基-FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SGSGSK-NH_2(序列号79)

[0230] 80)乙酰基-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SGSGSK-NH_2(序列号80)

[0231] 81)乙酰基-FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-$(PEG)_4$-Lys-NH_2(序列号81)

[0232] 72-2)乙酰基-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-$(PEG)_4$-Lys-NH_2(序列号72)

[0233] 82)FNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD-NH_2(序列号82)

[0234] 83)FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(序列号83)

[0235] 84)FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SRRK(Z)R-NH_2(序列号84)

[0236] 85)FNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SRRCR-NH_2(序列号85)

[0237] 86)FNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARICSIRDDP-SRRCRRCRRC-NH_2(序列号86)

[0238] 87)FNMQQQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIK(Z)SIRDDP-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH_2(序列号87)

[0239] 88)乙酰基-KNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD-NH_2(序列号88)

[0240] 89)乙酰基-KNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(序列号89)

[0241] 90)乙酰基-KNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SRRK(Z)R-NH_2(序列号90)

[0242] 91)乙酰基-KNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SRRCR-NH_2(序列号91)

[0243] 92)乙酰基-KNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARICSIRDDP-SRRCRRCRRC-NH_2(序列号92)

[0244] 93)乙酰基-KNMQQQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIK(Z)SIRDDP-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH_2(序列号93)

[0245] 94)GFNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD-NH_2(序列号94)

[0246] 95)GFNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(序列号95)

[0247] 96)GFNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SRRK(Z)R-NH_2(序列号96)

[0248] 97)GFNMQQQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDP-SRRCR-NH_2(序列号97)

[0249] 98)GFNMQQQCRFYEALHDPNLNEEQRNARICSIRDDP-SRRCRRCRRC-NH_2(序列号98)

[0250] 99)GFNMQQQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIK(Z)SIRDDP-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH_2(序列号99)

[0251] 100)FNMQCQZRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2序列号100)

[0252] 101)乙酰基-KNMQCQZRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(序列号101)

[0253] 102)GFNMQCQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SRRK(Z)R-NH_2(序列号102)

[0254] 103)FNMQCQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(序列号103)

[0255] 104)乙酰基-KNMQCQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SRRK(Z)R-NH_2(序列号104)

[0256] 105)GFNMQCQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH_2(序列号105)

[0257] 106)乙酰基-KNMQCQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH_2(序列号106)

[0258] 107)GFNMQCQK(Z)RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-SRRK(Z)RRK(Z)RRK(Z)-NH_2(序列号107)

[0259] (iii)以下的肽

[0260] 108)CAWHLGELVWC(序列号108)

[0261] 109)DCAWHLGELVWCT(序列号109)

[0262] 110)DCAWHLGELVFCT(序列号110)

[0263] 111)DCAWHLGELVX^{15}CT(序列号111)

[0264] X^{15}＝1-萘酰基、2-萘酰基、苄基、或苯并噻吩

[0265] 112)CDCAWHLGELVWCTC(序列号112)

[0266] 113)CAYHLGELVWC(序列号113)

[0267] 114)DCAYHLGELVWCTF(2-Pya)(序列号114)

[0268] 115)乙酰基-(Lys[叠氮])RRRGSGPDCAYHKGELVWCTFH-CONH$_2$)(序列号115)

[0269] 考虑到IgG-BP与IgG的立体结构,在R^{3}具有IgG-BP时,IgG-BP的氨基酸序列可为缺少序列号72～107所示的氨基酸序列的N末端的氨基酸残基的序列号116至151的任一个所示的氨基酸序列。

[0270] R^{2}可经由IgG-BP中所包含的Lys残基尤其是经由X^{5}的侧链,而结合在式I的羰基的碳或连接基,R^{3}可经由IgG-BP中所包含的Lys残基尤其是经由上述X^{5}的侧链而结合在式I的苯环的碳或连接基。

[0271] 另外,在R^{2}例如为上述79)、80)、81)、72-2)、88)、89)、90)、91)、92)、93)、101)、104)及106)时,任意Lys残基的侧链可与式I的羰基的碳或连接基结合。同样地,在R^{3}为上述79)、80)、81)、72-2)、88)、89)、90)、91)、92)、93)、101)、104)及106)时,任意Lys残基的侧链可与式I的苯环的碳或连接基结合。

[0272] 需要说明的是,上述IgG-BP中,任意2个半胱氨酸残基均可经由双硫键而形成分子(肽)内键。

[0273] R^{4}为H或者经取代或未经取代的碳原子数为1～8的烷基。R^{4}例如为碳原子数为1～6、1～4或1～3的烷基,优选为乙基,更优选为甲基。

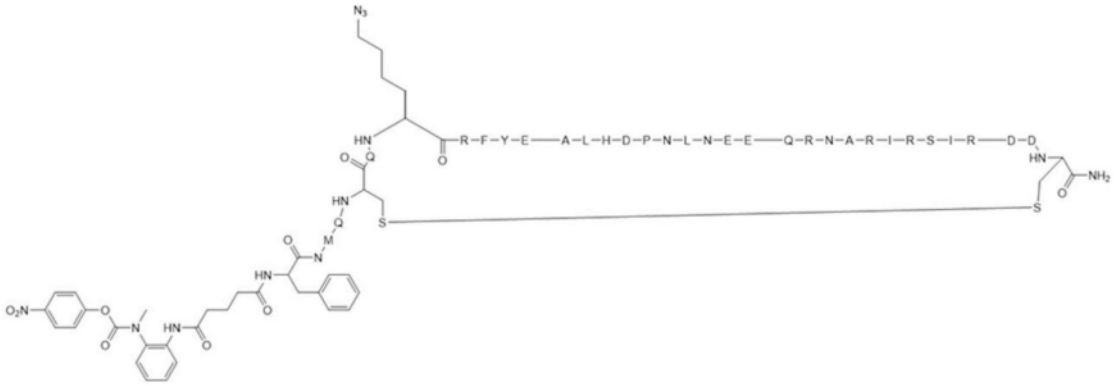
[0274] 作为本实施方式的环状肽的盐,并无特别限定,只要为药理学上可接受的盐即可,可为酸性盐及碱性盐的任一种。作为盐,可列举例如:锂盐、钠盐及钾盐等碱金属盐;镁盐及钙盐等碱土金属盐等;盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、硝酸盐、草酸盐及磷酸盐等无机酸盐;以及乙酸盐、丙酸盐、己酸盐、环戊丙酸盐、乙醇酸盐、丙酮酸盐、乳酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、苯甲酸盐、邻(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸盐、肉桂酸盐、苦杏仁酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、1,2-乙二磺酸盐、2-羟基乙磺酸盐、苯磺酸盐、对氯苯磺酸盐、2-萘磺酸盐、对甲苯磺酸盐、樟脑磺酸盐、葡庚糖酸盐、3-苯基丙酸盐、三甲基乙酸盐、叔丁基乙酸盐、月桂基硫酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、羟基萘甲酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、三氟乙酸(TFA)盐、马来酸盐及粘康酸盐等有机酸盐等。

[0275] 本实施方式的化合物可基于上述式I所示的结构,利用公知方法合成。例如在合成R^{2}具有IgG-BP的化合物时,可对利用肽固相合成法所合成的树脂上的肽的氨基进行戊二酰化,使N-甲基-1,2-苯二胺缩合后,进行氯甲酸4-硝基苯酯处理。例如在合成R^{3}具有IgG-BP的化合物时,通过在在树脂上将肽伸长的途中,使用Fmoc-MeDbz(3-[(9-芴基甲氧基羰基)氨基]-4-(甲基氨基)苯甲酸)预先插入MeDbz残基,可利用对保护肽树脂的氯甲酸4-硝基苯酯处理而在MeDbz残基部位上构建上述式I所示的骨架。

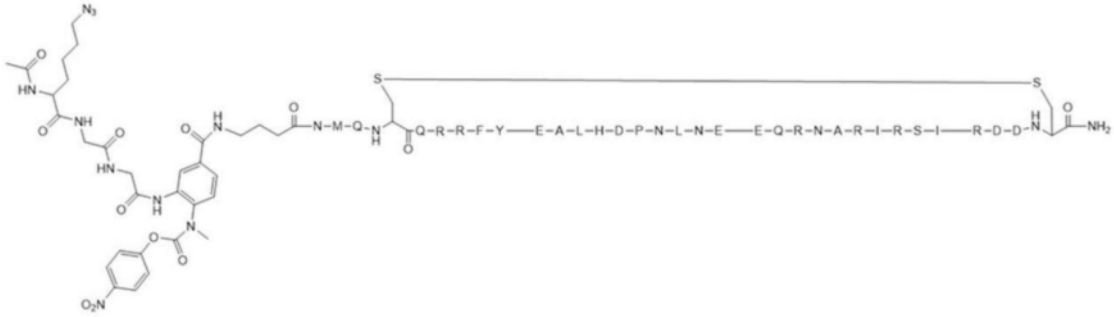
[0276] 本实施方式的化合物或其盐不具有容易水解的NHS基,因此化学上稳定,可长期保存。该化合物或其盐由于具有式I所示的活性酯前驱体,因此通过与IgG混合,可对Fc区的规

定部位特异性地修饰。当利用反应性官能团对IgG修饰时,可经由反应性官能团使药物或标记物质等结合在IgG。当使药物负载在IgG时,可获得位点特异性地结合有药物的抗体药物复合体。由此,可对IgG赋予药物的特性,因此可应用于药物输送系统(DDS)等。另外,通过利用位点特异性的标记物质对IgG进行修饰,可控制标记物质的量,因此可用于IgG的追踪、分布及检测等。

[0277] 作为本实施方式的化合物的一个示例,化合物A的结构如下所示。化合物A具有R^2由序列号152表示的氨基酸序列的IgG-BP。需要说明的是,在下述化合物A的结构中,-N-M-Q-NH-中的N、M和Q以及RFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD以单字母表示氨基酸。

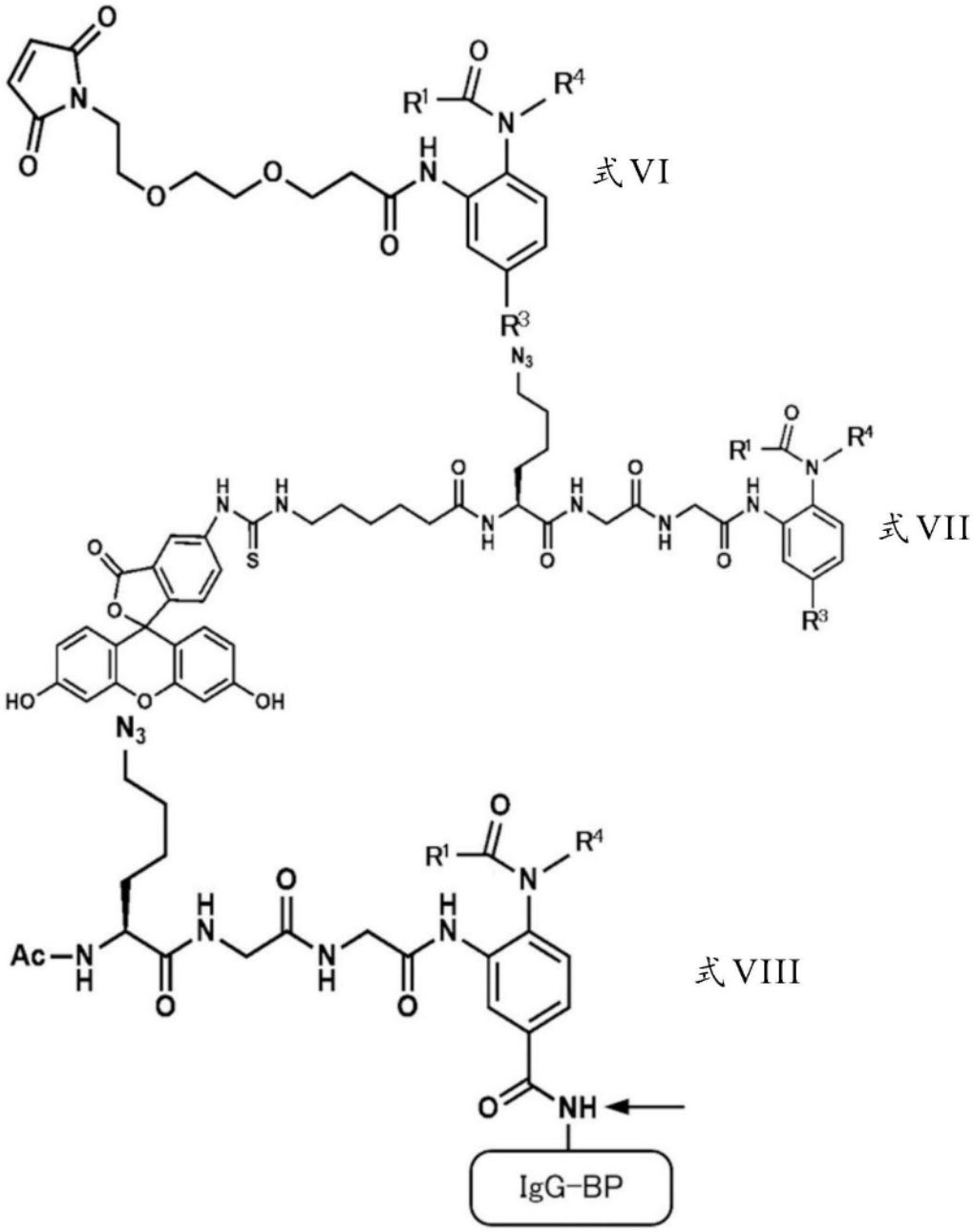
[0278] 

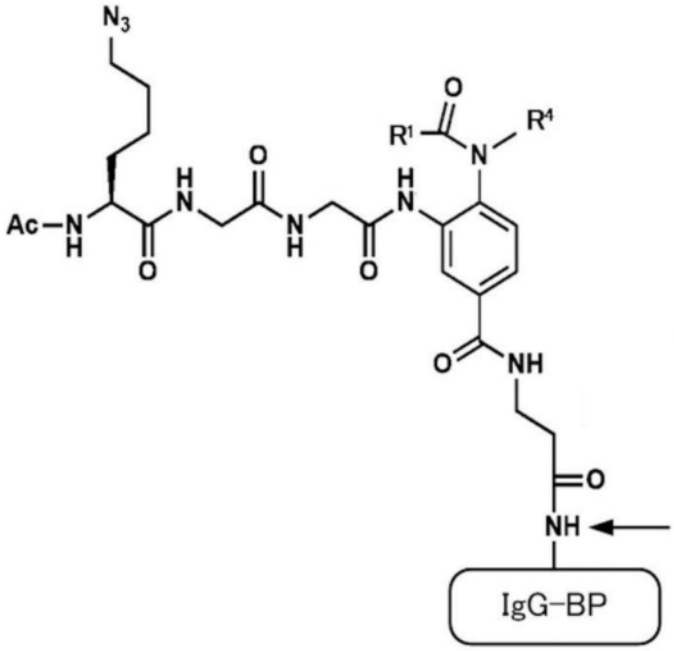
[0279] 作为本实施方式的化合物的一个示例,化合物B的结构如以下所示。该化合物具有R^3由序列号153表示的氨基酸序列的IgG-BP。需要说明的是,下述化合物B的结构中,-C(=O)-N-M-Q-NH-中的N、M和Q以及QRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDD以单字母表示氨基酸。

[0280] 

[0281] 此外,作为R^3具有IgG-BP的化合物,例示下述式VI～IX。

[0282]

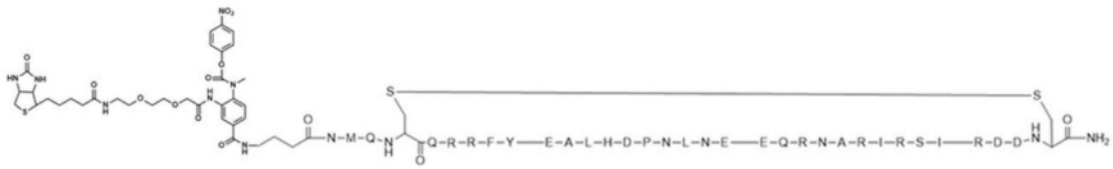


[0283] 

