

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7605290号
(P7605290)

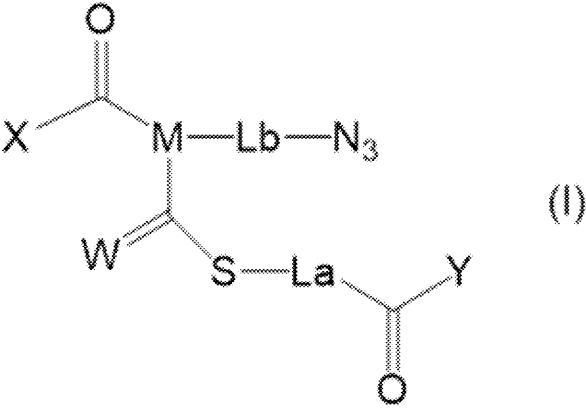
(45)発行日 令和6年12月24日(2024.12.24)

(24)登録日 令和6年12月16日(2024.12.16)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/00
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
		M	
		請求項の数 26 (全100頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2023-505632(P2023-505632)	(73)特許権者	000000066
(86)(22)出願日	令和4年3月10日(2022.3.10)		味の素株式会社
(86)国際出願番号	PCT/JP2022/010574		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(87)国際公開番号	WO2022/191283	(74)代理人	110002860
(87)国際公開日	令和4年9月15日(2022.9.15)		弁理士法人秀和特許事務所
審査請求日	令和6年7月26日(2024.7.26)	(72)発明者	藤井 友博
(31)優先権主張番号	特願2021-39706(P2021-39706)		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3月11日(2021.3.11)	(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	平間 竜介
			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】



(I)

〔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、

前記親和性ペプチドが、下記（１）～（４）からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含み：

- （１）RGNCA Y H K G Q I I W C T Y H（配列番号２）；
 （２）F N 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 D D C（配列番号４）；
 （３）F N 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（配列番号５）；および
 （４）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 (O r n) E E C（配列番号６）、

Mは、Mに隣接するC＝O中の炭素原子とC＝W中の炭素原子を、炭素原子数３～５個からなる主鎖部分で連結する３価の基を示し、前記主鎖部分が、炭素原子数３個からなる直鎖アルキレン、炭素原子数３個からなるフェニレン構成炭素原子、または炭素原子数１もしくは２個からなる直鎖アルキレンと炭素原子数３個からなるフェニレン構成炭素原子との組合せであり、

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、

N₃は、アジド基を示し、

L aは、２価の基を示し、

L bは、２価の基を示し、

前記２価の基が、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)－、－N R_d－（ここで、R_dは、水素原子、もしくは置換基を示す。）、－O－、－S－、またはこれらの２以上の組み合わせからなる基から構成される。）で表される化合物またはその塩。

【請求項２】

前記脱離基が以下から選ばれる、請求項１記載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、もしく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、もしく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、もしく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。

【請求項３】

前記１価の炭化水素基が、１価の芳香族炭化水素基である、請求項２記載の化合物またはその塩。

【請求項４】

前記１価の芳香族炭化水素基が、フェニル基である、請求項３記載の化合物またはその塩。

【請求項５】

前記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、請求項１～４のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

【請求項６】

前記イムノグロブリン単位がヒトIgGである、請求項１～５のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

【請求項７】

Mにおける炭素原子数３～５個からなる主鎖部分が、炭素原子数３個からなる直鎖アルキレンである、請求項１～６のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

【請求項８】

L aに隣接するカルボニル基が、親和性ペプチド中のリジン残基の側鎖中のアミノ基と

アミド結合を形成している、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

【請求項 9】

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、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項記載の化合物またはその塩。

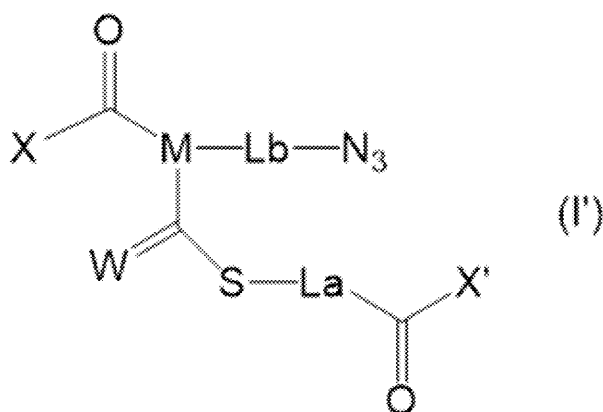
【請求項 10】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項記載の化合物またはその塩を含む、抗体誘導体化用試薬。

【請求項 11】

下記式 (I') :

【化 2】



〔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、

前記脱離基 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り、

M は、M に隣接する C = O 中の炭素原子と C = W 中の炭素原子を、炭素原子数 3 ～ 5 個からなる主鎖部分で連結する 3 価の基を示し、前記主鎖部分が、炭素原子数 3 個からなる直鎖アルキレン、炭素原子数 3 個からなるフェニレン構成炭素原子、または炭素原子数 1 もしくは 2 個からなる直鎖アルキレンと炭素原子数 3 個からなるフェニレン構成炭素原子との組合せであり、

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、

N₃ は、アジド基を示し、

La は、2 価の基を示し、

Lb は、2 価の基を示し、

前記 2 価の基が、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- (ここで、R_d は、水素原子、もしくは置換基を示す。)、-O-、-S-、またはこれらの 2 以上の組み合わせからなる基から構成される。〕で表される化合物またはその塩。

【請求項 12】

下記式 (I'') :

10

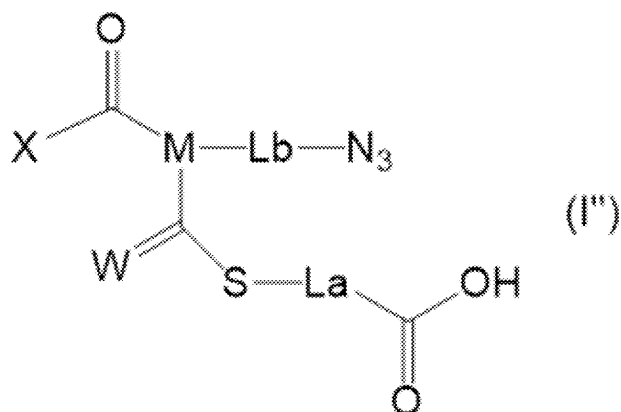
20

30

40

50

【化 3】



10

〔式中、

X は、脱離基を示し、

OH は、ヒドロキシ基を示し、

M は、M に隣接する C = O 中の炭素原子と C = W 中の炭素原子を、炭素原子数 3 ～ 5 個からなる主鎖部分で連結する 3 価の基を示し、前記主鎖部分が、炭素原子数 3 個からなる直鎖アルキレン、炭素原子数 3 個からなるフェニレン構成炭素原子、または炭素原子数 1 もしくは 2 個からなる直鎖アルキレンと炭素原子数 3 個からなるフェニレン構成炭素原子との組合せであり、

20

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、

N₃ は、アジド基を示し、

La は、2 価の基を示し、

Lb は、2 価の基を示し、

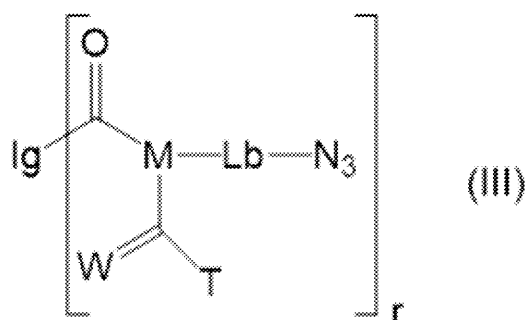
前記 2 価の基が、2 価の直鎖炭化水素基、2 価の環状炭化水素基、2 価の複素環基、-C(=O)-、-C(=S)-、-NR_d- (ここで、R_d は、水素原子、もしくは置換基を示す。)、-O-、-S-、またはこれらの 2 以上の組み合わせからなる基から構成される。) で表される化合物またはその塩。

30

【請求項 13】

下記式 (I I I) :

【化 4】



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、2 個の重鎖中の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、

M は、M に隣接する C = O 中の炭素原子と C = W 中の炭素原子を、炭素原子数 3 ～ 5 個からなる主鎖部分で連結する 3 価の基を示し、前記主鎖部分が、炭素原子数 3 個からなる

50

直鎖アルキレン、炭素原子数 3 個からなるフェニレン構成炭素原子、または炭素原子数 1 もしくは 2 個からなる直鎖アルキレンと炭素原子数 3 個からなるフェニレン構成炭素原子との組合せであり、

O は、酸素原子を示し、

T は、1 価の基を示し、置換されていてもよいヒドロキシアミノ基であり、

W は、酸素原子または硫黄原子を示し、

N₃ は、アジド基を示し、

L b は、2 価の基を示し、

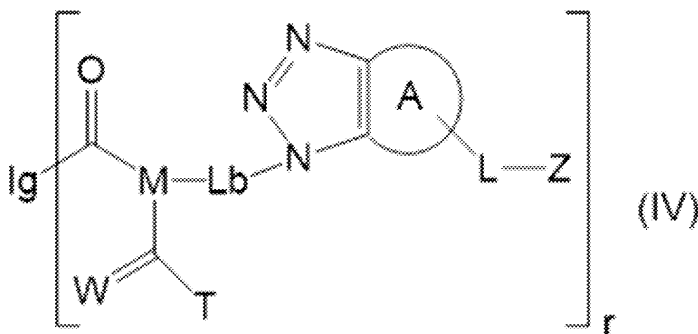
前記 2 価の基が、2 価の直鎖炭化水素基、2 価の環状炭化水素基、2 価の複素環基、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-NR_d-$ （ここで、R_d は、水素原子、もしくは置換基を示す。）、 $-O-$ 、 $-S-$ 、またはこれらの 2 以上の組み合わせからなる基から構成され、

2 個の重鎖あたりの前記アミド結合の平均比率 r は、1.0～3.0 である。) で表される構造単位を含む、アジド基導入抗体誘導体またはその塩。

【請求項 14】

下記式 (IV) :

【化 5】



〔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、2 個の重鎖中の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、

M は、M に隣接する $C=O$ 中の炭素原子と $C=W$ 中の炭素原子を、炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分で連結する 3 価の基を示し、前記主鎖部分が、炭素原子数 3 個からなる直鎖アルキレン、炭素原子数 3 個からなるフェニレン構成炭素原子、または炭素原子数 1 もしくは 2 個からなる直鎖アルキレンと炭素原子数 3 個からなるフェニレン構成炭素原子との組合せであり、

O は、酸素原子を示し、

T は、1 価の基を示し、置換されていてもよいヒドロキシアミノ基であり、

W は、酸素原子または硫黄原子を示し、

N は、窒素原子を示し、

L b は、2 価の基を示し、

前記 2 価の基が、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、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-NR_d-$ （ここで、R_d は、水素原子、もしくは置換基を示す。）、 $-O-$ 、 $-S-$ 、またはこれらの 2 以上の組み合わせからなる基から構成され、

Z は、機能性物質を示し、

L は、2 価の基を示し、

環 A は、トリアゾール環と融合した環を示し、

環 A は、単環、または単環と他の環との縮合環であり、トリアゾールと共有している炭素原子間の二重結合の部分を含み、

前記単環は、同素環、または酸素原子、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種以上を含む複素環であり、前記単環と縮合される他の環は、シクロアルカン、アレーン、または複素環であり、

2個の重鎖あたりの前記アミド結合の平均比率 r は、 $1.0 \sim 3.0$ である。)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。

【請求項15】

抗体がヒト抗体である、請求項13記載のアジド基導入抗体誘導体もしくはその塩、または請求項14記載のコンジュゲートもしくはその塩。

【請求項16】

抗体がヒトIgGである、請求項13記載のアジド基導入抗体誘導体もしくはその塩、または請求項14もしくは15記載のコンジュゲートもしくはその塩。

【請求項17】

Mにおける炭素原子数3～5個からなる主鎖部分が、炭素原子数3個からなる直鎖アルキレンである、請求項13、15、もしくは16記載のアジド基導入抗体誘導体もしくはその塩、または請求項14～16のいずれか一項記載のコンジュゲートもしくはその塩。

【請求項18】

前記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の246／248位、288／290位、および317位からなる群より選ばれる1以上の位置に存在する、請求項13もしくは15～17のいずれか一項記載のアジド基導入抗体誘導体もしくはその塩、または請求項14～17のいずれか一項記載のコンジュゲートもしくはその塩。

【請求項19】

前記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の246／248位のリジン残基に対する位置選択性を有する、請求項13もしくは15～17のいずれか一項記載のアジド基導入抗体誘導体、または請求項14～17のいずれか一項記載のコンジュゲートもしくはその塩。

【請求項20】

前記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の288／290位のリジン残基に対する位置選択性を有する、請求項13もしくは15～17のいずれか一項記載のアジド基導入抗体誘導体、または請求項14～17のいずれか一項記載のコンジュゲートもしくはその塩。

【請求項21】

前記平均比率 r が、 $1.5 \sim 2.5$ である、請求項13もしくは15～20のいずれか一項記載のアジド基導入抗体誘導体もしくはその塩、または請求項14～20のいずれか一項記載のコンジュゲートもしくはその塩。

【請求項22】

前記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の246／248位、288／290位、および317位からなる群より選ばれる2つの位置に存在する、請求項18～21のいずれか一項記載のアジド基導入抗体誘導体もしくはその塩、または請求項18～21のいずれか一項記載のコンジュゲートもしくはその塩。

【請求項23】

前記2つの位置が、246／248位、および288／290位である、請求項22記載のアジド基導入抗体誘導体もしくはその塩、またはコンジュゲートもしくはその塩。

【請求項24】

下記式(II)：

10

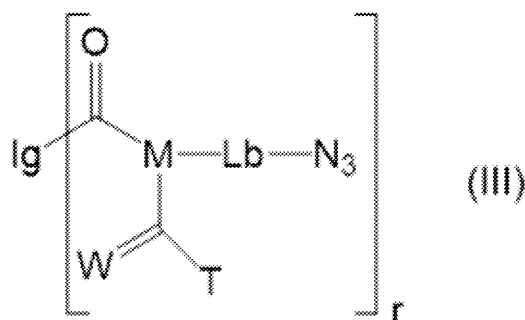
20

30

40

50

【化 6】



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、2 個の重鎖中の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、

M は、M に隣接する C = O 中の炭素原子と C = W 中の炭素原子を、炭素原子数 3 ～ 5 個からなる主鎖部分で連結する 3 価の基を示し、前記主鎖部分が、炭素原子数 3 個からなる直鎖アルキレン、炭素原子数 3 個からなるフェニレン構成炭素原子、または炭素原子数 1 もしくは 2 個からなる直鎖アルキレンと炭素原子数 3 個からなるフェニレン構成炭素原子との組合せであり、

20

O は、酸素原子を示し、

T は、1 価の基を示し、置換されていてもよいヒドロキシアミノ基であり、

W は、酸素原子または硫黄原子を示し、

N₃ は、アジド基を示し、

L b は、2 価の基を示し、

前記 2 価の基が、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) -、- N R_d - (ここで、R_d は、水素原子、もしくは置換基を示す。)、- O -、- S -、またはこれらの 2 以上の組み合わせからなる基から構成され、

2 個の重鎖あたりの前記アミド結合の平均比率 r は、1 . 0 ～ 3 . 0 である。) で表される構造単位を含む、アジド基導入抗体誘導体またはその塩を、下記式 (V) :

30

【化 7】



〔式中、

環 A' は、炭素原子間の三重結合を有する環を示し、

Z は、機能性物質を示し、

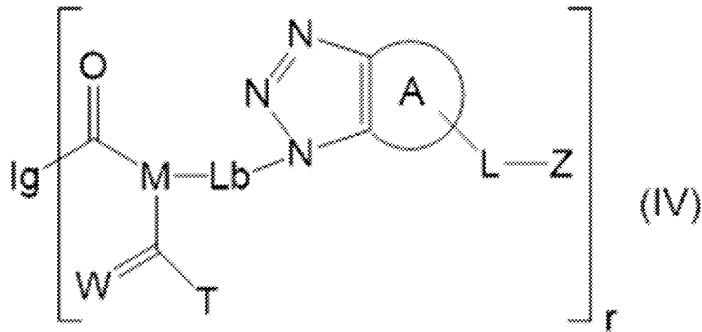
40

L は、2 価の基を示す。) で表される目的物質と反応させて、

下記式 (I V) :

50

【化 8】



10

〔式中、

環 A は、トリアゾール環に融合した環を示し、

環 A は、単環、または単環と他の環との縮合環であり、トリアゾールと共有している炭素原子間の二重結合の部分を含み、

前記単環は、同素環、または酸素原子、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 種以上を含む複素環であり、

前記単環と縮合される他の環は、シクロアルカン、アレーン、または複素環であり、

N は、窒素原子を示し、

I g、M、O、T、W、L b、および r は、前記式 (I I I) のものと同じであり、

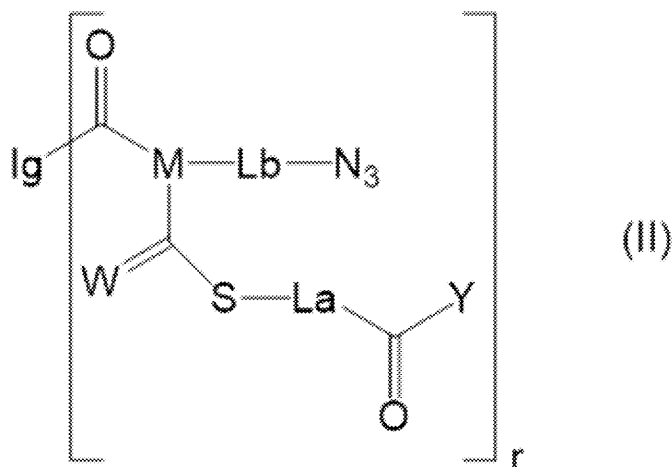
Z、および L は、前記式 (V) のものと同じである。〕で表される構造単位を含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩を生成することを含む、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩の製造方法。

20

【請求項 25】

下記式 (I I)：

【化 9】



30

〔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、2 個の重鎖中の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、前記イムノグロブリン単位における C H 2 ドメインに結合領域を有する親和性ペプチドを示し、

前記親和性ペプチドが、下記 (1) ~ (4) からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含み：

(1) R G N C A Y H K G Q I I W C T Y H (配列番号 2)；

(2) F N 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 D D C (配列番号 4)；

40

50

(3) F N 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 (配列番号5) ; および

(4) 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 (O r n) E E C (配列番号6) 、

Mは、Mに隣接するC=O中の炭素原子とC=W中の炭素原子を、炭素原子数3～5個からなる主鎖部分で連結する3価の基を示し、前記主鎖部分が、炭素原子数3個からなる直鎖アルキレン、炭素原子数3個からなるフェニレン構成炭素原子、または炭素原子数1もしくは2個からなる直鎖アルキレンと炭素原子数3個からなるフェニレン構成炭素原子との組合せであり、

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、

N₃は、アジド基を示し、

L aは、2価の基を示し、

L bは、2価の基を示し、

前記2価の基が、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- (ここで、R_dは、水素原子、もしくは置換基を示す。)、-O-、-S-、またはこれらの2以上の組み合わせからなる基から構成され、

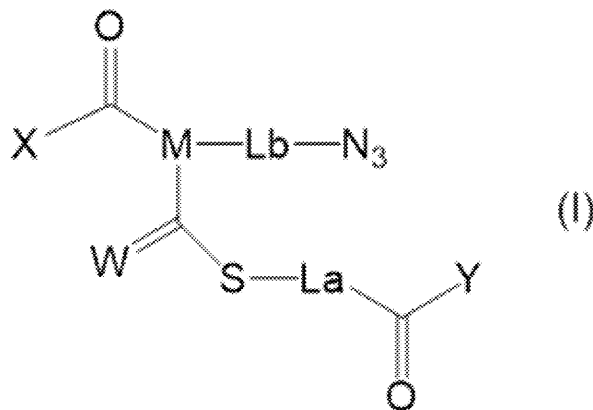
2個の重鎖あたりの前記アミド結合の平均比率rは、1.0～3.0である。) で表される構造単位を含む、抗体中間体またはその塩を、チオエステルの切断反応に供して、

請求項24記載の式(III)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さらに含む、請求項24記載の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。

【請求項26】

下記式(I)：

【化10】



〔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、

前記親和性ペプチドが、下記(1)～(4)からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含み：

(1) R G N C A Y H K G Q I I W C T Y H (配列番号2) ;

(2) F N 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 D D C (配列番号4) ;

(3) F N 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 (配列番号5) ; および

(4) 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 (O r n) E E C (

配列番号 6)、

Mは、Mに隣接するC=O中の炭素原子とC=W中の炭素原子を、炭素原子数3～5個からなる主鎖部分で連結する3価の基を示し、前記主鎖部分が、炭素原子数3個からなる直鎖アルキレン、炭素原子数3個からなるフェニレン構成炭素原子、または炭素原子数1もしくは2個からなる直鎖アルキレンと炭素原子数3個からなるフェニレン構成炭素原子との組合せであり、

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、

N₃は、アジド基を示し、

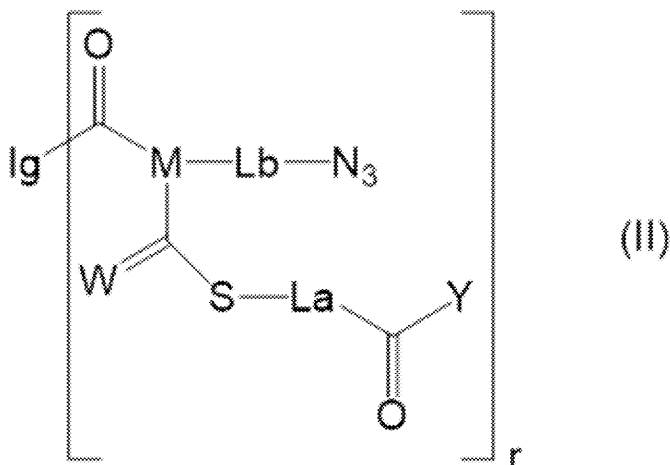
Laは、2価の基を示し、

Lbは、2価の基を示し、

前記2価の基が、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-（ここで、R_dは、水素原子、もしくは置換基を示す。）、-O-、-S-、またはこれらの2以上の組み合わせからなる基から構成される。）で表される化合物またはその塩を、前記イムノグロブリン単位を含む抗体と反応させて、

下記式（II）：

【化11】



〔式中、

Igは、前記イムノグロブリン単位を示し、

Y、M、O、S、W、N₃、La、およびLbは、前記式（I）のものと同一であり、

2個の重鎖あたりの前記アミド結合の平均比率rは、1.0～3.0である。）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により、請求項25記載の式（II）で表される構造単位を含むアジド基導入抗体誘導体またはその塩を生成することをさらに含む、請求項25記載の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。

10

【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。

20

【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。

30

【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】

40

50

本発明の目的は、抗体と修飾基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における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式（I）で表される化合物（アジド基含有化合物）を用いることで、イムノグロブリン単位とアジド基含有修飾基との結合の平均比率（アジド基含有修飾基／イムノグロブリン単位）を所望の範囲（1.0～3.0）に高度に制御することが容易になることを見出した。

【0010】

本発明者らはまた、上記アジド基含有化合物によれば、イムノグロブリン単位中の重鎖における異なるリジン残基の位置選択的な修飾が容易になるため、上記アジド基含有化合物がイムノグロブリン単位の位置選択的な修飾の汎用性に優れることを見出した。例えば、ある種のアミノ酸配列を有する親和性ペプチドを有するアジド基含有化合物を使用することにより、ヒトIgG重鎖の246／248位のリジン残基を位置選択的に修飾しつつ、イムノグロブリン単位とアジド基含有修飾基との結合の平均比率を上記所望の範囲に高度に制御することができる。また、別の種のアミノ酸配列を有する親和性ペプチドを有するアジド基含有化合物を使用することにより、ヒトIgG重鎖の288／290位のリジン残基を位置選択的に修飾しつつ、イムノグロブリン単位とアジド基含有修飾基との結合の平均比率を上記所望の範囲に高度に制御することができる。

【0011】

本発明者らはさらに、式（I）で表われる化合物またはそれらの塩の使用により調製することができる、イムノグロブリン単位中の重鎖におけるリジン残基がアジド基含有修飾基で修飾され、かつイムノグロブリン単位とアジド基含有修飾基との結合の平均比率（アジド基含有修飾基数／イムノグロブリン単位）が所望の範囲（1.0～3.0）に高度に制御された抗体が優れた安定性を提示できることなどを見出し、本発明を完成するに至った。

【0012】

すなわち、本発明は、以下に示されるような化合物またはその塩、またはそれらを含む抗体誘導体化用試薬を提供する。

〔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〕上記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〕上記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たはその塩。

〔5〕Mにおける炭素原子数3～5個からなる主鎖部分が、直鎖アルキレン、もしくは環構成炭素原子、またはこれらの組合せを含む部分である、〔1〕～〔4〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔6〕MおよびYを連結する主鎖の原子数が6～20個である、〔1〕～〔5〕のいずれかの化合物またはその塩。

10

20

30

40

50

〔7〕 L aに隣接するカルボニル基が、親和性ペプチド中のリジン残基の側鎖中のアミノ基とアミド結合を形成している、〔1〕～〔6〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔8〕 上記親和性ペプチドが、下記（A）のアミノ酸配列を含む、〔1〕～〔7〕のいずれかの化合物またはその塩：

（A）（X₀₋₃）_a - C - X_{a a 1} - X_{a a 2} - X_{a a 3} - X_{a a 4} - X_{a a 5} - X_{a a 6} - I - I - W - C - （X₀₋₃）_b（配列番号1）

ここで、

（X₀₋₃）_aは、なし、または1～3個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基（リジン残基およびシステイン残基以外）であり、

（X₀₋₃）_bは、なし、または1～3個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基（リジン残基およびシステイン残基以外）であり、

X_{a a 1}は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X_{a a 2}は、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、またはフェニルアラニン残基であり、

X_{a a 3}は、ヒスチジン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アルギニン残基、またはグリシン残基であり、

X_{a a 4}は、リジン残基であり、

X_{a a 5}は、グリシン残基、セリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、スレオニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、イソロイシン残基、またはアルギニン残基であり、

X_{a a 6}は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である。

〔9〕 上記（A）のアミノ酸配列を含む親和性ペプチドが、下記（1）のアミノ酸配列を含む、〔8〕の化合物またはその塩：

（1）R G N C A Y H K G Q I I W C T Y H（配列番号2）。

〔10〕 上記親和性ペプチドが、下記（B）のアミノ酸配列を含む、〔1〕～〔7〕のいずれかの化合物またはその塩：

（B）P N L N E E Q R N A R I R S I（配列番号3）。

〔11〕 上記（B）のアミノ酸配列を含む親和性ペプチドが、下記（1）～（3）からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む、〔10〕の化合物またはその塩：

（1）F N 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 D D C（配列番号4）；

（2）F N 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（配列番号5）；または

（3）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（O r n）E E C（配列番号6）。

〔12〕 上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

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、〔8〕～〔11〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔13〕 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。

〔0013〕

本発明はまた、抗体中間体またはその塩を提供する。

〔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。

〔2〕 抗体がヒト抗体である、〔1〕の抗体中間体またはその塩。

〔3〕抗体がヒトIgGである、〔1〕または〔2〕の抗体中間体またはその塩。

〔4〕上記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の246／248位、288／290位、および317位からなる群より選ばれる1以上の位置に存在する、〔1〕～〔3〕のいずれかの抗体中間体またはその塩。

〔5〕上記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の246／248位のリジン残基に対する位置選択性を有する、〔1〕～〔4〕のいずれかの抗体中間体またはその塩。

〔6〕上記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の288／290位のリジン残基に対する位置選択性を有する、〔1〕～〔4〕のいずれかの抗体中間体またはその塩。

〔7〕上記平均比率rが、1.5～2.5である、〔1〕～〔6〕のいずれかの抗体中間体またはその塩。

〔8〕Mにおける炭素原子数3～5個からなる主鎖部分が、直鎖アルキレン、もしくは環構成炭素原子、またはこれらの組合せを含む部分である、〔1〕～〔7〕のいずれかの抗体中間体またはその塩。

〔9〕前記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の246／248位、288／290位、および317位からなる群より選ばれる2つの位置に存在する、〔4〕～〔8〕のいずれかの抗体中間体またはその塩。

〔10〕前記2つの位置が、246／248位、および288／290位である、〔9〕の抗体中間体またはその塩。

〔11〕MおよびYを連結する主鎖の原子数が6～20個である、〔1〕～〔10〕のいずれかの抗体中間体またはその塩。

〔12〕Laに隣接するカルボニル基が、親和性ペプチド中のリジン残基の側鎖中のアミノ基とアミド結合を形成している、〔1〕～〔11〕のいずれかの抗体中間体またはその塩。

〔13〕上記親和性ペプチドが、下記(A)のアミノ酸配列を含む、〔1〕～〔12〕のいずれかの抗体中間体またはその塩：

(A) (X0-3) a-C-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-I-I-W-C-(X0-3) b (配列番号1)

ここで、

(X0-3) aは、なし、または1～3個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基（リジン残基およびシステイン残基以外）であり、

(X0-3) bは、なし、または1～3個の連続する同一または異なる任意のアミノ酸残基（リジン残基およびシステイン残基以外）であり、

Xaa1は、アラニン残基、グリシン残基、ロイシン残基、プロリン残基、アルギニン残基、バリン残基、アスパラギン残基、グルタミン酸残基、またはフェニルアラニン残基であり、

Xaa2は、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、またはフェニルアラニン残基であり、

Xaa3は、ヒスチジン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、アルギニン残基、またはグリシン残基であり、

Xaa4は、リジン残基であり、

Xaa5は、グリシン残基、セリン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、ヒスチジン残基、スレオニン残基、ロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、イソロイシン残基、またはアルギニン残基であり、

Xaa6は、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、プロリン残基、グリシン残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、またはヒスチジン残基である。

〔14〕上記(A)のアミノ酸配列を含む親和性ペプチドが、下記(1)のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を含む、〔13〕の抗体中間体またはその塩：

〔1〕 RGNCA Y H K G Q I I W C T Y H（配列番号2）。

〔15〕上記親和性ペプチドが、下記（B）のアミノ酸配列を含む、〔1〕～〔12〕のいずれかの抗体中間体またはその塩：

（B） PNLNEEQRNARIRSI（配列番号3）。

〔16〕上記（B）のアミノ酸配列を含む親和性ペプチドが、下記（1）～（3）からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む、〔15〕の抗体中間体またはその塩：

