

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7670072号
(P7670072)

(45)発行日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(24)登録日 令和7年4月21日(2025.4.21)

(51)国際特許分類	F I		
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	Z N A	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L	
C 0 7 D 225/08 (2006.01)	C 0 7 D 225/08	C S P	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
請求項の数 15 (全106頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2022-575671(P2022-575671)	(73)特許権者	000000066
(86)(22)出願日	令和4年1月18日(2022.1.18)		味の素株式会社
(86)国際出願番号	PCT/JP2022/001617		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(87)国際公開番号	WO2022/154127	(74)代理人	110002860
(87)国際公開日	令和4年7月21日(2022.7.21)		弁理士法人秀和特許事務所
審査請求日	令和7年1月17日(2025.1.17)	(72)発明者	藤井 友博
(31)優先権主張番号	特願2021-5763(P2021-5763)		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
(32)優先日	令和3年1月18日(2021.1.18)	(72)発明者	山田 慧
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
早期審査対象出願		(72)発明者	松田 豊
			神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
		(72)発明者	平間 竜介
			最終頁に続く

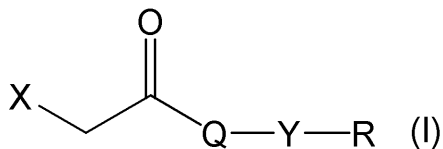
(54)【発明の名称】 化合物またはその塩、およびそれらにより得られる抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式(I)：

【化1】



(式中、

Xは、ハロゲン原子であり、

Qは、アリーレンであり、

Yは、結合手または2価の基であり、

2価の基が、アルキレン、アリーレン、-C(=O)-、-NR₂-、-C(=O)-NR₂-、-NR₂-C(=O)-、-O-、および-(O-R₃)_m-からなる群より選ばれる2個以上の基が連結した2価の基であり、

R₂が、水素原子であり、

R₃が、アルキレンまたはアリーレンであり、

mが、1~5の整数であり、

Rは、生体直交性官能基である。)。

で表される化合物またはその塩を含む、チオール基導入抗体またはその塩の誘導体化用試薬。

【請求項 2】

前記試薬が、チオール基導入抗体またはその塩におけるシステイン残基以外のアミノ酸残基の側鎖を介して導入されたチオール基と反応することによりチオール基導入抗体またはその塩を誘導体化するための試薬である、請求項 1 記載の試薬。

【請求項 3】

チオール基導入抗体におけるチオール基が、抗体重鎖の定常領域中のリジン残基の側鎖中の窒素原子に対して、ペプチドを含有しないリンカーを介して、位置選択的に結合している、請求項 1 または 2 記載の試薬。

10

【請求項 4】

チオール基導入抗体が I g G 抗体である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の試薬。

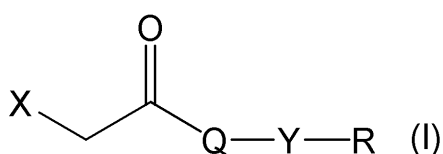
【請求項 5】

リジン残基が、E U n u m b e r i n g におけるヒト I g G 重鎖の 2 4 6 / 2 4 8 位、2 8 8 / 2 9 0 位、および 3 1 7 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 3 または 4 記載の試薬。

【請求項 6】

下記式 (I) :

【化 2】



20

(式中、

X は、ハロゲン原子であり、

Q は、アリーレンであり、

Y は、2 価の基であり、

2 価の基が、アルキレン、アリーレン、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NR}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_2-$ 、 $-\text{NR}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{O}-$ 、および $-(\text{O}-\text{R}_3)_m-$ からなる群より選ばれる 2 個以上の基が連結した 2 価の基であり、

30

R_2 が、水素原子であり、

R_3 が、アルキレンまたはアリーレンであり、

m が、1 ~ 5 の整数であり、

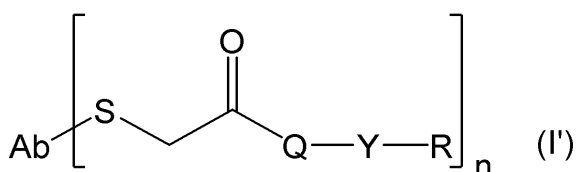
R は、D B C O 基である。) 。

で表される化合物またはその塩。

【請求項 7】

下記式 (I ') :

【化 3】



40

(式中、

A b は、抗体であり、

S は、硫黄原子であり、

Q は、アリーレンであり、

Y は、結合手または 2 価の基であり、

50

2 価の基が、アルキレン、アリーレン、 $-C(=O)-$ 、 $-NR_2-$ 、 $-C(=O)-NR_2-$ 、 $-NR_2-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、および $-(O-R_3)_m-$ からなる群より選ばれる 2 個以上の基が連結した 2 価の基であり、

R_2 が、水素原子であり、

R_3 が、アルキレンまたはアリーレンであり、

m が、1 ~ 5 の整数であり、

R は、生体直交性官能基であり、

n は、1 ~ 8 の整数である。)

で表される、生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩。

【請求項 8】

10

前記式 (I') における抗体 (Ab) に隣接している硫黄原子 (S) が、抗体 (Ab) 重鎖の定常領域中のリジン残基の側鎖中の窒素原子に対して、ペプチドを含有しないリンカーを介して、位置選択的に結合している、請求項 7 記載の抗体中間体またはその塩。

【請求項 9】

前記抗体中間体が IgG 抗体である、請求項 7 または 8 記載の抗体中間体またはその塩。

【請求項 10】

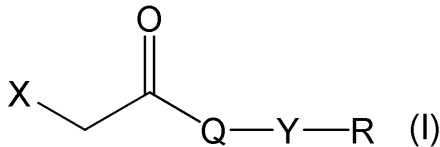
リジン残基が、EU numbering におけるヒト IgG 重鎖の 246 / 248 位、288 / 290 位、および 317 位からなる群より選ばれる 1 以上の位置に存在する、請求項 8 または 9 記載の抗体中間体またはその塩。

【請求項 11】

20

下記式 (I) :

【化 4】



(式中、

X は、ハロゲン原子であり、

Q は、アリーレンであり、

Y は、結合手または 2 価の基であり、

30

2 価の基が、アルキレン、アリーレン、 $-C(=O)-$ 、 $-NR_2-$ 、 $-C(=O)-NR_2-$ 、 $-NR_2-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、および $-(O-R_3)_m-$ からなる群より選ばれる 2 個以上の基が連結した 2 価の基であり、

R_2 が、水素原子であり、

R_3 が、アルキレンまたはアリーレンであり、

m が、1 ~ 5 の整数であり、

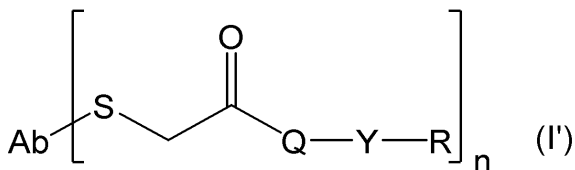
R は、生体直交性官能基である。)

で表される化合物またはその塩を、チオール基導入抗体またはその塩と反応させて、

下記式 (I') :

40

【化 5】



(式中、

Ab は、抗体であり、

S は、硫黄原子であり、

50

n は、1 ~ 8 の整数であり、

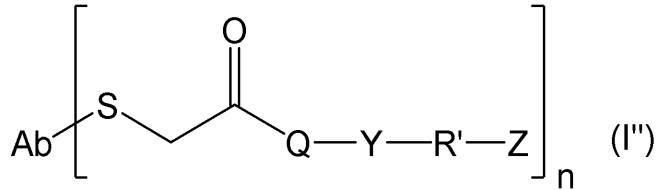
Q、Y および R は、式 (I) のものと同じである。)

で表される、生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩を生成することを含む、
生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩の製造方法。

【請求項 1 2】

下記式 (I') :

【化 6】



10

(式中、

Ab は、抗体であり、

S は、硫黄原子であり、

Q は、アリーレンであり、

Y は、結合手または 2 価の基であり、

2 価の基が、アルキレン、アリーレン、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NR}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_2-$ 、 $-\text{NR}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{O}-$ 、および $-(\text{O}-\text{R}_3)_m-$ からなる群より選ばれる 2 個以上の基が連結した 2 価の基であり、

20

R_2 が、水素原子であり、

R_3 が、アルキレンまたはアリーレンであり、

m が、1 ~ 5 の整数であり、

R' は、互いに反応可能な 2 つの生体直交性官能基間の反応により生成する基であり、

Z は、機能性物質であり、

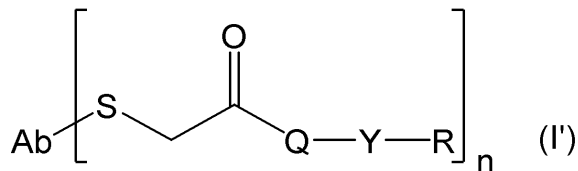
n は、1 ~ 8 の整数である。)

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。

【請求項 1 3】

下記式 (I') :

【化 7】



30

(式中、

Ab は、抗体であり、

S は、硫黄原子であり、

Q は、アリーレンであり、

Y は、結合手または 2 価の基であり、

2 価の基が、アルキレン、アリーレン、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NR}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_2-$ 、 $-\text{NR}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{O}-$ 、および $-(\text{O}-\text{R}_3)_m-$ からなる群より選ばれる 2 個以上の基が連結した 2 価の基であり、

40

R_2 が、水素原子であり、

R_3 が、アルキレンまたはアリーレンであり、

m が、1 ~ 5 の整数であり、

R は、生体直交性官能基であり、

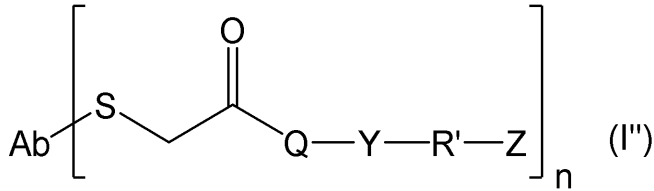
n は、1 ~ 8 の整数である。)

50

で表される、生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩を、抗体中間体により保有される生体直交性官能基と反応可能な生体直交性官能基を有する機能性物質と反応させて、

下記式 (I'):

【化 8】



10

(式中、

Ab、Abに隣接するS、Q、Yおよびnは、式(I')のものと同じであり、

R'は、互いに反応可能な2つの生体直交性官能基間の反応により生成する基であり、

Zは、機能性物質である。)。

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生成することを含み、

前記抗体中間体またはその塩がアルキン残基を有する場合、前記抗体中間体またはその塩はアジドを有する機能性物質と反応され、

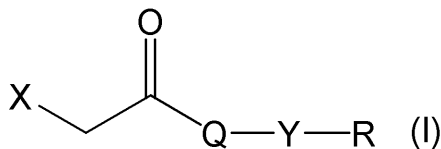
前記抗体中間体またはその塩がアジドを有する場合、前記抗体中間体またはその塩はアルキン残基を有する機能性物質と反応される、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩の製造方法。

20

【請求項 14】

下記式 (I):

【化 9】



(式中、

Xは、ハロゲン原子であり、

Q、YおよびRは、式(I')のものと同じである。)

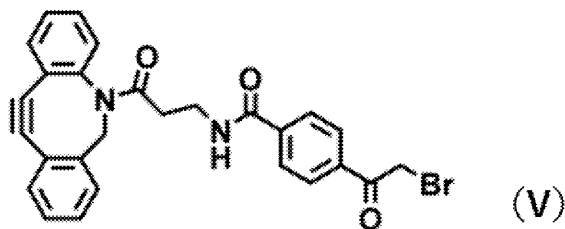
で表される化合物またはその塩を、チオール基導入抗体またはその塩と反応させて、

前記式(I)で表される、生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩を生成することをさらに含む、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

下記式 (V) で表される化合物またはその塩。

【化 10】



40

【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】

50

【 0 0 0 2 】

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、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、Immugene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。

【 0 0 0 3 】

ADCは、抗体中に存在する特定のアミノ酸残基の側鎖中の官能基を薬物に結合することにより作製されている。ADCの作製に利用されるこのような官能基の例は、抗体中に存在するシステイン残基の側鎖中のチオール基である。抗体中のチオール基を修飾する技術としては、3 - アリールプロピオニトリル化合物を用いる技術 (特許文献1)、およびアリール / ヘテロアリールスルホン / スルホキシド化合物を用いる技術 (特許文献2) が知られている。抗体中のチオール基を修飾する上記先行技術は、抗体におけるシステイン残基の側鎖中のチオール基 (例、抗体中に天然に存在するシステイン残基、および抗体に遺伝子工学的に導入されたシステイン残基の側鎖中のチオール基) を修飾するものである。

10

【 0 0 0 4 】

しかしながら、本発明者らが把握する限り、先行技術は、抗体に化学的に導入されたチオール基 (例、抗体におけるシステイン残基以外のアミノ酸残基の側鎖を介して抗体に導入されたチオール基) を修飾することを教示も示唆もしていない。

【先行技術文献】

20

【特許文献】

【 0 0 0 5 】

【文献】国際公開第2015 / 001117号

【文献】国際公開第2014 / 144878号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

本発明の目的は、抗体に化学的に導入されたチオール基の修飾により所望の抗体または抗体組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

30

【 0 0 0 7 】

本発明者らは、鋭意検討した結果、特定の化合物が、抗体に化学的に導入されたチオール基を高効率で修飾できることを見出した。このような特定の化合物は、反応の効率性に優れるため、抗体に化学的に導入されたチオール基の修飾のみならず、抗体におけるシステイン残基中のチオール基の修飾にも有用であると考えられる。また、このような特定の化合物によれば、抗体中のチオール基が高効率で修飾された所望の抗体を作製することができる。

【 0 0 0 8 】

本発明者らはまた、当該特定の化合物により修飾された抗体が、低い抗体凝集性等の所望の性質に優れることを見出した。

40

【 0 0 0 9 】

本発明者らはさらに、本発明によれば、上記特徴を有する所望の抗体を含む特殊な抗体組成物を得ることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は、以下である。

(1) (A) 式 (A) で表される、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩、および (B) 式 (B) で表される、チオール基導入抗体またはその塩を含み、

式 (A) における抗体 (Ab) に隣接している硫黄原子 (S)、および式 (B) における抗体 (Ab) に隣接しているチオール基 (SH) が、抗体重鎖の定常領域中の同じ位置

50

に存在する同じアミノ酸残基の側鎖中の原子に対して、直接結合しているか、またはリンカーを介して結合しており、

L - Rで示される部分構造の分子量が700以下であり、

前記抗体中間体またはその塩および前記チオール基導入抗体またはその塩の合計量に対する前記抗体中間体またはその塩の量の百分率〔100(%)×(前記抗体中間体またはその塩の量)/(前記抗体中間体またはその塩および前記チオール基導入抗体またはその塩の合計量)〕が80%以上であり、

前記抗体中間体またはその塩および前記チオール基導入抗体またはその塩の凝集率が5%以下である、抗体組成物。

〔2〕前記抗体中間体が、式(I')、(II')、(III')、または(IV')で表され10

る、〔1〕の抗体組成物。

〔3〕前記アミノ酸残基が、システイン残基以外のアミノ酸残基である、〔1〕または〔2〕の抗体組成物。

〔4〕式(A)における抗体(Ab)に隣接している硫黄原子(S)、および式(B)に

おける抗体(Ab)に隣接しているチオール基(SH)が、抗体(Ab)重鎖の定常領域中の同じ位置に存在するリジン残基の側鎖中の窒素原子に対して、ペプチドを含有しないリンカーを介して、位置選択的に結合している、〔1〕～〔3〕のいずれかの抗体組成物。

〔5〕前記抗体がIgG抗体である、〔1〕～〔4〕のいずれかの抗体組成物。

〔6〕リジン残基が、E U n u m b e r i n gにおけるヒトIgG重鎖の246/24

8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、〔4〕または〔5〕の抗体組成物。

20

〔7〕前記抗体中間体が、式(1')～(10')で表される抗体中間体からなる群より選ばれる、〔1〕～〔6〕のいずれかの抗体組成物。

〔8〕保護されていてもよい生体直交性官能基が、アルキン残基またはアジドである、〔1〕～〔7〕のいずれかの抗体組成物。

〔9〕アルキン残基が、置換されていてもよい、炭素原子間3重結合を有する環基である、〔8〕の抗体組成物。

〔10〕式(I)、(II)、(III)、または(IV)で表される化合物またはその塩を含む、チオール基導入抗体またはその塩の誘導体化用試薬。

〔11〕前記試薬が、チオール基導入抗体またはその塩におけるシステイン残基以外のア

ミノ酸残基の側鎖を介して導入されたチオール基と反応することによりチオール基導入抗体またはその塩を誘導体化するための試薬である、〔10〕の試薬。

30

〔12〕チオール基導入抗体におけるチオール基が、抗体重鎖の定常領域中のリジン残基の側鎖中の窒素原子に対して、ペプチドを含有しないリンカーを介して、位置選択的に結合している、〔10〕または〔11〕の試薬。

〔13〕チオール基導入抗体がIgG抗体である、〔10〕～〔12〕のいずれかの試薬。

〔14〕リジン残基が、E U n u m b e r i n gにおけるヒトIgG重鎖の246/2

48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、〔12〕または〔13〕の試薬。

40

〔15〕2価の基が、アルキレン、アリーレン、-C(=O)-、-NR₂-、-C(=O)-NR₂-、-NR₂-C(=O)-、-O-、および-(O-R₃)_m-からなる群より選ばれる1個の基であるか、または

2価の基が、アルキレン、アリーレン、-C(=O)-、-NR₂-、-C(=O)-NR₂-、-NR₂-C(=O)-、-O-、および-(O-R₃)_m-からなる群より選ばれる2個以上の基が連結した2価の基であり、

R₂が、水素原子またはアルキルであり、

R₃が、アルキレンまたはアリーレンであり、

mが、1～5の整数である、〔10〕～〔14〕のいずれかの試薬。

〔16〕前記化合物が、式(1)～(10)で表される化合物からなる群より選ばれる、

50

〔 17 〕式 (I)、(I I)、(I I I)、または (I V) で表される化合物またはその塩。

〔 18 〕前記化合物が、式 (2) ~ (10) で表される化合物からなる群より選ばれる、〔 17 〕の化合物またはその塩。

〔 19 〕式 (I ')、(I I ')、(I I I ')、または (I V ') で表される、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩。

〔 20 〕式 (I ')、(I I ')、(I I I ')、または (I V ') における抗体 (A b) に隣接している硫黄原子 (S) が、抗体 (A b) 重鎖の定常領域中のシステイン残基以外のアミノ酸残基の側鎖中の原子に対して、直接結合しているか、またはリンカーを介して結合している、〔 19 〕の抗体中間体またはその塩。 10

〔 21 〕式 (I ')、(I I ')、(I I I ')、または (I V ') における抗体 (A b) に隣接している硫黄原子 (S) が、抗体 (A b) 重鎖の定常領域中のリジン残基の側鎖中の窒素原子に対して、ペプチドを含有しないリンカーを介して、位置選択的に結合している、〔 20 〕の抗体中間体またはその塩。

〔 22 〕前記抗体中間体が I g G 抗体である、〔 19 〕 ~ 〔 21 〕のいずれかの抗体中間体またはその塩。

〔 23 〕リジン残基が、E U n u m b e r i n g におけるヒト I g G 重鎖の 2 4 6 / 2 4 8 位、2 8 8 / 2 9 0 位、および 3 1 7 位からなる群より選ばれる 1 以上の位置に存在する、〔 21 〕または〔 22 〕の抗体中間体またはその塩。

〔 24 〕前記抗体中間体が、式 (1 ') ~ (1 2 ') で表される抗体中間体からなる群より選ばれる、〔 19 〕 ~ 〔 23 〕のいずれかの抗体中間体またはその塩。 20

〔 25 〕式 (I)、(I I)、(I I I)、または (I V) で表される化合物またはその塩を、チオール基導入抗体またはその塩と反応させて、式 (I ')、(I I ')、(I I I ')、または (I V ') で表される、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩を生成することを含む、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩の製造方法。

〔 26 〕式 (I ' ')、(I I ' ')、(I I I ' ')、または (I V ' ') 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。

〔 27 〕前記コンジュゲートが、式 (1 ' ') ~ (1 2 ' ') で表されるコンジュゲートからなる群より選ばれる、〔 26 〕のコンジュゲートまたはその塩。 30

〔 28 〕式 (I ')、(I I ')、(I I I ')、または (I V ') で表される、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩を、抗体中間体により保有される生体直交性官能基と反応可能な生体直交性官能基を有する機能性物質と反応させて、式 (I ' ')、(I I ' ')、(I I I ' ')、または (I V ' ') 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生成することを含み、

前記抗体中間体またはその塩がアルキン残基を有する場合、前記抗体中間体またはその塩はアジドを有する機能性物質と反応され、

前記抗体中間体またはその塩がアジドを有する場合、前記抗体中間体またはその塩はアルキン残基を有する機能性物質と反応される、抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩の製造方法。 40

〔 29 〕式 (I)、(I I)、(I I I)、または (I V) で表される化合物またはその塩を、チオール基導入抗体またはその塩と反応させて、式 (I ')、(I I ')、(I I I ')、または (I V ') で表される、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩を生成することをさらに含む、〔 28 〕の方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明の抗体組成物は、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、凝集率が低い状態において効率的に製造することができる。

本発明の試薬は、チオール基導入抗体またはその塩を誘導體化することができる。

本発明の化合物またはその塩は、チオール基導入抗体またはその塩の誘導體化に用いる 50

ことができる。

本発明の抗体中間体またはその塩は、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に用いることができる。

本発明のコンジュゲートまたはその塩は、医薬、または試薬（例、診断薬、研究用試薬）として用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、チオール基導入抗体および「脱離基 - L - R」で表される化合物またはその塩（Lは、2価の基であり、Rは、保護されていてもよい生体直交性官能基である。）の反応により得られる抗体組成物の概要を示す図である。このような反応により得られる抗体組成物は、式（A）で表される、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩、および式（B）で表される、チオール基導入抗体またはその塩を含む。

10

【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チオール基導入抗体の修飾の概要を示す図である。

【図3】図3は、式（II）で表される本発明の化合物またはその塩によるチオール基導入抗体の修飾の概要を示す図である。

【図4】図4は、式（III）で表される本発明の化合物またはその塩によるチオール基導入抗体の修飾の概要を示す図である。

【図5】図5は、式（IV）で表される本発明の化合物またはその塩によるチオール基導入抗体の修飾の概要を示す図である。

20

【図6】図6は、（1）トラスツズマブの重鎖のアミノ酸配列（配列番号1）、および（2）トラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列（配列番号2）を示す図である。

【図7】図7は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含むアミノ酸18残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPR（配列番号3）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（実測値：m/z 577.03606、理論値：577.03557、4価）を示す図である。

【図8】図8は、EU numberingにおけるヒトIgG重鎖の288/290位のリジン残基の修飾を示す、3価のy16に相当するm/z 682.13（理論値：682.01）のプロダクトイオンのCIDスペクトルを示す図である。

30

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

【図10】図10は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含むアミノ酸18残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPR（配列番号3）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（実測値：m/z 577.03571、理論値：577.03557、4価）を示す図である。

40

【図11】図11は、EU numberingにおけるヒトIgG重鎖の288/290位のリジン残基の修飾を示す、3価のy16に相当するm/z 682.41（理論値：682.01）のプロダクトイオンのCIDスペクトルを示す図である。

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

【図13】図13は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（

50

ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019Da)を含むアミノ酸18残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPR(配列番号3)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値:m/z 769.04506、理論値:769.04482、3価)を示す図である。

【図14】図14は、EUnumberingにおけるヒトIgG重鎖の288/290位のリジン残基の修飾を示す、2価のy16に相当するm/z 1022.71(理論値:1022.51)のプロダクトイオンのCIDスペクトルを示す図である。

【図15】図15は、トラスツズマブのトリプシン消化物に対し、リジン残基への修飾(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019Da)を含むペプチドフラグメントをBioPharmaFinderを用いて検索した結果を示す図である。横軸は同定されたリジン残基を示し、縦軸はIntensityを示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

1. 一般的な用語の定義

(抗体およびそれに関連する用語)

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

【0014】

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

【0015】

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

【0016】

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

10

20

30

40

50

【0017】

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

【0018】

(1) がん領域

PD-L1、GD2、PDGFR (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、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、RSP0、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、2-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、TGF、IL-17、5T4、RTK、Immune Suppressor Protein、NaPi2b、ルイス血液型B抗原、A34、Lysil-Oxidase、DLK-1、TROP-2、9インテグリン、TAG-72(CA72-4)、CD70

10

20

30

【0019】

(2) 自己免疫疾患・炎症性疾患

IL-17、IL-6R、IL-17R、INF-、IL-5R、IL-13、IL-23、IL-6、ActRIIB、7-Integrin、IL-4R、HAS、Eotaxin-1、CD3、CD19、TNF-、IL-15、CD3、Fibronectin、IL-1、IL-1、IL-17、TSLP(Thymic Stromal Lymphopoietin)、LAMP(Alpha4 Beta7 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-、IL-7R、Kv1.3、9インテグリン、LI FHT

40

【0020】

50

(3) 脳神経疾患

CGRP、CD20、アミロイド、アミロイドプロトフィブリン、Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor、LINGO (Ig Domain Containing 1)、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

【0021】

(4) 感染症

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

10

【0022】

(5) 遺伝性・希少疾患

アミロイドAL、SEMA4D (CD100)、インスリン受容体、ANGPTL3、IL4、IL13、FGF23、副腎皮質刺激ホルモン、トランスサイレチン、ハンチンチン

【0023】

(6) 眼疾患

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

20

【0024】

(7) 骨・整形外科領域

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

【0025】

(8) 血液疾患

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

30

【0026】

(9) その他の疾患

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

【0027】

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

40

50

【0028】

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_IHGnber.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。

10

【0029】

（ハロゲン原子）

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。

【0030】

（1価の炭化水素基、およびそれに関連する用語）

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。

20

【0031】

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。

【0032】

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。アルキルが置換基を有する場合、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。

30

【0033】

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。アルケニルが置換基を有する場合、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。

【0034】

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。アルキニルが置換基を有する場合、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。

40

【0035】

1価の鎖状炭化水素基としては、アルキルが好ましい。

【0036】

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

50

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。

【0037】

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。シクロアルキルが置換基を有する場合、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。

【0038】

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。シクロアルケニルが置換基を有する場合、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。

【0039】

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。シクロアルキニルが置換基を有する場合、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。

【0040】

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。

【0041】

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いてもよく、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。1価の芳香族炭化水素基が置換基を有する場合、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。

【0042】

1価の芳香族炭化水素基としては、フェニルが好ましい。

【0043】

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。

【0044】

(1価の複素環基およびそれに関連する用語)

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

【0045】

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。1価の芳香族複素環基が置換基を有する場合、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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 4 6 】

1 価の非芳香族複素環基としては、炭素原子数 2 ~ 1 5 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。1 価の非芳香族複素環基が置換基を有する場合、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。