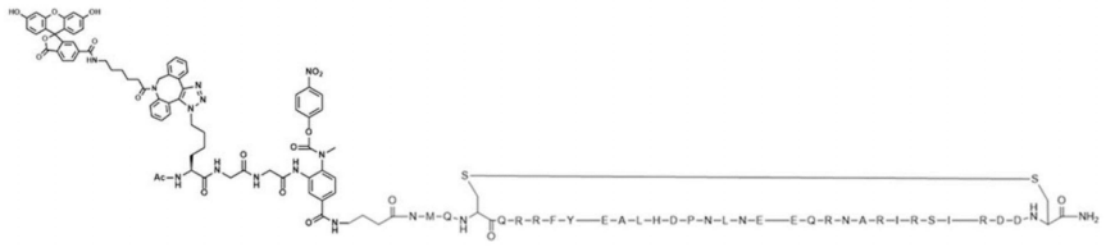
式IX

[0284] 式VIII及式IX中,IgG-BP的非N末端的氨基酸残基、例如Lys残基的侧链的氨基经由连接基与式I的苯环的碳结合。需要说明的是,式VIII及式IX中箭头所表示的-NH-表示Lys残基的侧链的氨基。

[0285] 此外,作为R^3具有IgG-BP的化合物C及化合物D,分别例示下述式X及式XI。化合物C及化合物D的IgG-BP的氨基酸序列与上述化合物B的IgG-BP相同,为序列号153所示的氨基酸序列。



式X

[0286] 

式XI

[0287] 在另一实施方式中,提供包含本实施方式的化合物或其盐的抗体修饰试剂。在其他实施方式中,提供使用该抗体修饰试剂的修饰抗体的制造方法。修饰抗体的制造方法包括反应步骤。反应步骤中,使该抗体修饰试剂与IgG进行反应。

[0288] 反应步骤中的反应条件任意,只要抗体修饰试剂暴露在IgG即可,例如在pH值7.0～9.0的缓冲液中,只要将IgG与抗体修饰试剂混合即可。缓冲液中的IgG及抗体修饰试剂的

浓度为适当进行调整。缓冲液中的IgG与抗体修饰试剂的摩尔比例如为1:1～10、1:2～8或1:3～6,优选为1:5。

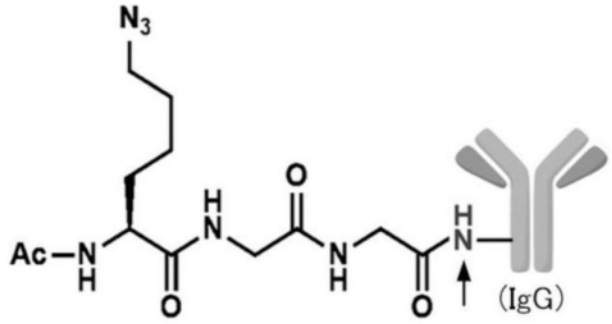
[0289] (修饰抗体)

[0290] 本实施方式的修饰抗体具有原子团,该原子团为将上述式I的R^2所结合的羰基直至R^2包括在内。该修饰抗体优选为通过使上述化合物或其盐与IgG进行反应而获得。

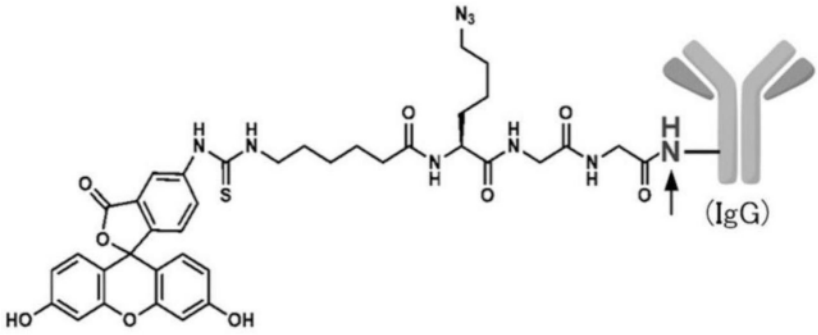
[0291] 例如,该修饰抗体具有经由包含Lys-Gly-Gly的原子团以一价或二价结合在IgG的Fc区的Lys的药物、反应性官能团或标记物质。IgG并无特别限定,尤其优选为人IgG,例如为曲妥珠单抗及托珠单抗等。

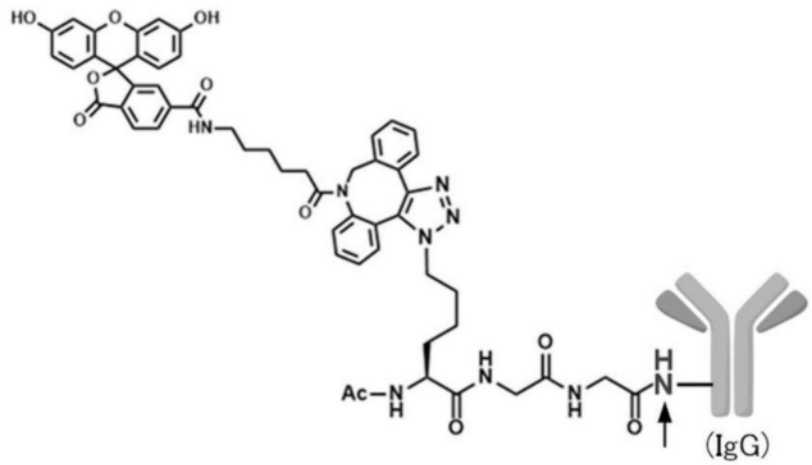
[0292] 上述原子团例如可为包含Lys-Gly-Gly的肽链,也可为在肽链上进一步结合有连接基等而成的原子团。药物、反应性官能团或标记物质可经由连接基结合在肽链的N末端,也可原子团中所包含的Lys的侧链的氨基被取代为药物、反应性官能团或标记物质。需要说明的是,Lys-Gly-Gly的Lys的N末端可被乙酰化。

[0293] 作为经由包含Lys-Gly-Gly的原子团而结合药物、反应性官能团或标记物质而成的修饰抗体的结构,示例以下的结构。需要说明的是,箭头所示的-NH-表示Lys残基的侧链的氨基。



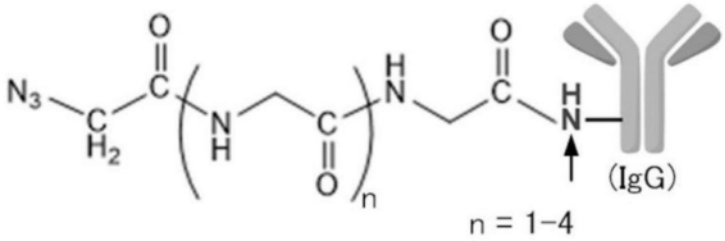
[0294]





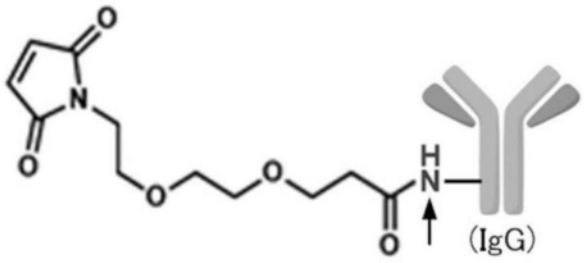
[0295] 修饰抗体也可具有经由原子团结合的上述药物、反应性官能团或标记物质,该原子团包含以一价或二价与IgG的Fc区的Lys结合的PEG、Gly或其组合。作为该修饰抗体的结构,例示以下的结构。

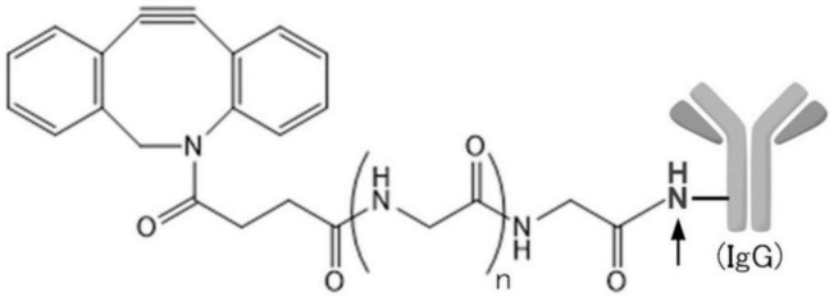
[0296] 需要说明的是,箭头所示的-NH-表示Lys残基的侧链的氨基。



n = 1-4

[0297]





n = 1-4

[0298] (附记)

[0299] (附记1)一种化合物或其盐,该化合物由上述式I所示。

[0300] (附记2)如附记1所述的化合物或其盐,其中,R^1为硝基苯氧基。

[0301] (附记3)如附记1或2所述的化合物或其盐,其中,R^2具有上述IgG结合肽,R^3不存在。

[0302] (附记4)如附记1至3中任一项所述的化合物或其盐,其中,R^2为以所述IgG结合肽作为R^{2a},由上述式II表示。

[0303] (附记5)如附记3或4所述的化合物或其盐,其中,所述IgG结合肽经药物、反应性官能团或标记物质修饰。

[0304] (附记6)如附记1或2所述的化合物或其盐,其中,R^3具有所述IgG结合肽,R^2具有药物、反应性官能团或标记物质。

[0305] (附记7)如附记1、2及6中的任一项所述的化合物或其盐,其中,R^3为以所述IgG结合肽作为R^{3a},由上述式III、式IV及式V中的任一个表示。

[0306] (附记8)如附记1至7中任一项所述的化合物或其盐,其中,所述IgG结合肽的氨基酸序列为序列号1至115的任一个所示的氨基酸序列。

[0307] (附记9)如附记6或7所述的化合物或其盐,其中,所述IgG结合肽的氨基酸序列为序列号116至151中的任一个所示的氨基酸序列。

[0308] (附记10)一种抗体修饰试剂,其包含如附记1至9中任一项所述的化合物或其盐。

[0309] (附记11)一种修饰抗体的制造方法,其包括如下反应步骤:使附记10中所述的抗体修饰试剂与IgG进行反应。

[0310] [实施例]

[0311] 通过以下的实施例,对本发明更具体地进行说明,但本发明并不受实施例限定。

[0312] 实施例1:化合物A的合成

[0313] 以如下方式合成上述化合物A。使用0.25mmol的Rink Amide PEG树脂(0.55mmol/g),利用PurePep Chorus肽固相合成机(Gyros Protein Technologies公司制造),反复进行基于哌啶/NMP(1:4)的脱Fmoc、及Fmoc保护氨基酸/DIC/Oxyma(1mmol/1mmol/1 mmol)而构建保护肽树脂。其中,Fmoc-Lys(N_3)的缩合为利用Fmoc-Lys(N_3)/DIC/Oxyma(0.50mmol/0.50mmol/0.50mmol)实施。

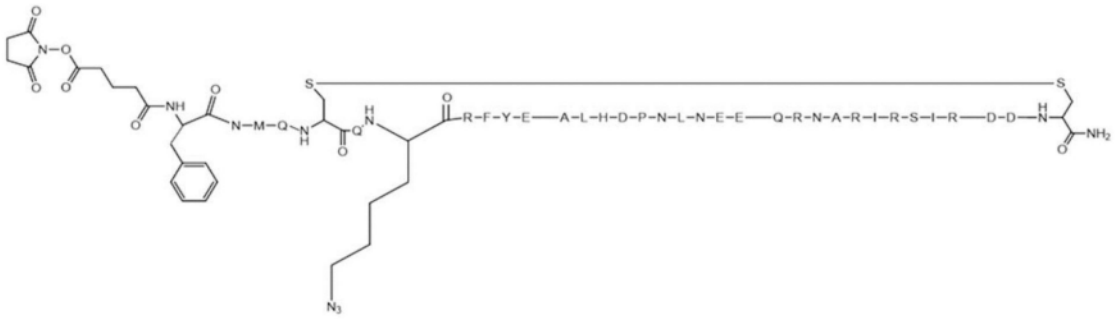
[0314] 在三乙胺(35μL)存在下,使戊二酸酐(0.1g)在N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)中与所获得的保护肽树脂(0.20mmol)的N末端胺反应1小时。其后,使用偶联剂PyAop(0.625g)、HOAt(0.163g)及N,N-二异丙基乙基胺(DIEA)(0.612mL),使N-甲基-1,2-苯二胺二盐酸盐(0.234g)与所获得的N末端羧酸树脂缩合。其后,使氯甲酸4-硝基苯酯(0.4g)在二氯甲烷中反应1小时,构建PMD(苯氧基羰化N-甲基-邻二氨基苯)(NO_2)骨架。将所获得的树脂利用三氟乙酸(TFA)溶液进行处理,进行脱树脂及脱保护,利用二乙醚进行固化,获得721mg的粗肽(2SH体)。使所获得的粗肽(2SH体)中的250mg溶解在乙酸/水(1:1)中,在冰浴冷却下缓慢地添加0.1M的碘-甲醇溶液1当量。90秒后,利用抗坏血酸水溶液使反应淬灭,利用反相高效液相色谱(HPLC)柱进行纯化、冷冻干燥,由此获得50mg的所需SS体肽即PMD(NO_2)-αZ34C(化合物A)。

[0315] 实施例2:化合物B的合成

[0316] 以如下方式合成上述化合物B。使用0.25mmol的Rink Amide PEG树脂(0.55mmol/g),利用PurePep Chorus肽固相合成机(Gyros Protein Technologies公司制造),反复进行基在哌啶/NMP(1:4)的脱Fmoc、及Fmoc保护氨基酸/DIC/Oxyma(1mmol/1mmol/1 mmol)而构建保护肽树脂。其中,Fmoc-MeDbz的缩合为利用Fmoc-MeDbz/HCTU/6-Cl HOBt/DIEA(1mmol/1mmol/1mmol/2mmol)实施,Fmoc-Lys(N_3)的缩合为利用Fmoc-Lys(N_3)/DIC/HOAt(0.375mmol/0.375mmol/0.375mmol)实施。

[0317] 使氯甲酸4-硝基苯酯(0.5g)在二氯甲烷中与所获得的保护肽树脂(0.25mmol)反应1小时,而构建PMD(NO_2)骨架。将所获得的树脂利用TFA溶液进行处理,进行脱树脂及脱保护,利用二乙醚进行固化,获得966mg的粗肽(2SH体)。将所获得的粗肽利用逆相HPLC柱进行纯化、冷冻干燥,由此获得147mg的2SH体。其後,使粗肽(2SH體)溶解在乙酸/水(1:1)中,在冰浴冷卻下缓慢地添加1当量的0.1M的碘-甲醇溶液。30秒后,利用抗坏血酸水溶液使反应淬灭,利用逆相HPLC管柱进行纯化、冷冻干燥,由此获得87mg的所需的SS体肽即AzideKGG-PMD(NO_2)-αZ34C(F1Gaba,K7R)(化合物B)。

[0318] 为了比较,而合成具有DSG的下述化合物。

[0319] 

[0320] 使用0.25mmol的Rink Amide PEG树脂(0.55mmol/g),利用PurePep Chorus肽固相合成机(Gyros Protein Technologies公司制造),反复进行基在哌啶/NMP(1:4)的脱Fmoc、及Fmoc保护氨基酸/DIC/Oxyma(1mmol/1mmol/1 mmol)而构建保护肽树脂。其中,Fmoc-Lys(N_3)的缩合为利用Fmoc-Lys(N_3)/DIC/Oxyma(0.50mmol/0.50mmol/0.50mmol)来实施。

[0321] 将所获得的保护肽树脂利用TFA溶液进行处理,进行脱树脂及脱保护,将粗肽(2SH体)利用二乙醚固化并滤取。使所获得的粗肽(2SH体)溶解在乙酸/水(1:1)中,在冰浴冷却下缓慢地添加0.1M的碘-甲醇溶液。60秒后,利用抗坏血酸水溶液使反应淬灭,利用逆相HPLC柱进行纯化、冷冻干燥,由此获得61mg的具有N末端游离胺成分的前驱体肽(SS体)。最后,使前驱体肽(SS体)60mg溶解在DMSO中,缓慢地加入DSG(18mg)及DIEA(12μL),将N末端的氨基转化为琥珀酰亚胺酯并进行活化。10分钟后,利用0.1%TFA水进行稀释,利用逆相HPLC柱进行纯化、冷冻干燥,由此此获得19mg的所需的DSG-αZ34C(以下设为比较例)。

[0322] 试验例1:稳定性的研究

[0323] 使化合物A、化合物B或比较例以达到20mg/mL的方式溶解在DMSO中,在室温或-20℃下静置规定时间,利用HPLC进行分析。

[0324] (结果)

[0325] 针对化合物A、化合物B及比较例,将主峰面积相对于全部峰面积之和的比例(HPLC纯度)示于表1。在室温及-20℃下化合物A及化合物B较比较例稳定。

[0326] [表1]

[0327]

	室温		−20℃	
	0小时	22小时	0天	30天
比较例	85%	83%	92%	85%
化合物A	94%	93%	94%	94%
化合物B	98%	92%	98%	98%

[0328] 实施例3:化合物A及化合物B的对于人IgG的反应的评价

[0329] [与人IgG1的反应]

