

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7687350号
(P7687350)

(45)発行日 令和7年6月3日(2025.6.3)

(24)登録日 令和7年5月26日(2025.5.26)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/00	Z N A
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 0 7 C 327/22 (2006.01)	C 0 7 C 327/22	
C 0 7 C 327/26 (2006.01)	C 0 7 C 327/26	C S P
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
請求項の数 8 (全82頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-575662(P2022-575662)	(73)特許権者	000000066
(86)(22)出願日	令和4年1月17日(2022.1.17)		味の素株式会社
(86)国際出願番号	PCT/JP2022/001358		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(87)国際公開番号	WO2022/154116	(74)代理人	110002860
(87)国際公開日	令和4年7月21日(2022.7.21)		弁理士法人秀和特許事務所
審査請求日	令和7年1月17日(2025.1.17)	(72)発明者	畑田 紀子
(31)優先権主張番号	特願2021-5762(P2021-5762)		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
(32)優先日	令和3年1月18日(2021.1.18)	(72)発明者	山田 慧
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
早期審査対象出願		(72)発明者	松田 豊
			神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
		(72)発明者	藤井 友博
			最終頁に続く

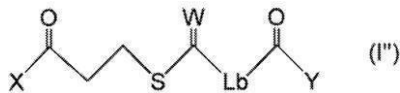
(54)【発明の名称】 化合物またはその塩、およびそれらにより得られる抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式（I'）：

【化1】



〔式中、

Xは、以下から選ばれる脱離基：

（a）R-S（ここで、Rは、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示し、Sは、硫黄原子を示す。）；

（b）R-O（ここで、Rは、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示し、Oは、酸素原子を示す。）；または

（d）ハロゲン原子、

を示し、

Yは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むヒトIgGにおけるCH2ドメインに結合領域を有する、以下からなる群より選ばれる親和性ペプチド：

（A）CQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC（配列番号1）

のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(a) FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(b) FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKEDC (配列番号 3) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(c) FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC (配列番号 4) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(d) NMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC (配列番号 5) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(e) MQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC (配列番号 6) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；および

(f) QCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC (配列番号 7) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド、

を示し、

前記親和性ペプチドは、前記親和性ペプチドにおける N 末端および C 末端アミノ酸残基が、保護されていてもよく、かつ

前記親和性ペプチドにおける 2 つのシステイン残基 (C) の側鎖中の 2 つのチオール基が、ジスルフィド結合により、またはリンカーを介して連結されていてもよく、

前記親和性ペプチドのリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Y に隣接するカルボニル基 (C=O) とアミド結合を形成し、

O は、酸素原子を示し、

S は、硫黄原子を示し、

W は、酸素原子または硫黄原子を示し、

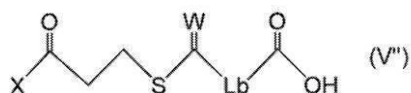
Lb は、第 2 リンカーを示し、

第 2 リンカーにおける主鎖を構成する原子数が、3 ～ 5 個である。) で表される化合物またはその塩。

【請求項 2】

下記式 (V'') :

【化 2】



〔式中、

X は、脱離基を示し、

O は、酸素原子を示し、

OH は、ヒドロキシ基を示し、

S は、硫黄原子を示し、

W は、酸素原子または硫黄原子を示し、

Lb は、第 2 リンカーを示し、

第 2 リンカーにおける主鎖を構成する原子数が、3 ～ 5 個である。) で表される化合物またはその塩。

【請求項 3】

前記式 (V'') で表される化合物が、下記式 (V''-1) または (V''-2) :

10

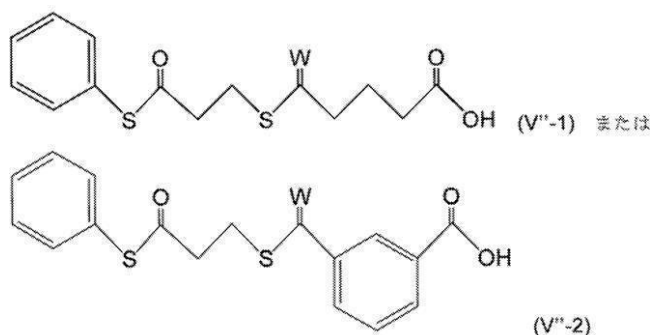
20

30

40

50

【化 3】



10

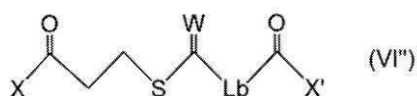
〔式中、

O、OH、SおよびWは、前記式（V'）のものと同一である。〕で表される、請求項2記載の化合物またはその塩。

【請求項 4】

下記式（VI'）：

【化 4】



20

〔式中、

Xは、脱離基を示し、

X'は、ペンタフルオロフェニルオキシ基、テトラフルオロフェニルオキシ基、パラニトロフェニルオキシ基、またはN-スクシンイミジルオキシ基を示し、

Oは、酸素原子を示し、

Sは、硫黄原子を示し、

Wは、酸素原子または硫黄原子を示し、

Lbは、第2リンカーを示し、

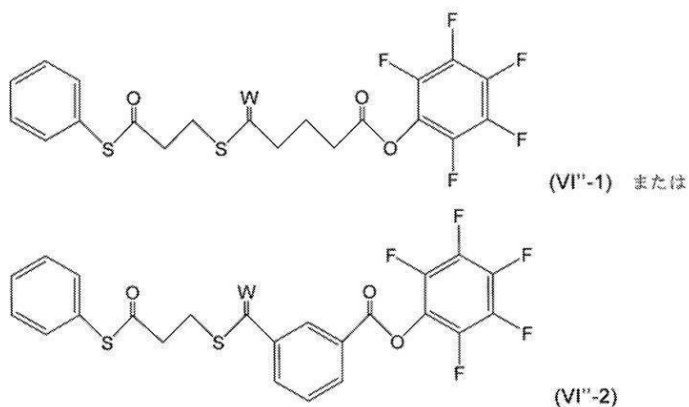
第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数が、3～5個である。〕で表される化合物またはその塩。

30

【請求項 5】

前記式（VI'）で表される化合物が、下記式（VI'-1）または（VI'-2）：

【化 5】



40

〔式中、

O、SおよびWは、前記式（VI'）のものと同一であり、

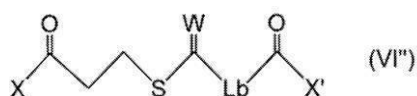
Fは、フッ素原子である。〕で表される、請求項4記載の化合物またはその塩。

【請求項 6】

50

下記式 (VI'') :

【化 6】



〔式中、

X は、脱離基を示し、

X' は、ペンタフルオロフェニルオキシ基、テトラフルオロフェニルオキシ基、パラニトロフェニルオキシ基、またはN-スクシンイミジルオキシ基を示し、

O は、酸素原子を示し、

S は、硫黄原子を示し、

W は、酸素原子または硫黄原子を示し、

Lb は、第 2 リンカーを示し、

第 2 リンカーにおける主鎖を構成する原子数が、3～5 個である。〕で表される化合物またはその塩を、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むヒト IgG における CH2 ドメインに結合領域を有する、以下からなる群より選ばれる親和性ペプチド：

(A) CQRRFYEA LHD PNLN EEQ RNAR I R S I K D D C (配列番号 1) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(a) FNMQCQRRFYEA LHD PNLN EEQ RNAR I R S I K D D C (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(b) FNMQCQRRFYEA LHD PNLN EEQ RNAR I R S I K E D C (配列番号 3) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(c) FNMQCQRRFYEA LHD PNLN EEQ RNAR I R S I K E E C (配列番号 4) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(d) NMQCQRRFYEA LHD PNLN EEQ RNAR I R S I K E E C (配列番号 5) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(e) MQCQRRFYEA LHD PNLN EEQ RNAR I R S I K E E C (配列番号 6) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；および

(f) QCQRRFYEA LHD PNLN EEQ RNAR I R S I K E E C (配列番号 7) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド、

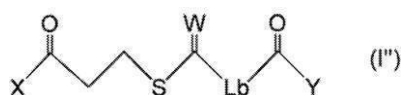
であって、

前記親和性ペプチドは、前記親和性ペプチドにおける N 末端および C 末端アミノ酸残基が、保護されていてもよく、かつ

前記親和性ペプチドにおける 2 つのシステイン残基 (C) の側鎖中の 2 つのチオール基が、ジスルフィド結合により、またはリンカーを介して連結されていてもよい、親和性ペプチドの リジン残基の側鎖中のアミノ基 と反応させて、

下記式 (I'') :

【化 7】



〔式中、

X、O、S、W、および Lb は前記式 (VI'') のものと同じであり、

Y は、前記親和性ペプチドを示す。〕で表される化合物またはその塩を生成することを、式 (I'') で表される化合物またはその塩の製造方法。

【請求項 7】

(1') 下記式 (V'') :

10

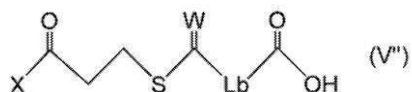
20

30

40

50

【化 8】



〔式中、

X は、脱離基を示し、

O は、酸素原子を示し、

OH は、ヒドロキシ基を示し、

S は、硫黄原子を示し、

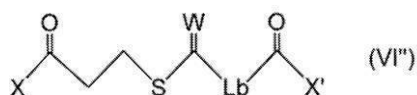
W は、酸素原子または硫黄原子を示し、

L b は、第 2 リンカーを示し、

第 2 リンカーにおける主鎖を構成する原子数が、3～5 個である。〕で表される化合物
またはその塩を、カルボキシル基修飾試薬と反応させて、

下記式 (V I'') :

【化 9】



〔式中、

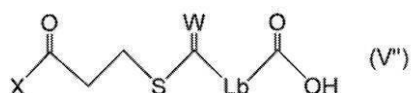
X、O、S、W、および L b は、前記式 (V') のものと同じであり、

X' は、ペンタフルオロフェニルオキシ基、テトラフルオロフェニルオキシ基、パラニトロ
フェニルオキシ基、または N-スクシンイミジルオキシ基を示す。〕で表される化合物
またはその塩を生成することをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

下記式 (V') :

【化 10】



〔式中、

X は、脱離基を示し、

O は、酸素原子を示し、

OH は、ヒドロキシ基を示し、

S は、硫黄原子を示し、

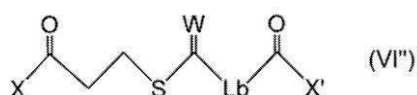
W は、酸素原子または硫黄原子を示し、

L b は、第 2 リンカーを示し、

第 2 リンカーにおける主鎖を構成する原子数が、3～5 個である。〕で表される化合物
またはその塩を、カルボキシル基修飾試薬と反応させて、

下記式 (V I') :

【化 11】



〔式中、

X、O、S、W、および L b は、前記式 (V') のものと同じであり、

X' は、ペンタフルオロフェニルオキシ基、テトラフルオロフェニルオキシ基、パラニトロ

ロフェニルオキシ基、またはN-スクシンイミジルオキシ基を示す。)で表される化合物またはその塩を生成することを含む、式(VI')で表される化合物またはその塩の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、化合物またはその塩、およびそれらにより得られる抗体などに関する。

【背景技術】

【0002】

近年、抗体薬物複合体(Antibody Drug Conjugate:ADC)の研究開発が盛んに行われている。ADCはその名の通り、抗体に薬物(例、抗がん剤)をコンジュゲーションした薬剤であり、がん細胞などに対して直接的な殺細胞活性を有する。代表的なADCとしては、Immunogene社およびRoche社が共同開発したT-DM1(商品名:カドサイラ(登録商標))がある。

【0003】

T-DM1を始めとするADCは、開発当初からその不均一性が問題となっている。すなわち、抗体中に70~80程度あるリジン残基に対して、低分子薬物をランダムに反応させているため、薬物抗体比(Drug Antibody Ratio:DAR)やコンジュゲーション位置が一定ではない。通常このようなランダムコンジュゲーション法になるとDARが0~8の範囲となり、薬物の結合数が異なる複数の抗体薬剤が生じることが分かっている。近年ADCの薬物の結合数および結合位置を変化させると、体内動態や薬物の放出速度、効果が変化することが報告されている。これらのことから次世代型ADCではコンジュゲーションする薬物の個数と位置を制御することが求められている。個数および位置が一定であると、期待通りのefficacy、コンジュゲーション薬剤のバリエーション、ロット差いわゆるレギュレーションの問題が解決すると考えられている。

【0004】

抗体の位置選択的修飾法は世界中で研究されているが、そのほとんどが遺伝子工学的手法もしくは酵素を用いた修飾法である。遺伝子工学的修飾法に関しては、位置選択性、個数選択性は制御できるものの、抗体自体の発現効率が低下(ADCを調製する際の総収率が低下)するなどの問題が指摘されている。また、抗体発現系の構築などに長い年月を要することが問題となっている。

【0005】

最近、化学合成的手法により抗体の位置選択的な修飾を可能にするC-CAP(Chemical Conjugation by Affinity Peptide)法が開発された(特許文献1)。本方法は、親和性ペプチド(Affinity Peptide)に対してNHS活性化エステルおよび薬物が連結されたペプチド試薬を抗体と反応させることにより、抗体の位置選択的な修飾に成功している。しかし、本方法により作製されるADCは、抗体と薬物がペプチド部分を含むリンカーを介して結合している。ペプチド部分は、潜在的な免疫原性を有し、また血中で加水分解され易い。したがって、本方法により作製されるADCは、リンカー中にペプチド部分を含む点で改善の余地がある。

【0006】

上記C-CAP法の改良方法として、親和性ペプチドを含む所定の化合物を用いる化学合成的手法により、ペプチド部分をリンカーとして含まない、機能性物質(例、薬物)を位置選択的に有する抗体を調製できる技術が報告されている(特許文献2~6)。ペプチド部分を含むリンカーの使用の回避は、臨床応用において望ましいものである。これらの技術では、薬物で位置選択的に修飾され得る抗体中のアミノ酸残基の位置として、CH2およびCH3ドメイン中の各種アミノ酸残基(例、リジン残基、チロシン残基、セリン残基、およびスレオニン残基)に対応する複数の位置が提案されている。しかしながら、抗体を機能性物質で位置選択的に修飾し、かつ抗体と機能性物質との結合比率を所望の範囲に制御することは必ずしも容易ではない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【文献】国際公開第2016/186206号

【文献】国際公開第2018/199337号

【文献】国際公開第2019/240287号

【文献】国際公開第2019/240288号

【文献】国際公開第2020/009165号

【文献】国際公開第2020/090979号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、抗体を機能性物質で位置選択的に修飾し、かつ抗体と機能性物質との結合比率を所望の範囲に制御することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、鋭意検討した結果、イムノグロブリン単位中の重鎖の288/290位のリジン残基を抗体の修飾位置として選択し、かつ当該リジン残基の位置特異的な修飾を可能にする化合物として特定の化合物を用いることで、抗体を機能性物質で位置選択的に修飾でき、しかもイムノグロブリン単位と機能性物質との結合の平均比率（機能性物質数／イムノグロブリン単位）を所望の範囲（1.5～2.5）に高度に制御することが容易になることを見出した。このような特定の化合物は、イムノグロブリン単位中の重鎖の288/290位のリジン残基との反応性部分〔X（脱離基）-C=O〕と、親和性ペプチドとの結合部分〔O=C-Y（親和性ペプチド）〕とを連結する主鎖を構成する原子数の合計が7～9個である化合物（すなわち、式（I）で表われる化合物において、第1リンカーにおける主鎖を構成する原子数、および第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数の合計が5～7個であるもの）に対応する。本発明者らは、かかる知見に基づき、式（I）で表される化合物またはその塩、およびそれらを含む抗体誘導体化用試薬を開発することに成功した。本発明者らはまた、式（I）で表われる化合物またはそれらの塩の使用により、特定の抗体、すなわち、抗体中の288/290位のリジン残基が修飾基で位置選択的に修飾され、かつイムノグロブリン単位と修飾基との結合の平均比率（修飾基数／イムノグロブリン単位）が所望の範囲（1.5～2.5）に高度に制御された抗体（抗体中間体、チオール基導入抗体誘導体、ならびに抗体および機能性物質のコンジュゲート）を調製できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明は、以下である。

〔1〕式（I）で表される化合物またはその塩。

〔2〕脱離基が以下から選ばれる、〔1〕の化合物またはその塩：

（a）R-S（ここで、Rは、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示し、Sは、硫黄原子を示す。）；

（b）R-O（ここで、Rは、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示し、Oは、酸素原子を示す。）；または

（c）R_A-(R_B-)N（ここで、R_AおよびR_Bは、それぞれ独立して、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示し、Nは、窒素原子を示す。）；または

（d）ハロゲン原子。

〔3〕イムノグロブリン単位がヒトイムノグロブリン単位である、〔1〕または〔2〕の化合物またはその塩。

〔4〕イムノグロブリン単位がヒトIgGである、〔1〕～〔3〕のいずれかの化合物ま

10

20

30

40

50

たはその塩。

〔５〕親和性ペプチドがリジン残基を含み、かつリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Ｙに隣接するカルボニル基（Ｃ＝Ｏ）とアミド結合を形成している、〔１〕～〔４〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔６〕親和性ペプチドが以下である、〔１〕～〔５〕のいずれかの化合物またはその塩：

（Ａ）ＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＫＤＤＣ（配列番号１）のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；または

（Ｂ）ＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＫＤＤＣ（配列番号１）のアミノ酸配列において、アミノ酸残基の置換、挿入、欠失、および付加からなる群より選ばれる１～５個のアミノ酸残基の変異を含むアミノ酸配列（ここで、２７位のリジン残基、ならびに１位および３０位の２つのシステイン残基は維持される）を含む親和性ペプチド。

〔７〕（Ｂ）の親和性ペプチドが、以下からなる群より選ばれる、〔６〕の化合物またはその塩：

（ａ）ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＫＤＤＣ（配列番号２）のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

（ｂ）ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＫＥＤＣ（配列番号３）のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

（ｃ）ＦＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＫＥＥＣ（配列番号４）のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

（ｄ）ＮＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＫＥＥＣ（配列番号５）のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

（ｅ）ＭＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＫＥＥＣ（配列番号６）のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；および

（ｆ）ＱＣＱＲＲＦＹＥＡＬＨＤＰＮＬＮＥＥＱＲＮＡＲＩＲＳＩＫＥＥＣ（配列番号７）のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド。

〔８〕親和性ペプチドにおけるＮ末端およびＣ末端アミノ酸残基が、保護されていてもよく、かつ

親和性ペプチドにおける２つのシステイン残基（Ｃ）の側鎖中の２つのチオール基が、ジスルフィド結合により、またはリンカーを介して連結されていてもよい、〔６〕または〔７〕の化合物またはその塩。

〔９〕式（Ｉ）で表される化合物が、式（Ｉ'）で表される、〔１〕～〔８〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔１０〕式（Ｉ'）で表される化合物が、式（Ｉ''）で表される、〔９〕の化合物またはその塩。

〔１１〕式（Ｉ）で表される化合物またはその塩を含む、抗体誘導体化用試薬。

〔１２〕式（Ｉ）で表される化合物が、式（Ｉ'）で表される、〔１１〕の試薬。

〔１３〕式（Ｉ'）で表される化合物が、式（Ｉ''）で表される、〔１２〕の試薬。

〔１４〕式（ＩＩ）で表される構造単位を含む抗体中間体またはその塩。

〔１５〕抗体中間体がヒト抗体中間体である、〔１４〕の抗体中間体またはその塩。

〔１６〕抗体中間体がヒトＩｇＧ中間体である、〔１４〕または〔１５〕の抗体中間体またはその塩。

〔１７〕式（ＩＩ）で表される構造単位が、式（ＩＩ'）で表される、〔１４〕～〔１６〕のいずれかの抗体中間体またはその塩。

〔１８〕式（ＩＩ'）で表される構造単位が、式（ＩＩ''）で表される、〔１７〕の抗体中間体またはその塩。

〔１９〕式（ＩＩＩ）で表される構造単位を含む、チオール基導入抗体誘導体またはその塩。

〔２０〕前記２個の重鎖中の２８８／２９０位に存在するリジン残基以外の特定アミノ酸残基がさらに修飾されている、〔１９〕のチオール基導入抗体誘導体またはその塩。

〔２１〕前記特定アミノ酸残基が、２個の重鎖中の２４６／２４８位に存在するリジン残基である、〔２０〕のチオール基導入抗体誘導体またはその塩。

〔２２〕式（ⅠⅠⅠ）で表される構造単位が、式（ⅠⅠⅠ'）で表される、〔１９〕～〔２１〕のいずれかのチオール基導入抗体誘導体またはその塩。

〔２３〕式（ⅠⅠⅠ'）で表される構造単位が、式（ⅠⅠⅠ''）で表される、〔２２〕のチオール基導入抗体誘導体またはその塩。

〔２４〕式（ⅠⅤ）で表される構造単位を含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩。

〔２５〕前記２個の重鎖中の２８８／２９０位に存在するリジン残基以外の特定アミノ酸残基がさらに修飾されている、〔２４〕のコンジュゲートまたはその塩。

10

〔２６〕前記特定アミノ酸残基が、２個の重鎖中の２４６／２４８位に存在するリジン残基である、〔２５〕のコンジュゲートまたはその塩。

〔２７〕式（ⅠⅤ）で表される構造単位が、式（ⅠⅤ'）で表される、〔２４〕～〔２６〕のいずれかのコンジュゲートまたはその塩。

〔２８〕式（ⅠⅤ'）で表される構造単位が、式（ⅠⅤ''）で表される、〔２７〕のコンジュゲートまたはその塩。

〔２９〕式（Ⅴ）で表される化合物またはその塩。

〔３０〕式（Ⅴ）で表される化合物が、式（Ⅴ'）で表される、〔２９〕の化合物またはその塩。

〔３１〕式（Ⅴ'）で表される化合物が、式（Ⅴ''）で表される、〔３０〕の化合物またはその塩。

20

〔３２〕式（Ⅴ''）で表される化合物が、式（Ⅴ''－１）または（Ⅴ''－２）で表される、〔３１〕の化合物またはその塩。

〔３３〕式（ⅤⅠ）で表される化合物またはその塩。

〔３４〕脱離基Xよりも脱離する能力が高い脱離基が、ペンタフルオロフェニルオキシ基、テトラフルオロフェニルオキシ基、パラニトロフェニルオキシ基、またはN-スクシンイミジルオキシ基である、〔３３〕の化合物またはその塩。

〔３５〕式（ⅤⅠ）で表される化合物が、式（ⅤⅠ'）で表される、〔３３〕または〔３４〕の化合物またはその塩。

〔３６〕式（ⅤⅠ'）で表される化合物が、式（ⅤⅠ''）で表される、〔３５〕の化合物またはその塩。

30

〔３７〕式（ⅤⅠ''）で表される化合物が、式（ⅤⅠ''－１）または（ⅤⅠ''－２）で表される、〔３６〕の化合物またはその塩。

〔３８〕式（Ⅰ）で表される化合物またはその塩を、イムノグロブリン単位を含む抗体と反応させて、式（ⅠⅠ）で表される構造単位を含む抗体中間体またはその塩を生成することを含む、抗体中間体またはその塩の製造方法。

〔３９〕（１）式（Ⅰ）で表される化合物またはその塩を、イムノグロブリン単位を含む抗体と反応させて、式（ⅠⅠ）で表される構造単位を含む抗体中間体またはその塩を生成すること；ならびに

（２）抗体中間体またはその塩を、チオエステルの切断反応に供して、式（ⅠⅠⅠ）で表される構造単位を含む、チオール基導入抗体誘導体またはその塩を生成することを含む、チオール基導入抗体誘導体またはその塩の製造方法。

40

〔４０〕（１）式（Ⅰ）で表される化合物またはその塩を、イムノグロブリン単位を含む抗体と反応させて、式（ⅠⅠ）で表される構造単位を含む、抗体中間体またはその塩を生成すること；

（２）抗体中間体またはその塩を、チオエステルの切断反応に供して、式（ⅠⅠⅠ）で表される構造単位を含む、チオール基導入抗体誘導体またはその塩を生成すること；ならびに

（３）チオール基導入抗体誘導体またはその塩を、機能性物質と反応させて、式（ⅠⅤ）で表される構造単位を含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩を生成することを含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩の製造方法。

50

〔４１〕式（ＶＩ）で表される化合物またはその塩を、２個の重鎖および２個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位におけるＣＨ２ドメインに結合領域を有する親和性ペプチドと反応させて、式（Ｉ）で表される化合物またはその塩を生成することをさらに含む、〔３８〕～〔４０〕のいずれかの方法。

〔４２〕（１'）式（Ｖ）で表される化合物またはその塩を、カルボキシル基修飾試薬と反応させて、式（ＶＩ）で表される化合物またはその塩を生成すること；ならびに

（２'）式（ＶＩ）で表される化合物またはその塩を、２個の重鎖および２個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位におけるＣＨ２ドメインに結合領域を有する親和性ペプチドと反応させて、式（Ｉ）で表される化合物またはその塩を生成することをさらに含む、〔３８〕～〔４０〕のいずれかの方法。

〔４３〕式（Ｖ）で表される化合物またはその塩を、カルボキシル基修飾試薬と反応させて、式（ＶＩ）で表される化合物またはその塩を生成することを含む、式（ＶＩ）で表される化合物またはその塩の製造方法。

〔４４〕式（ＩＩ）で表される構造単位を含む抗体中間体またはその塩を、チオエステルの切断反応に供して、式（ＩＩＩ）で表される構造単位を含む、チオール基導入抗体誘導体またはその塩を生成することを含む、チオール基導入抗体誘導体またはその塩の製造方法。

〔４５〕（１）式（ＩＩ）で表される構造単位を含む、抗体中間体またはその塩を、チオエステルの切断反応に供して、式（ＩＩＩ）で表される構造単位を含む、チオール基導入抗体誘導体またはその塩を生成すること；ならびに

（２）チオール基導入抗体誘導体またはその塩を、機能性物質と反応させて、式（ＩＶ）で表される構造単位を含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩を生成することを含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩の製造方法。

〔４６〕式（ＩＩＩ）で表される構造単位を含む、チオール基導入抗体誘導体またはその塩を、機能性物質と反応させて、式（ＩＶ）で表される構造単位を含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩を生成することを含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩の製造方法。

【発明の効果】

【００１１】

式（Ｉ）で表される化合物またはその塩は、イムノグロブリン単位と親和性ペプチド含有基との結合の平均比率（親和性ペプチド含有基数／イムノグロブリン単位）が所望の範囲（１．５～２．５）となるように、イムノグロブリン単位中の重鎖の２８８／２９０位のリジン残基を特異的かつ高度に修飾することができる。したがって、式（Ｉ）で表される化合物またはその塩は、抗体誘導体化用試薬として有用である。

また、式（Ｉ）で表される化合物またはその塩によれば、イムノグロブリン単位中の重鎖の２８８／２９０位のリジン残基が親和性ペプチド含有基で特異的に修飾されており、かつイムノグロブリン単位と親和性ペプチド含有基との結合の平均比率（親和性ペプチド含有基数／イムノグロブリン単位）が所望の範囲に高度に制御された、式（ＩＩ）で表される抗体中間体またはその塩を提供することができる。

さらに、式（ＩＩ）で表される抗体中間体またはその塩を原料として使用して作製された抗体は、当該抗体中間体またはその塩の位置選択性および結合の平均比率を引き継ぐことができる。したがって、上記のような位置選択性および結合の平均比率を有する、式（ＩＩＩ）で表されるチオール基導入抗体誘導体またはその塩、ならびに式（ＩＶ）で表される抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩を提供することができる。

また、式（Ｉ）で表される化合物またはその塩の効率的な製造を可能にする合成中間体である式（Ｖ）および（ＶＩ）で表される化合物またはその塩が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１】図１は、式（Ｉ）で表される本発明の化合物またはその塩によるイムノグロブリン単位の修飾のコンセプトを示す模式図（その１）である。まず、式（Ｉ）で表される本

10

20

30

40

50

発明の化合物またはその塩は、親和性ペプチド（Y）を介して、イムノグロブリン単位におけるCH₂ドメインに会合する。次に、式（I）で表される本発明の化合物またはその塩は、脱離基（X）を有する活性化カルボニル基を介して、CH₂ドメイン中の特定のアミノ酸残基の側鎖（図中ではリジン残基の側鎖におけるアミノ基）と反応して、抗体中間体またはその塩を生成する。

【図2】図2は、式（I）で表される本発明の化合物またはその塩によるイムノグロブリン単位の修飾のコンセプトを示す模式図（その2）である。チオエステル基の切断により、チオール基導入抗体誘導体またはその塩が生成する。

【図3】図3は、式（I）で表される本発明の化合物またはその塩によるイムノグロブリン単位の修飾のコンセプトを示す模式図（その3）である。チオール基導入抗体誘導体またはその塩におけるチオール基と機能性物質（Z）との反応により、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩が生成する。

10

【図4】図4は、本発明の一実施形態の概要を示す図である。

【図5】図5は、本発明の好ましい実施形態の概要を示す図である。

【図6】図6は、本発明のより好ましい実施形態の概要を示す図である。

【図7】図7は、トラスツズマブ（抗HER2 IgG抗体）の特異的修飾（結合性ペプチドの導入数）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例1）。

【図8】図8は、トラスツズマブの特異的修飾（重鎖選択性）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例1）。

【図9】図9は、（1）トラスツズマブの重鎖のアミノ酸配列（配列番号8）、および（2）トラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列（配列番号9）を示す図である。

20

【図10】図10は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含むアミノ酸18残基からなるペプチド、FNWYVDGV EVHNAKTKPR（配列番号10）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（実測値：m/z 577.03606、理論値：577.03557、4価）を示す図である（実施例1-9-4）。

【図11】図11は、EUnumberingにおけるヒトIgG重鎖の288/290位のリジン残基の修飾を示す、3価のy16に相当するm/z 682.13（理論値：682.01）のプロダクトイオンのCIDスペクトルを示す図である（実施例1-9-4）。