10

【 0 0 4 7 】

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。

【 0 0 4 8 】

(2 価の基)

2 価の基は、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、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-NR_2-$ 、 $-C(=O)-NR_2-$ 、 $-NR_2-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-NR_2-$ 、 $-NR_2-C(=S)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-(O-R_3)_m-$ 、および $-(S-R_3)_m-$ からなる群より選ばれる 1 個の基、またはこれらの 2 個以上 (例えば 2 ~ 1 0 個、好ましくは 2 ~ 8 個、より好ましくは 2 ~ 6 個、さらにより好ましくは 2 ~ 5 個、特に好ましくは 2 または 3 個) の基を含む主鎖構造を有する基である。 R_2 は、水素原子、または後述する置換基を示す。 R_3 は、2 価の直鎖炭化水素基、2 価の環状炭化水素基、または 2 価の複素環基を示す。 m は、1 ~ 1 0 の整数であり、好ましくは 1 ~ 8 の整数であり、より好ましくは 1 ~ 6 の整数であり、さらにより好ましくは 1 ~ 5 の整数であり、特に好ましくは 1 ~ 3 の整数である。

20

【 0 0 4 9 】

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。

30

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。

40

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。

【 0 0 5 0 】

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 ~ 1 4 のアリーレンが好ましく、炭素原子数 6 ~ 1 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 ~ 1 2 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 ~ 1 0 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

50

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。

【0051】

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、ジオキサランジイル、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、テトラヒドロオキサジンジイル、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。

【0052】

好ましくは、2 価の基は、アルキレン、アリーレン、 $-C(=O)-$ 、 $-NR_2-$ 、 $-C(=O)-NR_2-$ 、 $-NR_2-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、および $-(O-R_3)_m-$ からなる群より選ばれる 1 個の基を含む主鎖構造を有する 2 価の基であるか、または、

アルキレン、アリーレン、 $-C(=O)-$ 、 $-NR_2-$ 、 $-C(=O)-NR_2-$ 、 $-NR_2-C(=O)-$ 、 $-O-$ 、および $-(O-R_3)_m-$ からなる群より選ばれる 2 個以上の基を含む主鎖構造を有する 2 価の基であり、

R_2 が、水素原子またはアルキルであり、

R_3 が、アルキレンまたはアリーレンであり、

m が、1 ~ 5 の整数（すなわち、1、2、3、4、または 5）であってもよい。

アルキレン、アリーレン、アルキルは、上述したものと同様である。

【0053】

2 価の基における主鎖構造は、1 個以上（例えば 1 ~ 10 個、好ましくは 1 ~ 8 個、より好ましくは 1 ~ 6 個、さらにより好ましくは 1 ~ 5 個、特に好ましくは 1 ~ 3 個）の後述する置換基により置換されていてもよい。

【0054】

（置換基）

置換基としては、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；

10

20

30

40

50

(i v) アラルキル ;

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

(v i) $N R_b R_c -$ 、 $N R_b R_c - C(=O) -$ 、 $N R_b R_c - C(=O) - O -$ 、もしくは $R_b - C(=O) - N R_c -$ (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。) ;

(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。

【 0 0 5 5 】

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、上述したものと同様である。

10

【 0 0 5 6 】

アラルキルとは、アリアルキルをいう。アリアルキルにおけるアリア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。

【 0 0 5 7 】

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 ;

20

(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) $N R_b R_c -$ 、 $N R_b R_c - C(=O) -$ 、 $N R_b R_c - C(=O) - O -$ 、もしくは $R_b - C(=O) - N R_c -$ (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。

【 0 0 5 8 】

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 ;

30

(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) $N R_b R_c -$ 、 $N R_b R_c - C(=O) -$ 、 $N R_b R_c - C(=O) - O -$ 、もしくは $R_b - C(=O) - N R_c -$ (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。

【 0 0 5 9 】

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 ;

40

(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) $N R_b R_c -$ 、 $N R_b R_c - C(=O) -$ 、 $N R_b R_c - C(=O) - O -$ 、もしくは $R_b - C(=O) - N R_c -$ (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。

【 0 0 6 0 】

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 ;

50

(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) $NR_b R_c -$ 、 $NR_b R_c - C(=O) -$ 、 $NR_b R_c - C(=O) - O -$ 、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。

【 0 0 6 1 】

(生体直交性官能基)

生体直交性官能基は、生体構成成分 (例、アミノ酸、タンパク質、核酸、脂質、糖、リン酸) とは反応しない、もしくは生体構成成分に対する反応の速度が遅いが、生体構成成分以外の成分に対して選択的に反応する基をいう。生体直交性官能基は、当該技術分野において周知である (例、Sharpless K. B. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2004 (2015); Bertozzi C. R. et al., *Science* 291, 2357 (2001); Bertozzi C. R. et al., *Nature Chemical Biology* 1, 13 (2005) を参照)。

【 0 0 6 2 】

本発明では、生体直交性官能基として、タンパク質に対する生体直交性官能基が用いられる。本発明の試薬により誘導体化されるべきチオール基導入抗体は、タンパク質であるためである。タンパク質に対する生体直交性官能基は、タンパク質を構成する天然の 20 種のアミノ酸残基の側鎖と反応しない、もしくは当該側鎖に対する反応の速度が遅いが、目的の官能基と反応する基である。タンパク質を構成する天然の 20 種のアミノ酸は、アラニン (A)、アスパラギン (N)、システイン (C)、グルタミン (Q)、グリシン (G)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、フェニルアラニン (F)、プロリン (P)、セリン (S)、スレオニン (T)、トリプトファン (W)、チロシン (Y)、バリン (V)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、アルギニン (R)、ヒスチジン (H)、およびリジン (L) である。これらの天然の 20 種のアミノ酸のうち、側鎖がない (すなわち、水素原子である) グリシン、ならびに側鎖が炭化水素基である (すなわち、硫黄原子、窒素原子、および酸素原子からなる群より選ばれるヘテロ原子を側鎖に含まない) アラニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、およびバリンは、通常の反応に対して不活性である。したがって、タンパク質に対する生体直交性官能基は、通常の反応に対して不活性である側鎖を有するこれらのアミノ酸の側鎖に加えて、アスパラギン、グルタミン、メチオニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、およびリジンの側鎖に対して反応しない、または反応の速度が遅いが、目的の官能基と反応する基である。

【 0 0 6 3 】

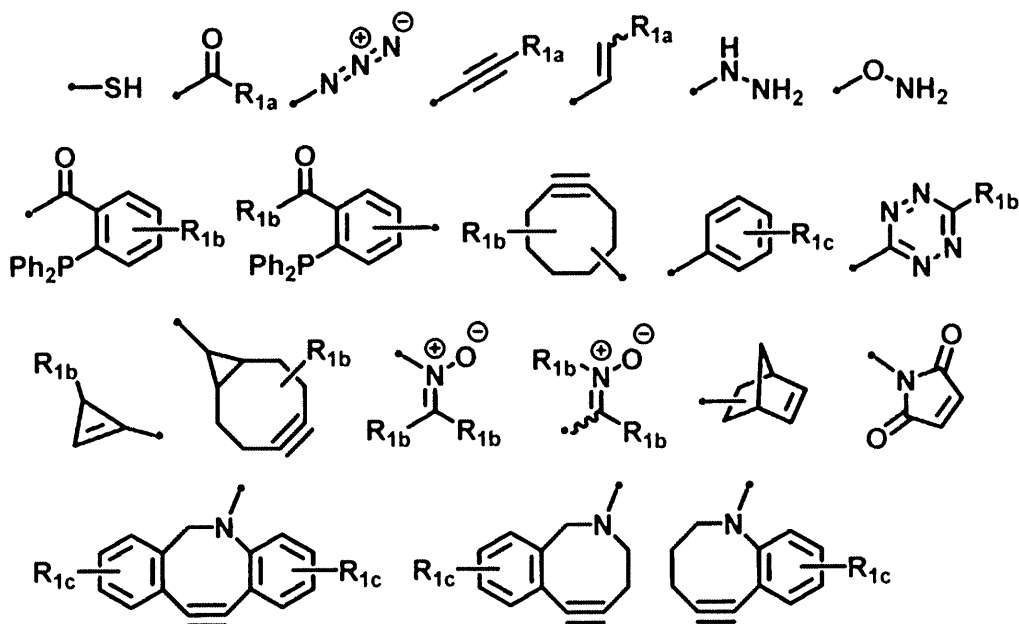
このような生体直交性官能基としては、例えば、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルケン残基 (換言すれば、炭素原子間二重結合を有する最小単位であるビニレン (エテニレン) 部分を有していればよい。以下同様)、アルキン残基 (換言すれば、炭素原子間三重結合を有する最小単位であるエチニレン部分を有していればよい。以下同様)、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル残基、ハロカルボニル残基 (例、 位にフッ素原子、塩素原子、臭素原子またはヨウ素原子を有するカルボニル残基。以下同様)、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基が挙げられる。

【 0 0 6 4 】

より具体的には、生体直交性官能基は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化

学構造に対応していてもよい。

【化 1】



10

20

〔ここで、

R_{1a} 、単一もしくは複数の R_{1b} 、および単一もしくは複数の R_{1c} は、同一もしくは異なって、上述の置換基、または電子吸引基であり、

・は、結合手である。〕

【0065】

電子吸引基としては、例えば、ハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されたアルキル（例、トリフルオロメチル）、ボロン酸残基、メシル、トシル、トリフレート、ニトロ、シアノ、フェニル基、ケト基（例、アシル）が挙げられ、ハロゲン原子、ボロン酸残基、メシル、トシル、トリフレートが好ましい。

【0066】

好ましくは、生体直交性官能基は、アルキン残基またはアジドであってもよい。アルキン残基は、より好ましくは、上述したような置換基で置換されていてもよい、炭素原子間3重結合を有する環基であってもよい。

【0067】

生体直交性官能基は、保護されていてもよい。保護されていてもよい生体直交性官能基とは、未保護の生体直交性官能基、または保護された生体直交性官能基をいう。未保護の生体直交性官能基は、上述の生体直交性官能基に該当する。保護された生体直交性官能基は、保護基の切断により生体直交性官能基を生成する基である。保護基の切断は、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）下での特定の処理により行うことができる。このような特定の処理としては、例えば、（a）酸性物質、塩基性物質、還元剤、酸化剤、酵素からなる群より選ばれる1種以上の物質による処理、（b）光からなる群より選ばれる物理化学的刺激による処理、または（c）自己分解性の切断性部分を含む切断性リンカーを用いた場合の放置が挙げられる。このような保護基およびその切断条件は、当該分野における技術常識である（例、G. Leriche, L. Chisholm, A. Wagner, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 571 (2012); Feng P. et al., *Journal of American Chemical Society*, 132, 1500 (2010).; Bessodes M. et al., *Journal of Controlled Release*, 99, 423 (2004).; Desimone, J. M., *Journal of American Chemical So*

30

40

50

ciety, 132, 17928 (2010); Thompson, D. H., Journal of Controlled Release, 91, 187 (2003); Schoenmarks, R. G., Journal of Controlled Release, 95, 291 (2004)).

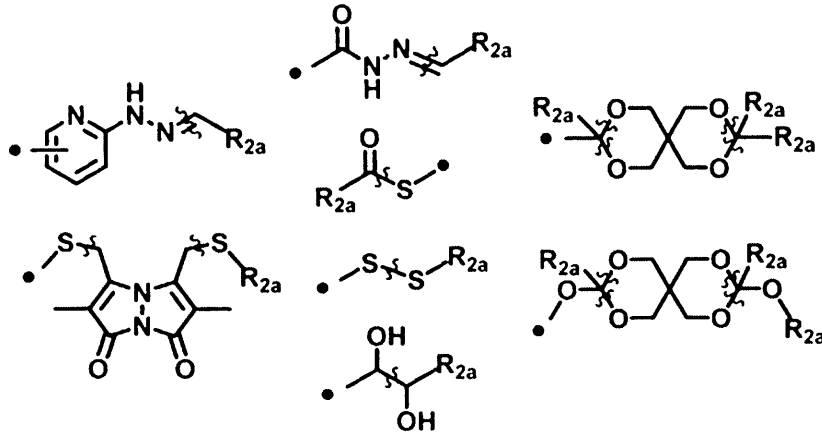
【0068】

保護された生体直交性官能基としては、例えば、ジスルフィド残基、エステル残基、アセタール残基、ケタール残基、イミン残基、ピシナルジオール残基が挙げられる。

【0069】

より具体的には、保護された生体直交性官能基は、以下からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

【化2】



〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

単一もしくは複数の R_{2a} は、同一または異なって、水素原子、または上述の置換基からなる群より選ばれ、

・は、結合手である。〕

【0070】

好ましくは、保護されていてもよい生体直交性官能基は、未保護の生体直交性官能基である。

【0071】

(機能性物質)

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。

【0072】

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。

【0073】

10

20

30

40

50

より具体的には、薬物は、抗癌剤であってもよい。抗癌剤としては、例えば、化学療法剤、毒素、放射性同位体またはそれを含む物質が挙げられる。化学療法剤としては、例えば、DNA損傷剤、代謝拮抗薬、酵素阻害剤、DNAインターカレート剤、DNA切断剤、トポイソメラーゼ阻害剤、DNA結合阻害剤、チューブリン結合阻害剤、細胞傷害性ヌクレオシド、白金化合物が挙げられる。毒素としては、例えば、細菌毒素（例、ジフテリア毒素）、植物毒素（例、リシン）が挙げられる。放射性同位体としては、例えば、水素原子の放射性同位体（例、 ^3H ）、炭素原子の放射性同位体（例、 ^{14}C ）、リン原子の放射性同位体（例、 ^{32}P ）、硫黄原子の放射性同位体（例、 ^{35}S ）、イットリウム⁹⁰の放射性同位体（例、 ^{90}Y ）、テクネチウム^{99m}の放射性同位体（例、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、インジウム¹¹¹の放射性同位体（例、 ^{111}In ）、ヨウ素¹²³の放射性同位体（例、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{129}I 、 ^{131}I ）、サマリウム¹⁵³の放射性同位体（例、 ^{153}Sm ）、レニウム¹⁸⁶の放射性同位体（例、 ^{186}Re ）、アスタチン²¹¹の放射性同位体（例、 ^{211}At ）、ビスマス²¹²の放射性同位体（例、 ^{212}Bi ）が挙げられる。更に具体的には、薬物として、オーリスチン（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。

【0074】

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

【0075】

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。

【0076】

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

【0077】

機能性物質が、抗体中間体により保有される生体直交性官能基と反応し易い生体直交性官能基を有しない場合、機能性物質は、このような生体直交性官能基を有するように誘導体化されてもよい。機能性物質、または誘導体化された機能性物質により保有される生体直交性官能基は、抗体中間体により保有される生体直交性官能基を考慮しつつ、上述したような生体直交性官能基から選択される。例えば、抗体中間体により保有される生体直交性官能基がアルキン残基（好ましくは、上述したような置換基により置換されていてよい、炭素原子間3重結合を有する環基）である場合、機能性物質、または誘導体化された機能性物質により保有される生体直交性官能基は、アジドであってもよい。また、抗体中間体により保有される生体直交性官能基がアジドである場合、機能性物質、または誘導体化された機能性物質により保有される生体直交性官能基は、アルキン残基（好ましくは、上述したような置換基により置換されていてよい、炭素原子間3重結合を有する環基）

であってもよい。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。

10

【0078】

（塩）

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

20

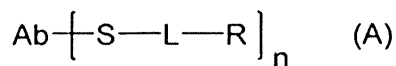
30

【0079】

2. 抗体組成物

本発明は、(A)下記式(A)：

【化3】



40

（式中、

A b は、2 個の重鎖および2 個の軽鎖を含み、かつ重鎖間および重鎖と軽鎖との間にジスルフィド結合を有するイムノグロブリン単位を含む抗体であり、

S は、硫黄原子であり、

L は、2 価の基であり、

R は、保護されていてもよい生体直交性官能基であり、

n は、1 ~ 8 の整数である。) で表される、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩、および

(B) 下記式(B)：

50

【化 4】



(式中、

A b は、式 (A) における抗体と同一の抗体であり、

S H は、チオール基であり、

n は、式 (A) における n と同一の整数である。) で表される、チオール基導入抗体またはその塩を含み、

式 (A) における抗体 (A b) に隣接している硫黄原子 (S)、および式 (B) における抗体 (A b) に隣接しているチオール基 (S H) が、抗体重鎖の定常領域中の同じ位置に存在する同じアミノ酸残基の側鎖中の原子に対して、直接結合しているか、またはリンカーを介して結合しており、

L - R で示される部分構造の分子量が 700 以下であり、

前記抗体中間体またはその塩および前記チオール基導入抗体またはその塩の合計量に対する前記抗体中間体またはその塩の量の百分率 $[100(\%) \times (\text{前記抗体中間体またはその塩の量}) / (\text{前記抗体中間体またはその塩および前記チオール基導入抗体またはその塩の合計量})]$ が 80% 以上であり、

前記抗体中間体またはその塩および前記チオール基導入抗体またはその塩の凝集率が 5% 以下である、抗体組成物を提供する。

【0080】

本発明の抗体組成物は、チオール基導入抗体を、「脱離基 - L - R」で表される化合物と反応させることにより、得ることができる(図1)。したがって、式(A)および(B)における共通記号である A b および n は、式(A)と(B)との間で同一である。本発明によればこのような抗体組成物を得ることができるものの、先行技術によってはこのような抗体組成物を得る動機付けはない。

【0081】

式(A)および(B)における A b は、2個の重鎖および2個の軽鎖を含み、かつ重鎖間および重鎖と軽鎖との間にジスルフィド結合を有するイムノグロブリン単位を含む抗体である。このような抗体としては、例えば、2個の重鎖および2個の軽鎖を含み、かつ重鎖間および重鎖と軽鎖との間にジスルフィド結合を有するイムノグロブリン単位を含む I g G 抗体、I g D 抗体および I g E 抗体、4個の重鎖および4個の軽鎖を含み、かつ重鎖間および重鎖と軽鎖との間にジスルフィド結合を有するイムノグロブリン単位を含む I g A 抗体、8個の重鎖および8個の軽鎖を含み、かつ重鎖間および重鎖と軽鎖との間にジスルフィド結合を有するイムノグロブリン単位を含む I g M 抗体が挙げられるが、I g G 抗体(例、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)が好ましい。抗体は、好ましくはヒト I g G モノクローナル抗体であり、より好ましくはヒト I g G 全長モノクローナル抗体である。

【0082】

式(A)における L で表される 2 価の基は、上述したものと同一である。

【0083】

式(A)における R で表される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したものと同一である。

【0084】

式(A)および(B)における n は、1~8の整数である。n は、好ましくは1~6の整数であり、より好ましくは1~4の整数(すなわち、1、2、3または4)である。

【0085】

式(A)における抗体(A b)に隣接している硫黄原子(S)、および式(B)における抗体(A b)に隣接しているチオール基(S H)は、抗体重鎖の定常領域中の同じ位置に存在する同じアミノ酸残基の側鎖中の原子に対して、直接結合しているか、またはリン

10

20

30

40

50

カーを介して結合している。本発明の抗体組成物は、チオール基導入抗体を、「脱離基 - L - R」で表される化合物で修飾することにより得ることができることから（図1）、上記硫黄原子（S）および上記チオール基（SH）の抗体に対する結合様式は同一となるためである。すなわち、上記硫黄原子（S）が上記側鎖中の原子に対して同じく直接結合している場合、上記チオール基（SH）もまた、同じ側鎖中の同じ原子に対して直接結合しているものとなる。また、上記硫黄原子（S）が上記側鎖中の原子に対してリンカーを介して結合している場合、上記チオール基（SH）もまた、同じ側鎖中の同じ原子に対して同じリンカーを介して結合しているものとなる。

【0086】

一実施形態では、上記硫黄原子（S）およびチオール基（SH）の結合に利用される抗体中のアミノ酸残基は、システイン残基以外のアミノ酸残基であってもよい。システイン残基以外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）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）を利用できるが、好ましくは、窒素原子（アミノ基）を含む側鎖を有するリジン残基、酸素原子（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であり、より好ましくは、リジン残基である。

10

【0087】

別の実施形態では、上記硫黄原子（S）およびチオール基（SH）の結合に利用される抗体中のアミノ酸残基は、システイン残基であってもよい。本発明で用いられる化合物は、反応の効率性に優れるため、抗体に化学的に導入されたチオール基の修飾のみならず、抗体におけるシステイン残基中のチオール基の修飾にも有用であると考えられるためである。

20

【0088】

上記硫黄原子（S）およびチオール基（SH）の結合に利用される抗体中のアミノ酸残基は、抗体重鎖の定常領域（例えばCH1、CH2またはCH3、好ましくはCH2またはCH3）中の所定の位置に存在するものを利用することができる。

【0089】

好ましい特定の実施形態では、上記硫黄原子（S）およびチオール基（SH）の結合に利用される抗体中のアミノ酸残基は、窒素原子（アミノ基）を含む側鎖を有するリジン残基である。リジン残基としては、例えば、ヒトIgG重鎖における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リジン残基が挙げられる。

30

【0090】

所定の位置の特定のアミノ酸残基を位置選択的に修飾して所定の位置に特定の原子または基を含有する抗体を作製する方法は、例えば、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。また、これらの文献に記載される方法によれば、ペプチドを含有するリンカーを利用せずに、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。

40

【0091】

好ましくは、チオール基導入抗体として、重鎖の定常領域中の所定の位置に存在する特定のアミノ酸残基の側鎖中の原子（好ましくは、リジン残基の側鎖中の窒素原子）に対して、ペプチドを含有しないリンカーを介して、位置選択的に結合しているチオール基を含有する抗体を使用することができる。このようなチオール基導入抗体を「脱離基 - L - R」で表される化合物で修飾することにより、式（A）における抗体（Ab）に隣接する硫黄原子（S）、および式（B）における抗体（Ab）に隣接するチオール基（SH）が、抗体重鎖の定常領域中の同じ位置に存在する同じアミノ酸残基の側鎖中の原子に対して、

50

位置選択的に直接結合しているか、またはリンカーを介して位置選択的に結合している本発明の抗体組成物を得ることができる。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的な結合または保有は、チオール基導入抗体として、所定の位置の特定のアミノ酸残基を位置選択的にチオール基で修飾することができる上記方法により得られる抗体を利用することにより達成することができる。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。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〔例、国際公開第2019/240287号(WO2019/240287A1)を参照〕。

10

【0092】

ペプチドを含有しないリンカーとしては、上述した2価の基を利用することができる。好ましくは、上記硫黄原子(S)およびチオール基(SH)の結合に利用される抗体中のアミノ酸残基がリジン残基である場合、ペプチドを含有しないリンカーとして、リジン残基の側鎖中のアミノ基とアミド結合できる-C(=O)-部分を含むカルボニル含有リンカーを利用することができる。

20

【0093】

カルボニル含有リンカーとしては、-C(=O)-部分を末端に有し、かつ、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)-、-NR₄-、-C(=O)-NR₄-、-NR₄-C(=O)-、-C(=S)-NR₄-、-NR₄-C(=S)-、-O-、-S-、-(O-R₅)_{m1}-、および-(S-R₅)_{m1}-からなる群より選ばれる1個の基、またはこれらの2個以上(例えば2~10個、好ましくは2~8個、より好ましくは2~6個、さらにより好ましくは2~5個、特に好ましくは2または3個)の基を含む主鎖構造を有する基を用いることができる。R₄は、水素原子、または後述する置換基を示す。R₅は、2価の直鎖炭化水素基、2価の環状炭化水素基、または2価の複素環基を示す。m₁は、1~10の整数であり、好ましくは1~8の整数であり、より好ましくは1~6の整数であり、さらにより好ましくは1~5の整数であり、特に好ましくは1~3の整数である。

30

【0094】

好ましくは、カルボニル含有リンカーは、-C(=O)-部分を末端に有し、かつ、アルキレン、アリーレン、-C(=O)-、-NR₂-、-C(=O)-NR₄-、-NR₄-C(=O)-、-O-、および-(O-R₅)_{m1}-からなる群より選ばれる1個の基を含む主鎖構造を有する2価の基であるか、または、

40

-C(=O)-を末端に有し、かつ、アルキレン、アリーレン、-C(=O)-、-NR₄-、-C(=O)-NR₄-、-NR₄-C(=O)-、-O-、および-(O-R₅)_m-からなる群より選ばれる2個以上の基を含む主鎖構造を有する2価の基であり、

R₂が、水素原子またはアルキルであり、

R₃が、アルキレンまたはアリーレンであり、

mが、1~5の整数(すなわち、1、2、3、4、または5)であってもよい。

アルキレン、アリーレン、アルキルは、上述したものと同様である。

【0095】

より好ましくは、カルボニル含有リンカーは、-C(=O)-部分を末端に有し、かつ、アルキレンもしくはアリーレンまたはその組み合わせを含む主鎖構造を有する2価の基

50

であってもよい。

【0096】

さらにより好ましくは、カルボニル含有リンカーは、 $-C(=O)-$ 部分およびアルキレンを含む主鎖構造を有する2価の基(例、 $-C(=O)-CH_2-CH_2-$)であってもよい。

【0097】

カルボニル含有リンカーの主鎖構造は、1個以上(例えば1~10個、好ましくは1~8個、より好ましくは1~6個、さらにより好ましくは1~5個、特に好ましくは1~3個)の上述した置換基により置換されていてもよい。

【0098】

本発明では、式(A)においてL-Rで示される部分構造の分子量は、700以下である。L-Rで示される部分構造の分子量が700以下である場合、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩、およびチオール基導入抗体またはその塩は、抗体全体の分子量に対する上記部分構造の分子量の割合が非常に小さいため、分子量の差異に基づく分離が困難である。L-Rで示される部分構造の分子量は、好ましくは600以下であり、より好ましくは500以下であり、さらにより好ましくは400以下であり、特に好ましくは300以下、250以下、200以下、または150以下である。

【0099】

本発明では、抗体中間体またはその塩およびチオール基導入抗体またはその塩の合計量に対する抗体中間体またはその塩の量の百分率〔 $100(\%) \times (\text{抗体中間体またはその塩の量}) / (\text{抗体中間体またはその塩およびチオール基導入抗体またはその塩の合計量})$ 〕は、80%以上である。本発明で用いられる化合物またはその塩は、チオール基導入抗体またはその塩に対する反応効率に優れるため、このような百分率で表現される良好な反応性を達成することができる。このような百分率は、好ましくは82%以上、より好ましくは84%以上、さらにより好ましくは86%以上、特に好ましくは88%以上、90%以上、92%以上、94%以上、または96%以上である。このような百分率は、還元条件下の逆相HPLC、または質量分析による測定値に基づき決定することができる(実施例を参照)。