[0330] 使化合物A或化合物B与抗体(人IgG1抗体医药品安挺乐(Actemra)、托珠单抗)在4种pH条件下进行反应。即,在20mg/ml的IgG溶液20μL中加入0.5M乙酸缓冲液(pH值5.5)、0.5M磷酸缓冲液(pH值7.0)、0.5M Hepes缓冲液(pH值8.0)或0.5M碳酸氢盐缓冲液(pH值

8.9)20μL,并添加蒸馏水138.4μL。最后,每次加入1.56μL的溶解在DMSO中的10mM的化合物A或10mM的化合物B,快速搅拌后,使总量达到200μL(最终反应物中的IgG浓度为15.6μM,试剂为5倍摩尔比的78μM)。在2小时后进行取样,利用最终浓度10%甲酸使反应终止后,利用LC-MS进行分析。

[0331] [反应物的LC-MS分析]

[0332] 将终止反应的反应溶液利用0.1%甲酸稀释至5倍后,利用连结有蛋白质BEH C4柱(300Å,1.7μm,2.1×500mm,Waters公司制造)的BioAccord LC-MS系统(Waters公司制造)对所获得的溶液20μL进行分析(流速:0.4mL/分,洗脱:包含0.1%甲酸的1%CH_3CN至50%CH_3CN的线性梯度,柱温度:80℃)。

[0333] (结果)

[0334] 将化合物A与IgG的2小时后的反应溶液的LC-MS的结果示于图3及图4。图3(A)、(B)、(C)及(D)分别为pH值5.5、7.0、8.0及8.9的反应溶液的洗脱色谱图(280nm)。2.23分钟或2.25分钟的波峰为与IgG的洗脱对应的波峰。图4(A)、(B)、(C)及(D)分别表示对pH值5.5、7.0、8.0及8.9的反应溶液中的IgG的波峰进行质谱分析所得的结果。图4(A)所示的pH值5.5的反应液中的质量147879Da、148041Da及148203Da的分子种类分别为通过IgG的糖链的多样性检测到的N-G0F×2(分子种类1)、N-G0F×1+N-G1F×1(分子种类2)及N-G1F×2(分子种类3)。pH值5.5时,未观察到通过附加肽而得到修饰的分子种类。

[0335] 图4(B)所示的pH值7.0的反应溶液及图4(C)所示的pH值8.0的反应溶液中,与pH值5.5时大致同样地,均未观察到得到修饰的分子种类。另一方面,在图4(D)所示的pH值8.9的反应溶液中,观察到质量152195Da、152357Da及152519Da的分子种类。它们较IgG的分子种类1、分子种类2及分子种类3的质量,分别增加了4316Da、4316Da及4317Da。这大致与期待通过化合物A而将肽附加至IgG时会增加的质量4333Da一致,因此表明,化合物A在pH值8.9时与IgG发生反应。

[0336] 将化合物B与IgG的2小时后的反应溶液的LC-MS的结果示于图5及图6。图5(A)、(B)、(C)及(D)分别为pH值5.5、7.0、8.0及8.9的反应溶液的洗脱色谱图(280nm)。1.93分或2.02分的波峰为与化合物B的洗脱对应的波峰。2.25分或2.27分的波峰为与IgG的洗脱对应的波峰。图6(A)、(B)、(C)及(D)分别表示对pH值5.5、7.0、8.0及8.9的反应溶液中的IgG的波峰进行质谱分析所得的结果。如图6(A)所示,在pH5.5时,观察到IgG的分子种类1(147882Da)、分子种类2(148044Da)、分子种类3(148208Da),但在图6(B)所示的pH值7.0时,分子种类1减少,148193Da的分子种类增加。该311Da的差为与通过化合物B的反应所附加的叠氮化KGG的附加量(311.33Da)一致。

[0337] 此外,在图6(C)所示的pH值8.0及图6(D)所示的pH值8.9时,分别增加了148505Da及148501Da的分子种类。这些分子种类的质量较分子种类1,增加了623Da或619Da,相当在叠氮化KGG的附加量(311.33)的2倍,因此认为2个叠氮化KGG附加至IgG,另外,关于分子种类2,观察到如下情况:在pH值7.0时,认为附加了1个叠氮化KGG的148353Da及认为附加了2个叠氮化KGG的148664Da的分子种类出现增加,在pH值8.0、及8.9时,也在附加1个后接着附加2个。根据以上情况表明,化合物B在pH值7.0以上时与IgG发生反应。

[0338] 实施例4:化合物B对于小鼠IgG的反应的评价

[0339] [与小鼠IgG的反应]

[0340] 使化合物B与小鼠IgG2抗体(抗DYKDDDDK小鼠IgG2b单克隆抗体)在2个pH值条件下以如下方式发生反应。在0.98mg/mL的IgG溶液30μL中加入0.2M Hepes缓冲液(pH值8.0)或0.2M碳酸氢盐缓冲液(pH值8.9)22μL。最后,每次加入8μL的溶解在DMSO中的50μM的化合物B,快速搅拌后,使总量达到60μL(最终反应物中的IgG浓度为1.67μM,试剂为4倍摩尔比的6.67μM)。在2小时后进行取样,利用最终浓度5%甲酸使反应终止后,与实施例3同样地利用LC-MS进行分析。

[0341] (结果)

[0342] 将化合物B与小鼠IgG的反应溶液的LC-MS的结果示于图7及图8。图7(A)、(B)及(C)分别为添加化合物B之前的pH值8.0的抗体溶液、反应2小时后的pH值8.0的溶液及反应2小时后的pH值8.9的溶液的洗脱色谱图(280nm)。2.30分及2.53分的波峰为与小鼠IgG的洗脱对应的波峰。图8(A)、(B)及(C)分别表示对添加化合物B之前的pH值8.0的抗体溶液、反应2小时后的pH值8.0的溶液及反应2小时后的pH值8.9的溶液中的IgG的波峰进行质谱分析所得的结果。图8(A)所示的添加化合物B之前的pH值8.0的溶液中的质量150094Da、150256Da及150419Da的分子种类分别为通过IgG的糖链的多样性所检测到的N-G0F×2(分子种类1)、N-G0F×1+N-G1F×1(分子种类2)及N-G1F×2(分子种类3)。

[0343] 如图8(B)及(C)分别所示,在pH值8.0及pH值8.9时,分子种类1～3减少,另一方面,新增加了150569Da、150729Da、150884Da及151039Da的分子种类。质量150569Da较分子种类2增加313Da。质量150729Da较分子种类3增加310Da,较分子种类1增加635Da。质量150884Da较分子种类2增加628Da。质量151039Da较分子种类3增加620Da。这些质量的差为相当于通过化合物B的反应附加在抗体的叠氮化KGG的附加量(311.33Da)或其2倍,因此观察到在第1个的附加后接着发生第2个的附加。根据以上情况表明,化合物B在pH值8.0以上时与小鼠抗体发生反应。

[0344] 实施例5:化合物B对于兔IgG的反应的评价

[0345] [与兔IgG的反应]

[0346] 使化合物B与兔抗体(抗小鼠IgG1单克隆兔抗体)在pH值8.0的条件下以如下方式发生反应。在1.93mg/mL的IgG溶液25μL中添加0.5M Hepes缓冲液(pH值8.0)10μL及蒸馏水5μL。最后,每次加入60μL的溶解在蒸馏水中的89.3μM的化合物B,快速搅拌后,使总量达到100μL(最终反应物中的IgG浓度为6.7μM,化合物B为8倍摩尔比的53.6μM)。在2小时后进行取样,利用最终浓度5%甲酸使反应终止后,与实施例3同样地利用LC-MS进行分析。

[0347] (结果)

[0348] 将化合物B与兔IgG的反应溶液的LC-MS的结果示于图9及图10。图9(A)及(B)分别为添加化合物B之前的pH值8.0的抗体溶液及反应24小时后的pH值8.0的溶液的洗脱色谱图(280nm)。图10(A)及(B)分别表示对添加化合物B的前的pH值8.0的抗体溶液及反应24小时后的pH值8.0的溶液中的IgG的波峰进行质谱分析所得的结果。图10(A)所示的添加化合物B之前的pH值8.0的反应液中的质量144237Da、144397Da及144559Da的分子种类分别为通过IgG的糖链的多样性所检测到的N-G0F×2(分子种类1)、N-G0F×1+N-G1F×1(分子种类2)及N-G1F×2(分子种类3)。

[0349] 如图10(B)所示,分子种类1～3减少,另一方面,新增加了质量144544Da、144713Da、144864Da、145019Da、145179Da的分子种类。质量144544Da较分子种类1增加

307Da。质量144713Da较分子种类2增加316Da。质量144864Da较分子种类3增加305Da,较分子种类1增加627Da。质量145019Da较分子种类2增加622Da。质量1445179Da较分子种类3增加620Da。这些质量的差相当于通过化合物B的反应所附加的叠氮化KGG的附加量(311.33Da)或其2倍,因此观察到在第1个的附加后接着发生第2个的附加。根据以上情况表明,化合物B在pH值8.0以上时与兔抗体也发生反应。

[0350] 实施例6:化合物C的合成

[0351] 以如下方式合成上述化合物C。使用0.25mmol的Rink Amide PEG树脂(0.48mmol/g),利用PurePep Chorus肽固相合成机(Gyros Protein Technologies公司制造),反复进行基于哌啶/NMP(1:4)的脱Fmoc、及Fmoc保护氨基酸/DIC/Oxyma(1mmol/1mmol/1 mmol),而构建具有N末端MeDbz的保护肽树脂。其后,使用0.03mmol量,依序使Fmoc-AEEA(氨基乙氧基乙氧基乙酸)及生物素缩合。其中,Fmoc-MeDbz的缩合为利用Fmoc-MeDbz/HCTU/6-Cl HOBt/DIEA(1mmol/1mmol/1mmol/2mmol)实施,Fmoc-AEEA的缩合为利用Fmoc-AEEA/DIC/Oxyma(1mmol/1mmol/1mmol)实施,生物素的缩合为利用生物素/DIC/Oxyma(0.5mmol/0.5mmol/0.5mmol)实施。

[0352] 使氯甲酸4-硝基苯酯(0.06g)在二氯甲烷中与所获得的保护肽树脂(0.03mmol)反应1小时,而构建PMD(NO_2)骨架。将所获得的树脂利用TFA溶液进行处理,进行脱树脂及脱保护,利用二乙醚进行固化,而获得130mg的粗肽(2SH体)。其后,使粗肽(2SH体)65mg溶解在乙酸/水(1:1)中,在冰浴冷却下,缓慢添加数当量的0.1M的碘-甲醇溶液。60秒后,利用抗坏血酸水溶液使反应淬灭,利用逆相HPLC柱进行纯化及冷冻干燥,由此获得10mg的所需的SS体肽即Biotin-AEEA-PMD(NO_2)-aZ34C(F1Gaba,K7R)(化合物C)。

[0353] 实施例7:化合物D的合成

[0354] 以如下方式合成上述化合物D。使0.62mg的化合物B溶解在10μL的DMSO中,添加0.15mg的2倍摩尔比的FAM-DBCO并进行静置(最终反应物中的化合物D的浓度为10.8mM)。1小时后,通过高效液相色谱确认到化合物B消失,生成化合物D。不进行纯化而直接用于与IgG的反应。

[0355] 实施例8:化合物C对在人IgG的反应的评价

[0356] [与人IgG的反应]

[0357] 使化合物C与抗体(托珠单抗)在4种pH条件下进行反应。即,在20mg/ml的IgG溶液20μL中加入0.5M乙酸缓冲液(pH值5.5)、0.5M磷酸缓冲液(pH值7.0)、0.5M Hepes缓冲液(pH值8.0)或0.5M碳酸氢盐缓冲液(pH值8.9)40μL,另外添加蒸馏水138.4μL。最后,每次加入1.56μL溶解在DMSO中的10mM的化合物C,迅速搅拌后,使总量达到200μL(最终反应物中的IgG浓度为15.6μM,化合物C为5倍摩尔比的78μM)。在2小时后进行取样,利用最终浓度10%甲酸使反应终止后,以与实施例3相同的方式利用LC-MS进行分析。

[0358] (结果)

[0359] 将化合物C与人IgG的反应2小时后的反应溶液的LC-MS的结果示在图11及图12。图11(A)、(B)、(C)及(D)分别为pH值5.5、7.0、8.0及8.9的反应溶液的洗脱色谱图(280nm)。2.27分的波峰为与IgG的洗脱对应的波峰。图12(A)、(B)、(C)及(D)分别表示对pH值5.5、7.0、8.0及8.9的反应溶液中的IgG的波峰进行质谱分析所得的结果。图12(A)所示的pH值5.5的反应液中的质量147878Da、148039Da及148201Da的分子种类分别为通过IgG的糖链的

多样性所检测到的N-G0F×2(分子种类1)、N-G0F×1+N-G1F×1(分子种类2)及N-G1F×2(分子种类3)。

[0360] 如图12(A)所示,在pH值5.5时,未观察到经化合物C修饰的分子种类。另一方面,在图12(B)所示的pH值7.0时,分子种类1减少,而增加了148248Da的分子种类。该370Da的差为与通过化合物C的反应所附加的生物素-AEEA(以下也简称为“生物素-PEG”)的附加量(372.46Da)一致。

[0361] 此外,在图12(C)所示的pH值8.0及图12(D)所示的pH值8.9时,分别增加了148620Da及148619Da的分子种类。这些分子种类的质量较分子种类1,分别增加742Da及743Da。这些质量的差为相当在生物素-PEG的附加量(372.46Da)的2倍,因此认为2个生物素-PEG附加在IgG,另外,关在分子种类2,观察到如下情况:在pH值7.0时,认为附加了1个生物素-PEG的148411Da的分子种类出现增加,在pH值8.0及8.9时,认为附加了1个生物素-PEG的148409Da及认为附加了2个生物素-PEG的148782Da的分子种类也出现增加,在第1个附加后接着发生了第2个的附加。根据以上情况表明,化合物C在pH值7.0以上时与人IgG发生了反应。

[0362] 实施例9:化合物D对在人源化IgG的反应的评价

[0363] [与IgG的反应]

[0364] 使化合物D与抗体(抗HER2人源化单克隆抗体医药品赫赛汀、曲妥珠单抗)在pH值8.0或8.9的条件下以如下方式发生。在20mg/ml的IgG溶液20μL中添加0.5M Hepes缓冲液(pH值8.0)或0.5M碳酸氢盐缓冲液(pH值8.9)40μL,进一步添加蒸馏水138μL。最后,每次添加2μL的化合物D的DMSO溶液10.8mM,迅速搅拌后,使总量达到100μL(最终反应物中的IgG浓度为13.5μM,化合物D为8倍摩尔比的108μM)。在24小时后进行取样,利用最终浓度5%甲酸使反应终止后,与实施例3同样地利用LC-MS进行分析。

[0365] (结果)

[0366] 将化合物D与人源化IgG的反应溶液的LC-MS的结果示于图13及图14。图13(A)、(B)及(C)分别为添加化合物D之前的抗体溶液、反应24小时后的pH值8.0的溶液及反应24小时后的pH值8.9的溶液的洗脱色谱图(280nm)。2.23分的波峰为与IgG的洗脱对应的波峰。图14(A)、(B)及(C)分别为对添加化合物D之前的抗体溶液、反应24小时后的pH值8.0的溶液及反应24小时后的pH值8.9的溶液中的IgG的波峰进行质谱分析所得的结果。图14(A)中所示的添加化合物D之前的pH值8.0的反应液中的质量148058Da、148220Da及148381Da的分子种类分别为通过IgG的糖链的多样性所检测到的N-G0F×2(分子种类1)、N-G0F×1+N-G1F×1(分子种类2)及N-G1F×2(分子种类3)。

[0367] 如图14(B)所示,在pH值8.0时,分子种类1～3减少,另一方面,新增加了质量149048Da、149209Da、149371Da、150036Da、150196Da及150356Da的分子种类。质量149048Da较分子种类1增加990Da。质量149209Da较分子种类2增加989Da。质量149371Da较分子种类3增加990Da。质量150036Da较分子种类1增加1978Da。质量150196Da较分子种类2增加1976Da。质量150356Da较分子种类3增加1975Da。这些质量的差为相当于通过化合物D的反应所附加的FAM-DBCO-N3-KGG的附加量(988.03Da)或其2倍,因此观察到在第1个附加后接着发生了第2个附加。

[0368] 另外,即使在pH值8.9时,分子种类1～3也减少,另一方面,新增加了质量

149077Da、149235Da、149399Da、150062Da、150224Da及150386Da的分子种类。质量149077Da较分子种类1增加1019Da。质量149235Da较分子种类2增加1015Da。质量149399Da较分子种类3增加1018Da。质量150062Da较分子种类1增加2004Da。质量150224Da较分子种类2增加2004Da。质量150386Da较分子种类3增加2005Da。这些质量的差大致相当于通过化合物D的反应所附加的FAM-DBCO-N3-KGG的附加量(988.03Da)或其2倍,因此观察到在第1个的附加后接着发生了第2个的附加。根据以上情况表明,化合物D在pH值8.0以上时与人源化单克隆抗体发生了反应。