（1） FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC（配列番号4）；

（2） FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC（配列番号5；または

（3） MQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSI（Orn）EEC（配列番号6）。

〔17〕上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

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、〔1〕～〔16〕のいずれかの抗体中間体またはその塩。

〔0014〕

本発明はまた、アジド基導入抗体誘導体またはその塩を提供する。

〔1〕式（III）で表される構造単位を含む、アジド基導入抗体誘導体またはその塩。

〔2〕Tにより示される1価の基が、置換されていてもよいヒドロキシアミノ基である、〔1〕のアジド基導入抗体誘導体またはその塩。

〔3〕抗体がヒト抗体である、〔1〕または〔2〕のアジド基導入抗体誘導体またはその塩。

〔4〕抗体がヒトIgGである、〔1〕～〔3〕のいずれかのアジド基導入抗体誘導体またはその塩。

〔5〕Mにおける炭素原子数3～5個からなる主鎖部分が、直鎖アルキレン、もしくは環構成炭素原子、またはこれらの組合せを含む部分である、〔1〕～〔4〕のいずれかのアジド基導入抗体誘導体またはその塩。

〔6〕MおよびYを連結する主鎖の原子数が6～20個である、〔1〕～〔5〕のいずれかのアジド基導入抗体誘導体またはその塩。

〔7〕上記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の246／248位、288／290位、および317位からなる群より選ばれる1以上の位置に存在する、〔1〕～〔6〕のいずれかのアジド基導入抗体誘導体またはその塩。

〔8〕上記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の246／248位のリジン残基に対する位置選択性を有する、〔1〕～〔7〕のいずれかのアジド基導入抗体誘導体またはその塩。

〔9〕上記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の288／290位のリジン残基に対する位置選択性を有する、〔1〕～〔7〕のいずれかのアジド基導入抗体誘導体またはその塩。

〔10〕上記平均比率rが、1.5～2.5である、〔1〕～〔9〕のいずれかのアジド基導入抗体誘導体またはその塩。

〔11〕前記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の246／248位、288／290位、および317位からなる群より選ばれる2つの位置に存在する、〔7〕～〔10〕のいずれかのアジド基導入抗体誘導体またはその塩。

〔12〕前記2つの位置が、246／248位、および288／290位である、〔11〕のアジド基導入抗体誘導体またはその塩。

〔0015〕

本発明はまた、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。

〔１〕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。

〔２〕抗体がヒト抗体である、〔１〕のコンジュゲートまたはその塩。

〔３〕抗体がヒトIgGである、〔１〕または〔２〕のコンジュゲートまたはその塩。

〔４〕Mにおける炭素原子数３～５個からなる主鎖部分が、直鎖アルキレン、もしくは環構成炭素原子、またはこれらの組合せを含む部分である、〔１〕～〔３〕のいずれかのコンジュゲートまたはその塩。

〔５〕MおよびYを連結する主鎖の原子数が６～２０個である、〔１〕～〔４〕のいずれかのコンジュゲートまたはその塩。

〔６〕上記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の２４６／２４８位、２８８／２９０位、および３１７位からなる群より選ばれる１以上の位置に存在する、〔１〕～〔５〕のいずれかのコンジュゲートまたはその塩。

〔７〕上記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の２４６／２４８位のリジン残基に対する位置選択性を有する、〔１〕～〔６〕のいずれかのコンジュゲートまたはその塩。

〔８〕上記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の２８８／２９０位のリジン残基に対する位置選択性を有する、〔１〕～〔７〕のいずれかのコンジュゲートまたはその塩。

〔９〕上記平均比率rが、１．５～２．５である、〔１〕～〔８〕のいずれかのコンジュゲートまたはその塩。

〔１０〕前記リジン残基が、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の２４６／２４８位、２８８／２９０位、および３１７位からなる群より選ばれる２つの位置に存在する、〔６〕～〔９〕のいずれかのコンジュゲートまたはその塩。

〔１１〕前記２つの位置が、２４６／２４８位、および２８８／２９０位である、〔１０〕のコンジュゲートまたはその塩。

【００１６】

本発明はまた、抗体中間体、アジド基導入抗体誘導体、もしくは抗体および機能性物質のコンジュゲート、あるいはそれらの塩の製造方法を提供する。

〔１〕式（Ⅰ）で表される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。

〔２〕（１）式（Ⅰ）で表される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）上記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、アジド基導入抗体誘導体またはその塩を生成することを含む、アジド基導入抗体誘導体またはその塩の製造方法。

〔３〕（１）式（Ⅰ）で表される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）上記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、アジド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）上記アジド基導入抗体誘導体またはその塩を、式（Ⅴ）で表される目的物質と反応させて、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。

〔４〕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、アジド基導入抗体誘導体またはその塩を生成することを含む、アジド基導入抗体誘導体またはその塩の製造方法。

〔５〕（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、アジド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）上記アジド基導入抗体誘導体またはその塩を、式（Ⅴ）で表される目的物質と反応させて、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。

〔６〕式（ⅠⅠⅠ）で表される構造単位を含む、アジド基導入抗体誘導体またはその塩を、式（Ⅴ）で表される目的物質と反応させて、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】

【００１７】

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アジド基含有修飾基との結合の平均比率（アジド基含有修飾基数／イムノグロブリン単位）が所望の範囲（１．０～３．０）となるように、イムノグロブリン単位中の重鎖におけるリジン残基を高度に修飾することができる。式（Ⅰ）で表される化合物またはその塩はまた、イムノグロブリン単位中の重鎖における異なる位置のリジン残基の位置選択的な修飾の汎用性に優れるという利点を有する。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における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アジド基含有修飾基との結合の平均比率（アジド基含有修飾基数／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所望の特性（例、結合の平均比率、位置選択性）を引き継ぐことができる。したがって、本発明によれば、上記のような所望の特性を有する、式（ⅠⅠⅠ）で表されるアジド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、上述した本発明の抗体は、優れた安定性を有する。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【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、アジド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。アジド基導入抗体誘導体またはその塩におけるアジド基と機能性物質（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。このような反応は、*Strain-promoted azide-alkyne cyclization*（SPAAC）反応として知られている。

【図 4】図 4 は、本発明の一実施形態の概要を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

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。

【0020】

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。

【0021】

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。

【0022】

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。

【0023】

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。

【0024】

(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、CD3、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、GITR、Fucosyl GM1、IGF-1、Angiopoietin 2、CSF-1R、FGFR3、OX40、BCMA、ErbB3、CD137 (4-1BB)、PTK7、EFNA4、FAP、DR5、CEA、Ly6E、CA6、CEACAM5、LAMP1、tissue factor、EPHA2、DR5、B7-H3、FGFR4、FGFR2、α2-PI、A33、GDF15、CAIX、CD166、ROR1、GITR、BCMA、TBA、LAG-3、EphA2、TIM-3、CD-200、EGFRvIII、CD16A、CD32B、PIGF、Axl、MICA/B、Thomsen-Friedenreich、CD39、CD37、CD73、CLEC12A、Lgr3、トランスフェリン受容体、TGFβ、IL-17、5T4、RTK、Immune Suppressor Protein、NaPi2b、ルイス血液型B抗原、A34、Lysil-Oxidase、DLK-1、TROP-2、α9インテグリン、TAG-72 (CA72-4)、CD70

【0025】

(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、β7-Integrin、IL-4αR、HAS、Eotaxin-1、CD3、CD19、TNF-α、IL-15、CD3ε、Fibronectin、IL-1β、IL-1α、IL-17、TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin)、LAMP (Alpha4 Beta 7 Integrin)、IL-23、GM-CSFR、TSLP、CD28、CD40、TLR-3、BAFF-R、MAdCAM、IL-31R、IL-33、CD74、CD32B、CD79B、IgE (免疫グロブリンE)、IL-17A、IL-17F、C5、FcRn、CD28、TLR4、MCAM、B7RP1、CXCR1, 2 Ligands、IL-21、Cadherin-11、CX3CL1、CCL20、IL-36R、IL-10R、CD86、TNF-α、IL-7R、Kv1. 3、α9インテグリン、LI FHT

【0026】

(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、Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor、LINGO (Ig 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ウイルス

【0027】

(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-protein、Env、CD3、病原性大腸菌、クレブシエラ、肺炎球菌

【0028】

(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、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

【0029】

(6) 眼疾患

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

【0030】

(7) 骨・整形外科領域

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

【0031】

(8) 血液疾患

vWF、Factor IXa、Factor X、IFNγ、C5、BMP-6、Ferroportin、TFPI

【0032】

(9) その他の疾患

BAFF (B cell activating factor)、IL-1β、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-1β、AT2-R、IAPP

【0033】

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、ダクリズマブ、パリビズマブ、トラスツズマブ、アレクツズマブ、オマリズマブ、エファリズマブ、ベバシズマブ、ナタリズマブ (IgG4)、トシリズマブ、エクリズマブ (IgG2)、モガムリズマブ、ペルツツマブ、オビヌツツマブ、ベドリズマブ、ペンプロリズマブ (IgG4)、メポリズマブ、エロツツマブ、ダラツムマブ、イケセキツマブ (IgG4)、レスリズマブ (IgG4)、アテゾリズマブ）、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、ブロダルマブ (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)。

【0034】

抗体中のアミノ酸残基の位置、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)。例えば、ヒトIgGを対象とする場合、246位のリジン残基は、ヒトIgG CH2領域の16番目のアミノ酸残基に相当し、248位のリジン残基は、ヒトIgG CH2領域の18番目のアミノ酸残基に相当し、288位のリジン残基は、ヒトIgG CH2領域の58番目のアミノ酸残基に相当し、290位のリジン残基は、ヒトIgG CH2領域の60番目のアミノ酸残基に相当し、317位のリジン残基は、ヒトIgG CH2領域の87番目のアミノ酸残基に相当する。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。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。

【0035】

本発明によれば、抗体中の重鎖における特定のリジン残基（例、246／248位、または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、抗体中の重鎖における特定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。

【0036】

本発明では、抗体中の重鎖における特定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、リジン残基であってもよい（すなわち、246／248位のリジン残基、288／290位のリジン残基、および317位のリジン残基のうちの、2つのリジン残基が位置選択的に二重修飾されていてもよく、3つのリジン残基が位置選択的に三重修飾されていてもよい）。さらにより好ましくは、E U n u m b e r i n gに従うヒトIgG重鎖の246／248位、288／290位、および317位からなる群より選ばれる2つの位置に存在するリジン残基が位置選択的に修飾されてもよい。特に好ましくは、246／248位、および288／290位の2つの位置に存在するリジン残基が位置選択的に修飾されてもよい。

【0037】

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 sulfonic acid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

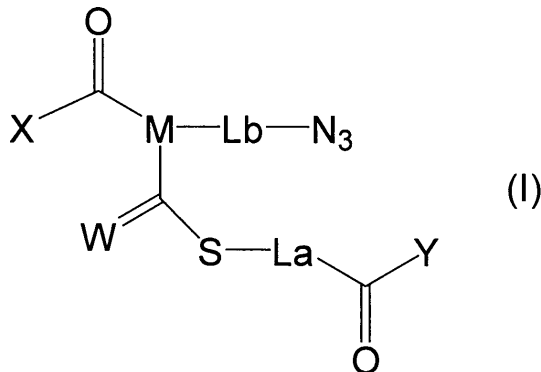
ン、オルニチン)、および酸性アミノ酸(例、アスパラギン酸、グルタミン酸)との塩が挙げられる。塩は、好ましくは、無機酸(例、塩化水素)との塩、または有機酸(例、トリフルオロ酢酸)との塩である。

【0038】

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】



〔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、

Mは、Mに隣接するC=O中の炭素原子とC=W中の炭素原子を、炭素原子数3～5個からなる主鎖部分で連結する3価の基を示し、

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、

N₃は、アジド基を示し、

Laは、結合、または2価の基を示し、

Lbは、結合、または2価の基を示す。〕

【0039】

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、Mは、カルボニル基を構成する炭素原子、C=Wを構成する炭素原子、およびLbと共有結合しており、Sは、C=Wを構成する炭素原子、およびLaと共有結合しており、Laは、S、およびYと共有結合しており、Lbは、M、およびN₃と共有結合しており、Yは、Laと共有結合しており、N₃は、Lbと共有結合している。

【0040】

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

(d) ハロゲン原子。

【0041】

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価の複素環基を示し、Nは、窒素原子を示す。)

10

【0042】

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。)

【0043】

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：

(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。)

20

【0044】

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。)

【0045】

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。

【0046】

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。

30

【0047】

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。

【0048】

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。

40

【0049】

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。

【0050】

50

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。

【0051】

1 価の鎖状炭化水素基としては、アルキルが好ましい。

【0052】

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。

10

【0053】

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。

【0054】

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。

20

【0055】

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。

30

【0056】

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。

【0057】

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。

40

【0058】

1 価の芳香族炭化水素基としては、フェニルが好ましい。

【0059】

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。

【0060】

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

50

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。

【００６１】

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。

10

【００６２】

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。

20

【００６３】

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。

【００６４】

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；

30

(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。)

(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。)；または

(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。

【００６５】

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。

40

【００６６】

アラルキルとは、アリーラルキルをいう。アリーラルキルにおけるアリーラ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。

【００６７】

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；

50

(i i i) 炭素原子数 3 ~ 15 のアルキル ;
 (i v) 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。) ;
 (v i) 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 i i) 上記 (v i i) で列挙したものと同一基。

【0068】

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 ;
 (i i) 炭素原子数 1 ~ 12 のアルキル ;
 (i i i) 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。) ;
 (i v) 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 (v i i) で列挙したものと同一基。

【0069】

さらに好ましくは、置換基は、以下であってもよい :

(i) ハロゲン原子 ;
 (i i) 炭素原子数 1 ~ 6 のアルキル ;
 (i i i) 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。) ;
 (i v) 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 (v i i) で列挙したものと同一基。

【0070】

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 ;
 (i i) 炭素原子数 1 ~ 4 のアルキル ;
 (i i i) 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。) ;
 (i v) 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 (v i i) で列挙したものと同一基。

【0071】

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/

10

20

30

40

50

240287号、国際公開第2019/240288号、および国際公開第2020/090979号に開示される親和性ペプチド、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。

【0072】

一実施形態では、親和性ペプチドは、下記（A）のアミノ酸配列、またはそのアナログアミノ酸配列を含んでいてもよい：

（A）（X0-3）a-C-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-I-I-W-C-（X0-3）b（配列番号1）。

【0073】

また、上記（A）のアミノ酸配列、またはそのアナログアミノ酸配列としては、例えば、以下が挙げられる。

（1）国際公開第2016/186206号に記載される式（I）～（V）で表されるアミノ酸配列（例、国際公開第2016/186206号に記載される配列番号1～17、36、37のアミノ酸配列）；

（2）国際公開第2018/199337号に記載される式（i）、（i-1）、（i-1'）および（i-1''）、（i-2）、（ii）～（viii）で表されるアミノ酸配列（例、国際公開第2018/199337号に記載される配列番号20～60、73～91、94～105のアミノ酸配列）；

（3）国際公開第2019/240287号に記載される式（1-1）～（1-9）、（2-1）で表されるアミノ酸配列（例、国際公開第2019/240287号に記載される配列番号5、8～92のアミノ酸配列）；

（4）国際公開第2019/240288号に記載される式（1-1）～（1-9）、（2-1）で表されるアミノ酸配列（例、国際公開第2019/240288号に記載される配列番号15～24、46～96、99、108のアミノ酸配列）；

（5）国際公開第2020/090979号に記載される（10）～（11）のアミノ酸配列（例、国際公開第2020/090979号に記載される配列番号24、25のアミノ酸配列）。

【0074】

上記（A）のアミノ酸配列、またはそのアナログアミノ酸配列を含む親和性ペプチドは、その保存部分から理解できるように、イムノグロブリン単位におけるCH2ドメイン中の同じ部位に結合領域を有する。したがって、上記アナログアミノ酸配列を含む親和性ペプチドを有する化合物は、上記（A）のアミノ酸配列を含む親和性ペプチドを有する化合物と同様に、イムノグロブリン単位におけるCH2ドメイン中の同じ部位に結合して、ヒトIgG重鎖の246/248位のリジン残基を位置選択的に修飾しつつ、イムノグロブリン単位とアジド基含有修飾基との結合の平均比率を所望の範囲に高度に制御することができる。親和性ペプチドは、好ましくは上記（A）のアミノ酸配列を含み、より好ましくは下記（1）のアミノ酸配列を含む：

（1）RGNCA Y H K G Q I I W C T Y H（配列番号2）。

【0075】

別の実施形態では、親和性ペプチドは、下記（B）のアミノ酸配列、またはそのアナログアミノ酸配列を含んでいてもよい：

（B）PNLNEEQRNARIRSI（配列番号3）。

【0076】

また、上記（B）のアミノ酸配列、またはそのアナログアミノ酸配列としては、例えば、以下が挙げられる。

（1）国際公開第2018/199337号に記載される（a）～（d）のアミノ酸配列（例、国際公開第2018/199337号に記載される配列番号61～72、92のアミノ酸配列）；

（2）国際公開第2019/240288号に記載される（a）～（b）のアミノ酸配列（例、国際公開第2019/240288号に記載される配列番号5～8、11～14、

10

20

30

40

50

37～45、97、98、100のアミノ酸配列)；

(3) 国際公開第2020/090979号に記載される(1)～(9)のアミノ酸配列(例、国際公開第2020/090979号に記載される配列番号5～10、22、23、51～53のアミノ酸配列)。

【0077】

上記(B)のアミノ酸配列、またはそのアナログアミノ酸配列を含む親和性ペプチドは、その保存部分から理解できるように、イムノグロブリン単位におけるCH2ドメイン中の同じ部位に結合領域を有する。したがって、上記アナログアミノ酸配列を含む親和性ペプチドを有する化合物は、上記(B)のアミノ酸配列を含む親和性ペプチドを有する化合物と同様に、イムノグロブリン単位におけるCH2ドメイン中の同じ部位に結合して、ヒトIgG重鎖の288/290位のリジン残基を位置選択的に修飾しつつ、イムノグロブリン単位とアジド基含有修飾基との結合の平均比率を所望の範囲に高度に制御することができる。親和性ペプチドは、好ましくは上記(B)のアミノ酸配列を含み、より好ましくは下記(1)～(3)のいずれかのアミノ酸配列を含む：

(1) FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC (配列番号4)；

(2) FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC (配列番号5)；または

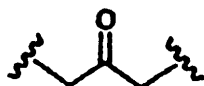
(3) MQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSI(Orn)EEC (配列番号6)。

【0078】

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、リンカー(例、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。

【0079】

【化2】



【0080】

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。

【0081】

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 adipimidate・2HCl、アジプイミド酸ジメチル二塩酸塩)、DMP(dimethyl pimelimidate・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)。

【0082】

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)、アリールオキシカルボニル基、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)、アリールオキシ基(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。

【0083】

Mは、Mに隣接するC=O中の炭素原子とC=W中の炭素原子、すなわち、Mに隣接する第1の炭素原子(C=O中の炭素原子)とMに隣接する第2の炭素原子(C=W中の炭素原子)とを、炭素原子数3~5個からなる主鎖部分で連結する3個の基を示す。したがって、Mに隣接する第1および第2の炭素原子との間を連結する主鎖部分にヘテロ原子は含まれない。このような構造を有する化合物の使用により、以下の利点を期待することができる。

第1に、上記化合物の使用により、抗体とアジド基含有修飾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、アジド基含有修飾基)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。

第2に、上記化合物の使用により、イムノグロブリン単位中の重鎖における異なるリジン残基を位置選択的に修飾できる。例えば、ある種のアミノ酸配列を有する親和性ペプチドをYとして使用することにより、ヒトIgG重鎖の246/248位のリジン残基を位置選択的に修飾することができる。また、別の種のアミノ酸配列を有する親和性ペプチドをYとして使用することにより、ヒトIgG重鎖の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。

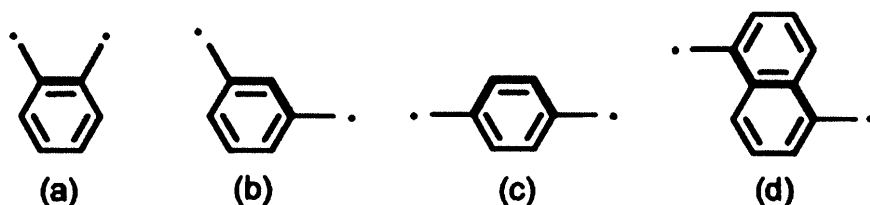
第3に、上記化合物の使用により調製される抗体は、優れた安定性を示すことができる。

【0084】

炭素原子数3~5個からなる主鎖部分は、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。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】



・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 価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 価の環状構造中の原子数は、3 である。

(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 価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 価の環状構造中の原子数は、4 である。

【0085】

炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分は、M に隣接する第 1 の炭素原子（C=O 中の炭素原子）と M に隣接する第 2 の炭素原子（C=W 中の炭素原子）とを連結するものであるため、このような第 1 および第 2 の炭素原子との関係では、2 価の基として把握することができる。一方で、M は、このような第 1 および第 2 の炭素原子のみならず、L b にも結合する 3 価の基である。したがって、M は、炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分（2 価の基）から、水素原子を 1 個取り除いた 3 価の基として表現することができる。ここで、炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分（2 価の基）は、以下から構成されていてもよい：

- (1) 炭素原子数 3～5 個の 2 価の直鎖炭化水素基；
- (2) 2 価の環状炭化水素基、および炭素原子数 1～4 個の 2 価の直鎖炭化水素基（1 つ、または 2 つ）が連結した 2 価の基；
- (3) 2 価の環状炭化水素基；および
- (4) 2 つの 2 価の環状炭化水素基が連結した 2 価の基（すなわち、2 価のビシクロ構造物）。

【0086】

炭素原子数 3～5 個の直鎖炭化水素基は、炭素原子数 3～5 個の直鎖アルキレン、炭素原子数 3～5 個の直鎖アルケニレン、または炭素原子数 3～5 個の直鎖アルキニレンである。

炭素原子数 3～5 個の直鎖アルキレンは、n-プロピレン、n-ブチレン、または n-ペンチレンである。

炭素原子数 3～5 個の直鎖アルケニレンは、n-プロピニレン、n-ブテニレン、または n-ペンテニレンである。

炭素原子数 3～5 個の直鎖アルキニレンは、n-プロピニレン、n-ブチニレン、または n-ペンチニレンである。

炭素原子数 3～5 個の 2 価の直鎖炭化水素基としては、炭素原子数 3～5 個の直鎖アルキレンが好ましい。

【0087】

2 価の環状炭化水素基は、アリーレン、または 2 価の非芳香族環状炭化水素基である。このような 2 価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 3～5 個となるように設定することができる。

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

10

20

30

40

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。

【0088】

炭素原子数1～4個の2価の直鎖炭化水素基は、炭素原子数1～4個の直鎖アルキレン、炭素原子数2～4個の直鎖アルケニレン、または炭素原子数2～4個の直鎖アルキニレンである。

炭素原子数1～4個の直鎖アルキレンは、メチレン、エチレン、n-プロピレン、またはn-ブチレンである。

炭素原子数1～4個の直鎖アルケニレンは、エチレニレン、n-プロピニレン、またはn-ブテニレンである。

炭素原子数1～4個の直鎖アルキニレンは、エチニレン、n-プロピニレン、またはn-ブチニレンである。

炭素原子数1～4個の2価の直鎖炭化水素基としては、炭素原子数1～4個の直鎖アルキレンが好ましい。

【0089】

炭素原子数3～5個からなる主鎖部分（2価の基）は、上記（1）～（4）のなかでも、（1）～（3）が好ましく、（1）および（2）がより好ましい。

【0090】

特定の実施形態では、Mにおける炭素原子数3～5個からなる主鎖部分は、直鎖アルキレン、もしくは環構成炭素原子、またはこれらの組合せを含む部分であってもよい。したがって、炭素原子数3～5個からなる主鎖部分（2価の基）は、以下から構成されていてもよい：

（1'）炭素原子数3～5個の直鎖アルキレン；

（2'）2価の環状炭化水素基、および炭素原子数1～4個の直鎖アルキレン（1つ、または2つ）が連結した2価の基；

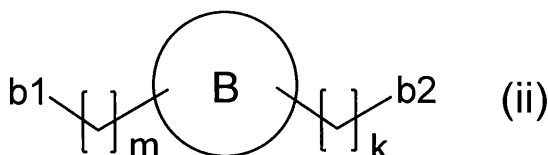
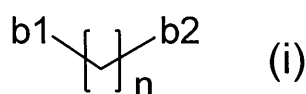
（3'）2価の環状炭化水素基；および

（4'）2つの2価の環状炭化水素基が連結した2価の基（すなわち、2価のビスシクロ構造物）。

【0091】

炭素原子数3～5個からなる主鎖部分（2価の基）は、上記（1'）～（4'）のなかでも、（1'）～（3'）が好ましく、（1'）および（2'）がより好ましい。したがって、Mは、下記式（i）または（ii）で表される、炭素原子数3～5個からなる主鎖部分（2価の基）から、水素原子を1個取り除いた3価の基であってもよい：

【化4】



10

20

30

40

50

〔式中、

n は、3～5の整数を示し、

m は、0～4の整数を示し、

k は、0～4の整数を示し、

環 B は、2価の環状炭化水素基を示し、

b 1 は、M に隣接する C = O 中の炭素原子に対する結合手を示し、

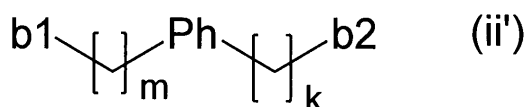
b 2 は、M に隣接する C = W 中の炭素原子に対する結合手を示す。〕

環 B で示される 2 価の環状炭化水素基は、上述したものと同様である。炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分（2 価の基）が式（i i）で表される場合、M は、式（i i）で表される、炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分（2 価の基）における環 B から、水素原子を 1 個取り除いた 3 価の基であることが好ましい。

〔0 0 9 2〕

好ましくは、上記式（i i）で表される、炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分（2 価の基）は、下記式（i i'）で表されるものであってもよい。

〔化 5〕



〔式中、

m は、0～4の整数を示し、

k は、0～4の整数を示し、

Ph は、フェニレンを示し、

b 1 は、M に隣接する C = O 中の炭素原子に対する結合手を示し、

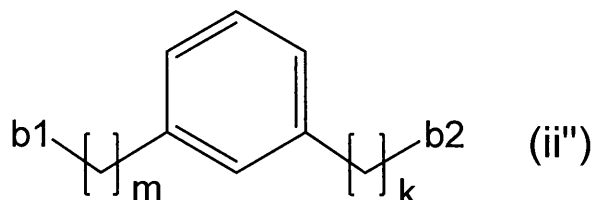
b 2 は、M に隣接する C = W 中の炭素原子に対する結合手を示す。〕

Ph は、メタ位、オルト位、またはパラ位で 2 つの直鎖アルキレンと結合することができる。炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分（2 価の基）が式（i i'）で表される場合、M は、式（i i'）で表される、炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分（2 価の基）におけるフェニレンから、水素原子を 1 個取り除いた 3 価の基であることが好ましい。

〔0 0 9 3〕

より好ましくは、上記式（i i）で表される、炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分（2 価の基）は、下記式（i i''）で表されるものであってもよい。

〔化 6〕



〔式中、

m は、0～2の整数を示し、

k は、0～2の整数を示し、

b 1 は、M に隣接する C = O 中の炭素原子に対する結合手を示し、

b 2 は、M に隣接する C = W 中の炭素原子に対する結合手を示す。〕

炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分（2 価の基）が式（i i''）で表される場合、M は、式（i i''）で表される、炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分（2 価の基）におけるフェニレン（好ましくは、2 つのアルキレンに対してオルト位の炭素原子）から、水素原子を 1 個取り除いた 3 価の基であることが好ましい。

〔0 0 9 4〕

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。

【0095】

L aおよびL bは、それぞれ独立して、結合、または2価の基を示す。

【0096】

L aは、式(I)で表される化合物により製造される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アジド基導入抗体誘導体、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。したがって、式(I)で表される化合物により製造される抗体では、L aの安定性は問題となり難い。

【0097】

L bは、式(I)で表される化合物により製造される抗体中間体、アジド基導入抗体誘導体、および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。また、L bは、アジド基導入抗体誘導体において、抗体およびアジド基を連結するリンカーとして作用する部分である。

【0098】

L aおよびL bで示される2価の基における主鎖は、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(例えば2~15、好ましくは2~10、より好ましくは2~8、さらにより好ましくは2~6、特に好ましくは2、3、4または5)の組み合わせからなる基から構成することが好ましい。L aおよびL bにより示される2価の基における主鎖を構成する原子数は、好ましくは1~17個であり、より好ましくは1~15個である。また、L aおよびL bにより示される2価の基における主鎖を構成する原子数の下限値は、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、または7個以上であってもよい。L aおよびL bにより示される2価の基における主鎖を構成する原子数の上限値は、14個以下、13個以下、12個以下、11個以下、または10個以下であってもよい。主鎖が環状構造を含む構造である場合、環状構造における主鎖の原子数は、上述したようにして決定することができる。

【0099】

2価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。

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価の直鎖炭化水素基としては、直鎖アルキレンが好ましい。

【0100】

2価の環状炭化水素基は、アリーレン、または2価の非芳香族環状炭化水素基である。

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6~10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。

【0101】

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。

【0102】

特定の実施形態では、L a に隣接するカルボニル基は、親和性ペプチド中のリジン残基の側鎖中のアミノ基とアミド結合を形成していてもよい。

【0103】

特定の実施形態では、L b により示される 2 価の基における主鎖は、合成の容易さ等の観点より、環状構造を含まないものであってもよい。したがって、L b により示される 2 価の基における主鎖は、2 価の直鎖炭化水素基、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-NR_d-$ (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、3、4、または 5) の組み合わせからなる基から構成されていてもよい。好ましくは、L b における安定性の確保の観点から、上記組み合わせから、 $-C(=O)-NR_d-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-C(=O)-S-$ 、 $-C(=S)-NR_d-$ 、 $-C(=S)-O-$ 、 $-C(=S)-S-$ は除かれる。L b により示される 2 価の基における主鎖を構成する原子数は、好ましくは 1 ～ 12 個であり、より好ましくは 1 ～ 10 個である。