【0100】

本発明では、抗体中間体またはその塩およびチオール基導入抗体またはその塩の凝集率は、5%以下である。本発明で用いられる化合物によるチオール基導入抗体の修飾は、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)下で行うことができ、抗体の凝集を引き起こし難いためである。凝集率は、好ましくは4.8%以下、より好ましくは4.6%以下、さらにより好ましくは4.4%以下、特に好ましくは4.2%以下、4.0%以下、3.8%以下、3.6%以下、または3.4%以下である。抗体の凝集率は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)-HPLCにより測定することができる(実施例およびACS Omega 2020, 5, 7193-7200を参照)。

【0101】

抗体組成物に含まれる抗体中間体またはその塩の詳細は、抗体中間体またはその塩について後述するとおりである。

【0102】

本発明の抗体組成物は、(A)保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩、および(B)チオール基導入抗体またはその塩に加えて、チオール基導入抗体の作製原料として使用された抗体をさらにも含む。この場合、チオール基導入抗体の作製原料として使用された抗体の特性は、「保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体」および「チオール基導入抗体」に引き継がれることができる。したがって、チオール基導入抗体の作製原料として使用された抗体は、「保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体」および「チオール基導入抗体」にお

10

20

30

40

50

ける「抗体」と同様に定義することができる。

【0103】

本発明の抗体組成物は、チオール基導入抗体を、「脱離基 - L - R」で表される化合物と反応させることにより得ることができる(図1)。このような反応より、チオール基導入抗体におけるチオール基と、「脱離基 - L - R」で表される化合物におけるL中の脱離基結合原子とが結合し、かつ脱離基が脱離基結合原子から脱離して、抗体中間体またはその塩(反応生成物)、およびチオール基導入抗体またはその塩(未反応物)を含む抗体組成物が得られる。反応における、チオール基導入抗体またはその塩に対する、「脱離基 - L - R」で表される化合物またはその塩のモル比率(「脱離基 - L - R」で表される化合物またはその塩/チオール基導入抗体またはその塩)は、「脱離基 - L - R」で表される化合物またはその塩、およびチオール基導入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3~50である。

10

【0104】

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。

20

【0105】

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、還元条件下の逆相HPLC、または質量分析により行うことができる。

【0106】

本発明の抗体組成物は、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩を、凝集率が低い状態において高い含有率で含むことができる。保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩は、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に用いることができる。したがって、本発明の抗体組成物は、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、凝集率が低い状態において効率的に製造することができる。

30

【0107】

3. チオール基導入抗体またはその塩の誘導体化用試薬

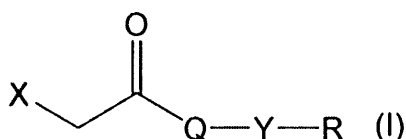
本発明は、チオール基導入抗体またはその塩の誘導体化用試薬を提供する。

【0108】

一実施形態では、本発明の試薬は、下記式(I)で表される化合物またはその塩を含む。

40

【化5】



(式中、

Xは、ハロゲン原子であり、

Qは、アリーレンまたはアルキレンであり、

50

Y は、結合手または 2 価の基であり、
R は、保護されていてもよい生体直交性官能基である。)

【0109】

式 (I) における X で表されるハロゲン原子は、上述したものと同一である。

【0110】

式 (I) における Q で表される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、フェニレン、ナフチレンが好ましく、フェニレンが好ましい。式 (I) における Q で表されるアルキレンとしては、例えば、直鎖または分岐鎖アルキレンが挙げられ、直鎖アルキレンが好ましい。直鎖アルキレンとしては、炭素原子数 1 ~ 6 の直鎖アルキレンが好ましく、炭素原子数 1 ~ 4 の直鎖アルキレンがより好ましい。

10

【0111】

式 (I) における Y で表される 2 価の基は、上述したものと同一である。

【0112】

特定の実施形態では、式 (I) における Y で表される 2 価の基は、 $-(O-R_5)_{m1}-$ を含む主鎖構造を有する基であってもよい。R₅ および m₁ は、上述したものと同一である。

【0113】

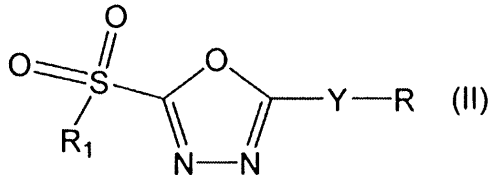
式 (I) における R で表される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したものと同一である。

【0114】

別の実施形態では、本発明の試薬は、下記式 (II) で表される化合物またはその塩を含む。

20

【化 6】



(式中、

R₁ は、アルキルであり、
Y は、2 価の基であり、
R は、保護されていてもよい生体直交性官能基である。)

30

【0115】

式 (II) における R₁ で表されるアルキルは、上述したものと同一である。

【0116】

式 (II) における Y で表される 2 価の基は、上述したものと同一である。

【0117】

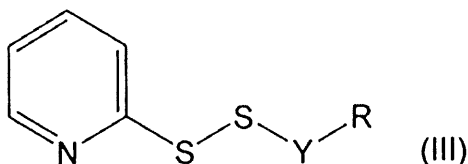
式 (II) における R で表される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したものと同一である。

40

【0118】

さらに別の実施形態では、本発明の試薬は、下記式 (III) で表される化合物またはその塩を含む。

【化 7】



50

(式中、

Yは、2価の基であり、

Rは、保護されていてもよい生体直交性官能基である。)

【0119】

式(III)におけるYで表される2価の基は、上述したのと同じである。

【0120】

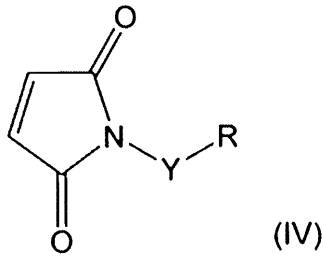
式(III)におけるRで表される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したのと同じである。

【0121】

さらに別の実施形態では、本発明の試薬は、下記式(IV)で表される化合物またはその塩を含む。

10

【化8】



20

(式中、

Yは、2価の基であり、

Rは、保護されていてもよい生体直交性官能基である。)

【0122】

式(IV)におけるYで表される2価の基は、上述したのと同じである。

【0123】

式(IV)におけるRで表される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したのと同じである。

【0124】

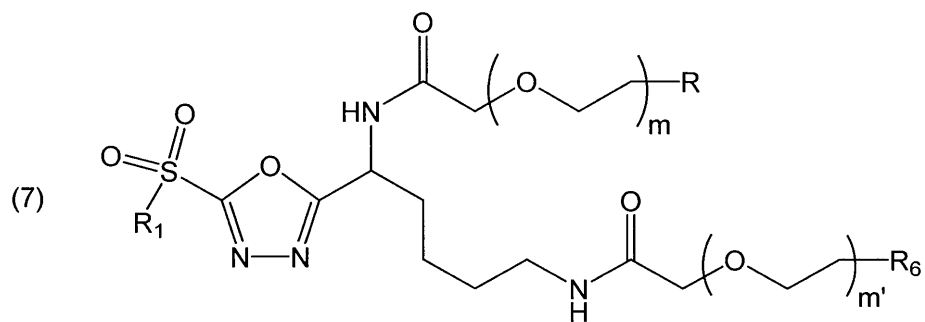
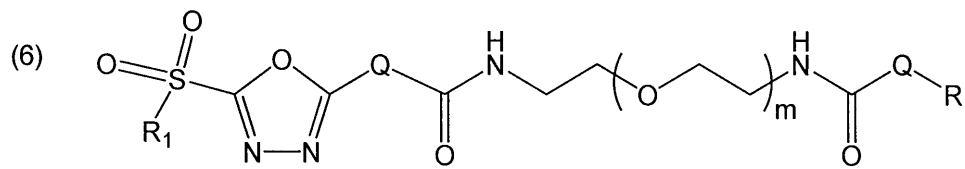
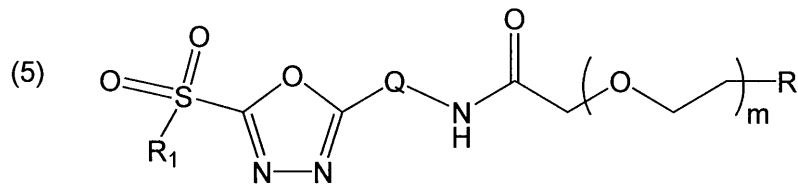
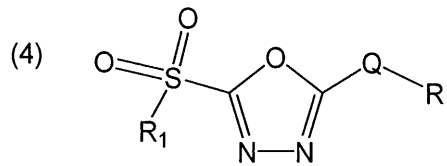
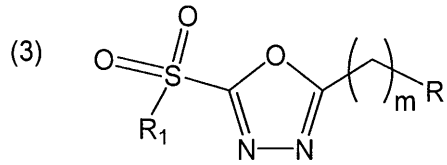
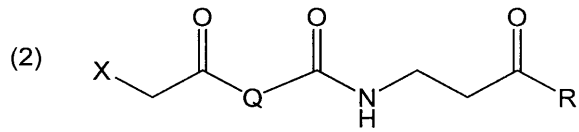
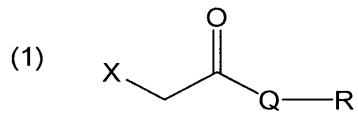
より具体的には、式(I)~(IV)で表される化合物は、下記式(1)~(12)で表される化合物であってもよい。

30

40

50

【化9】



10

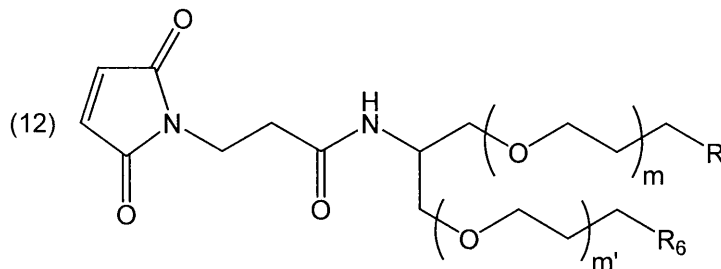
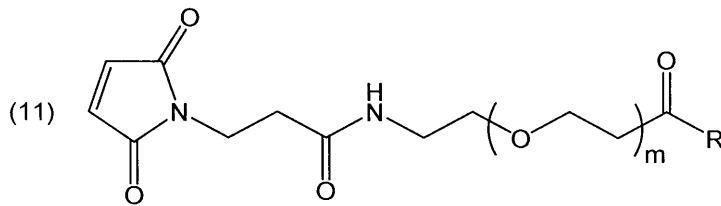
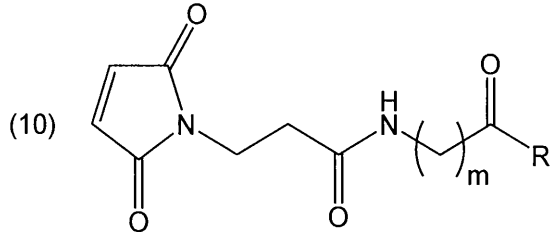
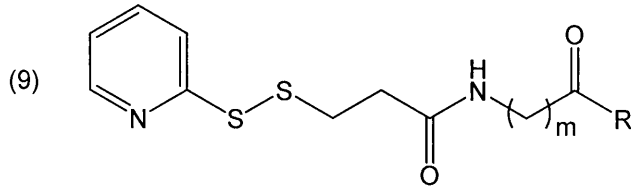
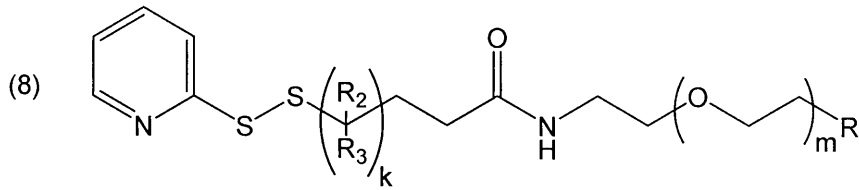
20

30

40

50

【化 1 0】



(式中、

k は、0 または 1 の整数であり、

m は、1 ~ 5 の整数 (好ましくは 1 ~ 3 の整数) であり、

m' は、1 ~ 5 の整数 (好ましくは 1 ~ 3 の整数) であり、

R₂ および R₃ は、それぞれ独立して、水素原子またはメチルであり、

R₆ は、保護されていてもよい生体直行性官能基であり、

X、R₁、Q および R は、上述したものと同一である。) 40

【0125】

本発明の試薬により誘導体化されるチオール基導入抗体またはその塩は、チオール基導入抗体または抗体について上述したとおりである。例えば、チオール基導入抗体におけるチオール基は、抗体重鎖の定常領域中のアミノ酸残基 (例、上述した修飾し易い側鎖を有するアミノ酸残基) の側鎖中の原子 (好ましくは、リジン残基の側鎖中の窒素原子) に対して、ペプチドを含有しないリンカーを介して、位置選択的に結合していてもよい。また、チオール基導入抗体は、IgG 抗体であってもよい。チオール基導入抗体としてヒト IgG 抗体が用いられる場合、このようなリジン残基は、EU numbering におけるヒト 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ものであってもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 6 】

本発明の試薬は、チオール基導入抗体またはその塩におけるチオール基（好ましくは、リジン残基の側鎖を介して導入されたチオール基）と反応することによりチオール基導入抗体またはその塩を誘導体化することができる。

【 0 1 2 7 】

本発明の試薬は、他の成分をさらに含む組成物の形態で提供されてもよい。このような他の成分としては、例えば、溶液、安定化剤（例、酸化防止剤、保存剤）が挙げられる。溶液としては、水溶液が好ましい。水溶液としては、例えば、水（例、蒸留水、滅菌蒸留水、精製水、生理食塩水）、緩衝液（例、リン酸水溶液、T r i s - 塩酸緩衝液、炭酸 - 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

10

【 0 1 2 8 】

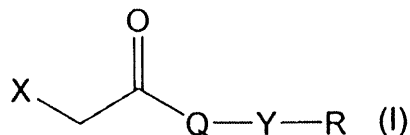
4. 化合物またはその塩

本発明はまた、化合物またはその塩を提供する。

【 0 1 2 9 】

一実施形態では、本発明の化合物は、下記式（I）で表される化合物またはその塩である。

【 化 1 1 】



20

（式中、

X は、ハロゲン原子であり、

Q は、アリーレンまたはアルキレンであり、

Y は、2 価の基であり、

R は、保護されていてもよい生体直交性官能基である。）

30

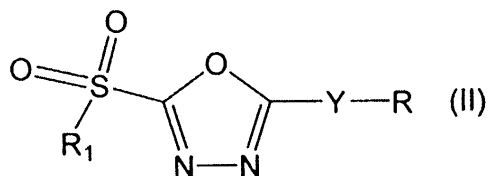
【 0 1 3 0 】

式（I）における、Xで表されるハロゲン原子、Qで表されるアリーレンまたはアルキレン、Yで表される2価の基、およびRで表される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したものと同一である。

【 0 1 3 1 】

別の実施形態では、本発明の化合物は、下記式（II）で表される化合物またはその塩である。

【 化 1 2 】



40

（式中、

R₁ は、アルキルであり、

Y は、2 価の基であり、

R は、保護されていてもよい生体直交性官能基である。）

【 0 1 3 2 】

式（II）における、R₁で表されるアルキル、Yで表される2価の基、およびRで表

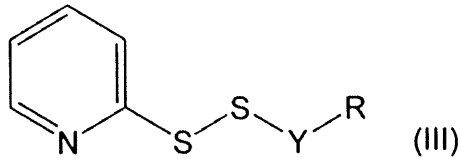
50

される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したものと同一である。

【0133】

さらに別の実施形態では、本発明の化合物は、下記式(III)で表される化合物またはその塩である。

【化13】



10

(式中、

Yは、2価の基であり、

Rは、保護されていてもよい生体直交性官能基である。)

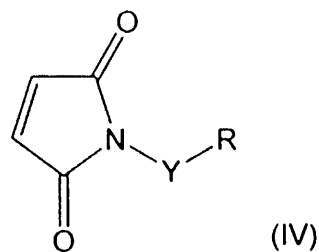
【0134】

式(III)における、Yで表される2価の基、およびRで表される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したものと同一である。

【0135】

さらに別の実施形態では、本発明の化合物は、下記式(IV)で表される化合物またはその塩である。

【化14】



20

(式中、

Yは、2価の基であり、

Rは、保護されていてもよい生体直交性官能基である。)

【0136】

式(IV)における、Yで表される2価の基、およびRで表される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したものと同一である。

【0137】

より具体的には、式(I)~(IV)で表される化合物は、上記式(2)~(12)で表される化合物であってもよい。

【0138】

式(I)~(IV)で表される化合物は、実施例に記載したような合成反応により得ることができる。例えば、このような反応は、適切な有機溶媒系において、適温(例、約4~90)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時間である。

40

【0139】

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、NMR、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、溶媒抽出、再結晶等の任意の方法により適宜精製することができる。

【0140】

本発明の化合物またはその塩は、チオール基導入抗体またはその塩の誘導体化に用いる

50

ことができる。

【0141】

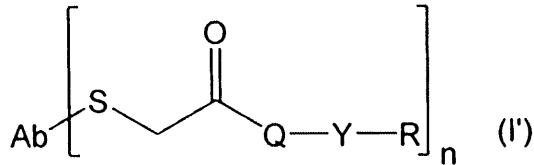
5. 抗体中間体またはその塩

本発明は、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体またはその塩を提供する。

【0142】

一実施形態では、本発明の抗体中間体は、下記式(I')で表される、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体である。

【化15】



10

(式中、

Abは、抗体であり、

Sは、硫黄原子であり、

Qは、アリーレンまたはアルキレンであり、

Yは、結合手または2価の基であり、

Rは、保護されていてもよい生体直交性官能基であり、

nは、1～8の整数である。)

20

【0143】

式(I')におけるAbで表される抗体、および抗体とそれに隣接する硫黄原子(S)の関係は、チオール基導入抗体または抗体について上述したものと同様である。例えば、抗体に隣接する硫黄原子(S)は、抗体重鎖の定常領域中のアミノ酸残基(例、上述した修飾し易い側鎖を有するアミノ酸残基)の側鎖中の原子(好ましくは、リジン残基の側鎖中の窒素原子)に対して、ペプチドを含有しないリンカーを介して、位置選択的に結合していてもよい。また、抗体は、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含む抗体(好ましくは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含み、かつ重鎖間および重鎖と軽鎖との間にジスルフィド結合を有するイムノグロブリン単位を含む抗体)であってもよい。さらに、抗体は、IgG抗体であってもよい。抗体としてヒトIgG抗体が用いられる場合、このようなリジン残基は、E U n u m b e r i n gにおけるヒト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ものであってもよい。位置選択性およびその程度は、上述したものと同様である。位置選択性の確認は、上述した方法により確認することができる。

30

【0144】

式(I')におけるnは、1～8の整数であり、好ましくは1～6の整数であり、より好ましくは1～4の整数(すなわち、1、2、3、または4)である。

【0145】

式(I')におけるQで表される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、フェニレン、ナフチレンが好ましく、フェニレンが好ましい。式(I')におけるQで表されるアルキレンとしては、例えば、直鎖または分岐鎖アルキレンが挙げられ、直鎖アルキレンが好ましい。直鎖アルキレンとしては、炭素原子数1～6の直鎖アルキレンが好ましく、炭素原子数1～4の直鎖アルキレンがより好ましい。

40

【0146】

式(I')における、Yで表される2価の基、およびRで表される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したものと同一である。

【0147】

特定の実施形態では、式(I')におけるYで表される2価の基は、 $-(O-R_3)_m$

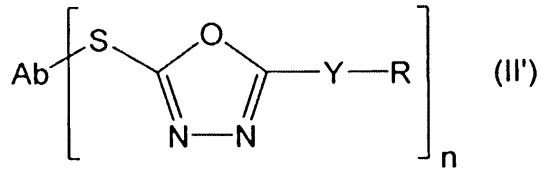
50

- を含む主鎖構造を有する基であってもよい。R₅ および m₁ は、上述したものと同じである。

【0148】

別の実施形態では、本発明の抗体中間体は、下記式 (II') で表される、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体である。

【化16】



10

(式中、

Ab は、抗体であり、

S は、硫黄原子であり、

Y は、結合手または2価の基であり、

R は、保護されていてもよい生体直交性官能基であり、

n は、1 ~ 8の整数である。)

【0149】

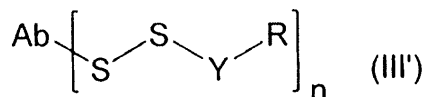
式 (II') における、Ab で表される抗体、抗体とそれに隣接する硫黄原子 (S) の関係、n で表される整数、Y で表される2価の基、および R で表される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したものと同じである。

20

【0150】

さらに別の実施形態では、本発明の抗体中間体は、下記式 (III') で表される、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体である。

【化17】



30

(式中、

Ab は、抗体であり、

S は、硫黄原子であり、

Y は、結合手または2価の基であり、

R は、保護されていてもよい生体直交性官能基であり、

n は、1 ~ 8の整数である。)

【0151】

式 (III') における、Ab で表される抗体、抗体とそれに隣接する硫黄原子 (S) の関係、n で表される整数、Y で表される2価の基、および R で表される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したものと同じである。

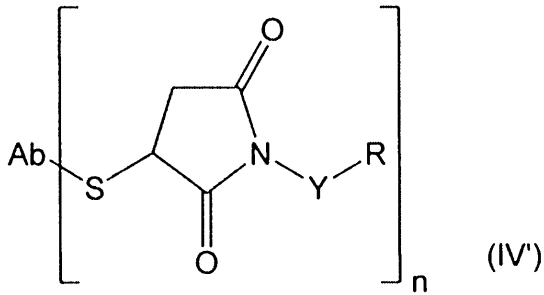
40

【0152】

さらに別の実施形態では、本発明の抗体中間体は、下記式 (IV') で表される、保護されていてもよい生体直交性官能基を有する抗体中間体である。

50

【化 1 8】



10

(式中、

A b は、抗体であり、

S は、硫黄原子であり、

Y は、結合手または 2 価の基であり、

R は、保護されていてもよい生体直交性官能基であり、

n は、1 ~ 8 の整数である。)

【0 1 5 3】

式 (IV') における、A b で表される抗体、抗体とそれに隣接する硫黄原子 (S) の関係、n で表される整数、Y で表される 2 価の基、および R で表される保護されていてもよい生体直交性官能基は、上述したものと同一である。

20

【0 1 5 4】

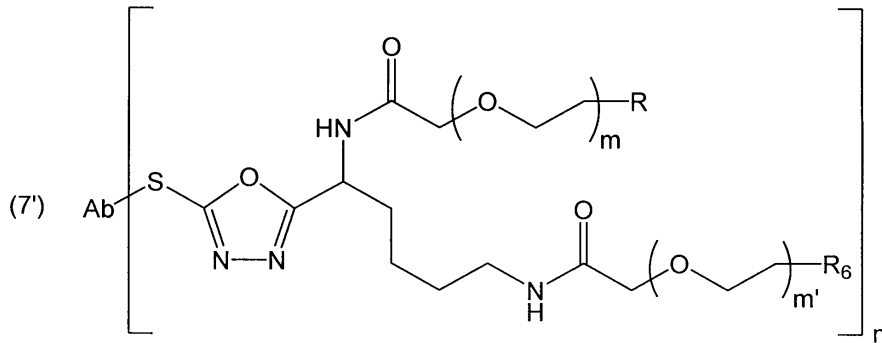
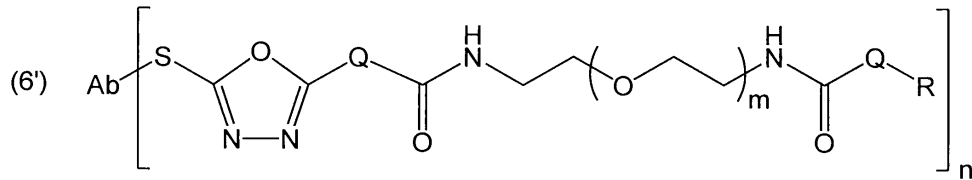
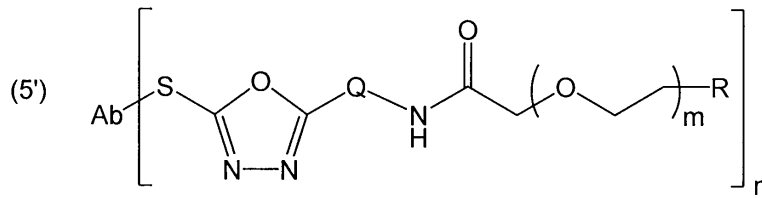
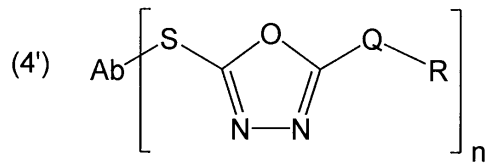
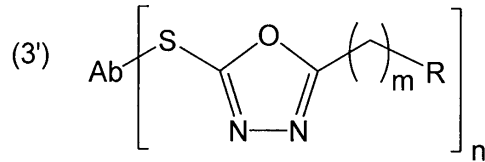
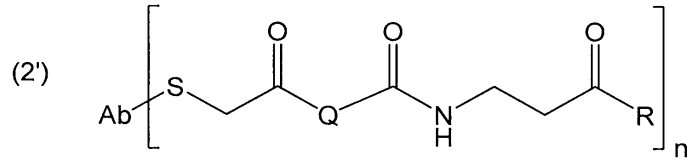
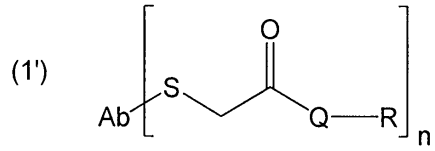
より具体的には、式 (I') ~ (IV') で表される抗体中間体は、下記式 (1') ~ (12') で表される抗体中間体であってもよい。