[0369] 试验例2:基于肽谱图及质谱仪的修饰位点的鉴别

[0370] 将曲妥珠单抗或与化合物B发生了反应的曲妥珠单抗(50μg、25μL的水中)与25μL的0.2%Rapigest SF(Waters公司制造)加以混合。加入2.6μL的100mM二硫苏糖醇(DTT、最终浓度5mM)后,将溶液在60℃下保温30分钟。加入5.8μL的150mM碘乙酰胺(最终浓度15mM)后,将该溶液在室温、暗处中保温30分钟。加入12.5μL的0.2μg/μL胰蛋白酶,在37℃下保温3.5小时后,加入7.85μL的5%TFA(终浓度0.5%)以使反应终止。离心分离后,将上清液注入至与ACQUITY UPLC H-Class FTN系统(Waters公司制造)连接的ACQUITY UPLC Peptide BEH130 C18柱(1.7μm,2.1×150mm,Waters公司制造),进行肽图分析(peptide mapping)。洗脱为以包含0.1%甲酸的2-90%乙腈梯度进行,将柱温箱的温度保持为60℃。分离的肽的质谱分析为利用与ACQUITY UPLC H-Class FTN系统(Waters公司制造)连接的Xevo G2-XS QTof质谱仪(Waters公司制造)进行,所获得的质谱的分析为通过MassLynx ver.4.1或UNIFI 1.9.2软件来进行。

[0371] (结果)

[0372] 将肽谱图的结果示于图15。将与化合物B发生了反应的曲妥珠单抗(tCAP偶联物)的结果及曲妥珠单抗的结果分别示于上段及下段。对各波峰的质量进行分析,结果在曲妥珠单抗时观察到的在44.65分洗脱的波峰(T20)显示2844.45Da的质量,与源自曲妥珠单抗H链的226-251残基的T20肽的质量(2844.46Da)一致。

[0373] [表2]

[0374]

片段名	氨基酸序列
T20	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR (序列号154)

[0375] 另一方面,在tCAP偶联物的情形时,在44.65分洗脱的波峰消失,在50.77分洗脱的波峰(T19-21)显示质量4461.17Da。该波峰如下所述,与在源自曲妥珠单抗H链的残基编号222-258(Eu编号为219-255)的T19-T20-T21肽的质量上附加1个N-乙酰基Azide Lys-Gly-Gly后所得的质量4461.20一致。

[0376] [表3]

[0377]

片段名	氨基酸序列
T19-21	SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR (序列号155)

[0378] 以上情况表示,N-乙酰基(Azide Lys)-Gly-Gly有1个附加到T19-T20-T21肽(残基编号:222-258)上,作为其附加位置,认为Lys225、Lys249或Lys251(Eu编号为Lys222、Lys246或Lys248)为候补。此处,将tCAP偶联物时在50.77分洗脱的波峰的MS/MS的结果示于

图16。相较于作为母体质量的4461.178,若追加b系列的质量数据,则检测到与Lys-Thr-His(残基编号:245-247)对应的质量峰的差量(b6与b3的差量),因此表明,Lys225未引起修饰。另一方面,若追加y系列的质量数据,则检测到与Lys-Pro(残基编号:249-248)对应的质量峰的差量(y11与y9的差量),因此表明,残基编号Lys249(Eu编号为Lys246)未引起修饰。除此以外,还检测到附加有N-乙酰基(Azide Lys)-Gly-Gly的Lys-Pro(残基编号:251-250)的质量峰的差量(y9与y7的差量)。以上情况明确表明,tCAP反应的主要修饰部位为残基编号Lys251(Eu编号为Lys248)。

[0379] 实施例10:叠氮化人IgG抗体的抗癌剂修饰及荧光剂修饰

[0380] [曲妥珠单抗与抗癌剂或荧光剂的反应]

[0381] 使化合物B与曲妥珠单抗反应而制备成叠氮化曲妥珠单抗,通过点击反应而制备上述叠氮化曲妥珠单抗与抗癌剂(DM1)或荧光剂(IRDye(商标)800CW)的偶联物。首先,以如下方式制备用以利用抗癌剂修饰曲妥珠单抗的试剂。将溶解在DMSO中的100mM美登素(MedChemExpress公司制造)50μL、溶解在DMSO中的100mM溴乙酰胺-dPEG(商标)4-酰胺基DBCO(QUANTA BIODESIGN公司制造)50μL及1M $NaHCO_3$溶液(pH值8.9)10μL加以混合,在室温下放置1小时。将如此制备成的DBCO-PEG4-DM1试剂溶液利用DMSO稀释成1mM,将1mM DBCO-PEG4-DM1试剂溶液10μL与制备成20μM的叠氮化曲妥珠单抗的PBS溶液100μL加以混合(摩尔比5:1),并在室温下放置0.5小时。

[0382] 在曲妥珠单抗的荧光剂修饰中,将溶解在DMSO中的1mM IRDye(商标)800CW DBCO Infrared Dye(LI-COR Biosciences公司制造)10μL与制备成20μM的叠氮化曲妥珠单抗的PBS溶液100μL加以混合(摩尔比为5:1),并在室温下放置1小时。对各反应液进行取样,利用最终浓度5%甲酸使反应终止后,与实施例3同样地利用LC-MS进行分析。

[0383] (结果)

[0384] 将叠氮化曲妥珠单抗的抗癌剂修饰后及荧光剂修饰后的反应溶液的LC-MS的结果分别示于图17及图18。图17(A)、(B)、(C)及(D)分别为曲妥珠单抗(未修饰抗体)、经化合物B修饰的叠氮化曲妥珠单抗(叠氮化KGG修饰抗体)、抗癌剂与叠氮化曲妥珠单抗的反应物及叠氮化曲妥珠单抗与荧光剂的反应物的洗脱色谱图(280nm)。

[0385] 图18(A)、(B)、(C)及(D)分别表示针对未修饰抗体、叠氮化KGG修饰抗体、抗癌剂与叠氮化曲妥珠单抗的反应物及叠氮化曲妥珠单抗与荧光剂的反应物,对洗脱的各抗体进行质谱分析的结果。如图18(A)所示,在未修饰抗体时,由于糖链的多样性,观察到148058Da、148220Da及148381Da这3个质量的分子种类。利用化合物B进行修饰,结果如图18(B)所示,叠氮化KGG以一价或二价附加,作为一价,生成了148374Da、148531Da及148682Da的质量的分子种类。作为二价,生成了148682Da(与一价的波峰重迭)、148841Da及149003Da的质量的分子种类。根据图18(B)的波峰比,算出0价(未修饰):一价:二价的反应后的生成比率,为0:29:71。

[0386] 使叠氮化KGG修饰抗体与以摩尔比计为5倍量的DBCO-PEG4-DM1进行反应,结果如图18(C)所示,生成了以一价或二价附加有DM1的分子种类。质量为149672Da、149833Da及149994Da的分子种类为一价的修饰物,质量为151283Da、151447Da及151609Da的分子种类为二价的修饰物。

[0387] 使叠氮化KGG修饰抗体与以摩尔比计为5倍量的IRDye(商标)800CW DBCO

Infrared Dye进行反应,结果如图18(D)所示,生成了以一价或二价附加有IRDye(商标)800CW的分子种类。质量为149630Da、149792Da及149954Da的分子种类为一价的修饰物,质量为151202Da、151365Da及151526Da的分子种类为二价的修饰物。

[0388] 如上所述,若使用叠氮化KGG修饰抗体,则利用点击反应将附加有DBCO基的功能性配体附加在抗体,可容易使抗体高功能化。

[0389] 试验例3:叠氮化KGG修饰抗体与Fc受体的亲和力评价

[0390] 使用BIAcore 8K(Cytiva公司制造),在25℃下进行叠氮化KGG修饰抗体对于Fc受体(FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa及FcγRIIIb)的亲和力分析为。将抗His标签抗体(Cytiva公司制造)利用胺偶合法固定化至CM5传感器芯片上直至RU值约8000的量。此外,将Fc受体(FcgRI-His、FcgRIIaI-His、FcgRIIbI-His、FcgRIIIaI-His或FcgRIIIbI-His、Sino Biological公司制造)以0.4μg/mL的浓度注入至其中,由此固定化至RU值约100的量。关于分析对象物,将以1600nM至12.5nM的浓度(FcγRI的情形时,1600nM至0.05nM的浓度)溶解在PBST缓冲液(PBS、0.005% Tween20)中的合计8种(FcγRI的情形时为16种浓度)浓度的叠氮化KGG修饰抗体或未修饰抗体以流速30μL/分注入,获得传感器图谱(聚集时间:150秒、解离时间:250秒)(FcγRI的情形时,聚集时间:120秒、解离时间:480秒)。使用附带的BIA评价软件,通过1:1结合模型算出解离常数(Kd)。

[0391] 另一方面,使用BIAcore 8K(Cytiva公司制造)在25℃下以如下方式实施叠氮化KGG修饰抗体对于FcRn(胎儿性Fc受体)的亲和力分析。将使用乙酸钠pH值5.5溶液(Cytiva公司制造)制备成1.0μg/mL浓度的FcRn(Sino Biological公司制造)注入至用于胺偶合反应的活化的CM5传感器芯片,进行固定化直至RU值约300的量。关于分析对象物,将以1600nM至12.5nM的浓度溶解在磷酸缓冲液(50mM磷酸钠、150mM NaCl、pH值6.0)中的合计8种浓度的叠氮化KGG修饰抗体或未修饰抗体以流速30μL/分注入,而获得传感器图谱(聚集时间:120秒、解离时间:150秒、再生:30秒)。使用附带的BIA评价软件,通过二价结合模型算出解离常数(Kd)。再生溶液为使用100mM TrisHCl、0.2M NaCl、pH值8.0。

[0392] (结果)

[0393] 将评价叠氮化KGG修饰抗体及未修饰抗体与Fc受体的亲和力所得的结果示于以下表中。除FcγRIIb以外,叠氮化KGG修饰抗体与未修饰抗体对于Fc受体的亲和力未发现有较大差异。该情况表明,使用化合物B的修饰几乎不会影响与对IgG抗体的效应功能重要的Fc受体的结合,而可作为一种偶联物技术使用。

[0394] [表4]

[0395]

受体	对于未修饰抗体的Kd (nM)	对于叠氮化KGG修饰抗体的Kd (nM)
FcγRI	5.3	6.6
FcγRIIa	100	88
FcγRIIb	270	2000
FcγRIIIa	66	65
FcγRIIIb	4000	3200
FcRn	570	250

[0396] 上述实施方式为用以说明本发明,而非限定本发明的范围。即,本发明的范围并非由实施方式表示,而是由权利要求表示。并且,在权利要求内及与其同等的发明意义的范围内所实施的各种变化视为本发明的范围内。

[0397] 本发明为基于2021年9月8日提出申请的日本专利申请2021-146504号。以日本专利申请2021-146504号的说明书、权利要求、全部附图作为参照并入本说明书中。

[0398] [产业上的可利用性]