【0104】

L a および L b により示される 2 価の基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に付属する上記 R_d は、置換基に該当する。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
 (v i') $NR_f R_g-$ 、 $NR_f R_g-C(=O)-$ 、 $NR_f R_g-C(=O)-O-$ 、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。) ;

(v i i') 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。

【0105】

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 、ならびに上記(i) ~ (i v)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。

【0106】

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；

(i i') 炭素原子数1 ~ 12のアルキル、フェニル、もしくはナフチル；

(i i i') 炭素原子数3 ~ 15のアラルキル；

(i v') 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。) ;

(v i') $NR_f R_g-$ 、 $NR_f R_g-C(=O)-$ 、 $NR_f R_g-C(=O)-O-$ 、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 i i') 上記(v i i')で列挙したものと同一基。

【0107】

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；

(i i') 炭素原子数1 ~ 12のアルキル；

(i i i') 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。) ;

(i v') $NR_f R_g-$ 、 $NR_f R_g-C(=O)-$ 、 $NR_f R_g-C(=O)-O-$ 、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(v i i')で列挙したものと同一基。

【0108】

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；

(i i') 炭素原子数1 ~ 6のアルキル；

(i i i') 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。) ;

(i v') $NR_f R_g-$ 、 $NR_f R_g-C(=O)-$ 、 $NR_f R_g-C(=O)-O-$ 、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(v i i')で列挙したものと同一基。

【0109】

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；

(i i') 炭素原子数1 ~ 4のアルキル；

(i i i') R_e-O- 、もしくは $R_e-C(=O)-$ (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。) ;

(i v') N R_f R_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(v i i')で列挙したものと同一基。

【0110】

特定の実施形態では、式(I)で表される化合物は、MおよびYを連結する主鎖の原子数により規定することができる。MおよびYを連結する主鎖は、MおよびYを連結する構造「C(=W)-S-La-C(=O)」中の主鎖「C-S-La-C」に相当する。MおよびYを連結する主鎖の原子数は、6～20個であってもよい。MおよびYを連結する主鎖の原子数がこのような個数を有する式(I)で表される化合物は、合成が容易である。また、抗体とアジド基含有修飾基との結合の平均比率を所望の範囲に高度に制御することを容易にし、しかも、イムノグロブリン単位の位置選択的な修飾の汎用性に優れる。MおよびYを連結する主鎖の原子数はまた、6～19個、6～18個、6～17個、6～16個、6～15個、6～14個、6～13個、6～12個、6～11個、6～10個、7～19個、7～18個、7～17個、7～16個、7～15個、7～14個、7～13個、7～12個、7～11個、7～10個、8～19個、8～18個、8～17個、8～16個、8～15個、8～14個、8～13個、8～12個、8～11個、8～10個であってもよい。

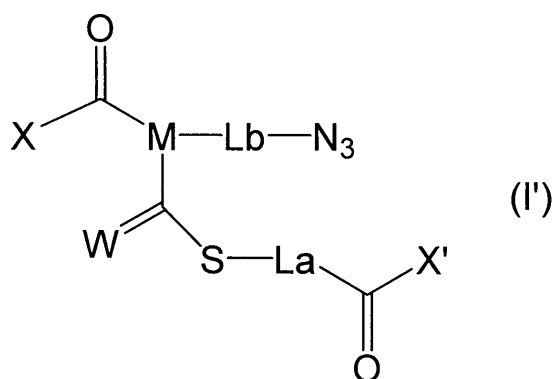
【0111】

式(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)で表される化合物またはその塩においてYの部分が脱離基(好ましくは、Xよりも脱離する能力が高い脱離基、またはヒドロキシ)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。

【0112】

好ましくは、式(I)で表される化合物またはその塩においてYの部分が脱離基に置換された化合物またはその塩は、下記式(I')で表される化合物またはその塩であってもよい。

【化7】



〔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、

Mは、Mに隣接するC=O中の炭素原子とC=W中の炭素原子を、炭素原子数3～5個からなる主鎖部分で連結する3価の基を示し、

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、
 N_3 は、アジド基を示し、
 La は、結合、または2価の基を示し、
 Lb は、結合、または2価の基を示す。]

【0113】

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。

【0114】

式(I')における X (脱離基)、 M (3価の基)、 W (酸素原子または硫黄原子)、 La (結合、または2価の基)、 Lb (結合、または2価の基)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。

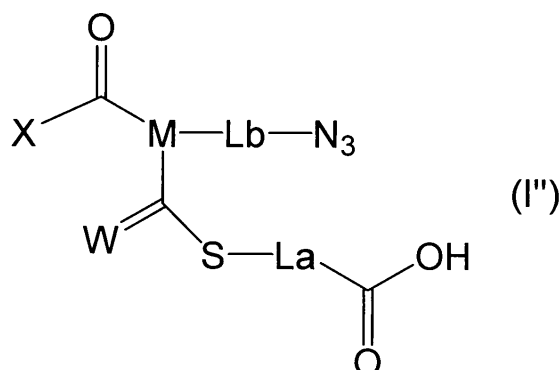
【0115】

式(I')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。

【0116】

式(I')で表される化合物またはその塩は、下記式(I'')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8】



〔式中、

X は、脱離基を示し、
 OH は、ヒドロキシ基を示し、
 M は、 M に隣接する $C=O$ 中の炭素原子と $C=W$ 中の炭素原子を、炭素原子数3～5個からなる主鎖部分で連結する3価の基を示し、
 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、
 N_3 は、アジド基を示し、
 La は、結合、または2価の基を示し、
 Lb は、結合、または2価の基を示す。]

【0117】

式(I'')における X (脱離基)、 M (3価の基)、 W (酸素原子または硫黄原子)、 La (結合、または2価の基)、 Lb (結合、または2価の基)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。

【0118】

式(I')で表される化合物またはその塩は、式(I'')で表される化合物またはその塩をカルボキシ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。

【0119】

式(I')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。あるいは、(I')で表される化合物またはその塩は、式(I)で表される化合物またはその塩を直接かつ効率良く製造するための合成中間体としても有用である。

【0120】

式(I')で表される化合物は、実施例に示される種々の合成方法により得ることができる。

【0121】

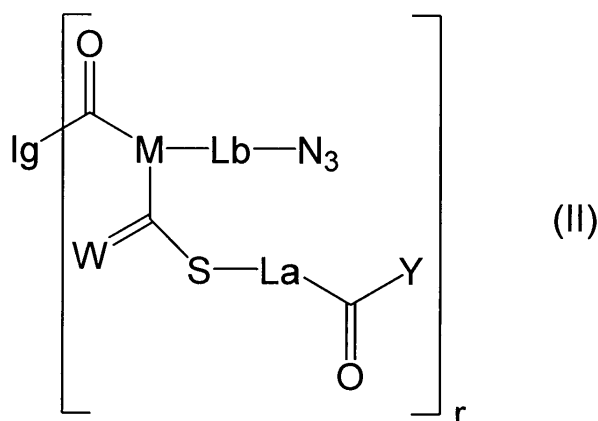
上記のような一連の化合物またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー(例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC)、NMR、または質量分析により、行うことができる。このような化合物またはその塩は、クロマトグラフィー(例、上述したクロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィー)等の任意の方法により適宜精製することができる。

【0122】

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9】



〔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、2個の重鎖中の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、前記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、

Mは、Mに隣接するC=O中の炭素原子とC=W中の炭素原子を、炭素原子数3～5個からなる主鎖部分で連結する3価の基を示し、

Oは、酸素原子を示し、

Sは、硫黄原子を示し、

10

20

30

40

50

Wは、酸素原子または硫黄原子を示し、

N₃は、アジド基を示し、

L_aは、結合、または2価の基を示し、

L_bは、結合、または2価の基を示し、

2個の重鎖あたりの前記アミド結合の平均比率rは、1.0～3.0である。]

【0123】

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)、M(3価の基)、W(酸素原子または硫黄原子)、L_a(結合、または2価の基)、L_b(結合、または2価の基)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。

【0124】

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アジド基含有修飾基との結合の平均比率(アジド基含有修飾基数/イムノグロブリン単位)を示す。このような平均比率は、1.0～3.0であり、1.5～2.5が好ましい。さらに、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。I_gに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しているアミノ基を含む側鎖を有するリジン残基は、2個の重鎖における所望の1つの位置(例えば、EU numberingに従うヒトI_gG重鎖の246/248位、288/290位、および317位からなる群より選ばれる1つの位置)において、上記のような値の平均比率を示すように修飾されていてもよい。また、2個の重鎖がそれぞれ2以上の位置で修飾されている場合、I_gに隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しているアミノ基を含む側鎖を有するリジン残基は、2個の重鎖における所望の2以上の位置(例えば、EU numberingに従うヒトI_gG重鎖の246/248位、288/290位、および317位からなる群より選ばれる1つの位置；好ましくは、246/248位、および288/290位)における各位置において、上記のような値の平均比率を示すように修飾されていてもよい。

【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、まず、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、抗体の重鎖におけ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】

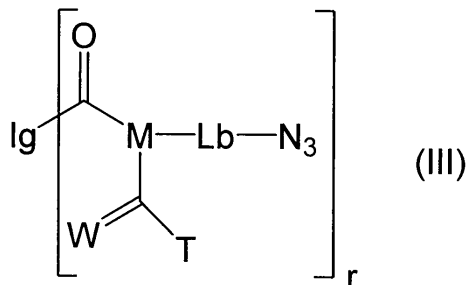
抗体中間体またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC）、または質量分析により、行うことができる。位置選択性の確認は、例えば、ペプチドマッピングにより行うことができる。ペプチドマッピングは、例えば、プロテアーゼ処理および質量分析により行うことができる。プロテアーゼとしては、エンドプロテアーゼが好ましい。このようなエンドプロテアーゼとしては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、Glu-C、Lys-N、Lys-C、Asp-Nが挙げられる。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. アジド基導入抗体誘導体またはその塩

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

【化10】



〔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、2個の重鎖中の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、

Mは、Mに隣接するC=O中の炭素原子とC=W中の炭素原子を、炭素原子数3～5個からなる主鎖部分で連結する3価の基を示し、

Oは、酸素原子を示し、

Tは、1価の基を示し、

Wは、酸素原子または硫黄原子を示し、

N₃は、アジド基を示し、

Lbは、結合、または2価の基を示し、

2個の重鎖あたりの前記アミド結合の平均比率rは、1.0～3.0である。〕

【0129】

Ig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（III）におけるM（3価の基）、W（酸素原子または硫黄原子）、Lb（結合、または2価の基）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】

Tは、1価の基を示す。Tは、式(II)で表される化合物における部分構造「C(=W)-S」における炭素原子と硫黄原子との間の切断反応により生成することができる。したがって、Tとしては、切断反応の種類に応じた適切な1価の基を採用することができる。

【0131】

特定の実施形態では、Tで示される1価の基は、置換されていてもよいヒドロキシアミノ基であってもよい。置換されていてもよいヒドロキシアミノ基は、下記式(α)により表すことができる。

【化11】



〔式中、

R₁、R₂は、同一または異なって、水素原子、または置換されていてもよい1価の炭化水素基を示す。)

1価の炭化水素基、および置換基の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

【0132】

式(III)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アジド基含有修飾基との結合の平均比率(アジド基含有修飾基数/イムノグロブリン単位)を示す。このような平均比率は、1.0~3.0であり、1.5~2.5が好ましい。さらに、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。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アミノ基を含む側鎖を有するリジン残基は、2個の重鎖における所望の1つの位置(例えば、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の246/248位、288/290位、および317位からなる群より選ばれる1つの位置)において、上記のような値の平均比率を示すように修飾されていてもよい。また、2個の重鎖がそれぞれ2以上の位置で修飾されている場合、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アミノ基を含む側鎖を有するリジン残基は、2個の重鎖における所望の2以上の位置(例えば、EU numberingに従うヒトIgG重鎖の246/248位、288/290位、および317位からなる群より選ばれる1つの位置；好ましくは、246/248位、および288/290位)における各位置において、上記のような値の平均比率を示すように修飾されていてもよい。

【0133】

本発明のアジド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、チオエステルは、pH4.0~8.0、10mM~10Mの範囲にあるヒドロキシルアミン塩酸塩溶液中で適切な時間(例、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.)。

【0134】

アジド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。アジド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。

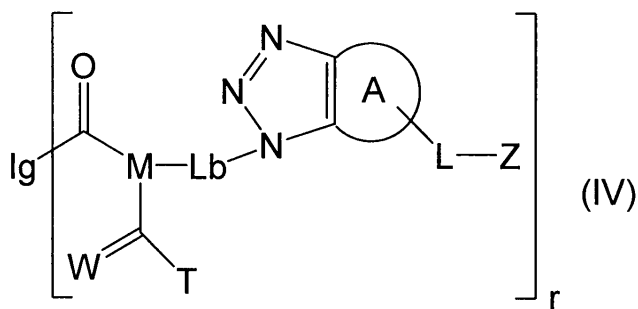
10

【0135】

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

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12】



20

〔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、2個の重鎖中の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

Mは、Mに隣接するC=O中の炭素原子とC=W中の炭素原子を、炭素原子数3～5個からなる主鎖部分で連結する3価の基を示し、

Oは、酸素原子を示し、

Tは、1価の基を示し、

Wは、酸素原子または硫黄原子を示し、

Nは、窒素原子を示し、

Lbは、結合、または2価の基を示し、

Zは、機能性物質を示し、

Lは、結合、または2価の基を示し、

環Aは、トリアゾール環と融合した環を示し、

40

2個の重鎖あたりの前記アミド結合の平均比率rは、1.0～3.0である。〕

【0136】

Ig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（IV）におけるM（3価の基）、W（酸素原子または硫黄原子）、Lb（結合、または2価の基）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。

【0137】

環Aは、トリアゾール環と融合した環を示す。環Aの構成部分には、縮合しているトリアゾール環自体は含まれないが、トリアゾールと共有している炭素原子間の二重結合の部分は含まれる。したがって、環Aは、炭素原子間の二重結合を有する環であるといえることができる。

50

【0138】

環 A は、単環、または単環と他の環との縮合環である。環 A は、置換基を有していてもよい。単環としては、同素環、または酸素原子、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 種以上を含む複素環が好ましい。より好ましくは、単環は、同素環、または酸素原子、硫黄原子及び窒素原子からなる群から選択される 1 種以上を含む複素環である。単環としては、5～12 員の単環が好ましく、6～10 員の単環がより好ましく、7～9 員の単環がさらに好ましい。単環としては、非芳香族性の単環が好ましい。

【0139】

環 A が縮合環である場合、単環と縮合される他の環としては、例えば、シクロアルカン、アレーン、複素環が挙げられる。

10

【0140】

単環と縮合されるシクロアルカンとしては、炭素原子数 3～24 のシクロアルカンが好ましく、炭素原子数 6～18 のシクロアルカンがより好ましく、炭素原子数 3～14 のシクロアルカンがさらに好ましく、炭素原子数 3～10 のシクロアルカンがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。シクロアルカンとしては、例えば、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン、シクロヘプタン、シクロオクタンが挙げられる。

【0141】

単環と縮合されるアレーンとしては、炭素原子数 6～24 のアレーンが好ましく、炭素原子数 6～18 のアレーンがより好ましく、炭素原子数 6～14 のアレーンがさらに好ましく、炭素原子数 6～10 のアレーンがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。アレーンとしては、例えば、ベンゼン、ナフタレン、アントラセンが挙げられる。

20

【0142】

単環と縮合される複素環は、芳香族複素環、または非芳香族複素環である。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。

【0143】

単環と縮合される芳香族複素環としては、炭素原子数 3～21 の芳香族複素環が好ましく、炭素原子数 3～15 の芳香族複素環がより好ましく、炭素原子数 3～9 の芳香族複素環がさらに好ましく、炭素原子数 3～6 の芳香族複素環がさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。より具体的には、芳香族複素環としては、例えば、ピレン、ピロール、フラン、チオフェン、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、トリアジン、ピロリン、ピペリジン、トリアゾール、プリン、アントラキノ、カルバゾール、フルオレン、キノリン、及びイソキノリンが挙げられる。

30

【0144】

単環と縮合される非芳香族複素環としては、炭素原子数 3～21 の非芳香族複素環が好ましく、炭素原子数 3～15 の非芳香族複素環がより好ましく、炭素原子数 3～9 の非芳香族複素環がさらに好ましく、炭素原子数 3～6 の非芳香族複素環がさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。より具体的には、非芳香族複素環としては、例えば、オキシラン、アジリジン、アゼチジン、オキセタン、チエタン、ピロリジン、ジヒドロフラン、テトラヒドロフラン、ジオキサラン、テトラヒドロチオフェン、イミダゾリジン、オキサゾリジン、ピペリジン、ジヒドロピラン、テトラヒドロピラン、テトラヒドロチオピラン、モルホリン、チオモルホリン、ピペラジン、ジヒドロオキサジン、テトラヒドロオキサジン、ジヒドロピリミジン、及びテトラヒドロピリミジンが挙げられる。

40

【0145】

環 A が有していてもよい置換基は、上述した (i)～(vii) の置換基と同様であり

50

、好ましい範囲も同様である。置換基の数は、例えば 1～5 個、好ましくは 1～3 個、より好ましくは 1 または 2 個である。

【0146】

好ましくは、環 A は、7～9 員の単環、または 7～9 員の単環と他の環との縮合環であってもよい（例、Org. Biomol. Chem. 2013, 11, 6439、Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 1190 を参照）。例えば、このような環 A として、国際公開第 2017/191817 号に記載される式 (i')～(vii') の環を使用することができる。

【0147】

式 (IV) において、L により示される 2 価の基は、機能性物質 (Z) と環 A を連結する、直鎖、分岐鎖、もしくは環状の基、またはこれらの組み合わせからなる基である。L で示される 2 価の基における主鎖は、例えば、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、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-NR-$ (R 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（例えば 2～15、好ましくは 2～10、より好ましくは 2～8、さらに好ましくは 2～6、特に好ましくは 2、3、4 または 5）の組み合わせからなる基から構成されていてもよい。L により示される 2 価の基は、置換基を有していてもよい。このような置換基は、上述した (i)～(vii) の置換基と同様であり、好ましい範囲も同様である。置換基の数は、例えば 1～5 個、好ましくは 1～3 個、より好ましくは 1 または 2 個である。L は、環 A において、トリアゾールと共有している炭素原子とは異なる任意の環構成原子に結合することができる。

【0148】

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。

【0149】

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。

【0150】

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、 ^{99m}Tc ）、インジウム¹¹¹の放射性同位体（例、 ^{111}In ）、ヨウ素原子の放射性同位体（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¹⁶¹の放射性同位体（例、 ^{161}Re ）が挙げられる。

^{186}Re)、アスタチンの放射性同位体 (例、 ^{211}At)、ビスマスの放射性同位体 (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。

【0151】

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、アブタマー)、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。

10

【0152】

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。

【0153】

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)、アブタマー、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。

20

【0154】

機能性物質が所望の官能基 (例、環A、またはLに連結させ易い官能基) 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。

30

40

【0155】

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アジド基含有修飾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、1.0~3.0であり、1.5~2.0

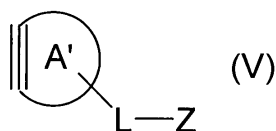
50

5 が好ましい。さらに、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。I g に隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しているアミノ基を含む側鎖を有するリジン残基は、2 個の重鎖における所望の 1 つの位置（例えば、E U n u m b e r i n g に従うヒト I g G 重鎖の 246 / 248 位、288 / 290 位、および 317 位からなる群より選ばれる 1 つの位置）において、上記のような値の平均比率を示すように修飾されていてもよい。また、2 個の重鎖がそれぞれ 2 以上の位置で修飾されている場合、I g に隣接するカルボニル基とアミド結合を形成しているアミノ基を含む側鎖を有するリジン残基は、2 個の重鎖における所望の 2 以上の位置（例えば、E U n u m b e r i n g に従うヒト I g G 重鎖の 246 / 248 位、288 / 290 位、および 317 位からなる群より選ばれる 1 つの位置；好ましくは、246 / 248 位、および 288 / 290 位）における各位置において、上記のような値の平均比率を示すように修飾されていてもよい。

【0156】

本発明のコンジュゲートまたはその塩は、本発明のアジド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、温和な条件下でアジド基と反応できるシクロアルキン基を有するように誘導体化されたものを使用することができる。このような機能性物質は、下記式（V）により表すことができる。

【化13】



〔式中、

環 A' は、炭素原子間の三重結合を有する環を示し、

Z は、機能性物質を示し、

L は、結合、または 2 価の基を示す。〕

【0157】

環 A' は、炭素原子間 3 重結合を有する環を示す。環 A' は、単環、または単環と他の環との縮合環である。環 A' は、置換基を有していてもよい。単環としては、同素環、または酸素原子、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 種以上を含む複素環が好ましい。より好ましくは、単環は、同素環、または酸素原子、硫黄原子及び窒素原子からなる群から選択される 1 種以上を含む複素環である。単環としては、7 ~ 10 員の単環が好ましく、7 ~ 9 員の単環がより好ましい。単環としては、非芳香族性の単環が好ましい。

【0158】

環 A' が縮合環である場合、単環と縮合される他の環としては、例えば、シクロアルカン、アレーン、複素環が挙げられる。シクロアルカン、アレーン、複素環の定義、例及び好ましい例は、環 A' についての縮合環における他の環のものと同じである。

【0159】

環 A' が有していてもよい置換基は、上述した (i) ~ (vii) の置換基と同様であり、好ましい範囲も同様である。置換基の数は、例えば 1 ~ 5 個、好ましくは 1 ~ 3 個、より好ましくは 1 または 2 個である。

【0160】

好ましくは、環A'は、7～9員の単環、または7～9員の単環と他の環との縮合環である。このような環A'とアジド基との反応は、Strain-promoted azide-alkyne cyclization (SPAAC) 反応としても知られている（例、Org. Biomol. Chem. 2013, 11, 6439; Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 1190; J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 15046; J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 11486; Chem. Commun. 2010, 46, 97）。例えば、このような環Aとして、国際公開第2017/191817号に記載される式(i'')～(vii'')の環を使用してもよい。

10

【0161】

反応において、アジド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／アジド基導入抗体誘導体またはその塩）は、アジド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。アジド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、アジド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。

【0162】

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。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。

20

30

【0163】

6. 用途

本発明の化合物またはその塩は、イムノグロブリン単位とアジド基含有修飾基との結合の平均比率（アジド基含有修飾基／イムノグロブリン単位）を所望の範囲（1.0～3.0）に高度に制御することができる。本発明の化合物またはその塩はまた、イムノグロブリン単位中の重鎖における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。

【0164】

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、Tris-塩酸緩衝液、炭酸-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。

40

【0165】

本発明の抗体中間体またはその塩、および本発明のアジド基導入抗体誘導体またはその

50

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。

【0166】

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（1.0～3.0）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 *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。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。

【0167】

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。

【0168】

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。

【0169】

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。

【0170】

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】

【0171】

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。

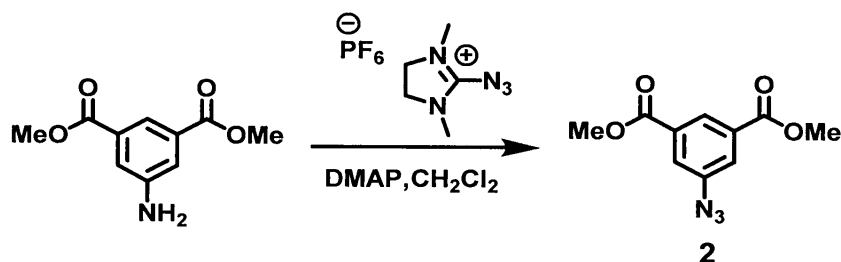
【0172】

実施例1：I g G 1 修飾用試薬の合成

(1-1) 修飾試薬(1)の合成

(1-1-1) リンカー中間体(2)の合成

【化14】



10

【0173】

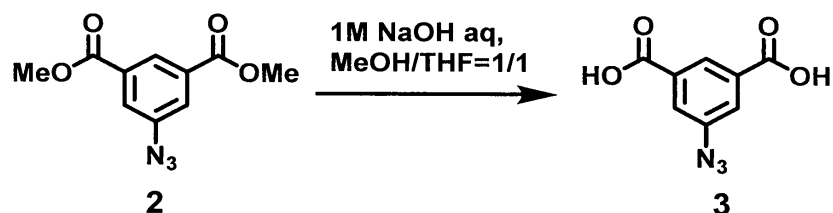
2-Azido-1,3-dimethylimidazolium hexafluorophosphate (4.0 g、14.0 mmol) を CH_2Cl_2 (23.4 mL) に溶解し、Dimethyl-5-Aminoisophthalate (977 mg、4.67 mmol)、DMAP (1.7 g、14.0 mmol) を加え 50°C で1時間攪拌した。LC/MSとTLC (ヘキサン/酢酸エチル=1/1) で反応を確認後、反応液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC (ヘキサン/酢酸エチル=2/1) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、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、リンカー中間体(2)を得た (1.08 g、4.59 mmol)。

20

【0174】

(1-1-2) リンカー中間体(3)の合成

【化15】



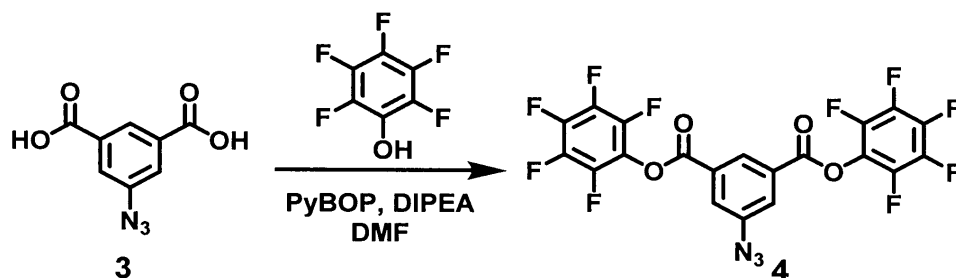
30

(1-1-1) で合成したリンカー中間体2 (1.08 g、4.59 mmol) をメタノール (23 mL) に溶解し、1 M NaOH 水溶液 (13.8 mL、13.8 mmol)、THF (23 mL) を加え室温で2時間攪拌した。LC/MSで反応を確認後、2 M HCl 水溶液で反応液を酸性にした。その後、酢酸エチルと2 M HCl 水溶液で抽出し、有機層を濃縮し、真空乾燥を行い、リンカー中間体3を得た (953.2 mg、4.60 mmol)。

【0175】

(1-1-3) リンカー(4)の合成

【化16】



50

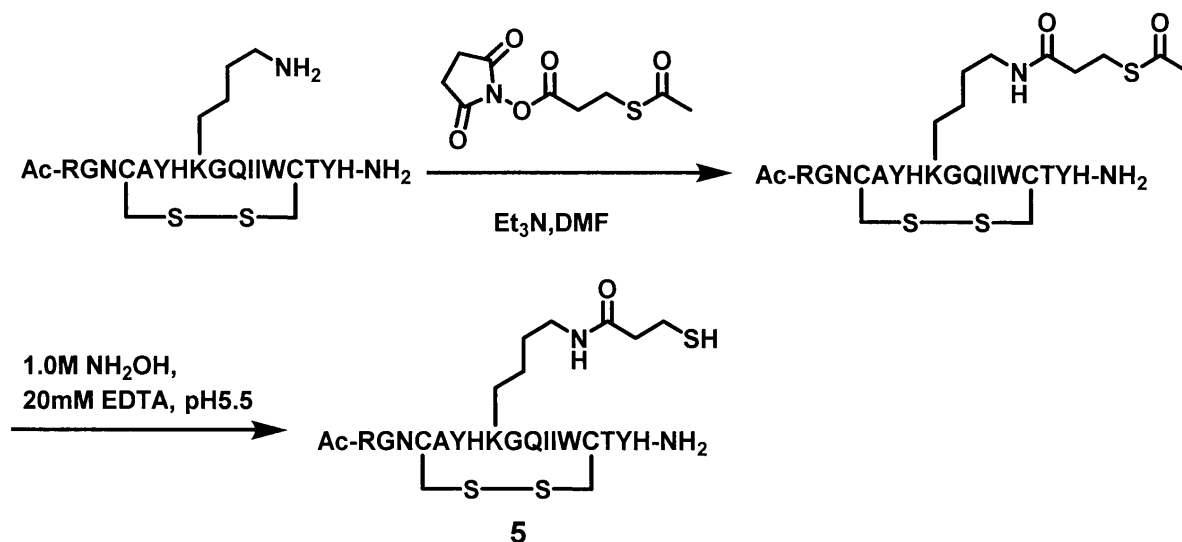
【0176】

(1-1-2) で合成したリンカー中間体 3 (200 mg、0.97 mmol) を DMF (4.85 mL) に溶解し、Pentafluorophenol (893 mg、4.85 mmol)、PyBOP (1.0 g、1.94 mmol)、DIPEA (990 μ L、5.82 mmol)、DMAP (11.9 mg、0.097 mmol) を加え室温で 2 時間攪拌した。LC/MS と 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 2 M HCl 水溶液で抽出し、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、リンカー (4) を得た (173.4 mg、0.32 mmol)。

【0177】

(1-1-4) ペプチド中間体 (5) の合成

【化 17】



上記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。

【0178】

配列番号 X1 のアミノ酸配列からなるペプチドは、国際公開第 2018/199337 号に記載の方法に従って固相合成した (ペプチドの合成について以下同様)。Ac-RGNCAYHKGQIIWCTYH-NH₂ (配列番号 2、50.0 mg、19.6 μ mol、ただし 4 番目と 14 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) と N-Succinimidyl-3-(Acetylthio)propionate (48.0 mg、196 μ mol) を DMF (1.00 mL) に溶解し、トリエチルアミン (8.2 μ L、58.8 μ mol) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。LC-MS で反応を確認後、反応液に 1.0 M NH₂OH、20 mM EDTA (2 mL) 加え、さらに 2 時間攪拌した。LC-MS で反応を確認後、0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタド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、ペプチド中間体 (5) を得た (29.1 mg、13.4 μ mol)。