30

40

50

【化 1 9】



10

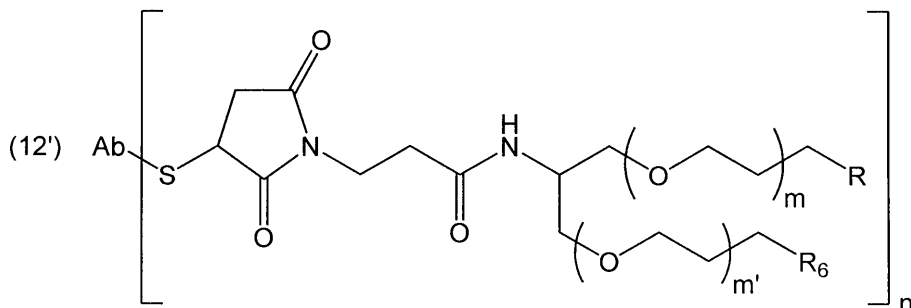
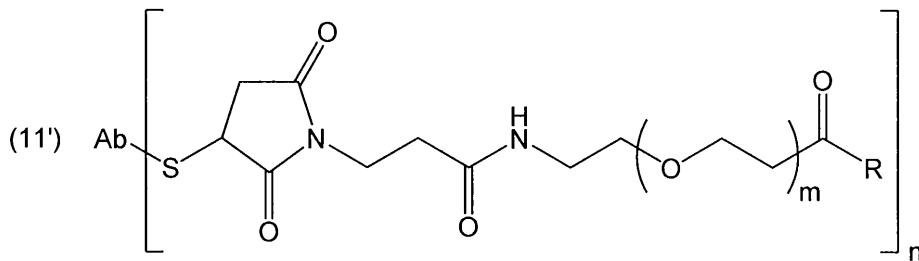
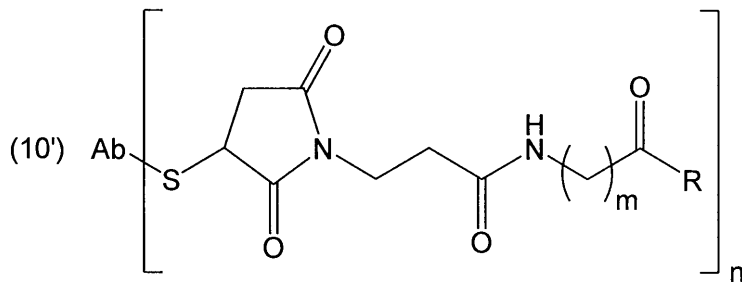
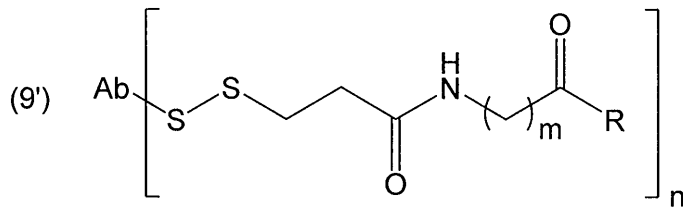
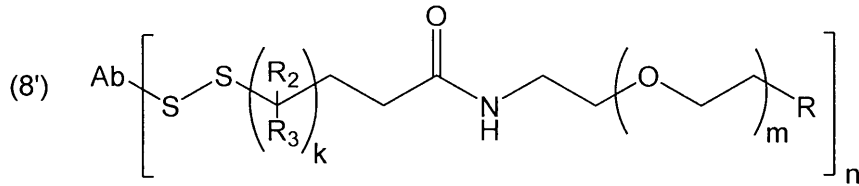
20

30

40

50

【化 2 0】



(式中、

k は、0 または 1 の整数であり、

m は、1 ~ 5 の整数（好ましくは 1 ~ 3 の整数）であり、

m' は、1 ~ 5 の整数（好ましくは 1 ~ 3 の整数）であり、

R₂ および R₃ は、それぞれ独立して、水素原子またはメチルであり、

R₆ は、保護されていてもよい生体直行性官能基であり、

Ab、Ab に隣接する S、Q、R および n は、上述したものと同一である。）

【0155】

本発明の抗体中間体またはその塩の凝集率は、5%以下であってもよい。本発明で用いられる化合物によるチオール基導入抗体の修飾は、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）下で行うことができ、抗体の凝集を引き起こし難いためである。凝集率は、好ましくは 4.8%以下、より好ましくは 4.6%以下、さらにより好ましくは 4.4%以下、特に好ましくは 4.2%以下、4.0%以

10

20

30

40

50

下、3.8%以下、3.6%以下、または3.4%以下である。抗体の凝集率は、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）-HPLCにより測定することができる（実施例およびACS Omega 2020, 5, 7193-7200を参照）。

【0156】

本発明の抗体中間体またはその塩はまた、高い血中安定性を有することができる。

【0157】

本発明の抗体中間体は、チオール基導入抗体を、式（I）～（IV）で表される化合物またはその塩と反応させることにより得ることができる（図1）。反応における、チオール基導入抗体またはその塩に対する、式（I）～（IV）で表される化合物またはその塩のモル比率（式（I）～（IV）で表される化合物またはその塩/チオール基導入抗体またはその塩）は、式（I）～（IV）で表される化合物またはその塩、およびチオール基導入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3～50である。

【0158】

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。

【0159】

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、還元条件下の逆相HPLC、または質量分析により行うことができる。

【0160】

本発明の抗体中間体は、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に用いることができる。

【0161】

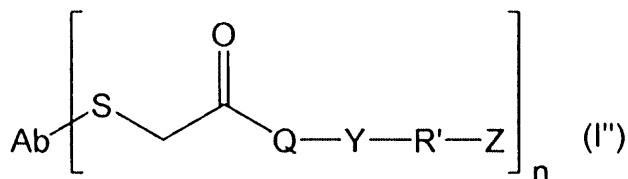
6. 抗体および機能性物質のコンジュゲートまたはその塩

本発明は、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。

【0162】

一実施形態では、本発明のコンジュゲートは、下記式（I'）で表される、抗体および機能性物質のコンジュゲートである。

【化21】



（式中、

Abは、抗体であり、

Sは、硫黄原子であり、

Qは、アリーレンまたはアルキレンであり、

Yは、結合手または2価の基であり、

10

20

30

40

50

R' は、互いに反応可能な2つの生体直交性官能基間の反応により生成する基であり、
Z は、機能性物質であり、
n は、1～8の整数である。)

【0163】

式(I')におけるAbで表される抗体、および抗体とそれに隣接する硫黄原子(S)の関係は、チオール基導入抗体または抗体について上述したものと同様である。例えば、抗体に隣接する硫黄原子(S)は、抗体重鎖の定常領域中のアミノ酸残基(例、上述した修飾し易い側鎖を有するアミノ酸残基)の側鎖中の原子(好ましくは、リジン残基の側鎖中の窒素原子)に対して、ペプチドを含有しないリンカーを介して、位置選択的に結合していてもよい。また、抗体は、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含む抗体(好ましくは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含み、かつ重鎖間および重鎖と軽鎖との間にジスルフィド結合を有するイムノグロブリン単位を含む抗体)であってもよい。さらに、抗体は、IgG抗体であってもよい。抗体としてヒトIgG抗体が用いられる場合、このようなリジン残基は、EU numberingにおけるヒト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ものであってもよい。位置選択性およびその程度は、上述したものと同様である。位置選択性の確認は、上述した方法により確認することができる。

10

【0164】

式(I')におけるnは、1～8の整数であり、好ましくは1～6の整数であり、より好ましくは1～4の整数(すなわち、1、2、3、または4)である。

20

【0165】

式(I')におけるR'で表される互いに反応可能な2つの生体直交性官能基間の反応により生成する基は、抗体中間体により保有される生体直交性官能基と、機能性物質により保有される生体直交性官能基(ここで、これらの生体直交性官能基は互いに反応可能な組合せとなるように選択される)との反応により生成する基である。互いに反応可能な2つの生体直交性官能基の組合せは周知であるため、当業者は、このような組合せを適宜選択して、互いに反応可能な2つの生体直交性官能基の反応により生成する部分を含む2個の基を適宜設定することができる。互いに反応可能な生体直交性官能基の組合せとしては、例えば、チオール残基とマレイミド残基の組み合わせ、フラン残基とマレイミド残基の組み合わせ、チオール残基とハロカルボニル残基の組み合わせ(置換反応により、ハロゲンがチオールに置換される)、アルキン残基(好ましくは、上述したような置換基により置換されていてもよい、炭素原子間3重結合を有する環基)とアジド残基の組み合わせ、テトラジン残基とアルケン残基の組み合わせ、テトラジン残基とアルキン残基の組み合わせ、チオール残基と別のチオール残基の組み合わせ(ジスルフィド結合)が挙げられる。したがって、上記部分は、チオール残基とマレイミド残基の反応により生成する基、フラン残基とマレイミド残基の反応により生成する基、チオール残基とハロカルボニル残基の反応により生成する基、アルキン残基とアジド残基の反応により生成する基、またはテトラジン残基とアルケン残基の反応により生成する基、チオール残基と別のチオール残基の組み合わせにより生成するジスルフィド基であってもよい。互いに反応可能な生体直交性官能基の組合せとしては、例えば、アルキン残基(好ましくは、上述したような置換基により置換されていてもよい、炭素原子間3重結合を有する環基)とアジドの組み合わせ、チオールとマレイミドの組み合わせ、テトラジンとアジドの組み合わせ、フランとマレイミドの組み合わせが挙げられる。好ましくは、互いに反応可能な生体直交性官能基の組合せは、アルキン残基(好ましくは、上述したような置換基により置換されていてもよい、炭素原子間3重結合を有する環基)とアジドの組み合わせであってもよい。互いに反応可能な2つの生体直交性官能基としてアルキン残基とアジドの組み合わせが使用される場合、R'は、2個のトリアゾール環基である。互いに反応可能な2つの生体直交性官能基として炭素原子間3重結合を有する環基とアジドの組み合わせが使用される場合、R'は、当該環基とトリアゾール環とが縮合した2個の環基である。炭素原子間3重結合を有する環基は上述したような置換基により置換されていてもよいことから、当該環基とトリアゾール環

30

40

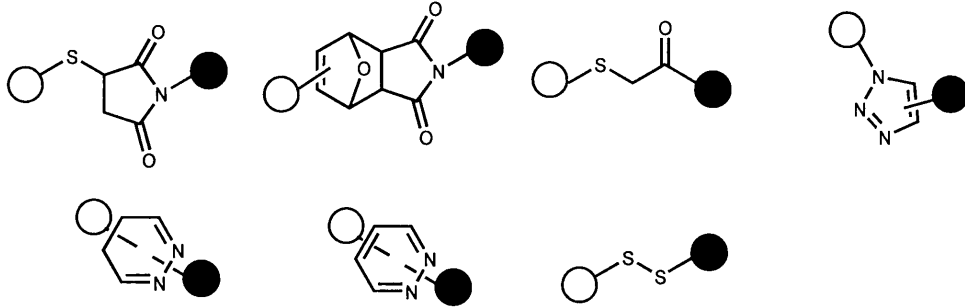
50

とが縮合した 2 個の環基もまた、上述したような置換基により置換されていてもよい。

【0166】

特定の実施形態では、互いに反応可能な 2 つの生体直交性官能基間の反応により生成する基は、下記構造式のうちのいずれか一つの構造式により表される 2 個の基であってもよい。

【化 2 2】



10

[ここで、白丸および黒丸は結合手を示す。白丸の結合手が A b 結合部側に存在する原子に結合している場合、黒丸の結合手が Z に結合していてもよく、白丸の結合手が Z に結合している場合、黒丸の結合手が A b 結合部側に存在する原子に結合していてもよい。]

【0167】

式 (I') における Q で表される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、フェニレン、ナフチレンが好ましく、フェニレンが好ましい。式 (I') における Q で表されるアルキレンとしては、例えば、直鎖または分岐鎖アルキレンが挙げられ、直鎖アルキレンが好ましい。直鎖アルキレンとしては、炭素原子数 1 ~ 6 の直鎖アルキレンが好ましく、炭素原子数 1 ~ 4 の直鎖アルキレンがより好ましい。

20

【0168】

式 (I') における、Y で表される 2 個の基、および Z で表される機能性物質は、上述したものと同一である。

【0169】

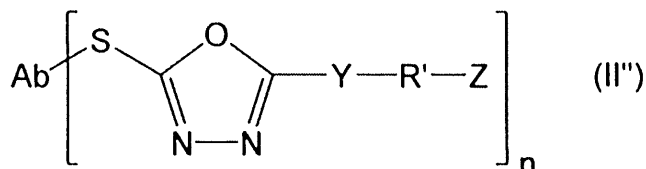
特定の実施形態では、式 (I') における Y で表される 2 個の基は、 $-(O-5R)_{m1}-$ を含む主鎖構造を有する基であってもよい。R₅ および m₁ は、上述したものと同一である。

30

【0170】

別の実施形態では、本発明のコンジュゲートは、下記式 (II') で表される、抗体および機能性物質のコンジュゲートである。

【化 2 3】



40

(式中、

A b は、抗体であり、

S は、硫黄原子であり、

Y は、結合手または 2 個の基であり、

R' は、互いに反応可能な 2 つの生体直交性官能基間の反応により生成する基であり、

Z は、機能性物質であり、

n は、1 ~ 8 の整数である。)

50

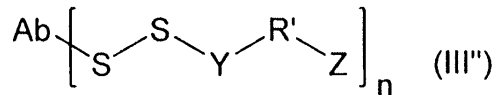
【0171】

式(II')におけるAbで表される抗体、および抗体とそれに隣接する硫黄原子(S)の関係、nで表される整数、Yで表される2価の基、R'で表される互いに反応可能な2つの生体直交性官能基間の反応により生成する基、およびZで表される機能性物質は、上述したものと同一である。

【0172】

さらに別の実施形態では、本発明のコンジュゲートは、下記式(III')で表される、抗体および機能性物質のコンジュゲートである。

【化24】



10

(式中、

Abは、抗体であり、

Sは、硫黄原子であり、

Yは、結合手または2価の基であり、

R'は、互いに反応可能な2つの生体直交性官能基間の反応により生成する基であり、

Zは、機能性物質であり、

nは、1～8の整数である。)

20

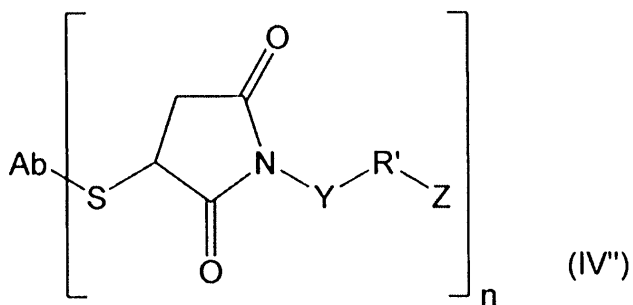
【0173】

式(III')におけるAbで表される抗体、および抗体とそれに隣接する硫黄原子(S)の関係、nで表される整数、Yで表される2価の基、R'で表される互いに反応可能な2つの生体直交性官能基間の反応により生成する基、およびZで表される機能性物質は、上述したものと同一である。

【0174】

さらに別の実施形態では、本発明のコンジュゲートは、下記式(IV')で表される、抗体および機能性物質のコンジュゲートである。

【化25】



30

(式中、

Abは、抗体であり、

Sは、硫黄原子であり、

Yは、結合手または2価の基であり、

R'は、互いに反応可能な2つの生体直交性官能基間の反応により生成する基であり、

Zは、機能性物質であり、

nは、1～8の整数である。)

40

【0175】

式(IV')におけるAbで表される抗体、および抗体とそれに隣接する硫黄原子(S)の関係、nで表される整数、Yで表される2価の基、R'で表される互いに反応可能な2つの生体直交性官能基間の反応により生成する基、およびZで表される機能性物質は、上

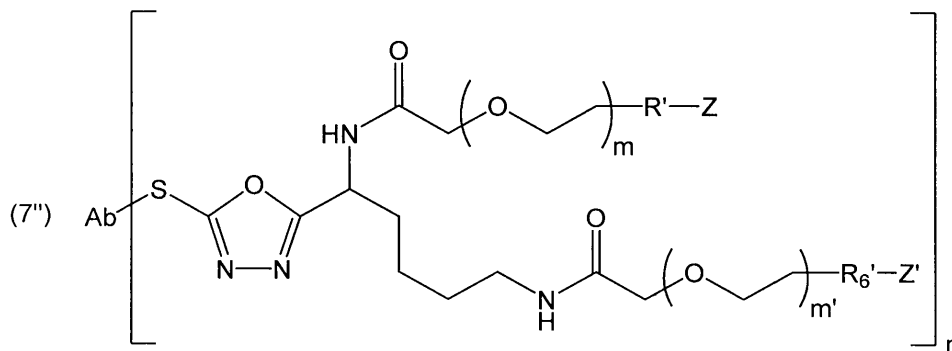
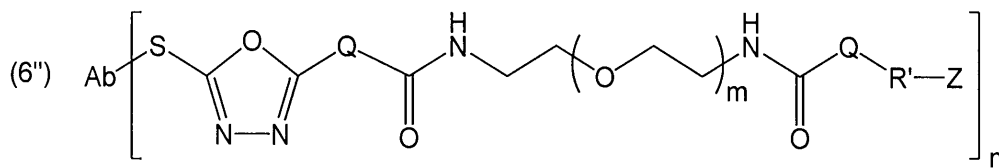
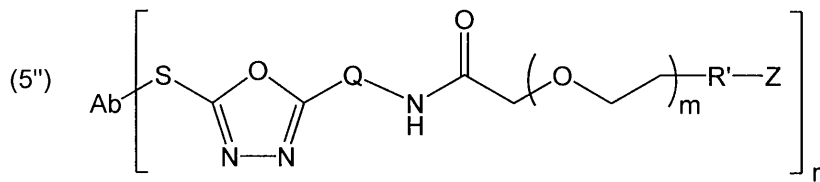
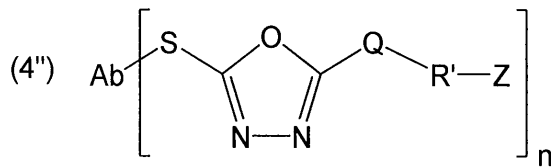
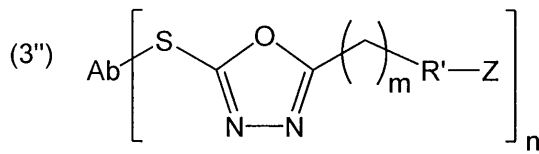
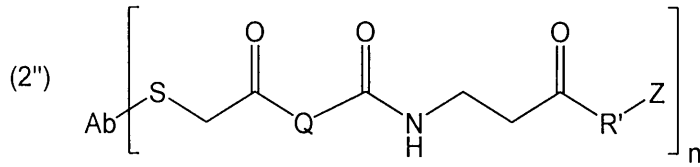
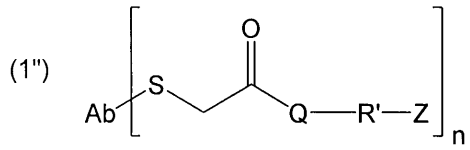
50

述したものと同一である。

【0176】

より具体的には、式(Ⅰ'')~(Ⅳ'')で表されるコンジュゲートは、下記式(1'')~(12'')で表されるコンジュゲートであってもよい。

【化26】



10

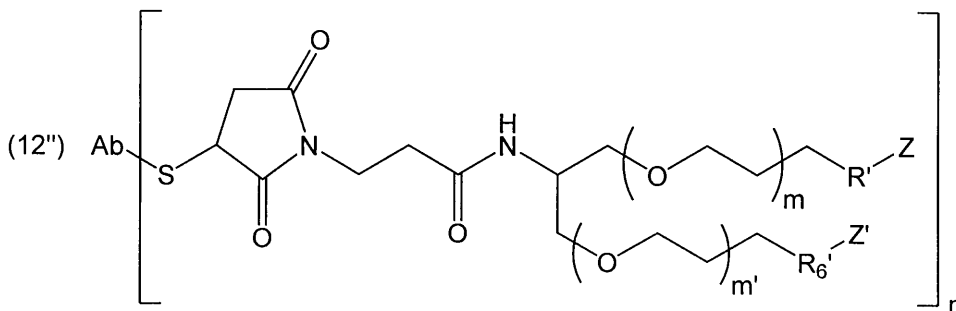
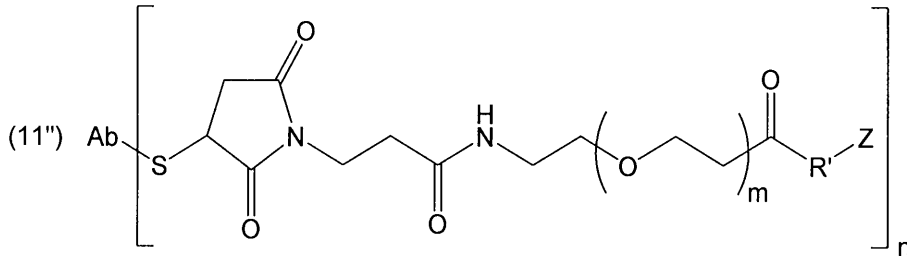
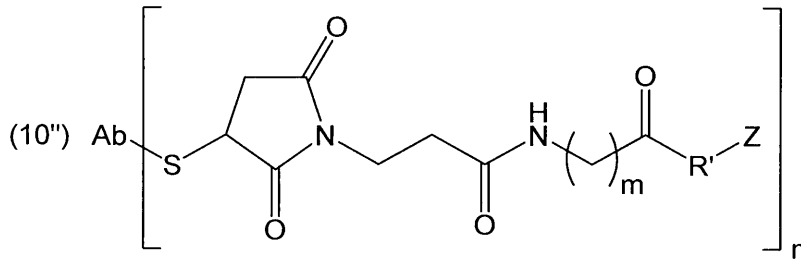
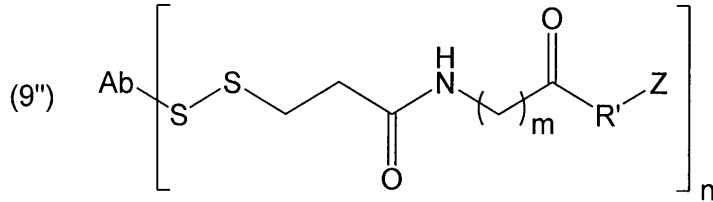
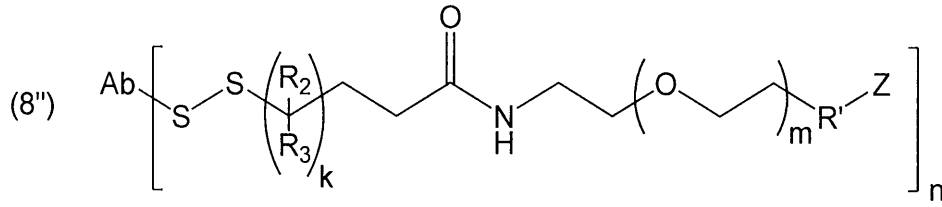
20

30

40

50

【化 2 7】



(式中、

k は、0 または 1 の整数であり、

m は、1 ~ 5 の整数 (好ましくは 1 ~ 3 の整数) であり、

m' は、1 ~ 5 の整数 (好ましくは 1 ~ 3 の整数) であり、

R₂ および R₃ は、それぞれ独立して、水素原子またはメチルであり、

R₆' は、互いに反応可能な 2 つの生体直交性官能基間の反応により生成する基であり、

Z' は、機能的物質であり、

Ab、Ab に隣接する S、Q、R'、Z および n は、上述したものと同一である。)

【 0 1 7 7】

本発明のコンジュゲートまたはその塩の凝集率は、10% 以下であってもよい。本発明で用いられる抗体中間体またはその塩は、凝集率が 5% 以下であり、本発明のコンジュゲートまたはその塩は、このような抗体中間体またはその塩を、タンパク質の変性・分解 (

10

20

30

40

50

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)下の反応に付すことにより得ることができ、抗体の凝集を引き起こし難いためである。凝集率は、好ましくは9%以下、より好ましくは8.5%以下、さらにより好ましくは8.0%以下、特に好ましくは7.5%以下、7.0%以下、6.5%以下、6.0%以下、5.5%以下、5%以下、4.8%以下、4.6%以下、4.4%以下、4.2%以下、4.0%以下、3.8%以下、3.6%以下、または3.4%以下であってもよい。抗体の凝集率は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)-HPLCにより測定することができる(実施例およびACS Omega 2020, 5, 7193-7200を参照)。

【0178】

本発明のコンジュゲートまたはその塩はまた、高い血中安定性を有することができる。

10

【0179】

本発明のコンジュゲートまたはその塩は、本発明の抗体中間体またはその塩を、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。反応において、抗体中間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/抗体中間体またはその塩)は、抗体中間体またはその塩、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。抗体中間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、抗体中間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。

20

【0180】

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、還元条件下の逆相HPLC、また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、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。

【0181】

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)として用いることができる。

【0182】

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いてもよい。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。

30

40

【0183】

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

50

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。

【0184】

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。

【0185】

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。

10

【実施例】

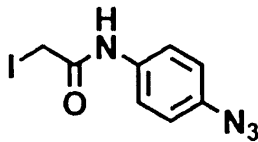
【0186】

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。

【0187】

比較例1：N-(4-azidophenyl)-2-iodoacetamideによるアジド基の導入

【化28】



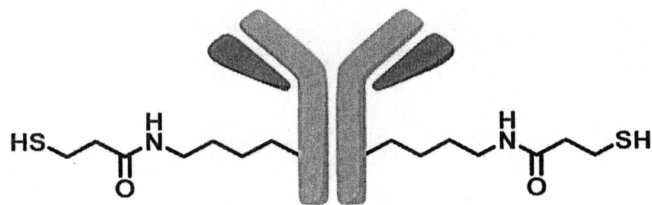
20

【0188】

以降の比較例および実施例では、チオール基導入抗体として、国際公開第2019/240287号(WO2019/240287A1)の実施例81-7に記載される抗体誘導体(チオール基導入トラスツズマブ)を用いた。この抗体誘導体は、抗体重鎖の246位または248位のリジン残基の側鎖のアミノ基を介して、トラスツズマブ(ヒト化IgG1抗体)にチオール基が位置選択的に導入されている下記構造を有する(リジン残基の位置はE U n u m b e r i n gに従う)。

30

【化29】



(上記構造において、抗体重鎖から伸びているNH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-は、リジン残基の側鎖に対応し、このリジン残基の側鎖中のアミノ基に対してチオール含有基であるHS-CH₂-CH₂-C(=O)が付加されている。)

40

【0189】

チオール基導入抗体のbuffer(pH8.0のHEPESバッファー)溶液(50 μM)に20等量のN-(4-azidophenyl)-2-iodoacetamideのDMF溶液(12.5 mM)及び50等量のヨウ化ナトリウムのバッファー(pH8.0のHEPESバッファー)溶液(100 mM)を加え、37 °Cにて2時間静置後、NAP-5 Columns(GEヘルスケア社製)を用いて精製した。

【0190】

生成物にトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液(0.5 mM)を加え

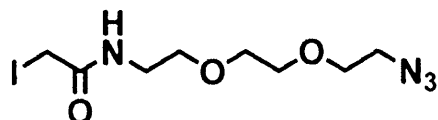
50

て、室温で10分攪拌し、既報(WO2019/240287A1)に従ってESI-TOFMSにより質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は50683、50845に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジド基が導入された50831、50993および、原料と同じ50683、50845に重鎖ピークおよび、23439に軽鎖ピークが観測された。

【0191】

比較例2：N-[2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethyl]-2-iodoacetamideによるアジド基の導入

【化30】



10

【0192】

チオール基導入抗体のbuffer(pH8.0のHEPESバッファー)溶液(50 μM)に50等量のN-[2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethyl]-2-iodoacetamideのDMF溶液(31.3mM)及び50等量のヨウ化ナトリウムのバッファー(pH8.0のHEPESバッファー)溶液(100 mM)を加え、37にて2時間静置後、NAP-5 Columns(GEヘルスケア社製)を用いて精製した。