[0399] 本发明可用于修饰抗体的制造、包含抗体的复合体的制造及研究用试剂。

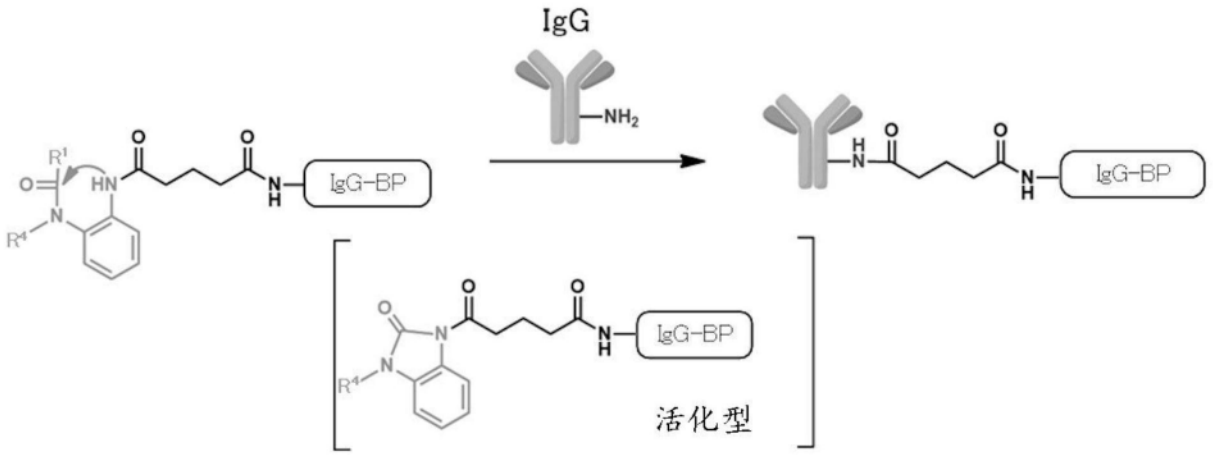


图1

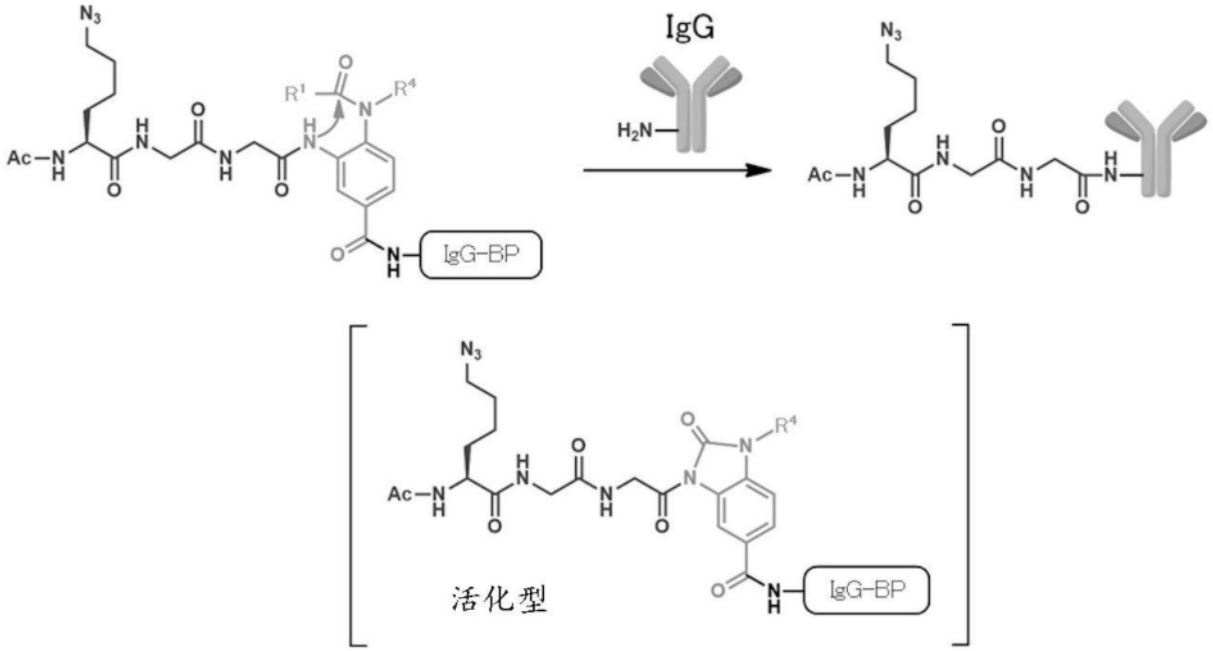


图2

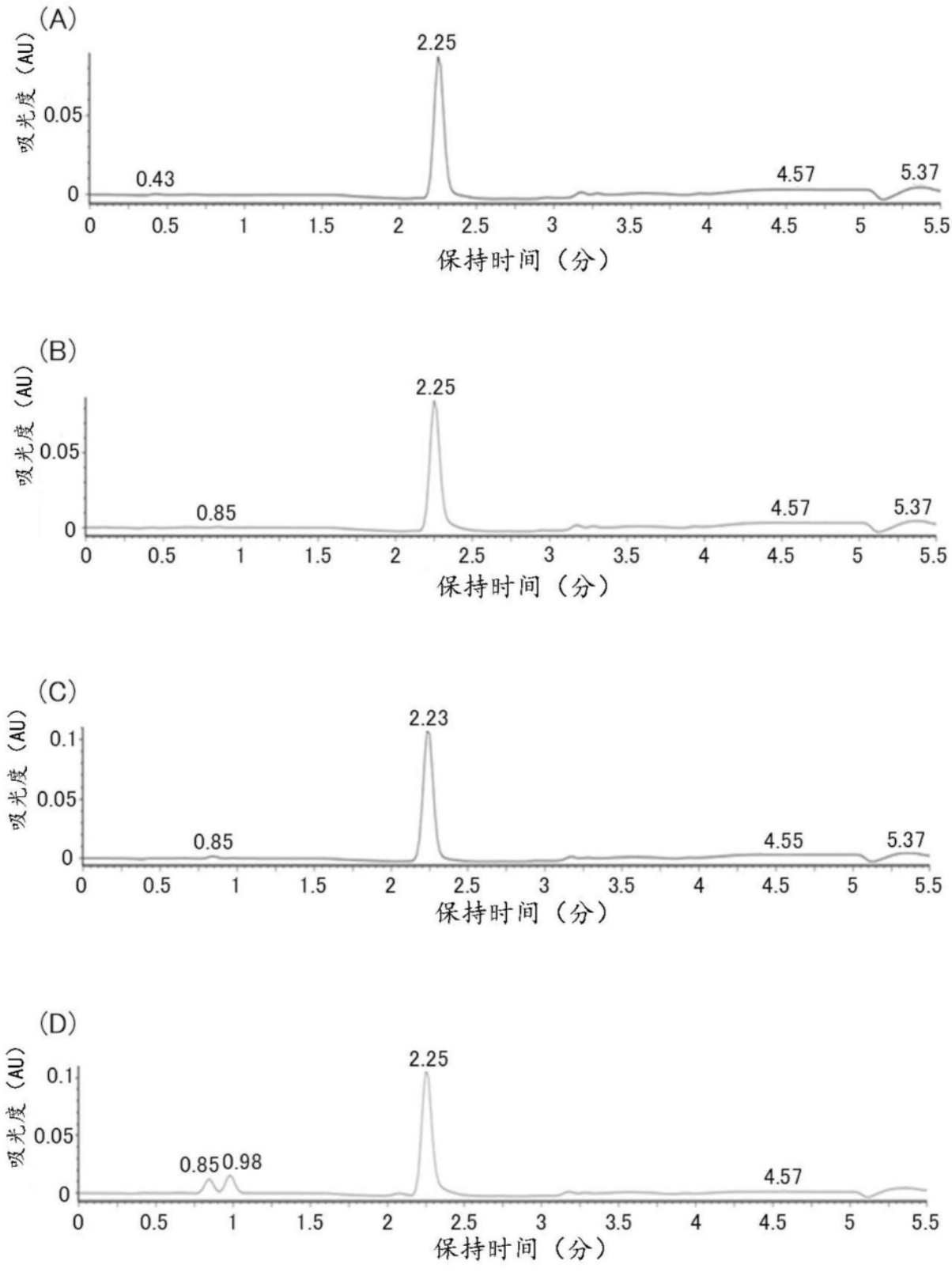

(A)
吸光度（AU）
0.05
0
2.25
0.43
4.57
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
保持时间（分）
(B)
吸光度（AU）
0.05
0
2.25
0.85
4.57
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
保持时间（分）
(C)
吸光度（AU）
0.1
0.05
0
2.23
0.85
4.55
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
保持时间（分）
(D)
吸光度（AU）
0.1
0.05
0
2.25
0.85
0.98
4.57
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
保持时间（分）

图3

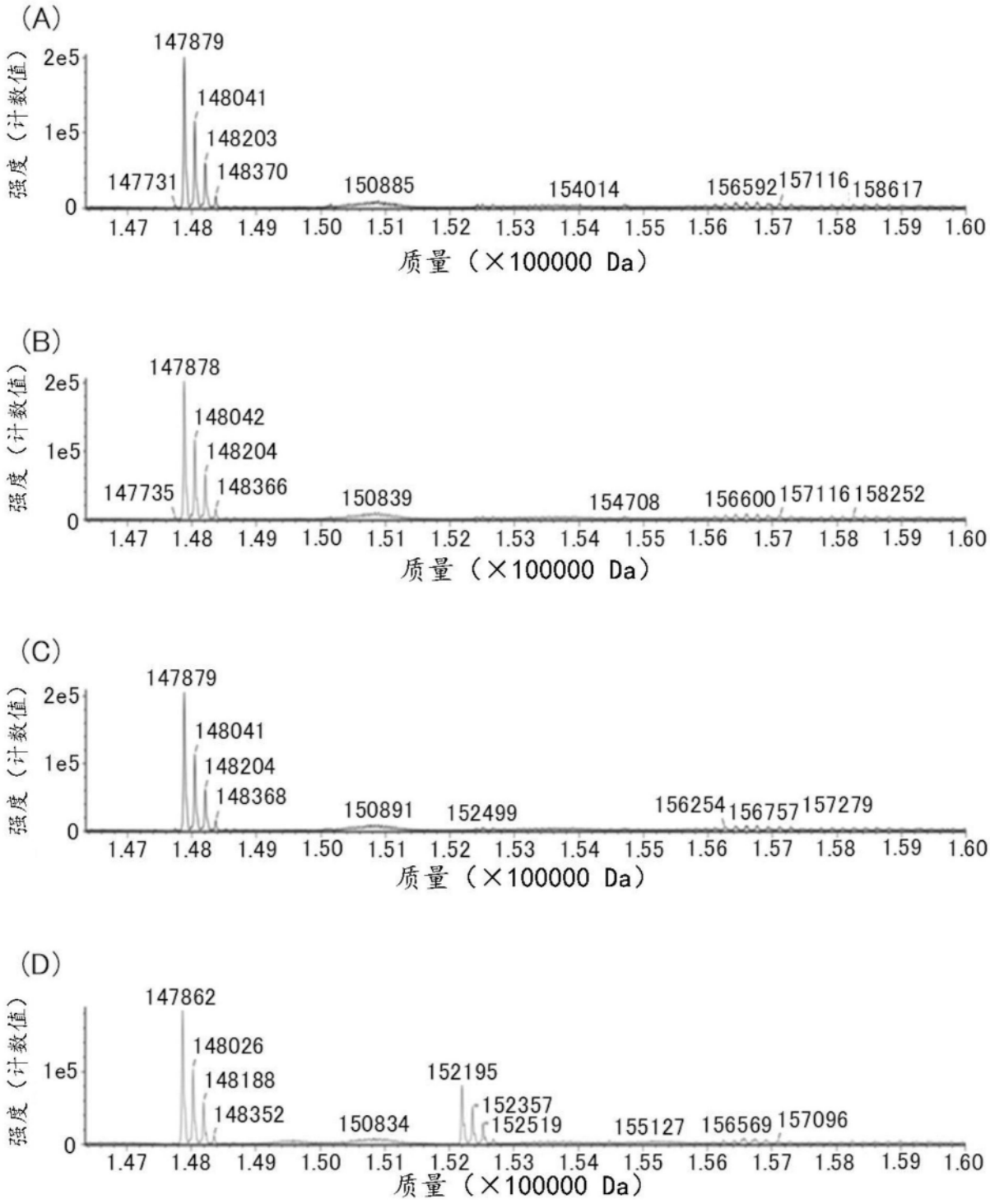

(A)
强度（计数值）
2e5
1e5
0
147879
148041
148203
148370
147731
150885
154014
156592
157116
158617
1.47 1.48 1.49 1.50 1.51 1.52 1.53 1.54 1.55 1.56 1.57 1.58 1.59 1.60
质量（×100000 Da）
(B)
强度（计数值）
2e5
1e5
0
147878
148042
148204
148366
147735
150839
154708
156600
157116
158252
1.47 1.48 1.49 1.50 1.51 1.52 1.53 1.54 1.55 1.56 1.57 1.58 1.59 1.60
质量（×100000 Da）
(C)
强度（计数值）
2e5
1e5
0
147879
148041
148204
148368
150891
152499
156254
156757
157279
1.47 1.48 1.49 1.50 1.51 1.52 1.53 1.54 1.55 1.56 1.57 1.58 1.59 1.60
质量（×100000 Da）
(D)
强度（计数值）
1e5
0
147862
148026
148188
148352
150834
152195
152357
152519
155127
156569
157096
1.47 1.48 1.49 1.50 1.51 1.52 1.53 1.54 1.55 1.56 1.57 1.58 1.59 1.60
质量（×100000 Da）

图4

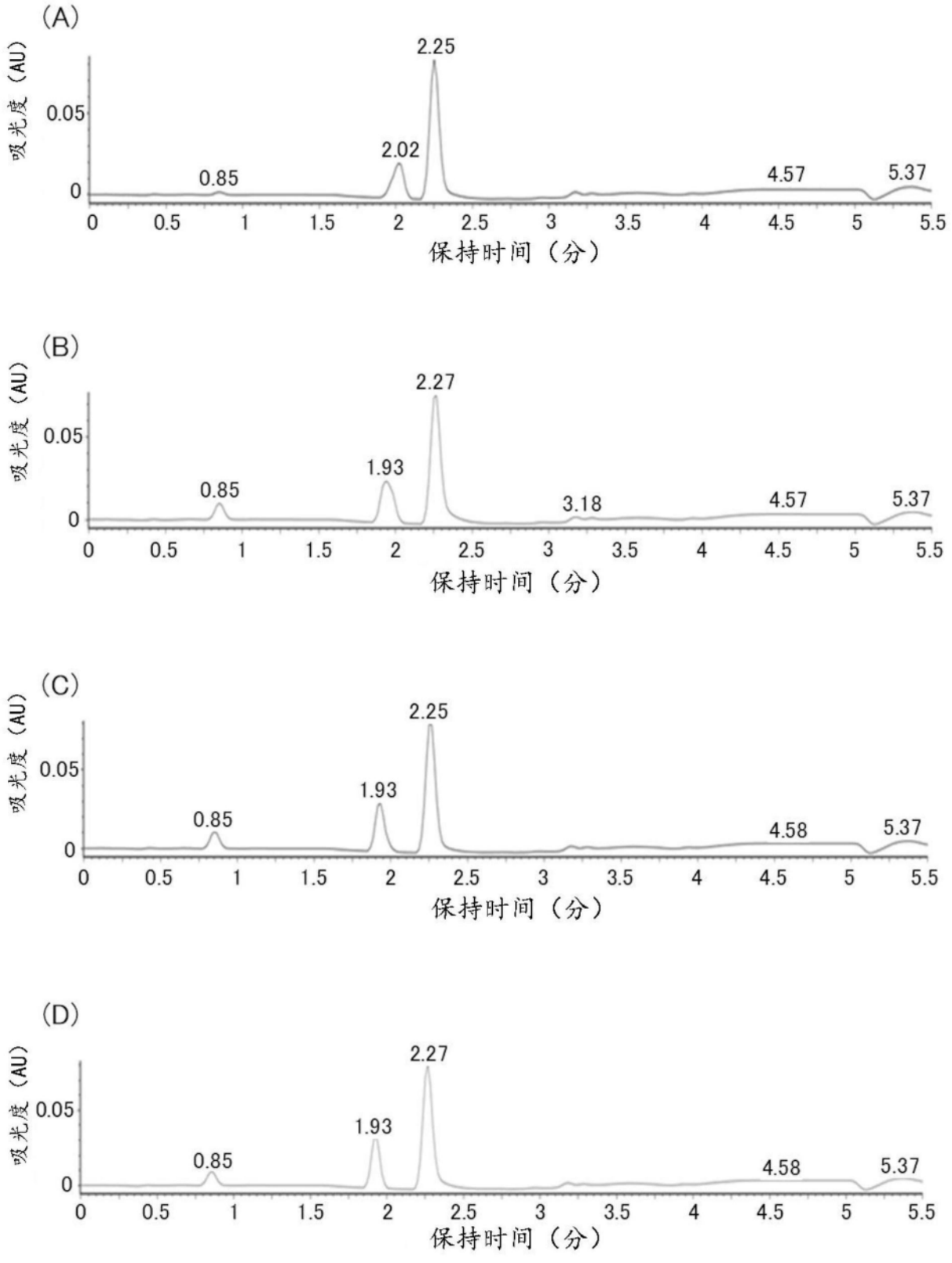

(A)
吸光度（AU）
0.05
0
2.25
2.02
0.85
4.57
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
保持时间（分）
(B)
吸光度（AU）
0.05
0
2.27
1.93
0.85
3.18
4.57
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
保持时间（分）
(C)
吸光度（AU）
0.05
0
2.25
1.93
0.85
4.58
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
保持时间（分）
(D)
吸光度（AU）
0.05
0
2.27
1.93
0.85
4.58
5.37
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
保持时间（分）

图5

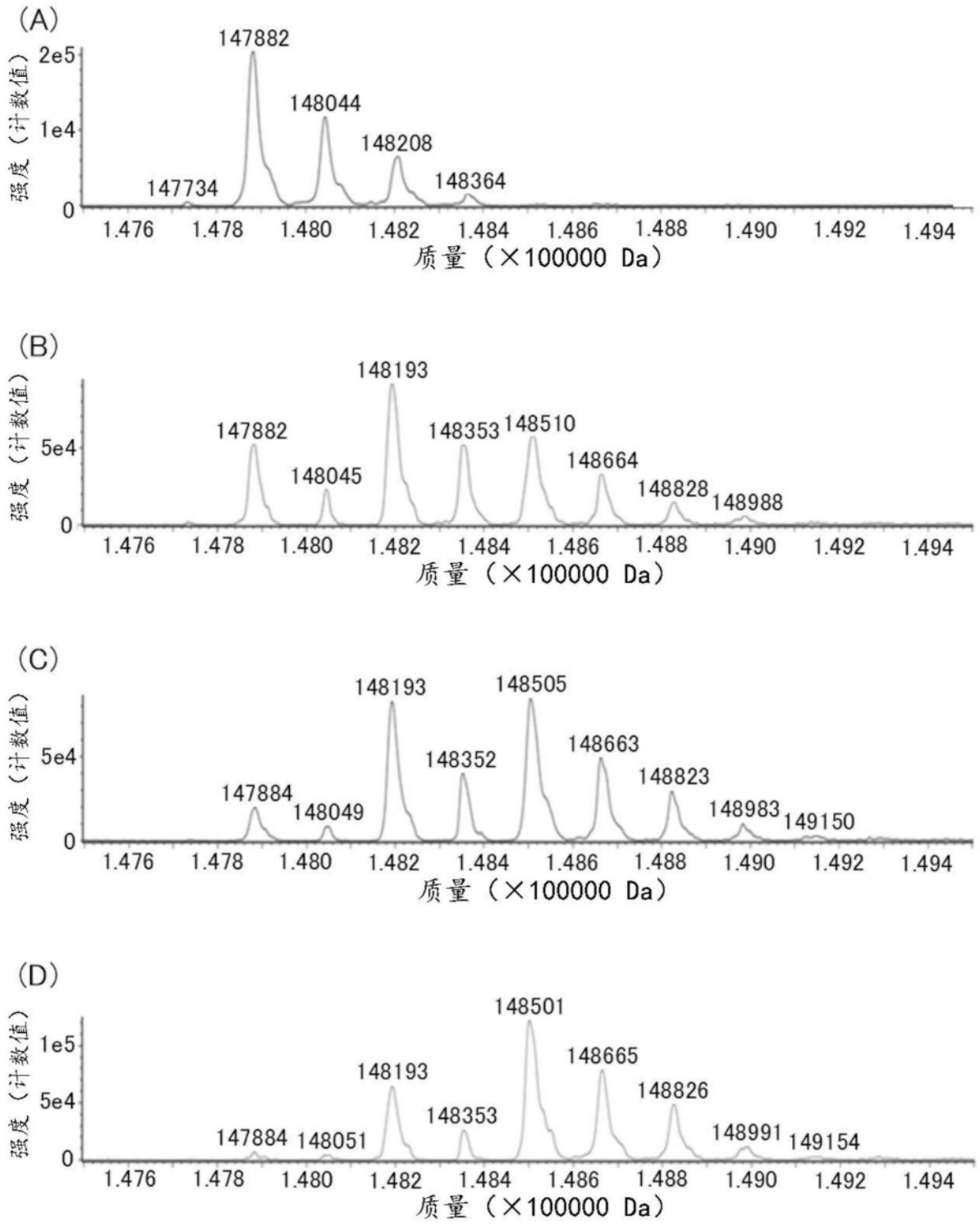

(A)
强度（计数值）
2e5
1e4
0
147882
148044
148208
147734
148364
1.476
1.478
1.480
1.482
1.484
1.486
1.488
1.490
1.492
1.494
质量（×100000 Da）
(B)
强度（计数值）
5e4
0
148193
147882
148353
148510
148664
148045
148828
148988
质量（×100000 Da）
(C)
强度（计数值）
5e4
0
148193
148505
148663
148352
148823
147884
148049
148983
149150
质量（×100000 Da）
(D)
强度（计数值）
1e5
5e4
0
148501
148665
148193
148826
148353
147884
148051
148991
149154
质量（×100000 Da）