【0179】

MS (ESI) m/z: z = 3 727.10 [M+3H]³⁺

【0180】

(1-1-5) 修飾試薬 (1) の合成

10

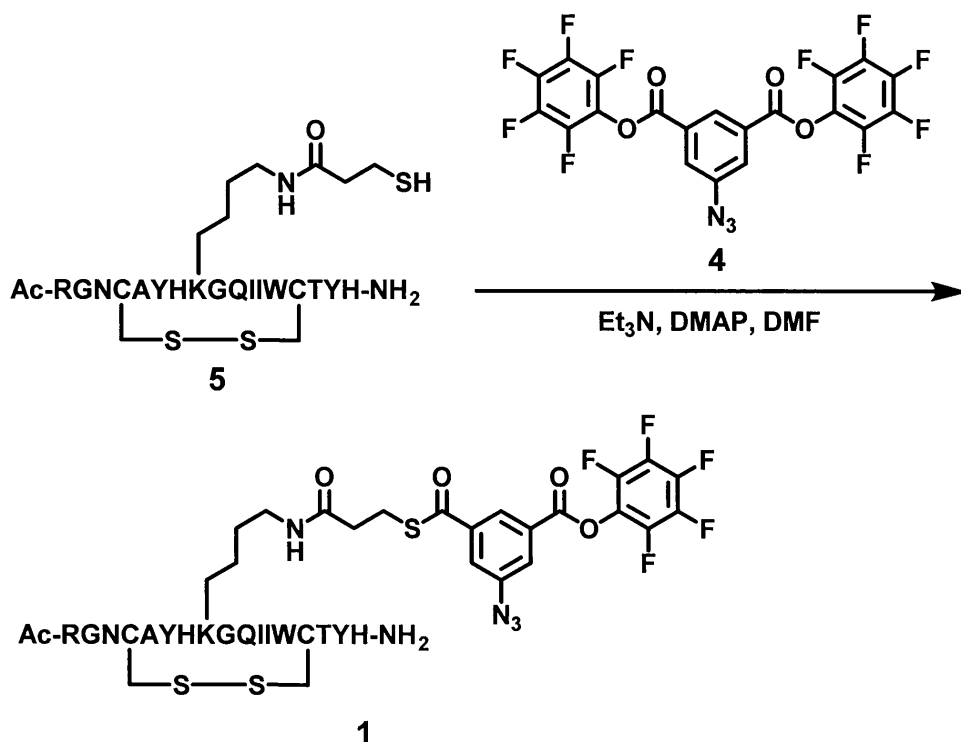
20

30

40

50

【化 18】



上記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。

【0181】

(1-1-4) で合成したペプチド中間体 (5) (29.1 mg, 13.4 μmol) と (1-1-3) で合成したリンカー (4) (72.3 mg, 134 μmol) を DMF (1.00 mL) に溶解し、トリエチルアミン (5.6 μL, 40.2 μmol)、DMAP を加え、室温で 1 時間攪拌した。LC-MS で反応を確認後、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、上記修飾試薬 (1) を得た (9.0 mg, 3.55 μmol)。

【0182】

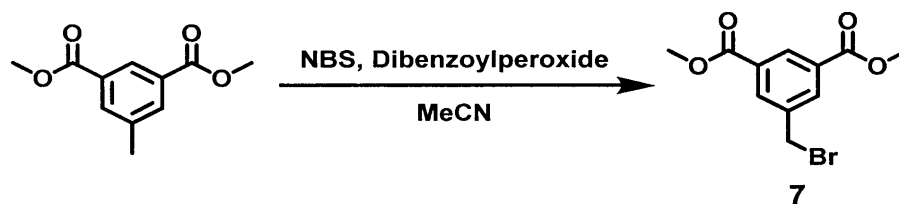
MS (ESI) m/z : $z = 3$ 845.55 $[M + 3H]^3+$

【0183】

(1-2) 修飾試薬 (6) の合成

(1-2-1) リンカー中間体 (7) の合成

【化 19】



【0184】

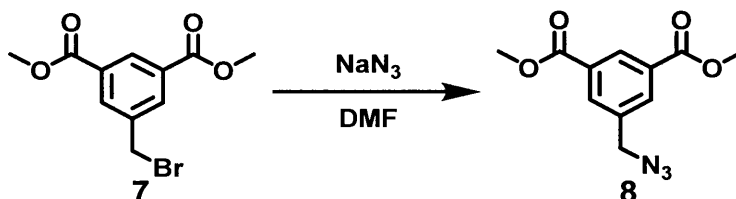
Dimethyl-5-methylisophthalate (830 mg, 4.0 mmol) をアセトニトリル (100 mL) に溶解し、NBS (783 mg, 4.4 mmol)、Benzoyl Peroxide (40 mg, 0.17 mmol) を加え 90

℃で20時間撹拌した。LC/MSとTLC（ヘキサン／酢酸エチル＝5／1）で反応を確認後、反応液を濃縮した。ヘキサン／酢酸エチル＝1／1の混合溶媒に溶解し濾過した。結晶を集め真空乾燥を行い、リンカー中間体（7）を得た（630mg、2.19mmol）。

【0185】

（1-2-2）リンカー中間体（8）の合成

【化20】



10

【0186】

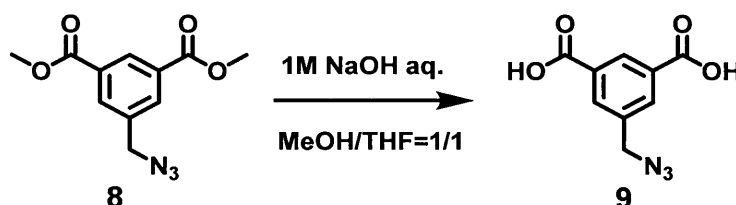
アジ化ナトリウム（204mg、3.13mmol）をDMF（2.0mL）に溶解し、（1-2-1）で合成したリンカー中間体（7）（300mg、1.04mmol）を加え60℃で3時間撹拌した。LC/MSとTLC（ヘキサン／酢酸エチル＝5／1）で反応を確認後、酢酸エチルと水で抽出し、有機層を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC（ヘキサン／酢酸エチル＝5／1）により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、リンカー中間体（8）を得た（268mg、1.08mmol）。

20

【0187】

（1-2-3）リンカー中間体（9）の合成

【化21】



30

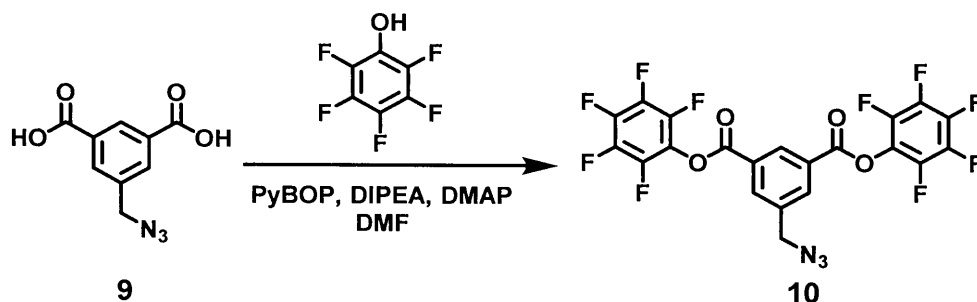
【0188】

（1-2-2）で合成した化合物（268mg、1.08mmol）をメタノール（5.4mL）、THF（5mL）に溶解し、1M NaOH水溶液を加え室温で2時間撹拌した。MSで反応を確認後、2M HCl水溶液で酸性にし、酢酸エチルと2M HCl水溶液で抽出し、有機層を濃縮した。真空乾燥を行い、リンカー中間体（9）を得た（227mg、1.00mmol）。

【0189】

（1-2-4）リンカー中間体（10）の合成

【化22】



40

50

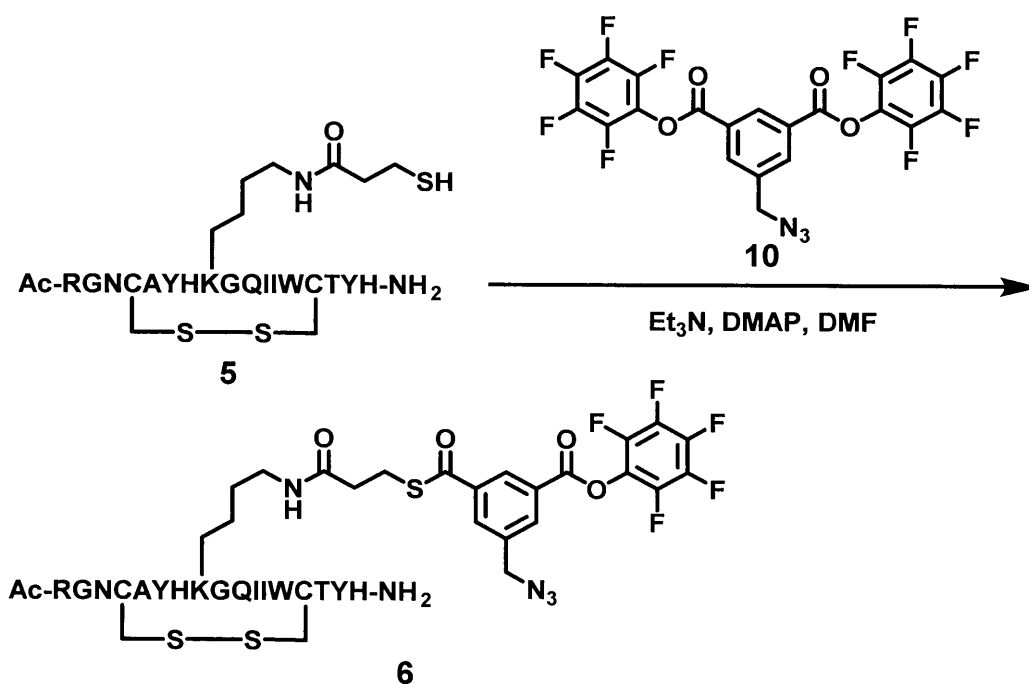
【0190】

(1-2-3) で合成したリンカー中間体 (9) (227 mg、1.00 mmol) を DMF (5.0 mL) に溶解し、Pentafluorophenol (920 mg、5.00 mmol)、PyBOP (1.3 g、2.5 mmol)、DIPEA (1.02 mL、6.0 mmol)、DMAP (12.2 mg、0.1 mmol) を加え室温で 20 時間攪拌した。LC/MS と 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 1 M HCl 水溶液で抽出し、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、リンカー中間体 (10) を得た (395.7 mg、0.72 mmol)。

【0191】

(1-2-5) 修飾試薬 (6) の合成

【化23】



上記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。

【0192】

(1-1-4) で合成したペプチド中間体 (5) (30.3 mg、13.9 μmol) と (1-2-4) で合成したリンカー中間体 (10) (76.9 mg、139 μmol) を DMF (1.00 mL) に溶解し、トリエチルアミン (5.8 μL、41.7 μmol)、DMAP を加え、室温で 1 時間攪拌した。LC-MS で反応を確認後、0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタド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、修飾試薬 (6) を得た (14.4 mg、5.65 μmol)。

【0193】

MS (ESI) m/z : z = 3 850.20 [M+3H]³⁺

【0194】

(1-3) 修飾試薬 (11) の合成

(1-3-1) リンカー中間体 (12) の合成

10

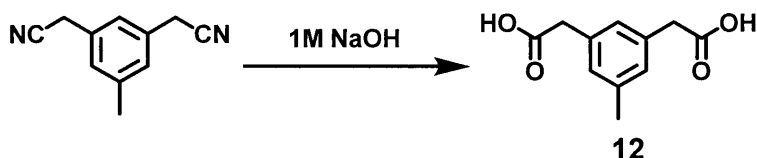
20

30

40

50

【化24】



【0195】

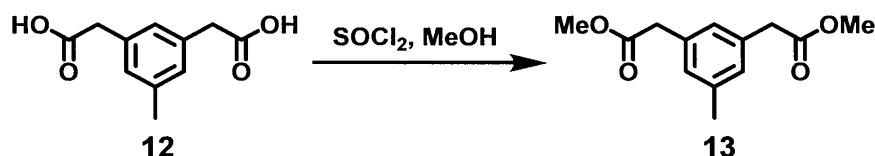
5-メチル-1,3-ベンゼンジアセトニトリル (5.0 g、29.4 mmol) を 1 M NaOH 水溶液 (100 mL) に溶解し、DMF を加え 110℃ で 20 時間撹拌した。LC/MS で反応を確認後、反応液を濃縮した。2 M HCl 水溶液で酸性にし、酢酸エチルと 2 M HCl 水溶液で抽出し、有機層を濃縮した。真空乾燥を行い、リンカー中間体 (12) を得た (6.0 g、28.8 mmol)。

10

【0196】

(1-3-2) リンカー中間体 (13) の合成

【化25】



20

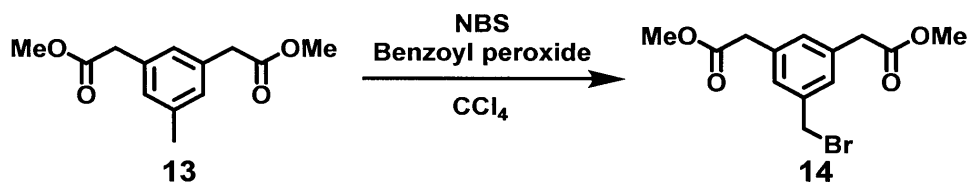
【0197】

(1-3-1) で合成したリンカー中間体 (12) (6.0 g、28.8 mmol) をメタノールに溶解し、0℃ 下で塩化チオニル (21.4 mL、288 mmol) を加え常温で 3 時間撹拌した。LC/MS で反応を確認後、酢酸エチルと重曹水で抽出し、有機層を濃縮することでリンカー中間体 (13) をえた。

【0198】

(1-3-3) リンカー中間体 (14) の合成

【化26】



30

【0199】

(1-3-2) で合成した化合物を四塩化炭素 (28.8 mL) に溶解し、N-Bromosuccinimide (5.6 g、31.6 mmol)、Benzoyl peroxide (157 mg、0.49 mmol) を加え 85℃ で 2 時間撹拌した。その後、N-Bromosuccinimide (5.6 g、31.6 mmol) を加え 85℃ で 30 分撹拌した。LC/MS と TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 3/1) で反応を確認後、結晶を除去し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去した。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、リンカー中間体 (14) を得た (870 mg、2.76 mmol)。

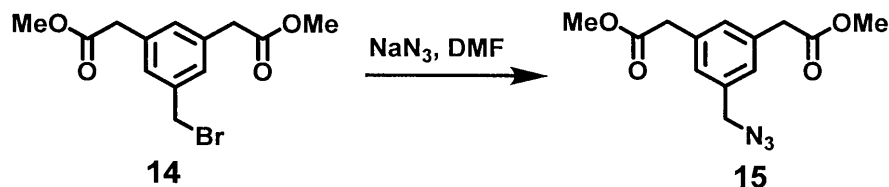
40

【0200】

(1-3-4) リンカー中間体 (15) の合成

50

【化 27】



【0201】

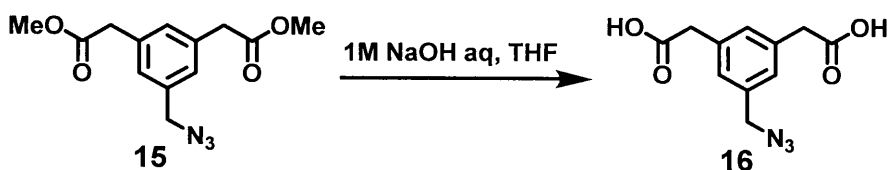
(1-3-3) で合成したリンカー中間体 (14) (870mg、2.76mmol) を DMF (5.0mL) に溶解し、アジ化ナトリウム (540mg、8.28mmol) を加え室温で1時間攪拌した。LC/MSとTLC (ヘキサン/酢酸エチル=3/1) で反応を確認後、酢酸エチルと水で抽出し、有機層を濃縮し、真空乾燥を行い、リンカー中間体 (15) を得た。

10

【0202】

(1-3-5) リンカー中間体 (16) の合成

【化 28】



20

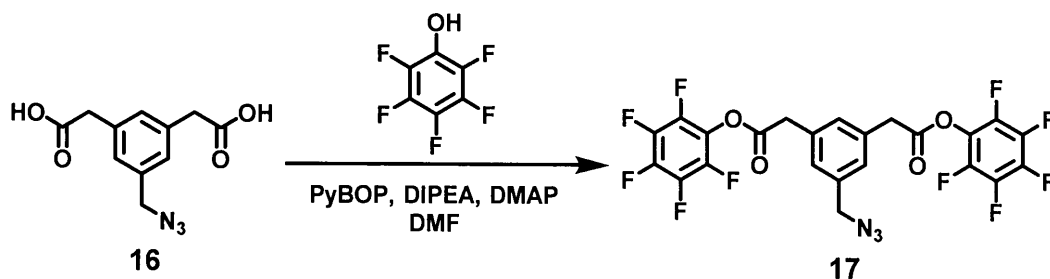
【0203】

(1-3-4) で合成したリンカー中間体 (16) を THF (3.0mL) に溶解し、0℃で1M NaOH水溶液 (7.0mL) を加え室温で1時間攪拌した。LC/MSで反応を確認後、2M HCl水溶液で酸性にし、酢酸エチルと2M HCl水溶液で抽出し、有機層を濃縮した。真空乾燥を行い、リンカー中間体 (16) を得た (637.8mg、2.56mmol)。

【0204】

(1-3-6) リンカー中間体 (17) の合成

【化 29】



30

40

【0205】

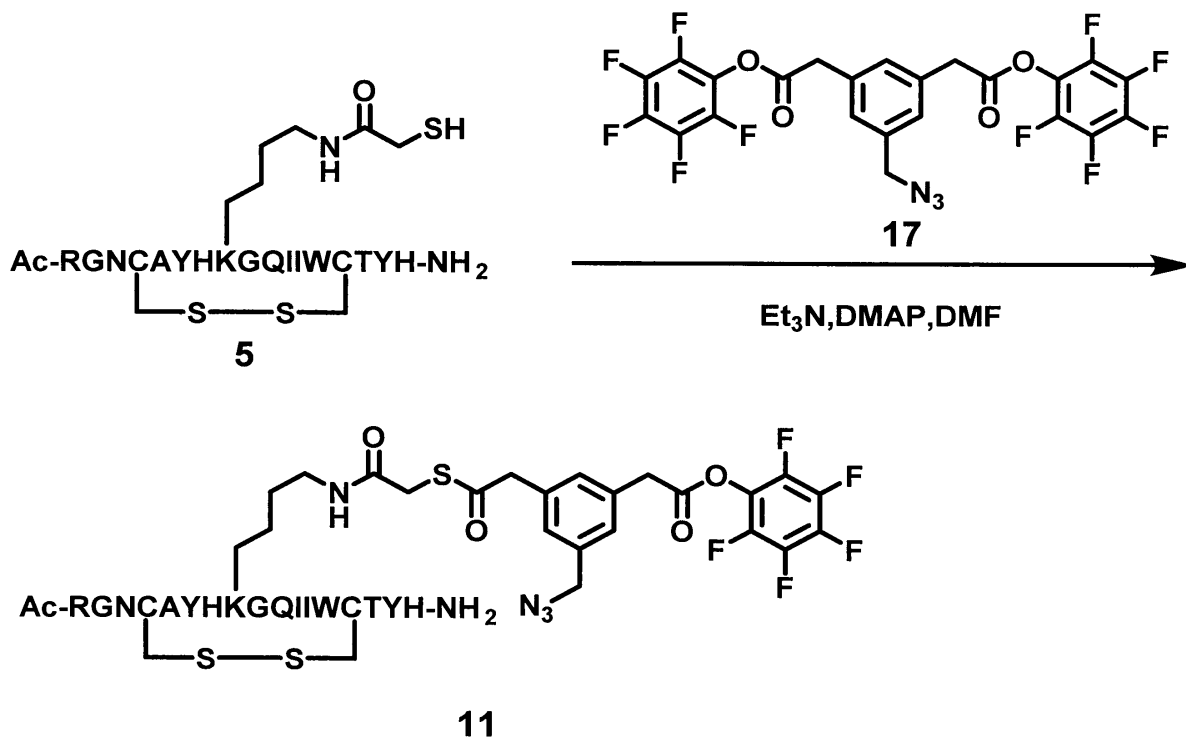
(1-3-5) で合成したリンカー中間体 (16) (237mg、0.95mmol) を DMF (4.75mL) に溶解し、Pentafluorophenol (874mg、4.75mmol)、PyBOP (1.24g、2.38mmol)、DIPEA (969μL、5.70mmol)、DAMP (11.6mg、0.095mmol) を加え室温で20時間攪拌した。LC/MSとTLC (ヘキサン/酢酸エチル=3/1) で反応を確認後、酢酸エチルと水で抽出し、有機層を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC (ヘキサン/酢酸エチル=3/1) により確認した。生成物が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、リンカー中間体 (17) を得た (300mg、0.52mmol)。

50

【0206】

(1-3-7) 修飾試薬(11)の合成

【化30】



上記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。

【0207】

(1-1-4)で合成したペプチド中間体(5)(15.0mg、6.93 μmol 、ただし4番目と14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)と(1-3-6)で合成したリンカー中間体(17)(40.2mg、69.3 μmol)をDMF(1.00mL)に溶解し、トリエチルアミン(2.89 μL 、20.79 μmol)、DMAPを加え、室温で1時間攪拌した。LC-MSで反応を確認後、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、修飾試薬(11)を得た(1.44mg、0.56 μmol)。

【0208】

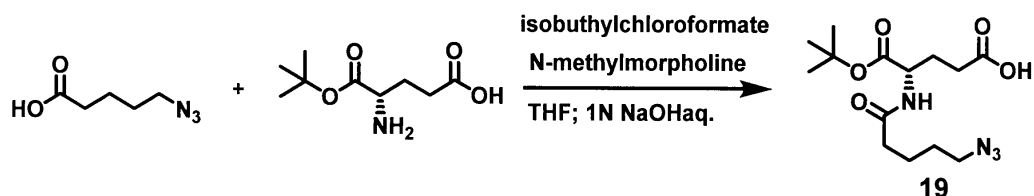
MS (ESI) m/z : $z=3$ 854.30 $[M+3H]^3+$

【0209】

(1-4) 修飾試薬(18)の合成

(1-4-1) リンカー中間体(19)の合成

【化31】



10

20

30

40

50

【0210】

5-アジドペンタン酸 (800 mg, 5.59 mmol) を THF (14 mL) に溶解させ、クロロギ酸イソブチル (808 μ L, 6.15 mmol)、N-メチルモルホリン (873 μ L, 8.39 mmol) を加え 0°C にて 30 分攪拌した後、1 M NaOH 水溶液 (4 mL) に溶解したヒドラジン水和物 (1.36 g, 6.71 mmol) を加えて室温にて 3 時間攪拌した。減圧下濃縮した後、1 M NaOH 水溶液を加え、系内の pH を pH 10 に調整し、酢酸エチルで洗浄後、水層に 1 M HCl 水溶液を加え、系内の pH を 3.0 に調整し、酢酸エチルを加えて洗浄し、得られた酢酸エチル溶液に硫酸ナトリウムを加えた。フィルトレーションにより硫酸ナトリウムを取り除き、減圧下濃縮カラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン：メタノール = 10 : 1) にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することにより、リンカー中間体 (19) を得た。

10

【0211】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 6.29 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 4.56 (td, $J=8.0$, 4.9 Hz, 1H), 3.32 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 2.53–2.38 (m, 3H), 2.36–2.16 (m, 3H), 2.12 (s, 2H), 1.96 (dq, $J=14.7$, 7.6 Hz, 1H), 1.84–1.59 (m, 4H), 1.50 (s, 9H) .

【0212】

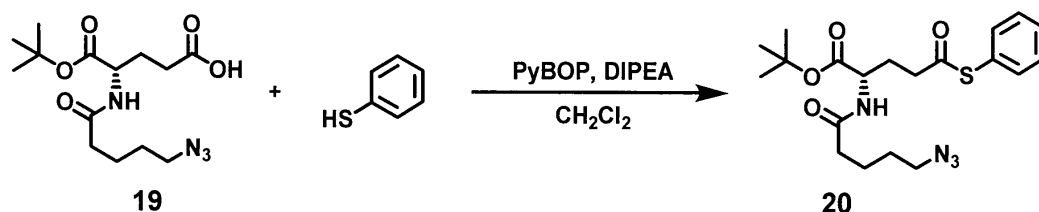
MS (ESI) m/z : 329 $[\text{M}+\text{H}]^+$

20

【0213】

(1-4-2) リンカー中間体 (20) の合成

【化32】



30

【0214】

リンカー中間体 (19) (2.41 g, 5.59 mmol) をジクロロメタン (28 mL) に溶解させ、チオフェノール (627 μ L, 6.15 mmol)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ (3.49 g, 6.71 mmol)、DIPEA (1.42 mL, 8.39 mmol) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。その後、減圧下濃縮し、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル = 4 : 1) にて精製した。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、リンカー中間体 (20) を得た (2.20 g, 5.23 mmol)。

【0215】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.43 (s, 5H), 6.10 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 4.55 (td, $J=7.7$, 4.9 Hz, 1H), 3.31 (t, $J=6.7$ Hz, 2H), 2.87–2.63 (m, 2H), 2.28 (dd, $J=8.7$, 5.9 Hz, 2H), 2.16–1.98 (m, 1H), 1.83–1.58 (m, 4H), 1.50 (s, 9H), 1.37–1.22 (m, 2H), 0.91 (t, $J=6.7$ Hz, 1H) .

40

【0216】

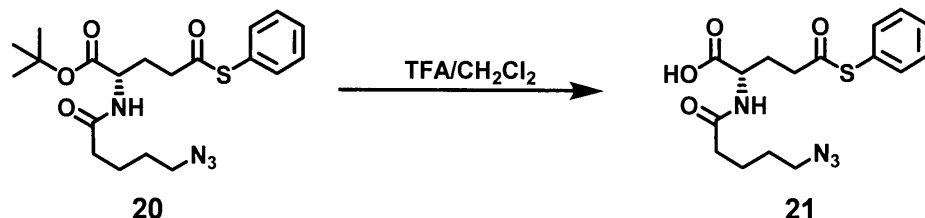
MS (ESI) m/z : 421 $[\text{M}+\text{H}]^+$

【0217】

(1-4-3) リンカー中間体 (21) の合成

50

【化 3 3】



【0 2 1 8】

リンカー中間体 (20) (2.20 g, 5.23 mmol) をジクロロメタン (10 mL) に溶解させ、トリフルオロ酢酸 (10 mL) を加えて、室温にて 1 時間攪拌した後、減圧下濃縮しジクロロメタンを除去し、水を加えて凍結乾燥することにより、リンカー中間体 (21) を得た (1.98 g, 5.43 mmol)。

【0 2 1 9】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.44 (s, $J=6.3$, 4.6, 2.4 Hz, 5H), 6.76 (s, 1H), 4.62 (td, $J=7.5$, 4.9 Hz, 1H), 3.31 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 2.88 (qt, $J=16.8$, 6.8 Hz, 2H), 2.33 (dt, $J=12.4$, 6.8 Hz, 3H), 2.18 (dq, $J=14.4$, 7.4 Hz, 1H), 1.74 (dq, $J=11.8$, 7.5, 6.9 Hz, 2H), 1.63 (ddd, $J=17.7$, 10.5, 4.8 Hz, 2H)。

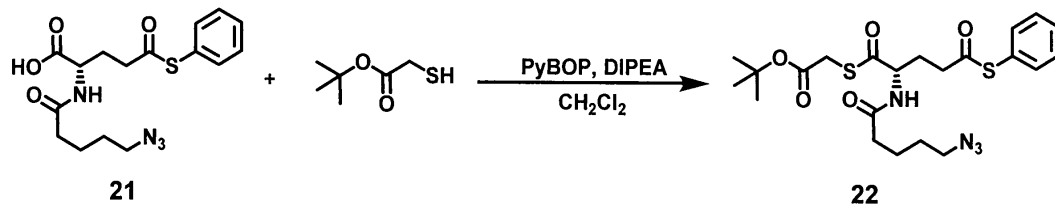
【0 2 2 0】

MS (ESI) m/z : 365 $[\text{M}+\text{H}]^+$

【0 2 2 1】

(1-4-4) リンカー中間体 (22) の合成

【化 3 4】



【0 2 2 2】

リンカー中間体 (21) (100 mg, 0.274 mmol) をジクロロメタン (3 mL) に溶解させ、(40.6 μL , 0.280 mmol)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ (150 mg, 0.288 mmol)、DIPEA (70.1 μL , 0.412 mmol) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。1 M HCl 水溶液を加えて系内を pH 3 に調整し、ジクロロメタンを加えて希釈し、水、食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムを加えた。フィルトレーションにより、硫酸ナトリウムを除去した後、減圧下濃縮し、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル = 4 : 1) にて精製した。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、リンカー中間体 (22) を得た (84.7 mg, 0.171 mmol)。

【0 2 2 3】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.50–7.38 (m, 5H), 6.33 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.78 (ddd, $J=7.8$, 4.6, 3.0 Hz, 1H), 3.70–3.54 (m, 2H), 3.32 (dt, $J=9.1$, 6.7 Hz, 2H), 2.96–2.67 (m, 2H), 2.30 (pd, $J=7.1$, 4.5 Hz, 2H), 1.85–1.60 (m, 6H), 1.49 (d, $J=2.8$ Hz, 9H)。

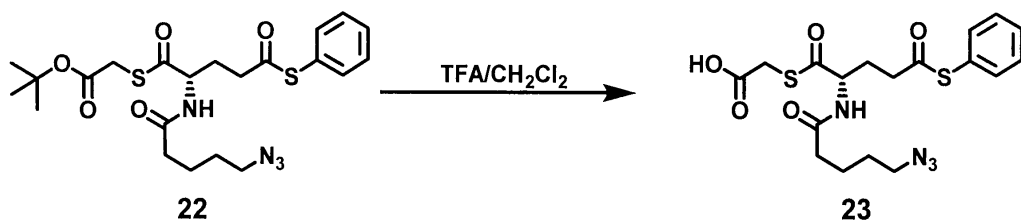
【0224】

MS (ESI) m/z : 495 [M+H]⁺

【0225】

(1-4-5) リンカー中間体 (23) の合成

【化35】



10

【0226】

リンカー中間体 (22) (84.7 mg, 0.171 mmol) をジクロロメタン (5 mL) に溶解させ、トリフルオロ酢酸 (5 mL) を加えて、室温にて1時間攪拌した後、減圧下濃縮しジクロロメタンを除去し、水を加えて凍結乾燥した後、カラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン:メタノール=10:1) にて精製した。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リンカー中間体 (23) を得た (46.8 mg, 0.107 mmol)。