20

【0193】

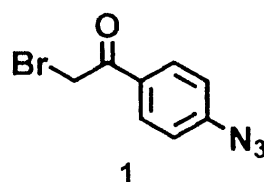
生成物にトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液(0.5mM)を加えて、室温で10分攪拌し、既報(WO2019/240287A1)に従ってESI-TOFMSにより質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は50683、50845に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジド基が導入された50896、51058および、原料と同じ50683、50845に重鎖ピークおよび、23439に軽鎖ピークが観測された。

【0194】

実施例1：アジドリンカー(1)によるアジド基の導入

30

【化31】



1

【0195】

チオール基導入抗体のbuffer(pH7.4PBSバッファー、10mM EDTA)溶液(20 μM)にアジドリンカー(1、Aldrich社製)のDMF溶液(1.25mM)を5等量加え、室温にて1時間静置後、NAP-5 Columns(GEヘルスケア社製)を用いて精製した。

40

【0196】

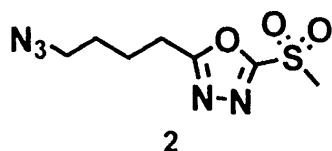
生成物にトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液(0.5mM)を加えて、室温で10分攪拌し、既報(WO2019/240287A1)に従ってESI-TOFMSにより質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は50683、50845に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジド基が導入された50816、50978および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0197】

実施例2：アジドリンカー(2)によるアジド基の導入

50

【化32】



【0198】

(1) アジドリンカー(2)の合成

(1-1) 5-azidopentanehydrazideの合成

【化33】



【0199】

5-azidopentanoic acid (200 mg, 1.4 mmol) の THF 溶液 (10 mL) を 0 に冷却し、N-メチルモルフォリン (0.32 mL, 2.1 mmol) 及びクロロギ酸イソブチル (0.22 mL, 1.7 mmol) を加えた。0 にて30分間攪拌した後、ヒドラジン-水和物 (0.087 mL, 2.8 mmol) 及び DIPEA (0.71 mL, 4.2 mmol) を加えた。室温にて16時間攪拌した後、減圧下濃縮を行い、得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、5-(4-azidobutyl)-1,3,4-oxadiazole-2-thiol を得た (111 mg, 0.71 mmol, 収率 51%)。

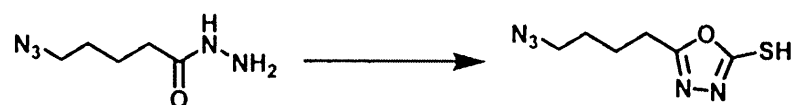
【0200】

MS (ESI) m/z : 158 [M+H]

【0201】

(1-2) 5-(4-azidobutyl)-1,3,4-oxadiazole-2-thiol の合成

【化34】



【0202】

5-azidopentanehydrazide (111 mg, 0.71 mmol) のエタノール溶液 (7.1 mL) に二硫化炭素 (0.055 mL, 0.92 mmol) 及び水酸化カリウム (192 mg, 3.4 mmol) を加え、70度にて16時間攪拌した後、6 M 塩酸水溶液を加え、系内の pH を 3.0 に調整した。調整後、酢酸エチルによる分液抽出を行い、有機相を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、5-(4-azidobutyl)-1,3,4-oxadiazole-2-thiol を得た (35 mg, 0.18 mmol, 収率 25%)。

【0203】

MS (ESI) m/z : 200 [M+H]

【0204】

(1-3) 2-(4-azidobutyl)-5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazole の合成

10

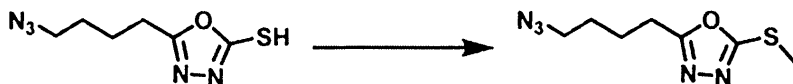
20

30

40

50

【化35】



【0205】

5-(4-azidobutyl)-1,3,4-oxadiazole-2-thiol (35 mg, 0.18 mmol) の THF 溶液 (1.8 mL) にヨードメタン (0.033 mL, 0.53 mmol) 及びトリエチルアミン (0.074 mL, 0.53 mmol) を加え、室温にて16時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、2-(4-azidobutyl)-5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazole を得た (33 mg, 0.15 mmol, 収率 85%)。

10

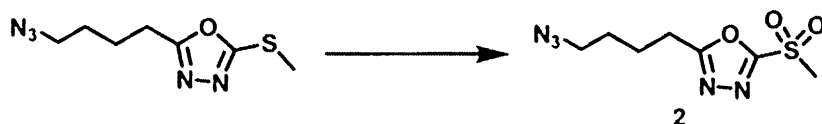
【0206】

MS (ESI) m/z : 214 [M+H]

【0207】

(1-4) アジドリンカー (2) の合成

【化36】



20

【0208】

2-(4-azidobutyl)-5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazole (33 mg, 0.15 mmol) のジクロロメタン溶液 (1.5 mL) を 0 に冷却し、mCPBA (0.311 g, 1.3 mmol) を加えた。室温にて20時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルによる分液抽出を行った。有機層を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、アジドリンカー (2) を得た (26 mg, 0.11 mmol, 収率 71%)。

30

【0209】

MS (ESI) m/z : 246 [M+H]

【0210】

(2) アジドリンカー (2) によるアジド基の導入

チオール基導入抗体の buffer (pH 7.4 PBS バッファー、10 mM EDTA) 溶液 (20 μM) にアジドリンカー (2) の DMF 溶液 (1.25 mM) を 5 等量加え、室温にて1時間静置後、NAP-5 Columns (GEヘルスケア社製) を用いて精製した。

40

【0211】

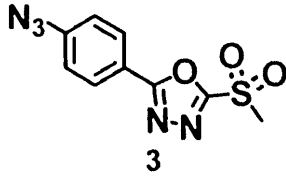
生成物にトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 (0.5 mM) を加えて、室温で10分攪拌し、既報 (WO2019/240287A1) に従って ESI-TOFMS により質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は 50683、50845 に重鎖ピーク、23439 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジド基が導入された 50846、51008 および、原料と同じ 23439 に軽鎖ピークが観測された。

【0212】

実施例 3 : アジドリンカー (3) によるアジド基の導入

50

【化37】



【0213】

(1) アジドリナー(3)の合成

(1-1) 2-(4-azidophenyl)-5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoleの合成

10

【化38】



【0214】

4-(5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)anilineのトリフルオロ酢酸塩(48mg, 0.15mmol)のジクロロメタン溶液(3.0mL)に2-アジド-1,3-ジメチルイミダゾリニウムヘキサフルオロホスファート(137mg, 0.48mmol)及びDMAc(86mg, 0.70mmol)を加え、50℃にて16時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、2-(4-azidophenyl)-5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoleを得た(26mg, 0.11mmol, 収率73%)。

20

【0215】

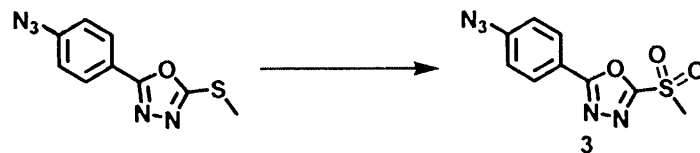
MS(ESI) m/z: 234 [M+H]

【0216】

(1-2) アジドリナー(3)の合成

30

【化39】



2-(4-azidophenyl)-5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazole(26mg, 0.11mmol)のジクロロメタン溶液(1.1mL)を0℃に冷却し、mCPBA(113mg, 0.45mmol)を加えた。室温にて20時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルによる分液抽出を行った。有機層を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、アジドリナー(3)を得た(23mg, 0.086mmol, 収率78%)。

40

【0217】

MS(ESI) m/z: 266 [M+H]

【0218】

(2) アジドリナー(3)によるアジド基の導入

実施例2(2)に記載の手法と同様の方法にてチオール基導入抗体にアジドリナー(

50

3) を反応させた。

【0219】

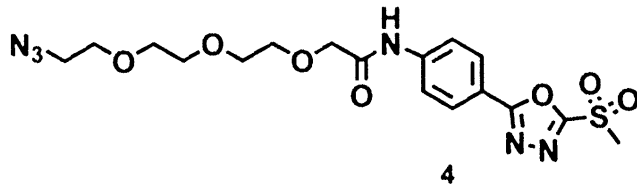
生成物にトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液(0.5 mM)を加えて、室温で10分攪拌し、既報(WO2019/240287A1)に従ってESI-TOFMSにより質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は50683、50845に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジド基が導入された50841、51002および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0220】

実施例4：アジドリナー(4)によるアジド基の導入

【化40】

10



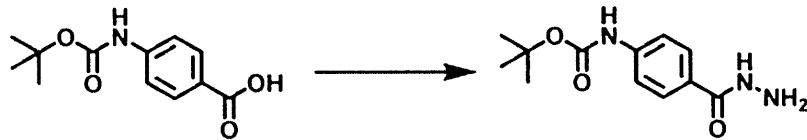
【0221】

(1) アジドリナー(4)の合成

(1-1) tert-butyl N-[4-(hydrazinocarbonyl)phenyl]carbamateの合成

20

【化41】



【0222】

4-(tert-butoxycarbonylamino)benzoic acid (200 mg, 0.84 mmol)のTHF溶液(8.4 mL)を0 に冷却し、N-メチルモルホリン(0.14 mL, 1.3 mmol)及びクロロギ酸イソブチル(0.13 mL, 1.0 mmol)を加えた。0 にて30分間攪拌した後、ヒドラジン-水和物(0.078 mL, 2.5 mmol)及びDIPEA(0.30 mL, 1.7 mmol)を加えた。室温にて16時間攪拌した後、減圧下濃縮を行い、得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、tert-butyl N-[4-(hydrazinocarbonyl)phenyl]carbamateを得た(187 mg, 0.74 mmol, 収率88%)。

30

【0223】

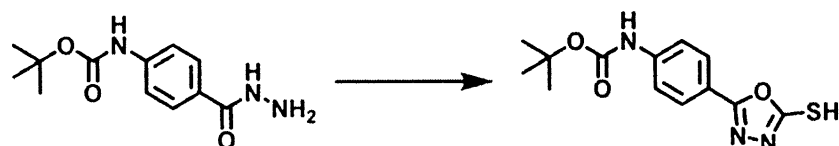
MS(ESI) m/z : 252 [M+H]

40

【0224】

(1-2) tert-butyl N-[4-(5-sulfanyln-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl]carbamateの合成

【化42】



50

【0225】

tert-butyl N-[4-(hydrazinecarbonyl)phenyl]carbamate (187 mg, 0.74 mmol) のエタノール溶液 (7.4 mL) に二硫化炭素 (0.058 mL, 0.97 mmol) 及び水酸化カリウム (125 mg, 2.2 mmol) を加え、75 °C にて16時間攪拌した後、6 M塩酸水溶液を加え、系内のpHを3.0に調整した。調整後、酢酸エチルによる分液抽出を行い、有機相を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、tert-butyl N-[4-(5-sulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl]carbamate を得た (99 mg, 0.34 mmol, 収率45%)。

10

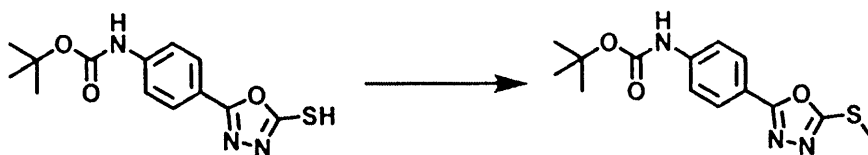
【0226】

MS (ESI) m/z : 294 [M+H]

【0227】

(1-3) tert-butyl N-[4-(5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl]carbamate の合成

【化43】



20

【0228】

tert-butyl N-[4-(5-sulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl]carbamate (99 mg, 0.34 mmol) のTHF溶液 (3.4 mL) を0 °C に冷却し、ヨードメタン (0.063 mL, 1.0 mmol) 及びトリエチルアミン (0.14 mL, 1.0 mmol) を加え、室温にて3時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、tert-butyl N-[4-(5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl]carbamate を得た (88 mg, 0.29 mmol, 収率84%)。

30

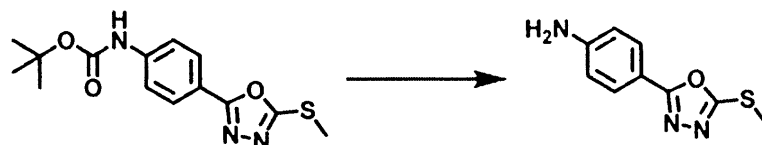
【0229】

MS (ESI) m/z : 308 [M+H]

【0230】

(1-4) 4-(5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)aniline の合成

【化44】



40

【0231】

tert-butyl N-[4-(5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl]carbamate (88 mg, 0.29 mmol) のジクロロメタン溶液 (2.9 mL) にトリフルオロ酢酸 (2.9 mL) を加え、室温にて1時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮することにより4-(5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)aniline

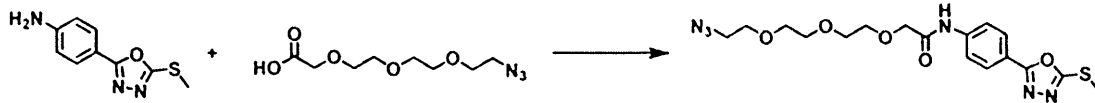
50

のトリフルオロ酢酸塩を得た (93 mg, 0.29 mmol, 収率 100%)。

【0232】

(1-5) 2-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy-N-[4-(5-methylsulfonyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl]acetamideの合成

【化45】



10

【0233】

4-(5-methylsulfonyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)anilineのトリフルオロ酢酸塩 (57 mg, 0.18 mmol) のジクロロメタン溶液 (1.8 mL) に 2-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]acetic acid (102 mg, 0.43 mmol)、EDCI (115 mg, 0.60 mmol)、DMAP (9.4 mg, 0.077 mmol) 及びトリエチルアミン (0.114 mL, 0.82 mmol) を加えた。室温にて2時間攪拌した後、反応液を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、2-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]-N-[4-(5-methylsulfonyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl]acetamideを得た (73 mg, 0.17 mmol, 収率 94%)。

20

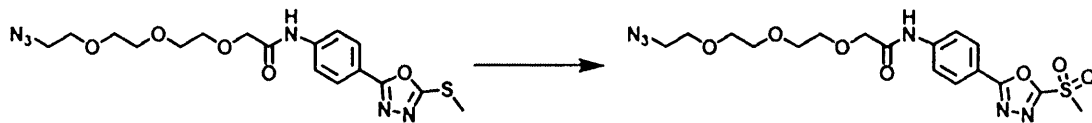
【0234】

MS (ESI) m/z : 423 [M+H]

【0235】

(1-6) アジドリンカー (4) の合成

【化46】



30

【0236】

2-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]-N-[4-(5-methylsulfonyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenyl]acetamide (73 mg, 0.17 mmol) のジクロロメタン溶液 (1.7 mL) を 0 に冷却し、mCPBA (185 mg, 0.75 mmol) を加えた。室温にて20時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルによる分液抽出を行った。有機層を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、アジドリンカー (4) を得た (1.2 mg, 0.0026 mmol, 収率 1.8%)。

40

【0237】

MS (ESI) m/z : 455 [M+H]

【0238】

(2) アジドリンカー (4) によるアジド基の導入

実施例 2 (2) に記載の手法と同様の方法にてチオール基導入抗体にアジドリンカー (4) を反応させた。

50

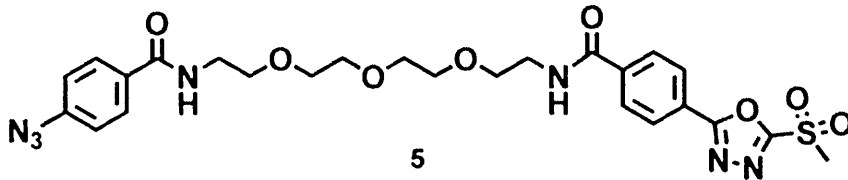
【0239】

生成物にトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液(0.5 mM)を加えて、室温で10分攪拌し、既報(WO2019/240287A1)に従ってESI-TOFMSにより質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は50683、50845に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジド基が導入された51057、51219および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0240】

実施例5：アジドリinker(5)によるアジド基の導入

【化47】



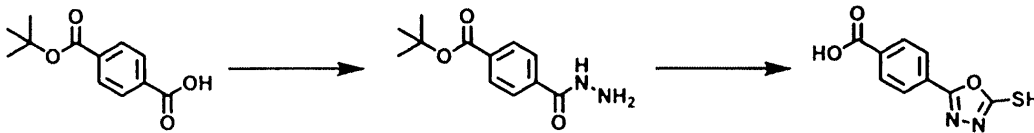
10

【0241】

(1) アジドリinker(5)の合成

(1-1) 4-(5-sulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)benzoic acidの合成

【化48】



20

【0242】

4-tert-butoxycarbonylbenzoic acid(307.0 mg, 1.38 mmol)のジクロロメタン溶液(10 mL)にヒドラジン-水合物(0.0558 mL, 1.79 mmol)、EDCI(411.1 mg, 2.14 mmol)、DMAP(18.1 mg, 0.14 mmol)及びトリエチルアミン(0.462 mL, 3.34 mmol)を加えた。室温にて16時間攪拌した後、減圧下濃縮を行い、得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製しtert-butyl 4-(hydrazinyl)benzoateの混合物を得た。

30

【0243】

得られた混合物のエタノール溶液(10 mL)に二硫化炭素(0.0471 mL, 0.78 mmol)及び水酸化カリウム(103.7 mg, 1.80 mmol)を加え、70にて16時間攪拌した後、6 M塩酸水溶液を加え、系内のpHを3.0に調整した。調整後、酢酸エチルによる分液抽出を行い、有機相を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、4-(5-sulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)benzoic acidを得た(72.9 mg, 0.33 mmol, 2工程収率24%)。

40

【0244】

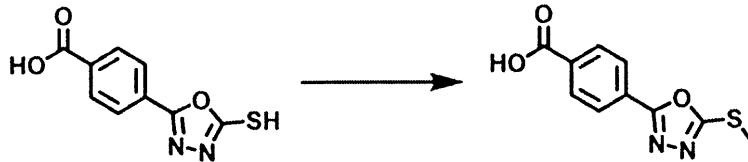
MS(ESI) m/z: 223 [M+H]

【0245】

(1-2) 4-(5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)benzoic acidの合成

50

【化49】



【0246】

4 - (5 - sulfanyl - 1 , 3 , 4 - oxadiazol - 2 - yl) benzoic acid (72 . 9 mg , 0 . 33 mmol) の THF 溶液 (3 . 3 mL) を 0 に冷却し、ヨードメタン (0 . 616 mL , 0 . 99 mmol) 及びトリエチルアミン (0 . 228 mL , 1 . 60 mmol) を加え、室温にて3時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、4 - (5 - methylsulfanyl - 1 , 3 , 4 - oxadiazol - 2 - yl) benzoic acid を得た (66 . 2 mg , 0 . 28 mmol , 収率 88 %) 。

10

【0247】

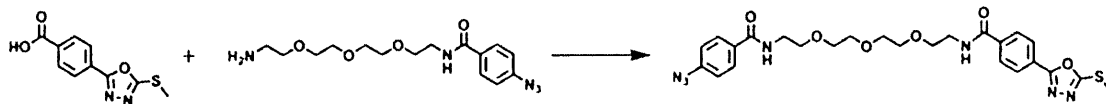
MS (ESI) m / z : 237 [M + H]

【0248】

(1 - 3) N - [2 - [2 - [2 - [2 - [(4 - azidobenzoyl) amino] ethoxy] ethoxy] ethoxy] ethyl] - 4 - (5 - methylsulfanyl - 1 , 3 , 4 - oxadiazol - 2 - yl) benzamide の合成

20

【化50】



【0249】

4 - (5 - methylsulfanyl - 1 , 3 , 4 - oxadiazol - 2 - yl) benzoic acid (66 . 2 mg , 0 . 28 mmol) のジクロロメタン溶液 (2 . 8 mL) に N - [2 - [2 - [2 - (2 - aminoethoxy) ethoxy] ethoxy] ethyl] - 4 - azido - benzamide (0 . 190 mg , 0 . 42 mmol) 、 EDCI (88 . 5 mg , 0 . 46 mmol) 、 DMAP (7 . 2 mg , 0 . 059 mmol) 及びトリエチルアミン (0 . 116 mL , 0 . 84 mmol) を加えた。室温にて5時間攪拌した後、反応液を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、N - [2 - [2 - [2 - [2 - [(4 - azidobenzoyl) amino] ethoxy] ethoxy] ethoxy] ethyl] - 4 - (5 - methylsulfanyl - 1 , 3 , 4 - oxadiazol - 2 - yl) benzamide を得た (104 mg , 0 . 19 mmol , 収率 67 %) 。

30

40

【0250】

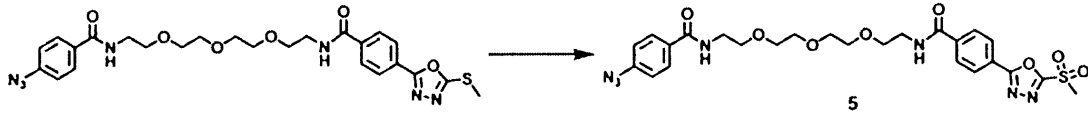
MS (ESI) m / z : 556 [M + H]

【0251】

(1 - 4) アジドリンカー (5) の合成の合成

50

【化51】



【0252】

N - [2 - [2 - [2 - [2 - [(4 - a z i d o b e n z o y l) a m i n o] e t h o x y] e t h o x y] e t h o x y] e t h y l] - 4 - (5 - m e t h y l s u l f a n y l - 1 , 3 , 4 - o x a d i a z o l - 2 - y l) b e n z a m i d e (1 0 4 m g , 0 . 1 9 m m o l) のジクロロメタン溶液 (1 . 9 m L) を 0 に冷却し、mC P B A (1 9 5 . 4 m g , 0 . 7 9 m m o l) を加えた。室温にて20時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルによる分液抽出を行った。有機層を減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、アジドリンカー (5) を得た (8 4 . 8 m g , 0 . 1 4 m m o l , 収率 7 6 %) 。

10

【0253】

MS (E S I) m / z : 5 8 8 [M + H]

【0254】

(2) アジドリンカー (5) によるアジド基の導入

20

実施例 2 (2) に記載の手法と同様の方法にてチオール基導入抗体にアジドリンカー (5) を反応させた。

【0255】

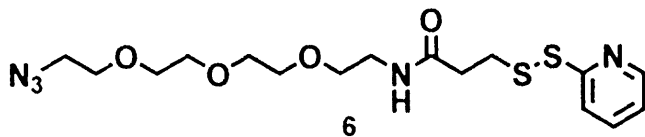
生成物にトリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 (0 . 5 m M) を加えて、室温で10分攪拌し、既報 (W O 2 0 1 9 / 2 4 0 2 8 7 A 1) に従って E S I - T O F M S により質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は 5 0 6 8 3 、 5 0 8 4 5 に重鎖ピーク、2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジド基が導入された 5 1 1 8 9 、 5 1 3 5 0 および、原料と同じ 2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測された。

【0256】

実施例 6 : アジドリンカー (6) によるアジド基の導入

30

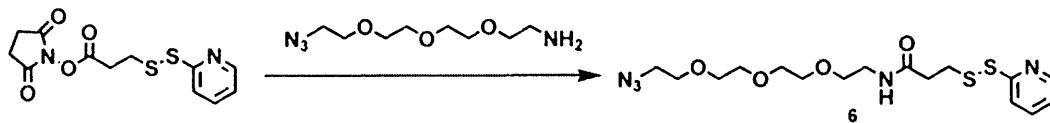
【化52】



【0257】

(1) アジドリンカー (6) の合成

【化53】



40

【0258】

N - S u c c i n i m i d y l 3 - (2 - P y r i d y l d i t h i o) p r o p i o n a t e (5 5 . 2 m g , 0 . 1 7 7 m m o l) , を C H ₂ C l ₂ (2 . 0 m L) に溶解し、1 1 - A z i d o - 3 , 6 , 9 - t r i o x a u n d e c a n - 1 - a m i n e (3 5 μ L , 0 . 1 7 7 m m o l) を加え室温で18時間攪拌した。LC / MS で反応を確認後、0 . 0 5 % 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

50

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、アジドリンカー (6) を (72.2 mg、0.173 mmol) 得た。

【0259】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-d) = 8.55 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 3.76 - 3.63 (m, 10H), 3.60 (dd, $J = 5.6, 4.5$, 2H), 3.49 (q, $J = 5.2$, 2H), 3.41 (t, $J = 5.0$, 2H), 3.13 (tt, $J = 7.0, 2.4$, 2H), 2.66 (td, $J = 6.9, 2.2$, 2H).

MS (ESI) m/z : $z = 1$ 416 [M+H]⁺

【0260】

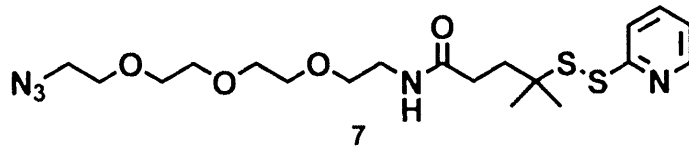
(2) アジドリンカー (6) によるアジド基の導入

実施例 2 (2) に記載の手法と同様の方法にてチオール基導入抗体にアジドリンカー (6) 試薬を反応させた。反応液を 20 mM 酢酸アンモニウムバッファーに置換し、既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) の手法に則り ESI-TOFMS により質量を測定したところ、アジド基が抗体に 2 つ導入された 149009 のピークが確認された。

【0261】

実施例 7: アジドリンカー (7) によるアジド基の導入

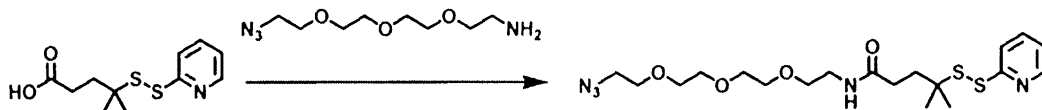
【化 54】



【0262】

(1) アジドリンカー (7) の合成

【化 55】



【0263】

4-Methyl-4-(pyridin-2-yl)disulfanylpentanoic acid (100.0 mg、0.39 mmol), を THF (3.0 mL) に溶解し、11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (77 μL 、0.39 mmol)、DCC (97.0 mg、0.47 mmol)、NMS (54.0 g、0.47 mmol) を加え室温で 18 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、アジドリンカー (7) を (39.9 mg、0.087 mmol) 得た。

【0264】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-d) = 8.52 (d, $J = 5.0$, 1H), 7.81 (d, $J = 8.2$, 1H), 7.72 (t, $J = 7.9$, 1H),

7.17 (t, J = 6.2, 1H), 6.15 (s, 1H), 3.76 - 3.62 (m, 10H), 3.57 (dd, J = 5.6, 4.6, 2H), 3.44 (dt, J = 15.2, 5.1, 4H), 2.42 - 2.27 (m, 2H), 2.06 - 1.94 (m, 2H), 1.33 (s, 6H).