30

【図12】図12は、トラスツズマブのトリプシン消化物に対し、リジン残基への修飾（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含むペプチドフラグメントをBioPharma Finderを用いて検索した結果を示す図である（実施例1-9-4）。横軸は同定されたリジン残基を示し、縦軸はIntensityを示す。

【図13】図13は、トラスツズマブの特異的修飾（結合性ペプチドの導入数）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例2）。

【図14】図14は、トラスツズマブの特異的修飾（重鎖選択性）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例2）。

40

【図15】図15は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含むアミノ酸18残基からなるペプチド、FNWYVDGV EVHNAKTKPR（配列番号10）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（実測値：m/z 577.03571、理論値：577.03557、4価）を示す図である（実施例2-7-4）。

【図16】図16は、EUnumberingにおけるヒトIgG重鎖の288/290位のリジン残基の修飾を示す、3価のy16に相当するm/z 682.41（理論値：682.01）のプロダクトイオンのCIDスペクトルを示す図である（実施例2-7-4）。

50

【図17】図17は、トラスツズマブのトリプシン消化物に対し、リジン残基への修飾（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethylationを受けたチオール導入体（+145.019Da）を含むペプチドフラグメントをBioPharma Finderを用いて検索した結果を示す図である（実施例2-7-4）。横軸は同定されたリジン残基を示し、縦軸はIntensityを示す。

【図18】図18は、トラスツズマブの特異的修飾（結合性ペプチドの導入数）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例3）。

【図19】図19は、トラスツズマブの特異的修飾（重鎖選択性）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例3）。

【図20】図20は、トラスツズマブの特異的修飾（結合性ペプチドの導入数）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例4）。 10

【図21】図21は、トラスツズマブの特異的修飾（重鎖選択性）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例4）。

【図22】図22は、トラスツズマブの特異的修飾（結合性ペプチドの導入数）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例5）。

【図23】図23は、トラスツズマブの特異的修飾（重鎖選択性）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例5）。

【図24】図24は、トラスツズマブの特異的修飾（結合性ペプチドの導入数）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例6）。 20

【図25】図25は、トラスツズマブの特異的修飾（重鎖選択性）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例6）。

【図26】図26は、トラスツズマブの特異的修飾（結合性ペプチドの導入数）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例7）。

【図27】図27は、トラスツズマブの特異的修飾（重鎖選択性）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例7）。

【図28】図28は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethylationを受けたチオール導入体（+145.019Da））を含むアミノ酸18残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPR（配列番号10）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（実測値： m/z 769.04506、理論値：769.04482、3価）を示す図である（実施例7-6-4）。 30

【図29】図29は、EU numberingにおけるヒトIgG重鎖の288/290位のリジン残基の修飾を示す、2価のy16に相当する m/z 1022.71（理論値：1022.51）のプロダクトイオンのCIDスペクトルを示す図である（実施例7-6-4）。

【図30】図30は、トラスツズマブのトリプシン消化物に対し、リジン残基への修飾（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethylationを受けたチオール導入体（+145.019Da））を含むペプチドフラグメントをBioPharma Finderを用いて検索した結果を示す図である（実施例7-6-4）。横軸は同定されたリジン残基を示し、縦軸はIntensityを示す。 40

【図31】図31は、トラスツズマブの特異的修飾（結合性ペプチドの導入数）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例8）。

【図32】図32は、トラスツズマブの特異的修飾（重鎖選択性）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例8）。

【図33】図33は、トラスツズマブの特異的修飾（結合性ペプチドの導入数）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例9）。

【図34】図34は、トラスツズマブの特異的修飾（重鎖選択性）のESI-TOFMS解析を示す図である（実施例9）。

【発明を実施するための形態】

【0013】 50

1. 一般的な用語の定義

本発明において、用語「抗体」は、以下のとおりである。また、用語「イムノグロブリン単位」は、このような抗体の基本構成要素である2価の単量体単位に対応するものであり、2個の重鎖および2個の軽鎖を含む単位である。したがって、イムノグロブリン単位について、その由来、種類（ポリクローナルもしくはモノクローナル、アイソタイプ、および全長抗体もしくは抗体断片）、抗原、リジン残基の位置、および位置選択性の定義、例、および好ましい例は、以下に説明する抗体のものと同様である。

【0014】

抗体の由来は、特に限定されず、例えば、哺乳動物、鳥類（例、ニワトリ）等の動物に由来するものであってもよい。好ましくは、イムノグロブリン単位は、哺乳動物に由来する。このような哺乳動物としては、例えば、霊長類（例、ヒト、サル、チンパンジー）、齧歯類（例、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ）、愛玩動物（例、イヌ、ネコ）、家畜（例、ウシ、ブタ、ヤギ）、使役動物（例、ウマ、ヒツジ）が挙げられ、好ましくは霊長類または齧歯類であり、より好ましくはヒトである。

【0015】

抗体の種類は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよい。抗体はまた、2価の抗体（例、IgG、IgD、IgE）、または4価以上の抗体（例、IgA抗体、IgM抗体）であってもよい。好ましくは、抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体としては、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、所定の糖鎖が付加された抗体（例、N型糖鎖結合コンセンサス配列等の糖鎖結合コンセンサス配列を有するように改変された抗体）、二重特異性抗体、Fc領域タンパク質、Fc融合タンパク質が挙げられる。モノクローナル抗体のアイソタイプとしては、例えば、IgG（例、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgM、IgA、IgD、IgE、およびIgYが挙げられる。本発明では、モノクローナル抗体として、全長抗体、または可変領域ならびにCH1ドメインおよびCH2ドメインを含む抗体断片を利用できるが、全長抗体が好ましい。抗体は、好ましくはヒトIgGモノクローナル抗体であり、より好ましくはヒトIgG全長モノクローナル抗体である。

【0016】

抗体の抗原としては、任意の抗原を用いることができる。例えば、このような抗原としては、タンパク質〔オリゴペプチド、ポリペプチドを含む。糖等の生体分子で修飾されたタンパク質（例、糖タンパク質）であってもよい〕、糖鎖、核酸、低分子化合物が挙げられる。好ましくは、抗体は、タンパク質を抗原とする抗体であってもよい。タンパク質としては、例えば、細胞膜受容体、細胞膜受容体以外の細胞膜タンパク質（例、細胞外基質タンパク質）、リガンド、可溶性受容体が挙げられる。

【0017】

より具体的には、抗体の抗原であるタンパク質は、疾患標的タンパク質であってもよい。疾患標的タンパク質としては、例えば、以下が挙げられる。

【0018】

(1) がん領域

PD-L1、GD2、PDGFR α （血小板由来成長因子受容体）、CD22、HER2、ホスファチジルセリン（PS）、EpCAM、フィブロネクチン、PD-1、VEGFR-2、CD33、HGF、gpNMB、CD27、DEC-205、葉酸受容体、CD37、CD19、Trop2、CEACAM5、S1P、HER3、IGF-1R、DLL4、TNT-1/B、CPAAs、PSMA、CD20、CD105（エンドグリン）、ICAM-1、CD30、CD16A、CD38、MUC1、EGFR、KIR2DL1、2、NKG2A、tenascin-C、IGF（Insulin-like growth factor）、CTLA-4、mesothelin、CD138、c-Met、Ang2、VEGF-A、CD79b、ENPD3、葉酸受容体 α 、TEM-1、GM2、グリピカン3、macrophage inhibitory factor、CD74、Notch1、Notch2、Notch3、CD37、TLR-2、CD

10

20

30

40

50

3、CSF-1R、FGFR2b、HLA-DR、GM-CSF、EphA3、B7-H3、CD123、gpA33、Frizzled7受容体、DLL4、VEGF、RSP
O、LIV-1、SLITRK6、Nectin-4、CD70、CD40、CD19、
SEMA4D (CD100)、CD25、MET、Tissue Factor、IL-
8、EGFR、cMet、KIR3DL2、Bst1 (CD157)、P-カドヘリン、
CEA、GITR、TAM (tumor associated macrophage)
、CEA、DLL4、Ang2、CD73、FGFR2、CXCR4、LAG-3、GI
TR、Fucosyl GM1、IGF-1、Angiopoietin 2、CSF-1
R、FGFR3、OX40、BCMA、ErbB3、CD137 (4-1BB)、PTK
7、EFNA4、FAP、DR5、CEA、Ly6E、CA6、CEACAM5、LAM
P1、tissue factor、EPHA2、DR5、B7-H3、FGFR4、F
GFR2、 α 2-PI、A33、GDF15、CAIX、CD166、ROR1、GIT
R、BCMA、TBA、LAG-3、EphA2、TIM-3、CD-200、EGFR
vIII、CD16A、CD32B、PIGF、Axl、MICA/B、Thomsen
-Friedenreich、CD39、CD37、CD73、CLEC12A、Lgr
3、トランスフェリン受容体、TGF β 、IL-17、5T4、RTK、Immune
Suppressor Protein、NaPi2b、ルイス血液型B抗原、A34、
Lysil-Oxidase、DLK-1、TROP-2、 α 9インテグリン、TAG-
72 (CA72-4)、CD70

【0019】

(2) 自己免疫疾患・炎症性疾患

IL-17、IL-6R、IL-17R、INF- α 、IL-5R、IL-13、IL-
-23、IL-6、ActRIIB、 β 7-Integrin、IL-4 α R、HAS、
Eotaxin-1、CD3、CD19、TNF- α 、IL-15、CD3 ϵ 、Fibr
onectin、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-17、TSLP (Thymic St
romal Lymphopoietin)、LAMP (Alpha4 Beta 7 I
ntegrin)、IL-23、GM-CSFR、TSLP、CD28、CD40、TL
R-3、BAFF-R、MAdCAM、IL-31R、IL-33、CD74、CD32
B、CD79B、IgE (免疫グロブリンE)、IL-17A、IL-17F、C5、F
cRn、CD28、TLR4、MCAM、B7RP1、CXCR1, 2 Ligands
、IL-21、Cadherin-11、CX3CL1、CCL20、IL-36R、I
L-10R、CD86、TNF- α 、IL-7R、Kv1. 3、 α 9インテグリン、LI
FHT

【0020】

(3) 脳神経疾患

CGRP、CD20、 β アミロイド、 β アミロイドプロトフィブリン、Calcito
nin Gene-Related Peptide Receptor、LINGO (I
g Domain Containing1)、 α シヌクレイン、細胞外tau、CD52
、インスリン受容体、tauタンパク、TDP-43、SOD1、TauC3、JCウィ
ルス

【0021】

(4) 感染症

Clostridium Difficile toxin B、サイトメガロウイルス
、RSウイルス、LPS、S. Aureus Alpha-toxin、M2eタンパク
、Psl、PcrV、S. Aureus toxin、インフルエンザA、Alginate、黄色ブドウ球菌、PD-L1、インフルエンザB、アシネトバクター、F-pro
tein、Env、CD3、病原性大腸菌、クレブシエラ、肺炎球菌

【0022】

(5) 遺伝性・希少疾患

アミロイドAL、SEMA4D (CD100)、インスリン受容体、ANGPTL3、

10

20

30

40

50

IL4、IL13、FGF23、副腎皮質刺激ホルモン、トランスサイレチン、ハンチンチン

【0023】

(6) 眼疾患

Factor D、IGF-1R、PGDFR、Ang2、VEGF-A、CD-105 (Endoglin)、IGF-1R、 β アミロイド

【0024】

(7) 骨・整形外科領域

Sclerostin、Myostatin、Dickkopf-1、GDF8、RANKL、HAS、Siglec-15

【0025】

(8) 血液疾患

vWF、Factor IXa、Factor X、IFN γ 、C5、BMP-6、Ferroportin、TFPI

【0026】

(9) その他の疾患

BAFF (B cell activating factor)、IL-1 β 、PCSK9、NGF、CD45、TLR-2、GLP-1、TNFR1、C5、CD40、LPA、プロラクチン受容体、VEGFR-1、CB1、Endoglin、PTH1R、CXCL1、CXCL8、IL-1 β 、AT2-R、IAPP

【0027】

モノクローナル抗体の具体例としては、特定のキメラ抗体（例、リツキシマブ、バシリキシマブ、インフリキシマブ、セツキシマブ、シルツキシマブ、ディヌツキシマブ、オルタトキサシマブ）、特定のヒト化抗体（例、ダクリツマブ、パリビズマブ、トラスツズマブ、アレクツズマブ、オマリツマブ、エファリツマブ、ベバシツマブ、ナタリツマブ (IgG4)、トシリツマブ、エクリツマブ (IgG2)、モガムリツマブ、ペルツツマブ、オビヌツツマブ、ベドリツマブ、ペンプロリツマブ (IgG4)、メポリツマブ、エロツツマブ、ダラツムマブ、イケセキツマブ (IgG4)、レスリツマブ (IgG4)、アテゾリツマブ）、特定のヒト抗体（例、アダリムマブ (IgG1)、パニツムマブ、ゴリムマブ、ウステキヌマブ、カナキヌマブ、オフアツムマブ、デノスマブ (IgG2)、イピリムマブ、ベリムマブ、ラキシバクマブ、ラムシルマブ、ニボルマブ、デュピルマブ (IgG4)、セクキヌマブ、エボロクマブ (IgG2)、アリロクマブ、ネシツムマブ、プロダルマブ (IgG2)、オララツマブ）が挙げられる（IgGサブタイプに言及していない場合、IgG1であることを示す）。

【0028】

抗体中のリジン残基の位置、および重鎖の定常領域の位置（例、CH2ドメイン）についてはEU numberingに従う（http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.htmlを参照）。したがって、ヒトIgGを対象とする場合、288位のリジン残基は、ヒトIgG CH2領域の58番目の残基に相当し、290位のリジン残基は、ヒトIgG CH2領域の60番目の残基に相当する。288/290位の表記は、288位または290位のリジン残基が対象であることを示す。

【0029】

本発明によれば、抗体における288/290位のリジン残基を位置選択的に修飾することができる。本明細書において、「位置選択的」または「位置選択性」とは、抗体において特定のアミノ酸残基が特定の領域に偏在していないにもかかわらず、抗体中の特定のアミノ酸残基と結合できる所定の構造単位が、抗体中の特定の領域に偏在することをいう。したがって、「位置選択的に有する」、「位置選択的な結合」、「位置選択性での結合」等の位置選択性に関連する表現は、1個以上の特定のアミノ酸残基を含む標的領域における所定の構造単位の保有率または結合率が、標的領域における当該特定のアミノ酸残基

10

20

30

40

50

と同種である複数個のアミノ酸残基を含む非標的領域における当該構造単位の保有率または結合率よりも有意なレベルで高いことを意味する。このような位置選択性は、50%以上であり、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらにより好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.5%以上、または100%であってもよい。本発明によれば、ペプチドを含有するリンカーを利用せずに、288/290位のリジン残基を位置選択的に修飾することができる。ペプチド部分は、潜在的な免疫原性を有し、また血中で加水分解され易い。したがって、ペプチド部分を含むリンカーの使用の回避は、臨床応用において望ましいものである。

【0030】

本発明では、抗体における288/290位のリジン残基が位置選択的に修飾されている限り、他の位置の特定のアミノ酸残基がさらに位置選択的に修飾されていてもよい。例えば、抗体における所定の位置の特定のアミノ酸残基を位置選択的に修飾する方法は、国際公開第2018/199337号、国際公開第2019/240288号、国際公開第2019/240287号、および国際公開第2020/090979号に記載されている。このような特定のアミノ酸残基としては、修飾し易い側鎖（例、アミノ基、カルボキシ基、アミド基、ヒドロキシ基、チオール基）を有するアミノ酸残基（例、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、スレオニン残基、セリン残基、チロシン残基、システイン残基）を利用できるが、好ましくは、アミノ基を含む側鎖を有するリジン残基、ヒドロキシ基を含む側鎖を有するチロシン残基、セリン残基、およびスレオニン残基、またはチオール基を含む側鎖を有するシステイン残基であり、より好ましくは、リジン残基であり、さらにより好ましくは、246/248位のリジン残基、または317位のリジン残基であり、特に好ましくは246/248位のリジン残基である。246/248位の表記は、246位または248位のリジン残基が対象であることを示す。

【0031】

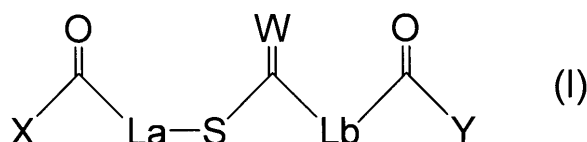
本発明において、用語「塩」としては、例えば、無機酸との塩、有機酸との塩、無機塩基との塩、有機塩基との塩、およびアミノ酸との塩が挙げられる。無機酸との塩としては、例えば、塩化水素、臭化水素、リン酸、硫酸、硝酸との塩が挙げられる。有機酸との塩としては、例えば、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、乳酸、酒石酸、フマル酸、シュウ酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸との塩が挙げられる。無機塩基との塩としては、例えば、アルカリ金属（例、ナトリウム、カリウム）、アルカリ土類金属（例、カルシウム、マグネシウム）、および亜鉛、アルミニウム等の他の金属、ならびにアンモニウムとの塩が挙げられる。有機塩基との塩としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、プロピレンジアミン、エチレンジアミン、ピリジン、エタノールアミン、モノアルキルエタノールアミン、ジアルキルエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミンとの塩が挙げられる。アミノ酸との塩としては、例えば、塩基性アミノ酸（例、アルギニン、ヒスチジン、リジン、オルニチン）、および酸性アミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）との塩が挙げられる。塩は、好ましくは、無機酸（例、塩化水素）との塩、または有機酸（例、トリフルオロ酢酸）との塩である。

【0032】

2. 化合物またはその塩

本発明は、下記式(I)で表される化合物またはその塩を提供する。

【化1】



10

20

30

40

50

〔式中、

Xは、脱離基を示し、

Yは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位におけるCH₂ドメインに結合領域を有する親和性ペプチドを示し、

Oは、酸素原子を示し、

Sは、硫黄原子を示し、

Wは、酸素原子または硫黄原子を示し、

L_aは、第1リンカーを示し、

L_bは、第2リンカーを示し、

第1リンカーにおける主鎖を構成する原子数、および第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数の合計が、5～7個である。〕

10

【0033】

本発明に関連して提示される式(I)および他の式において、－(ハイフン)は、その両側に存在する2つの単位が共有結合していることを示す。したがって、式(I)では、Xは、カルボニル基を構成する炭素原子と共有結合しており、L_aは、カルボニル基を構成する炭素原子、およびSと共有結合しており、Sは、L_a、およびカルボニル基を構成する炭素原子と共有結合しており、L_bは、両隣に存在する2個のカルボニル基を構成する2個の炭素原子と共有結合しており、Yは、カルボニル基を構成する炭素原子と共有結合している。

【0034】

20

Xにより示される脱離基は、Xに隣接するカルボニル基の炭素原子とアミノ基との間の反応により脱離できる基である。当業者であれば、このような脱離基を適宜設定することができる。このような脱離基としては、例えば、以下が挙げられる：

(a) R－S(ここで、Rは、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示し、Sは、硫黄原子を示す。)；

(b) R－O(ここで、Rは、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示し、Oは、酸素原子を示す。)；

(c) R_A－(R_B－)N(ここで、R_AおよびR_Bは、それぞれ独立して、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示し、Nは、窒素原子を示す。)；または

30

(d) ハロゲン原子。

【0035】

好ましくは、Xにより示される脱離基は、下記であってもよい：

(a) R－S(ここで、Rは、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示し、Sは、硫黄原子を示す。)；

(b) R－O(ここで、Rは、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示し、Oは、酸素原子を示す。)；または

(c) R_A－(R_B－)N(ここで、R_AおよびR_Bは、それぞれ独立して、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示す。)；であってもよい。

40

【0036】

より好ましくは、Xにより示される脱離基は、下記であってもよい：

(a) R－S(ここで、Rは、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示し、Sは、硫黄原子を示す。)；または

(b) R－O(ここで、Rは、水素原子、置換基を有していてもよい1価の炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の複素環基を示し、Oは、酸素原子を示す。)

【0037】

さらにより好ましくは、Xにより示される脱離基は、下記であってもよい：

50

(a) R-S (ここで、Rは、置換基を有していてもよい1価の芳香族炭化水素基、または置換基を有していてもよい1価の芳香族複素環基を示し、Sは、硫黄原子を示す。)

【0038】

特に好ましくは、Xにより示される脱離基は、下記であってもよい：

(a') R-S (ここで、Rは、置換基を有していてもよい1価の芳香族炭化水素基 (例、フェニル) を示し、Sは、硫黄原子を示す。)

【0039】

ハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられる。

【0040】

1価の炭化水素基としては、例えば、1価の鎖状炭化水素基、1価の脂環式炭化水素基、および1価の芳香族炭化水素基が挙げられる。

【0041】

1価の鎖状炭化水素基とは、鎖状構造のみで構成された炭化水素基を意味し、主鎖に環状構造を含まない。ただし、鎖状構造は直鎖状であっても分岐状であってもよい。1価の鎖状炭化水素基としては、例えば、アルキル、アルケニル、アルキニルが挙げられる。アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、直鎖状、または分岐状のいずれであってもよい。

【0042】

アルキルとしては、炭素原子数1～12のアルキルが好ましく、炭素原子数1～6のアルキルがより好ましく、炭素原子数1～4のアルキルがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数1～12のアルキルとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、イソブチル、t-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ドデシルが挙げられる。

【0043】

アルケニルとしては、炭素原子数2～12のアルケニルが好ましく、炭素原子数2～6のアルケニルがより好ましく、炭素原子数2～4のアルケニルがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数2～12のアルケニルとしては、例えば、ビニル、プロペニル、n-ブテニルが挙げられる。

【0044】

アルキニルとしては、炭素原子数2～12のアルキニルが好ましく、炭素原子数2～6のアルキニルがより好ましく、炭素原子数2～4のアルキニルがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数2～12のアルキニルとしては、例えば、エチニル、プロピニル、n-ブチニルが挙げられる。

【0045】

1価の鎖状炭化水素基としては、アルキルが好ましい。

【0046】

1価の脂環式炭化水素基とは、環構造として脂環式炭化水素のみを含み、芳香族環を含まない炭化水素基を意味し、脂環式炭化水素は単環、多環のいずれであってもよい。ただし、脂環式炭化水素のみで構成されている必要はなく、その一部に鎖状構造を含んでいてもよい。1価の脂環式炭化水素基としては、例えば、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニルが挙げられ、これらは、単環、多環のいずれであってもよい。

【0047】

シクロアルキルとしては、炭素原子数3～12のシクロアルキルが好ましく、炭素原子数3～6のシクロアルキルがより好ましく、炭素原子数5～6のシクロアルキルがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数3～12のシクロアルキルとしては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルが挙げられる。

【0048】

10

20

30

40

50

シクロアルケニルとしては、炭素原子数 3～12 のシクロアルケニルが好ましく、炭素原子数 3～6 のシクロアルケニルがより好ましく、炭素原子数 5～6 のシクロアルケニルがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数 3～12 のシクロアルケニルとしては、例えば、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニルが挙げられる。

【0049】

シクロアルキニルとしては、炭素原子数 3～12 のシクロアルキニルが好ましく、炭素原子数 3～6 のシクロアルキニルがより好ましく、炭素原子数 5～6 のシクロアルキニルがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数 3～12 のシクロアルキニルとしては、例えば、シクロプロピニル、シクロブチニル、シクロペンチニル、シクロヘキシニルが挙げられる。

10

【0050】

1 価の脂環式炭化水素基としては、シクロアルキルが好ましい。

【0051】

1 価の芳香族炭化水素基とは、芳香族環構造を含む炭化水素基を意味する。ただし、芳香族環のみで構成されている必要はなく、その一部に鎖状構造や脂環式炭化水素を含んでもよく、芳香族環は単環、多環のいずれであってもよい。1 価の芳香族炭化水素基としては、炭素原子数 6～12 のアリールが好ましく、炭素原子数 6～10 のアリールがより好ましく、炭素原子数 6 のアリールがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。炭素原子数 6～12 のアリールとしては、例えば、フェニル、ナフチルが挙げられる。

20

【0052】

1 価の芳香族炭化水素基としては、フェニルが好ましい。

【0053】

これらの中でも、1 価の炭化水素基としては、アルキル、シクロアルキル、アリールが好ましい。

【0054】

1 価の複素環基とは、複素環式化合物の複素環から水素原子 1 個を除いた基をいう。1 価の複素環基は、1 価の芳香族複素環基、または 1 価の非芳香族複素環基である。複素環基を構成するヘテロ原子として、酸素原子、硫黄原子、窒素原子、リン原子、ホウ素原子及びケイ素原子からなる群から選択される 1 種以上を含むことが好ましく、酸素原子、硫黄原子及び窒素原子からなる群から選択される 1 種以上を含むことがより好ましい。

30

【0055】

1 価の芳香族複素環基としては、炭素原子数 1～15 の芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数 1～9 の芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数 1～6 の芳香族複素環基がさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。1 価の芳香族複素環基としては、例えば、ピロリル、フラニル、チオフェニル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、インドリル、プリニル、アントラキノリル、カルバゾニル、フルオレニル、キノリニル、イソキノリニル、キナゾリニル、及びフタラジニルが挙げられる。

40

【0056】

1 価の非芳香族複素環基としては、炭素原子数 2～15 の非芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数 2～9 の非芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数 2～6 の非芳香族複素環基がさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。1 価の非芳香族複素環基としては、例えば、オキシラニル、アジリジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ピロリジニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロフラニル、ジオキサラニル、テトラヒドロチオフェニル、ピロリニル、イミダゾリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ピペラジニル、ジヒドロオキサジニル、テトラヒ

50

ドロオキサジニル、ジヒドロピリミジニル、及びテトラヒドロピリミジニルが挙げられる。

【0057】

これらの中でも、1価の複素環基としては、5員または6員の複素環基が好ましい。

【0058】

上記R、 R_A 、および R_B で示される「置換基を有していてもよい1価の炭化水素基」、および「置換基を有していてもよい1価の複素環基」における「置換基」の個数は、例えば1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1もしくは2個であってもよい。このような置換基としては、例えば、以下が挙げられる：

(i) ハロゲン原子；

(ii) 1価の炭化水素基；

(iii) 1価の複素環基；

(iv) アラルキル；

(v) R_a-O- 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_a-C(=O)-O-$ (R_a は、水素原子、もしくは1価の炭化水素基を示す。)；または

(vi) NR_bR_c- 、 $NR_bR_c-C(=O)-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_b-C(=O)-NR_c-$ (R_b および R_c は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは1価の炭化水素基を示す。)；

(vii) ニトロ基、硫酸基、スルホン酸基、シアノ基、およびカルボキシ基。

【0059】

上記置換基におけるハロゲン原子、1価の炭化水素基、および1価の複素環基の定義、例、および好ましい例は、それぞれ、上記R、 R_A 、および R_B において説明した1価の炭化水素基、および1価の複素環基のものと同様である。

【0060】

アラルキルとは、アリールアルキルをいう。アリールアルキルにおけるアリールおよびアルキルの定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。アラルキルとしては、炭素原子数3～15のアラルキルが好ましい。このようなアラルキルとしては、例えば、ベンゾイル、フェネチル、ナフチルメチル、ナフチルエチルが挙げられる。

【0061】

好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

(i) ハロゲン原子；

(ii) 炭素原子数1～12のアルキル、フェニル、もしくはナフチル；

(iii) 炭素原子数3～15のアラルキル；

(iv) 5員または6員の複素環；

(v) R_a-O- 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_a-C(=O)-O-$ (R_a は、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；

(vi) NR_bR_c- 、 $NR_bR_c-C(=O)-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_b-C(=O)-NR_c-$ (R_b および R_c は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；または

(vii) 上記(vi)で列挙したものと同一基。

【0062】

より好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

(i) ハロゲン原子；

(ii) 炭素原子数1～12のアルキル；

(iii) R_a-O- 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_a-C(=O)-O-$ (R_a は、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；

(iv) NR_bR_c- 、 $NR_bR_c-C(=O)-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_b-C(=O)-NR_c-$ (R_b および R_c は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；または

(v) 上記(vi)で列挙したものと同一基。

【0063】

10

20

30

40

50

さらにより好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

- (i) ハロゲン原子；
- (ii) 炭素原子数1～6のアルキル；
- (iii) R_a-O- 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_a-C(=O)-O-$ (R_a は、水素原子、もしくは炭素原子数1～6のアルキルを示す。)；
- (iv) NR_bR_c- 、 $NR_bR_c-C(=O)-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_b-C(=O)-NR_c-$ (R_b および R_c は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～6のアルキルを示す。)；または
- (v) 上記(vii)で列挙したものと同一基。

【0064】

特に好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

- (i) ハロゲン原子；
- (ii) 炭素原子数1～4のアルキル；
- (iii) R_a-O- 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_a-C(=O)-O-$ (R_a は、水素原子、もしくは炭素原子数1～4のアルキルを示す。)；
- (iv) NR_bR_c- 、 $NR_bR_c-C(=O)-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_b-C(=O)-NR_c-$ (R_b および R_c は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～4のアルキルを示す。)；または
- (v) 上記(vii)で列挙したものと同一基。

【0065】

Yにより示される親和性ペプチドは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位におけるCH2ドメインに結合領域を有する。親和性ペプチドとしては、イムノグロブリン単位におけるCH2ドメインに結合領域を有する任意のペプチドを用いることができる。親和性ペプチドは、Yに隣接するカルボニル基($C=O$)と結合可能な部分(例、アミノ基、ヒドロキシ基)を含む側鎖を含むアミノ酸残基(例、リジン残基、プロリン残基、トリプトファン残基、チロシン残基、セリン残基、スレオニン残基)を含み、かつリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Yに隣接するカルボニル基($C=O$)とアミド結合を形成していてもよい。好ましくは、親和性ペプチドは、リジン残基を含み、かつリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Yに隣接するカルボニル基($C=O$)とアミド結合を形成していてもよい。このような親和性ペプチドとしては、例えば、国際公開第2016/186206号、国際公開第2018/199337号、国際公開第2019/240288号、国際公開第2019/240287号、および国際公開第2020/090979号、ならびにこれらの国際公開公報中で引用されている文献中に開示される種々の親和性ペプチドを用いることができる。