【0227】

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 7.44 (dq, J=2.3, 1.5 Hz, 5H), 4.69–4.57 (m, 1H), 3.79–3.67 (m, 2H), 3.40–3.30 (m, 2H), 2.89–2.71 (m, 2H), 2.44–2.23 (m, 4H), 2.08–1.95 (m, 1H), 1.82–1.61 (m, 4H)。

20

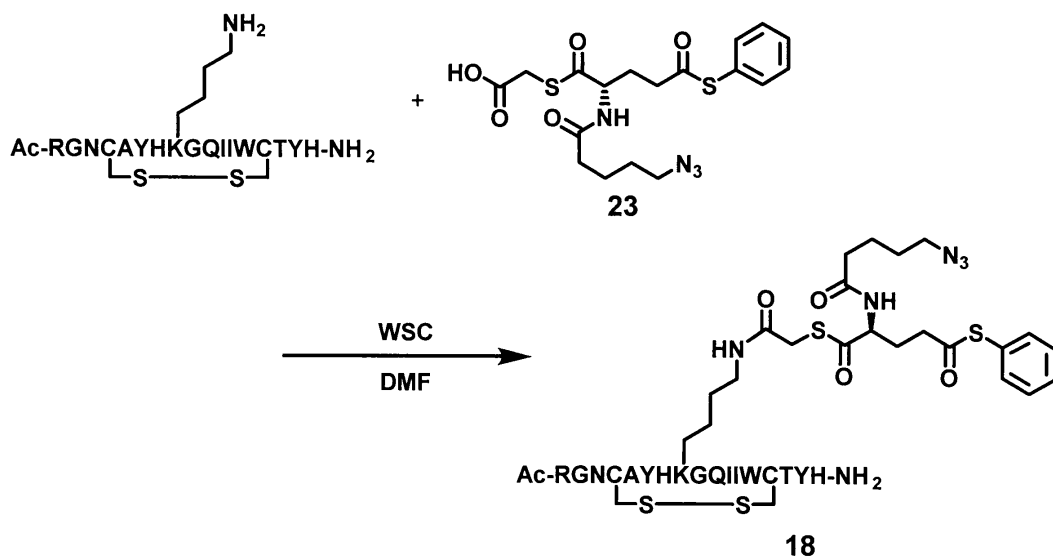
【0228】

MS (ESI) m/z : 439 [M+H]⁺

【0229】

(1-4-6) 修飾試薬 (18) の合成

【化36】



30

40

上記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。

【0230】

Ac-RGNCA YHKGQIIWCTYH-NH₂ (配列番号2、30.9 mg, 14.9 μmol、ただし、4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジ

50

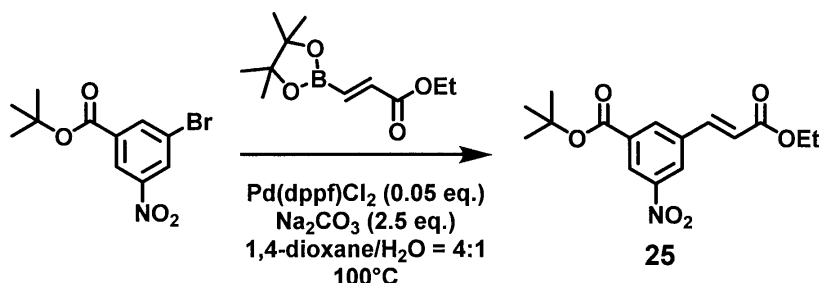
スルフィド結合している。)を(468 μL)に溶解し、リンカー中間体(23) 46.8 mg, 0.107 mmol)、WSC・HCl(29.7 mg, 0.155 mmol)を加え、室温にて5時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにより、溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記修飾試薬(18)を得た(15.1 mg, 6.02 μmol)。

【0231】

(1-5) 修飾試薬(24)の合成

(1-5-1) リンカー中間体(25)の合成

【化37】



【0232】

tert-Butyl 3-bromo-5-nitrobenzoate (500 mg, 1.65 mmol)を1,4-Dioxane/H₂O=4/1の混合溶液(8.25 mL)に溶解し、2-Ethoxycarbonylvinylboronic acid pinacol ester (447 mg, 1.98 mmol)、Pd(dppf)Cl₂ (67.8 mg, 0.083 mmol)、Na₂CO₃ (438 mg, 4.13 mmol)を加え100°Cで2時間攪拌した。LC/MSとTLC(ヘキサン/酢酸エチル=10/1)で反応を確認後、酢酸エチルと水で抽出し、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=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、リンカー中間体(25)を得た(371.7 mg, 1.16 mmol)。

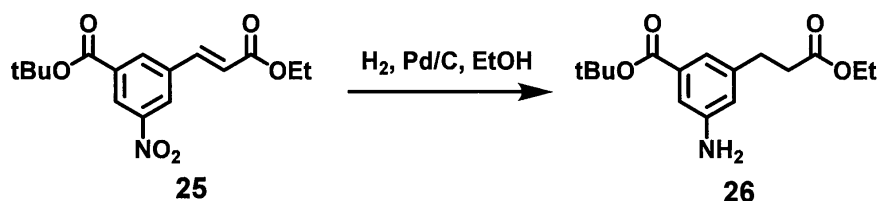
【0233】

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ=8.69 (d, J=1.8, 1H), 8.43 (t, J=2.0, 1H), 8.35 (d, J=1.6, 1H), 7.67 (d, J=16.0, 1H), 6.55 (d, J=16.0, 1H), 4.23 (q, J=7.1, 2H), 1.57 (s, 9H), 1.36-1.22 (m, 3H)。

【0234】

(1-5-2) リンカー中間体(26)の合成

【化38】



【0235】

リンカー中間体(25) (371.7 mg, 1.16 mmol)をメタノール(5.8 mL)、酢酸エチル(5.0 mL)に溶解し、Pd/C(5% Pd、53% H₂O)(5.0 mol%)を加え、水素下で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、メンブレンフィルターにより濾過し、濾液を濃縮後、真空乾燥を行いリンカー中間体 (26) を得た (320.5 mg、1.09 mmol)。

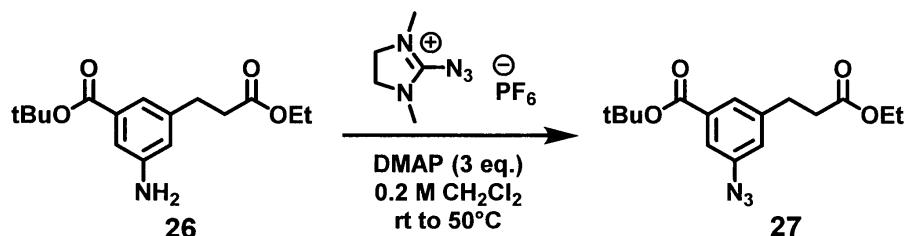
【0236】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ = 7.24–7.11 (m, 1H), 6.75 (t, J = 1.9, 1H), 4.14 (q, J = 7.1, 2H), 2.90 (t, J = 7.8, 2H), 2.61 (t, J = 7.8, 2H), 1.58 (s, 9H), 1.25 (td, J = 7.1, 4.5, 3H)。

【0237】

(1-5-3) リンカー中間体 (27) の合成

【化39】



【0238】

リンカー中間体 (26) (320.5 g、1.09 mmol) を CH_2Cl_2 (5.45 mL) に溶解し、2-Azido-1,3-dimethylimidazolinium Hexafluorophosphate (932 mg、3.27 mmol), DMAP (399 mg、3.27 mmol) 加え1.5時間攪拌した。TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) で反応を確認後、反応液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒で溶出し、TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) 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、リンカー中間体 (27) を得た (278 mg、1.18 mmol)。

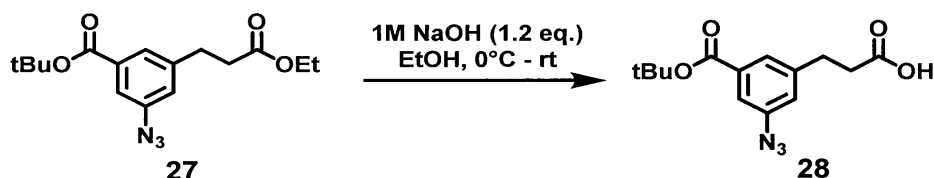
【0239】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ = 7.60 (d, J = 1.5, 1H), 7.50 (t, J = 1.8, 1H), 7.02 (t, J = 2.0, 1H), 4.14 (q, J = 7.1, 2H), 2.98 (t, J = 7.7, 2H), 2.64 (t, J = 7.7, 2H), 1.60 (s, 10H), 1.25 (t, J = 7.1, 4H)。

【0240】

(1-5-4) リンカー中間体 (28) の合成

【化40】



【0241】

リンカー中間体 (27) (278 mg、1.18 mmol) を THF (4.35 mL) に溶解し、0°C下で1M NaOH水溶液 (1.74 mL)、エタノール (4 mL) を加え室温で1.5時間攪拌した。LC/MSとTLC (ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) で反応を確認後、0°C下で1M HCl水溶液 (2.61 mL) 加え酸性にした。酢酸エチルと1M HCl水溶液で抽出し、有機層を濃縮し、真空乾燥を行い、リンカー中間体 (28) を得た (246.6 mg、0.85 mmol)。

【0242】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ = 7.61 (d, J = 1.5, 1H), 7.52 (t, J = 1.8, 1H), 7.02 (t, J = 1.9, 1H),

10

20

30

40

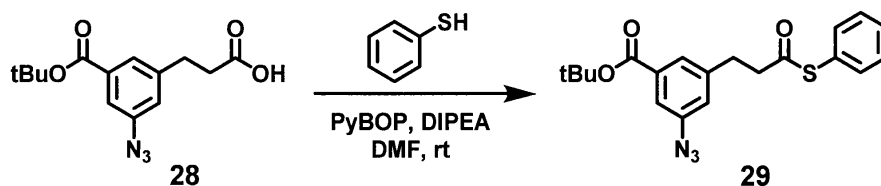
50

3.00 (t, J = 7.7, 2H), 2.72 (t, J = 7.7, 2H), 1.60 (s, 8H).

【0243】

(1-5-5) リンカー中間体(29)の合成

【化41】



10

【0244】

リンカー中間体(28) (246.6 mg、0.85 mmol)をDMF (4.25 mL)に溶解し、Benzenethiol (86.7 μ L、0.85 mmol)、PyBOP (442 mg、0.85 mmol)、DIPEA (218 μ L、1.28 mmol)を加え室温で1.5時間攪拌した。LC/MSとTLC (ヘキサン/酢酸エチル=4/1)で反応を確認後、酢酸エチルと水で抽出し、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=4/1)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、リンカー中間体(29)を得た(250.9 mg、0.65 mmol)。

20

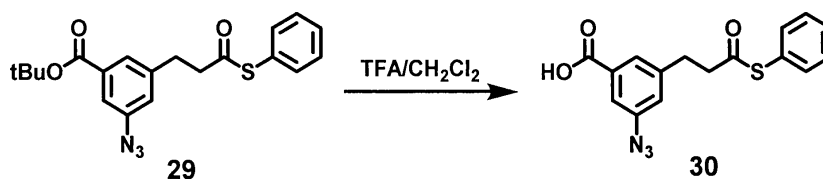
【0245】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ = 7.53 (d, J = 1.6, 1H), 7.44 (t, J = 1.8, 1H), 7.34 (p, J = 3.6, 5H), 6.93 (t, J = 1.9, 1H), 3.04–2.80 (m, 4H), 1.53 (s, 10H).

【0246】

(1-5-6) リンカー中間体(30)の合成

【化42】



30

【0247】

リンカー中間体(29) (250.9 mg、0.65 mmol)をCH₂Cl₂/TFA = 1/1の混合溶媒(10 mL)に溶解し、室温で1時間攪拌した。LC/MSとTLC (ヘキサン/酢酸エチル=4/1)で反応を確認後、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去し、真空乾燥を行い、リンカー中間体(30)を得た(215.1 mg、0.66 mmol)。

40

【0248】

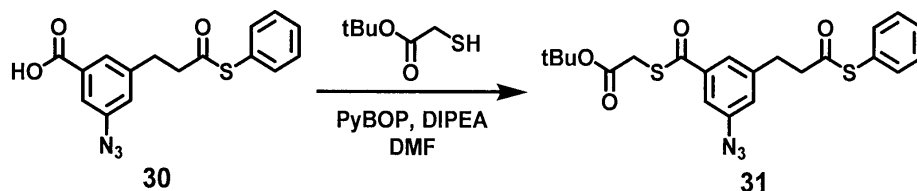
^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ = 7.74 (s, 1H), 7.64 (d, J = 1.8, 1H), 7.49–7.32 (m, 4H), 7.10 (d, J = 2.0, 1H), 3.19–2.88 (m, 4H).

【0249】

(1-5-7) リンカー中間体(31)の合成

50

【化 4 3】



【0 2 5 0】

リンカー中間体 (30) (215.1mg、0.66mmol) を DMF (3.3mL) に溶解し、Tert Butyl-2-Sulfanylaceta (97.8mg、0.66mmol)、PyBOP (343mg、0.66mmol)、DIPEA (168μL、0.99mmol) を加え室温で1時間攪拌した。LC/MSと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し、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、リンカー中間体 (31) を得た (247.8mg、0.54mmol)。

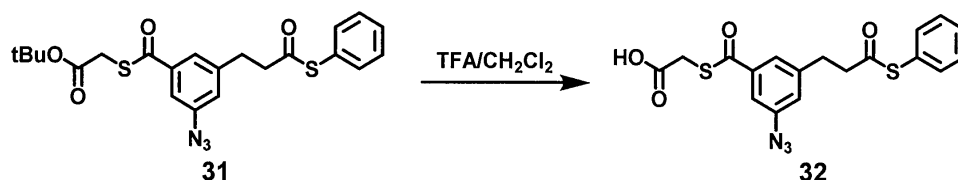
【0 2 5 1】

^1H NMR (400MHz, Chloroform-d) δ = 7.60 (d, J = 1.6, 1H), 7.49 (t, J = 1.9, 1H), 7.42 (p, J = 3.7, 4H), 7.08 (d, J = 1.9, 1H), 3.82 (d, J = 3.1, 2H), 3.03 (dd, J = 21.1, 6.9, 4H), 1.50 (s, 9H)。

【0 2 5 2】

(1-5-8) リンカー中間体 (32) の合成

【化 4 4】



【0 2 5 3】

リンカー中間体 (31) (247.8mg、0.54mmol) を CH_2Cl_2 /TFA = 1/1 の混合溶媒 (10mL) に溶解し、室温で1時間攪拌した。LC/MSとTLC (ヘキサン/酢酸エチル=5/1) で反応を確認後、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去し、真空乾燥を行い、リンカー中間体 (32) を得た (227.3mg、0.56mmol)。

【0 2 5 4】

^1H NMR (400MHz, Chloroform-d) δ = 7.70 (d, J = 1.6, 1H), 7.42 (t, J = 1.9, 1H), 7.41 (p, J = 3.7, 4H), 7.01 (d, J = 1.9, 1H), 3.67 (d, J = 3.1, 2H), 3.20 (dd, J = 21.1, 6.9, 4H)。

MS (ESI) m/z : $z = 1$ 402.29 $[\text{M} + \text{H}]^+$

【0 2 5 5】

(1-5-9) 修飾試薬 (24) の合成

10

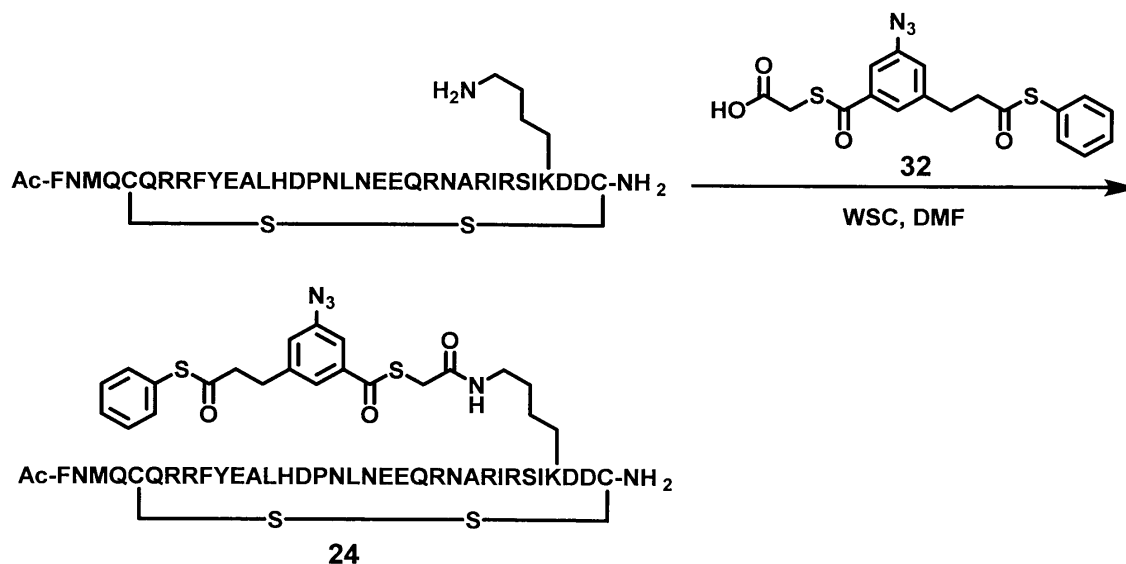
20

30

40

50

【化 4 5】



上記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。

【0256】

Ac-FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂ (配列番号 4、330.0 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) とリンカー中間体 (32) (29 mg、70.6 μmol)、WSC・HCl (13.5 mg、70.6 μmol) を DMF (1.00 mL) に溶解し、室温で 1 時間攪拌した。LC-MS で反応を確認後、0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタド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、修飾試薬 (24) を得た (5.5 mg、1.19 μmol)。

【0257】

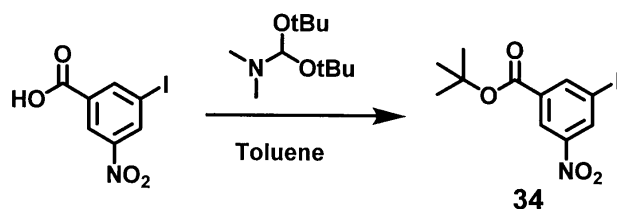
MS (ESI) m/z : z = 3 928.30 [M+3H]³⁺

【0258】

(1-6) 修飾試薬 (33) の合成

(1-6-1) リンカー中間体 (34) の合成

【化 4 6】



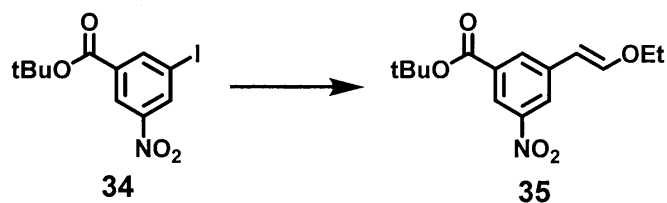
【0259】

3-Iodo-5-Nitrobenzoic Acid (1.0 g、3.41 mmol)、をトルエン (17 mL) に溶解し、N,N-Dimethylformamide Di-tertbutyl Acetal (5 mL、20.5 mmol) を加え 80 °C で 2 時間攪拌した。LC/MS と TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 5/1) で反応を確認後、反応液を濃縮した。真空乾燥を行い、リンカー中間体 (34) を得た (1.37 g、3.92 mmol)。

【0260】

(1-6-2) リンカー中間体 (35) の合成

【化47】



10

【0261】

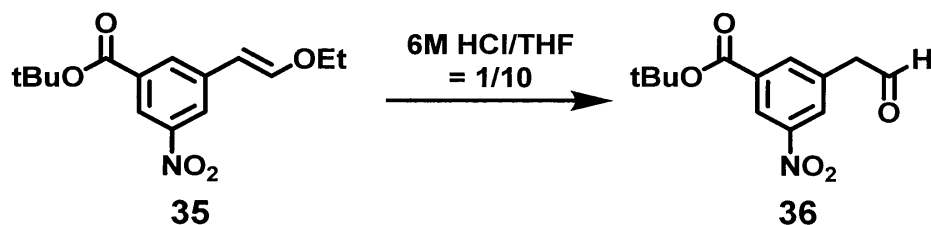
リンカー中間体 (34) (1.25 g、3.58 mmol) を 1,4-Dioxane / H₂O = 4 / 1 の混合溶液 (18 mL) に溶解し、(E)-Ethoxyethene-2-boronic acid pinacol ester (851 mg、4.3 mmol)、Pd(dppf)Cl₂ (146 mg、0.179 mmol)、Na₂CO₃ (948 mg、8.95 mmol) を加え 100℃ で 3 時間攪拌した。LC/MS と TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 10/1) で反応を確認後、酢酸エチルと水で抽出し、有機層を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションを TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 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、リンカー中間体 (35) を得た (415 mg、1.41 mmol)。

20

【0262】

(1-6-3) リンカー中間体 (36) の合成

【化48】



30

【0263】

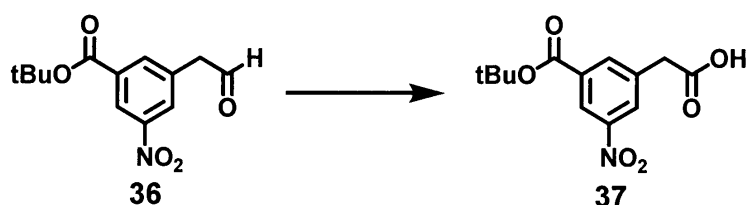
リンカー中間体 (35) 614 mg、2.09 mmol を THF (20 mL)、1 M HCl 水溶液 (2.0 mL) に溶解し、6 M HCl 水溶液 (1 mL) を加えさらに 60℃ で 20 時間攪拌した。TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) で反応を確認後、酢酸エチルと 1 M HCl 水溶液で抽出し、有機層を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションを TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、リンカー中間体 (36) を得た (426.4 mg、1.61 mmol)。

40

【0264】

(1-6-4) リンカー中間体 (37) の合成

【化49】



50

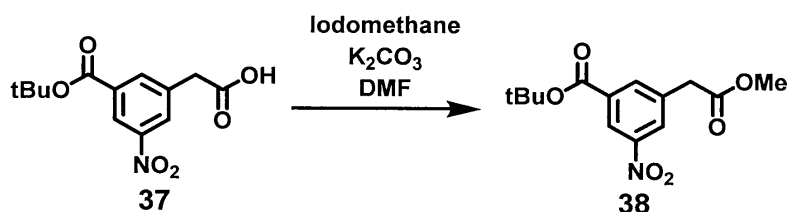
【0265】

リンカー中間体 (36) (426.4 mg、1.61 mmol) を *t*BuOH (16.1 mL) に溶解し、2-methyl-2-butene (1.71 mL、16.1 mmol)、0.85 M NaH₂PO₄ 水溶液 (11.4 mL、9.66 mmol)、0.5 M NaClO₂ 水溶液 (16.1 mL、8.05 mmol) を加え常温で1.5時間撹拌した。LC/MSで反応を確認後、1.0 M NaHSO₃ 水溶液 (16.1 mL、16.1 mmol) を加え反応を止めた。1 M HCl 水溶液を加え弱酸性よりにし、酢酸エチルで抽出し、有機層を濃縮した。真空乾燥を行い、リンカー中間体 (37) を得た (591.5 mg、2.10 mmol)。

【0266】

(1-6-5) リンカー中間体 (38) の合成

【化50】



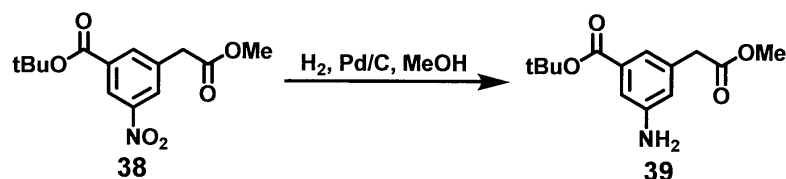
【0267】

リンカー中間体 (37) (591.5 mg、2.10 mmol) を DMF に溶解し、Iodomethane (392 μg、6.30 mmol)、炭酸カリウム (319 mg、2.31 mmol) を加え1.5時間撹拌した。LC/MSとTLC (ヘキサン/酢酸エチル=3/1) で反応を確認後、酢酸エチルと水で抽出し、有機層を濃縮した。真空乾燥を行い、リンカー中間体 (38) を得た (413.5 mg、1.40 mmol)。

【0268】

(1-6-6) リンカー中間体 (39) の合成

【化51】



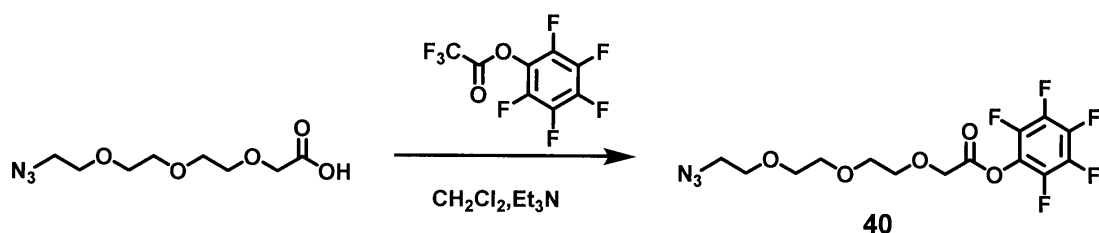
【0269】

リンカー中間体 (38) (413.5 mg、1.40 mmol) をメタノールに溶解し、Pd/C (317 mg、0.07 mmol) を加え水素下で1時間撹拌した。LC/MSで反応を確認後、メンブレンフィルターでPd/Cを除去し、溶媒を濃縮した。真空乾燥を行い、リンカー中間体 (39) を得た (348.4 mg、1.31 mmol)。

【0270】

(1-6-7) リンカー中間体 (40) の合成

【化52】



【0271】

10

20

30

40

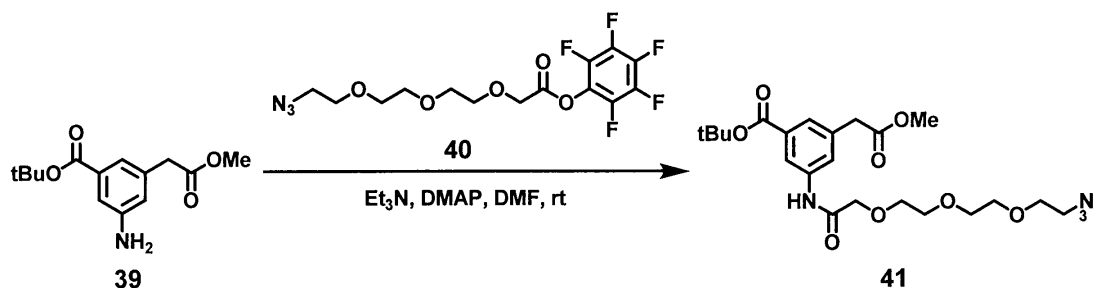
50

11-Azido-3,6,9-trioxaundecanoic Acid (700 mg、3.0 mmol) を CH_2Cl_2 (15.0 mL) に溶解し、 0°C でトリエチルアミン (2.09 mL、15.0 mmol)、ペンタフルオロフェニルトリフルオロ酢酸 (1.02 mL、6.0 mmol) を加え 0°C で1時間攪拌した。TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) で反応を確認後、反応液を濃縮した。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 = 2/1) 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、リンカー中間体 (40) を得た (1.4 g、3.51 mmol)。

【0272】

(1-6-8) リンカー中間体 (41) の合成

【化53】



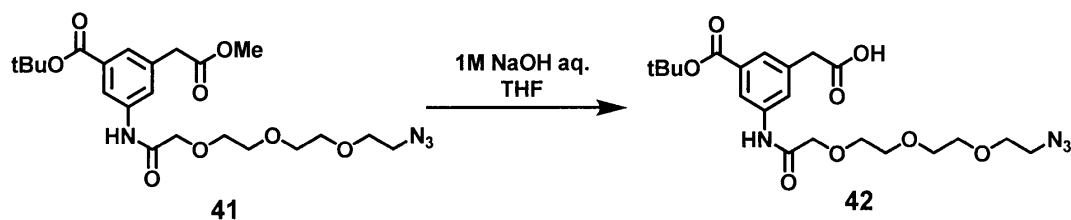
【0273】

リンカー中間体 (39) (348.4 mg、1.31 mmol) を DMF (6.55 mL) に溶解し、リンカー中間体 (40) (523 mg、1.31 mmol)、DIPEA (445 μL 、2.62 mmol)、DMAP (16.0 mg、0.131 mmol) を加え常温で1時間攪拌した。LC/MSで反応を確認後、水と酢酸エチルで抽出し、有機層を濃縮した。真空乾燥を行い、リンカー中間体 (41) を得た (429.4 mg、0.89 mmol)。

【0274】

(1-6-9) リンカー中間体 (42) の合成

【化54】



【0275】

リンカー中間体 (41) 429.4 mg、0.89 mmol) を THF (4.45 mL) に溶解し、1M NaOH水溶液 (2.67 mL、2.67 mmol) を加え常温で1時間攪拌した。LC/MSで反応を確認後、2M HCl水溶液で酸性よりにし、酢酸エチルで抽出し、有機層を濃縮した。真空乾燥を行い、リンカー中間体 (42) を得た (412.5 mg、0.88 mmol)。

【0276】

(1-6-10) リンカー中間体 (43) の合成

10

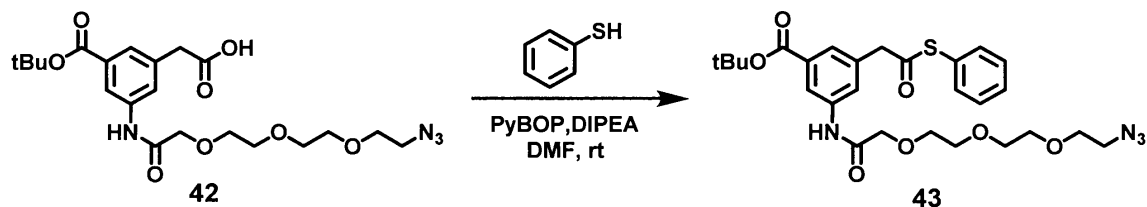
20

30

40

50

【化 5 5】



【0 2 7 7】

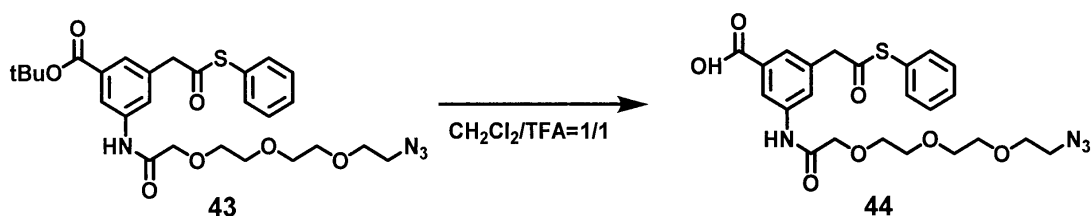
リンカー中間体 (**42**) (412.5 mg 、 0.88 mmol) を DMF (4.40 mL) に溶解し、Benzenethiol ($89.7 \mu\text{L}$ 、 0.88 mmol)、 PyBOP (458 mg 、 0.88 mmol)、 DIPEA ($226 \mu\text{L}$ 、 1.33 mmol) を加え室温で1時間攪拌した。LC/MSとTLC (酢酸エチル) で反応を確認後、酢酸エチルと水で抽出し、有機層を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC (酢酸エチル) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、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、リンカー中間体 (**43**) を得た (388.3 mg 、 0.69 mmol)。