图6

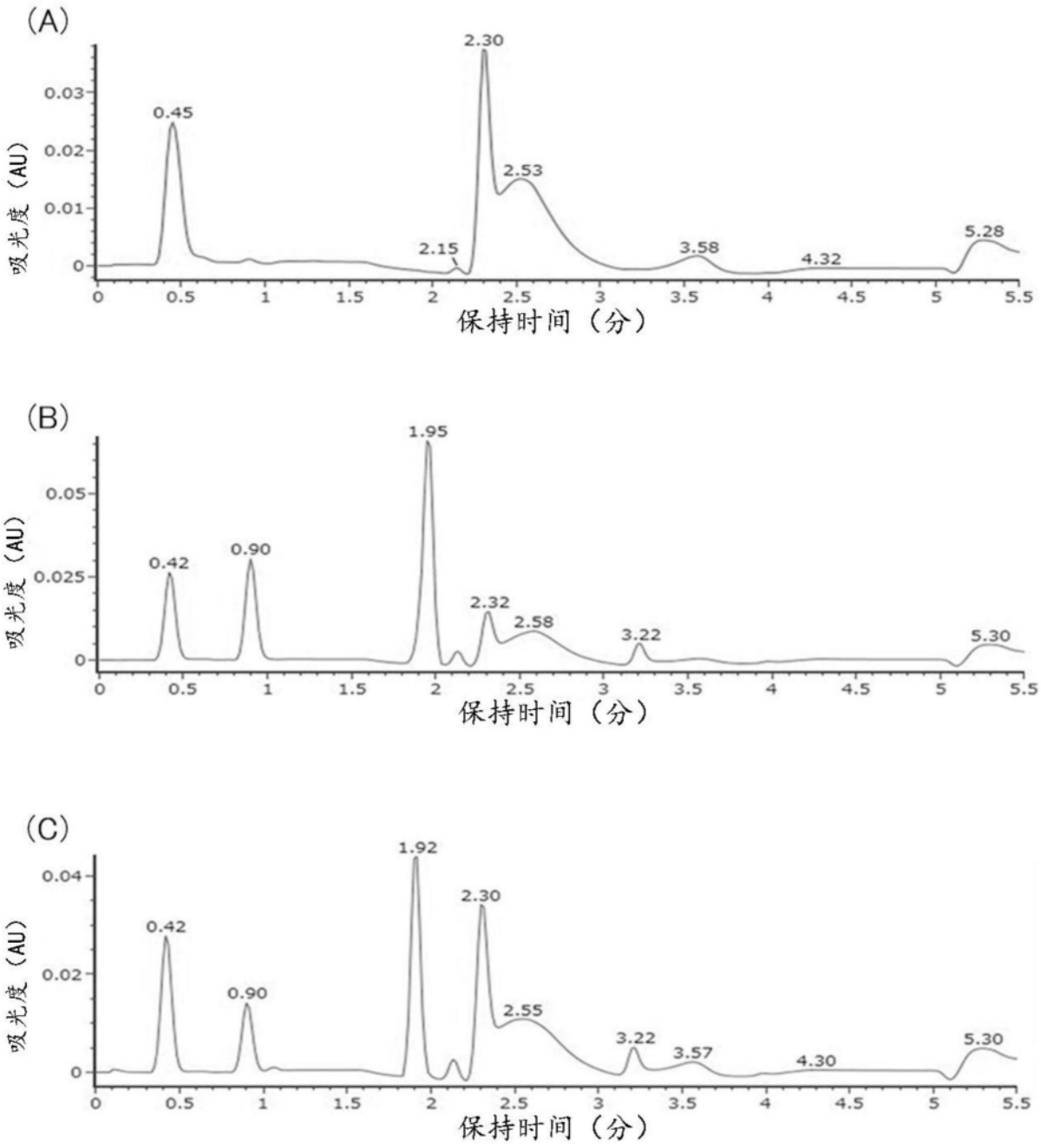

(A)
吸光度（AU）
保持时间（分）
0.45
2.15
2.30
2.53
3.58
4.32
5.28
(B)
吸光度（AU）
保持时间（分）
0.42
0.90
1.95
2.32
2.58
3.22
5.30
(C)
吸光度（AU）
保持时间（分）
0.42
0.90
1.92
2.30
2.55
3.22
3.57
4.30
5.30

图7

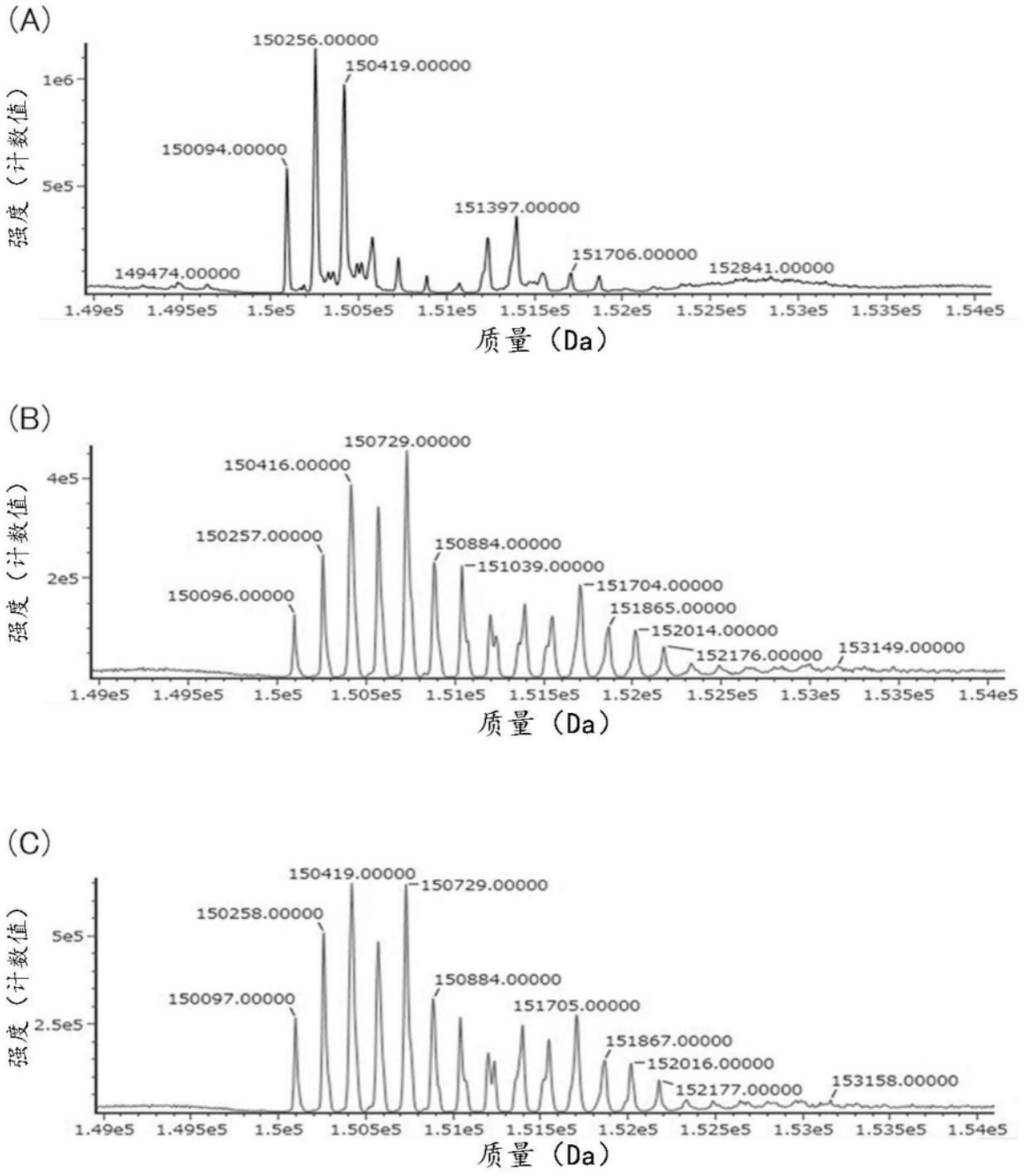

(A)
150256.00000
150419.00000
150094.00000
151397.00000
151706.00000
152841.00000
149474.00000
强度（计数值）
1e6
5e5
1.49e5 1.495e5 1.5e5 1.505e5 1.51e5 1.515e5 1.52e5 1.525e5 1.53e5 1.535e5 1.54e5
质量（Da）
(B)
150729.00000
150416.00000
150257.00000
150884.00000
151039.00000
151704.00000
150096.00000
151865.00000
152014.00000
152176.00000
153149.00000
强度（计数值）
4e5
2e5
1.49e5 1.495e5 1.5e5 1.505e5 1.51e5 1.515e5 1.52e5 1.525e5 1.53e5 1.535e5 1.54e5
质量（Da）
(C)
150419.00000
150729.00000
150258.00000
150884.00000
150097.00000
151705.00000
151867.00000
152016.00000
152177.00000
153158.00000
强度（计数值）
5e5
2.5e5
1.49e5 1.495e5 1.5e5 1.505e5 1.51e5 1.515e5 1.52e5 1.525e5 1.53e5 1.535e5 1.54e5
质量（Da）

图8

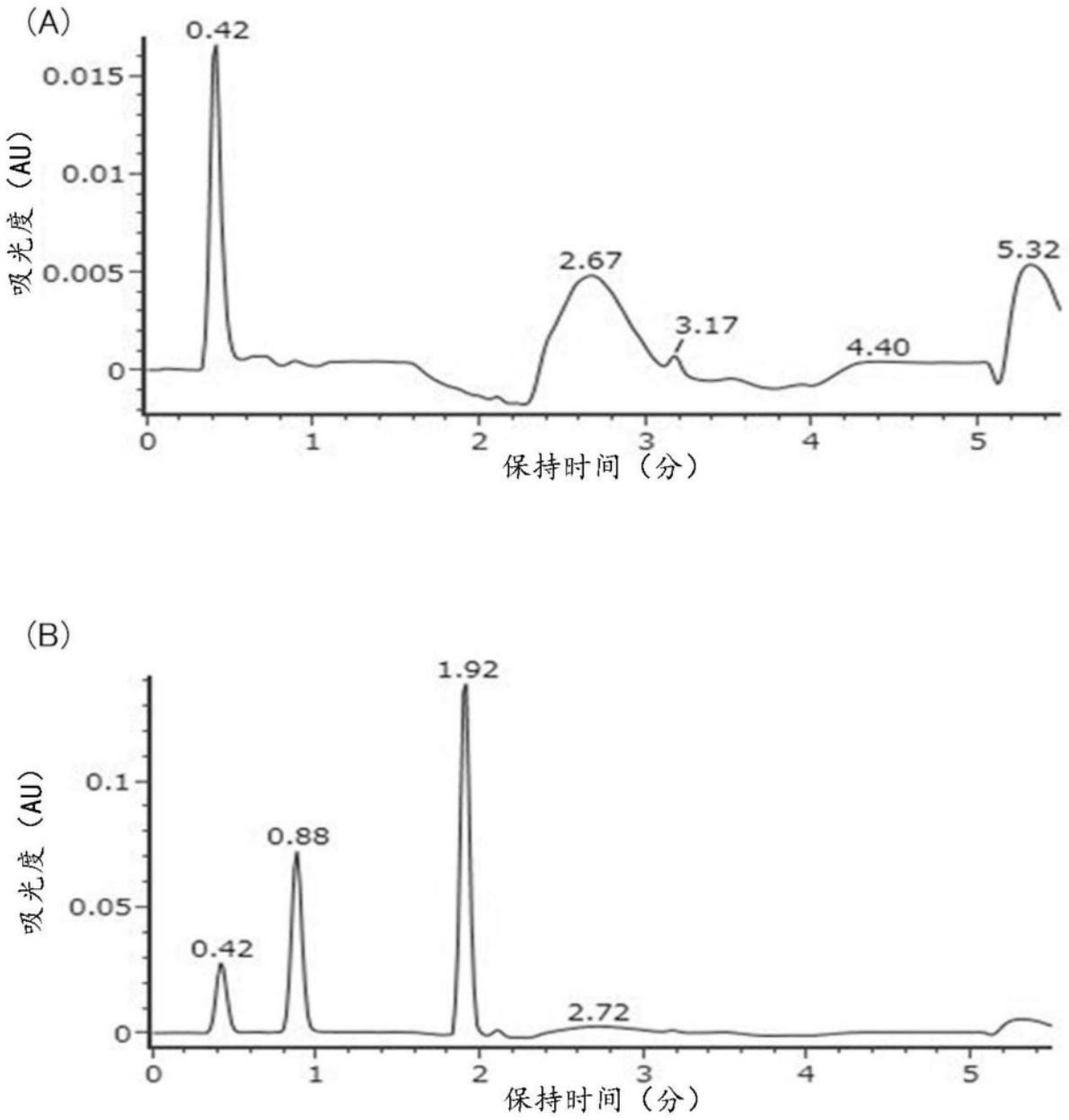

(A)
0.42
0.015
0.01
0.005
0
吸光度（AU）
2.67
3.17
4.40
5.32
0
1
2
3
4
5
保持时间（分）
(B)
1.92
0.1
0.05
0
吸光度（AU）
0.88
0.42
2.72
0
1
2
3
4
5
保持时间（分）

图9

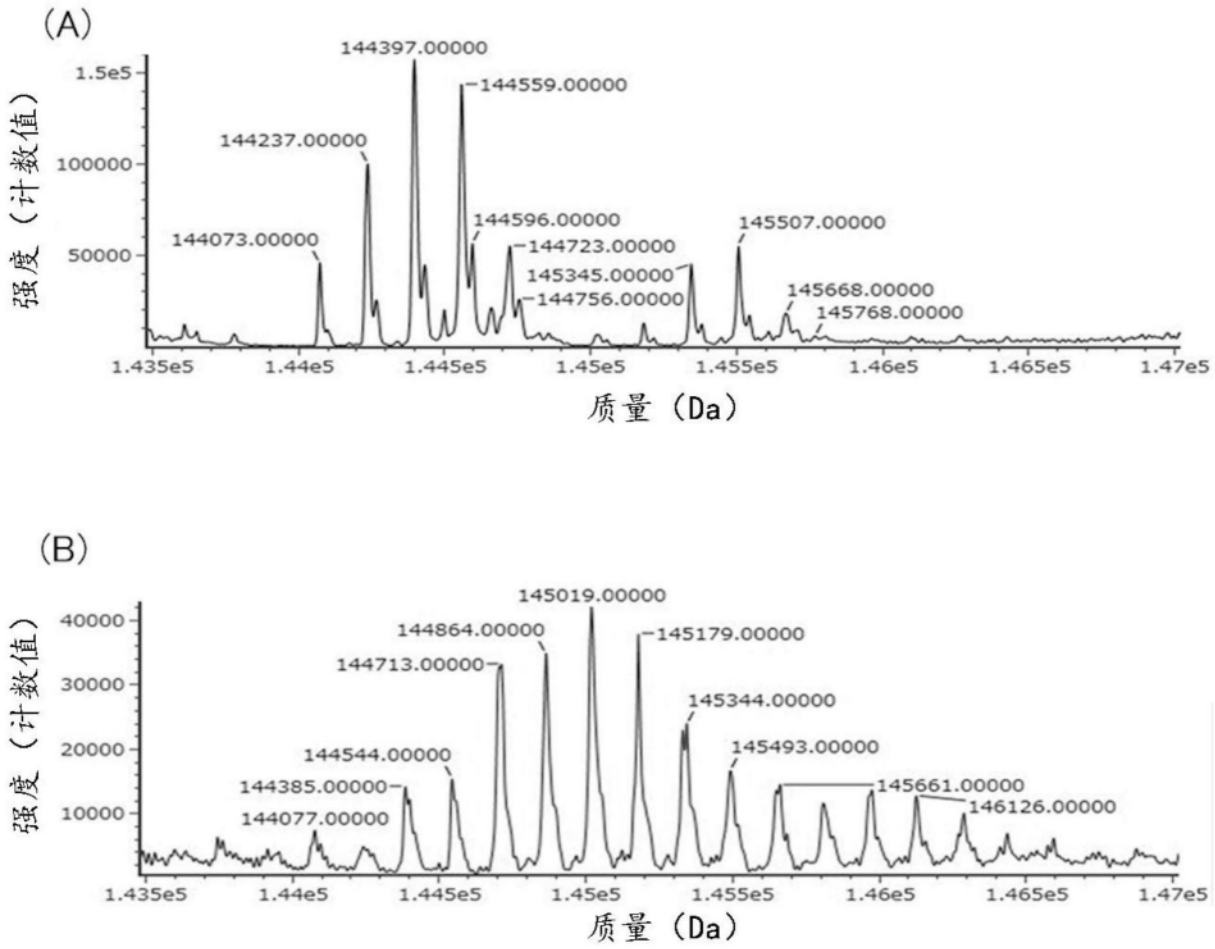

(A)
144397.00000
144559.00000
144237.00000
144596.00000
144073.00000
144723.00000
145345.00000
144756.00000
145507.00000
145668.00000
145768.00000
1.5e5
100000
50000
强度（计数值）
1.435e5
1.44e5
1.445e5
1.45e5
1.455e5
1.46e5
1.465e5
1.47e5
质量（Da）
(B)
145019.00000
144864.00000
145179.00000
144713.00000
145344.00000
145493.00000
144544.00000
145661.00000
144385.00000
146126.00000
144077.00000
40000
30000
20000
10000
强度（计数值）
1.435e5
1.44e5
1.445e5
1.45e5
1.455e5
1.46e5
1.465e5
1.47e5
质量（Da）