【0066】

好ましくは、親和性ペプチドは、以下であってもよい：

(A) CQRRFYEA LHD PNLNEEQRNARIRSIKDDC (配列番号1) のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；または

(B) CQRRFYEA LHD PNLNEEQRNARIRSIKDDC (配列番号1) のアミノ酸配列において、アミノ酸残基の置換、挿入、欠失、および付加からなる群より選ばれる1～5個(すなわち、1個、2個、3個、4個、または5個)のアミノ酸残基の変異を含むアミノ酸配列(ここで、27位のリジン残基、ならびに1位および30位の2つのシステイン残基は維持される)を含む親和性ペプチド。

配列番号1のアミノ酸配列を含む親和性ペプチドは、イムノグロブリン単位におけるCH2ドメインに結合領域を有する好適なペプチドであるため、本発明では、このような親和性ペプチドの使用が好ましい。

上記親和性ペプチドのN末端およびC末端アミノ酸残基は、保護されていてもよい。また、上記親和性ペプチドにおける2つのシステイン残基(C)の側鎖のチオール基は、ジスルフィド結合により、またはリンカーを介して連結されていてもよい。

【0067】

好ましくは、(B)の親和性ペプチドは、以下からなる群より選ばれるものであってもよい：

(a) FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC (配列番号2)のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(b) FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKEDC (配列番号3)のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(c) FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC (配列番号4)のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(d) NMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC (配列番号5)のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；

(e) MQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC (配列番号6)のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド；および

(f) QCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC (配列番号7)のアミノ酸配列を含む親和性ペプチド。

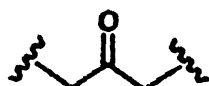
上記親和性ペプチドのN末端およびC末端アミノ酸残基は、保護されていてもよい。また、上記親和性ペプチドにおける2つのシステイン残基(C)の側鎖のチオール基は、ジスルフィド結合により、またはリンカーを介して連結されていてもよい。

【0068】

上記親和性ペプチドの各アミノ酸配列中の離間した少なくとも2つのシステイン残基は、ジスルフィド結合により環状ペプチドを形成することができる。あるいは、上記ペプチドにおいて、2つのシステイン残基中のチオール基は、以下で表されるカルボニル基含有リンカーにより連結されていてもよい。

【0069】

【化2】



【0070】

上記で表されるカルボニル基含有リンカーの破線部分は、チオール基との結合部分を意味する。当該リンカーは、通常のジスルフィド結合よりも、還元反応等に対して安定である。このようなペプチドは、例えば、国際公開第2016/186206号に記載される方法により、調製することができる。

【0071】

上記親和性ペプチドを構成するアミノ酸はL体またはD体のいずれであってもよいが、L体が好ましい（実施例ではペプチドを構成するアミノ酸残基は全てL体である）。上記親和性ペプチドは、架橋剤により特定のアミノ酸残基が修飾されて、式(I)の化合物またはその塩と連結されていてもよい。このような特定のアミノ酸残基としては、例えば、リジン残基、アスパラギン酸残基、およびグルタミン酸残基が挙げられるが、好ましくは、リジン残基である。架橋剤としては、例えば、DSG (disuccinimidyl glutarate、ジスクシンイミジルグルタレート)、DSS (disuccinimidyl suberate、ジスクシンイミジルスベレート)等のスクシンイミジル基を好ましくは2以上含む架橋剤、DMA (dimethyl adipimide・2HCl、アジプイミド酸ジメチル二塩酸塩)、DMP (dimethyl pimelidate・2HCl、ピメルイミド酸ジメチル二塩酸塩)、及びDMS (dimethyl suberimidate・2HCl、スベルイミド酸ジメチル二塩酸塩)等のイミド酸部分を好ましくは2以上含む架橋剤、並びにDTBP (dimethyl 3,3'-dithiobispropionimide・2HCl、3,3'-ジチオビスプロピオンイミド酸ジメチル二塩酸塩)及びDSP (dithiobis(succinimidyl propionate)、ジチオビススクシンイミジルプロピオン

酸)等のSS結合を有する架橋剤が挙げられる(例、国際公開第2016/186206号)。

【0072】

上記親和性ペプチドは、末端にあるアミノ基およびカルボキシ基が保護されていてもよい。N-末端アミノ基の保護基としては、例えば、アルキルカルボニル基(アシル基)(例、アセチル基、プロポキシ基、tert-ブトキシカルボニル基等のブトキシカルボニル基)、アルキルオキシカルボニル基(例、フルオレニルメトキシカルボニル基)、アリーロキシカルボニル基、アリールアルキル(アラルキル)オキシカルボニル基(例、ベンジルオキシカルボニル基)が挙げられる。N-末端アミノ基の保護基としては、アセチル基が好ましい。N-末端アミノ酸がグルタミン酸である場合、保護されたN-末端のグルタミン酸は、ピログルタミン酸の環状構造を有していてもよい。また、N-末端アミノ酸がグルタミンである場合、保護されたN-末端のグルタミンは、ピログルタミン酸型の環状構造を有していてもよい。C-末端カルボキシ基の保護基としては、例えば、エステルまたはアミドを形成可能な基が挙げられる。エステルまたはアミドを形成可能な基としては、例えば、アルキルオキシ基(例、メチルオキシ、エチルオキシ、プロピルオキシ、ブチルオキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ)、アリーロキシ基(例、フェニルオキシ、ナフチルオキシ)、アラルキルオキシ基(例、ベンジルオキシ)、アミノ基が挙げられる。C-末端カルボキシ基の保護基としては、アミノ基が好ましい。

10

【0073】

LaおよびLbによりそれぞれ示される第1リンカーおよび第2リンカーは、式(I)の化学構造から理解されるように2価の基である。第1リンカーにおける主鎖を構成する原子数、および第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数の合計は、5〜7個である。このような原子数を有する第1リンカーおよび第2リンカーの使用により、イムノグロブリン単位中の重鎖の288/290位のリジン残基を親和性ペプチド含有基で位置選択的に修飾でき、しかも抗体と親和性ペプチド含有基との結合の平均比率を所望の範囲(1.5〜2.5)に高度に制御することが容易になる。本発明では、抗体と所定の基(例、親和性ペプチド含有基)との結合の平均比率は、MS分析データをDAR calculator(Agilent社ソフト)により解析することで確認することができる。

20

【0074】

第1リンカーにおける主鎖を構成する原子数、および第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数の合計が5〜7個であることに照らすと、第1リンカーにおける主鎖を構成する原子数は1〜6個であり、第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数は1〜6個である。より具体的には、第1リンカーおよび第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数の関係は、以下である。

30

【0075】

【表1】

表1. 主鎖を構成する原子数

La	Lb
1	4〜6
2	3〜5
3	2〜4
4	1〜3
5	1、または2
6	1

40

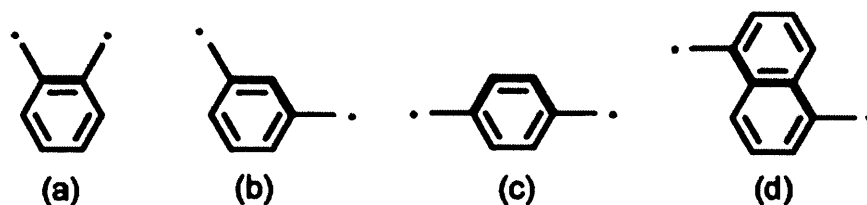
【0076】

第1リンカーおよび第2リンカーにおける主鎖は、鎖状構造、もしくは環状構造、またはこれらの組合せを含む構造から構成される。主鎖が環状構造を含まない鎖状構造である場合、主鎖の原子数は、鎖状構造中の原子数を数えることにより決定することができる。

50

一方、主鎖が環状構造を含む構造である場合、環状構造を構成する所定の原子数を、主鎖の原子数として数えることにより決定することができる。具体的には、環状構造における主鎖の原子数は、環状構造中の2つの結合手を連絡する最短経路の原子数を数えることにより決定することができる（例えば、以下（a）～（d）の太字経路を参照）。主鎖が、鎖状構造および環状構造の組合せを含む構造である場合、主鎖の原子数は、環状構造を含まない鎖状構造中の原子数を、環状構造中の2つの結合手を連絡する最短経路の原子数と合算することにより決定することができる。

【化3】



10

・は、結合手である。

（a）の場合、最短経路は太字経路であるため、主鎖の原子数として数えられる2個の環状構造中の原子数は、2である。

（b）の場合、最短経路は太字経路であるため、主鎖の原子数として数えられる2個の環状構造中の原子数は、3である。

20

（c）の場合、いずれの経路も最短経路（等距離）であるため、主鎖の原子数として数えられる2個の環状構造中の原子数は、4である。

（d）の場合、縮合部位の経路が最短経路であるため、主鎖の原子数として数えられる2個の環状構造中の原子数は、4である。

【0077】

第1リンカーおよび第2リンカーにおける主鎖は、上記のような主鎖を構成する原子数が1～6個となるように設定される。したがって、第1リンカーおよび第2リンカーにおける主鎖は、2個の直鎖炭化水素基、2個の環状炭化水素基、2個の複素環基、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-NR_d-$ （ R_d は水素原子、または置換基を示す。）、 $-O-$ 、 $-S-$ 、またはこれらの2以上（例、2または3）の組み合わせからなる基から構成されるものであってもよい。

30

【0078】

2個の直鎖炭化水素基は、直鎖アルキレン、直鎖アルケニレン、または直鎖アルキニレンである。

直鎖アルキレンは、炭素原子数1～6の直鎖アルキレンであり、炭素原子数1～4の直鎖アルキレンが好ましい。直鎖アルキレンとしては、例えば、メチレン、エチレン、*n*-プロピレン、*n*-ブチレン、*n*-ペンチレン、*n*-ヘキシレンが挙げられる。

直鎖アルケニレンは、炭素原子数2～6の直鎖アルケニレンであり、炭素原子数2～4の直鎖アルケニレンが好ましい。直鎖アルケニレンとしては、例えば、エチレニレン、*n*-プロピニレン、*n*-ブテニレン、*n*-ペンテニレン、*n*-ヘキセニレンが挙げられる。

40

直鎖アルキニレンは、炭素原子数2～6の直鎖アルキニレンであり、炭素原子数2～4の直鎖アルキニレンが好ましい。直鎖アルキニレンとしては、例えば、エチニレン、*n*-プロピニレン、*n*-ブチニレン、*n*-ペンチニレン、*n*-ヘキシニレンが挙げられる。

2個の直鎖炭化水素基としては、直鎖アルキレンが好ましい。

【0079】

2個の環状炭化水素基は、アリーレン、または2個の非芳香族環状炭化水素基である。このような2個の環状炭化水素基において2つの結合手を適宜設定することで、上記のような主鎖を構成する原子数が1～6個となるように設定することができる（以下、環状構造を有する基について同様）。

アリーレンとしては、炭素原子数6～14のアリーレンが好ましく、炭素原子数6～1

50

0のアリーレンがより好ましく、炭素原子数6のアリーレンが特に好ましい。アリーレンとしては、例えば、フェニレン、ナフチレン、アントラセニレンが挙げられる。

2価の非芳香族環状炭化水素基としては、炭素原子数3～12の単環式または多環式である2価の非芳香族環状炭化水素基が好ましく、炭素原子数4～10の単環式または多環式である2価の非芳香族環状炭化水素基がより好ましく、炭素原子数5～8の単環式である2価の非芳香族環状炭化水素基が特に好ましい。2価の非芳香族環状炭化水素基としては、例えば、シクロプロピレン、シクロブチレン、シクロペンチレン、シクロヘキシレン、シクロヘプチレン、シクロオクチレンが挙げられる。

2価の環状炭化水素基としては、アリーレンが好ましい。

【0080】

2価の複素環基は、2価の芳香族複素環基、または2価の非芳香族複素環基である。複素環を構成するヘテロ原子として、酸素原子、硫黄原子、窒素原子、リン原子、ホウ素原子およびケイ素原子からなる群から選択される1種以上を含むことが好ましく、酸素原子、硫黄原子および窒素原子からなる群から選択される1種以上を含むことがより好ましい。

2価の芳香族複素環基としては、炭素原子数3～15の2価の芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数3～9の2価の芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数3～6の2価の芳香族複素環基が特に好ましい。2価の芳香族複素環基としては、例えば、ピロールジイル、フランジイル、チオフェンジイル、ピリジンジイル、ピリダジンジイル、ピリミジンジイル、ピラジンジイル、トリアジンジイル、ピラゾールジイル、イミダゾールジイル、チアゾールジイル、イソチアゾールジイル、オキサゾールジイル、イソオキサゾールジイル、トリアゾールジイル、テトラゾールジイル、インドールジイル、プリンジイル、アントラキノンジイル、カルバゾールジイル、フルオレンジイル、キノリンジイル、イソキノリンジイル、キナゾリンジイル、およびフタラジンジイルが挙げられる。

2価の非芳香族複素環基としては、炭素原子数3～15の非芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数3～9の非芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数3～6の非芳香族複素環基が特に好ましい。2価の非芳香族複素環基としては、例えば、ピロールジオンジイル、ピロリンジオンジイル、オキシランジイル、アジリジンジイル、アゼチジンジイル、オキセタンジイル、チエタンジイル、ピロリジンジイル、ジヒドロフランジイル、テトラヒドロフランジイル、ジオキソランジイル、テトラヒドロチオフェンジイル、ピロリンジイル、イミダゾリジンジイル、オキサゾリジンジイル、ピペリジンジイル、ジヒドロピランジイル、テトラヒドロピランジイル、テトラヒドロチオピランジイル、モルホリンジイル、チオモルホリンジイル、ピペラジンジイル、ジヒドロオキサジンジイル、テトラヒドロオキサジンジイル、ジヒドロピリミジンジイル、およびテトラヒドロピリミジンジイルが挙げられる。

2価の複素環基としては、2価の芳香族複素環基が好ましい。

【0081】

Wは、酸素原子または硫黄原子を示し、好ましくは酸素原子を示す。

【0082】

L aおよびL bは、それぞれ、第1リンカーおよび第2リンカーを示す。第1リンカーおよび第2リンカーにおける主鎖は、炭素原子のみから構成されていてもよく、または炭素原子およびヘテロ原子（例、酸素原子、窒素原子、硫黄原子）の組合せから構成されていてもよいが、有機合成の容易さおよび安定性の向上等の観点より、炭素原子のみから構成されていてもよい。特定の場合、第1リンカーおよび第2リンカーにおける主鎖は、2価の直鎖炭化水素基、2価の環状炭化水素基、2価の複素環基、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、またはこれらの2以上（例えば2～4、好ましくは2または3）の組み合わせからなる基から構成されていてもよい。

【0083】

特定の実施形態では、L aにより示される第1リンカーにおける主鎖は、上記のような主鎖を構成する原子数が2～4個となるように設定されることが好ましい。この場合、L bにより示される第2リンカーにおける主鎖は、上記のような主鎖を構成する原子数が1

10

20

30

40

50

～5個となるように設定されることが好ましい。

【0084】

別の特定の実施形態では、L aにより示される第1リンカーにおける主鎖は、上記のような主鎖を構成する原子数が2個となるように設定されることが好ましい。この場合、L bにより示される第2リンカーにおける主鎖は、上記のような主鎖を構成する原子数が3～5個となるように設定されることが好ましい。

【0085】

L aにより示される第1リンカーにおける主鎖は、2価の直鎖炭化水素基、2価の環状炭化水素基、または2価の複素環基から構成されることが好ましい。L aがチオール基導入抗体誘導体、ならびに抗体および機能性物質のコンジュゲートに含まれる部分であるため、チオール基導入抗体誘導体およびコンジュゲートは、2価の直鎖炭化水素基、2価の環状炭化水素基、および2価の複素環基に比し相対的に安定性が低い（すなわち、反応性が高い） $-C(=O)-$ および $-C(=S)-$ を含まないことが好ましいためである。L aがチオール基導入抗体誘導体に含まれる部分であり、チオール基導入抗体誘導体のチオール基と機能性物質との反応に干渉しないように立体障害が低い基であることが好ましいこと、および有機合成が容易であることに照らすと、L aにより示される第1リンカーにおける主鎖は、炭素原子数2～4の2価の直鎖炭化水素基から構成されることがより好ましい。L aにより示される第1リンカーにおける主鎖は、エチレン基、プロピレン基、またはブチレン基であることがさらに好ましく、エチレン基であることが特に好ましい。

【0086】

一方、L bにより示される第2リンカーにおける主鎖は、抗体中間体には含まれるものの、抗体中間体から製造されるチオール基導入抗体誘導体、ならびに抗体および機能性物質のコンジュゲートには含まれない部分であるため、主鎖の安定性は問題となり難い。また、チオール基導入抗体誘導体を抗体中間体から製造する場合、チオカルボニル基（ $S-C=O$ ）におけるチオ基とカルボニル基との間で切断されて生じたチオール基は抗体に残存するものの、 $C(=W)-L b-C(=O)-Y$ で表される第2リンカー含有構造単位は抗体に残存しないため、この第2リンカーは、当該製造において分解されても支障はない。すなわち、第2リンカーにおける主鎖は、第1リンカーにおける主鎖と異なり、その安定性が問題となり難い。したがって、第2リンカーにおける主鎖は、2価の直鎖炭化水素基、2価の環状炭化水素基、2価の複素環基、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-NR_d-$ （ R_d は水素原子、または置換基を示す。）、 $-O-$ 、 $-S-$ 、またはこれらの2以上（例、2または3）の組み合わせからなる基から好適に構成することができる。第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数は、好ましくは1～5個であり、より好ましくは3～5個である。

【0087】

好ましくは、L bにより示される第2リンカーにおける主鎖は、合成の容易さ等の観点より、2価の直鎖炭化水素基、2価の環状炭化水素基、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-NR_d-$ （ R_d は水素原子、または置換基を示す。）、 $-O-$ 、 $-S-$ 、またはこれらの2以上（例、2または3）の組み合わせからなる基から構成されていてもよい。第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数は、好ましくは1～5個であり、より好ましくは3～5個である。

【0088】

より好ましくは、L bにより示される第2リンカーにおける主鎖は、2価の直鎖炭化水素基、2価の環状炭化水素基、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、またはこれらの2以上（例、2または3）の組み合わせから構成されていてもよい。第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数は、好ましくは1～5個であり、より好ましくは3～5個である。

【0089】

さらに好ましくは、L bにより示される第2リンカーにおける主鎖は、直鎖アルキレン、アリーレン、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、またはこれらの

10

20

30

40

50

2以上（例、2または3）の組み合わせから構成されていてもよい。第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数は、好ましくは1～5個であり、より好ましくは3～5個である。

【0090】

特に好ましくは、Lbにより示される第2リンカーにおける主鎖は、プロピレン、またはm-フェニレンであってもよい。

【0091】

第1リンカーおよび第2リンカーにおける主鎖を構成する基は、例えば1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1もしくは2個の置換基を有していてもよい。また、第1リンカーおよび第2リンカーにおける主鎖を構成する基の一つである上記Rdは、上記のとおり、置換基を示すことがある。このような置換基としては、例えば、以下が挙げられる：

(i') ハロゲン原子；

(ii') 1価の炭化水素基；

(iii') アラルキル；

(iv') 1価の複素環基；

(v') R_E-O- 、 $R_E-C(=O)-$ 、 $R_E-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_E-C(=O)-O-(R_E$ は、水素原子、もしくは1価の炭化水素基を示す。)；または

(vi') NR_fR_g- 、 $NR_fR_g-C(=O)-$ 、 $NR_fR_g-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_f-C(=O)-NR_g-$ (R_f および R_g は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは1価の炭化水素基を示す。)；

(vii') ニトロ基、硫酸基、スルホン酸基、シアノ基、およびカルボキシル基。

【0092】

上記置換基におけるハロゲン原子、1価の炭化水素基、アラルキル、および1価の複素環基の定義、例、および好ましい例は、それぞれ、上記R、 R_A 、および R_B および上記(i)～(iv)において説明したハロゲン原子、1価の炭化水素基、アラルキル、および1価の複素環基のものと同様である。

【0093】

好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

(i') ハロゲン原子；

(ii') 炭素原子数1～12のアルキル、フェニル、もしくはナフチル；

(iii') 炭素原子数3～15のアラルキル；

(iv') 5員または6員の複素環；

(v') R_E-O- 、 $R_E-C(=O)-$ 、 $R_E-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_E-C(=O)-O-(R_E$ は、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；

(vi') NR_fR_g- 、 $NR_fR_g-C(=O)-$ 、 $NR_fR_g-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_f-C(=O)-NR_g-$ (R_f および R_g は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；または

(vii') 上記(vii')で列挙したものと同一基。

【0094】

より好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

(i') ハロゲン原子；

(ii') 炭素原子数1～12のアルキル；

(iii') R_E-O- 、 $R_E-C(=O)-$ 、 $R_E-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_E-C(=O)-O-(R_E$ は、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；

(iv') NR_fR_g- 、 $NR_fR_g-C(=O)-$ 、 $NR_fR_g-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_f-C(=O)-NR_g-$ (R_f および R_g は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～12のアルキルを示す。)；または

(v') 上記(vii')で列挙したものと同一基。

【0095】

10

20

30

40

50

さらにより好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

(i') ハロゲン原子；

(ii') 炭素原子数 1～6 のアルキル；

(iii') R_e-O- 、 $R_e-C(=O)-$ 、 $R_e-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_e-C(=O)-O-$ (R_e は、水素原子、もしくは炭素原子数 1～6 のアルキルを示す。)；

(iv') NR_fR_g- 、 $NR_fR_g-C(=O)-$ 、 $NR_fR_g-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_f-C(=O)-NR_g-$ (R_f および R_g は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数 1～6 のアルキルを示す。)；または

(v') 上記 (vii') で列挙したものと同一基。

【0096】

特に好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

(i') ハロゲン原子；

(ii') 炭素原子数 1～4 のアルキル；

(iii') R_e-O- 、 $R_e-C(=O)-$ 、 $R_e-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_e-C(=O)-O-$ (R_e は、水素原子、もしくは炭素原子数 1～4 のアルキルを示す。)；

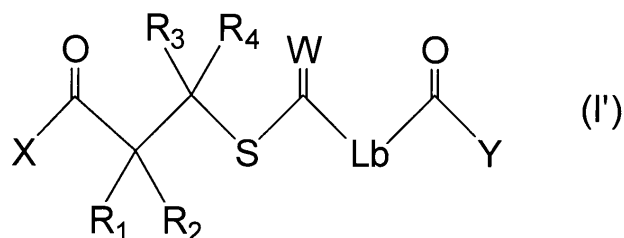
(iv') NR_fR_g- 、 $NR_fR_g-C(=O)-$ 、 $NR_fR_g-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_f-C(=O)-NR_g-$ (R_f および R_g は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数 1～4 のアルキルを示す。)；または

(v') 上記 (vii') で列挙したものと同一基。

【0097】

好ましくは、式 (I) で表される化合物は、下記式 (I') で表される化合物であってもよい。

【化 4】



〔式中、

X、Y、O、S および W は、式 (I) のものと同じであり、

Lb は、主鎖を構成する原子数が 3～5 個である第 2 リンカーを示し、

R₁、R₂、R₃、および R₄ は、各々独立して、水素原子、または置換基を示す。〕

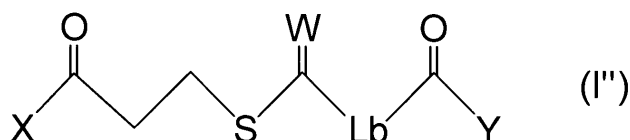
【0098】

式 (I') において、R₁、R₂、R₃、および R₄ により示される置換基の定義、例および好ましい例は、第 1 リンカーにおける主鎖を構成する基が有していてもよい上記置換基のものと同様である。

【0099】

より好ましくは、式 (I') で表される化合物は、下記式 (I'') で表される化合物であってもよい。

【化 5】



〔式中、

X、Y、O、S および W は、式 (I) のものと同じであり、

L bは、式（Ⅰ'）のものと同一である。）

【0100】

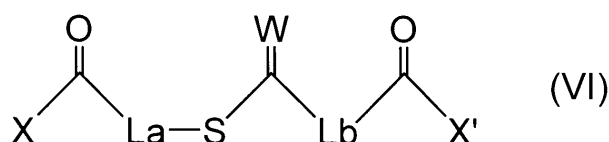
式（Ⅰ）～（Ⅰ'）で表される本発明の化合物またはその塩は、例えば、式（Ⅰ）～（Ⅰ'）で表される化合物またはその塩においてYの部分が高脱離基（Xよりも脱離する能力が高い脱離基）に置換された化合物またはその塩を合成し、次いで、この合成された化合物またはその塩を、親和性ペプチドと反応させることにより、得ることができる。例えば、このような反応は、適切な反応系（例、有機溶媒もしくは水溶液またはその混合溶媒中）において、適温（例、約15～200℃）で行うことができる。反応系は、適切な触媒を含んでいてもよい。反応時間は、例えば1分～20時間、好ましくは10分～15時間、より好ましくは20分～10時間、さらにより好ましくは30分～8時間である。

10

【0101】

好ましくは、式（Ⅰ）～（Ⅰ'）で表される化合物またはその塩においてYの部分が高脱離基（Xよりも脱離する能力が高い脱離基）に置換された化合物またはその塩は、下記式（ⅤⅠ）で表される化合物またはその塩であってもよい。

【化6】



20

〔式中、

Xは、脱離基を示し、

X'は、脱離基Xよりも脱離する能力が高い脱離基を示し、

Oは、酸素原子を示し、

Sは、硫黄原子を示し、

Wは、酸素原子または硫黄原子を示し、

Laは、第1リンカーを示し、

Lbは、第2リンカーを示し、

第1リンカーにおける主鎖を構成する原子数、および第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数の合計が、5～7個である。〕

30

【0102】

X'により示される、脱離基Xよりも脱離する能力が高い脱離基は、脱離基Xよりも脱離する能力が高い脱離基である限り特に限定されず、例えば、ペンタフルオロフェニルオキシ基、テトラフルオロフェニルオキシ基、パラニトロフェニルオキシ基、およびN-スクシンイミジルオキシ基が挙げられる。

【0103】

式（ⅤⅠ）におけるX（脱離基）、W（酸素原子または硫黄原子）、La（第1リンカー）、Lb（第2リンカー）等の記号、用語および表現の定義、例、および好ましい例は、上記式のものと同様である。

【0104】

式（ⅤⅠ）で表される化合物またはその塩は、例えば、式（Ⅰ）で表される化合物またはその塩を効率良く製造するための合成中間体として有用である。

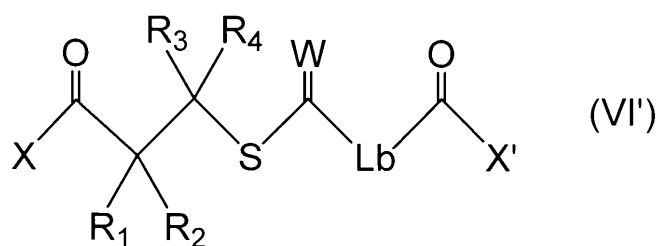
40

【0105】

より好ましくは、式（ⅤⅠ）で表される化合物は、下記式（ⅤⅠ'）で表される化合物であってもよい。

50

【化 7】



〔式中、

X、X'、O、SおよびWは、式(VI)のものと同じであり、

Lbは、主鎖を構成する原子数が3～5個である第2リンカーを示し、

R₁、R₂、R₃、およびR₄は、各々独立して、水素原子、または置換基を示す。〕

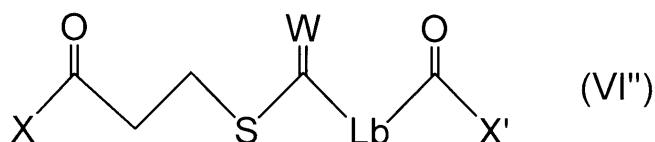
【0106】

式(VI')において、R₁、R₂、R₃、およびR₄により示される置換基の定義、例および好ましい例は、第1リンカーにおける主鎖を構成する基が有していてもよい上記置換基のものと同様である。

【0107】

さらに好ましくは、式(VI')で表される化合物は、下記式(VI'')で表される化合物であってもよい。

【化 8】



〔式中、

X、X'、O、SおよびWは、式(VI)のものと同じであり、

Lbは、式(VI')のものと同じである。〕

【0108】

特に好ましくは、式(VI'')で表される化合物は、下記式(VI''-1)または(VI''-2)で表される化合物であってもよい。

10

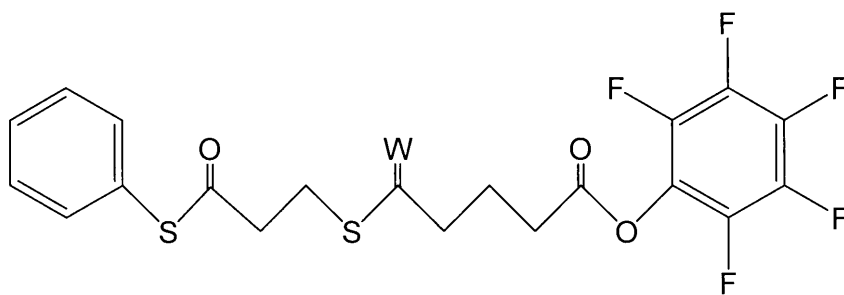
20

30

40

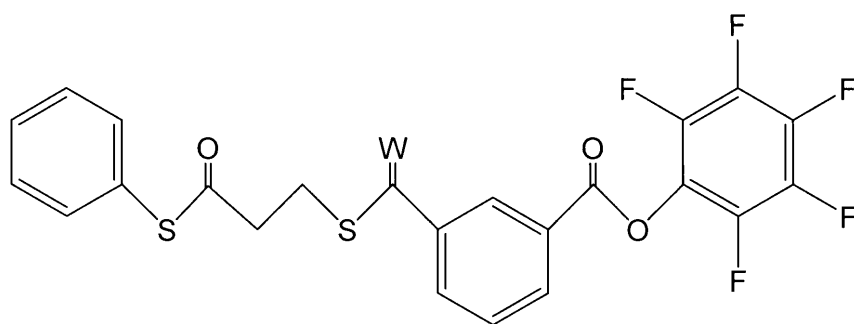
50

【化 9】



(VI''-1) または

10



(VI''-2)