MS (ESI) m/z : z = 1 458 [M + H]⁺

【0265】

(2) アジドリンカー(7)によるアジド基の導入

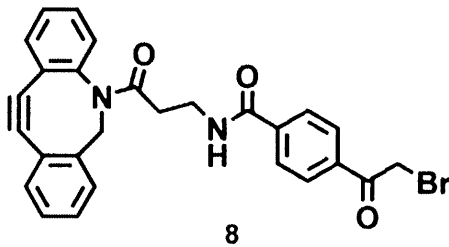
実施例2(2)に記載の手法と同様の方法にてチオール基導入抗体にアジドリンカー(7)試薬を反応させることができる。

【0266】

10

実施例8：アルキンリンカー(8)によるDBCO基の導入

【化56】

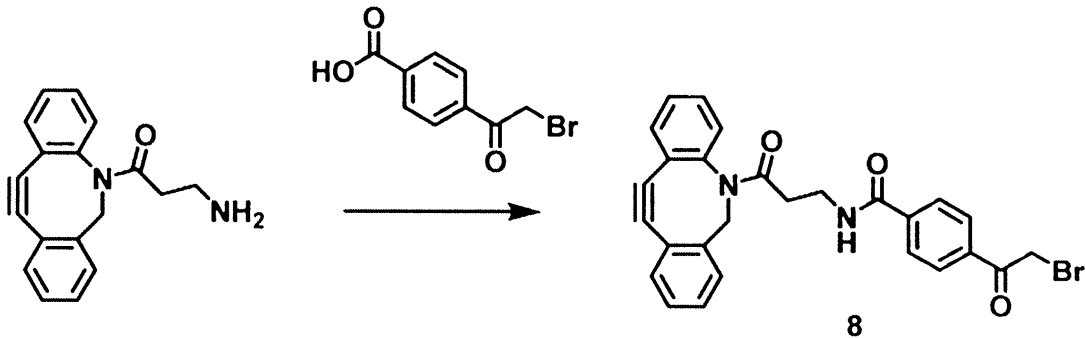


20

【0267】

(1) アルキンリンカー(8)の合成

【化57】



30

【0268】

3-Amino-1-(11,12-didehydrodibenz[b,f]azocin-5(6H)-yl)-1-propanone (20 mg, 0.072 mmol) のジクロロメタン溶液(1 mL)に室温にてジイソプロピルカルボジイミド(10.9 mg, 0.087 mmol)、およびプロモアセチル安息香酸(21 mg, 0.087 mmol)を加えた。室温にて16時間攪拌した後、減圧下濃縮を行い、得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、アルキンリンカー(8)を得た(12.3 mg, 0.25 mmol, 収率34%)。

40

【0269】

MS (ESI) m/z : 501 [M + H]

【0270】

(2) アルキンリンカー(8)によるDBCO基の導入

実施例2(2)に記載の手法と同様の方法にてチオール基導入抗体にアルキンリンカー(8)を反応させた。生成物にトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液(0.5 mM)を加えて、室温で10分攪拌し、既報(WO2019/240287A1)に従ってESI-TOFMSにより質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は506

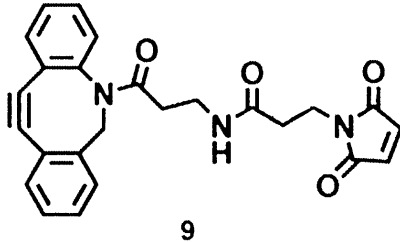
50

83、50845に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジド基が導入された51109、51270および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0271】

実施例9：アルキンリンカー(9)によるDBCO基の導入

【化58】



10

【0272】

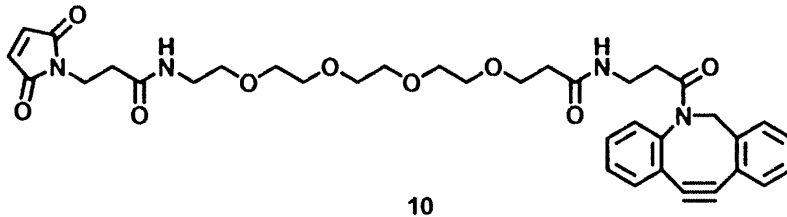
実施例2(2)に記載の手法と同様の方法にて、10当量の上記のアルキンリンカー(9、東京化成工業社製)を反応させた。生成物にトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液(0.5mM)を加えて、室温で10分攪拌し、既報(WO2019/240287A1)に従ってESI-TOFMSにより質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は50683、50845に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジド基が導入された51123、51291および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

20

【0273】

実施例10：アルキンリンカー(10)によるDBCO基の導入

【化59】



30

【0274】

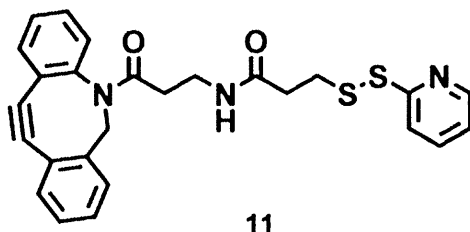
実施例2(2)に記載の手法と同様の方法にて、10当量の上記のアルキンリンカー(10)を反応させた。生成物にトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液(0.5mM)を加えて、室温で10分攪拌し、既報(WO2019/240287A1)に従ってESI-TOFMSにより質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は50683、50845に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジド基が導入された51371、51532および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

40

【0275】

実施例11：アルキンリンカー(11)によるDBCO基の導入

【化60】

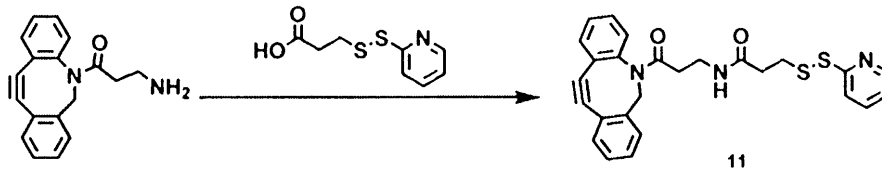


50

【0276】

(1) アルキンリンカー(11)の合成

【化61】



【0277】

3-Amino-1-(11,12-didehydrodibenz[b,f]azocin-5(6H)-yl)-1-propanone (14 mg, 0.051 mmol) のジクロロメタン溶液 (1 mL) に室温にてWSC (15 mg, 0.079 mmol)、HOBT (15 mg, 0.111 mmol)、トリエチルアミン (12 μ L, 0.162 mmol)、DMAP (0.5 mg, 0.004 mmol) および3-ピリジルジチオプロピオン酸 (11 mg, 0.050 mmol) を加えた。室温にて3時間攪拌した後、減圧下濃縮を行い、得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、アルキンリンカー(10)を得た (4.2 mg, 0.0096 mmol, 収率19%)。

【0278】

MS (ESI) m/z : 501 [M+H]

【0279】

(2) アルキンリンカー(11)によるDBCO基の導入

実施例2(2)に記載の手法と同様の方法にてチオール基導入抗体に上記のアルキンリンカー(11)を反応させた。反応液を20 mM酢酸アンモニウムバッファーに置換し、既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) の手法に則りESI-TOFMSにより質量を測定したところ、アジド基が抗体に2つ導入された149151のピークが確認された。

【0280】

実施例12: 生体直交性官能基導入抗体のSEC HPLCによる凝集率の測定

比較例1、2および実施例1~6、8~11で合成した抗体の生体直交性官能基導入抗体に対し、既報 (ACS Omega 2020, 5, 7193-7200) に従い、それぞれの凝集率を下記の条件にて測定した。

【0281】

測定システム: 1260 HPLC system (Agilent社製)

カラム: Agilent社製AdvanceBio SEC 300 2.7 μ m, 4.6 mm x 150 mm

流速: 0.25 mL/分

溶離液: 100 mMリン酸二水素ナトリウム/リン酸水素ナトリウム, 250 mM塩化ナトリウムの水溶液 (pH 6.8), 10% v/v イソプロパノール

検出器: UV (280 nm)

【0282】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. SEC HPLCによる凝集率の測定

抗体修飾体	凝集率 (%)
比較例 1	5.1
比較例 2	12.4
実施例 1	1.9
実施例 2	1.4
実施例 3	2.8
実施例 4	1.5
実施例 5	1.6
実施例 6	3.3
実施例 8	1.5
実施例 9	2.7
実施例 10	2.7
実施例 11	2.7

10

【0283】

その結果、実施例の化合物を用いて得られた生体直交性官能基導入抗体の凝集率は、3.5%未満であり、比較例の化合物を用いて得られた生体直交性官能基導入抗体の凝集率よりも低かった(表1)。

20

【0284】

実施例 13 : 還元条件の逆相 HPLC による未反応の重鎖の割合の測定

(1) 測定サンプルの調製

生成物に DL - ジチオトレイロール水溶液 (1 M の DL - ジチオトレイロール水溶液を 8 M グアニジン塩酸塩水溶液に添加させたもの) を加えて、80 で 10 分加熱した。

【0285】

(2) 逆相 HPLC による分析

比較例 1, 2 および実施例 1 ~ 5 および 8, 9, 10 で合成した生体直交性官能基導入抗体に対し、既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724 - 12732) に従い、逆相 HPLC 分析を行った。測定は下記の条件を用いて行った。

30

【0286】

測定システム: 1260 HPLC system (Agilent 社製)

カラム: Agilent 社製 AdvanceBio RP - mAb Diphenyl 3.5 μm, 2.1 mm × 100 mm

グラジエント: 溶離液 A / B の線形グラジエント

流速: 0.4 mL / 分

溶離液 A: 水, 0.1% v / v トリフルオロ酢酸

溶離液 B: アセトニトリル, 0.1% v / v トリフルオロ酢酸

検出器: UV (280 nm)

40

【0287】

反応の重鎖の割合は、(未反応の重鎖のピーク面積) / (抗体の全部の重鎖のピーク面積) により算出した。

【0288】

50

【表 2】

表 2. 未反応の重鎖の割合の測定

	未反応の重鎖割合 (%)
比較例 1	15.2
比較例 2	43.3
実施例 1	3.2
実施例 2	8.5
実施例 3	7.8
実施例 4	10.8
実施例 5	5.4
実施例 8	3.0
実施例 9	8.2
実施例 10	9.2

10

【0289】

上記の表 2 の結果から実施例 1 ~ 5 および 8, 9, 10 で合成した生体直交性官能基導入抗体は原料のチオール導入抗体からの変換率が 85% を超えていることが明らかになった。

【0290】

なお、実施例 6 および 11 のようにジスルフィド結合を有する化合物は、逆相 HPLC 測定の前処理工程において、DTT によってジスルフィド結合が切断され、原料であるチオール基導入抗体に変換されるため、本手法によっては未反応の重鎖割合 (%) を決定することはできない。したがって、実施例 6 および 11 の化合物についての未反応の重鎖割合 (%) の決定は、次の実施例で行った。

20

【0291】

実施例 14 : ESI - TOFMS による未反応のチオール基導入抗体の割合の測定

(1) 生体直交性官能基導入抗体の糖鎖切断

実施例 6, 11 で合成した生体直交性官能基導入抗体を PNGase F (New England Biolabs, カタログ番号 P0704) を用い、製造者プロトコルおよび既報 (WO2019240288A1) の手法に従い、糖鎖切断と後処理を行った。HIC - HPLC 分析を行った。

30

【0292】

(2) 糖鎖切断体の ESI - TOFMS 分析及び DAR calculator による未反応の抗体の割合の測定

(1) で得られた糖鎖切断体を既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724 - 12732) の手法に則り ESI - TOFMS により質量を測定した。得られた MS データについて、DAR calculator (Agilent 社ソフト) により DAR peak と % Area から算出された未反応抗体の割合を表 3 に示す。

【0293】

未反応の抗体の割合は、下記の式より算出した。

40

$$\text{未反応の抗体の割合 (\%)} = (A + B / 2) / (A + B + C)$$

A : 原料のチオール導入抗体 (化合物 28) に当たるマスナンバのピーク面積

B : 原料のチオール導入抗体 (化合物 28) に生体直交性官能基が一つ導入されたマスナンバに当たるピーク面積

C : 原料のチオール導入抗体 (化合物 28) に生体直交性官能基が二つ導入されたマスナンバに当たるピーク面積

【0294】

50

【表 3】

表 3. 未反応の重鎖の割合の測定

	未反応の抗体割合 (%)
実施例 6	4. 3
実施例 11	4. 4

【0295】

上記の表 3 の結果から、実施例 6 および 11 の化合物を用いる抗体誘導体の合成において、生体直交性官能基が導入された抗体誘導体は、原料のチオール導入抗体からの変換率が 90% を超えることが明らかになった。

10

【0296】

実施例 15：生体直交性官能基導入抗体とのクリック反応による ADC および ADC mimic の合成

(1) クリック反応による ADC の合成

既報 (WO2019/240287A1 および、WO2019/240288A1) に従って、実施例 1～6 で得られたアジド導入トラスツズマブに対して、DBCO-VC-PAB-MMAE (ABZENA 社製) の DMF 溶液 (5 mM) を 7 当量加え、室温にて 20 時間攪拌後、NAP-5 Columns (GEヘルスケア社製) を用いて精製し、ADC を得た。

20

【0297】

(2) クリック反応による ADC mimic の合成

既報 (WO2019/240287A1 および WO2019/240288A1) に従って、実施例 1～6 で得られたアジド導入トラスツズマブに対して、Carboxyrhodamine 110-PEG4-DBCO (Broadpharm 社製) を加え、ADC mimic を得た。

【0298】

同様に、実施例 8～11 で得られた DBCO 導入トラスツズマブに対して、Carboxyrhodamine 110-PEG3-azide (Broadpharm 社製) を加え、ADC mimic を得た。

30

【0299】

実施例 (3) ADC および ADC mimic の解析

実施例 13 (1) で合成した ADC、および実施例 13 (2) で合成した ADC mimic の ESI-TOFMS 分析は既報 (WO2019/240287A1) に従って行い、DAR は 2 であることを確認した。

【0300】

実施例 16：ラット血漿を用いた安定性試験による ADC mimic の評価

実施例 15 (2) で合成した各種 ADC mimic の血中安定性を評価した。具体的には、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により評価した。

40

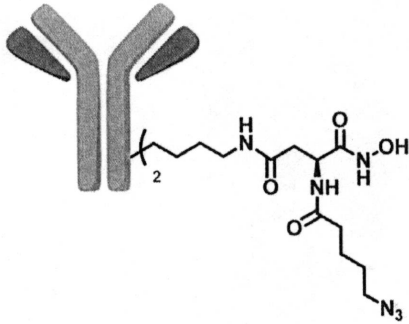
【0301】

(1) コントロール ADC mimic の合成

既報 (WO2019/240287A1) に記載の下記のアジド抗体を実施例 15 (2) に従って Carboxyrhodamine 110-PEG4-DBCO (Broadpharm 社製) と反応させ ADC mimic へと導いた。

50

【化 6 2】



10

【0302】

(2) 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 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 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。

20

【0303】

(3) 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 16 (1) で冷凍庫 (-80) 保管 (96 時間) した 3 本のサンプルを Day = 0 のものとし、実施例 14 (1) で 37 保管 (96 時間) 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。

【0304】

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、相対低下率の比を、下記式 (A) を用いて算出した。

30

【0305】

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)]

【0306】

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)]

【0307】

上昇量の比 = 実施例 ADC mimic の蛍光強度の上昇量 / コントロール ADC mimic の蛍光強度の上昇量

40

【0308】

50

【表 4】

表 4. コントロールと比較した際のADC mimicの相対低下率の比

	上昇量の比
実施例 1	< 10%
実施例 2	< 10%
実施例 3	< 10%
実施例 4	< 10%
実施例 5	< 10%
実施例 6	< 10%
実施例 8	< 10%
実施例 9	< 10%
実施例 10	< 10%
実施例 11	< 10%

10

【0309】

その結果、実施例 15 (1) および (2) で合成したADC mimicは実施例 16 (1) で合成したコントロールより全て10倍以上安定であった。

【0310】

実施例 17：生体直交性官能基導入抗体とのクリック反応による抗体 タンパク質複合体の合成

20

(1) タンパク質へのリンカー導入

リゾチーム (pH 7.4 PBSバッファー溶液) に対して、N-Hydroxysuccinimide-4-azidobenzoateのDMF溶液を6当量加え、室温にて3時間攪拌後、NAP-5 Columns (GEヘルスケア社製) を用いて精製し、アジド導入リゾチームを得た。既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) の手法に則りESI-TOFMSにより質量を測定したところ、アジド基がリゾチームに導入された14450のピークが確認された。

【0311】

また、ウシ血清アルブミンに対して、同様の手法にてアジド基を導入した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、アジド基がウシ血清アルブミンに導入された66579のピークが確認された。

30

【0312】

(2) クリック反応による抗体 - タンパク質複合体の合成

既報 (WO2019/240287A1およびWO2019/240288A1) に従って、実施例 8 で得られたアルキン導入トラスツズマブに対して、実施例 17 (1) で合成したアジド導入リゾチームを加え、トラスツズマブ - リゾチーム複合体を得た。既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) の手法に則りESI-TOFMSにより質量を測定したところ、トラスツズマブにリゾチームが2つ導入された178610のピークが確認された。

40

【0313】

また、同様の手法にて実施例 8 で得られたアルキン導入トラスツズマブに対して、実施例 17 (1) で合成したウシ血清アルブミンを加え、トラスツズマブ - リゾチーム複合体を得た。既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) の手法に則りESI-TOFMSにより質量を測定したところ、トラスツズマブにウシ血清アルブミンが2つ導入された283466のピークが確認された。

【0314】

同様の手法にて実施例 9 で得られたアルキン導入トラスツズマブに対して、実施例 17 (1) で合成したアジド導入リゾチームを加え、トラスツズマブ - リゾチーム複合体を得た。既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) の

50

手法に則りESI-TOFMSにより質量を測定したところ、トラスツズマブにリゾチームが2つ導入された178669のピークが確認された。

【0315】

同様の手法にて実施例10で得られたアルキン導入トラスツズマブに対して、実施例17(1)で合成したアジド導入リゾチームを加え、トラスツズマブ-リゾチーム複合体を得た。既報(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)の手法に則りESI-TOFMSにより質量を測定したところ、トラスツズマブにリゾチームが2つ導入された179154のピークが確認された。

【0316】

同様の手法にて実施例11で得られたアルキン導入トラスツズマブに対して、実施例17(1)で合成したアジド導入リゾチームを加え、トラスツズマブ-リゾチーム複合体を得た。既報(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)の手法に則りESI-TOFMSにより質量を測定したところ、トラスツズマブにリゾチームが2つ導入された178647のピークが確認された。

【0317】

実施例18: Lys288/290位への生体直交性官能基の導入

(18-1)可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2抗体トラスツズマブの修飾およびその解析

(18-1-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

可溶性タンパク質に対する親和性物質であるAc-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂(配列番号4のペプチドをFmoc固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はCEM社製Liberty Blueを使用した。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用した。ResinはFmoc-NH-SAL-PEG Resin, HL、アルギニン(R)、システイン(C)、ヒスチジン(H)はダブルカップリングを行った。Resinからの切り出しはトリフルオロ酢酸:水:トリイソプロピルシラン:エタンジチオール=94:2.5:1.0:2.5の溶液中3時間攪拌の条件で行った。切り出し後Resinをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈殿を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを0.1%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタ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0.1%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行った。

【0318】

(18-1-2) Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂(配列番号4)の5位と34位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

(18-1-1)で合成したペプチドをDMSOに溶解し、0.1M Tris-HCl pH 8.0を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で20時間攪拌した。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタ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0.05%を含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物(20.0mg, 4.70 μmol)を得た。

【0319】

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

10

20

30

40

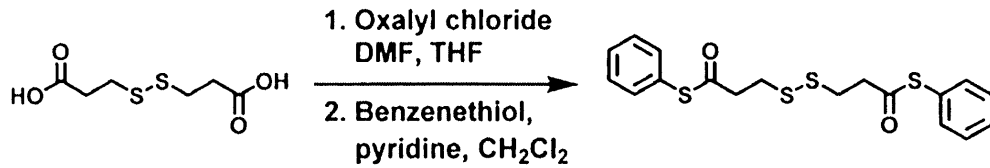
50

【0320】

(18-1-3) チオエステルリンカーの合成

(18-1-3-1)

【化63】



10

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

20

【0321】

(18-1-3-2)

【化64】



【0322】

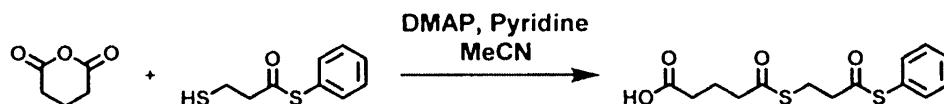
(18-1-3-1) で合成した化合物 (1.2 g, 3.04 mmol) を DMF / H₂O = 5 / 1 の混合溶媒に溶解し、TCEP·HCl (1.74 g, 6.08 mmol) を加え常温で 1 時間撹拌した。TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 5 / 1) で反応を確認後、酢酸エチルと水で抽出後、有機層を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションを TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 5 / 1) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を (1.18 g, 6.5 mmol) 得た。

30

【0323】

(18-1-3-3)

【化65】



40

(18-1-3-2) で合成した化合物 (200 mg, 1.10 mmol) をアセトニトリル (2.0 mL) に溶解し、Glutaric Anhydride (125.5 mg, 1.10 mmol)、DMAP (6.72 mg, 0.06 mmol)、Pyridine (0.22 mL) を加え常温で 4 時間撹拌した。TLC (ジクロロメタン/メタノール = 10 / 1) で反応を確認後、酢酸エチルと 0.5 M HCl で抽出し、有機層を濃縮した。ジクロロメタンとメタノールの混合溶液で溶出し、各フラクションを TLC (ジクロ

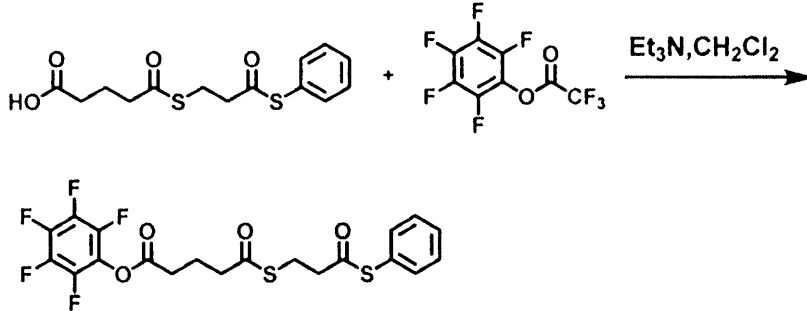
50

ロメタン/メタノール = 10 / 1) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を (135 mg、0.45 mmol) 得た。

【0324】

(18-1-3-4)

【化66】



10

【0325】

(18-1-3-3) で合成した化合物 (134 mg、0.45 mmol) に CH_2Cl_2 (2.25 mL)、トリエチルアミン (157 μL 、1.13 mmol) を加え、溶解した。0 でペンタフルオロフェニルトリフルオロ酢酸 (154 μL 、0.90 mmol) を加え、1時間攪拌した。TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 3 / 1) で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションを TLC (ヘキサン/酢酸エチル = 3 / 1) により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を (96 mg、0.20 mmol) 得た。

20

【0326】

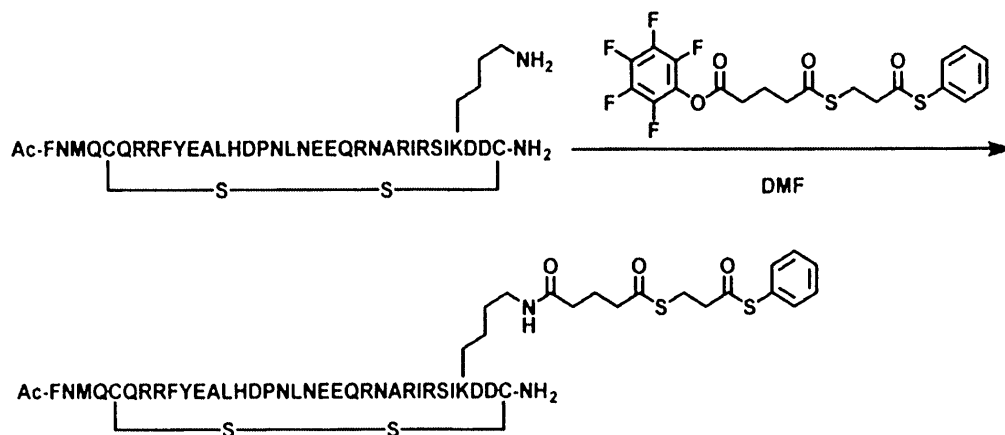
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-d) = 7.44 (s, 5H), 3.23 (t, $J = 6.9$, 2H), 3.01 (t, $J = 6.9$, 2H), 2.77 (dt, $J = 14.5$, 7.3, 4H), 2.16 (t, $J = 7.3$, 2H)。

30

【0327】

(18-1-4) ペプチドとリンカーの結合

【化67】



40

上記2つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号4のアミノ酸配列である。

【0328】

(18-1-2) で合成した Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂ (配列番号4) (30.0 mg, 7.06 μmol 、た

50

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

【0329】

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

【0330】

(18-1-5) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(18-1-4)で合成したペプチドリナー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し10 mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgをHEPESバッファー(pH 8.2)200 μL(20 μM)に溶解させ、10 mMのペプチド試薬を3.38 μL(抗体に対して10等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を20 mM酢酸アンモニウムバッファーに置換し、ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148223にピークが観測された。生成物は結合性ペプチドが1個導入された152660、結合性ペプチドが2個導入された157093、3個導入された161528のピークが確認された。

【0331】

(18-1-6)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(18-1-5)で生成した抗体・ペプチド複合体に100 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で15分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50596に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にリンカーが1個導入された55033、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された。

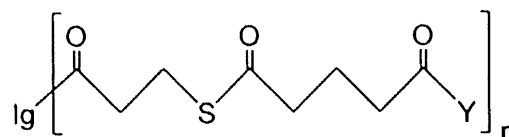
【0332】

(18-1-7)トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチド/抗体結合比の確認

(18-1-5)で解析したMSデータについて、DAR calculator(Agilent社ソフト)によりペプチド/抗体結合比の確認を行った結果を表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。

【0333】

【化68】



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

Yは、配列番号4のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

10

20

30

40

50

I g と、I g に隣接する 2 個のカルボニル基 (C = O) との間の平均結合比率 r は、 2 . 0 である。]

【 0 3 3 4 】

【表 5 】

表 5

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

10

【 0 3 3 5 】

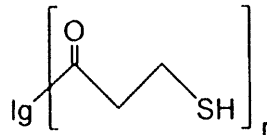
(1 8 - 1 - 8) チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