图10

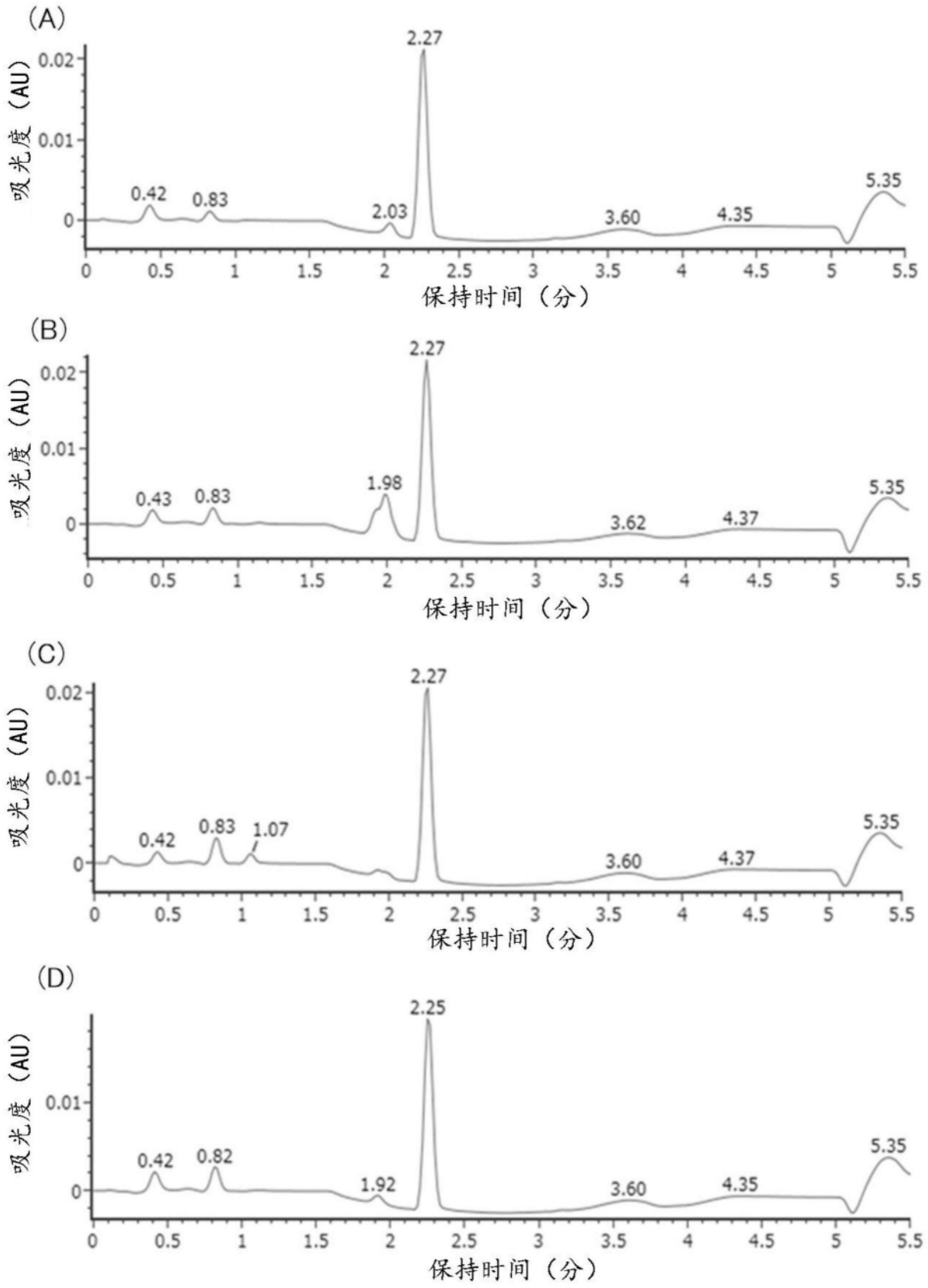

(A)
吸光度（AU）
0.02
0.01
0
2.27
0.42
0.83
2.03
3.60
4.35
5.35
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
保持时间（分）
(B)
吸光度（AU）
0.02
0.01
0
2.27
0.43
0.83
1.98
3.62
4.37
5.35
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
保持时间（分）
(C)
吸光度（AU）
0.02
0.01
0
2.27
0.42
0.83
1.07
3.60
4.37
5.35
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
保持时间（分）
(D)
吸光度（AU）
0.01
0
2.25
0.42
0.82
1.92
3.60
4.35
5.35
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5
保持时间（分）

图11

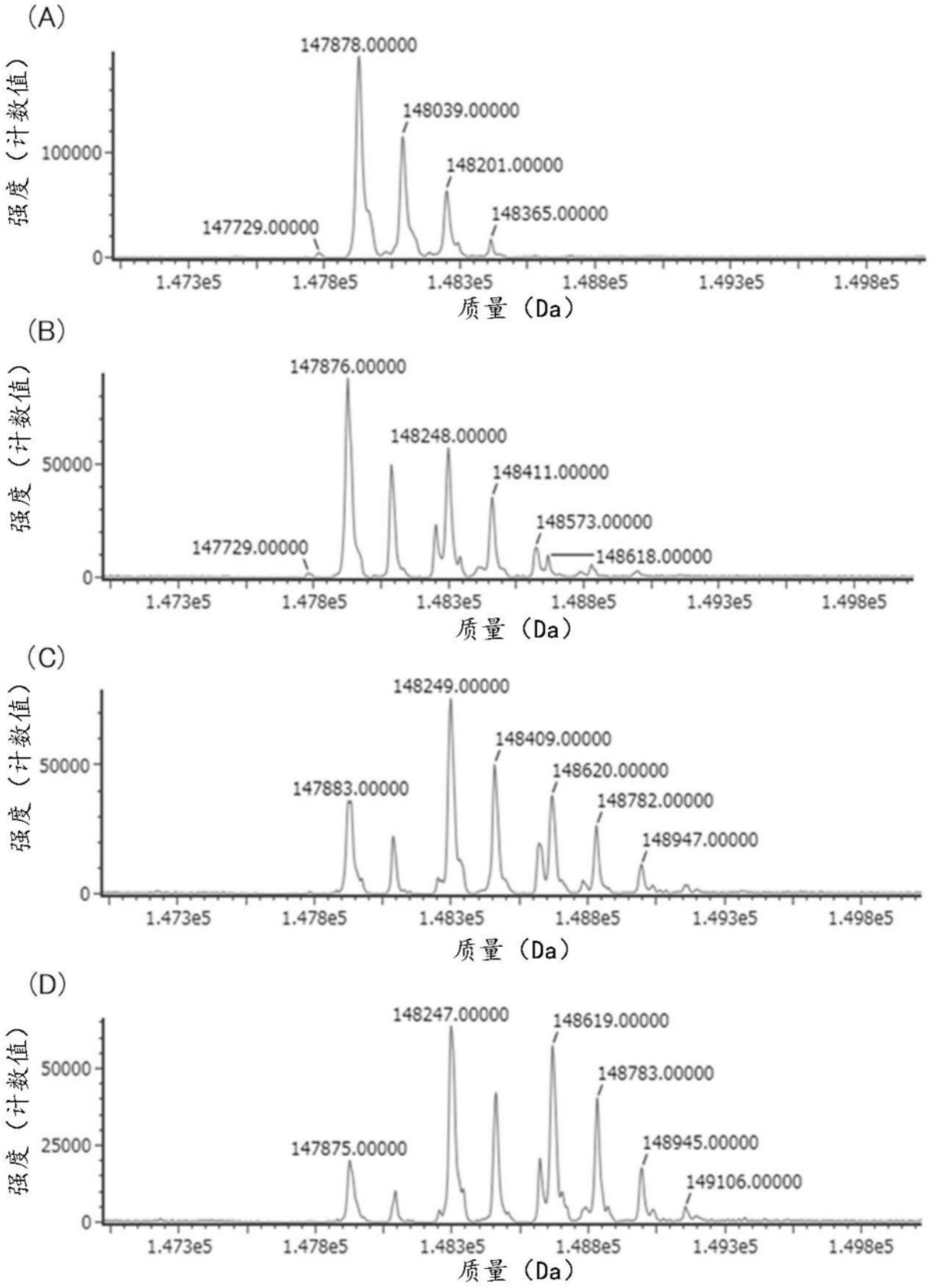

(A)
147878.00000
148039.00000
148201.00000
148365.00000
147729.00000
强度（计数值）
100000
0
1.473e5
1.478e5
1.483e5
1.488e5
1.493e5
1.498e5
质量（Da）
(B)
147876.00000
148248.00000
148411.00000
148573.00000
148618.00000
147729.00000
强度（计数值）
50000
0
1.473e5
1.478e5
1.483e5
1.488e5
1.493e5
1.498e5
质量（Da）
(C)
148249.00000
148409.00000
148620.00000
148782.00000
148947.00000
147883.00000
强度（计数值）
50000
0
1.473e5
1.478e5
1.483e5
1.488e5
1.493e5
1.498e5
质量（Da）
(D)
148247.00000
148619.00000
148783.00000
148945.00000
149106.00000
147875.00000
强度（计数值）
50000
25000
0
1.473e5
1.478e5
1.483e5
1.488e5
1.493e5
1.498e5
质量（Da）

图12

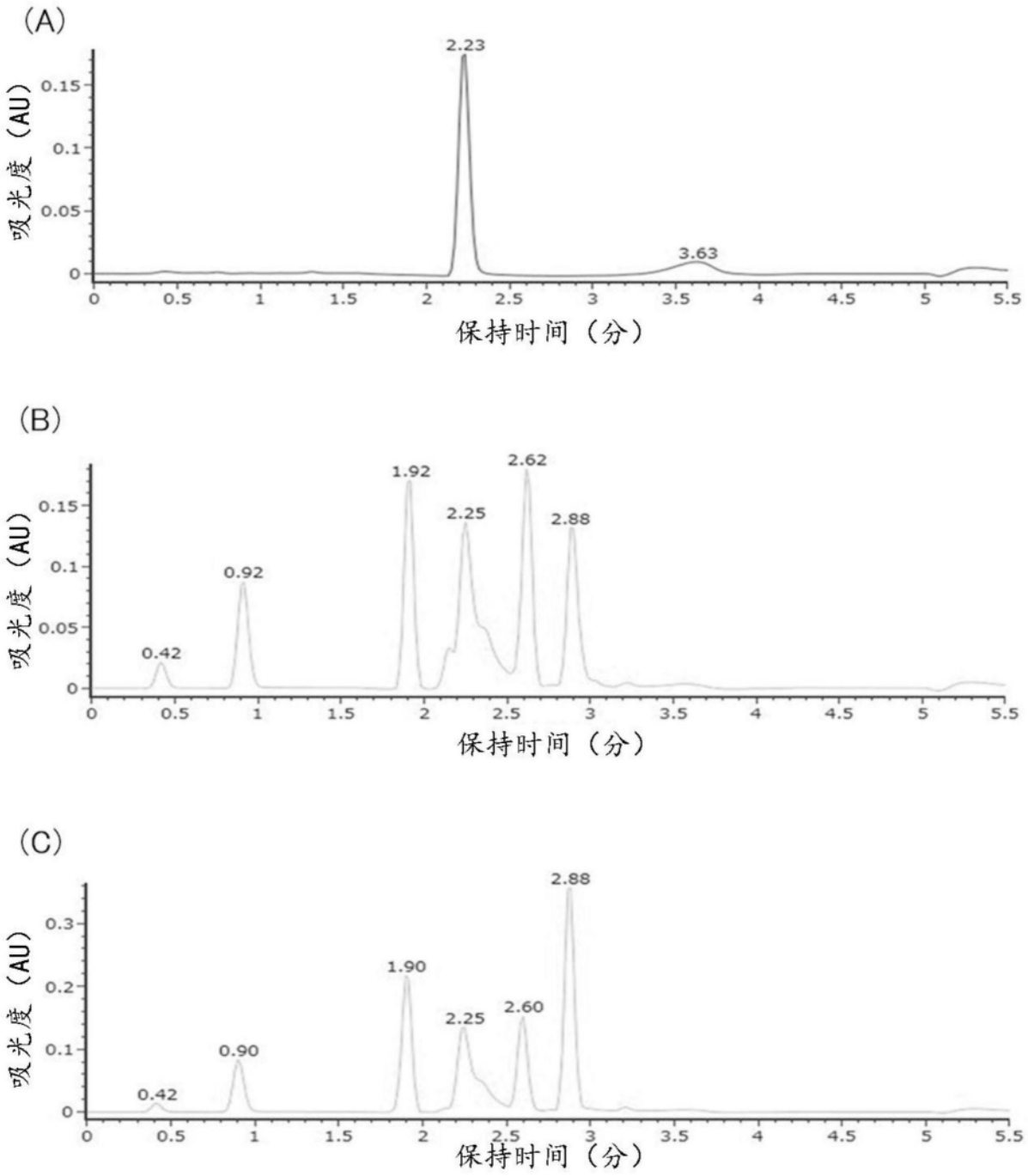

(A)
2.23
3.63
吸光度（AU）
保持时间（分）
(B)
0.42
0.92
1.92
2.25
2.62
2.88
吸光度（AU）
保持时间（分）
(C)
0.42
0.90
1.90
2.25
2.60
2.88
吸光度（AU）
保持时间（分）

图13

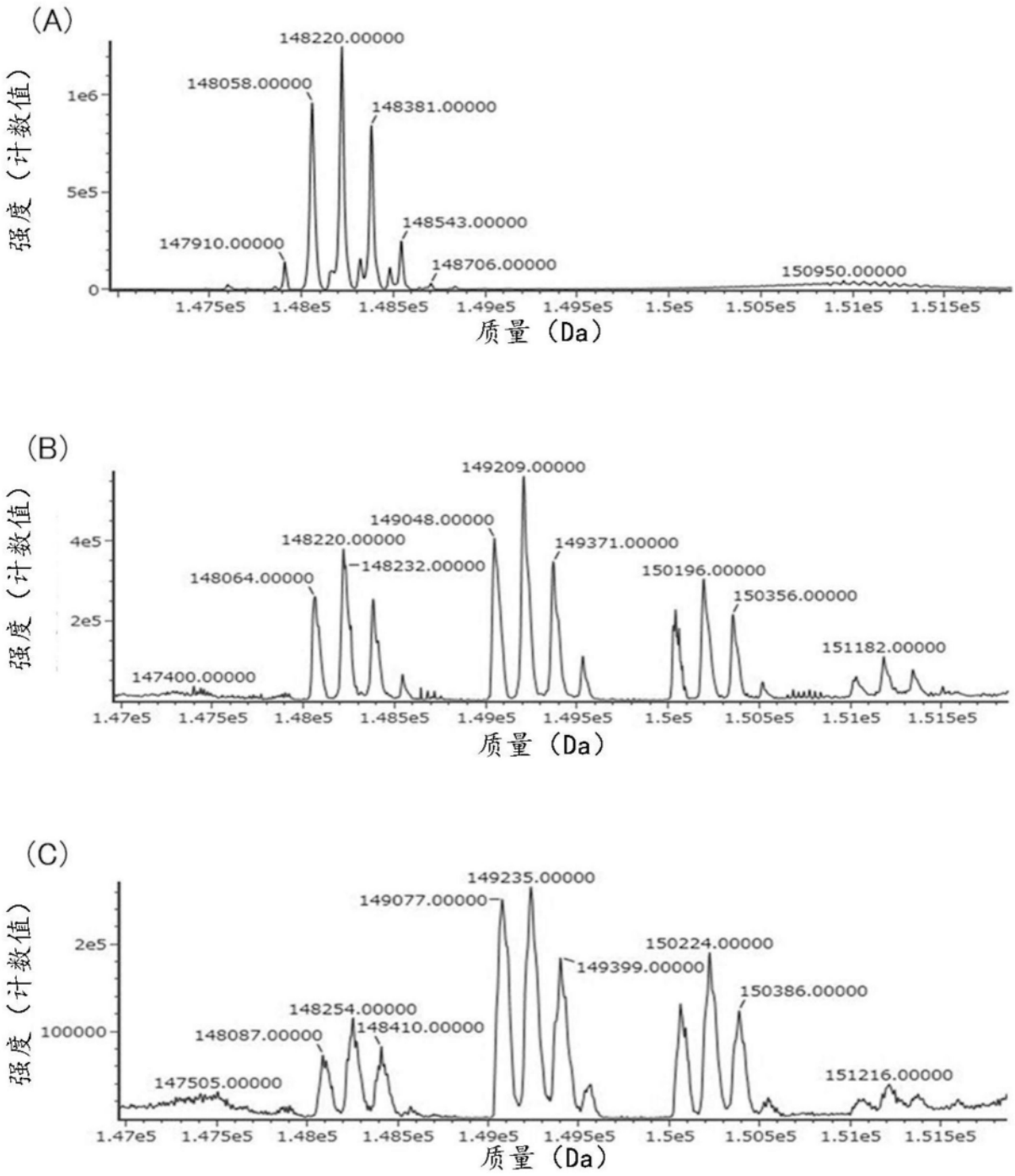

(A)
强度（计数值）
1e6
5e5
0
148220.00000
148058.00000
148381.00000
148543.00000
147910.00000
148706.00000
150950.00000
1.475e5
1.48e5
1.485e5
1.49e5
1.495e5
1.5e5
1.505e5
1.51e5
1.515e5
质量（Da）
(B)
强度（计数值）
4e5
2e5
149209.00000
149048.00000
148220.00000
148232.00000
149371.00000
148064.00000
150196.00000
150356.00000
151182.00000
147400.00000
1.47e5
1.475e5
1.48e5
1.485e5
1.49e5
1.495e5
1.5e5
1.505e5
1.51e5
1.515e5
质量（Da）
(C)
强度（计数值）
2e5
100000
149235.00000
149077.00000
150224.00000
149399.00000
150386.00000
148254.00000
148410.00000
148087.00000
151216.00000
147505.00000
1.47e5
1.475e5
1.48e5
1.485e5
1.49e5
1.495e5
1.5e5
1.505e5
1.51e5
1.515e5
质量（Da）