20

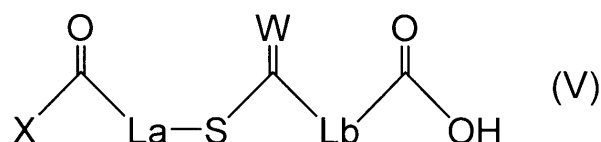
〔式中、

O、SおよびWは、式(VI)のものと同一であり、
Fは、フッ素原子である。〕

【0109】

式(VI)で表される化合物またはその塩は、下記式(V)で表される化合物またはその塩から製造することができる。

【化10】



(V)

30

〔式中、

Xは、脱離基を示し、
Oは、酸素原子を示し、
OHは、ヒドロキシ基を示し、
Sは、硫黄原子を示し、
Wは、酸素原子または硫黄原子を示し、
Laは、第1リンカーを示し、
Lbは、第2リンカーを示し、

第1リンカーにおける主鎖を構成する原子数、および第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数の合計が、5～7個である。〕

40

【0110】

式(V)におけるX(脱離基)、W(酸素原子または硫黄原子)、La(第1リンカー)、Lb(第2リンカー)等の記号、用語および表現の定義、例、および好ましい例は、上記式のものと同様である。

【0111】

式(VI)で表される化合物またはその塩は、式(V)で表される化合物またはその塩をカルボキシル基修飾試薬と反応させることにより得ることができる。カルボキシル基修飾試薬としては、例えば、ペンタフルオロフェニル化試薬(例、トリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル)、テトラフルオロフェニル化試薬(例、トリフルオロ酢酸テトラフル

50

オロフェニル)、パラニトロフェニル化試薬(例、トリフルオロ酢酸パラニトロフェニル)、N-スクシンイミジル化試薬(例、トリフルオロ酢酸N-スクシンイミジル)が挙げられる。例えば、このような反応は、適切な有機溶媒系(例、 CH_2Cl_2 等のハロゲン化アルキル(例、ハロゲン化メチル)、およびトリエチルアミン等のアミンを含む有機溶媒)において、適温(例、約 $-10\sim 30^\circ\text{C}$)で行うことができる。反応時間は、例えば1分～20時間、好ましくは10分～15時間、より好ましくは20分～10時間、さらにより好ましくは30分～8時間である。

【0112】

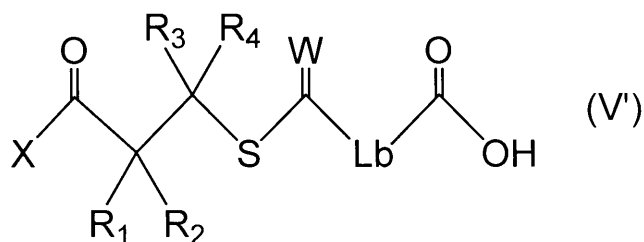
式(V)で表される化合物またはその塩は、例えば、式(VI)で表される化合物またはその塩を効率良く製造するための合成中間体として有用である。

10

【0113】

より好ましくは、式(V)で表される化合物は、下記式(V')で表される化合物であってもよい。

【化11】



20

〔式中、

X、O、OH、SおよびWは、式(V)のものと同じであり、

Lbは、主鎖を構成する原子数が3～5個である第2リンカーを示し、

R₁、R₂、R₃、およびR₄は、各々独立して、水素原子、または置換基を示す。〕

【0114】

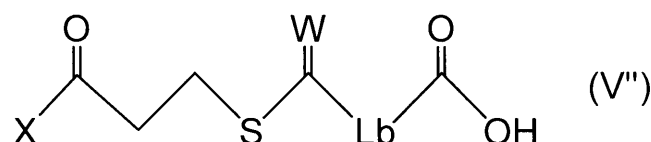
式(V')において、R₁、R₂、R₃、およびR₄により示される置換基の定義、例および好ましい例は、第1リンカーにおける主鎖を構成する基が有していてもよい上記置換基のものと同様である。

【0115】

30

より好ましくは、式(V')で表される化合物は、下記式(V'')で表される化合物であってもよい。

【化12】



〔式中、

X、O、OH、SおよびWは、式(V)のものと同じであり、

Lbは、式(V')のものと同じである。〕

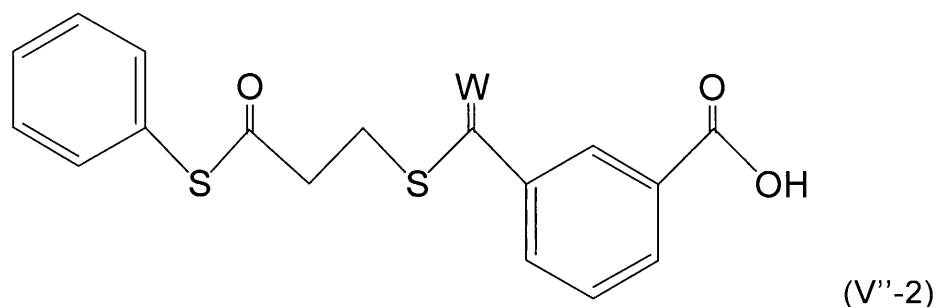
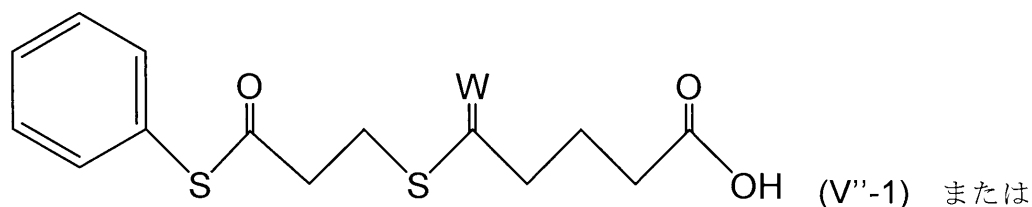
40

【0116】

特に好ましくは、式(V'')で表される化合物は、下記式(V''-1)または(V''-2)で表される化合物であってもよい。

50

【化 13】



10

〔式中、

O、OH、SおよびWは、式（V）のものと同一である。〕

【0117】

式（V）で表される化合物は、 $X-C(=O)-La-SH$ で表される化合物を、 $HO-C(=W)-Lb-C(=O)-OH$ で表されるジカルボン酸化合物、または当該ジカルボン酸化合物の分子内縮合反応により生成する環状化合物と反応させることにより得ることができる（例、実施例（1-3）および（2-1）を参照）。例えば、このような反応は、適切な有機溶媒系において、適温（例、約4～60℃）で行うことができる。反応時間は、例えば1分～20時間、好ましくは10分～15時間、より好ましくは20分～10時間、さらにより好ましくは30分～8時間である。

20

【0118】

上記のような一連の化合物またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC）、NMR、または質量分析により、行うことができる。このような化合物またはその塩は、クロマトグラフィー（例、上述したクロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィー）等の任意の方法により適宜精製することができる。

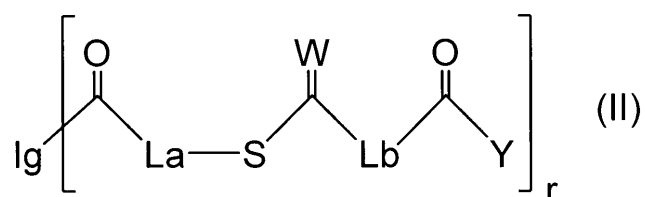
30

【0119】

3. 抗体中間体またはその塩

本発明は、下記式（II）で表される構造単位を含む抗体中間体またはその塩を提供する。

【化 14】



40

〔式中、

Igは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、E u n u m b e r i n gに従う2個の重鎖中の288／290位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Igに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

Yは、イムノグロブリン単位におけるCH2ドメインに結合領域を有する親和性ペプチ

50

ドを示し、

Oは、酸素原子を示し、

Sは、硫黄原子を示し、

Wは、酸素原子または硫黄原子を示し、

L aは、第1リンカーを示し、

L bは、第2リンカーを示し、

第1リンカーにおける主鎖を構成する原子数、および第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数の合計が、5～7個であり、

2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率 r は、1.5～2.5である。]

【0120】

I gにより示されるイムノグロブリン単位は、上述のとおりである。式(II)におけるY(親和性ペプチド)、W(酸素原子または硫黄原子)、L a(第1リンカー)、L b(第2リンカー)等の記号、用語および表現の定義、例、および好ましい例は、上記式のものと同様である。

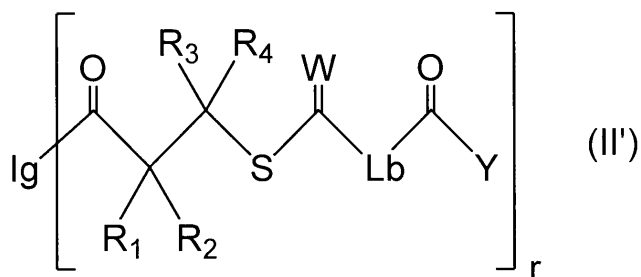
【0121】

式(II)において、2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率(r)は、イムノグロブリン単位と親和性ペプチド含有基との結合の平均比率(親和性ペプチド含有基数/イムノグロブリン単位)を示す。このような平均比率は、1.5～2.5である。このような平均比率は、好ましくは1.6以上、より好ましくは1.7以上、さらにより好ましくは1.8以上、特に好ましくは1.9以上であってもよい。このような平均比率はまた、好ましくは2.4以下、より好ましくは2.3以下、さらにより好ましくは2.2以下、特に好ましくは2.1以下であってもよい。より具体的には、このような平均比率は、好ましくは1.6～2.4、より好ましくは1.7～2.3、さらにより好ましくは1.8～2.2、特に好ましくは1.9～2.1であってもよい。

【0122】

好ましくは、式(II)で表される構造単位は、下記式(II')で表される構造単位であってもよい。

【化15】



〔式中、

I g、Y、O、S、Wおよび r は、式(II)のものと同じであり、

L bは、主鎖を構成する原子数が3～5個である第2リンカーを示し、

R₁、R₂、R₃、およびR₄は、各々独立して、水素原子、または置換基を示す。〕で表される構造単位であってもよい。

【0123】

式(II')において、R₁、R₂、R₃、およびR₄により示される置換基の定義、例および好ましい例は、第1リンカーにおける主鎖を構成する基が有していてもよい上記置換基のものと同様である。

【0124】

より好ましくは、式(II')で表される構造単位は、下記式(II'')で表される構造単位であってもよい。

10

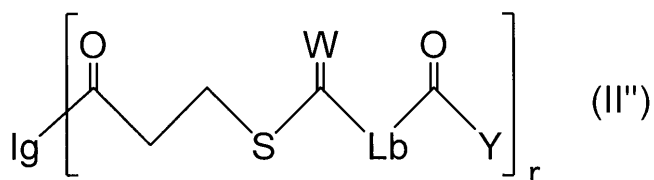
20

30

40

50

【化 16】



〔式中、

Ig、Y、O、S、Wおよびrは、式（II）のものと同じであり、

Lbは、式（II'）のものと同じである。〕

【0125】

本発明の抗体中間体またはその塩は、本発明の化合物またはその塩を、上記イムノグロブリン単位を含む抗体と反応させることにより、得ることができる。反応では、先ず、本発明の化合物またはその塩が抗体と混合される。これにより、本発明の化合物またはその塩が、抗体と親和性を有する親和性ペプチドを介して抗体と会合することができる。次に、抗体の会合後に、脱離基（X）を有するカルボニル基（X-C=O）が、抗体の288／290位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基と位置選択的に反応することができる。このような反応により、当該アミノ基とカルボニル基の炭素原子とが結合し、かつ脱離基（X）がカルボニル基から脱離して、本発明の抗体中間体またはその塩が得られる。反応における、抗体に対する本発明の化合物またはその塩のモル比率（本発明の化合物またはその塩／抗体）は、本発明の化合物またはその塩、および抗体の種類等の因子に応じて変動することから特に限定されないが、例えば1～100であり、好ましくは2～80であり、より好ましくは4～60であり、さらにより好ましくは5～50であり、特に好ましくは6～30である。

【0126】

このような反応は、タンパク質の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない条件（温和な条件）下で適宜行うことができる。例えば、このような反応は、適切な反応系、例えば緩衝液中において、室温（例、約15～30℃）で行うことができる。緩衝液のpHは、例えば5～9であり、好ましくは5.5～8.5であり、より好ましくは6.0～8.0である。緩衝液は、適切な触媒を含んでいてもよい。反応時間は、例えば1分～20時間、好ましくは10分～15時間、より好ましくは20分～10時間、さらにより好ましくは30分～8時間である。このような反応の詳細については、例えば、G. J. L. Bernardes et al., Chem. Rev., 115, 2174 (2015); G. J. L. Bernardes et al., Chem. Asian J., 4, 630 (2009); B. G. Davies et al., Nat. Commun., 5, 4740 (2014); A. Wagner et al., Bioconjugate Chem., 25, 825 (2014)を参照のこと。

【0127】

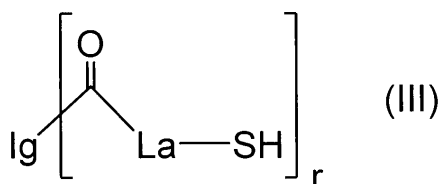
抗体中間体またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC）、または質量分析により、行うことができる。位置選択性の確認は、例えば、ペプチドマッピングにより行うことができる。ペプチドマッピングは、例えば、プロテアーゼ処理および質量分析により行うことができる。プロテアーゼとしては、エンドプロテアーゼが好ましい。このようなエンドプロテアーゼとしては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、Glu-C、Lys-N、Lys-C、Asp-Nが挙げられる。親和性ペプチドの導入個数の確認は、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。抗体中間体またはその塩は、クロマトグラフィー（例、上述したクロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィー）等の任意の方法により適宜精製することができる。

【0128】

4. チオール基導入抗体誘導体またはその塩

本発明は、下記式（ⅢⅢ）で表される構造単位を含む、チオール基導入抗体誘導体またはその塩を提供する。

【化17】



10

〔式中、

I g は、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、E u n u m b e r i n g に従う 2 個の重鎖中の 288 / 290 位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、I g に隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

O は、酸素原子を示し、

S H は、チオール基を示し、

L a は、第 1 リンカーを示し、

第 1 リンカーにおける主鎖を構成する原子数が 2 ～ 4 個であり、

2 個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率 r は、1.5 ～ 2.5 である。〕

20

【0129】

I g により示されるイムノグロブリン単位は、上述のとおりである。式（ⅢⅢ）における L a （第 1 リンカー）等の記号、用語および表現の定義、例、および好ましい例は、上記式のものと同様である。

【0130】

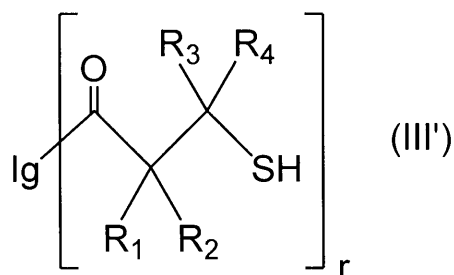
式（ⅢⅢ）において、2 個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率（ r ）は、イムノグロブリン単位とチオール含有基との結合の平均比率（チオール含有基数 / イムノグロブリン単位）を示す。このような平均比率は、1.5 ～ 2.5 である。このような平均比率は、好ましくは 1.6 以上、より好ましくは 1.7 以上、さらにより好ましくは 1.8 以上、特に好ましくは 1.9 以上であってもよい。このような平均比率はまた、好ましくは 2.4 以下、より好ましくは 2.3 以下、さらにより好ましくは 2.2 以下、特に好ましくは 2.1 以下であってもよい。より具体的には、このような平均比率は、好ましくは 1.6 ～ 2.4、より好ましくは 1.7 ～ 2.3、さらにより好ましくは 1.8 ～ 2.2、特に好ましくは 1.9 ～ 2.1 であってもよい。

30

【0131】

好ましくは、式（ⅢⅢ）で表される構造単位は、下記式（ⅢⅢ'）で表される構造単位であってもよい。

【化18】



40

〔式中、

I g、O、S H および r は、式（ⅢⅢ）のものと同じであり、

R₁、R₂、R₃、および R₄ は、各々独立して、水素原子、または置換基を示す。〕

50

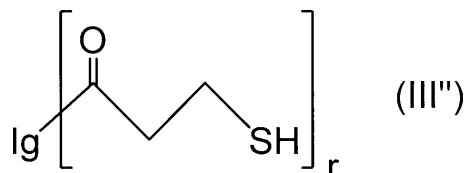
【0132】

式（ⅠⅠⅠ'）において、 R_1 、 R_2 、 R_3 、および R_4 により示される置換基の定義、例および好ましい例は、第1リンカーにおける主鎖を構成する基が有していてもよい上記置換基のものと同様である。

【0133】

より好ましくは、式（ⅠⅠⅠ'）で表される構造単位は、下記式（ⅠⅠⅠ''）で表される構造単位であってもよい。

【化19】



10

〔式中、

Ig 、 O 、 SH および r は、式（ⅠⅠⅠ）のものと同一である。〕

【0134】

本発明のチオール基導入抗体誘導体またはその塩は、本発明の抗体中間体またはその塩を、チオエステルの切断反応に供することにより、得ることができる。チオエステルの切断反応は、タンパク質（イムノグロブリン／抗体）の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない条件（上述したような温和な条件）下で行うことができる。より具体的には、 $\text{pH} 4.0 \sim \text{pH} 8.0$ 、 $10 \text{ mM} \sim 10 \text{ M}$ の範囲にあるヒドロキシルアミン塩酸塩溶液中で1時間攪拌することで切断できる（例、Vance, N. et al., Bioconjugate Chem. 2019, 30, 148-160.）。

20

【0135】

チオール基導入抗体誘導体またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC）、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。位置選択性の確認は、例えば、ペプチドマッピングにより行うことができる。ペプチドマッピングは、例えば、プロテアーゼ（例、トリプシン、キモトリプシン、）処理および質量分析により行うことができる。プロテアーゼとしては、エンドプロテアーゼが好ましい。このようなエンドプロテアーゼとしては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、 Glu-C 、 Lys-N 、 Lys-C 、 Asp-N が挙げられる。チオール基の導入個数の確認は、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。チオール基導入抗体誘導体またはその塩は、クロマトグラフィー（例、上述したクロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィー）等の任意の方法により適宜精製することができる。

30

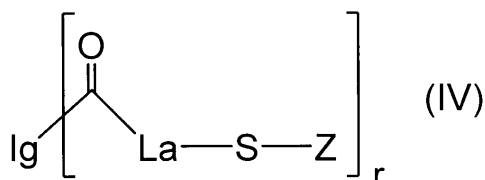
【0136】

5. 抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩

40

本発明は、下記式（ⅠⅤ）で表される構造単位を含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩を提供する。

【化20】



〔式中、

50

I g は、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位を示し、かつ、E u n u m b e r i n g に従う 2 個の重鎖中の 288 / 290 位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、I g に隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

O は、酸素原子を示し、

S は、硫黄原子を示し、

Z は、機能性物質を示し、

L a は、第 1 リンカーを示し、

第 1 リンカーにおける主鎖を構成する原子数が 2 ~ 4 個であり、

2 個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率 r は、1.5 ~ 2.5 である。]

【0137】

I g により示されるイムノグロブリン単位は、上述のとおりである。式 (I V) における L a (第 1 リンカー) 等の記号、用語および表現の定義、例、および好ましい例は、上記式のものと同様である。

【0138】

機能性物質は、抗体に任意の機能を付与する物質である限り特に限定されず、例えば、薬物、標識物質、安定化剤が挙げられるが、好ましくは薬物または標識物質である。機能性物質はまた、単一の機能性物質であってもよく、または 2 以上の機能性物質が連結された物質であってもよい。

【0139】

薬物としては、任意の疾患に対する薬物であってもよい。このような疾患としては、例えば、癌（例、肺癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、腎臓癌、肝臓癌、甲状腺癌、前立腺癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮癌、骨癌、皮膚癌、脳腫瘍、黒色腫）、自己免疫疾患・炎症性疾患（例、アレルギー疾患、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス）、脳神経疾患（例、脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症）、感染症（例、細菌感染症、ウイルス感染症）、遺伝性・希少疾患（例、遺伝性球状赤血球症、非ジストロフィー筋緊張症）、眼疾患（例、加齢黄斑変性症、糖尿病網膜症、網膜色素変性症）、骨・整形外科領域の疾患（例、変形性関節症）、血液疾患（例、白血病、紫斑病）、その他の疾患（例、糖尿病、高脂血症等の代謝異常症、肝臓疾患、腎疾患、肺疾患、循環器系疾患、消化器系疾患）が挙げられる。薬物は、疾患の予防または治療薬、副作用の緩和薬であってもよい。

【0140】

より具体的には、薬物は、抗癌剤である。抗癌剤としては、例えば、化学療法剤、毒素、放射性同位体またはそれを含む物質が挙げられる。化学療法剤としては、例えば、DNA 損傷剤、代謝拮抗薬、酵素阻害剤、DNA インターカレート剤、DNA 切断剤、トポイソメラーゼ阻害剤、DNA 結合阻害剤、チューブリン結合阻害剤、細胞傷害性ヌクレオシド、白金化合物が挙げられる。毒素としては、例えば、細菌毒素（例、ジフテリア毒素）、植物毒素（例、リシン）が挙げられる。放射性同位体としては、例えば、水素原子の放射性同位体（例、 ^3H ）、炭素原子の放射性同位体（例、 ^{14}C ）、リン原子の放射性同位体（例、 ^{32}P ）、硫黄原子の放射性同位体（例、 ^{35}S ）、イットリウム⁹⁰の放射性同位体（例、 ^{90}Y ）、テクネチウム^{99m}の放射性同位体（例、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、インジウム¹¹¹の放射性同位体（例、 ^{111}In ）、ヨウ素¹²³の放射性同位体（例、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{129}I 、 ^{131}I ）、サマリウム¹⁵³の放射性同位体（例、 ^{153}Sm ）、レニウム¹⁸⁶の放射性同位体（例、 ^{186}Re ）、アスタチン²¹¹の放射性同位体（例、 ^{211}At ）、ビスマス²¹²の放射性同位体（例、 ^{212}Bi ）が挙げられる。更に具体的には、薬物として、オーリスタチン（MMAE、MMAF）、メイタンシン（DM1、DM4）、PBD（ピロロベンゾジアゼピン）、IGN、カンプトテシン類縁体、カリケアミシン、デュオカルミシン、エリブリン、アントラサイクリン、dmDNA31、ツブリシンが挙げられる。

【0141】

標識物質は、標的（例、組織、細胞、物質）の検出を可能にする物質である。標識物質としては、例えば、酵素（例、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラ

10

20

30

40

50

ーゼ、 β ガラクトシダーゼ)、親和性物質(例、ストレプトアビジン、ビオチン、ジゴキシゲニン、アプタマー)、蛍光物質(例、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質)、発光物質(例、ルシフェリン、エクオリン、アクリジニウムエステル、トリス(2, 2'-ビピリジル)ルテニウム、ルミノール)、放射性同位体(例、上述したもの)、またはそれを含む物質が挙げられる。

【0142】

安定化剤は、抗体の安定化を可能にする物質である。安定化剤としては、例えば、ジオール類、グリセリン、非イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤、天然系界面活性剤、サッカリド、およびポリオール類が挙げられる。

【0143】

機能性物質はまた、ペプチド、タンパク質、核酸、低分子有機化合物、糖鎖、脂質、高分子ポリマー、金属(例、金)、キレーターであってもよい。ペプチドとしては、例えば、細胞膜透過ペプチド、血液脳関門透過性ペプチド、ペプチド医薬品が挙げられる。タンパク質としては、例えば、酵素、サイトカイン、フラグメント抗体、レクチン、インターフェロン、血清アルブミン、抗体が挙げられる。核酸としては、例えば、DNA、RNA、人工核酸が挙げられる。核酸としてはまた、例えば、RNA干渉誘導性核酸(例、siRNA)、アプタマー、アンチセンスが挙げられる。低分子有機化合物としては、例えば、タンパク質分解誘導キメラ分子、色素、光分解性化合物が挙げられる。

【0144】

機能性物質がチオール基と反応し易い官能基を有しない場合、機能性物質は、このような官能基を有するように誘導体化されてもよい。誘導体化は、当該分野における技術常識である(例、国際公開第2004/010957号、米国特許出願公開第2006/0074008号明細書、米国特許出願公開第2005/0238649号明細書)。例えば、誘導体化は、任意の架橋剤を用いて行われてもよい。あるいは、誘導体化は、所望の官能基を有する特定のリンカーを用いて行われてもよい。例えば、このようなリンカーは、適切な環境(例、細胞内または細胞外)において機能性物質と抗体とをリンカーの切断により分離可能なものであってもよい。このようなリンカーとしては、例えば、特定のプロテアーゼ(例、細胞内プロテアーゼ(例、リソソーム、またはエンドソーム中に存在するプロテアーゼ)、細胞外プロテアーゼ(例、分泌性プロテアーゼ))で分解されるペプチジルリンカー(例、米国特許第6,214,345号; Dubowchik et al., Pharm. Therapeutics 83:67-123(1999))、生体内に存在する局所酸性部位で切断され得るリンカー(例、米国特許第5,622,929号、同第5,122,368号; 同第5,824,805号)が挙げられる。リンカーは、自壊的(self-immolative)であってもよい(例、国際公開第02/083180号、国際公開第04/043493号、国際公開第05/112919号)。本発明では、誘導体化された機能性物質も、単に「機能性物質」と呼称される。

【0145】

式(IV)において、2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率(r)は、イムノグロブリン単位と機能性物質含有基との結合の平均比率(機能性物質含有基数/イムノグロブリン単位)を示す。このような平均比率は、1.5~2.5である。このような平均比率は、好ましくは1.6以上、より好ましくは1.7以上、さらにより好ましくは1.8以上、特に好ましくは1.9以上であってもよい。このような平均比率はまた、好ましくは2.4以下、より好ましくは2.3以下、さらにより好ましくは2.2以下、特に好ましくは2.1以下であってもよい。より具体的には、このような平均比率は、好ましくは1.6~2.4、より好ましくは1.7~2.3、さらにより好ましくは1.8~2.2、特に好ましくは1.9~2.1であってもよい。

【0146】

好ましくは、式(IV)で表される構造単位が、下記式(IV')で表される構造単位であってもよい。

10

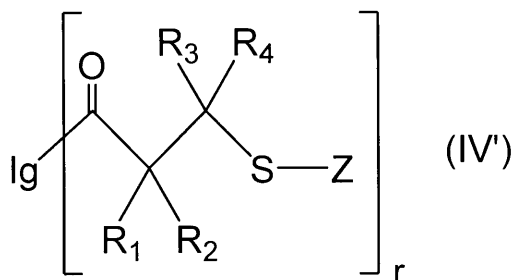
20

30

40

50

【化 2 1】



〔式中、

Ig、O、S、Zおよびrは、式（IV）のものと同じであり、

R₁、R₂、R₃、およびR₄は、各々独立して、水素原子、または置換基を示す。〕

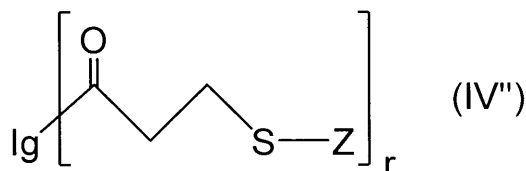
【0147】

式（IV'）において、R₁、R₂、R₃、およびR₄により示される置換基の定義、例および好ましい例は、第1リンカーにおける主鎖を構成する基が有していてもよい上記置換基のものと同様である。

【0148】

好ましくは、式（IV'）で表される構造単位が、下記式（IV''）で表される構造単位であってもよい。

【化 2 2】



〔式中、

Ig、O、S、Zおよびrは、式（IV）のものと同じである。〕

【0149】

本発明のコンジュゲートまたはその塩は、本発明のチオール基導入抗体誘導体またはその塩を、機能性物質と反応させることにより、得ることができる。このような反応は、タンパク質（イムノグロブリン／抗体）の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない条件（上述したような温和な条件）下で行うことができる。機能性物質としては、温和な条件下でチオール基と反応できる任意の官能基を有するものを使用することができるが、チオール基と反応し易い官能基の使用が好ましい。このような官能基としては、例えば、マレイミド基、ジスルフィド基、α-ハロケトン、α-ハロアミド、ベンジルブロミド、ヨードアルキルが挙げられる。あるいは、機能性物質が、生体直交性官能基と反応し易い官能基を有しない場合、機能性物質として、上述のように誘導体化されたものを使用することができる。反応において、チオール基導入抗体誘導体またはその塩に対する機能性物質のモル比率（機能性物質／チオール基導入抗体誘導体またはその塩）は、チオール基導入抗体誘導体またはその塩、および機能性物質の種類、および反応時間等の因子に応じて変動することから特に限定されないが、例えば2以上、好ましくは3以上、より好ましくは5以上である。チオール基導入抗体誘導体のチオール基に対して機能性物質を短い反応時間で十分に反応させるためには、チオール基導入抗体誘導体またはその塩に対する十分量（例、過剰量）の機能性物質を用いることができる。

【0150】

コンジュゲートまたはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC）、また

10

20

30

40

50

は質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。位置選択性の確認は、例えば、ペプチドマッピングにより行うことができる。ペプチドマッピングは、例えば、プロテアーゼ（例、トリプシン、キモトリプシン、）処理および質量分析により行うことができる。プロテアーゼとしては、エンドプロテアーゼが好ましい。このようなエンドプロテアーゼとしては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、G l u - C、L y s - N、L y s - C、A s p - Nが挙げられる。機能性物質の導入個数の確認は、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。コンジュゲートまたはその塩は、クロマトグラフィー（例、上述したクロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィー）等の任意の方法により適宜精製することができる。

10

【0151】

6. 用途

本発明の化合物またはその塩は、例えば、抗体の288／29位のリジン残基を位置選択的に修飾することができる。したがって、本発明は、本発明の化合物またはその塩を含む、抗体誘導体化用試薬を提供する。