(1 8 - 1 - 7) で得られた抗体中間体に対し、既報 (W O 2 0 1 9 2 4 0 2 8 7 A 1) に従いヒドロキシルアミン溶液を加え、室温で 1 時間静置した。2 時間後、2 0 m M P B S バッファー、1 0 m M E D T A (p H 7 . 4) へと置換し、チオール基導入抗体誘導体を得た。E S I - T O F M S により質量を測定したところ、切断反応が進行した 1 4 8 4 0 9 にピークが確認された。

【 0 3 3 6 】

【化 6 9 】

20



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

30

I g と、I g に隣接する 2 個のカルボニル基 (C = O) との間の平均結合比率 r は、 2 . 0 である。]

【 0 3 3 7 】

(1 8 - 1 - 9) トリプシン処理によるペプチドマッピング

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

【 0 3 3 8 】

(1 8 - 1 - 9 - 1) トラスツズマブ・チオール導入体のトリプシン処理

1 . 5 m L 低吸着マイクロテストチューブにサンプル溶液を 1 0 μ L 、 5 0 m M 炭酸水素アンモニウム緩衝液、4 0 % トリフルオロエタノールに溶解した 2 0 m M のジチオトレイトール水溶液 1 0 μ L を加えて 6 5 で 1 時間加熱後、5 0 m M のヨードアセトアミド水溶液 1 0 μ L を添加し、遮光下室温で 3 0 分間反応させた。反応後、5 0 m M 炭酸水素アンモニウム緩衝液を 4 0 μ L 加えて攪拌し、2 0 n g / μ L のトリプシン水溶液を 1 0 μ L 添加して 3 7 で 1 6 時間酵素消化した。消化後、2 0 % トリフルオロ酢酸水溶液を 2 μ L 添加し反応を止め、L C - M S / M S 測定を実施した。

40

【 0 3 3 9 】

(1 8 - 1 - 9 - 2) トラスツズマブの L C - M S / M S 測定

(分析装置)

ナノ H P L C : E A S Y - n L C 1 0 0 0 (サーマフィッシャーサイエンティフィック社)

50

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

【0340】

(HPLC分析条件)

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

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

移動相A：0.1%ギ酸水溶液

移動相B：0.1%ギ酸、アセトニトリル溶液

ローディング溶液：0.1%トリフルオロ酢酸水溶液

流速：300 nL/min

サンプル注入量：1 μL

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

【0341】

(質量分析計分析条件)

イオン化法：ESI, Positiveモード

スキャンタイプ：Data Dependent Acquisition

Activation Type：Collision Induced Dissociation (CID)

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

【0342】

(18-1-9-3) トラスツズマブの修飾部位の解析

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

BioPharma Finderでの解析は、S/N Thresholdを1、MS Noise Levelをピークトップの強度の0.01%となるように設定して実施した。また、消化酵素をTrypsinに、SpecificityをHighに設定した。Static Modificationにはヨードアセトアミドによるシステイン残基の修飾として、Carbamidomethyl (+57.021 Da) を設定した。Dynamic Modificationsについては、メチオニン残基の酸化 (+15.995 Da) およびリジン残基への修飾体 (ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体 (+145.019 Da)) を設定した。また、Confidence Scoreが80以上、ペプチド同定時のMass Accuracyが5 ppm以内、MS/MSが観測できているもののみとなるようフィルターを設定した。なお、リジン残基の残基番号に関して、重鎖VHドメインおよび軽鎖上については配列中の番号 (すなわち、N末のアミノ酸を1番目とする。以下同様) で、重鎖CH1、CH2、CH3ドメイン上についてはEU numberingを用いて表記した。

また、修飾部位の検索対象のアミノ酸配列のデータとして、図6に示される(1)および(2)を用いた。

【0343】

(18-1-9-4) トラスツズマブのLC-MS/MSによる修飾部位の解析結果

LC-MS/MSを用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位 (ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体 (+145.019 Da)) を含むアミノ酸18残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPR (配列番号3) のペプチドフラグメントのMS

10

20

30

40

50

スペクトル（実測値： m/z 577.03606、理論値：577.03557、4価）が観測され（図7）、CIDスペクトルより重鎖のEU numberingにおける288位もしくは290位のリジン残基の修飾を示す、3価のy16に相当する m/z 682.13（理論値：682.01）のプロダクトイオンが確認された（図8）。また、BioPharma Finderでの解析により、288位もしくは290位のリジン残基への修飾が高選択的に起こっていることが示された（図9）。

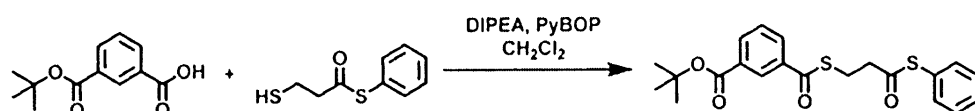
この結果より、上記（18-1-8）で得られたトラスツズマブ・チオール導入体では、抗体の重鎖上、EU numberingにおけるLys 288およびLys 290に位置選択的にコンジュゲーションが進行していることが分かった。

【0344】

（18-2-1）チオエステルリンカーの合成

（18-2-1-1）

【化70】



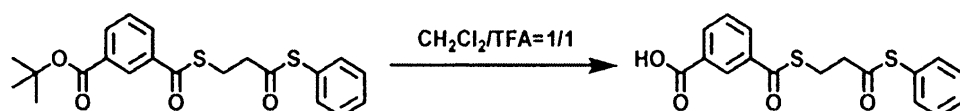
【0345】

（18-1-3-2）で合成した化合物（295 mg、1.62 mmol）を CH_2Cl_2 （13.5 mL）に溶解し、3-(tert-butoxycarbonyl)benzoic acid（300 mg、1.35 mmol）、DIPEA（700 μ L、2.03 mmol）、PyBOP（843 mg、1.62 mmol）を加えて常温で1時間撹拌した。TLC（ヘキサン/酢酸エチル=5/1）で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC（ヘキサン/酢酸エチル=5/1）により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を（259 mg、0.64 mmol）得た。

【0346】

（18-2-1-2）

【化71】



【0347】

（18-2-1-1）で合成した化合物（259 mg、0.64 mmol）を CH_2Cl_2 /TFA=1/1の混合溶液に溶解し、1時間常温で撹拌した。TLC（ヘキサン/酢酸エチル=5/1）で原点に落ちたことを確認後、反応溶液を濃縮後、真空乾燥を行い、上記化合物を（227 mg、0.66 mmol）得た。

【0348】

（18-2-1-3）

10

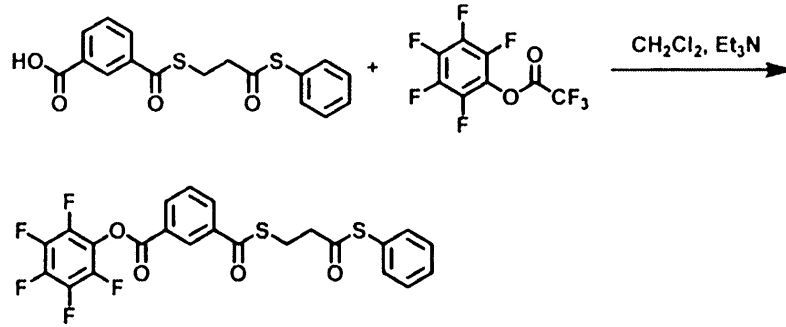
20

30

40

50

【化72】



10

【0349】

(18-2-1-2)で合成した化合物(227mg、0.66mmol)にCH₂Cl₂(3.3mL)、トリエチルアミン(230μL、1.65mmol)を加え、溶解した。0でペンタフルオロフェニルトリフルオロ酢酸(225μL、1.32mmol)を加え、1時間撹拌した。TLC(ヘキサン/酢酸エチル=3/1)で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC(ヘキサン/酢酸エチル=3/1)により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を(175.3mg、0.34mmol)得た。

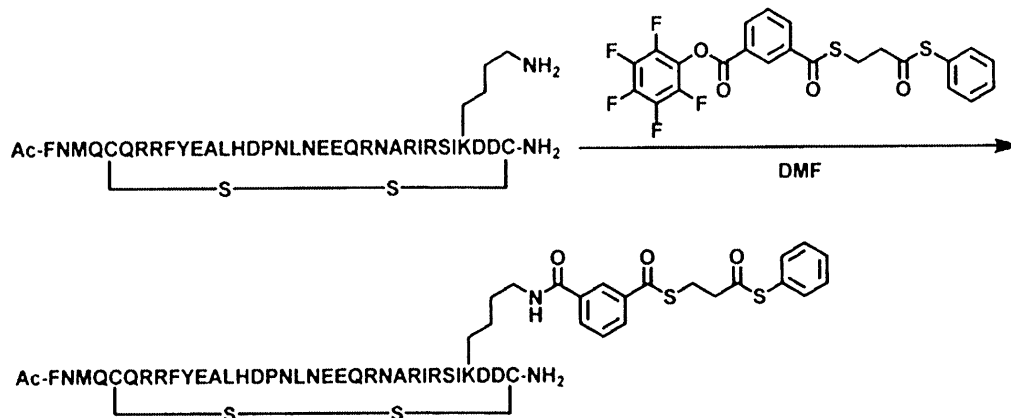
20

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

【0350】

(18-2-2)ペプチドとリンカーの結合

【化73】



30

40

上記2つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号4のアミノ酸配列である。

【0351】

(18-1-2)で合成したAc-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂(配列番号4)(30.0mg、7.06μmol、ただし5番目と34番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00mL)に溶解し、リンカー(72.0mg、141μmol)を加え、室温で24時間撹拌した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタド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

50

ニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体(10.0mg、2.19 μ mol)を得た。

【0352】

MS(ESI)m/z: z = 4 1145.6 [M + 4H]⁴⁺

【0353】

(18-2-3) 抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(18-2-2) で合成したペプチドリナー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し10mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μ gを50mMのHEPESバッファー(pH8.2)200 μ L(20 μ M)に溶解させ、10mMのペプチド試薬を3.38 μ L(抗体に対して10等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を20mM酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148223にピークが観測された。結合性ペプチドが1個導入された152691、結合性ペプチドが2個導入された157163、3個導入された161634のピークが確認された。

【0354】

(18-2-4) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(18-2-3) で生成した抗体・ペプチド複合体に100mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2 μ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で15分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50596に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが1個導入された55067、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された。

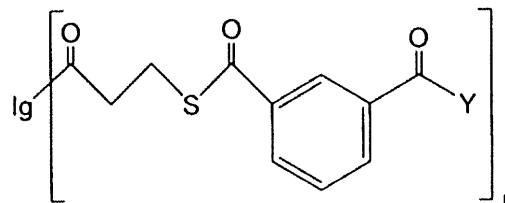
【0355】

(18-2-5) トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチド/抗体結合比の確認

(18-2-3) で解析したMSデータについて、DAR calculator(Agilent社ソフト)によりペプチド/抗体結合比の確認を行った結果を表6に示す。表6のDAR peakと%Areaから算出された平均のペプチド/抗体結合比は2.0となった。したがって、下記構造式で表される抗体中間体(平均のペプチド/抗体結合比2.0)の生成が確認された。

【0356】

【化74】



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

Yは、配列番号4のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

Igと、Igに隣接する2個のカルボニル基(C=O)との間の平均結合比率rは、2.0である。]

10

20

30

40

50

【 0 3 5 7 】

【 表 6 】

表 6

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

【 0 3 5 8 】

10

(1 8 - 2 - 6) チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

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

【 0 3 5 9 】

(1 8 - 2 - 7) トリプシン処理によるペプチドマッピング

(1 8 - 2 - 6) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体について、下記工程でペプチドマッピングを行った。

【 0 3 6 0 】

(1 8 - 2 - 7 - 1) トラスツズマブ・チオール導入体のトリプシン処理

20

(1 8 - 1 - 9 - 1) と同様にして(1 8 - 2 - 6) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体のトリプシン処理を行った。

【 0 3 6 1 】

(1 8 - 2 - 7 - 2) トラスツズマブの LC - MS / MS 測定

(1 8 - 1 - 9 - 2) と同様の条件で LC - MS / MS 測定を行った。

【 0 3 6 2 】

(1 8 - 2 - 7 - 3) トラスツズマブの修飾部位の解析

(1 8 - 1 - 9 - 3) と同様に解析を行った。

【 0 3 6 3 】

(1 8 - 2 - 7 - 4) トラスツズマブの LC - MS / MS による修飾部位の解析結果

30

LC - MS / MS を用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位 (ヨードアセトアミドによる Carbamidomethyl 化を受けたチオール導入体 (+ 1 4 5 . 0 1 9 Da)) を含むアミノ酸 1 8 残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPR (配列番号 3) のペプチドフラグメントの MS スペクトル (実測値 : m / z 5 7 7 . 0 3 5 7 1 、理論値 : 5 7 7 . 0 3 5 5 7 、4 価) が観測され (図 1 0) 、CID スペクトルより重鎖の E U n u m b e r i n g における 2 8 8 位もしくは 2 9 0 位のリジン残基の修飾を示す、3 価の y 1 6 に相当する m / z 6 8 2 . 4 1 (理論値 : 6 8 2 . 0 1) のプロダクトイオンが確認された (図 1 1) 。また、BioPharma Finder での解析により、2 8 8 位もしくは 2 9 0 位のリジン残基への修飾が高選択的に起こっていることが示された (図 1 2) 。

40

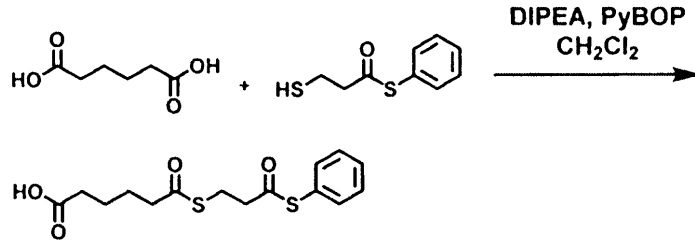
この結果より、上記 (1 8 - 2 - 6) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体では、抗体の重鎖上、E U n u m b e r i n g における L y s 2 8 8 および L y s 2 9 0 に位置選択的にコンジュゲーションが進行していることが分かった。

【 0 3 6 4 】

(1 8 - 3 - 1) チオエステルリンカーの合成

(1 8 - 3 - 1 - 1)

【化75】



【0365】

10

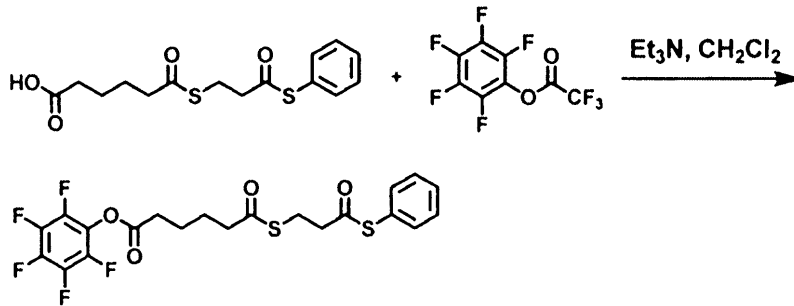
(18-1-3-2)で合成した化合物(220mg、1.21mmol)をCH₂Cl₂(12.0mL)に溶解し、Adipic Acid(530mg、3.63mmol)、DIPEA(314μL、1.82mmol)、PyBOP(755mg、1.45mmol)を加えて常温で1時間撹拌した。TLC(ジクロロメタン/メタノール=10/1)で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ジクロロメタンとメタノールの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC(ジクロロメタン/メタノール=10/1)により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を(205mg、0.63mmol)得た。

【0366】

20

(18-3-1-2)

【化76】



30

【0367】

(18-3-1-1)で合成した化合物(205mg、0.63mmol)にCH₂Cl₂(3.15mL)、トリエチルアミン(220μL、1.58mmol)を加え、溶解した。0でペンタフルオロフェニルトリフルオロ酢酸(215μL、1.26mmol)を加え、1時間撹拌した。TLC(ヘキサン/酢酸エチル=3/1)で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC(ヘキサン/酢酸エチル=3/1)により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を(200mg、0.41mmol)得た。

【0368】

40

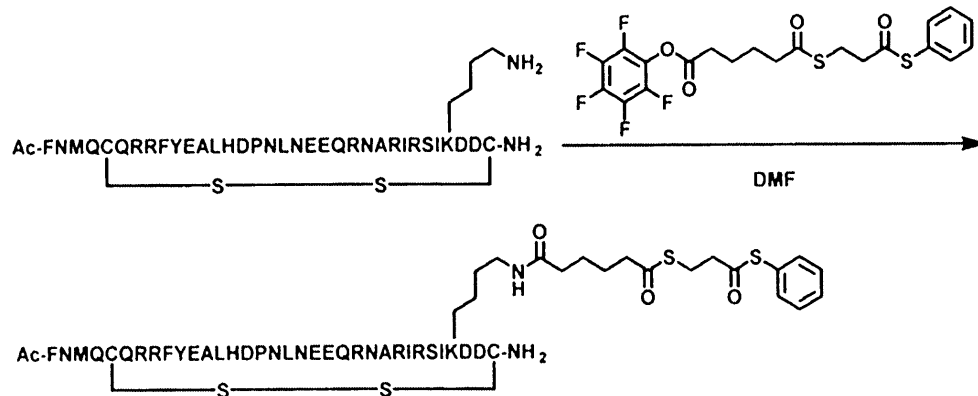
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) = 7.44 (s, 5H), 3.20 (t, J=7.0, 2H), 3.00 (t, J=6.9, 2H), 2.66 (dt, J=28.3, 7.4, 5H), 1.79 (ddt, J=20.4, 15.2, 7.5, 5H), 1.57-1.38 (m, 3H).

【0369】

(18-3-2)ペプチドとリンカーの結合

50

【化 7 7】



10

上記 2 つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号 4 のアミノ酸配列である。

【0370】

(18-1-2) で合成した Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂ (配列番号 4) (30.0 mg, 7.06 μmol、ただし 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、リンカー (69.0 mg, 141 μmol) を加え、室温で 24 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体 (7.5 mg, 1.65 μmol) を得た。

20

【0371】

MS (ESI) m/z : z = 4 1140.50 [M + 4H]⁴⁺

【0372】

(18-3-3) 抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

30

(18-3-2) で合成したペプチドリナー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し 10 mM とした。抗HER2抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 50 mM の HEPES バッファー (pH 8.2) 200 μL (20 μM) に溶解させ、10 mM のペプチド試薬を 3.38 μL (抗体に対して 10 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 20 mM 酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148223 にピークが観測された。結合性ペプチドが 1 個導入された 152676、結合性ペプチドが 2 個導入された 157126、3 個導入された 161572 のピークが確認された。

【0373】

40

(18-3-4) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(18-3-3) で生成した抗体・ペプチド複合体に 100 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 2 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 15 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50596 に重鎖ピーク、23439 に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが 1 個導入された 55048、軽鎖に原料と同じ 23439 にピークが観測された。

【0374】

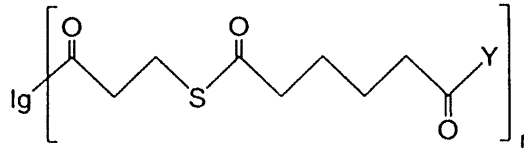
(18-3-5) トラスツズマブの特異的修飾体の DAR calculator によるペプチド/抗体結合比の確認

50

(18-3-3)で解析したMSデータについて、DAR calculator (Agilent社ソフト)によりペプチド/抗体結合比の確認を行った結果を表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。

【0375】

【化78】



10

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

Yは、配列番号4のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

Igと、Igに隣接する2個のカルボニル基(C=O)との間の平均結合比率rは、1.9である。]

20

【0376】

【表7】

表7

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

【0377】

(18-3-6)チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

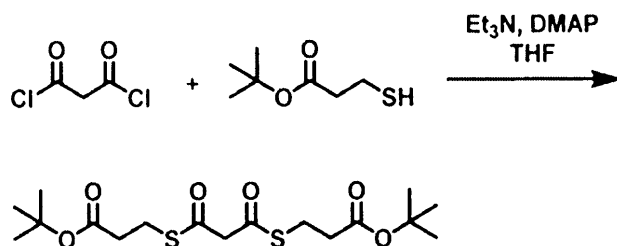
チオール基導入抗体誘導体は、(18-3-5)で得られた抗体中間体を、(18-1-8)に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、(18-1-8)に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

【0378】

(18-4-1)チオエステルリンカーの合成

(18-4-1-1)

【化79】



40

【0379】

tBu-3-Sulfanylpropanoate (500 mg、3.08 mmol) をテトラヒドロフラン(7 mL)に溶解し、トリエチルアミン(0.64 mL、4.62 mmol)を加えた後、0 でマロニルクロリド(0.15 mg、1.54 mmol)

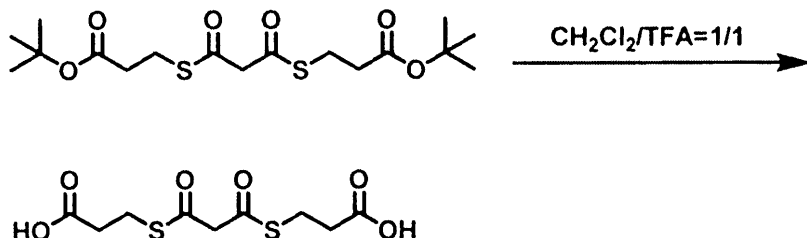
50

を加え3時間撹拌した。TLC(ヘキサン/酢酸エチル=5/1)で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC(ヘキサン/酢酸エチル=5/1)により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を(104mg、0.26mmol)得た。

【0380】

(18-4-1-2)

【化80】



【0381】

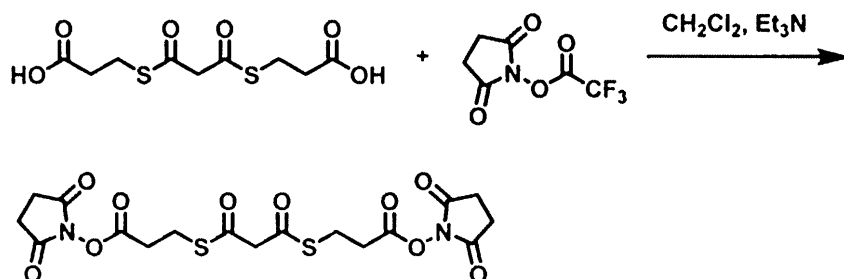
(18-4-1-1)で合成した化合物(104mg、0.26mmol)をCH₂Cl₂/TFA=1/1の混合溶液に溶解し、1時間常温で撹拌した。TLC(ヘキサン/酢酸エチル=5/1)で原点に落ちたことを確認後、反応溶液を濃縮後、真空乾燥を行い、上記化合物を(104mg、0.37mmol)得た。

20

【0382】

(18-4-1-3)

【化81】



【0383】

(18-4-1-2)で合成した化合物(104mg、0.37mmol)にCH₂Cl₂(1.85mL)、トリエチルアミン(130μL、0.93mmol)を加え溶解した。0でN-Succinimidyl Trifluoroacetate(156mg、0.74mmol)を加え、1時間撹拌した。TLC(ヘキサン/酢酸エチル=1/1)で反応を確認後、反応溶液を濃縮した。ヘキサンと酢酸エチルの混合溶液で溶出し、各フラクションをTLC(ヘキサン/酢酸エチル=1/1)により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより有機溶媒を除去後、真空乾燥を行い、上記化合物を(66.8mg、0.14mmol)得た。

40

【0384】

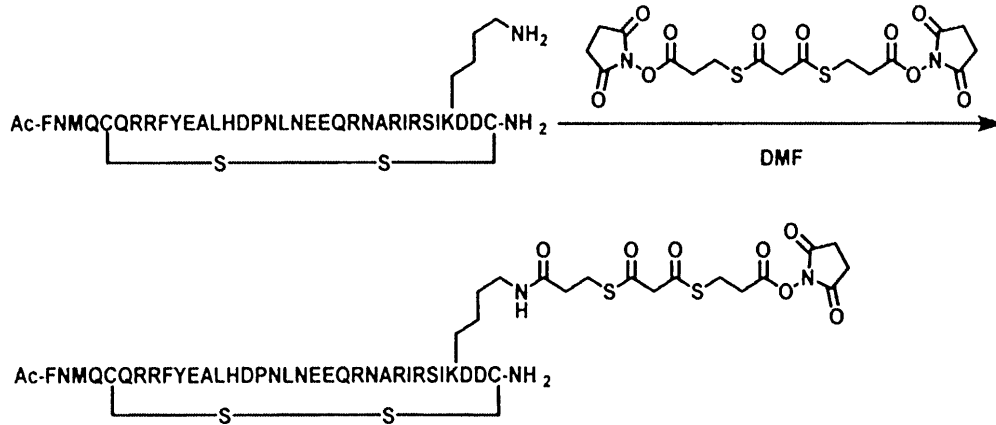
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) = 3.84 (s, 2H), 3.28 (t, J=6.9, 2H), 3.19 (t, J=6.8, 2H), 3.00 (t, J=6.8, 2H), 2.74 (t, J=6.8, 2H).