图14

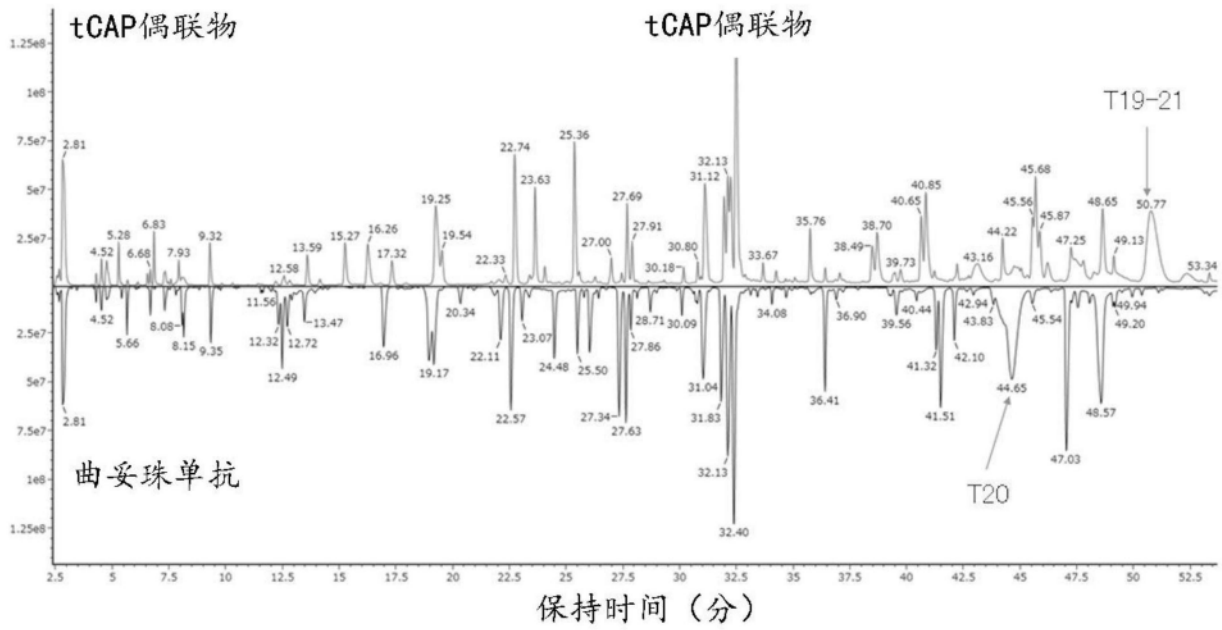

tCAP偶联物
tCAP偶联物
T19-21
曲妥珠单抗
T20
保持时间（分）

图15

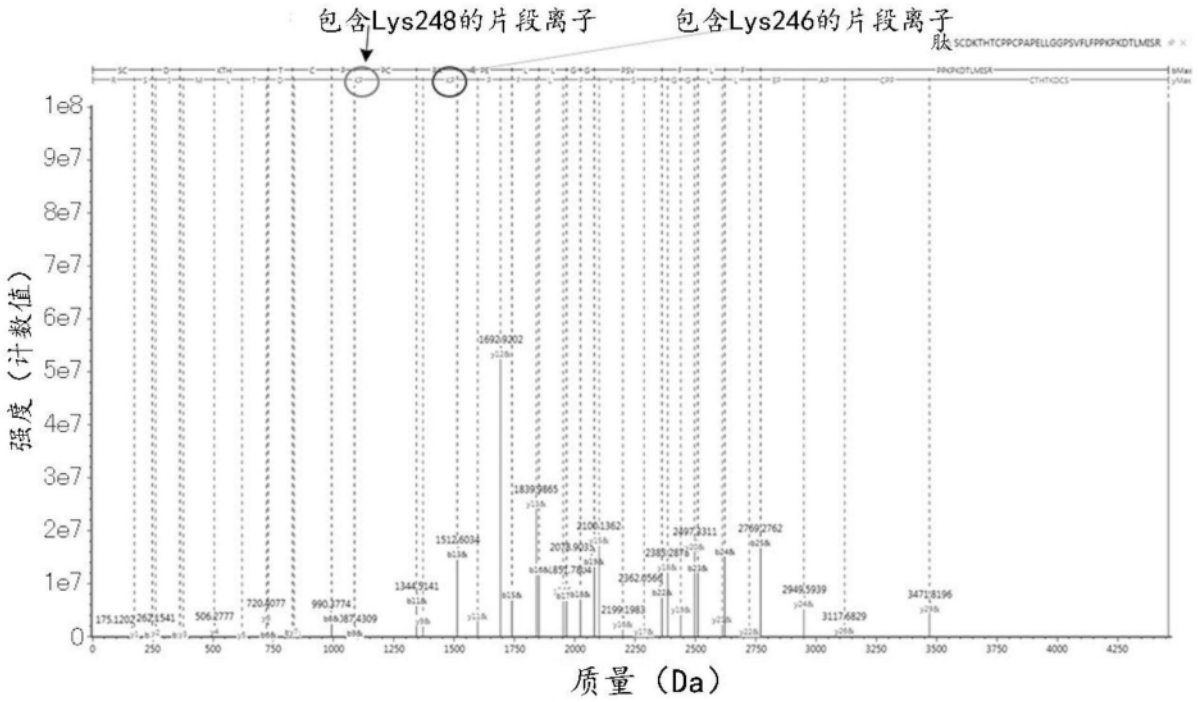

包含Lys248的片段离子
包含Lys246的片段离子
肽
强度（计数值）
质量（Da）

图16

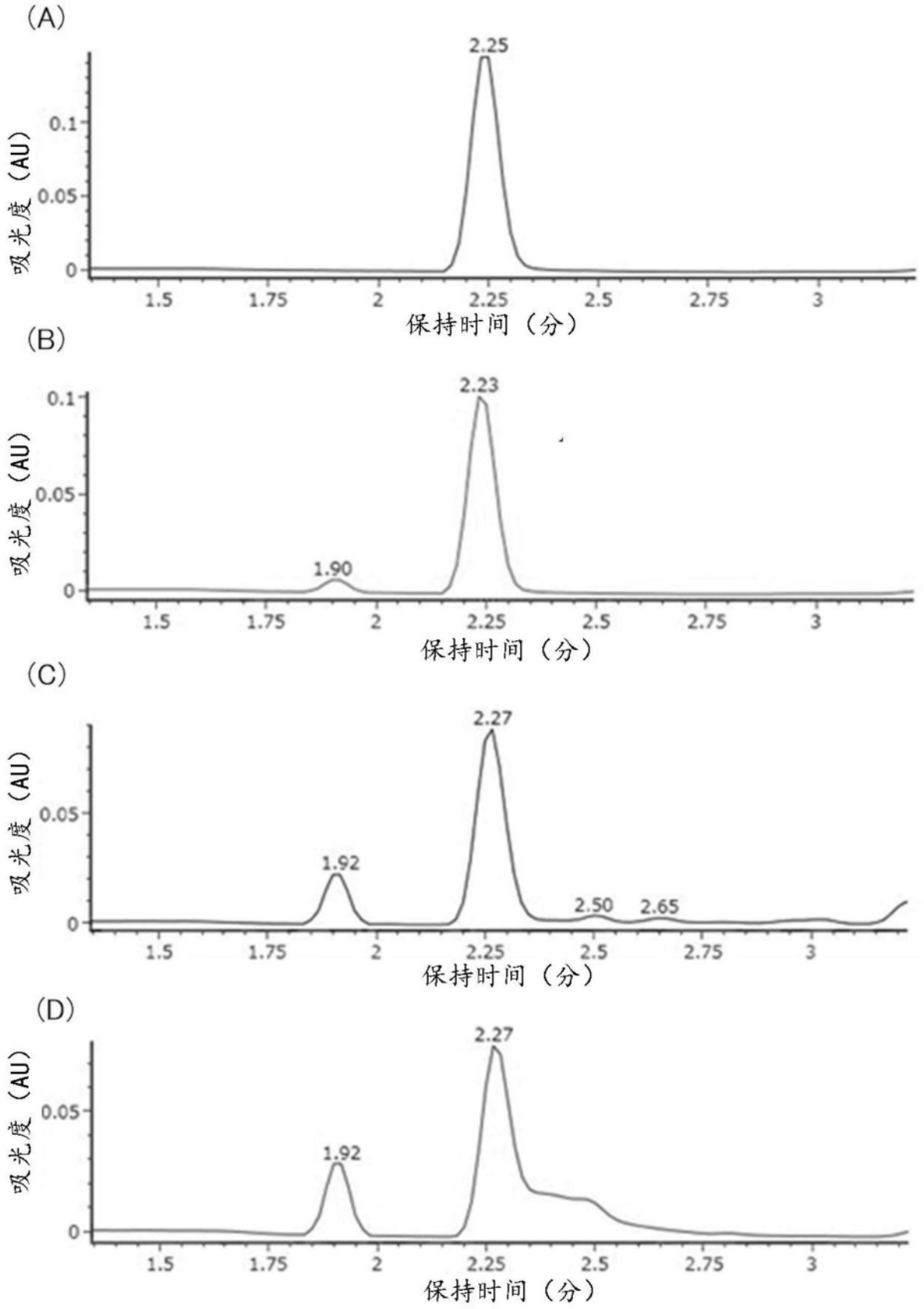

(A)
2.25
0.1
0.05
0
吸光度（AU）
1.5
1.75
2
2.25
2.5
2.75
3
保持时间（分）
(B)
2.23
0.1
0.05
1.90
0
吸光度（AU）
1.5
1.75
2
2.25
2.5
2.75
3
保持时间（分）
(C)
2.27
0.05
1.92
2.50
2.65
0
吸光度（AU）
1.5
1.75
2
2.25
2.5
2.75
3
保持时间（分）
(D)
2.27
0.05
1.92
0
吸光度（AU）
1.5
1.75
2
2.25
2.5
2.75
3
保持时间（分）

图17

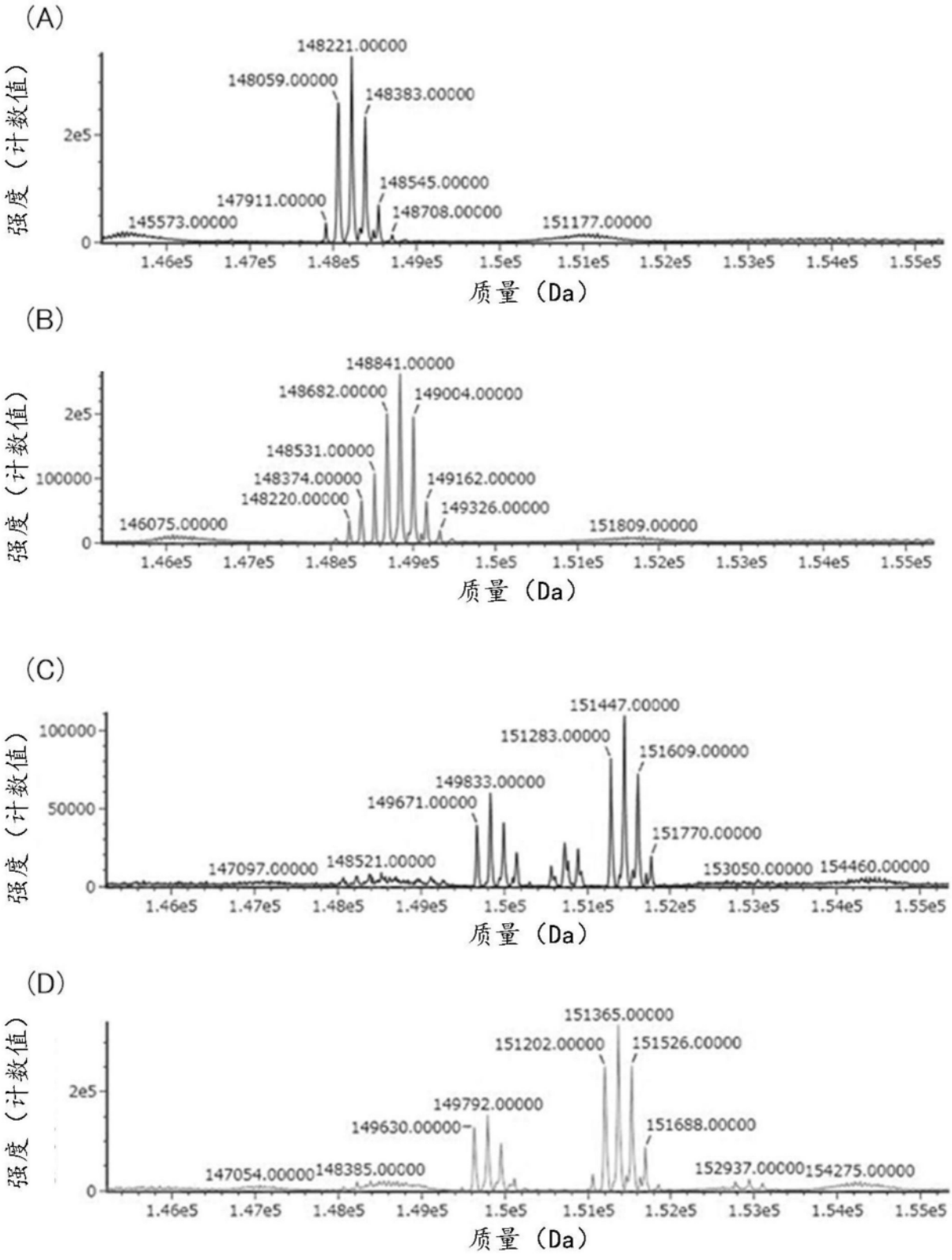

(A)
148221.00000
148059.00000
148383.00000
148545.00000
147911.00000
148708.00000
145573.00000
151177.00000
强度（计数值）
质量（Da）
(B)
148841.00000
149682.00000
149004.00000
148531.00000
148374.00000
149162.00000
148220.00000
149326.00000
146075.00000
151809.00000
强度（计数值）
质量（Da）
(C)
151447.00000
151283.00000
151609.00000
149833.00000
149671.00000
151770.00000
147097.00000
148521.00000
153050.00000
154460.00000
强度（计数值）
质量（Da）
(D)
151365.00000
151202.00000
151526.00000
149792.00000
149630.00000
151688.00000
147054.00000
148385.00000
152937.00000
154275.00000
强度（计数值）
质量（Da）

图18