【0152】

本発明の試薬は、他の成分をさらに含む組成物の形態で提供されてもよい。このような他の成分としては、例えば、溶液、安定化剤（例、酸化防止剤、保存剤）が挙げられる。溶液としては、水溶液が好ましい。水溶液としては、例えば、水（例、蒸留水、滅菌蒸留水、精製水、生理食塩水）、緩衝液（例、リン酸水溶液、T r i s - 塩酸緩衝液、炭酸一重炭酸緩衝液、ホウ酸水溶液、グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液、クエン酸緩衝液）が挙げられるが、緩衝液が好ましい。溶液のpHは、例えば5.0～9.0、好ましくは5.5～8.5である。本発明の試薬は、液状または粉末状（例、凍結乾燥粉末）において提供することができる。

20

【0153】

本発明の抗体中間体またはその塩、および本発明のチオール基導入抗体誘導体またはその塩は、例えば、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩の調製のための中間体として有用である。

【0154】

本発明のコンジュゲートまたはその塩は、例えば、医薬、または試薬（例、診断薬、研究用試薬）として有用である。特に、機能性物質で位置選択的に修飾されており、しかも抗体と機能性物質との結合の平均比率が所望の範囲（1.5～2.5）に高度に制御されている本発明のコンジュゲートまたはその塩は、医薬として有用である。抗体薬物複合体（ADC）の薬物の結合数および結合位置を変化させると、体内動態や薬物の放出速度、効果が変化することが報告されている。これらのことから次世代型ADCではコンジュゲーションする薬物の個数と位置を制御することが求められている。個数および位置が一定であると、期待通りのe f f i c a c y、コンジュゲーション薬剤のバリエーション、ロット違いいわゆるレギュレーションの問題が解決すると考えられている。したがって、本発明のコンジュゲートまたはその塩は、このようなレギュレーションの問題を解決することができる。

30

【0155】

本発明のコンジュゲートまたはその塩は、医薬組成物の形態において提供されてもよい。このような医薬組成物は、本発明のコンジュゲートまたはその塩に加えて、医薬上許容され得る担体を含んでもよい。医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等

40

50

の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。本発明のコンジュゲートまたはその塩はまた、安定性を実現する任意の修飾（例、PEG化）を有していてもよい。

【0156】

経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量のリガンドを溶解させた液剤、有効量のリガンドを固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤または錠剤、適当な分散媒中に有効量の有効成分を懸濁させた懸濁液剤、有効量の有効成分を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

【0157】

医薬組成物は、非経口的な投与（例、静脈内注射、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与）に好適である。このような非経口的な投与に好適な医薬組成物としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。

【0158】

医薬組成物の投与量は、有効成分の種類・活性、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なるが、適宜設定することができる。

【実施例】

【0159】

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0160】

【実施例1：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドチオエステルリンカー連結物—チオフェノール活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2抗体トラスツズマブの修飾およびその解析】

（1-1）IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

可溶性タンパク質に対する親和性物質であるAc-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂（配列番号2）のペプチドをFmoc固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はCEM社製Liberty Blueを使用した。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用した。ResinはFmoc-NH-SAL-PEG Resin, HL、アルギニン（R）、システイン（C）、ヒスチジン（H）はダブルカップリングを行った。Resinからの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール＝94：2.5：1.0：2.5の溶液中3時間攪拌の条件で行った。切り出し後Resinをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈殿を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを0.1%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.1%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行った。

【0161】

（1-2）Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂（配列番号2）の5位と34位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

（1-1）で合成したペプチドをDMSOに溶解し、0.1M Tris-HCl pH

10

20

30

40

50

8.0を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で20時間攪拌した。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸0.05%を含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物(20.0mg, 4.70 μ mol)を得た。

【0162】

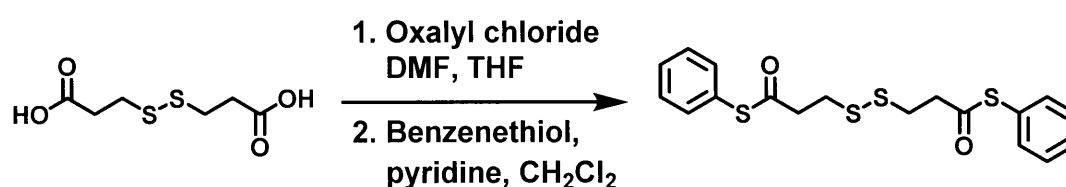
MS (ESI) m/z : $z=4$ 1063.65 $[M+4H]^{4+}$, $z=5$ 851.15 $[M+5H]^{5+}$

【0163】

(1-3) チオエステルリンカーの合成

(1-3-1)

【化23】



3,3'-Dithiodipropionic Acid (1g, 5.0mmol)をTHF(10mL)に溶解し、0℃でDMF(100 μ L)、Oxalyl Chloride(1.5mL、15.0mmol)を加え0℃で15分、常温で1時間攪拌した。その後、0℃でBenzenethiol(1.53mL、15.0mmol)、Pyridine(4mL、50mmol)、CH₂Cl₂(10mL)を加え常温で3時間攪拌した。TLC(ヘキサン/酢酸エチル=5/1)で反応を確認後、結晶を除去し、酢酸エチルと1M塩酸水溶液で抽出後、有機層を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC(ヘキサン/酢酸エチル=5/1)により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を(1.2g、3.04mmol)得た。

【0164】

(1-3-2)

【化24】



【0165】

(1-3-1)で合成した化合物(1.2g、3.04mmol)をDMF/H₂O=5/1の混合溶媒に溶解し、TCEP·HCl(1.74g、6.08mmol)を加え常温で1時間攪拌した。TLC(ヘキサン/酢酸エチル=5/1)で反応を確認後、酢酸エチルと水で抽出後、有機層を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC(ヘキサン/酢酸エチル=5/1)により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を(1.18g、6.5mmol)得た。

【0166】

(1-3-3)

10

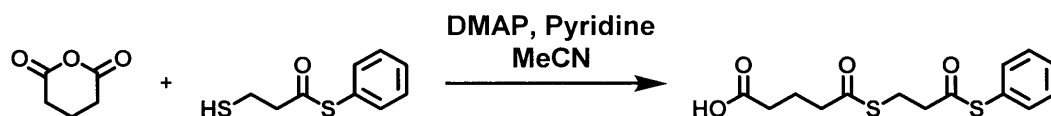
20

30

40

50

【化 2 5】

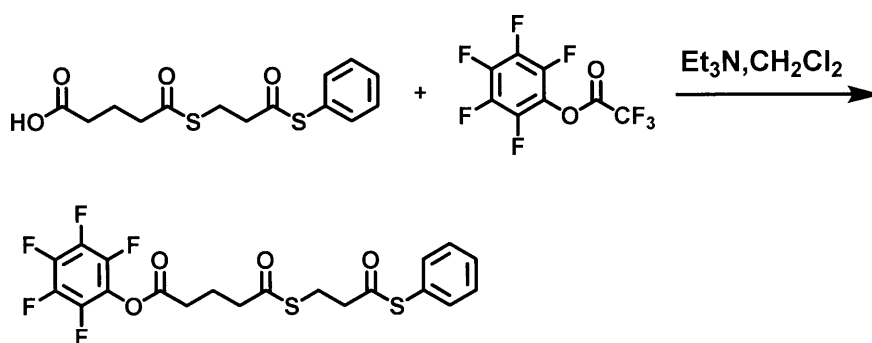


(1-3-2) で合成した化合物 (200 mg、1.10 mmol) をアセトニトリル (2.0 mL) に溶解し、Glutaric Anhydride (125.5 mg、1.10 mmol)、DMAP (6.72 mg、0.06 mmol)、Pyridine (0.22 mL) を加え常温で4時間攪拌した。TLC (ジクロロメタン/メタノール=10/1) で反応を確認後、酢酸エチルと0.5 M HCl で抽出し、有機層を濃縮した。ジクロロメタンとメタノールの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC (ジクロロメタン/メタノール=10/1) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を (135 mg、0.45 mmol) 得た。

【0167】

(1-3-4)

【化 2 6】



【0168】

(1-3-3) で合成した化合物 (134 mg、0.45 mmol) にCH₂Cl₂ (2.25 mL)、トリエチルアミン (157 μL、1.13 mmol) を加え、溶解した。0℃でペンタフルオロフェニルトリフルオロ酢酸 (154 μL、0.90 mmol) を加え、1時間攪拌した。TLC (ヘキサン/酢酸エチル=3/1) で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC (ヘキサン/酢酸エチル=3/1) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を (96 mg、0.20 mmol) 得た。

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ = 7.44 (s, 5H), 3.23 (t, J=6.9, 2H), 3.01 (t, J=6.9, 2H), 2.77 (dt, J=14.5, 7.3, 4H), 2.16 (t, J=7.3, 2H).

【0169】

(1-4) ペプチドとリンカーの結合

10

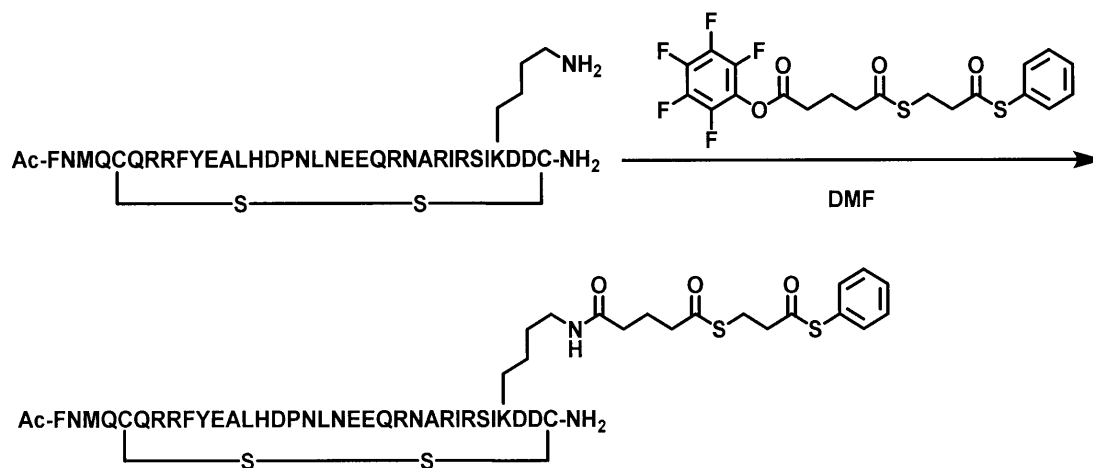
20

30

40

50

【化 27】



10

上記2つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号2のアミノ酸配列である。

【0170】

(1-2)で合成したAc-FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂ (配列番号2) (30.0mg, 7.06μmol、ただし5番目と34番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00mL)に溶解し、(1-3)で合成したチオエステルリンカー(96.0mg、201μmol)を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドチオエステルリンカー-チオフェノール活性化体(15.8mg、3.48μmol)を得た。

20

【0171】

MS (ESI) m/z: z = 4 1136.80 [M + 4H]⁴⁺

【0172】

(1-5)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(1-4)で合成したペプチドリinker連結物はジメチルスルホキシドに溶解し10mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgをHEPESバッファ(pH8.2)200μL(20μM)に溶解させ、10mMのペプチド試薬を3.38μL(抗体に対して10等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を20mM酢酸アンモニウムバッファに置換し、ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148223にピークが観測された。生成物は結合性ペプチドが1個導入された152660、結合性ペプチドが2個導入された157093、3個導入された161528のピークが確認された(図7)。

40

【0173】

(1-6)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(1-5)で生成した抗体・ペプチド複合体に100mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で15分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50596に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にリンカーが1個導入された55033、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された(図8)。

【0174】

(1-7)トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチ

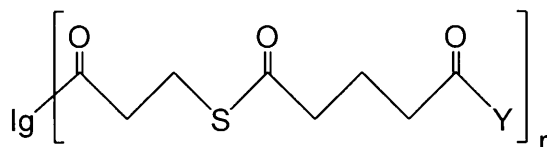
50

ド／抗体結合比の確認

(1-5) で解析したMSデータについて、DAR calculator (Agilent社ソフト) によりペプチド／抗体結合比の確認を行った結果を表2に示す。表2のDAR peakと%Areaから算出された平均のペプチド／抗体結合比は2.0となった。したがって、下記構造式で表される抗体中間体 (平均のペプチド／抗体結合比 2.0) の生成が確認された。

【0175】

【化28】



10

〔ここで、Igは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位 (IgG) を示し、かつ、Eu numberingに従う2個の重鎖中の288／290位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Igに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

Yは、配列番号2のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率rは、2.0である。〕

【0176】

20

【表2】

表2

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
1	152660	6.23E+003	4.56
2	157093	1.22E+005	89.26
3	161528	8.44E+003	6.18

【0177】

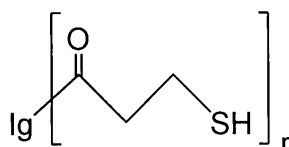
(1-8) チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

30

(1-7) で得られた抗体中間体に対し、既報 (WO2019／240287A1) に従いヒドロキシルアミン溶液を加え、室温で1時間静置した。2時間後、20mM PBSバッファー、10mM EDTA (pH7.4) へと置換し、チオール基導入抗体誘導体を得た。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、切断反応が進行した148409にピークが確認された。

【0178】

【化29】



40

〔ここで、Igは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位 (IgG) を示し、かつ、Eu numberingに従う2個の重鎖中の288／290位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Igに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率rは、2.0である。〕

【0179】

(1-9) トリプシン処理によるペプチドマッピング

(1-8) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体について、下記工程でペプチド

50

マッピングを行った。

【0180】

(1-9-1) トラストズマブ・チオール導入体のトリプシン処理

1. 5 mL 低吸着マイクロテストチューブにサンプル溶液を 10 μ L、50 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液、40 %トリフルオロエタノールに溶解した 20 mM のジチオトレイトール水溶液 10 μ L を加えて 65 $^{\circ}$ C で 1 時間加温後、50 mM のヨードアセトアミド水溶液 10 μ L を添加し、遮光下室温で 30 分間反応させた。反応後、50 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液を 40 μ L 加えて攪拌し、20 ng/ μ L のトリプシン水溶液を 10 μ L 添加して 37 $^{\circ}$ C で 16 時間酵素消化した。消化後、20 %トリフルオロ酢酸水溶液を 2 μ L 添加し反応を止め、LC-MS/MS 測定を実施した。

10

【0181】

(1-9-2) トラストズマブの LC-MS/MS 測定

(分析装置)

ナノ HPLC: EASY-nLC 1000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)

質量分析計: トライブリッド質量分析計 Orbitrap Fusion (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)

【0182】

(HPLC 分析条件)

トラップカラム: Accclaim PepMap (登録商標) 100, 75 μ m x 2 cm (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)

20

分析カラム: ESI-column (NTCC-360/75-3-125, 75 μ m x 12.5 cm, 3 μ m (日京テクノス社))

移動相 A: 0.1 %ギ酸水溶液

移動相 B: 0.1 %ギ酸、アセトニトリル溶液

ローディング溶液: 0.1 %トリフルオロ酢酸水溶液

流速: 300 nL/min

サンプル注入量: 1 μ L

グラジエント条件 (B %): 2 % (0.0-0.5 分)、2 % $\rightarrow$ 30 % (0.5-23.5 分)、30 % $\rightarrow$ 75 % (23.5-25.5 分)、75 % (25.5-35.0 分)

30

【0183】

(質量分析計分析条件)

イオン化法: ESI, Positive モード

スキャンタイプ: Data Dependent Acquisition

Activation Type: Collision Induced Dissociation (CID)

データの取得は付属ソフトである Xcalibur 3.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) および Thermo Orbitrap Fusion Tune Application 2.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて行った。

40

【0184】

(1-9-3) トラストズマブの修飾部位の解析

LC-MS/MS 測定結果に対する修飾部位解析については、BioPharma Finder 3.0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて行った。

BioPharma Finder での解析は、S/N Threshold を 1、MS Noise Level をピークトップの強度の 0.01 % となるように設定して実施した。また、消化酵素を Trypsin に、Specificity を High に設定した。Static Modification にはヨードアセトアミドによるシステイン残基の修飾として、Carbamidomethyl (+57.021 Da) を設定した。Dynamic Modifications については、メチオニン残基の酸化 (+1

50

5.995 Da) およびリジン残基への修飾体 (ヨードアセトアミドによる Carbamidomethylation を受けたチオール導入体 (+145.019 Da)) を設定した。また、Confidence Score が 80 以上、ペプチド同定時の Mass Accuracy が 5 ppm 以内、MS/MS が観測できているもののみとなるようフィルターを設定した。なお、リジン残基の残基番号に関して、重鎖 VH ドメインおよび軽鎖上については配列中の番号 (すなわち、N 末のアミノ酸を 1 番目とする。以下同様) で、重鎖 CH1、CH2、CH3 ドメイン上については EU numbering を用いて表記した。

また、修飾部位の検索対象のアミノ酸配列のデータとして、図 9 に示される (1) および (2) を用いた。

【0185】

(1-9-4) トラスツズマブの LC-MS/MS による修飾部位の解析結果

LC-MS/MS を用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位 (ヨードアセトアミドによる Carbamidomethylation を受けたチオール導入体 (+145.019 Da)) を含むアミノ酸 18 残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPR (配列番号 10) のペプチドフラグメントの MS スペクトル (実測値: m/z 577.03606、理論値: 577.03557、4 価) が観測され (図 10)、CID スペクトルより重鎖の EU numbering における 288 位もしくは 290 位のリジン残基の修飾を示す、3 価の y_{16} に相当する m/z 682.13 (理論値: 682.01) のプロダクトイオンが確認された (図 11)。また、BioPharma Finder での解析により、288 位もしくは 290 位の

リジン残基への修飾が高選択的に起こっていることが示された (図 12)。この結果より、上記 (1-8) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体では、抗体の重鎖上、EU numbering における Lys 288 および Lys 290 に位置選択的にコンジュゲーションが進行していることが分かった。

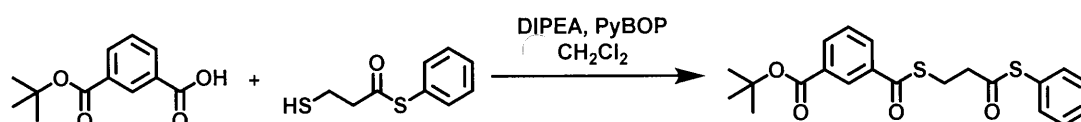
【0186】

【実施例 2: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 (ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 HER2 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(2-1) チオエステルリンカーの合成

(2-1-1)

【化 30】



【0187】

(1-3-2) で合成した化合物 (295 mg、1.62 mmol) を CH_2Cl_2 (13.5 mL) に溶解し、3-(tert-butoxycarbonyl) benzoic acid (300 mg、1.35 mmol)、DIPEA (700 μL 、2.03 mmol)、PyBOP (843 mg、1.62 mmol) を加えて常温で 1 時間攪拌した。TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 5/1) で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションを TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 5/1) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を (259 mg、0.64 mmol) 得た。

【0188】

(2-1-2)

10

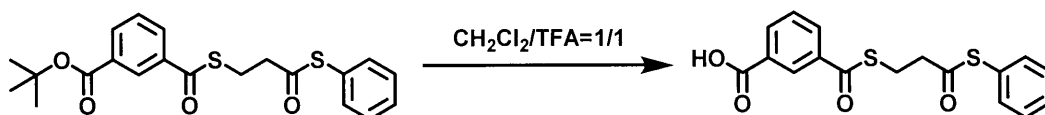
20

30

40

50

【化 3 1】



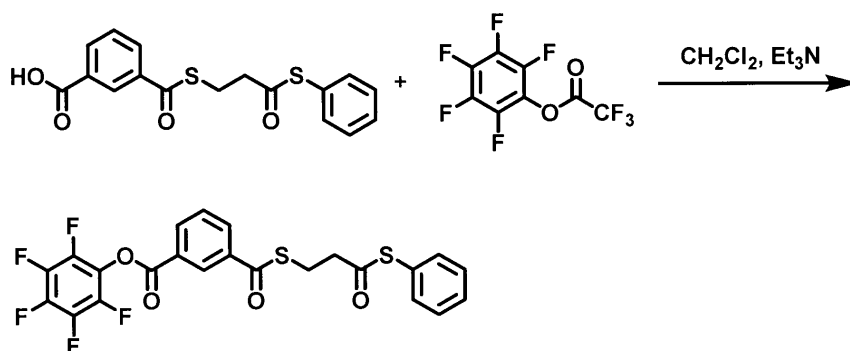
【0 1 8 9】

(2-1-1) で合成した化合物 (259 mg、0.64 mmol) を CH_2Cl_2 / $\text{TFA} = 1 / 1$ の混合溶液に溶解し、1 時間常温で攪拌した。TLC (ヘキサン / 酢酸エチル = 5 / 1) で原点に落ちたことを確認後、反応溶液を濃縮後、真空乾燥を行い、上記化合物を (227 mg、0.66 mmol) 得た。

【0 1 9 0】

(2-1-3)

【化 3 2】



【0 1 9 1】

(2-1-2) で合成した化合物 (227 mg、0.66 mmol) に CH_2Cl_2 (3.3 mL)、トリエチルアミン (230 μL 、1.65 mmol) を加え、溶解した。0℃でペンタフルオロフェニルトリフルオロ酢酸 (225 μL 、1.32 mmol) を加え、1 時間攪拌した。TLC (ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1) で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションを TLC (ヘキサン / 酢酸エチル = 3 / 1) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を (175.3 mg、0.34 mmol) 得た。

^1H NMR (400 MHz, CHloroform-d) δ = 8.79 (t, $J=1.8$, 1H), 8.43 (dt, $J=7.8$, 1.5, 1H), 8.30 (dt, $J=7.9$, 1.5, 1H), 7.70 (t, $J=7.8$, 1H), 7.45 (s, 4H), 3.45 (t, $J=6.9$, 2H), 3.14 (t, $J=6.9$, 2H).

【0 1 9 2】

(2-2) ペプチドとリンカーの結合

10

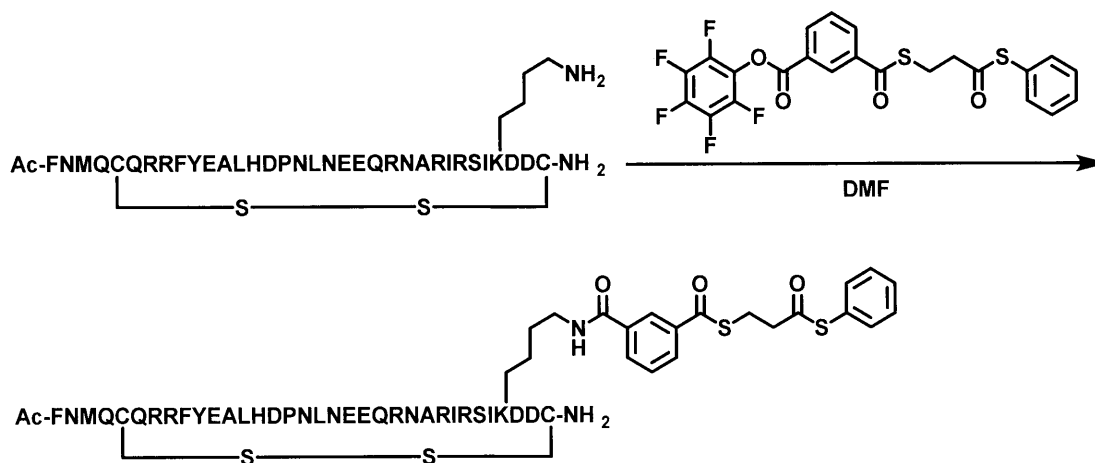
20

30

40

50

【化 3 3】



上記 2 つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号 2 のアミノ酸配列である。

【0193】

(1-2) で合成した Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂ (配列番号 2) (30.0 mg, 7.06 μmol、ただし 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N, N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、リンカー (72.0 mg、141 μmol) を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体 (10.0 mg、2.19 μmol) を得た。

【0194】

MS (ESI) m/z: z = 4 1145.6 [M + 4H]⁴⁺

【0195】

(2-3) 抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析
(2-2) で合成したペプチドリinker連結物はジメチルスルホキシドに溶解し 10 mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 50 mMのHEPESバッファー (pH 8.2) 200 μL (20 μM) に溶解させ、10 mMのペプチド試薬を 3.38 μL (抗体に対して 10 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 20 mM酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148223 にピークが観測された。結合性ペプチドが 1 個導入された 152691、結合性ペプチドが 2 個導入された 157163、3 個導入された 161634 のピークが確認された (図 13)。

【0196】

(2-4) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(2-3) で生成した抗体・ペプチド複合体に 100 mMトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 2 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 15 分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50596 に重鎖ピーク、23439 に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが 1 個導入された 55067、軽鎖に原料と同じ 23439 にピークが観測された (図 14)。

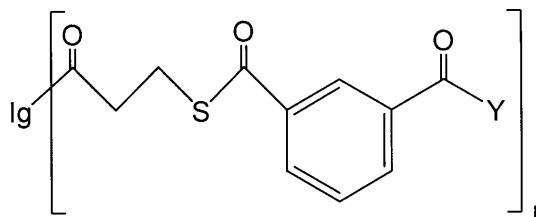
【0197】

(2-5) トラスツズマブの特異的修飾体の DAR calculator によるペプチド/抗体結合比の確認

(2-3)で解析したMSデータについて、DAR calculator (Agilent社ソフト)によりペプチド／抗体結合比の確認を行った結果を表3に示す。表3のDAR peakと%Areaから算出された平均のペプチド／抗体結合比は2.0となった。したがって、下記構造式で表される抗体中間体(平均のペプチド／抗体結合比 2.0)の生成が確認された。

【0198】

【化34】



10

〔ここで、Igは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位(IgG)を示し、かつ、Eu numberingに従う2個の重鎖中の288／290位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Igに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

Yは、配列番号2のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率rは、2.0である。〕

20

【0199】

【表3】

表3

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
1	152691	5.74E+003	4.25
2	157163	1.26E+005	93.33
3	161634	3.27E+003	2.42

【0200】

30

(2-6)チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

チオール基導入抗体誘導体は、(2-5)で得られた抗体中間体を、(1-8)に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、(1-8)に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

【0201】

(2-7)トリプシン処理によるペプチドマッピング

(2-6)で得られたトラスツズマブ・チオール導入体について、下記工程でペプチドマッピングを行った。

【0202】

(2-7-1)トラスツズマブ・チオール導入体のトリプシン処理

40

(1-9-1)と同様にして(2-6)で得られたトラスツズマブ・チオール導入体のトリプシン処理を行った。

【0203】

(2-7-2)トラスツズマブのLC-MS/MS測定

(1-9-2)と同様の条件でLC-MS/MS測定を行った。

【0204】

(2-7-3)トラスツズマブの修飾部位の解析

(1-9-3)と同様に解析を行った。

【0205】

(2-7-4)トラスツズマブのLC-MS/MSによる修飾部位の解析結果

50

LC-MS/MSを用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含むアミノ酸18残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPR（配列番号10）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（実測値： m/z 577.03571、理論値：577.03557、4価）が観測され（図15）、CIDスペクトルより重鎖のEU numberingにおける288位もしくは290位のリジン残基の修飾を示す、3価のy16に相当する m/z 682.41（理論値：682.01）のプロダクトイオンが確認された（図16）。また、BioPharma Finderでの解析により、288位もしくは290位のリジン残基への修飾が高選択的に起こっていることが示された（図17）。

10

この結果より、上記（2-6）で得られたトラスツズマブ・チオール導入体では、抗体の重鎖上、EU numberingにおけるLys 288およびLys 290に位置選択的にコンジュゲーションが進行していることが分かった。

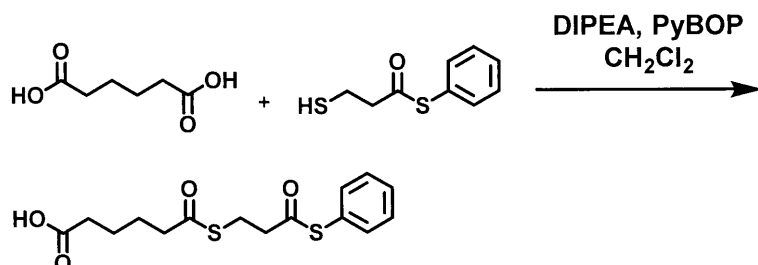
【0206】

【実施例3：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2抗体トラスツズマブの修飾およびその解析】

（3-1）チオエステルリンカーの合成

（3-1-1）

【化35】



20

【0207】

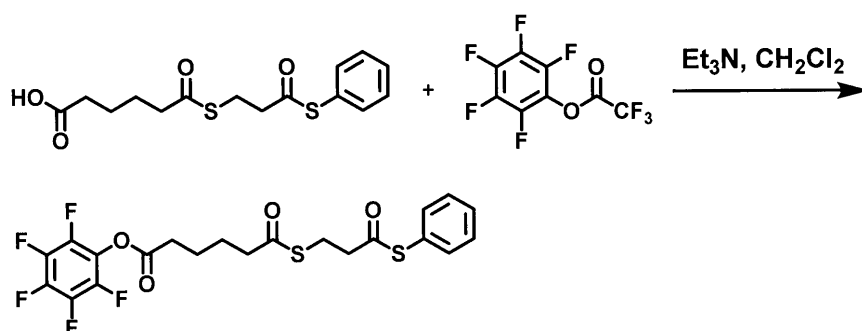
（1-3-2）で合成した化合物（220mg、1.21mmol）をCH₂Cl₂（12.0mL）に溶解し、Adipic Acid（530mg、3.63mmol）、DIPEA（314μL、1.82mmol）、PyBOP（755mg、1.45mmol）を加えて常温で1時間攪拌した。TLC（ジクロロメタン/メタノール=10/1）で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ジクロロメタンとメタノールの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC（ジクロロメタン/メタノール=10/1）により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を（205mg、0.63mmol）得た。