10

【0 2 7 8】

(1-6-11) リンカー中間体 (**44**) の合成

【化 5 6】



20

【0 2 7 9】

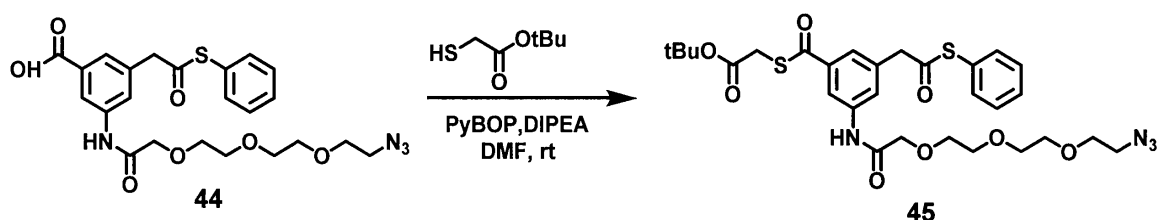
リンカー中間体 (**43**) (388.3 mg 、 0.69 mmol) を $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA} = 1/1$ の混合溶媒に溶解し、室温で1時間攪拌した。LC/MSとTLC (酢酸エチル) で反応を確認後、有機溶媒を除去し、真空乾燥を行い、リンカー中間体 (**44**) を得た (382.7 mg 、 0.76 mmol)。

30

【0 2 8 0】

(1-6-12) リンカー中間体 (**45**) の合成

【化 5 7】



40

【0 2 8 1】

リンカー中間体 (**44**) (382.7 mg 、 0.76 mmol) を DMF (3.8 mL) に溶解し、 $t\text{Bu-2-Sulfanylacetate}$ (112.6 mL 、 0.76 mmol)、 PyBOP (395 mg 、 0.76 mmol)、 DIPEA ($194 \mu\text{L}$ 、 1.14 mmol) を加え室温で1時間攪拌した。LC/MSとTLC (酢酸エチル) で反応を確認後、酢酸エチルと水で抽出し、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 (酢酸エチル) 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

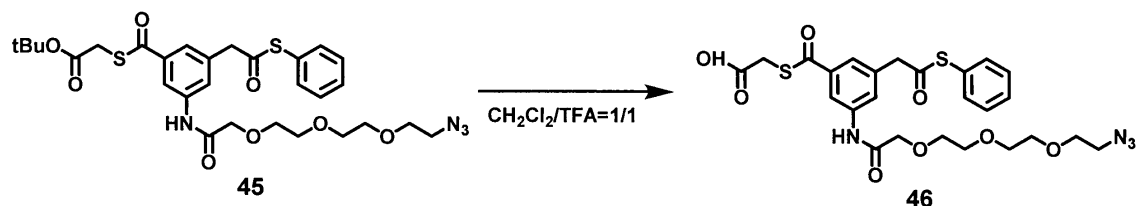
50

い、リンカー中間体 (45) を得た (350 mg、0.55 mmol)。

【0282】

(1-6-13) リンカー中間体 (46) の合成

【化58】



10

【0283】

リンカー中間体 (45) (350 mg、0.55 mmol) を $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}=1/1$ の混合溶媒に溶解し、室温で1時間攪拌した。LC/MSで反応を確認後、有機溶媒を除去し、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有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、リンカー中間体 (46) を得た (130.8 mg、0.23 mmol)。

【0284】

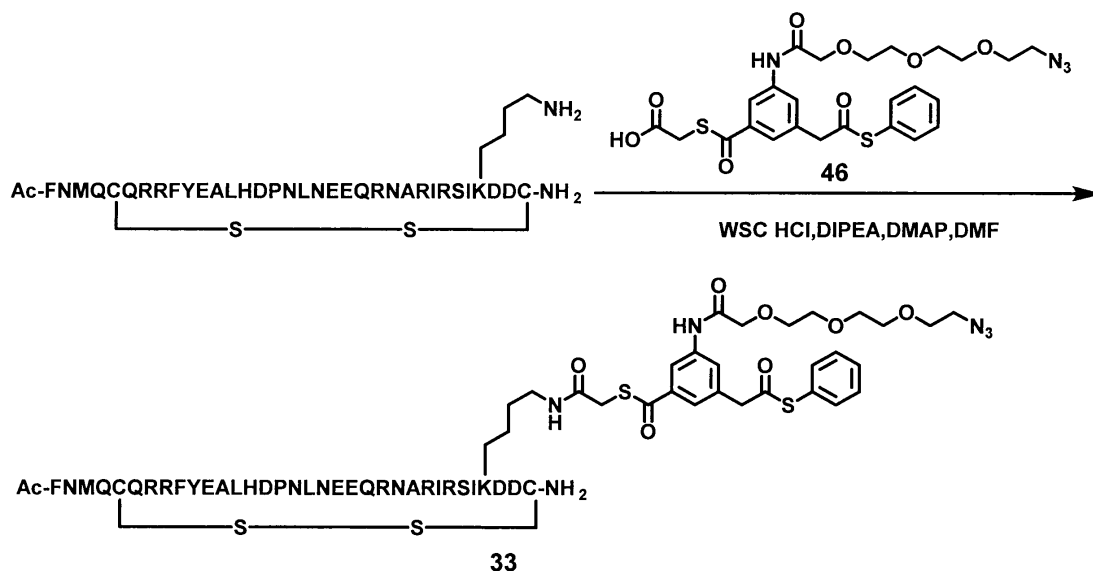
MS (ESI) m/z : $z=1$ 577.83 $[\text{M}+\text{H}]^+$

20

【0285】

(1-6-14) 修飾試薬 (33) の合成

【化59】



30

上記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。

40

【0286】

$\text{Ac-FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH}_2$ (配列番号4、30.0 mg、7.06 μmol 、ただし4番目と14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) とリンカー中間体 (46) 40.7 mg、70.6 μmol を DMF (1.00 mL) に溶解し、WSC $\cdot$ HCl (13.5 mg、70.6 μmol)、DIPEA (3.6 μL 、21.2 μmol) を加え、室温で2時間攪拌した。LC-MSで反応を確認後、0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタド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

50

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、修飾試薬 (33) を得た (4.1 mg、0.85 μmol)。

【0287】

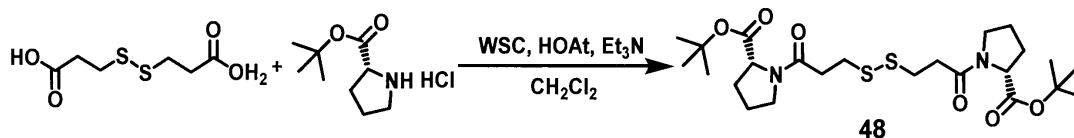
MS (ESI) m/z : $z = 3$ 802.50 $[M + 3H]^+$

【0288】

(1-7) 修飾試薬 (47) の合成

(1-7-1) リンカー中間体 (48) の合成

【化60】



3,3'-ジチオジプロピオン酸 (608 mg, 2.89 mmol) をジクロロメタン (15 mL) に溶解させ、D-プロリン tert-ブチル塩酸塩 (1.32 g, 6.36 mmol)、WSC・HCl (1.39 mg, 2.72 mmol)、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (78.7 mg, 0.578 mmol)、トリアチルアミン (2.00 mL, 14.5 mmol) を加え、室温にて終夜攪拌した。減圧下濃縮した後、酢酸エチルを加えて希釈し、水、食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムを加えた。フィルトレーションにより硫酸ナトリウムを除去した後、減圧下濃縮し、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 1:1) にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することにより、リンカー中間体 (48) を得た (1.06 g, 2.04 mmol)。

【0289】

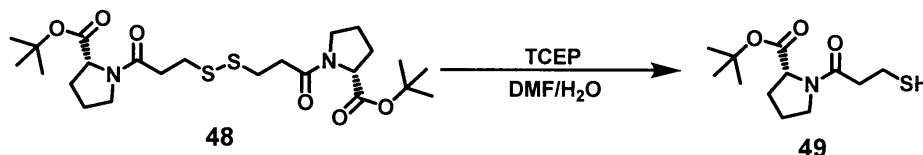
^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 4.40 (dd, $J = 8.6, 3.5$ Hz, 2H), 3.64–3.49 (m, $J = 8.5, 7.9$, 4H), 3.08–2.86 (m, 4H), 2.77 (td, $J = 8.1, 7.6, 3.3$ Hz, 4H), 2.23–1.87 (m, 8H), 1.68 (s, 2H), 1.47 (s, 16H), 1.40–1.24 (m, 2H), 0.90 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H)。

MS (ESI) m/z : 517 $[M + H]^+$

【0290】

(1-7-2) リンカー中間体 (49) の合成

【化61】



【0291】

リンカー中間体 (48) (1.06 g, 2.04 mmol) を DMF (5 mL) に溶解させ、水 (5 mL) に溶解したトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (760 mg, 2.65 mmol) を加え、室温にて終夜攪拌した後、反応液を酢酸エチルで希釈し、水、食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムを加えた。フィルトレーションにより硫酸ナトリウムを取り除き、減圧下濃縮した後、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 1:1) にて精製した。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リンカー中間体 (49) を得た (859 mg, 3.70 mmol)。

【0292】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 4.42 (dd, $J = 8.6, 3.5$ Hz, 1H), 3.70–3.56 (m, 2H), 3.52 (dt, $J = 9.6, 6.9$ Hz, 1H), 2.84 (pd, $J = 11.1, 9.7, 6.0$ Hz, 3H)

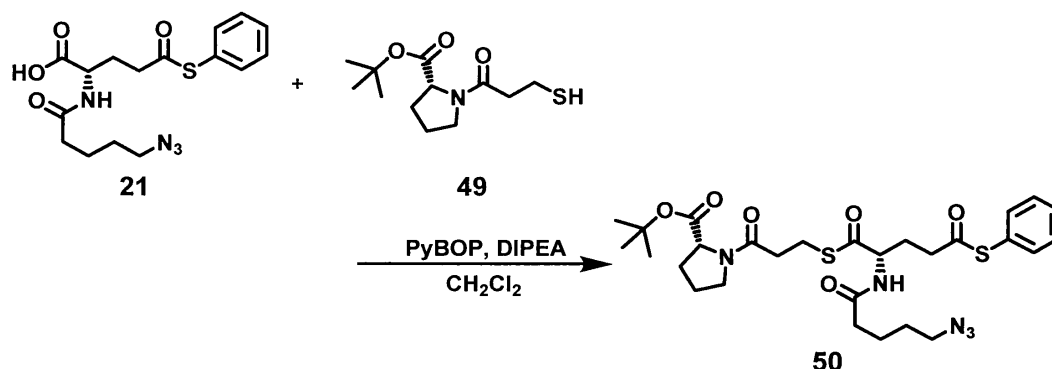
, 2.75–2.43 (m, 3H), 2.31–1.86 (m, 5H), 1.86–1.64 (m, 3H), 1.48 (s, 9H).

MS (ESI) m/z : 260 $[M+H]^+$

【0293】

(1-7-3) リンカー中間体 (50) の合成

【化62】



【0294】

リンカー中間体 (21) (52.4 mg, 0.144 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解させ、リンカー中間体 (49) (41.9 mg, 0.158 mmol)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ (89.9 mg, 0.173 mmol)、DIPEA (73.5 μL , 0.432 mmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。減圧下濃縮した後、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=1：1) にて精製した。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、リンカー中間体 (50) を得た (38.7 mg, 0.0639 mmol)。

【0295】

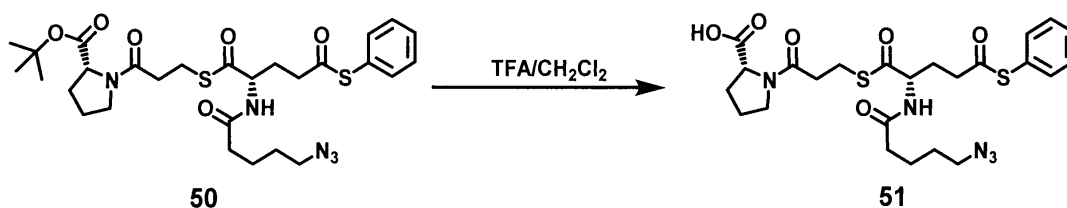
^1H NMR (400 MHz, CHloroform-d) δ 7.49–7.37 (m, 5H), 6.26 (q, $J=11.3, 9.5$ Hz, 1H), 4.72 (tt, $J=8.1, 3.9$ Hz, 1H), 4.39 (dd, $J=8.6, 3.3$ Hz, 1H), 3.67–3.40 (m, 2H), 3.31 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.20 (dt, $J=14.4, 7.1$ Hz, 2H), 2.92–2.40 (m, 4H), 2.30 (t, $J=6.9, 6.2$ Hz, 3H), 1.80–1.60 (m, 4H), 1.48 (d, $J=2.1$ Hz, 9H).

MS (ESI) m/z : 606 $[M+H]^+$

【0296】

(1-7-4) リンカー中間体 (51) の合成

【化63】



【0297】

リンカー中間体 (50) (38.7 mg, 0.0639 mmol) をジクロロメタン (5 mL) に溶解させ、トリフルオロ酢酸 (5 mL) を加えて、室温にて1時間攪拌した後、減圧下濃縮しジクロロメタンを除去し、水を加えて凍結乾燥することにより、リンカー中間体 (51) を得た (39.8 mg, 0.0639 mmol)。

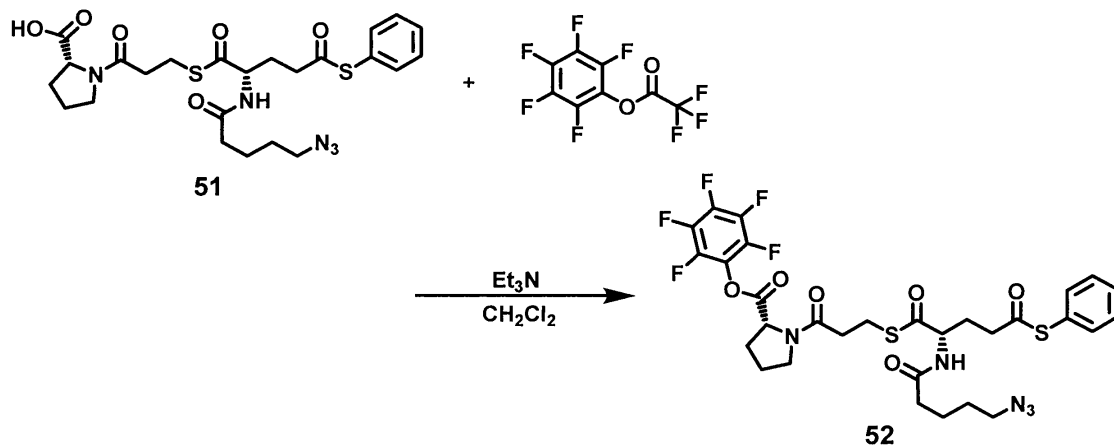
【0298】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.85 (s, 3H), 7.43 (q, $J=5.8, 4.9$ Hz, 5H), 6.82 (s, 1H), 4.80–4.48 (m, 2H), 3.78–3.40 (m, 2H), 3.31 (t, $J=6.5$ Hz, 2H), 3.19 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 2.94–2.51 (m, 4H), 2.41–2.22 (m, 4H), 2.22–1.87 (m, 4H), 1.68 (dp, $J=28.1, 7.3$ Hz, 4H).

【0299】

(1-7-5) リンカー中間体 (52) の合成

【化64】



【0300】

リンカー中間体 (51) (37.7 mg, 0.0686 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解させ、ペンタフルオロフェニルトリフルオロ酢酸 (23.4 mg, 0.137 mmol)、トリエチルアミン (28.6 μ L, 0.206 mmol) を加え、室温にて 1 h 攪拌した。減圧下濃縮した後、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1) にて精製した。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リンカー中間体 (52) を得た (37.4 mg, 0.0523 mmol)。

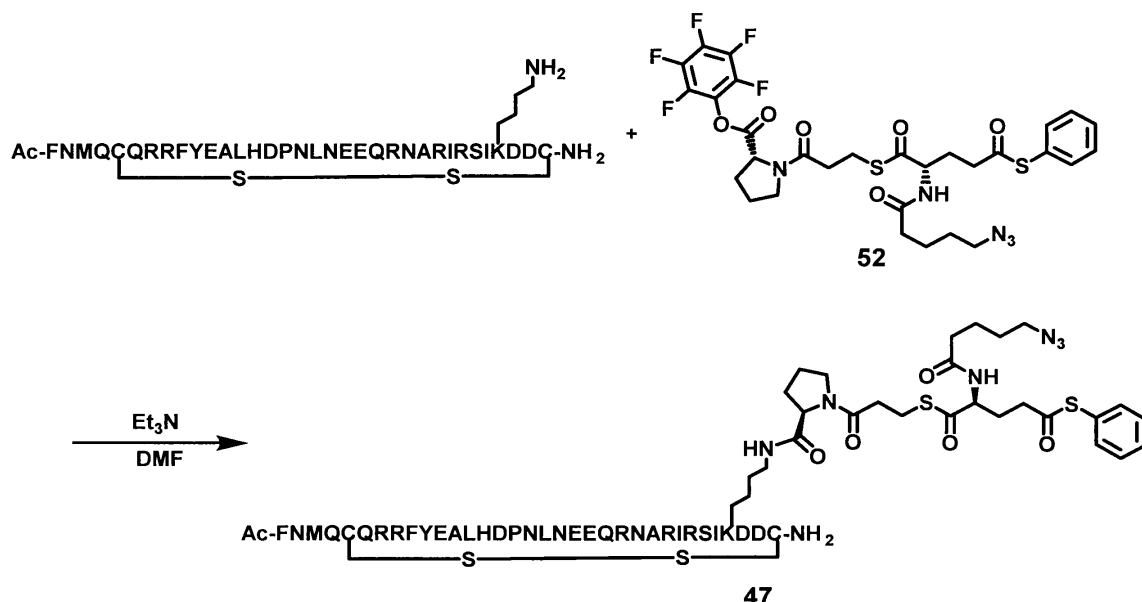
【0301】

MS (ESI) m/z : 716 [M+H]⁺

【0302】

(1-7-6) 修飾試薬 (47) の合成

【化 6 5】



上記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。

【0303】

Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂ のペプチド（配列番号4、22.2mg, 5.23μmol、ただし、5番目と35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している。）をDMF（374μL）に溶解し、リンカー中間体（52）（37.4mg, 52.3μmol）、トリエチルアミン（2.2μL, 0.0157mmol）を加え、室温にて3時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにより精製した。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、上記修飾試薬（47）（7.76mg, 1.62μmol）を得た。

【0304】

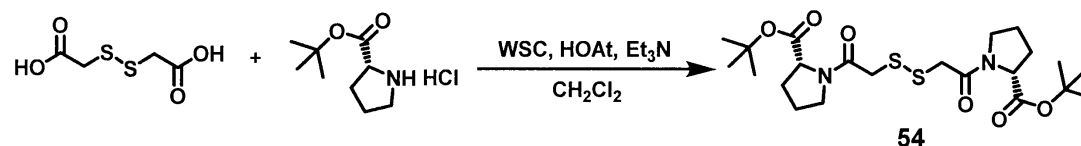
MS (ESI) m/z : z = 3 1595 [M + 3H]³⁺, z = 4 1196 [M + 4H]⁴⁺, z = 5 957 [M + 5H]⁵⁺, z = 6 798 [M + 6H]⁶⁺

【0305】

（1-8）修飾試薬（53）の合成

（1-8-1）リンカー中間体（54）の合成

【化 6 6】



【0306】

ジチオグリコール酸（613mg, 3.36mmol）をジクロロメタン（17mL）に溶解させ、D-プロリンtert-ブチル塩酸塩（1.53g, 7.40mmol）、WSC・HCl（1.61mg, 8.40mmol）、1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール（91.4mg, 0.672mmol）、トリアチルアミン（2.33mL, 16.8mmol）を加え、室温にて終夜攪拌した。減圧下濃縮した後、酢酸エチルを加えて希釈し、水、食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムを加えた。フィルトレーションにより硫酸ナトリウムを除去した後、減圧下濃縮し、カラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル=1：1）にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧濃縮することにより、リンカー中間体（54）を得た（1.09g, 2.23mmol）。

【0307】

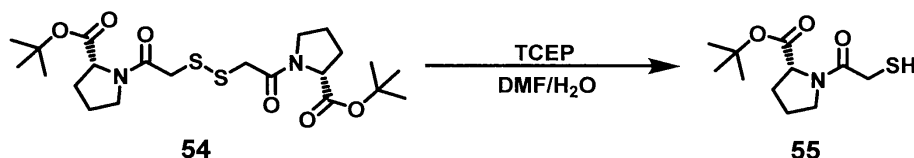
^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 4.39 (dt, $J=8.3, 3.6$ Hz, 2H), 3.79–3.60 (m, 8H), 2.35–2.14 (m, 2H), 2.14–1.85 (m, 6H), 1.47 (s, 18H).

MS (ESI) m/z : 489 $[\text{M}+\text{H}]^+$

【0308】

(1-8-2) リンカー中間体 (55) の合成

【化67】



10

【0309】

リンカー中間体 (54) (1.09 g, 2.23 mmol) を DMF (5 mL) に溶解させ、水 (5 mL) に溶解したトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (831 mg, 2.90 mmol) を加え、室温にて終夜攪拌した後、反応液を酢酸エチルで希釈し、水、食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムを加えた。フィルトレーションにより硫酸ナトリウムを取り除き、減圧下濃縮した後、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1) にて精製した。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リンカー中間体 (55) を得た (867 mg, 3.53 mmol)。

20

【0310】

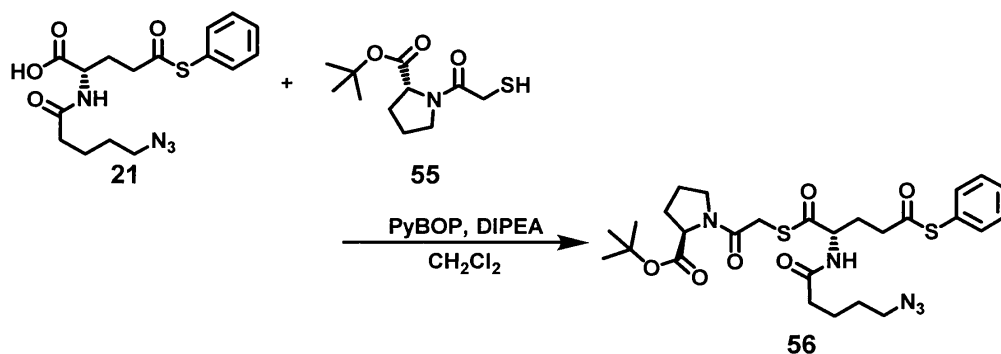
^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 4.39 (ddd, $J=14.0, 8.4, 3.1$ Hz, 1H), 3.77–3.53 (m, 2H), 3.39–3.24 (m, 2H), 2.33–2.06 (m, 2H), 2.06 (m, 2H), 1.49 (d, $J=4.5$ Hz, 9H).

MS (ESI) m/z : 246 $[\text{M}+\text{H}]^+$

【0311】

(1-8-3) リンカー中間体 (56) の合成

【化68】



30

40

【0312】

リンカー中間体 (21) (264 g, 0.723 mmol) をジクロロメタン (4 mL) に溶解させ、リンカー中間体 (55) (195 mg, 0.795 mmol)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ (452 mg, 0.868 mmol)、DIPEA (370 μ L, 2.17 mmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。減圧下濃縮した後、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1) にて精製した。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、リンカー中間体 (56) を得た (180 mg, 0.303 mmol)。

【0313】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.44 (p, $J=3.5$

50

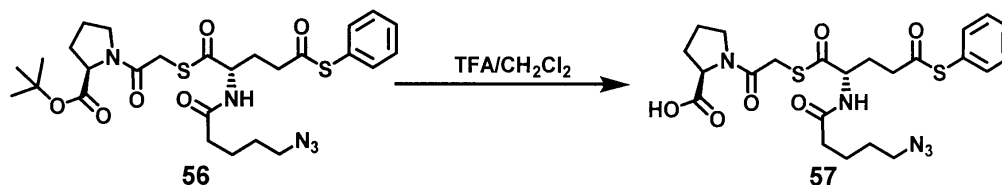
H z, 5 H), 6.52 (m, 1 H), 4.75 (td, $J=8.5$, 4.6 Hz, 1 H), 4.42 (ddd, $J=19.2$, 8.4, 3.3 Hz, 1 H), 3.80–3.49 (m, 4 H), 3.39–3.26 (m, 2 H), 2.94–2.67 (m, 2 H), 2.39–2.27 (m, 2 H), 2.27–1.87 (m, 3 H), 1.87–1.57 (m, 8 H), 1.47 (d, $J=3.2$ Hz, 9 H).

MS (ESI) m/z : 592 $[M+H]^+$

【0314】

(1-8-4) リンカー中間体 (57) の合成

【化69】



【0315】

リンカー中間体 (56) (180 mg, 0.303 mmol) をジクロロメタン (5 mL) に溶解させ、トリフルオロ酢酸 (5 mL) を加えて、室温にて1時間攪拌した後、減圧下濃縮しジクロロメタンを除去し、水を加えて凍結乾燥することにより、リンカー中間体 (57) を得た (172.6 mg, 0.322 mmol)。

【0316】

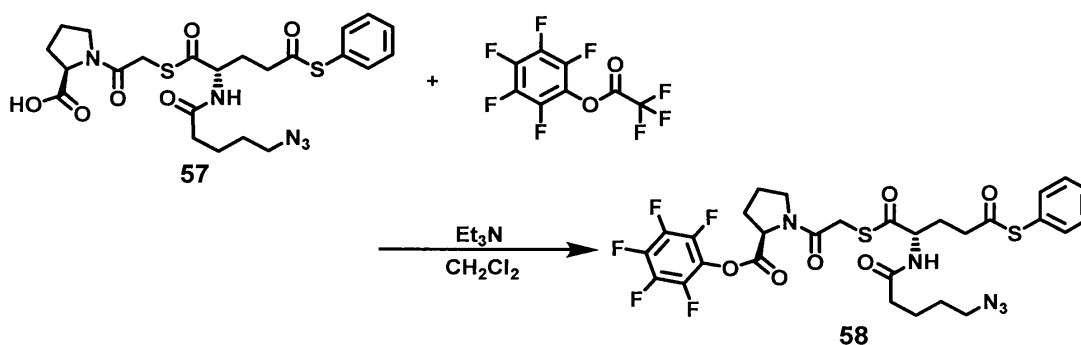
^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.43 (q, $J=5.7$, 4.7 Hz, 5 H), 4.71 (td, $J=8.7$, 4.7 Hz, 1 H), 4.53 (t, $J=5.7$ Hz, 1 H), 3.97–3.47 (m, 4 H), 3.32 (dt, $J=12.9$, 6.5 Hz, 2 H), 2.82 (qq, $J=15.4$, 7.4, 6.1 Hz, 2 H), 2.44–2.00 (m, 8 H), 1.87–1.59 (m, 4 H).

MS (ESI) m/z : 536 $[M+H]^+$

【0317】

(1-8-5) リンカー中間体 (58) の合成

【化70】



【0318】

リンカー中間体 (57) (172.6 mg, 0.322 mmol) をジクロロメタン (1.6 mL) に溶解させ、ペンタフルオロフェニルトリフルオロ酢酸 (110 mL, 0.644 mmol)、トリエチルアミン (134 μ L, 0.966 mmol) を加え、室温にて3 h 攪拌した。減圧下濃縮した後、カラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1) にて精製した。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リンカー中間体 (58) を得た (158.6 mg, 0.226 mmol)。

【0319】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.47–7.36 (m, 5 H), 6.59–6.40 (m, 1 H), 4.92–4.78 (m, 1 H), 4.73

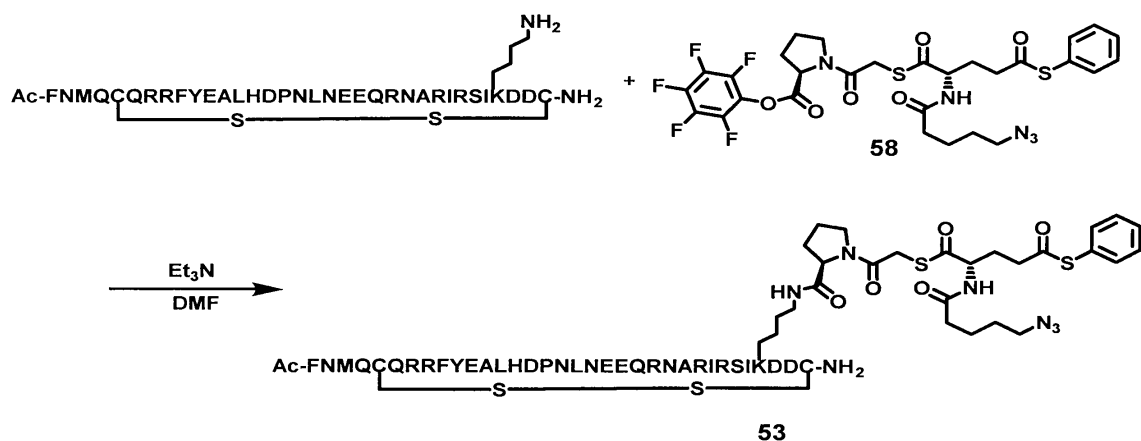
(t t, $J=7.6, 3.5 \text{ Hz}$, 1 H), 4.01–3.62 (m, 4 H), 3.31 (q d, $J=6.6, 2.8 \text{ Hz}$, 2 H), 2.99–2.68 (m, 2 H), 2.50–2.09 (m, 8 H), 1.84–1.56 (m, 4 H).