30

【0208】

（3-1-2）

【化36】



40

50

【0209】

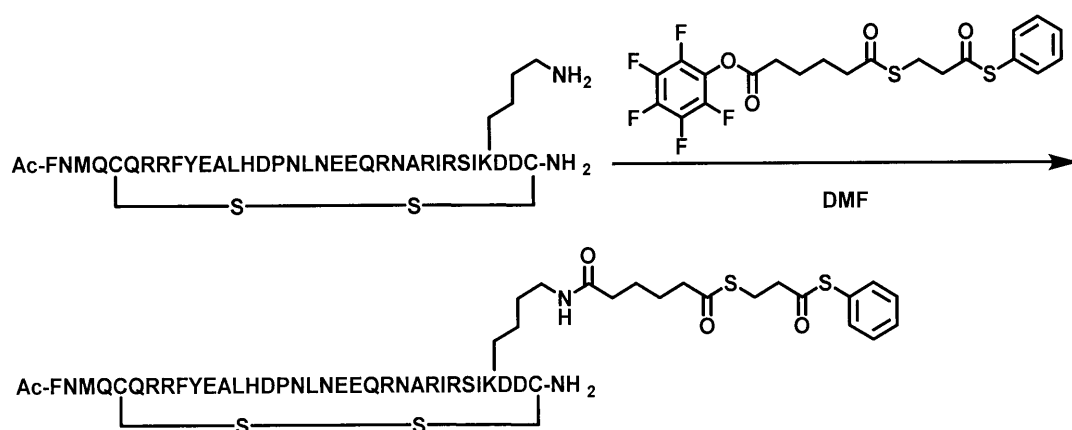
(3-1-1) で合成した化合物 (205 mg、0.63 mmol) に CH_2Cl_2 (3.15 mL)、トリエチルアミン (220 μL 、1.58 mmol) を加え、溶解した。0℃でペンタフルオロフェニルトリフルオロ酢酸 (215 μL 、1.26 mmol) を加え、1時間攪拌した。TLC (ヘキサン/酢酸エチル=3/1) で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC (ヘキサン/酢酸エチル=3/1) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を (200 mg、0.41 mmol) 得た。

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ = 7.44 (s, 5H), 3.20 (t, J =7.0, 2H), 3.00 (t, J =6.9, 2H), 2.66 (dt, J =28.3, 7.4, 5H), 1.79 (ddt, J =20.4, 15.2, 7.5, 5H), 1.57 – 1.38 (m, 3H)。

【0210】

(3-2) ペプチドとリンカーの結合

【化37】



上記2つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号2のアミノ酸配列である。

【0211】

(1-2) で合成した $\text{Ac-FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH}_2$ (配列番号2) (30.0 mg, 7.06 μmol 、ただし5番目と34番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N -ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、リンカー (69.0 mg, 141 μmol) を加え、室温で24時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体 (7.5 mg, 1.65 μmol) を得た。

【0212】

MS (ESI) m/z : $z=4$ 1140.50 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$

【0213】

(3-3) 抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(3-2) で合成したペプチドリリンカー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し10 mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を50 mMのHEPESバッファー (pH 8.2) 200 μL (20 μM) に溶解させ、10 mMのペプチド試薬を3.38 μL (抗体に対して10等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を2

0 mM酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148223にピークが観測された。結合性ペプチドが1個導入された152676、結合性ペプチドが2個導入された157126、3個導入された161572のピークが確認された（図18）。

【0214】

（3-4）トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

（3-3）で生成した抗体・ペプチド複合体に100 mMトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液2 μ L（抗体に対して等量）を加えて、室温で15分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50596に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが1個導入された55048、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された（図19）。

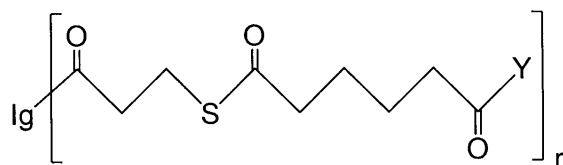
【0215】

（3-5）トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチド／抗体結合比の確認

（3-3）で解析したMSデータについて、DAR calculator（Agilent社ソフト）によりペプチド／抗体結合比の確認を行った結果を表4に示す。表4のDAR peakと%Areaから算出された平均のペプチド／抗体結合比は1.9となった。したがって、下記構造式で表される抗体中間体（平均のペプチド／抗体結合比 1.9）の生成が確認された。

【0216】

【化38】



〔ここで、Igは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位（IgG）を示し、かつ、Eu numberingに従う2個の重鎖中の288／290位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Igに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

Yは、配列番号2のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率rは、1.9である。〕

【0217】

【表4】

表4

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
1	152676	1.71E+004	13.70
2	157126	1.01E+005	81.15
3	161572	6.43E+003	5.15

【0218】

（3-6）チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

チオール基導入抗体誘導体は、（3-5）で得られた抗体中間体を、（1-8）に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、（1-8）に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

【0219】

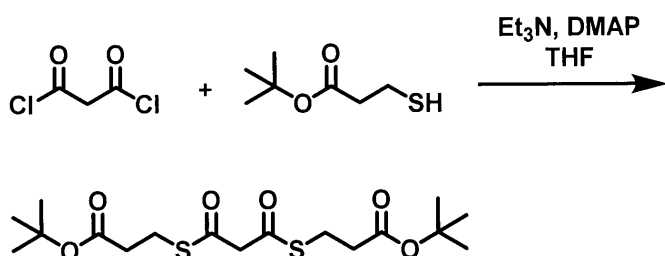
〔実施例4：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する

化合物（ペプチドチオエステルリンカー連結物ーチオフェノール活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

（４－１）チオエステルリンカーの合成

（４－１－１）

【化３９】



10

【０２２０】

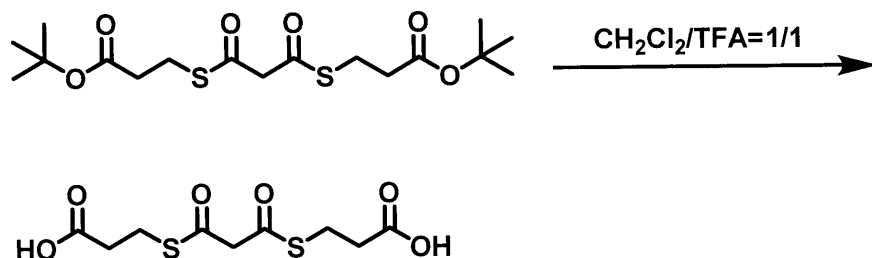
tBu-3-Sulfanyllpropanoate (500mg、3.08mmol) をテトラヒドロフラン (7mL) に溶解し、トリエチルアミン (0.64mL、4.62mmol) を加えた後、0℃でマロニルクロリド (0.15mg、1.54mmol) を加え3時間攪拌した。TLC (ヘキサン／酢酸エチル＝5／1) で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC (ヘキサン／酢酸エチル＝5／1) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を (104mg、0.26mmol) 得た。

20

【０２２１】

（４－１－２）

【化４０】



30

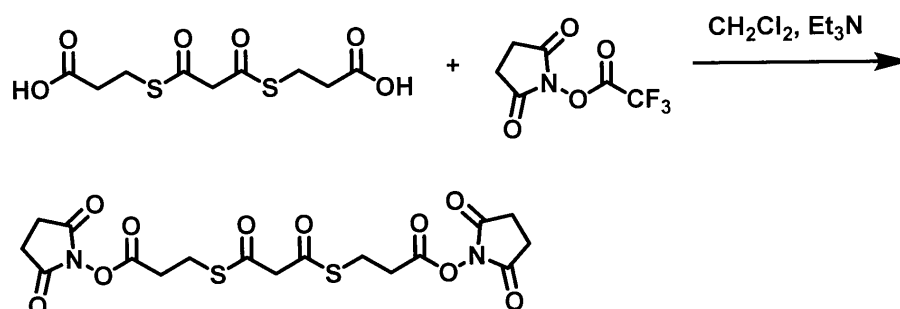
【０２２２】

（４－１－１）で合成した化合物 (104mg、0.26mmol) をCH2Cl2／TFA＝1／1の混合溶液に溶解し、1時間常温で攪拌した。TLC (ヘキサン／酢酸エチル＝5／1) で原点に落ちたことを確認後、反応溶液を濃縮後、真空乾燥を行い、上記化合物を (104mg、0.37mmol) 得た。

【０２２３】

（４－１－３）

【化４１】



40

50

【0224】

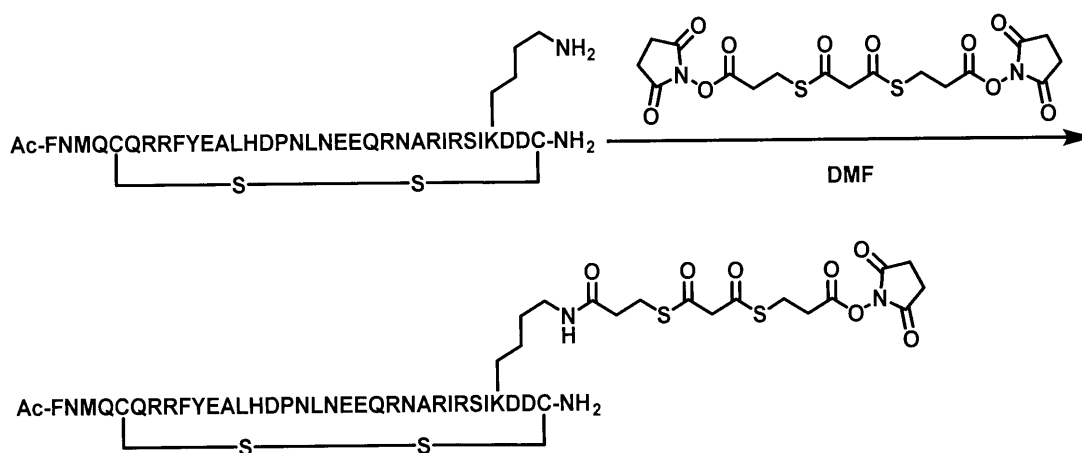
(4-1-2) で合成した化合物 (104 mg、0.37 mmol) に CH_2Cl_2 (1.85 mL)、トリエチルアミン (130 μL 、0.93 mmol) を加え溶解した。0°C で *N*-Succinimidy l Trifluoroacetate (156 mg、0.74 mmol) を加え、1 時間攪拌した。TLC (ヘキサン/酢酸エチル=1/1) で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションを TLC (ヘキサン/酢酸エチル=1/1) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を (66.8 mg、0.14 mmol) 得た。

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 3.84 (s, 2H), 3.28 (t, J =6.9, 2H), 3.19 (t, J =6.8, 2H), 3.00 (t, J =6.8, 2H), 2.74 (t, J =6.8, 2H).

【0225】

(4-2) ペプチドとリンカーの結合

【化42】



上記2つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号2のアミノ酸配列である。

【0226】

(1-2) で合成した $\text{Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH}_2$ (配列番号2) (29.7 mg, 7.00 μmol 、ただし5番目と34番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を *N,N*-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、リンカー (66.8 mg, 0.14 mmol) を加え、室温で4時間攪拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-NHS活性化体 (13 mg, 2.82 μmol) を得た。

【0227】

MS (ESI) m/z : $z=4$ 1153.10 [$M+4\text{H}$] $^{4+}$

【0228】

(4-3) 抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(4-2) で合成したペプチドリナー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し10 mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を50 mMのHEPESバッファー (pH 8.2) 200 μL (20 μM) に溶解させ、10 mMのペプチド試薬を3.38 μL (抗体に対して10等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を2

0 mM酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148223にピークが観測された。結合性ペプチドが1個導入された152722、結合性ペプチドが2個導入された157215、3個導入された161708のピークが確認された（図20）。

【0229】

（4-4）トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

（4-3）で生成した抗体・ペプチド複合体に100 mMトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液2 μL（抗体に対して等量）を加えて、室温で15分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが1個導入された55091、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された（図21）。

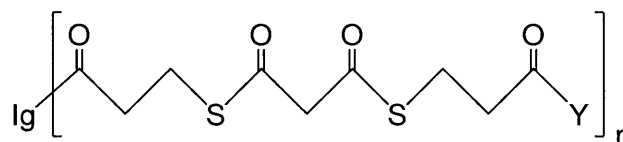
【0230】

（4-5）トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチド／抗体結合比の確認

（4-3）で解析したMSデータについて、DAR calculator（Agilent社ソフト）によりペプチド／抗体結合比の確認を行った結果を表5に示す。表5のDAR peakと%Areaから算出された平均のペプチド／抗体結合比は1.8となった。したがって、下記構造式で表される抗体中間体（平均のペプチド／抗体結合比 1.8）の生成が確認された。

【0231】

【化43】



〔ここで、Igは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位（IgG）を示し、かつ、Eu numberingに従う2個の重鎖中の288／290位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Igに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

Yは、配列番号2のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率rは、1.8である。〕

【0232】

【表5】

表5

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
1	152722	4.47E+005	24.92
2	157215	1.21E+006	67.20
3	161708	1.22E+005	6.78

【0233】

（4-6）チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

チオール基導入抗体誘導体は、（4-5）で得られた抗体中間体を、（1-8）に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、（1-8）に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

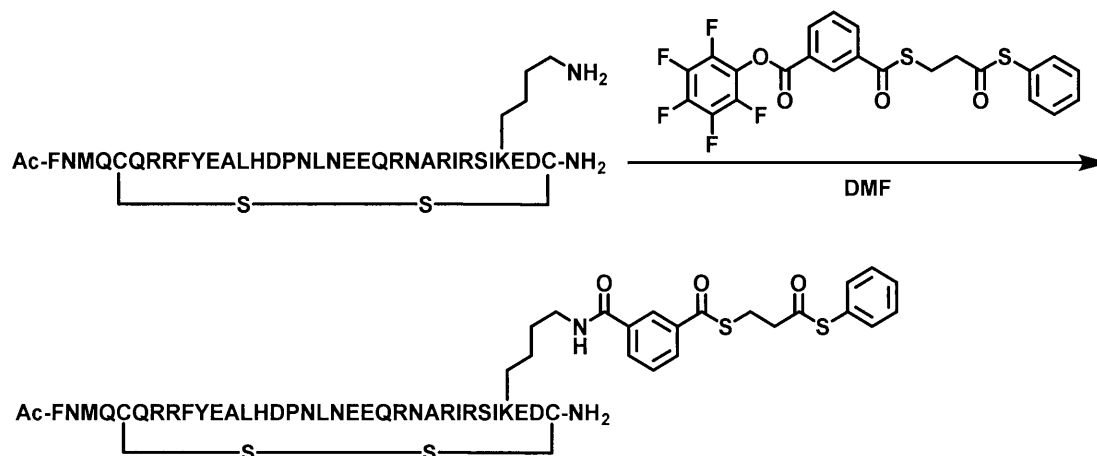
【0234】

〔実施例5：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体）の合成、なら

びに当該化合物を用いた抗HER2抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(5-1) ペプチドとリンカーの結合

【化44】



上記2つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号3のアミノ酸配列である。

【0235】

(1-1)に記載の方法で合成した $\text{Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKEDC-NH}_2$ (配列番号3) (30.0mg, 7.06 μmol 、ただし5番目と34番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)に実施例2(2-2)と同様の方法でリンカーを結合し、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体(10.0mg、2.19 μmol)を得た。

【0236】

MS (ESI) m/z : $z = 4$ 1145.6 $[M + 4H]^+$

【0237】

(5-2) 抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析
(5-1)で合成したペプチドリリンカー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し10mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μg を50mMのHEPESバッファー(pH8.2)200 μL (20 μM)に溶解させ、10mMのペプチド試薬を3.38 μL (抗体に対して10等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を20mM酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148223にピークが観測された。結合性ペプチドが1個導入された152707、結合性ペプチドが2個導入された157188、3個導入された161676のピークが確認された(図22)。

【0238】

(5-3) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(5-2)で生成した抗体・ペプチド複合体に100mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2 μL (抗体に対して等量)を加えて、室温で15分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50596に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが1個導入された55077、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された(図23)。

【0239】

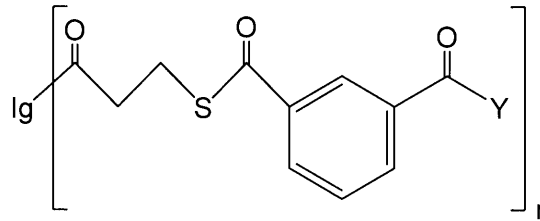
(5-4) トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチド/抗体結合比の確認

(5-2)で解析したMSデータについて、DAR calculator(Agilent社ソフト)によりペプチド/抗体結合比の確認を行った結果を表6に示す。表6のDAR peakと%Areaから算出された平均のペプチド/抗体結合比は2.0とな

った。したがって、下記構造式で表される抗体中間体（平均のペプチド／抗体結合比 2 . 0）の生成が確認された。

【0240】

【化45】



10

〔ここで、I g は、2 個の重鎖および 2 個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位（I g G）を示し、かつ、E u n u m b e r i n g に従う 2 個の重鎖中の 2 8 8 / 2 9 0 位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、I g に隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

Y は、配列番号 3 のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、
2 個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率 r は、2 . 0 である。〕

【0241】

【表6】

表 6

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
1	152707	6.90E+003	2.22
2	157188	2.96E+005	95.07
3	161676	8.47E+003	2.72

20

【0242】

（5－5）チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

チオール基導入抗体誘導体は、（5－4）で得られた抗体中間体を、（1－8）に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、（1－8）に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

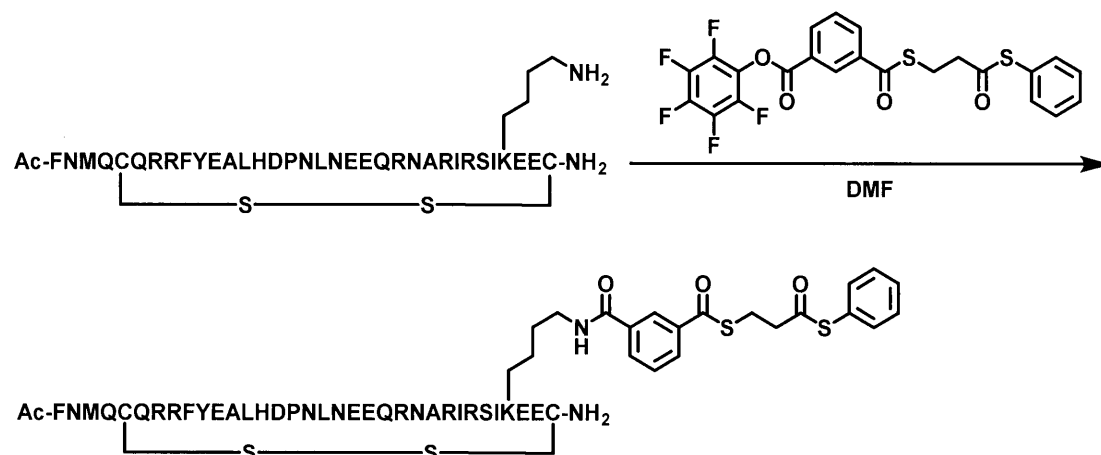
30

【0243】

〔実施例 6：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドチオエステルリンカー連結物－チオフェノール活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 H E R 2 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析〕

（6－1）ペプチドとリンカーの結合

【化46】



40

50

上記２つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号４のアミノ酸配列である。

【０２４４】

（１－１）に記載の方法で合成した $\text{Ac-FNMQCQRRFYEA LHD PNLNE EQRNARIRSIKEEC-NH}_2$ （配列番号４）（ 30.0 mg ， $7.06\text{ }\mu\text{mol}$ 、ただし５番目と３４番目の２つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している）に実施例２（２－２）と同様の方法でリンカーを結合し、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物－チオフェノール活性化体（ 22.2 mg 、 $4.82\text{ }\mu\text{mol}$ ）を得た。

【０２４５】

MS (ESI) m/z : $z = 4$ 1152.4 [M + 4H]⁴⁺

【０２４６】

（６－２）抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析
（６－１）で合成したペプチドリリンカー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し10mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ（中外製薬） $500\text{ }\mu\text{g}$ を50mMのHEPESバッファー（pH 8.2） $200\text{ }\mu\text{L}$ （ $20\text{ }\mu\text{M}$ ）に溶解させ、10mMのペプチド試薬を $3.38\text{ }\mu\text{L}$ （抗体に対して10等量）加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を20mM酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148223にピークが観測された。結合性ペプチドが1個導入された152720、結合性ペプチドが2個導入された157216、3個導入された161716のピークが確認された（図24）。

【０２４７】

（６－３）トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

（６－２）で生成した抗体・ペプチド複合体に100mMトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液 $2\text{ }\mu\text{L}$ （抗体に対して等量）を加えて、室温で15分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50596に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが1個導入された55091、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された（図25）。

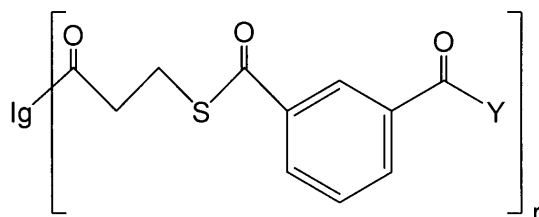
【０２４８】

（６－４）トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチド／抗体結合比の確認

（６－２）で解析したMSデータについて、DAR calculator（Agilent社ソフト）によりペプチド／抗体結合比の確認を行った結果を表7に示す。表7のDAR peakと%Areaから算出された平均のペプチド／抗体結合比は2.0となった。したがって、下記構造式で表される抗体中間体（平均のペプチド／抗体結合比 2.0）の生成が確認された。

【０２４９】

【化４７】



〔ここで、Igは、２個の重鎖および２個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位（IgG）を示し、かつ、Eu numberingに従う２個の重鎖中の288／290位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Igに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

Yは、配列番号４のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率 r は、2.0である。]

【0250】

【表7】

表7

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
1	152720	5.84E+003	2.31
2	157216	2.41E+005	95.07
3	161716	6.65E+003	2.63

【0251】

(6-5) チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

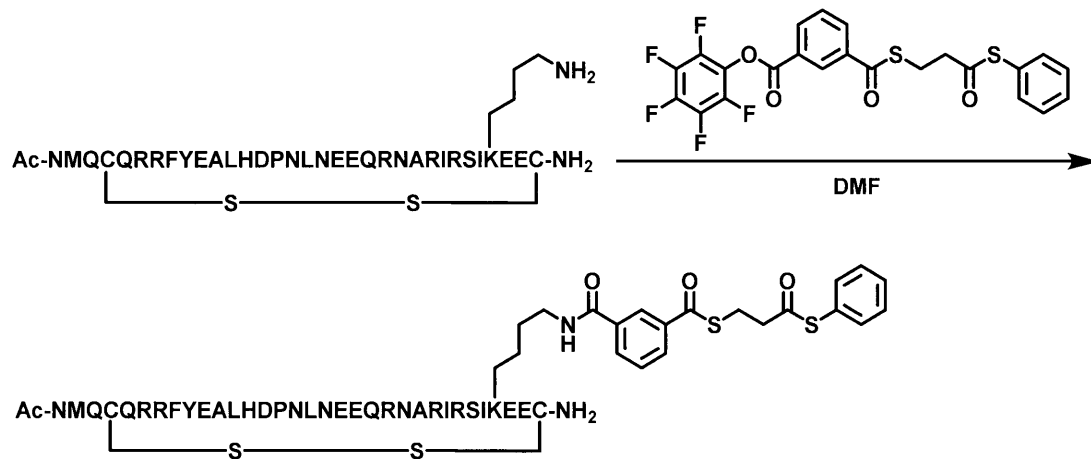
チオール基導入抗体誘導体は、(6-4) で得られた抗体中間体を、(1-8) に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、(1-8) に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

【0252】

[実施例7：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(7-1) ペプチドとリンカーの結合

【化48】



上記2つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号5のアミノ酸配列である。

【0253】

(1-1) に記載の方法で合成した $\text{Ac-NMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC-NH}_2$ (配列番号5) (30.0 mg, 7.06 μmol 、ただし5番目と34番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) に実施例2(2-2)と同様の方法でリンカーを結合し、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体 (12.0 mg、2.69 μmol) を得た。

【0254】

MS (ESI) m/z : $z = 4$ 1115.8 $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$

【0255】

(7-2) 抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(7-1) で合成したペプチドリリンカー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し10 mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を50 mMのHEPESバッファー (pH 8.2) 200 μL (20 μM) に溶解させ、10 mMのペプチド試薬を3.38 μL (抗体に対して10等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を2

0 mM酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148223にピークが観測された。結合性ペプチドが1個導入された152573、結合性ペプチドが2個導入された156927のピークが確認された（図26）。

【0256】

（7-3）トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

（7-2）で生成した抗体・ペプチド複合体に100 mMトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液2 μL（抗体に対して等量）を加えて、室温で15分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50596に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが1個導入された54942、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された（図27）。

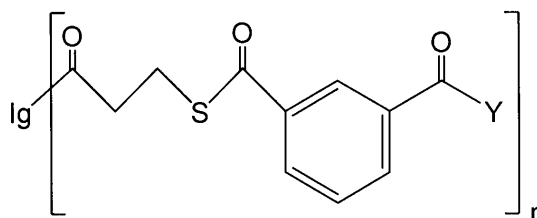
【0257】

（7-4）トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチド／抗体結合比の確認

（7-2）で解析したMSデータについて、DAR calculator（Agilent社ソフト）によりペプチド／抗体結合比の確認を行った結果を表8に示す。表8のDAR peakと%Areaから算出された平均のペプチド／抗体結合比は2.0となった。したがって、下記構造式で表される抗体中間体（平均のペプチド／抗体結合比 2.0）の生成が確認された。

【0258】

【化49】



〔ここで、Igは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位（IgG）を示し、かつ、Eu numberingに従う2個の重鎖中の288／290位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Igに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

Yは、配列番号5のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率rは、2.0である。〕

【0259】

【表8】

表8

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
1	152573	9.84E+004	9.08
2	156927	1.11E+006	90.92

【0260】

（7-5）チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

チオール基導入抗体誘導体は、（7-4）で得られた抗体中間体を、（1-8）に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、（1-8）に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

【0261】

（7-6）トリプシン処理によるペプチドマッピング

(7-5) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体について、下記工程でペプチドマッピングを行った。

【0262】

(7-6-1) トラスツズマブ・チオール導入体のトリプシン処理

(1-9-1) と同様にして (7-5) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体のトリプシン処理を行った。

【0263】

(7-6-2) トラスツズマブの LC-MS/MS 測定

(1-9-2) と同様の条件で LC-MS/MS 測定を行った。

【0264】

(7-6-3) トラスツズマブの修飾部位の解析

(1-9-3) と同様に解析を行った。

【0265】

(7-6-4) トラスツズマブの LC-MS/MS による修飾部位の解析結果

LC-MS/MS を用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位 (ヨードアセトアミドによる Carbamidomethyl 化を受けたチオール導入体 (+145.019 Da)) を含むアミノ酸 18 残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPR (配列番号 10) のペプチドフラグメントの MS スペクトル (実測値: m/z 769.04506、理論値: 769.04482、3 価) が観測され (図 28)、CID スペクトルより重鎖の E U n u m b e r i n g における 288 位もしくは 290 位のリジン残基の修飾を示す、2 価の y 16 に相当する m/z 1022.71 (理論値: 1022.51) のプロダクトイオンが確認された (図 29)。また、BioPharma Finder での解析により、288 位もしくは 290 位のリジン残基への修飾が高選択的に起こっていることが示された (図 30)。

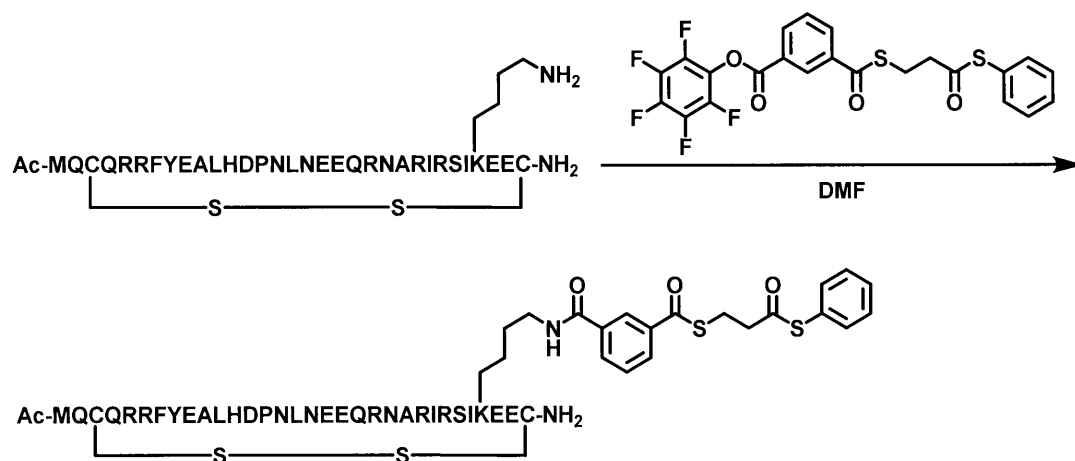
この結果より、上記 (7-5) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体では、抗体の重鎖上、E U n u m b e r i n g における L y s 288 および L y s 290 に位置選択的にコンジュゲーションが進行していることが分かった。

【0266】

【実施例 8：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 (ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 HER2 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析】

(8-1) ペプチドとリンカーの結合

【化 50】



上記 2 つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号 6 のアミノ酸配列である。

【0267】

(1-1) に記載の方法で合成した A c - M Q C Q R R F Y E A L H D P N L N E E Q R N A R I R S I K E E C - N H ₂ (配列番号 6) (30.0 mg, 7.06 μmol、

ただし5番目と34番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)に実施例2(2-2)と同様の方法でリンカーを結合し、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体(16.8mg、3.87 μ mol)を得た。

【0268】

MS(ESI) m/z: z = 4 1087.3 [M + 4H]⁴⁺

【0269】

(8-2) 抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析
(8-1)で合成したペプチドリinker連結物はジメチルスルホキシドに溶解し10mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μ gを50mMのHEPESバッファー(pH8.2)200 μ L(20 μ M)に溶解させ、10mMのペプチド試薬を3.38 μ L(抗体に対して10等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を20mM酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148223にピークが観測された。結合性ペプチドが1個導入された152457、結合性ペプチドが2個導入された156692、3個導入された160929のピークが確認された(図31)。

【0270】

(8-3) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(8-2)で生成した抗体・ペプチド複合体に100mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2 μ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で15分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50596に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが1個導入された54829、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された(図32)。

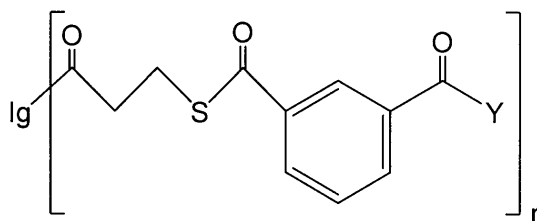
【0271】

(8-4) トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチド/抗体結合比の確認

(8-2)で解析したMSデータについて、DAR calculator(Agilent社ソフト)によりペプチド/抗体結合比の確認を行った結果を表9に示す。表9のDAR peakと%Areaから算出された平均のペプチド/抗体結合比は2.0となった。したがって、下記構造式で表される抗体中間体(平均のペプチド/抗体結合比 2.0)の生成が確認された。

【0272】

【化51】



〔ここで、Igは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位(IgG)を示し、かつ、Eu numberingに従う2個の重鎖中の288/290位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Igに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

Yは、配列番号6のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、
2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率rは、2.0である。〕

【0273】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
1	152457	1.74E+004	3.08
2	156692	5.22E+005	93.53
3	160929	1.89E+004	3.39

【0274】

(8-5) チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

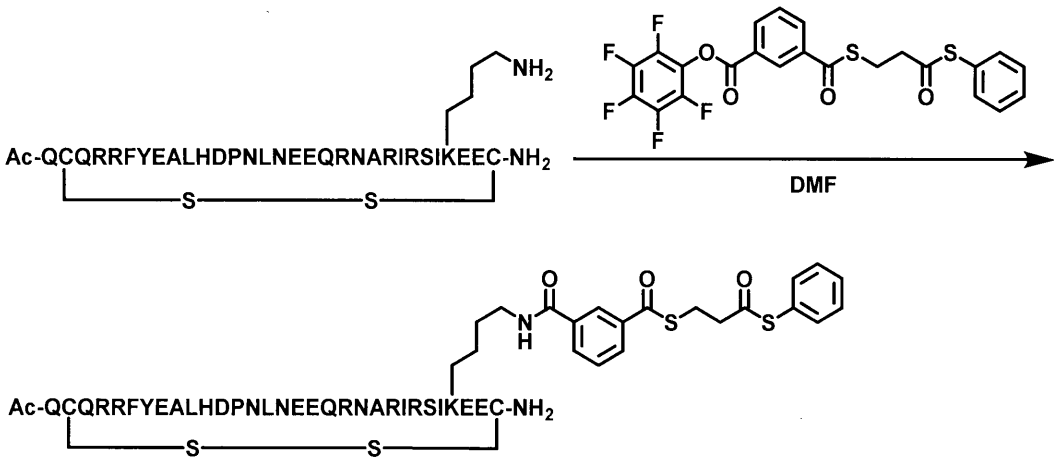
チオール基導入抗体誘導体は、(8-4) で得られた抗体中間体を、(1-8) に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、(1-8) に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

【0275】

[実施例 9：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(9-1) ペプチドとリンカーの結合

【化52】



上記2つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号7のアミノ酸配列である。

【0276】

(9-1) に記載の方法で合成した Ac-QCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC-NH₂ (配列番号7) (30.0mg, 7.06μmol、ただし5番目と34番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) に実施例2(2-2)と同様の方法でリンカーを結合し、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体 (14.1mg、3.35μmol) を得た。

【0277】

MS (ESI) m/z : z = 4 1054.4 [M+4H]⁴⁺

【0278】

(9-2) 抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(9-1) で合成したペプチドリリンカー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し10mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500μgを50mMのHEPESバッファー (pH8.2) 200μL (20μM) に溶解させ、10mMのペプチド試薬を3.38μL (抗体に対して10等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を20mM酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148223にピークが観測された。結合性ペプチド

が1個導入された152236、結合性ペプチドが2個導入された156430、3個導入された160541のピークが確認された(図33)。

【0279】

(9-3) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(9-2) で生成した抗体・ペプチド複合体に100mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で15分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50596に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが1個導入された54698、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された(図34)。

10

【0280】

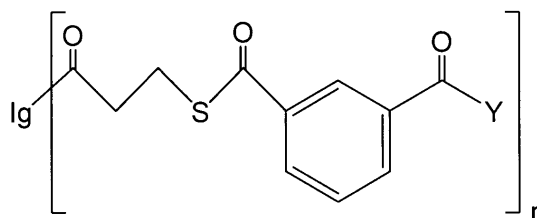
(9-4) トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチド/抗体結合比の確認

(9-2) で解析したMSデータについて、DAR calculator(Agilent社ソフト)によりペプチド/抗体結合比の確認を行った結果を表10に示す。表10のDAR peakと%Areaから算出された平均のペプチド/抗体結合比は2.0となった。したがって、下記構造式で表される抗体中間体(平均のペプチド/抗体結合比2.0)の生成が確認された。

【0281】

【化53】

20



[ここで、Igは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位(IgG)を示し、かつ、Eu numberingに従う2個の重鎖中の288/290位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Igに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しており、

30

Yは、配列番号7のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率rは、2.0である。]

【0282】

【表10】

表10

DAR Peak	Observed mass(Da)	Peak Area	%Area
1	152236	1.24E+004	7.09
2	156430	1.57E+005	89.82
3	160541	5.41E+003	3.09

40

【0283】

(9-5) チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

チオール基導入抗体誘導体は、(9-4)で得られた抗体中間体を、(1-8)に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、(1-8)に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

【0284】

(実施例1~9のまとめ)

実施例化合物におけるリンカー長とペプチド/抗体結合比(PAR)の関係を検討した

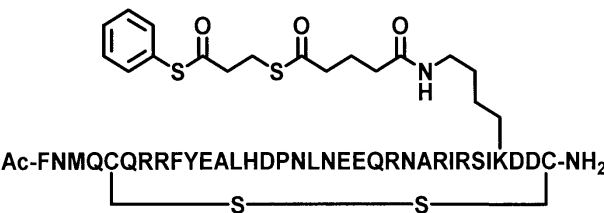
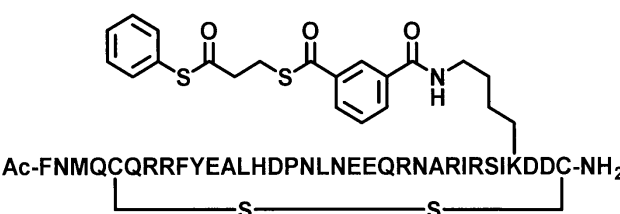
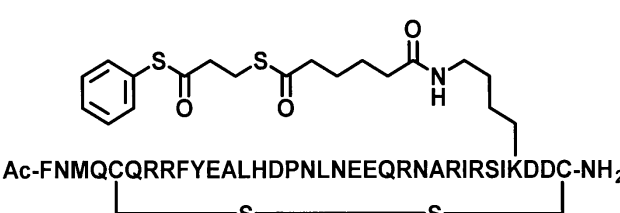
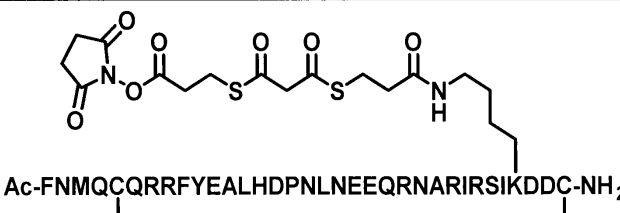
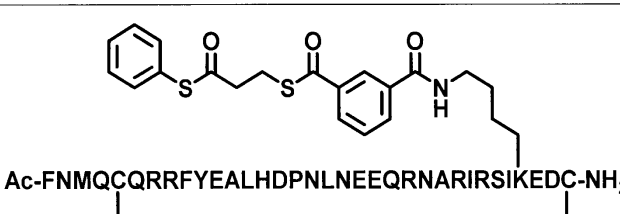
50

。その結果、イムノグロブリン単位中の重鎖の 288 / 290 位のリジン残基との反応性部分〔X (脱離基) - C=O〕と、親和性ペプチドとの結合部分〔O=C-Y (親和性ペプチド)〕とを連結する主鎖を構成する原子数であるリンカー長が 7～9 個である化合物 (式 (I) で表される化合物において、第 1 リンカーにおける主鎖を構成する原子数、および第 2 リンカーにおける主鎖を構成する原子数の合計が 5～7 個の原子数に相当するもの) は、所望の範囲 (1.5～2.0) の平均 PAR を示した。

【0285】

【表 11】

表 11. 実施例化合物におけるリンカー長と結合比の関係 (その 1)

実施例	化学構造	リンカー長 ¹⁾	結合比 ²⁾
1	 上記アミノ酸配列: 配列番号 2	7	2.0
2	 上記アミノ酸配列: 配列番号 2	7	2.0
3	 上記アミノ酸配列: 配列番号 2	8	1.9
4	 上記アミノ酸配列: 配列番号 2	9	1.8
5	 上記アミノ酸配列: 配列番号 3	7	2.0

1) リンカー長: イムノグロブリン単位中の重鎖の 288 / 290 位のリジン残基との反応性部分〔X (脱離基) - C=O〕と、親和性ペプチドとの結合部分〔O=C-Y (親和

性ペプチド)) とを連結する主鎖を構成する原子数

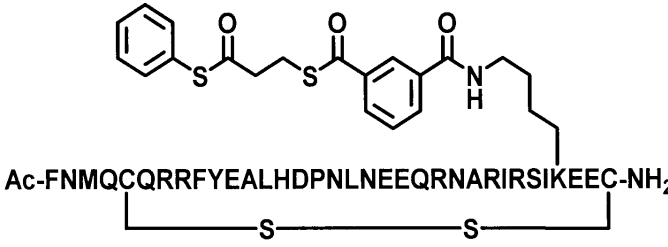
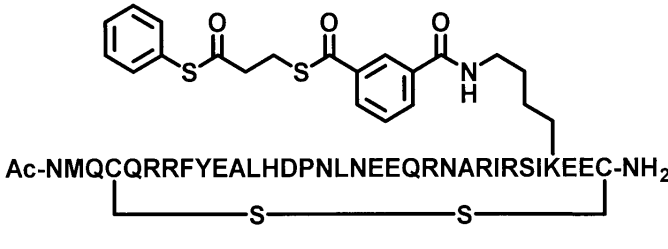
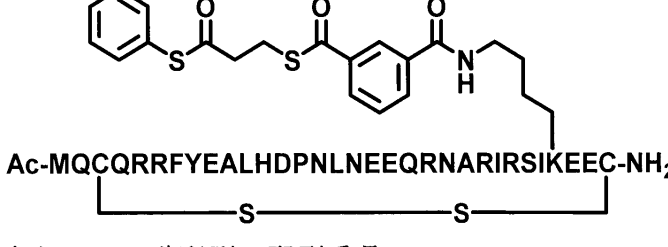
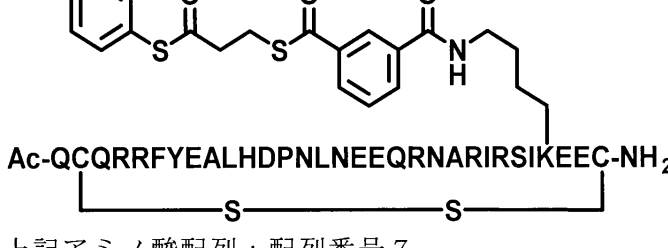
2) 結合比: ペプチドと抗体との結合比 (ペプチド / 抗体)

(以下同様)

【0286】

【表12】

表12. 実施例化合物におけるリンカー長と結合比の関係 (その2)

実施例	化学構造	リンカー長 ¹⁾	結合比 ²⁾
6	 上記アミノ酸配列: 配列番号4	7	2.0
7	 上記アミノ酸配列: 配列番号5	7	2.0
8	 上記アミノ酸配列: 配列番号6	7	2.0
9	 上記アミノ酸配列: 配列番号7	7	2.0

【0287】

【参考例1~5】

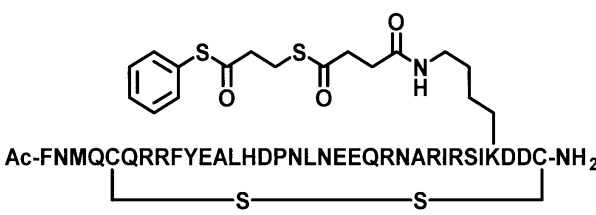
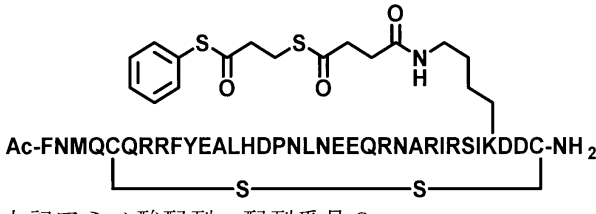
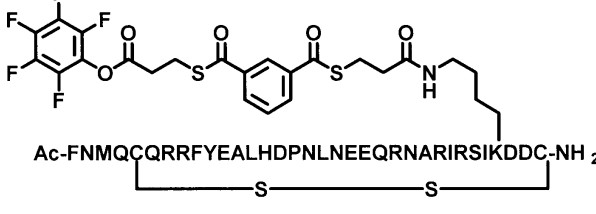
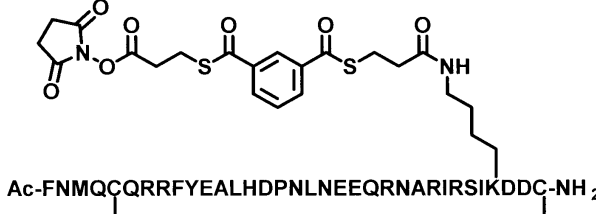
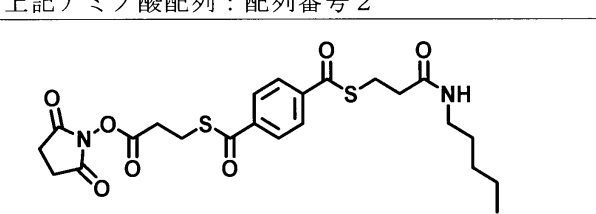
上記実施例を参考に以下のペプチドチオエステルリンカー連結物-NHS活性化体もしくはペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体の合成を行い、抗HER2抗体トラスツマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析を行った。また、実施例と同様に、トラスツマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチド/抗体結合比(PAR)の確認を行ったところ、リンカー長が6個以下または11個以上の原子数である化合物(式(I)で表される化合物において、第1リンカーにおける主鎖を構成する原子数、および第2リンカーにおける主鎖を構成する原子数の合計が4個未満または9個以上の原子数に相当するもの)は、0.5以下の平均PARを示し

た。

【 0 2 8 8 】

【 表 1 3 】

表 1 3 . 参考例化合物におけるリンカー長と結合比の関係

参考例	化学構造	リンカー長 ¹⁾	結合比 ²⁾
1	 上記アミノ酸配列：配列番号 2	6	0.5 以下
2	 上記アミノ酸配列：配列番号 2	6	
3	 上記アミノ酸配列：配列番号 2	1 1	
4	 上記アミノ酸配列：配列番号 2	1 1	
5	 上記アミノ酸配列：配列番号 2	1 2	

【 0 2 8 9 】

【実施例 10：I g G 1 F c 親和性ペプチド試薬による I g G 1 F c の異なる複数標的領域の位置選択的修飾、および抗体薬物複合体の合成】

(10-1) 抗 H E R 2 抗体トラスツズマブの位置選択的修飾に続く、チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

既報 (W O 2 0 1 9 / 2 4 0 2 8 7 A 1) 記載の下記ペプチド試薬をジメチルホルムアミドに溶解し 1 0 m M とした。抗 H E R 2 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 5 0 0 μ g を

10

20

30

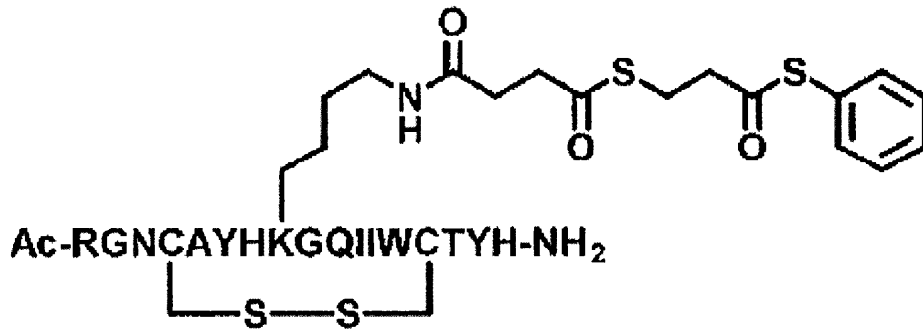
40

50

20 mMの酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) 200 μ L (20 μ M) に溶解させ、10 mMの上記ペプチド試薬を3.38 μ L (抗体に対して10当量) 加えて、室温で1時間攪拌した。続いて既報 (WO 2019/240287 A1) に従いヒドロキシルアミン溶液を加え、室温で1時間静置した。得られたチオール導入抗体について、ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、ヒドロキシルアミンによる切断反応が進行した148760にピークが確認された。下記ペプチド試薬が、IgG重鎖の246/248位のリジン残基の修飾を可能にする試薬であることを考慮すると、IgG重鎖の246/248位のリジン残基が下記ペプチド試薬で修飾されたと考えられる。

【0290】

【化54】



上記アミノ酸配列は、配列番号11のアミノ酸配列である。

【0291】

(10-2) 抗HER2抗体トラスツズマブの異なる複数標的領域の位置選択的修飾

(10-1) で合成したチオール導入抗体溶液を50 mMのHEPESバッファー (pH 8.2) に置換した。この溶液に対して、(3-2) で合成したペプチドリンカー連結物のジメチルホルムアミド溶液を抗体に対して10当量加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を20 mM酢酸アンモニウムバッファーに置換した。得られた抗体について、ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、(3-2) で合成したチオール導入抗体に対して結合性ペプチドが2個導入された157531のピークが確認された。

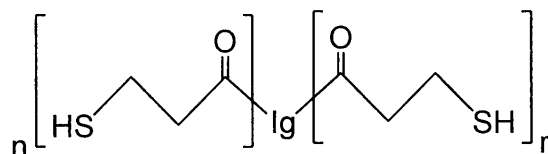
【0292】

(10-3) チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

(10-2) で得られた抗体中間体に対し、既報 (WO 2019/240287 A1) に従いヒドロキシルアミン溶液を加え、室温で1時間静置した。2時間後、20 mM PBSバッファー、10 mM EDTA (pH 7.4) へと置換し、チオール基導入抗体誘導体を得た。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、切断反応が進行した148760にピークが確認された。よって、得られたチオール基導入抗体誘導体は、下記構造を有することが確認された。

【0293】

【化55】



(ここで、Igは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含むイムノグロブリン単位 (IgG) を示し、かつ、Eu numberingに従う2個の重鎖中の288/290位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Igに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成している。また、同様にEu numberingに従う2個の重鎖中の246/248位に存在するリジン残基の側鎖中のアミノ基を介して、Igに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成している。2個の重鎖あたりの上記アミド結合の平均比率 r (28

8 / 290 位) および n (246 / 248 位) は、評価の結果、それぞれ 1.9、および 2.0 であった。]

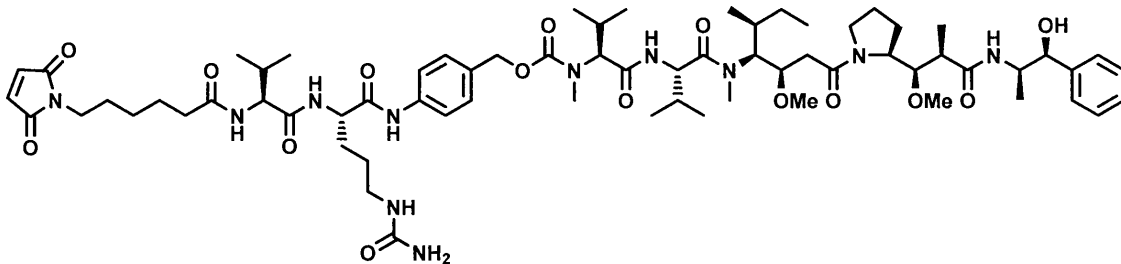
【0294】

(10-4) 薬物 mimic チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

(10-3) で得られたチオール基導入抗体の buffer (pH 7.4 PBS バッファー) 溶液 (20 μ M) に既報 (Org. Process Res. Dev. 2019, 23, 12, 2647-2654) の MC-VC-PAB-MMAE の DMF 溶液 (1.25 mM) を 10 当量加え、室温にて 2 時間静置後、NAP-5 Columns (GE ヘルスケア社製) を用いて精製して、ADC を得た。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、MC-VC-PAB-MMAE が 4 つ導入された 154029 にピークが確認された。

【0295】

【化 56】



MC-VC-PAB-MMAE

10

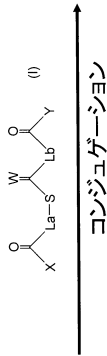
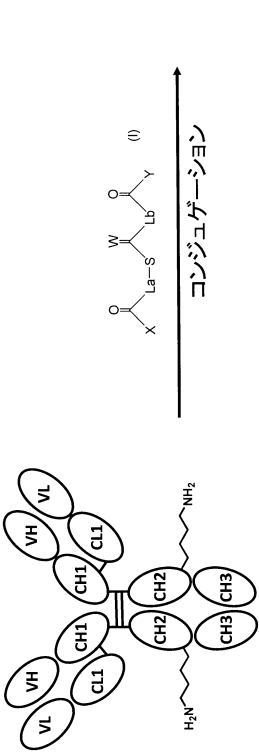
20

30

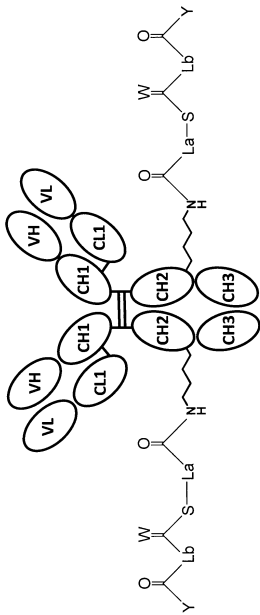
40

50

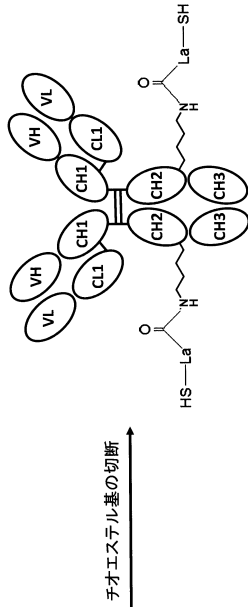
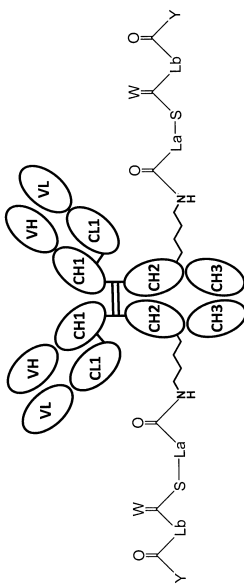
【図面】
【図 1】



コンジュゲーション



【図 2】



チオエステル基の切断

10

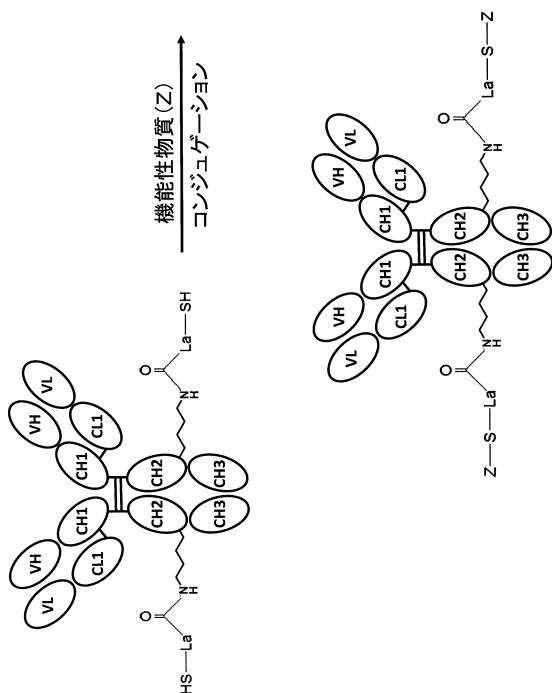
20

30

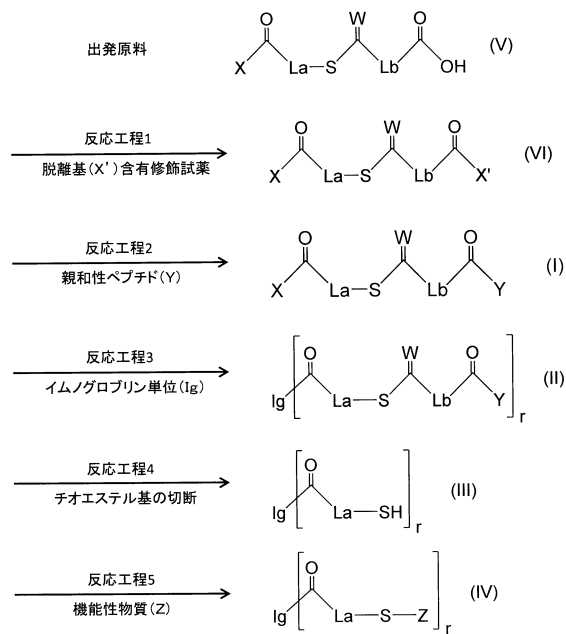
40

50

【図 3】



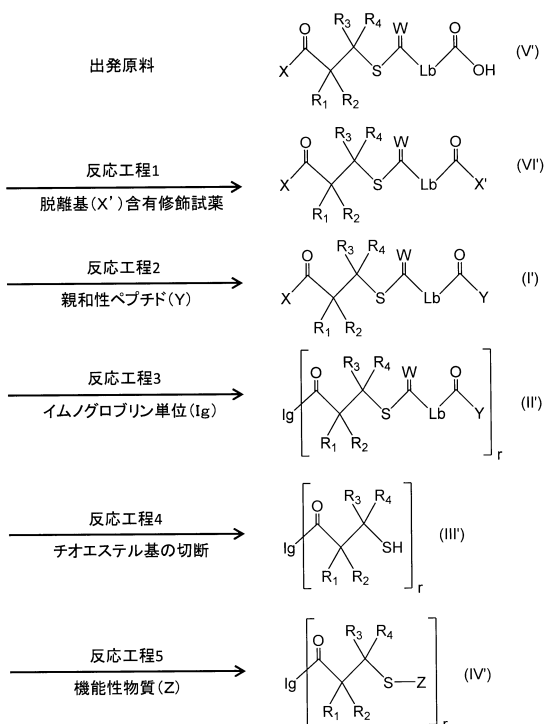
【図 4】



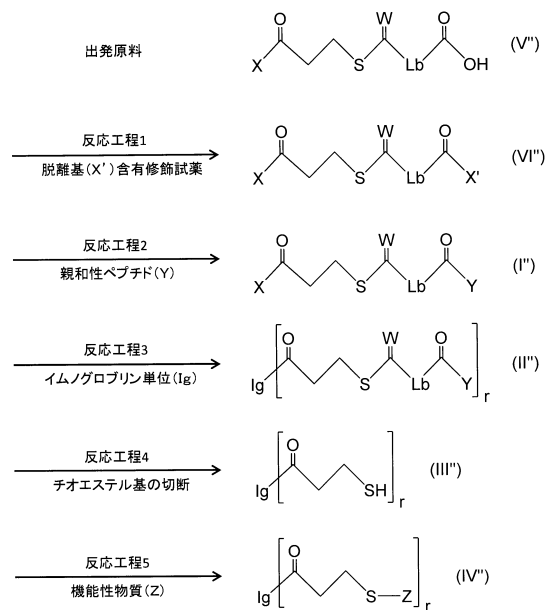
10

20

【図 5】



【図 6】

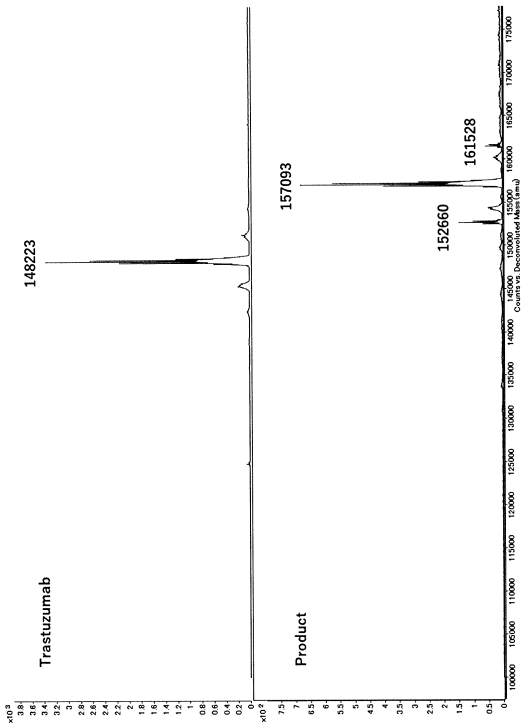


30

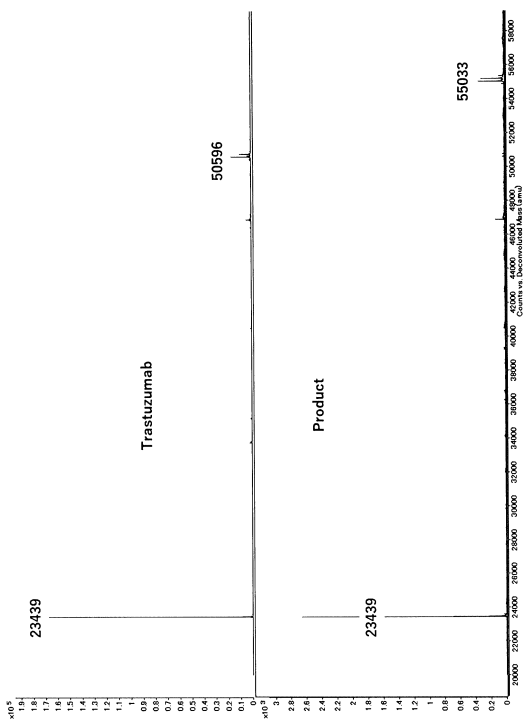
40

50

【図 7】



【図 8】

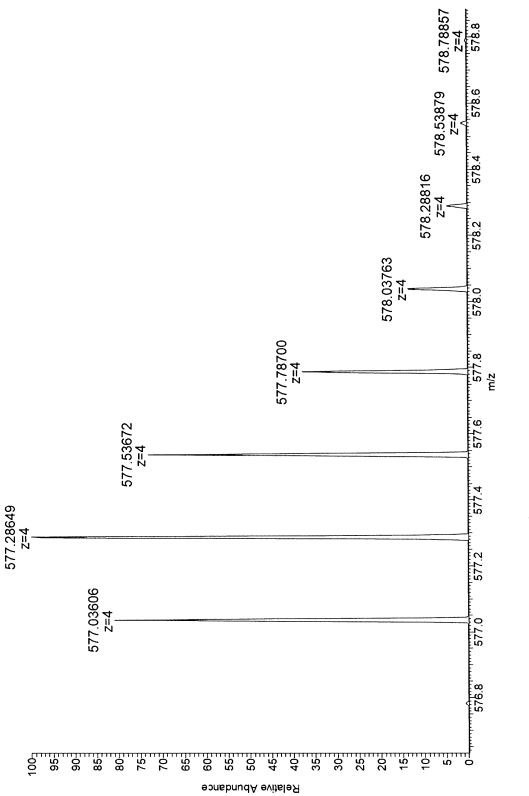


【図 9】

(1) トラスツズマブの重鎖のアミノ酸配列
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY
LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
QKSLSLSPG (配列番号 8)