MS (ESI) m/z : 702 $[M+H]^+$

【0320】

(1-8-6) 修飾試薬 (53) の合成

【化71】



上記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。

【0321】

Ac-FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂のペプチド（配列番号4、96.1mg, 22.6 μmol、ただし、5番目と35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している。）をDMF（1.59mL）に溶解し、リンカー中間体（58）（159mg, 226 μmol）、トリエチルアミン（9.4 μL, 67.8 μmol）を加え、室温にて3時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにより精製した。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、上記修飾試薬（53）を得た（49.4mg, 10.4 μmol）。

【0322】

MS (ESI) m/z : $z=3$ 1590 $[M+3H]^{3+}$, $z=4$ 1193 $[M+4H]^{4+}$, $z=5$ 954 $[M+5H]^{5+}$, $z=6$ 795 $[M+6H]^{6+}$

【0323】

(1-9) 修飾試薬 (59) の合成

10

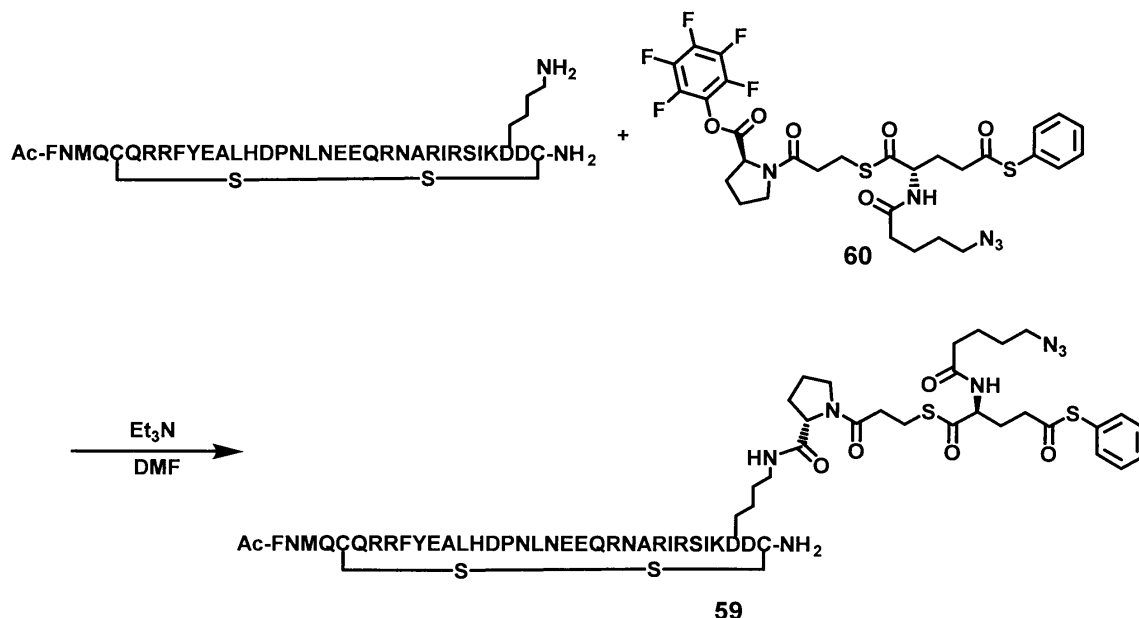
20

30

40

50

【化 7 2】



上記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。

【0324】

Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂ のペプチド（配列番号 4、24.5 mg, 5.77 μmol、ただし、5 番目と 35 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している。）を DMF（500 μL）に溶解し、実施例（1-7-5）のリンカー中間体（52）と同様の手法で レープロリン tert-ブチル塩酸塩より誘導したリンカー中間体（60）（41.3 mg, 57.7 μmol）、トリエチルアミン（2.40 μL, 17.3 mmol）を加え、室温にて 3 時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにより精製した。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、修飾試薬（59）（13.4 mg, 2.80 μmol）を得た。

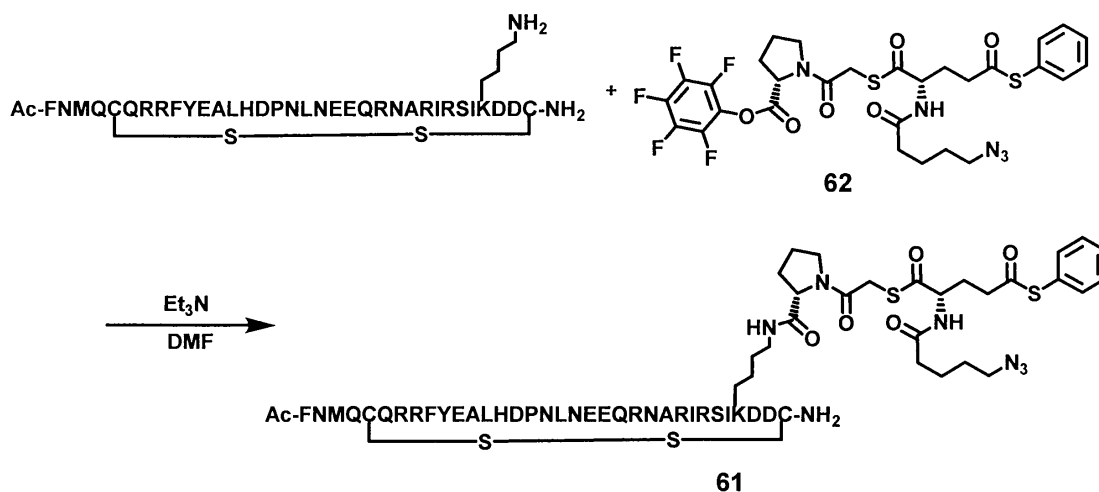
【0325】

MS (ESI) m/z : z = 4 1196 [M + 4H]⁴⁺, z = 5 957 [M + 5H]⁵⁺, z = 6 798 [M + 6H]⁶⁺

【0326】

（1-10）修飾試薬（61）の合成

【化 7 3】



上記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。

【0327】

Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂ のペプチド（配列番号4、14.0mg, 3.31μmol、ただし、5番目と35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している。）をDMF（300mL）に溶解し、実施例（1-8-5）のリンカー中間体（58）と同様の手法で L-プロリン tert-ブチル塩酸塩より誘導したリンカー中間体（62）（23.2mg, 33.1μmol）、トリエチルアミン（1.40μL, 9.93μmol）を加え、室温にて3時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにより精製した。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、上記修飾試薬（61）（6.6mg, 1.38μmol）を得た。

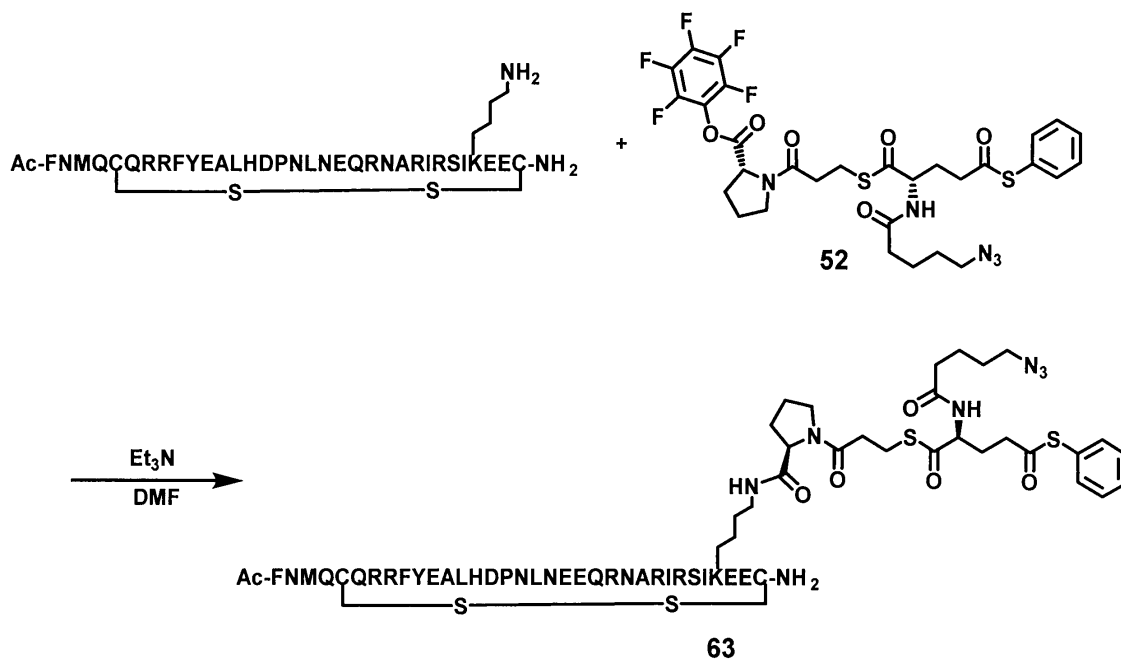
【0328】

MS (ESI) m/z: z=3 1590 [M+3H]³⁺, z=4 1193 [M+4H]⁴⁺, z=6 795 [M+6H]⁶⁺

【0329】

（1-11）修飾試薬（63）の合成

【化74】



上記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。

【0330】

Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC-NH₂ のペプチド（配列番号5、100mg, 23.4μmol、ただし、5番目と35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している。）をDMF（1002μL）に溶解し、リンカー中間体（52）（50.3mg, 70.2μmol）、トリエチルアミン（9.8μL, 70.2μmol）を加え、室温にて30分攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにより精製した。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、上記修飾試薬（63）を得た（63.7mg, 13.2μmol）。

【0331】

MS (ESI) m/z: z=3 1603 [M+3H]³⁺, z=4 1203 [M+4H]⁴⁺, z=5 963 [M+5H]⁵⁺

【0332】

（1-12）修飾試薬（64）の合成

10

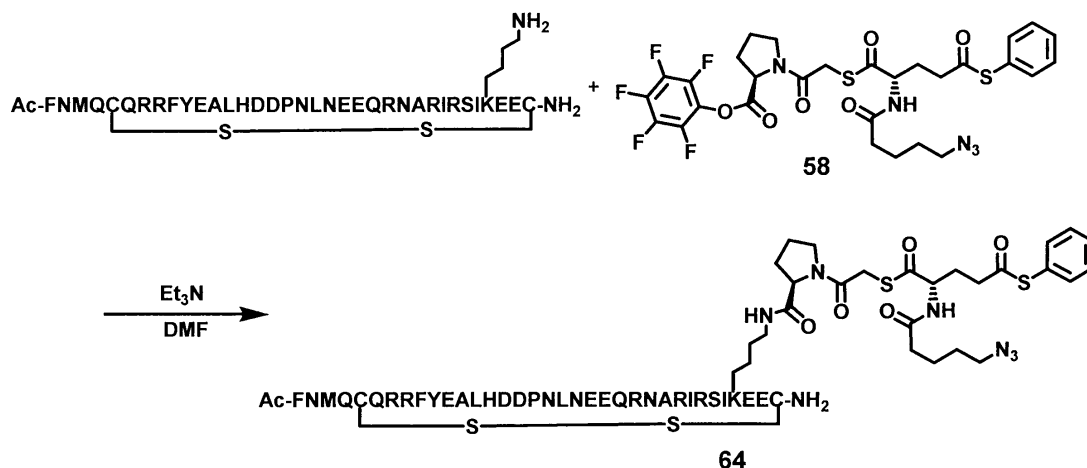
20

30

40

50

【化 7 5】



10

上記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。

【0333】

Ac-FNMQCQRRFYEALHDDPNLNEEQRNARIRSIKEEC-NH₂のペプチド（配列番号5、101mg、23.6μmol、ただし、5番目と35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している。）をDMF（1.01mL）に溶解し、リンカー中間体（58）（50.0mg、71.3μmol）、トリエチルアミン（9.9μL、71.3μmol）を加え、室温にて1.5時間攪拌した後、逆相分取クロマトグラフィーにより精製した。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、上記修飾試薬（64）を得た（61.2mg、12.8μmol）。

20

【0334】

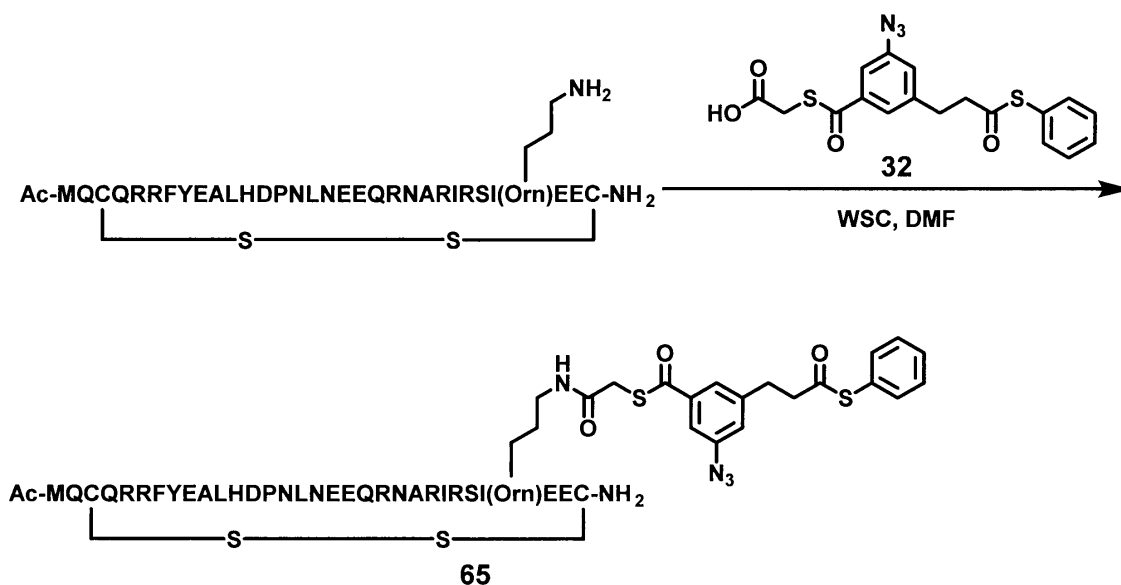
MS (ESI) m/z: z=3 1599 [M+3H]³⁺, z=4 1200 [M+4H]⁴⁺, z=5 960 [M+5H]⁵⁺, z=6 800 [M+6H]⁶⁺

【0335】

（1-13）修飾試薬（65）の合成

30

【化 7 6】



40

上記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。

【0336】

Ac-MQCQRRFYEALHDDPNLNEEQRNARIRSI(Orn)EEC

50

—NH₂（配列番号6、30.0mg、7.08μmol、ただし3番目と32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）とリンカー中間体（32）（28.4mg、70.8μmol）をDMF（1.00mL）に溶解し、WSC・HCl（13.6mg、70.8μmol）を加え、室温で2時間攪拌した。LC-MSで反応を確認後、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、上記ペプチドを得た（5.9mg、1.34μmol）。

【0337】

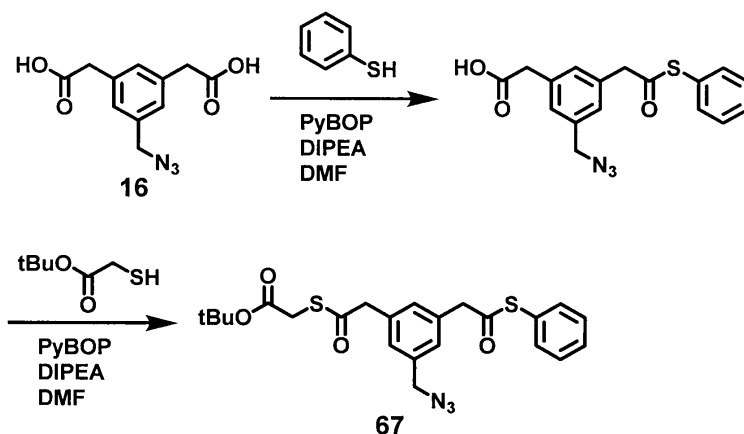
MS (ESI) m/z : z = 4 1098.20 [M + 3H]³⁺

【0338】

（1-14）修飾試薬（66）の合成

（1-14-1）リンカー中間体（67）の合成

【化77】



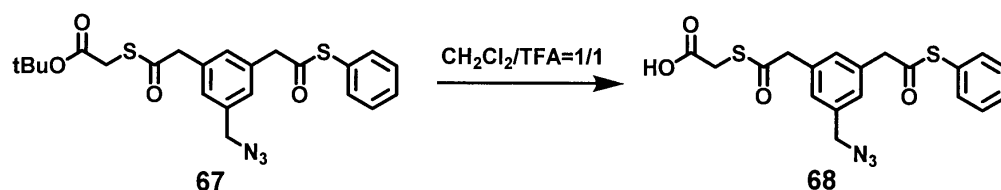
【0339】

実施例（1-3-5）で合成したリンカー中間体（16）（400mg、1.60mmol）をDMF（8.0mL）に溶解し、Benzenethiol（163μL、1.60mmol）、PyBOP（833mg、1.60mmol）、DIPEA（408μL、2.40mmol）を加え室温で1時間攪拌した。LC/MSで反応を確認後、tBu-2-Sulfanylacetate（237mg、1.60mmol）、PyBOP（833mg、1.60mmol）、DIPEA（408μL、2.40mmol）を加え室温で1時間攪拌した。LC/MSとTLC（ヘキサン／酢酸エチル＝3／1）で反応を確認後、酢酸エチルと水で抽出し、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＝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し、リンカー中間体（67）を得た。

【0340】

（1-14-2）リンカー中間体（68）の合成

【化78】



10

20

30

40

50

【0341】

リンカー中間体(67)を $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}=1/1$ の混合溶媒(10.0 mL)に溶解し、室温で1時間攪拌した。LC/MSとTLC(ジクロロメタン/メタノール=10/1)で反応を確認後、有機溶媒を除去した。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有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、リンカー中間体(68)を得た(162.9 mg、0.39 mmol)。

【0342】

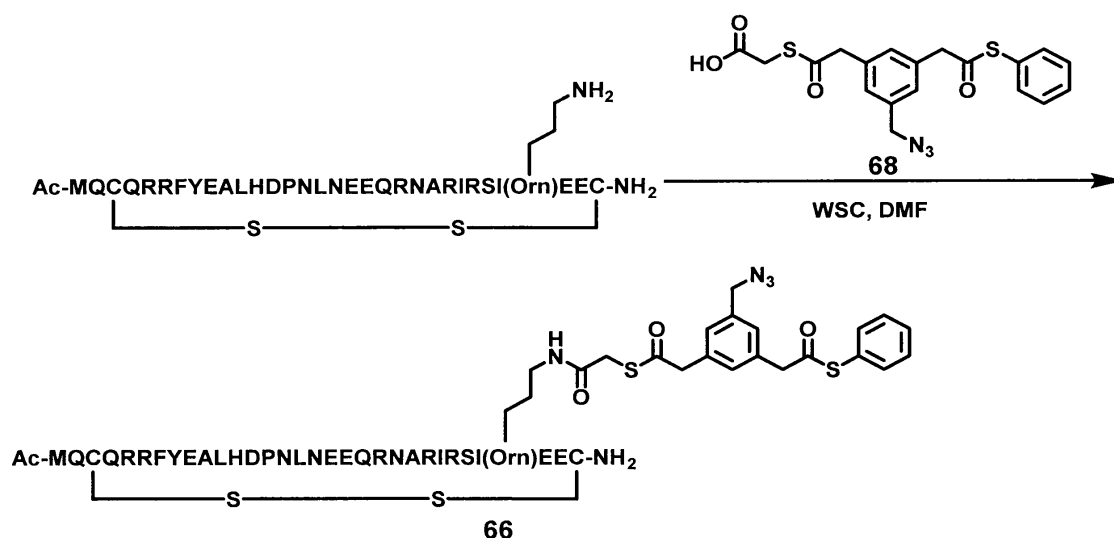
^1H NMR(400 MHz, Chloroform- d) δ = 7.39 (s, 5H), 7.23 (s, 2H), 7.19 (s, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.92 (d, J = 8.5, 4H), 3.72 (s, 2H).

MS (ESI) m/z : $z=1$ 402.29 $[\text{M}+\text{H}]^+$

【0343】

(1-14-3) 修飾試薬(66)の合成

【化79】



上記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。

【0344】

$\text{Ac-MQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSI(Orn)EEC-NH}_2$ (配列番号6、25.0 mg、6.2 μmol 、ただし3番目と32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)とリンカー中間体(68)(25.0 mg、62.0 μmol)をDMF(1.00 mL)に溶解し、WSC $\cdot$ HCl(11.9 mg、62.0 μmol)を加え、室温で2時間攪拌した。LC-MSで反応を確認後、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、修飾試薬(66)を得た(8.60 mg、1.95 μmol)。

【0345】

MS (ESI) m/z : $z=4$ 1101.70 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$

【0346】

[実施例2: 親和性物質を有する修飾試薬を用いた抗HER2抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(2-1) 親和性物質を有する修飾試薬を用いた抗HER2抗体トラスツズマブの修飾

(2-1-1) 修飾試薬(1、6、11)を用いた修飾反応

実施例（１－１－４）で合成した修飾試薬（１）を用いて、抗HER2抗体トラスツズマブの修飾反応を行った。修飾試薬（１）はDMFに溶解し30mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ（中外製薬）500μgを酢酸アンモニウムバッファー（pH 5.5）に溶解させ、DMF 6.88μL（5.0mg/mL）、30mMのペプチド試薬を1.12μL（抗体に対して10当量）、加え37℃で1時間攪拌しトラスツズマブーペプチド複合体（69）を得た。

【0347】

同様の手法にて修飾試薬（6）を用いて抗体修飾反応を行いトラスツズマブーペプチド複合体（70）を得た。

【0348】

同様の手法にて修飾試薬（11）を用いて抗体修飾反応を行いトラスツズマブーペプチド複合体（71）を得た。

【0349】

（2－1－2）修飾試薬（18）を用いた修飾反応

実施例（1－4－6）で合成した修飾試薬（18）を用いて、抗HER2抗体トラスツズマブの修飾反応を行った。修飾試薬（18）はDMFに溶解し10mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ（中外製薬）500μgを酢酸アンモニウムバッファー（pH 5.5）に溶解させ、DMF 6.88μL（5.0mg/mL）、10mMのペプチド試薬を3.3μL（抗体に対して10当量）加え室温で1時間攪拌しトラスツズマブーペプチド複合体（72）を得た。

【0350】

（2－1－3）修飾試薬（24、33、65、66）を用いた修飾反応

実施例（1－5－9）で合成した修飾試薬（24）はジメチルスルホキシドに溶解し20mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ（中外製薬）500μgを0.1M HEPESバッファー（pH 8.0）100μL（5.0mg/mL）または200μL（2.5mg/mL）に溶解させ、20mMのペプチド試薬を1.69μL（抗体に対して10当量）加え室温で1時間攪拌しトラスツズマブーペプチド複合体（73）を得た。

【0351】

同様の手法にて修飾試薬（33）を用いて抗体修飾反応を行いトラスツズマブーペプチド複合体（74）を得た。

【0352】

同様の手法にて修飾試薬（65）を用いて抗体修飾反応を行いトラスツズマブーペプチド複合体（75）を得た。

【0353】

同様の手法にて修飾試薬（66）を用いて抗体修飾反応を行いトラスツズマブーペプチド複合体（76）を得た。

【0354】

（2－1－4）修飾試薬（47、53、59、61、63、64）を用いた修飾反応

実施例（1－7－6）で合成した修飾試薬（47）はDMFに溶解し20mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ（中外製薬）500μgを50mM HEPESバッファー（pH 8.2）100μL（5.0mg/mL）に溶解させ、20mMのペプチド試薬を1.69μL（抗体に対して10当量）加え室温で1時間攪拌しトラスツズマブーペプチド複合体（77）を得た。

【0355】

同様の手法にて修飾試薬（53）を用いて抗体修飾反応を行いトラスツズマブーペプチド複合体（78）を得た。

【0356】

同様の手法にて修飾試薬（59）を用いて抗体修飾反応を行いトラスツズマブーペプチド複合体（79）を得た。

10

20

30

40

50

【0357】

同様の手法にて修飾試薬（61）を用いて抗体修飾反応を行いトラスツズマブーペプチド複合体（80）を得た。

【0358】

同様の手法にて修飾試薬（63）を用いて抗体修飾反応を行いトラスツズマブーペプチド複合体（81）を得た。

【0359】

同様の手法にて修飾試薬（64）を用いて抗体修飾反応を行いトラスツズマブーペプチド複合体（82）を得た。

【0360】

（2-2）ESI-TOFMSによる解析

トラスツズマブーペプチド複合体（69）のESI-TOFMS分析は既報（国際公開第2019/240287号（WO2019/240287A1））に従って行った。原料のトラスツズマブは148222にピークが観測された。反応生成物は修飾試薬（1）が2個導入された152915にピークが確認された。続いて、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1に示す。表1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。

【0361】

【表1】

表1

DAR Peak	Observed mass(Da)	Peak Area	%Area
1	150568.2	1.17E+005	12.3
2	152916.7	8.34E+005	87.7

【0362】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（70）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は修飾試薬（6）が2個導入された152945にピークが確認された。続いて、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1.7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1.7）の生成が確認された。

【0363】

【表2】

表2

DAR Peak	Observed mass(Da)	Peak Area	%Area
0	148219.5	1.01E+004	1.1
1	150581.7	2.52E+005	27.3
2	152944.0	6.62E+005	71.6

【0364】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（71）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は修飾試薬（11）が2個導入された152973にピークが確認された。続いて、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。

【0365】

【表 3】

表 3

DAR Peak	Observed mass(Da)	Peak Area	%Area
1	150597.2	2.12E+005	20.8
2	152972.5	8.05E+005	79.2

【0366】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体(72)のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は修飾試薬(18)が2個導入された153023にピークが確認された。続いて、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1.8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。

【0367】

【表 4】

表 4

DAR Peak	Observed mass(Da)	Peak Area	%Area
1	150875.3	1.22E+005	20.6
2	153021.75	4.70E+005	79.4

【0368】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体(73)のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は修飾試薬(24)が2個導入された157267にピークが確認された。続いて、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1.7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1.7)の生成が確認された。

【0369】

【表 5】

表 5

DAR Peak	Observed mass(Da)	Peak Area	%Area
1	152743.1	2.19E+005	25.5
2	157267.4	6.40E+005	74.5

【0370】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体(74)のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は修飾試薬(33)が2個導入された157619にピークが確認された。続いて、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1.5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1.5)の生成が確認された。

【0371】

【表 6】

表 6

DAR Peak	Observed mass(Da)	Peak Area	%Area
0	148222.7	1.40E+004	5.6
1	152921.0	1.18E+005	47.0
2	157618.7	1.19E+005	47.5
3	157618.7	1.50E+004	5.7

【0372】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（75）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は修飾試薬（65）が2個導入された161051にピークが確認された。続いて、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。

【0373】

【表7】

表 7

DAR Peak	Observed mass(Da)	Peak Area	%Area
1	152497.4	2.43E+004	3.6
2	156772.2	6.43E+005	96.4
3	161046.8	1.03E+005	1.5

10

【0374】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（76）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は修飾試薬（66）が2個導入された156802にピークが確認された。続いて、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1.5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1.5）の生成が確認された。

20

【0375】

【表8】

表 8

DAR Peak	Observed mass(Da)	Peak Area	%Area
1	148218.8	1.56E+004	3.5
2	152509.0	1.72E+005	38.8
3	156799.6	2.55E+005	57.7

30

【0376】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（77）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は修飾試薬（47）が2個導入された157567にピークが確認された。続いて、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。

【0377】

【表9】

表 9

DAR Peak	Observed mass(Da)	Peak Area	%Area
0	148496.65	2.33E+003	0.3
1	153047.95	1.41E+004	1.9
2	157563.95	6.70E+005	90.5
3	162405.95	5.42E+004	7.3

40

【0378】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（78）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は修飾試薬（53）が2個導入された157540にピークが確認された。続いて、DAR calculator（Agilent社ソフト）によりペプチド／抗体結

50

合比の確認を行った結果を表 10 に示す。表 10 の D A R peak と % A r e a 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。

【0379】

【表 10】

表 10

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
0	153043.55	6.37E+004	5.0
1	157538.5	1.16E+006	91.3
2	162201.65	4.68E+004	3.7

10

【0380】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（79）の E S I - T O F M S 分析を行い、反応生成物は修飾試薬（59）が 2 個導入された 157563 にピークが確認された。続いて、D A R c a l c u l a t o r（A g i l e n t 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 11 に示す。表 11 の D A R peak と % A r e a から算出された平均のペプチド／抗体結合比は 1.6 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 1.6）の生成が確認された。

【0381】

【表 11】

表 11

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
0	148223.05	1.17E+004	2.1
1	152891.95	1.98E+005	35.3
2	157559.55	3.43E+005	61.2
3	162228.2	7.86E+003	1.4

20

【0382】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（80）の E S I - T O F M S 分析を行い、反応生成物は修飾試薬（61）が 2 個導入された 157543 にピークが確認された。続いて、D A R c a l c u l a t o r（A g i l e n t 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 12 に示す。表 12 の D A R peak と % A r e a から算出された平均のペプチド／抗体結合比は 1.6 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 1.6）の生成が確認された。

【0383】

【表 12】

表 12

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
1	148384.45	1.14E+002	1.6
2	152880.25	2.56E+003	35.2
3	157537.05	4.60E+003	63.2

30

40

【0384】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（81）の E S I - T O F M S 分析を行い、反応生成物は修飾試薬（63）が 2 個導入された 152784 にピークが確認された。続いて、D A R c a l c u l a t o r（A g i l e n t 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 13 に示す。表 13 の D A R peak と % A r e a 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。

【0385】

50

【表 1 3】

表 1 3

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
1	153180.75	1.26E+004	1.4
2	157781.6	8.32E+005	91.7
3	162319	6.27E+004	6.9

【0 3 8 6】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（82）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は修飾試薬（64）が2個導入された157596にピークが確認された。続いて、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14に示す。表14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。

10

【0 3 8 7】

【表 1 4】

表 1 4

DAR Peak	Observed mass (Da)	Peak Area	%Area
1	153160.25	2.21E+003	0.2
2	157594.6	9.62E+005	96.7
3	162439.6	3.05E+004	3.0