(2) トラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQK
PKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGETDFTLTISLQ
PQEDFATYYCQGHYTPPTFGQGTQKVEIKRTVAAPSVEF
FPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QG LSSPVTKSFNRGEC (配列番号 9)

【図 10】



10

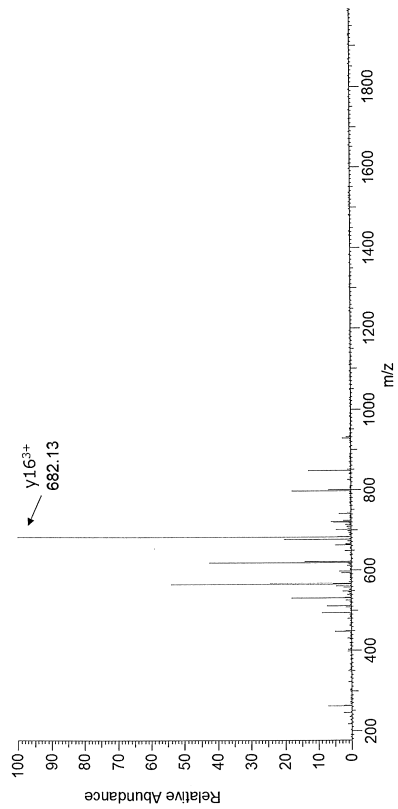
20

30

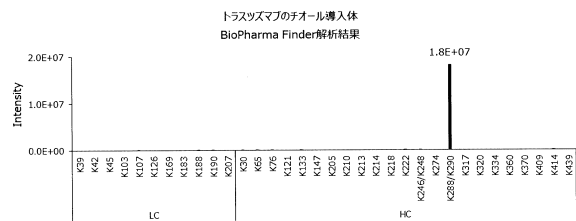
40

50

【図 1 1】



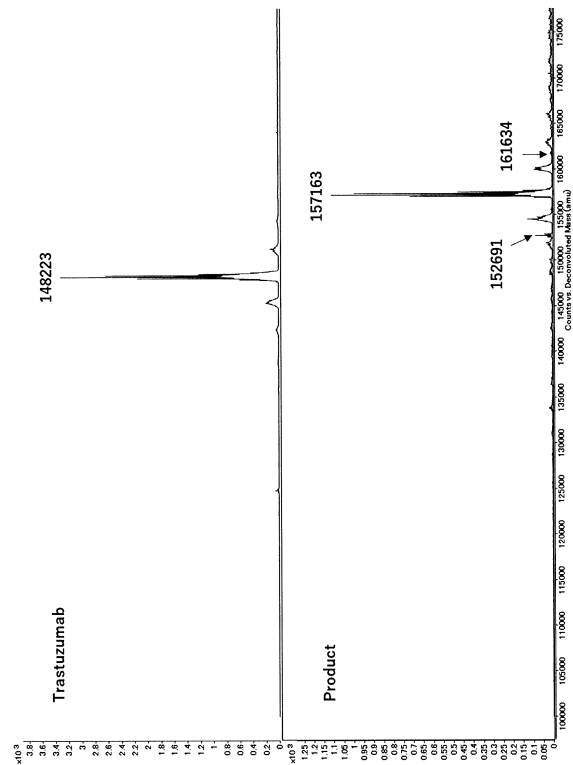
【図 1 2】



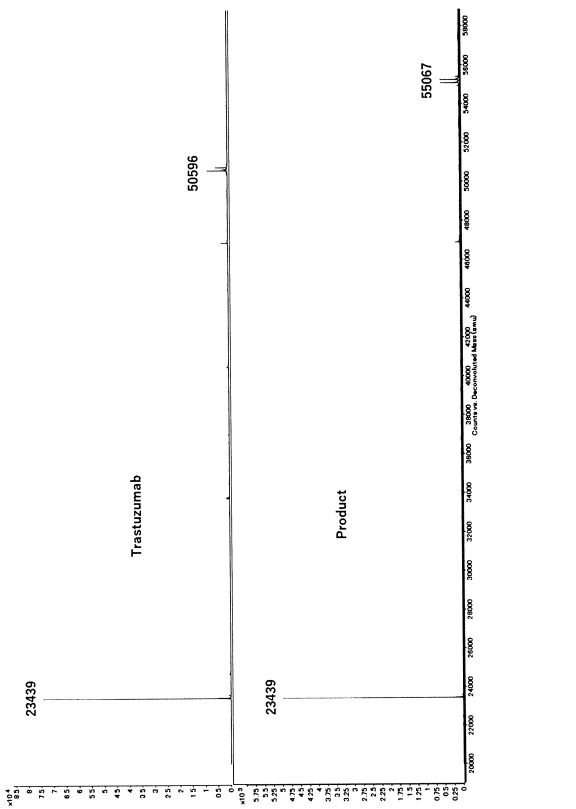
10

20

【図 1 3】



【図 1 4】

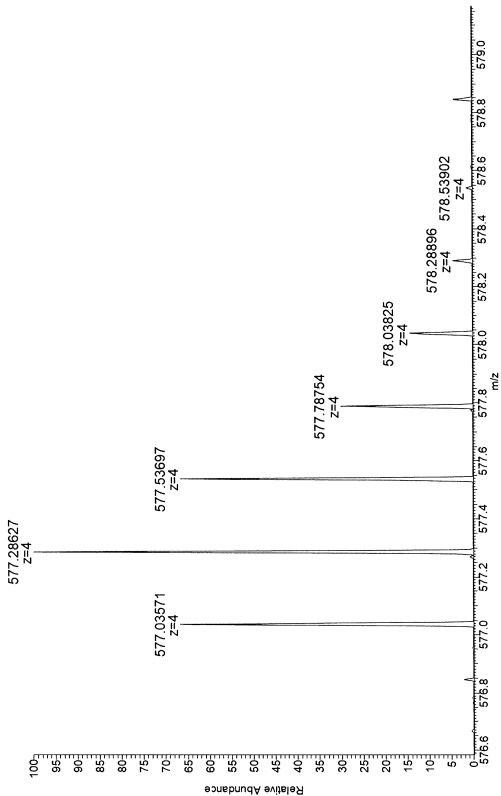


30

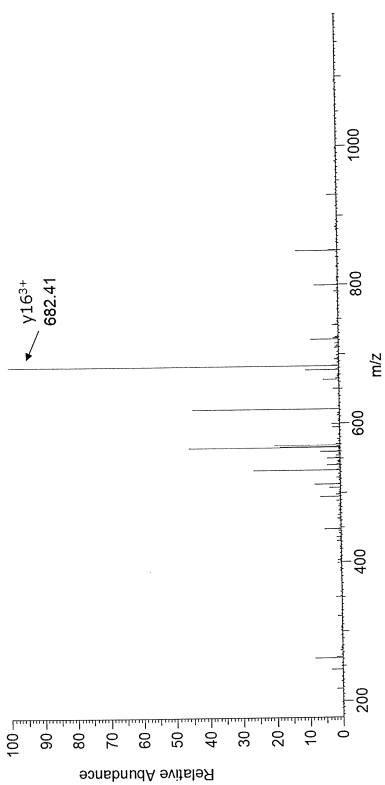
40

50

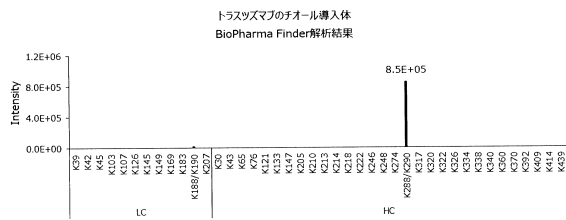
【図 1 5】



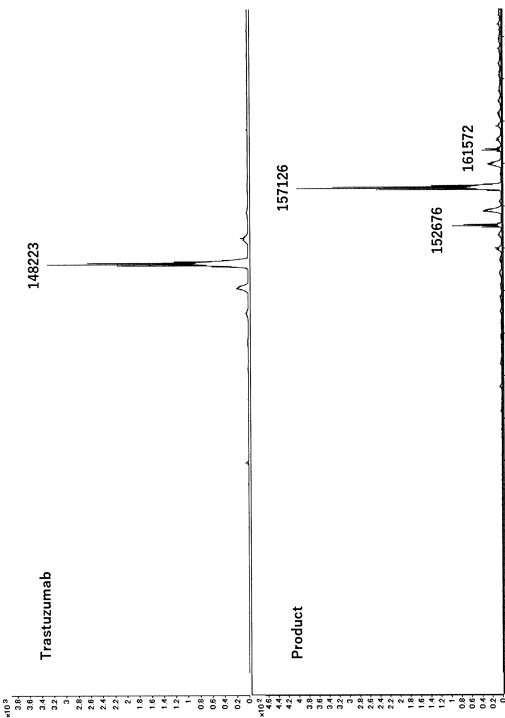
【図 1 6】



【図 1 7】



【図 1 8】



10

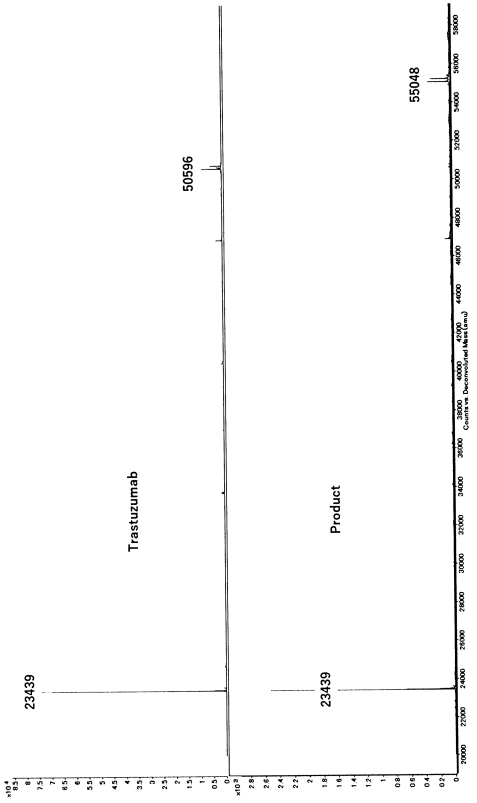
20

30

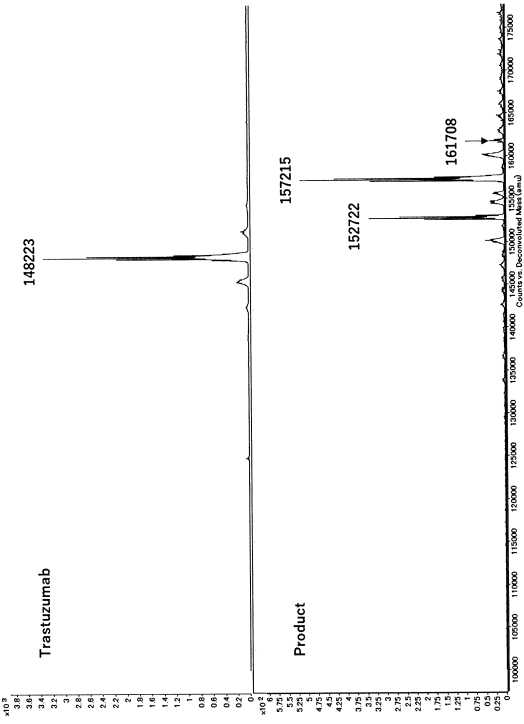
40

50

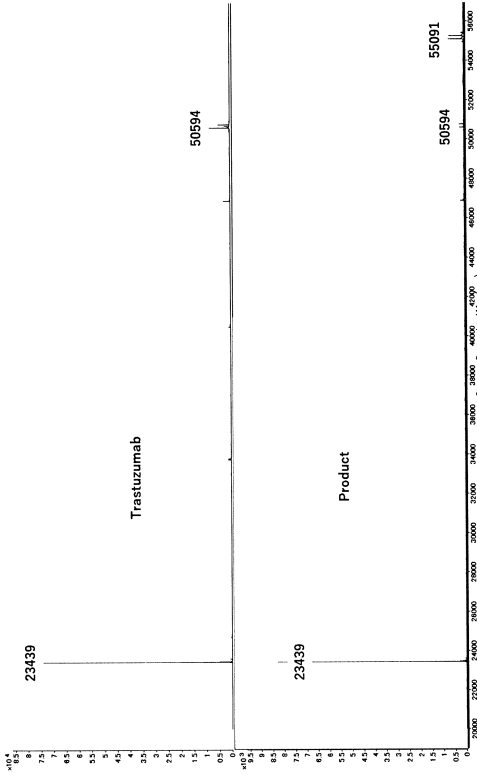
【図 19】



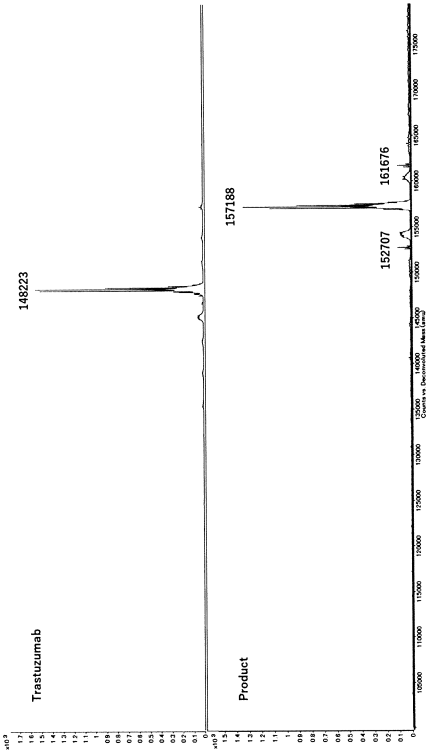
【図 20】



【図 21】



【図 22】



10

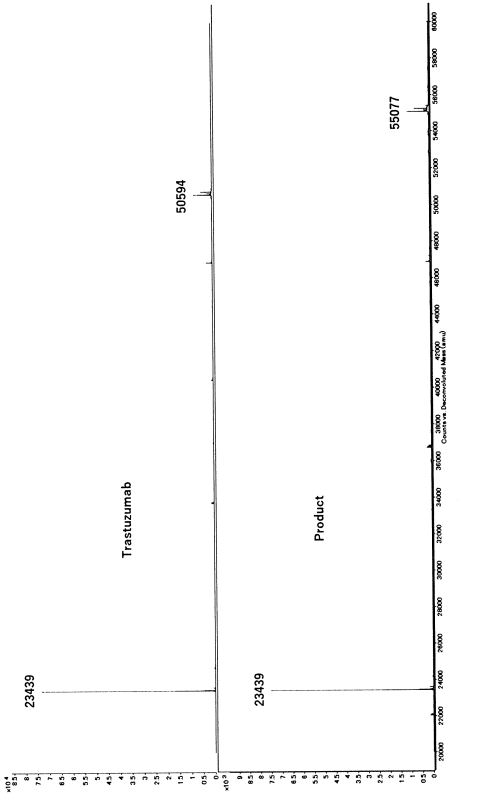
20

30

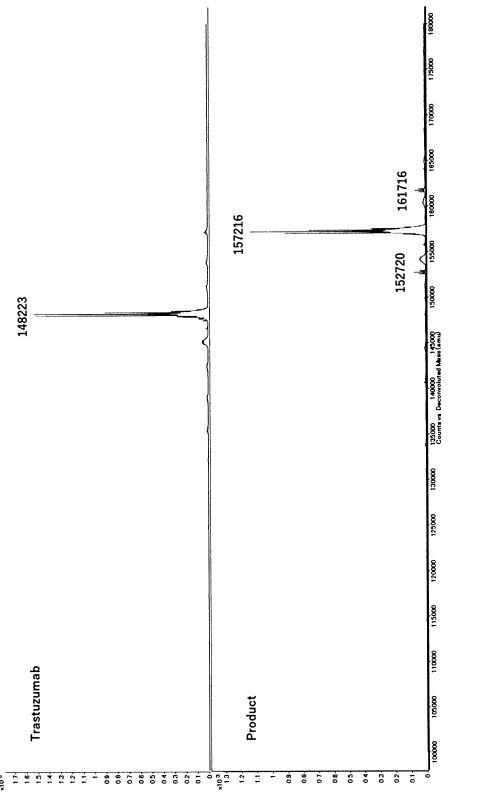
40

50

【図 2 3】



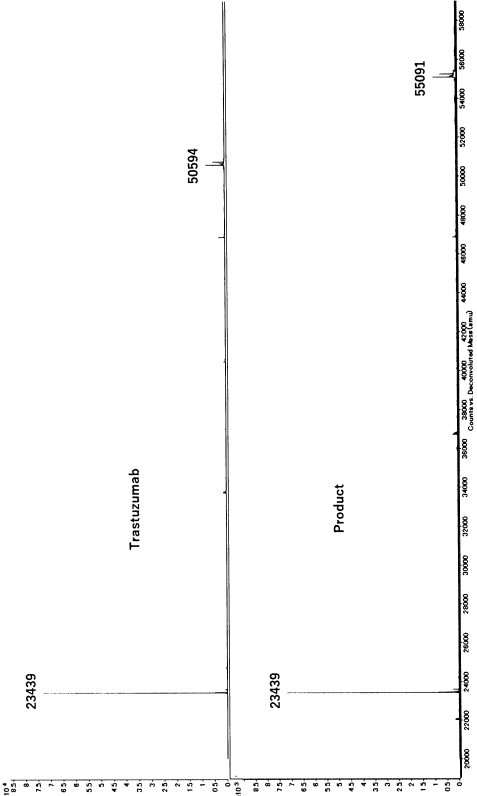
【図 2 4】



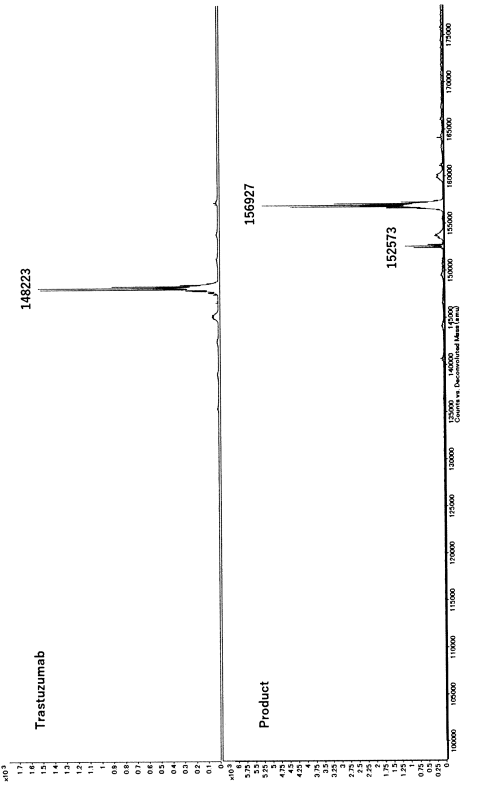
10

20

【図 2 5】



【図 2 6】

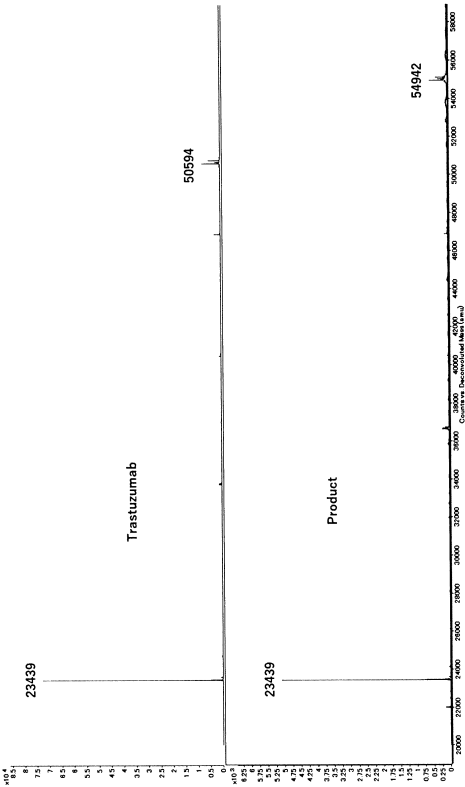


30

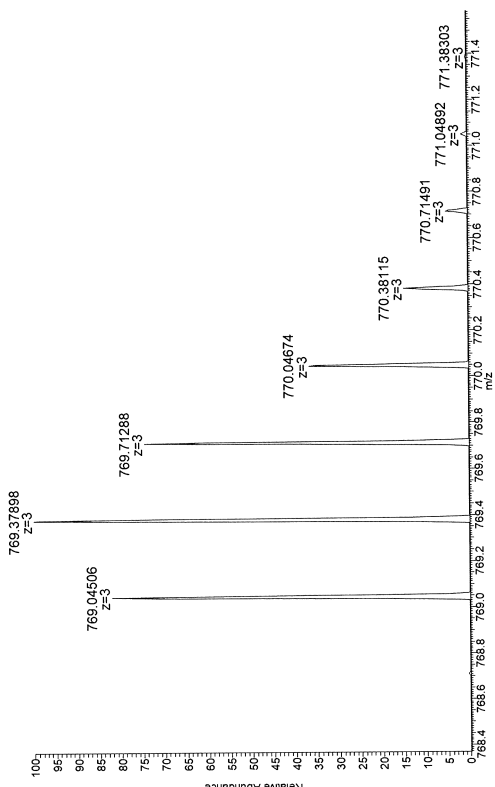
40

50

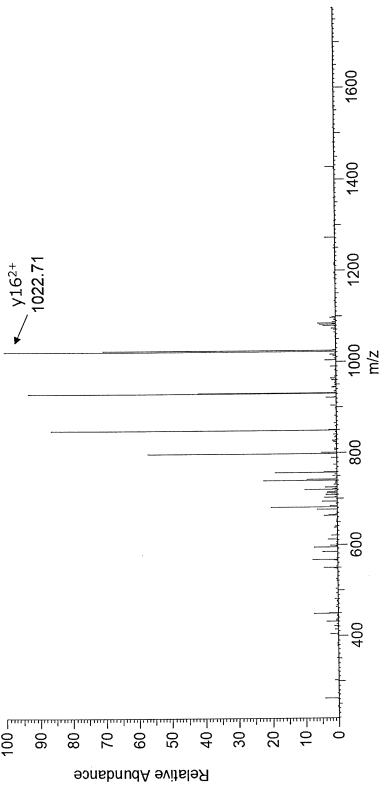
【図 2 7】



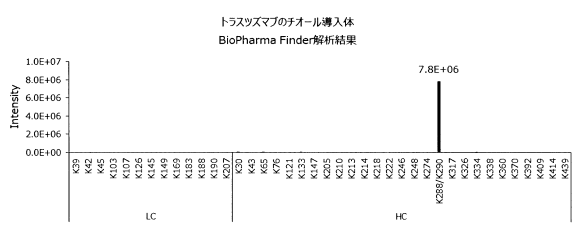
【図 2 8】



【図 2 9】



【図 3 0】



10

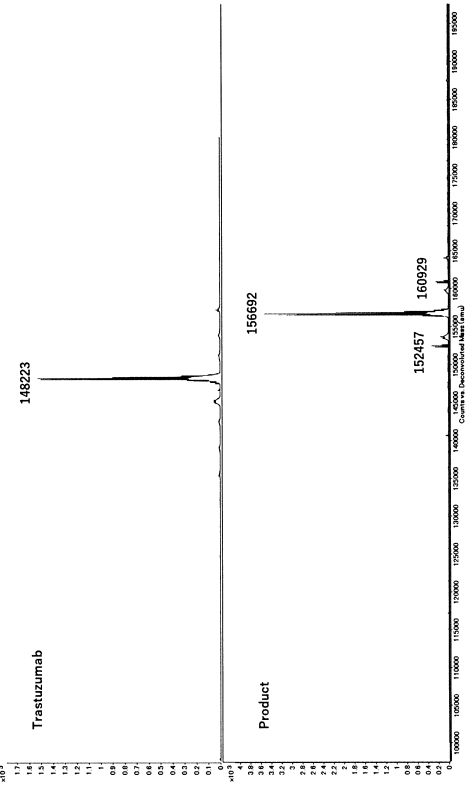
20

30

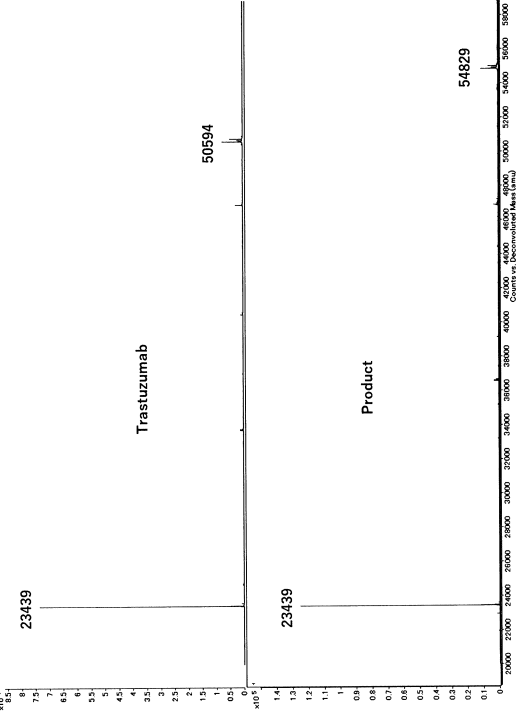
40

50

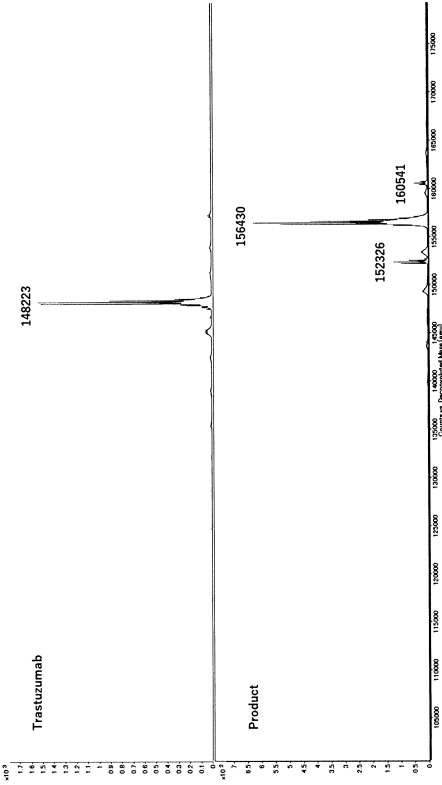
【図 3 1】



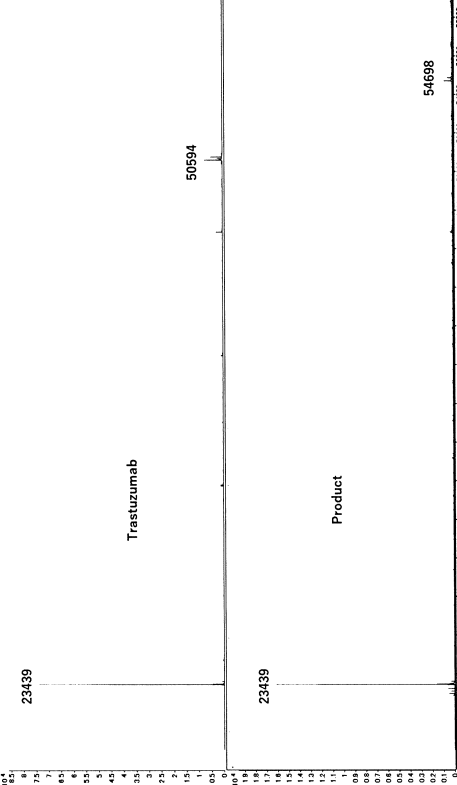
【図 3 2】



【図 3 3】



【図 3 4】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007687350000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献

国際公開第2018/199337 (WO, A1)

国際公開第2020/090979 (WO, A1)

国際公開第2019/240288 (WO, A1)

国際公開第2016/186206 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07K 14/00

C07K 16/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

UniProt/GeneSeq