20

【0 3 8 8】

（2-3）還元条件のESI-TOFMSによる重鎖選択性の確認

トラスツズマブーペプチド複合体（69）の還元条件によるESI-TOFMS分析は既報（国際公開第2019／240287号（WO2019／240287A1））に従って行った。原料のトラスツズマブは50594、50755に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、反応生成物は、重鎖にリンカーが導入された52917、53079、軽鎖に原料と同じ23439が確認された。

【0 3 8 9】

30

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（70）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は重鎖にリンカーが導入された52956、53118、軽鎖に原料と同じ23439が確認された。

【0 3 9 0】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（71）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は重鎖にリンカーが導入された52971、53133、軽鎖に原料と同じ23439が確認された。

【0 3 9 1】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（72）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は重鎖にリンカーが導入された52996、53157、軽鎖に原料と同じ23439が確認された。

40

【0 3 9 2】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（73）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は重鎖にリンカーが導入された55091、55253、軽鎖に原料と同じ23439が確認された。

【0 3 9 3】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（75）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は重鎖にリンカーが導入された54849、55010、軽鎖に原料と同じ23439が確認された。

【0 3 9 4】

50

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（76）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は重鎖にリンカーが導入された54888、55050、軽鎖に原料と同じ23439が確認された。

【0395】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（77）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は重鎖にリンカーが導入された55268、55430、軽鎖に原料と同じ23439が確認された。

【0396】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（78）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は重鎖にリンカーが導入された55254、55416、軽鎖に原料と同じ23439が確認された。

10

【0397】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（81）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は重鎖にリンカーが導入された55296、55458、軽鎖に原料と同じ23439が確認された。

【0398】

同様にトラスツズマブーペプチド複合体（82）のESI-TOFMS分析を行い、反応生成物は重鎖にリンカーが導入された55281、55443、軽鎖に原料と同じ23439が確認された。

【0399】

【実施例3：トラスツズマブー親和性物質複合体のリンカー切断反応およびそのESI-TOFMSによる解析】

20

（3-1）トラスツズマブー親和性物質複合体のリンカー切断反応

トラスツズマブーペプチド複合体（69）を用いて、既報（国際公開第2019／240287号（WO2019／240287A1））に従って、ヒドロキシアミン塩酸塩を用いてリンカー切断反応を行い、アジド導入抗体（83）を得た。

【0400】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（70）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（84）を得た。

【0401】

30

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（71）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（85）を得た。

【0402】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（72）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（86）を得た。

【0403】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（73）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（87）を得た。

【0404】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（74）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（88）を得た。

40

【0405】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（75）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（87）を得た。

【0406】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（76）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（89）を得た。

【0407】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（77）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（90）を得た。

50

【0408】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（78）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（90）を得た。

【0409】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（79）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（90）を得た。

【0410】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（80）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（90）を得た。

【0411】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（81）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（90）を得た。

【0412】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（82）のリンカー切断反応をヒドロキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（90）を得た。

【0413】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（72）のリンカー切断反応をメトキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（91）を得た。

【0414】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（77）のリンカー切断反応をメトキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（92）を得た。

【0415】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（78）のリンカー切断反応をメトキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（92）を得た。

【0416】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（79）のリンカー切断反応をメトキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（92）を得た。

【0417】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（80）のリンカー切断反応をメトキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（92）を得た。

【0418】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（81）のリンカー切断反応をメトキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（92）を得た。

【0419】

同様の手法にてトラスツズマブーペプチド複合体（82）のリンカー切断反応をメトキシアミン塩酸塩を用いて行い、アジド導入抗体（92）を得た。

【0420】

（3-2）ESI-TOFMSによる解析

アジド導入抗体（84）のESI-TOFMS分析は既報（国際公開第2019／240287号（WO2019／240287A1））に従って行い、リンカーが切断された148657にピークにピークを確認した。

【0421】

同様にアジド導入抗体（85）のESI-TOFMS分析を行い、リンカーが切断された148712にピークを確認した。

【0422】

同様にアジド導入抗体（86）のESI-TOFMS分析を行い、リンカー切断が進行した148755にピークを確認した。

【0423】

同様にアジド導入抗体（87）のESI-TOFMS分析を行い、リンカー切断が進行した148679にピークを確認した。

10

20

30

40

50

【0424】

同様にアジド導入抗体（89）のESI-TOFMS分析を行い、リンカー切断が進行した148706にピークを確認した。

【0425】

同様にアジド導入抗体（90）のESI-TOFMS分析を行い、リンカー切断が進行した148775にピークを確認した。

【0426】

同様にアジド導入抗体（91）のESI-TOFMS分析を行い、リンカー切断が進行した148779にピークを確認した。

【0427】

同様にアジド導入抗体（92）のESI-TOFMS分析を行い、リンカー切断が進行した148790にピークを確認した。

【0428】

[実施例4：トラスツズマブの位置特異的アジド導入体と任意の化合物とのコンジュゲーションおよび生成物のESI-TOFMS解析]

（4-1）アジド導入抗体と蛍光物質とのコンジュゲーション

既報（国際公開第2019/240287号（WO2019/240287A1）および国際公開第2019/240288号（WO2019/240288A1））に従って、アジド導入抗体（83）に対して、Carboxyrhodamine 110-PEG4-DBCO（Broadpharm社製）を加え、ADC mimic（93）を得た。

【0429】

同様の手法にてアジド導入抗体（84）よりADC mimic（94）を得た。

【0430】

同様の手法にてアジド導入抗体（85）よりADC mimic（95）を得た。

【0431】

同様の手法にてアジド導入抗体（86）よりADC mimic（96）を得た。

【0432】

同様の手法にてアジド導入抗体（87）よりADC mimic（97）を得た。

【0433】

同様の手法にてアジド導入抗体（88）よりADC mimic（98）を得た。

【0434】

同様の手法にてアジド導入抗体（89）よりADC mimic（99）を得た。

【0435】

同様の手法にてアジド導入抗体（90）よりADC mimic（100）を得た。

【0436】

同様の手法にてアジド導入抗体（91）よりADC mimic（101）を得た。

【0437】

同様の手法にてアジド導入抗体（92）よりADC mimic（102）を得た。

【0438】

同様の手法にて、アジド導入抗体（83）に対して、DBCO-MMAE（Abzena社製）と反応させた、ADC（103）を得た。

【0439】

同様の手法にて、アジド導入抗体（86）に対して、DBCO-MMAE（Abzena社製）と反応させた、ADC（104）を得た。

【0440】

同様の手法にて、アジド導入抗体（91）に対して、DBCO-MMAE（Abzena社製）と反応させた、ADC（105）を得た。

【0441】

以上より、本発明の化合物またはその塩は、DARに優れる抗体薬物複合体の作製に有

10

20

30

40

50

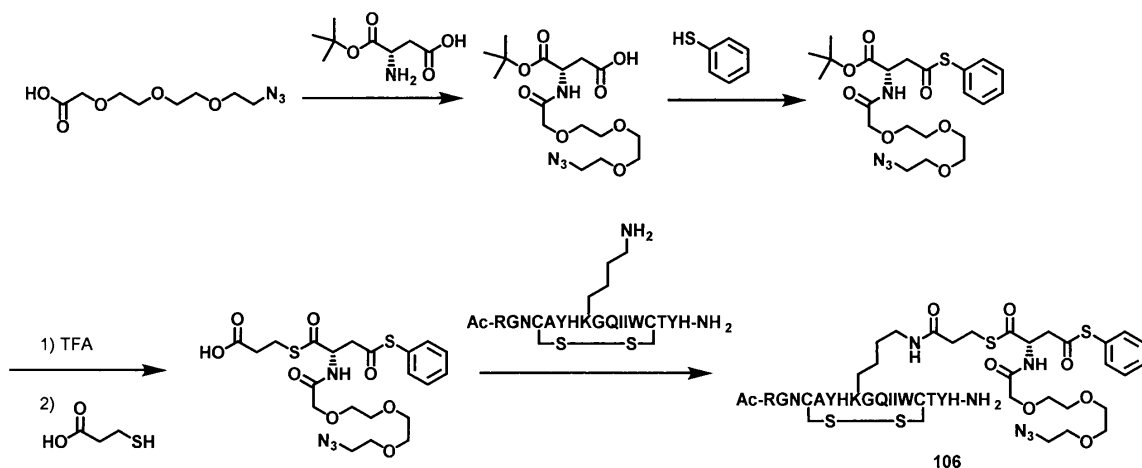
用であることが確認された。

【0442】

(参考例1) 修飾試薬(106)の合成と、ADC mimic(107)への誘導

修飾試薬(106)は下記のように合成し、実施例2に従って抗HER2抗体トラスツズマブと反応させたのち、実施例3に従ってリンカーを切断し、実施例4に従ってCarboxyrhodamine 110-PEG4-DBCO(Broadpharm社製)と反応させてADC mimic(107)を得た。

【化80】



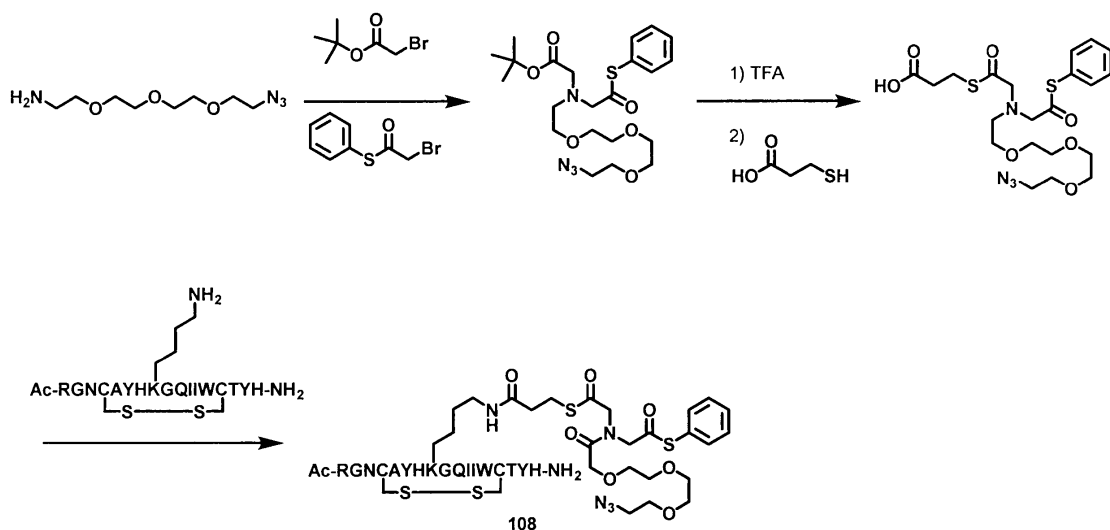
上記アミノ酸配列はいずれも、配列番号2のアミノ酸配列である。

【0443】

(参考例2) 修飾試薬(108)の合成と、ADC mimic(109)への誘導

修飾試薬(108)は下記のように合成し、実施例2に従って抗HER2抗体トラスツズマブと反応させたのち、実施例3に従ってリンカーを切断し、実施例4に従ってCarboxyrhodamine 110-PEG4-DBCO(Broadpharm社製)と反応させてADC mimic(109)を得た。

【化81】



上記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。

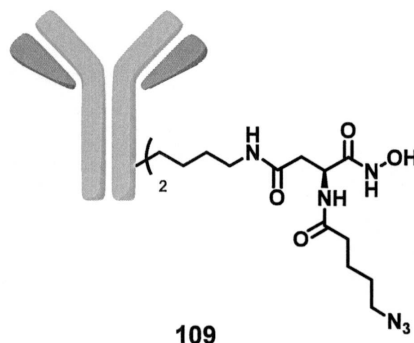
【0444】

(参考例3) アジド抗体(111)を用いた修飾反応およびその解析

既報(国際公開第2019/240287号(WO2019/240287A1))に記載の下記のアジド抗体(111)を実施例4に従ってCarboxyrhodamine 110-PEG4-DBCO(Broadpharm社製)と反応させてADC mim

i c (112) を得た。また、同様に DBCO-MMAE (Abzena 社製) と反応させて ADC (113) を得た。

【化 82】



【0445】

【実施例 5：ラット血漿を用いた安定性試験による ADC mimic の評価】

各種 ADC mimic の血中安定性は下記のように、ラット血中で ADC mimic をインキュベーションした際に ADC mimic より脱落した蛍光分子の量を解析することで評価した。

【0446】

(5-1) 血漿中安定性試験

ラット血漿 (Charles River 社製) 700 μ L に対し、0.1 mg/mL の濃度になるように ADC mimic を加えたのち滅菌ろ過を行った。この溶液を 6 本のエッペンチューブに 50 μ L ずつ分注した。6 本のサンプルのうち 3 本は、37 $^{\circ}$ C に設定したインキュベーターで 4 日間保管した。残りの 3 本は -80 $^{\circ}$ C の冷凍庫の中で同様に 4 日間保管した。各サンプルにアセトニトリルを 100 μ L ずつ加えてボルテックスで攪拌したのち遠心分離を行うことで、沈殿物を得た。生じた上澄み溶液を回収し、HPLC 分析を行った。

【0447】

(5-2) HPLC 分析を用いた、脱落した蛍光分子の量の解析

測定は、液体クロマトグラフィー／蛍光検出法を用いて、ADC mimic から脱落した蛍光分子量を測定した。実施例 5-1 で冷凍庫保管した 3 本のサンプルを Day = 0 のものとし、実施例 5-1 で 37 $^{\circ}$ C 保管した 3 本のサンプルを Day = 4 のものとし、Day = 4 と Day = 0 の蛍光強度の差分を解析した。

【0448】

結果は下記の表の通り評価した。コントロールとして、実施例 16 (1) で合成した ADC mimic を用いて実施例化合物の蛍光強度を比較することにより、上昇量の比を、下記式を用いて算出した。上昇量の比が低いほど、血漿中安定性が高いことを示す。

【0449】

実施例 ADC mimic より脱落した蛍光分子の蛍光強度の上昇量 = { (Day = 4 の蛍光強度) - (Day = 0 の蛍光強度) }

【0450】

コントロール ADC mimic より脱落した蛍光分子の蛍光強度の上昇量 = { (Day = 4 の蛍光強度) - (Day = 0 の蛍光強度) }

【0451】

別途 Carboxyrhodamine 110-PEG4-DBCO を用いて、HPLC による蛍光強度のエリア面積と、濃度の相関を算出した。その算出式を用いて上記各 ADC mimic の蛍光強度の上昇量を濃度に変換した。Day 0 の濃度を 100% としたときの、前述の上昇量の濃度の割合を脱落率として算出した。

【0452】

10

20

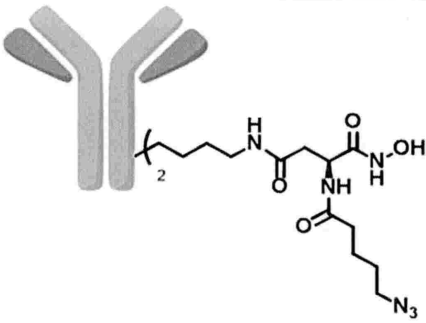
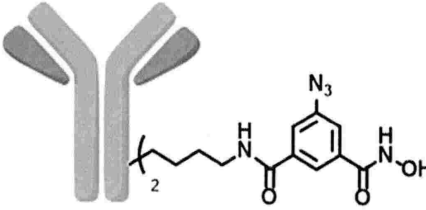
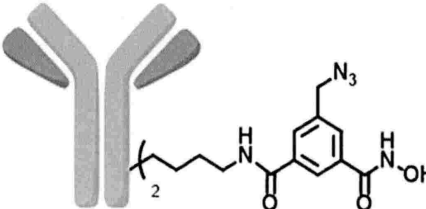
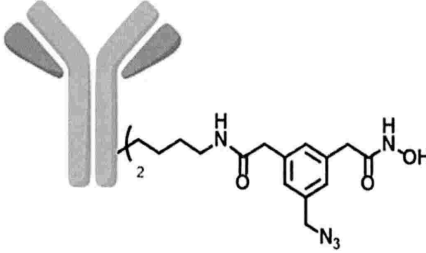
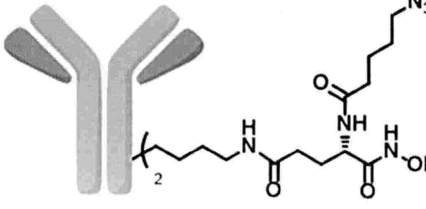
30

40

50

【表 1 5】

表 1 5 . ADC mimicを用いた血漿中安定性試験結果 (その 1)

ADC mimic の番号	コンジュゲー ション部位	アジド前駆体の構造	Day=4におけ る蛍光分子の 脱落率
1 1 1	Lys246/248		2 1 %
93	Lys246/248		< 3 %
94	Lys246/248		< 3 %
95	Lys246/248		< 3 %
96	Lys246/248		< 3 %

【 0 4 5 3】

10

20

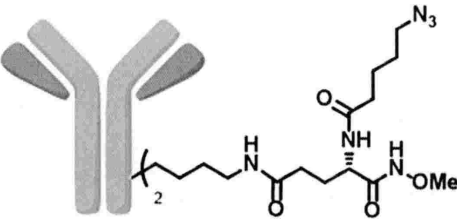
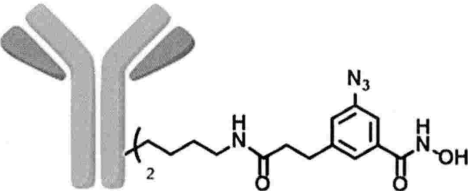
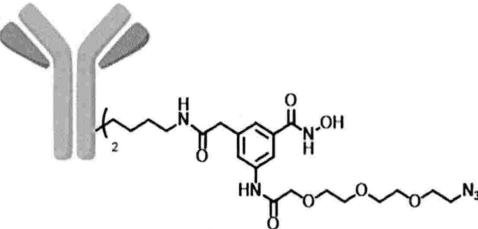
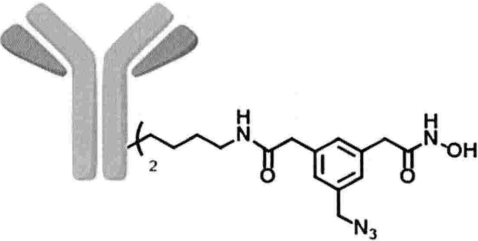
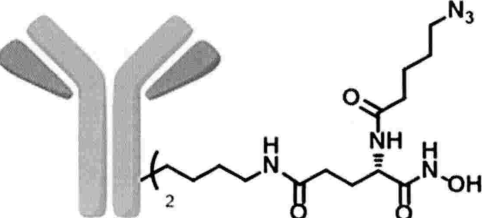
30

40

50

【表 1 6】

表 1 6 . ADC mimicを用いた血漿中安定性試験結果 (その 2)

ADC mimic の番号	コンジュゲー ション部位	アジド前駆体の構造	Day=4におけ る蛍光分子の 脱落率
101	Lys246/248		< 3 %
97	Lys288/290		< 3 %
98	Lys288/290		< 3 %
99	Lys288/290		< 3 %
100	Lys288/290		< 3 %

【 0 4 5 4】

10

20

30

40

50

【表 1 7】

表 1 7. ADC mimicを用いた血漿中安定性試験結果（その 3）

ADC mimic の番号	コンジュゲー ション部位	アジド前駆体の構造	Day=4におけ る蛍光分子の 脱落率
102	Lys288/290		< 3 %
107 (比較例1)	Lys246/248		2 0 %
109 (比較例2)	Lys246/248		1 6 %

比較例 1（1 0 7）、比較例 2（1 0 9）は、M（Mに隣接するC＝O中の炭素原子とC＝W中の炭素原子を、炭素原子数 3～5 個からなる主鎖部分で連結する 3 価の基）に該当しない。比較例 1、2 は、炭素原子数 3～5 個ではなく、炭素原子数 2 個からなる主鎖部分（比較例 1）、炭素原子数 2 個および窒素原子 1 個からなる主鎖部分（比較例 2）で連結するためである。

【 0 4 5 5】

その結果、実施例 3 で合成した ADC mimic は安定であり。比較例 1，2 で合成した ADC mimic は不安定という結果になった（表 1 5～1 7）。

【 0 4 5 6】

【実施例 6：ラット血漿を用いた安定性試験による ADC の評価】

各種 ADC の血中安定性は実施例 5 に従って行った。

【 0 4 5 7】

（ 6－1）血漿中安定性試験

ラット血漿を用いて実施例 5－1 と同様に、実施例 4－1 と比較例 2 で合成した ADC をインキュベーションし、冷凍庫保管した 3 本のサンプルと 3 7℃保管した 3 本のサンプルをそれぞれの ADC に対して準備した。

【 0 4 5 8】

(6-2) HPLC分析を用いた、脱落したペイロードの量を解析

測定は、液体クロマトグラフィー質量分析法（タンデム質量分析法を含む）を用いて、脱落したペイロード量を測定した。実施例6-1で冷凍庫保管した3本のサンプルをDay=0のものとし、実施例6-1で37℃保管した3本のサンプルをDay=4のものとし、Day=4とDay=0の検出されたペイロードのMS強度を抽出イオンクロマトグラムによってそれぞれ算出し、それらの差分を解析した。

【0459】

既報（国際公開第2019/240287号（WO2019/240287A1））に記載のアジド抗体（109）より合成したADC（112）にくらべ、実施例4で合成したADC（103）～（105）は安定であり、実施例5のADC mimicの比較検討結果と同様であった。

10

【0460】

〔実施例6：アジド導入抗体の位置選択性の確認〕

（4-1）で得られたトラスツズマブ・アジド導入体について、下記工程でペプチドマッピングを行った。

【0461】

（6-1）トラスツズマブ・アジド導入体（86）のペプチドマッピング

既報（国際公開第2019/240288号（WO2019/240288A））に従って、トラスツズマブ・アジド導入体（86）のペプチドマッピングを実施した。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アジド修飾を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、THTCPCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRのペプチドフラグメントが観測された。また、BioPharma Finderでの解析により、EU numberingにおける246位もしくは248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。

20

この結果より、上記（4-1）で得られたトラスツズマブ・アジド導入体（86）では、抗体の重鎖上、EU numberingにおけるLys246およびLys248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。

【0462】

（6-2）トラスツズマブ・アジド導入体（91）のペプチドマッピング

（6-1）と同様にして（4-1）で得られたトラスツズマブ・アジド導入体（91）のペプチドマッピングを実施した。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アジド修飾を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、THTCPCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRのペプチドフラグメントが観測された。また、BioPharma Finderでの解析により、EU numberingにおける246位もしくは248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。

30

【0463】

（6-3）トラスツズマブ・アジド導入体（90）のペプチドマッピング

既報（国際公開第2019/240288号（WO2019/240288A））に従って、トラスツズマブ・アジド導入体（90）のペプチドマッピングを実施した。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アジド修飾を含むアミノ酸18残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPRのペプチドフラグメントが観測された。また、BioPharma Finderでの解析により、EU numberingにおける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。

40

この結果より、上記（4-1）で得られたトラスツズマブ・アジド導入体（90）では、抗体の重鎖上、EU numberingにおけるLys288およびLys290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。

【0464】

（6-4）トラスツズマブ・アジド導入体（92）のペプチドマッピング

50

(6-1)と同様にして(4-1)で得られたトラスツズマブ・アジド導入体(92)のペプチドマッピングを実施した。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アジド修飾を含むアミノ酸18残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPRのペプチドフラグメントが観測された。また、BioPharma Finderでの解析により、EU numberingにおける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。

この結果より、上記(4-1)で得られたトラスツズマブ・アジド導入体(92)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。

【0465】

実施例7：IgG1 Fc親和性ペプチド試薬によるIgG1 Fc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

(7-1)抗HER2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アジド基導入抗体誘導体の製造

実施例(3-1)で合成したアジド導入抗体(91)を50mMのHEPESバッファー(pH8.2)に置換した。この溶液に対して、実施例(1-14)で合成した修飾試薬(64)を抗体に対して10当量加えて、室温で3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。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、(3-1)で合成したアジド導入抗体に対して結合性ペプチドが2個導入された158, 319のピークが確認された。

この結果より、本実施例(7-1)で得られた抗体は、抗体における2つの重鎖上、EU numberingにおける246位もしくは248位のリジン残基および288位もしくは290位のリジン残基の修飾を含むことが確認された。

【0466】

(7-2)抗HER2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アジド基導入抗体誘導体の製造

実施例(3-1)の手法にて実施例(7-1)で得た抗体-ペプチド複合体のリンカー切断反応を、メトキシアミン塩酸塩を用いて行ってアジド導入抗体を得た。得られたアジド抗体のESI-TOFMS分析を行い、リンカー切断が進行し、抗体に対して4つのアジド基が導入された149, 350にピークを確認した。

この結果より、本実施例(7-2)で得られた抗体は、抗体における2つの重鎖上、EU numberingにおける246位もしくは248位のリジン残基および288位もしくは290位のリジン残基の側鎖に導入された4つのアジド基(アジド基/抗体結合比=4)を含むことが確認された。

【0467】

(7-3) DAR=4のADC合成

実施例(4-1)と同様の手法にて、実施例(7-2)で得たアジド導入抗体に対して、DBCO-MMAE(Abzena社製)と反応させ、ADCを得た。

よって、本実施例(7-2)で得られた抗体は、抗体における2つの重鎖上、EU numberingにおける246位もしくは248位のリジン残基および288位もしくは290位のリジン残基の側鎖に導入された4つの薬物(DAR=4)を含むことが確認された。

10

20

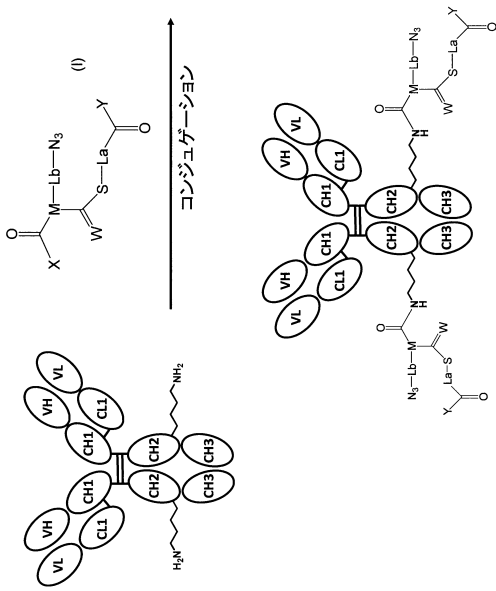
30

40

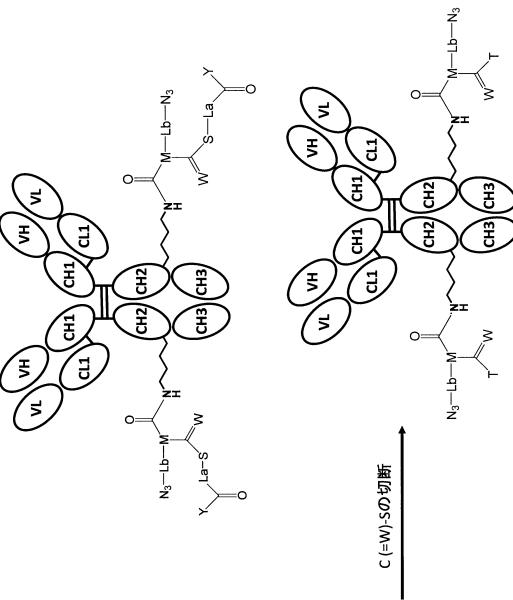
50

【図面】

【図 1】



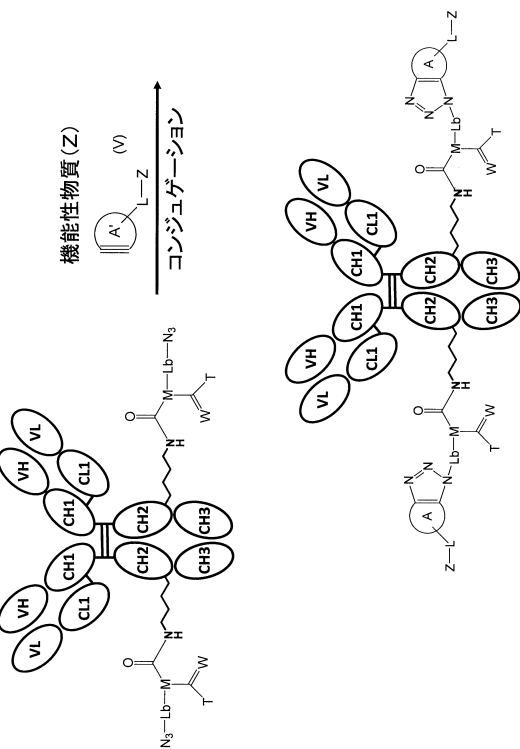
【図 2】



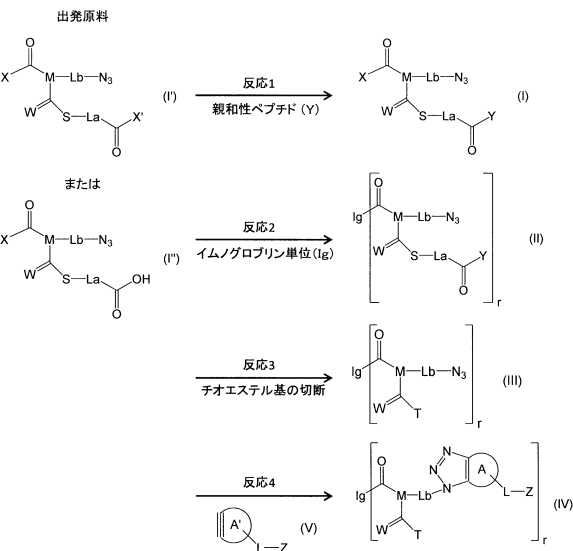
10

20

【図 3】



【図 4】



30

40

50

【配列表】
0007605290000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 C 247/12 (2006.01)

F I

C 0 7 C 247/12

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 畑田 紀子

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 嵐田 直子

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 坂崎 恵美子

(56)参考文献

国際公開第2019/240287 (WO, A1)

国際公開第2018/199337 (WO, A1)

YAMADA Kei et al., AJICAP: Affinity Peptide Mediated Regiodivergent Functionalization of Native Antibodies, Angewandte Chemie International Edition, 2019年, Vol.58, p.5592-5597, doi:10.1002/anie.201814215

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 7/08

C 0 7 K 16/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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