【0385】

(18-4-2)ペプチドとリンカーの結合

50

【化 8 2】



10

上記 2 つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号 4 のアミノ酸配列である。

【0386】

(18-1-2) で合成した Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂ (配列番号 4) (29.7 mg, 7.00 μmol、ただし 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、リンカー (66.8 mg, 0.14 mmol) を加え、室温で 4 時間攪拌した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタ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、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-NHS 活性化体 (13 mg, 2.82 μmol) を得た。

20

【0387】

MS (ESI) m/z : z = 4 1153.10 [M + 4H]⁴⁺

【0388】

(18-4-3) 抗HER2 抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS による解析

(18-4-2) で合成したペプチドリナー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し 10 mM とした。抗HER2 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 50 mM の HEPES バッファー (pH 8.2) 200 μL (20 μM) に溶解させ、10 mM のペプチド試薬を 3.38 μL (抗体に対して 10 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 20 mM 酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148223 にピークが観測された。結合性ペプチドが 1 個導入された 152722、結合性ペプチドが 2 個導入された 157215、3 個導入された 161708 のピークが確認された。

40

【0389】

(18-4-4) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(18-4-3) で生成した抗体・ペプチド複合体に 100 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 2 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 15 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50594 に重鎖ピーク、23439 に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが 1 個導入された 55091、軽鎖に原料と同じ 23439 にピークが観測された。

【0390】

(18-4-5) トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによる

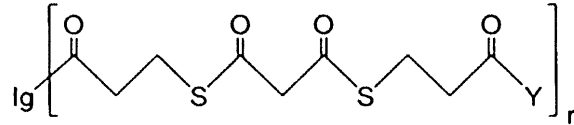
50

ペプチド / 抗体結合比の確認

(18-4-3) で解析した MS データについて、DAR calculator (Agilent 社ソフト) によりペプチド / 抗体結合比の確認を行った結果を表 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 1.8 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。

【0391】

【化83】



10

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

Y は、配列番号 4 のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

Ig と、Ig に隣接する 2 個のカルボニル基 (C=O) との間の平均結合比率 r は、1.8 である。]

20

【0392】

【表8】

表 8

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

【0393】

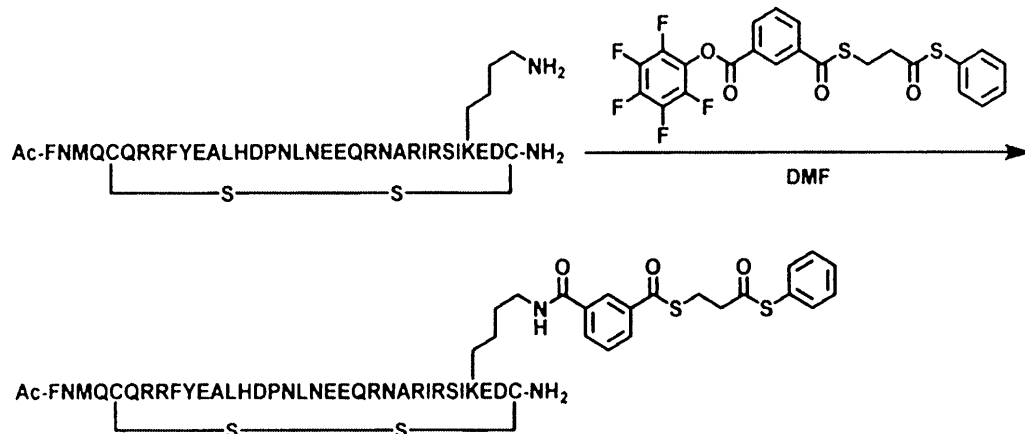
(18-4-6) チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

チオール基導入抗体誘導体は、(18-4-5) で得られた抗体中間体を、(18-1-8) に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、(18-1-8) に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

【0394】

(18-5-1) ペプチドとリンカーの結合

【化84】



40

50

上記2つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号5のアミノ酸配列である。

【0395】

(18-1-1)に記載の方法で合成したAc-FNMQCQRRFYEALHDPN
LNEEQRNARIRSIKEDC-NH₂(配列番号5)(30.0mg, 7.06
μmol、ただし5番目と34番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィ
ド結合を形成している)に実施例2(2-2)と同様の方法でリンカーを結合し、上記ペ
プチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体(10.0mg、2.19
μmol)を得た。

【0396】

MS(ESI)m/z: z = 4 1145.6 [M + 4H]⁴⁺

10

【0397】

(18-5-2)抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(18-5-1)で合成したペプチドリナー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し
10mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ(中外製薬)500μgを50mMのH
EPESバッファー(pH8.2)200μL(20μM)に溶解させ、10mMのペプ
チド試薬を3.38μL(抗体に対して10等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応
液を20mM酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を
測定したところ、原料のトラスツズマブは148223にピークが観測された。結合性ペ
プチドが1個導入された152707、結合性ペプチドが2個導入された157188、
3個導入された161676のピークが確認された。

20

【0398】

(18-5-3)トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析
による重鎖選択性の確認

(18-5-2)で生成した抗体・ペプチド複合体に100mMトリス(2-カルボキ
シエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で15分攪
拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50
596に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが
1個導入された55077、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された。

【0399】

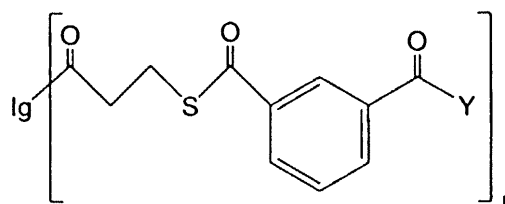
30

(18-5-4)トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによる
ペプチド/抗体結合比の確認

(5-2)で解析したMSデータについて、DAR calculator(Agil
ent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。

【0400】

【化85】



40

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

50

Yは、配列番号5のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、
I gと、I gに隣接する2個のカルボニル基(C=O)との間の平均結合比率rは、2
.0である。]

【0401】

【表9】

表9

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

10

【0402】

(18-5-5)チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

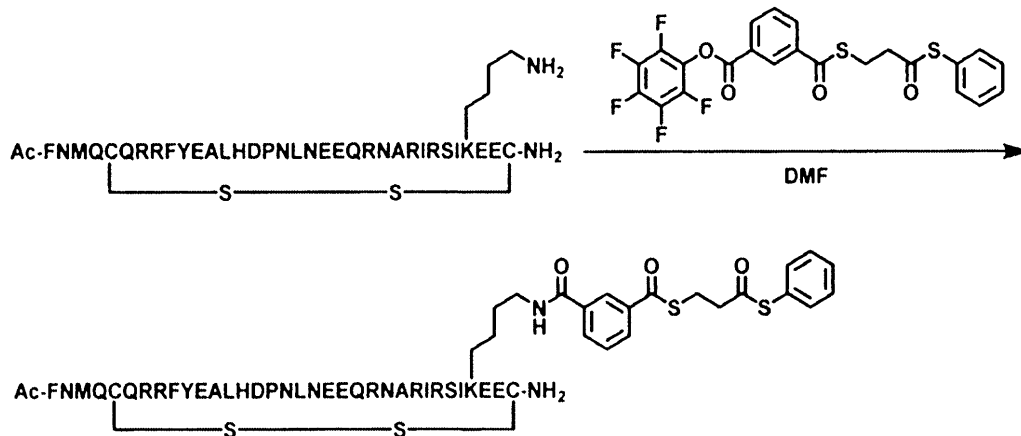
チオール基導入抗体誘導体は、(18-5-4)で得られた抗体中間体を、(18-1-8)に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、(18-1-8)に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

【0403】

(18-6-1)ペプチドとリンカーの結合

【化86】

20



30

上記2つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号6のアミノ酸配列である。

【0404】

(18-1-1)に記載の方法で合成したAc-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC-NH₂(配列番号6)(30.0mg, 7.06 μmol、ただし5番目と34番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)に(18-2-2)と同様の方法でリンカーを結合し、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体(22.2mg, 4.82 μmol)を得た。

40

【0405】

MS(ESI)m/z: z = 4 1152.4 [M + 4H]⁴⁺

【0406】

(18-6-2)抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(18-6-1)で合成したペプチドリンカー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し10mMとした。抗HER2抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを50mMのHEPESバッファー(pH 8.2)200 μL(20 μM)に溶解させ、10mMのペプチド試薬を3.38 μL(抗体に対して10等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応

50

液を20 mM酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148223にピークが観測された。結合性ペプチドが1個導入された152720、結合性ペプチドが2個導入された157216、3個導入された161716のピークが確認された。

【0407】

(18-6-3) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(18-6-2) で生成した抗体・ペプチド複合体に100 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2 μ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で15分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50596に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが1個導入された55091、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された。

10

【0408】

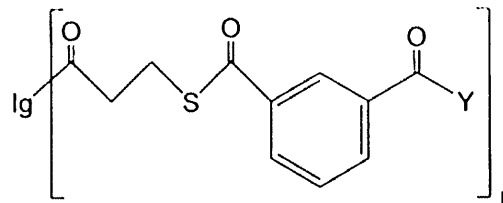
(18-6-4) トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチド/抗体結合比の確認

(18-6-2) で解析したMSデータについて、DAR calculator(Agilent社ソフト)によりペプチド/抗体結合比の確認を行った結果を表10に示す。表10のDAR peakと%Areaから算出された平均のペプチド/抗体結合比は2.0となった。したがって、下記構造式で表される抗体中間体(平均のペプチド/抗体結合比2.0)の生成が確認された。

20

【0409】

【化87】



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

30

Yは、配列番号6のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

Igと、Igに隣接する2個のカルボニル基(C=O)との間の平均結合比率rは、2.0である。]

【0410】

【表10】

表10

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

40

【0411】

(18-6-5) チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

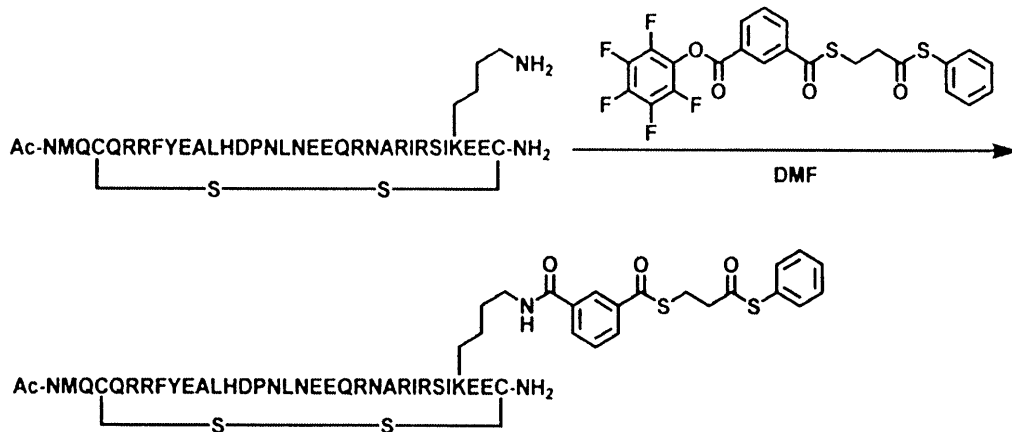
チオール基導入抗体誘導体は、(18-6-4)で得られた抗体中間体を、(18-1-8)に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、(18-1-8)に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

50

【 0 4 1 2 】

(1 8 - 7 - 1) ペプチドとリンカーの結合

【 化 8 8 】



10

上記2つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号7のアミノ酸配列である。

【 0 4 1 3 】

(1 8 - 1 - 1) に記載の方法で合成した Ac - 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 - N H ₂ (配列番号7) (3 0 . 0 m g , 7 . 0 6 μ m o l 、 20
ただし5番目と34番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) に (1 8 - 2 - 2) と同様の方法でリンカーを結合し、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物 - チオフェノール活性化体 (1 2 . 0 m g 、 2 . 6 9 μ m o l) を得た。

【 0 4 1 4 】

MS (E S I) m / z : z = 4 1 1 1 5 . 8 [M + 4 H] ⁴⁺

【 0 4 1 5 】

(1 8 - 7 - 2) 抗 H E R 2 抗体トラスツズマブの特異的修飾と E S I - T O F M S による解析

(1 8 - 7 - 1) で合成したペプチドリンカー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し 30
1 0 m M とした。抗 H E R 2 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 5 0 0 μ g を 5 0 m M の H E P E S バッファー (p H 8 . 2) 2 0 0 μ L (2 0 μ M) に溶解させ、1 0 m M のペプチド試薬を 3 . 3 8 μ L (抗体に対して 1 0 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 2 0 m M 酢酸アンモニウムバッファーに置換した。E S I - T O F M S により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 1 4 8 2 2 3 にピークが観測された。結合性ペプチドが 1 個導入された 1 5 2 5 7 3 、結合性ペプチドが 2 個導入された 1 5 6 9 2 7 のピークが確認された。

【 0 4 1 6 】

(1 8 - 7 - 3) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での E S I - T O F M S 解析による重鎖選択性の確認

(1 8 - 7 - 2) で生成した抗体・ペプチド複合体に 1 0 0 m M トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 2 μ L (抗体に対して等量) を加えて、室温で 1 5 分攪拌した。E S I - T O F M S により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 5 0 5 9 6 に重鎖ピーク、2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが 1 個導入された 5 4 9 4 2 、軽鎖に原料と同じ 2 3 4 3 9 にピークが観測された。

【 0 4 1 7 】

(1 8 - 7 - 4) トラスツズマブの特異的修飾体の D A R c a l c u l a t o r によるペプチド / 抗体結合比の確認

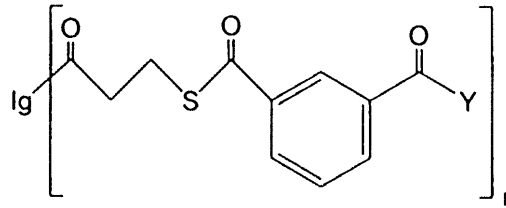
(1 8 - 7 - 2) で解析した MS データについて、D A R c a l c u l a t o r (A g i l e n t 社ソフト) によりペプチド / 抗体結合比の確認を行った結果を表 1 1 に示す

50

。表 1 1 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。

【 0 4 1 8 】

【 化 8 9 】



10

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

Y は、配列番号 7 のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

I g と、I g に隣接する 2 個のカルボニル基 (C = O) との間の平均結合比率 r は、2 . 0 である。〕

【 0 4 1 9 】

20

【 表 1 1 】

表 1 1

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

【 0 4 2 0 】

(1 8 - 7 - 5) チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

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

30

【 0 4 2 1 】

(1 8 - 7 - 6) トリプシン処理によるペプチドマッピング

(1 8 - 7 - 5) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体について、下記工程でペプチドマッピングを行った。

【 0 4 2 2 】

(1 8 - 7 - 6 - 1) トラスツズマブ・チオール導入体のトリプシン処理

(1 8 - 1 - 9 - 1) と同様に (1 8 - 7 - 5) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体のトリプシン処理を行った。

40

【 0 4 2 3 】

(1 8 - 7 - 6 - 2) トラスツズマブの L C - M S / M S 測定

(1 8 - 1 - 9 - 2) と同様の条件で L C - M S / M S 測定を行った。

【 0 4 2 4 】

(1 8 - 7 - 6 - 3) トラスツズマブの修飾部位の解析

(1 8 - 1 - 9 - 3) と同様に解析を行った。

【 0 4 2 5 】

(1 8 - 7 - 6 - 4) トラスツズマブの L C - M S / M S による修飾部位の解析結果

L C - M S / M S を用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位 (ヨードアセトアミドによる C a r b a m i d o m e t h y l 化を受け

50

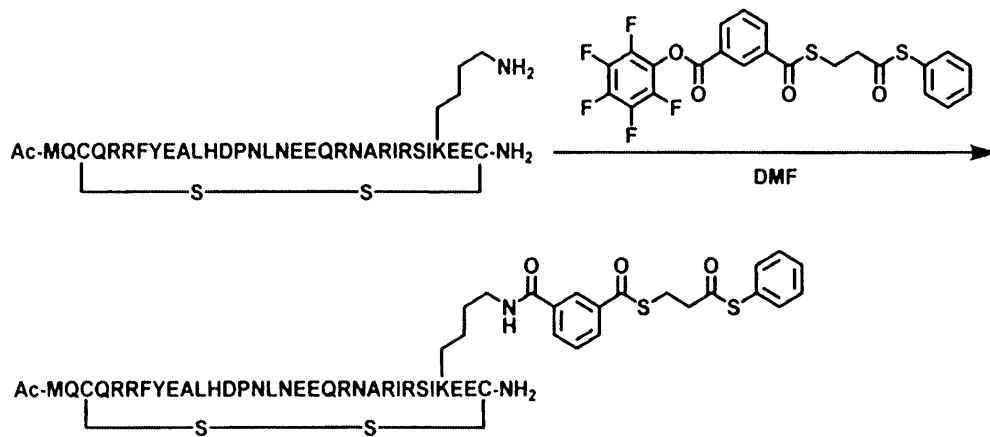
たチオール導入体 (+ 145.019 Da)) を含むアミノ酸 18 残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPR (配列番号 3) のペプチドフラグメントの MS スペクトル (実測値: m/z 769.04506、理論値: 769.04482、3 価) が観測され (図 13)、CID スペクトルより重鎖の E U n u m b e r i n g における 288 位もしくは 290 位のリジン残基の修飾を示す、2 価の y 16 に相当する m/z 1022.71 (理論値: 1022.51) のプロダクトイオンが確認された (図 14) 。また、BioPharma Finder での解析により、288 位もしくは 290 位のリジン残基への修飾が高選択的に起こっていることが示された (図 15) 。

この結果より、上記 (18-7-5) で得られたトラスツズマブ・チオール導入体では、抗体の重鎖上、E U n u m b e r i n g における L y s 288 および L y s 290 に位置選択的にコンジュゲーションが進行していることが分かった。

【0426】

(18-8-1) ペプチドとリンカーの結合

【化90】



上記 2 つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号 8 のアミノ酸配列である。

【0427】

(18-1-1) に記載の方法で合成した Ac-MQCQRRFYEALHDPNLN E E Q R N A R I R S I K E E C - N H ₂ (配列番号 8) (30.0 mg, 7.06 μmol、ただし 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) に (18-2-2) と同様の方法でリンカーを結合し、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体 (16.8 mg、3.87 μmol) を得た。

【0428】

MS (ESI) m/z : $z = 4$ 1087.3 [M + 4H]⁴⁺

【0429】

(18-8-2) 抗HER2抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(18-8-1) で合成したペプチドリンカー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し 10 mM とした。抗HER2抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 50 mM の HEPES バッファー (pH 8.2) 200 μL (20 μM) に溶解させ、10 mM のペプチド試薬を 3.38 μL (抗体に対して 10 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 20 mM 酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148223 にピークが観測された。結合性ペプチドが 1 個導入された 152457、結合性ペプチドが 2 個導入された 156692、3 個導入された 160929 のピークが確認された。

【0430】

(18-8-3) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析

による重鎖選択性の確認

(18-8-2)で生成した抗体・ペプチド複合体に100mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2 μ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で15分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50596に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが1個導入された54829、軽鎖に原料と同じ23439にピークが観測された。

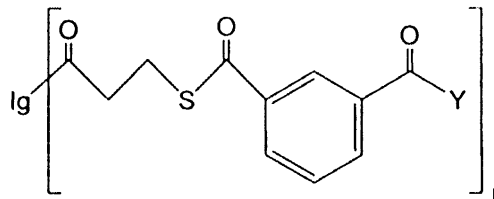
【0431】

(18-8-4)トラスツズマブの特異的修飾体のDAR calculatorによるペプチド/抗体結合比の確認

(18-8-2)で解析したMSデータについて、DAR calculator(Agilent社ソフト)によりペプチド/抗体結合比の確認を行った結果を表12に示す。表12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。

【0432】

【化91】



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

Yは、配列番号8のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

Igと、Igに隣接する2個のカルボニル基(C=O)との間の平均結合比率rは、2.0である。]

【0433】

【表12】

表12

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

【0434】

(18-8-5)チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

チオール基導入抗体誘導体は、(18-8-4)で得られた抗体中間体を、(18-1-8)に記載されるチオエステル基の切断反応に供することにより、(18-1-8)に記載されるチオール基導入抗体誘導体を得た。

【0435】

(18-9-1)ペプチドとリンカーの結合

10

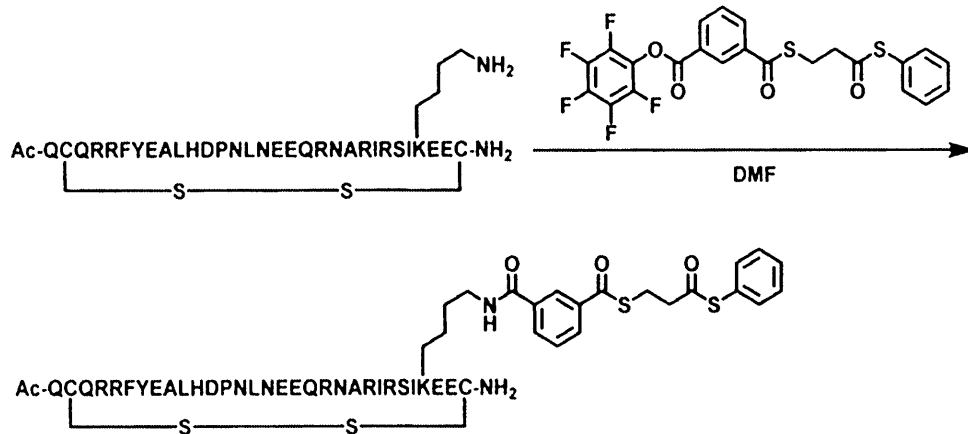
20

30

40

50

【化 9 2】



10

上記 2 つのアミノ酸配列はいずれも、配列番号 9 のアミノ酸配列である。

【0436】

(18-9-1)に記載の方法で合成した Ac-QCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKEEC-NH₂ (配列番号 9) (30.0 mg, 7.06 μmol、ただし 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) に (18-2-2) と同様の方法でリンカーを結合し、上記ペプチドチオエステルリンカー連結物-チオフェノール活性化体 (14.1 mg、3.35 μmol) を得た。

20

【0437】

MS (ESI) m/z : z = 4 1054.4 [M + 4H]⁴⁺

【0438】

(18-9-2) 抗 HER2 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(18-9-1) で合成したペプチドリリンカー連結物はジメチルスルホキシドに溶解し 10 mM とした。抗 HER2 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 50 mM の HEPES バッファー (pH 8.2) 200 μL (20 μM) に溶解させ、10 mM のペプチド試薬を 3.38 μL (抗体に対して 10 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 20 mM 酢酸アンモニウムバッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148223 にピークが観測された。結合性ペプチドが 1 個導入された 152236、結合性ペプチドが 2 個導入された 156430、3 個導入された 160541 のピークが確認された。

30

【0439】

(18-9-3) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(18-9-2) で生成した抗体・ペプチド複合体に 100 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 2 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 15 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 50596 に重鎖ピーク、23439 に軽鎖ピークが観測された。反応物は重鎖にリンカーが 1 個導入された 54698、軽鎖に原料と同じ 23439 にピークが観測された。

40

【0440】

(18-9-4) トラスツズマブの特異的修飾体の DAR calculator によるペプチド/抗体結合比の確認

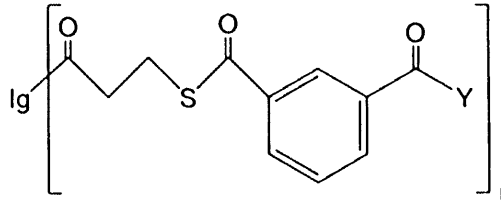
(18-9-2) で解析した MS データについて、DAR calculator (Agilent 社ソフト) によりペプチド/抗体結合比の確認を行った結果を表 13 に示す。表 13 の DAR peak と % Area から算出された平均のペプチド/抗体結合比は 2.0 となった。したがって、下記構造式で表される抗体中間体 (平均のペプチド/抗体

50

結合比 2 . 0) の生成が確認された。

【 0 4 4 1 】

【 化 9 3 】



10

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

Y は、配列番号 9 のアミノ酸配列で表される親和性ペプチドを示し、

I g と、I g に隣接する 2 個のカルボニル基 (C = O) との間の平均結合比率 r は、2 . 0 である。〕

【 0 4 4 2 】

【 表 1 3 】

20

表 1 3

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

【 0 4 4 3 】

(1 8 - 9 - 5) チオエステル基の切断によるチオール基導入抗体誘導体の製造

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

30

【 0 4 4 4 】

(1 8 - 1 0 - 1) 抗体の L y 2 8 8 / L y s 2 9 0 位に導入されたチオールへの生体直交性官能基の導入

実施例 1 のアジドリンカー (1) を用いて、実施例 (1 8 - 1 - 8) で合成した L y 2 8 8 / L y s 2 9 0 位チオール導入抗体を修飾した。生成物にトリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 (0 . 5 m M) を加えて、室温で 1 0 分攪拌し、既報 (W O 2 0 1 9 / 2 4 0 2 8 7 A 1) に従って E S I - T O F M S により質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は 5 0 6 8 3、5 0 8 4 5 に重鎖ピーク、2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジド基が導入された 5 0 8 1 6、5 0 9 7 8 および、原料と同じ 2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測された。

40

【 0 4 4 5 】

同様の手法にて、実施例 2 のアジドリンカー (2) を用いて、実施例 (1 8 - 1 - 8) で合成した L y 2 8 8 / L y s 2 9 0 位チオール導入抗体を修飾した。生成物にトリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 (0 . 5 m M) を加えて、室温で 1 0 分攪拌し、既報 (W O 2 0 1 9 / 2 4 0 2 8 7 A 1) に従って E S I - T O F M S により質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は 5 0 6 8 3、5 0 8 4 5 に重鎖ピーク、2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジド基が導入された 5 0 8 4 8、5 1 0 1 1 および、原料と同じ 2 3 4 3 9 に軽鎖ピークが観測された。

50

【0446】

同様の手法にて、実施例6で合成したアジドリンカー(6)を用いて、実施例(18-1-8)で合成したLy288/Lys290位チオール導入抗体を修飾した。反応液を20mM酢酸アンモニウムバッファーに置換し、既報(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)の手法に則りESI-TOFMSにより質量を測定したところ、アジド基が抗体に2つ導入された149023のピークが確認された。

【0447】

同様の手法にて、実施例8のアルキンリンカー(8)を用いて、実施例(18-1-8)で合成したLy288/Lys290位チオール導入抗体を修飾した。生成物にトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液(0.5mM)を加えて、室温で10分攪拌し、既報(WO2019/240287A1)に従ってESI-TOFMSにより質量を測定した。原料のチオール基導入抗体は50683、50845に重鎖ピーク、23439に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアルキン基が導入された51137、51304および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

10

【0448】

同様の手法にて、実施例11で合成したアルキンリンカー(11)を用いて、実施例(18-1-8)で合成したLy288/Lys290位チオール導入抗体を修飾した。反応液を20mM酢酸アンモニウムバッファーに置換し、既報(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)の手法に則りESI-TOFMSにより質量を測定したところ、アルキン基が抗体に2つ導入された149185のピークが確認された。

20

【0449】

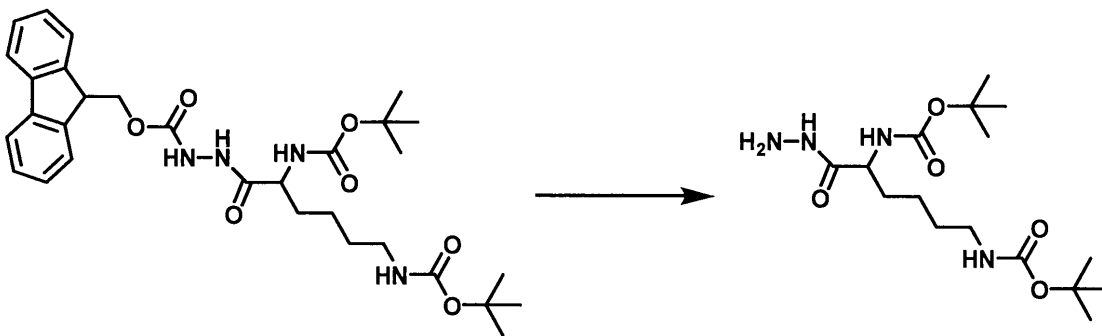
実施例19：ブランチ型試薬を用いたDAR=4型のADC合成

(19-1)ブランチ型アジド試薬の合成

(19-1-1)tert-Butyl N-[5-(tert-butoxycarbonylamino)-1-(hydrazinecarbonyl)pentyl]carbamateの合成

【0450】

【化94】



30

【0451】

9H-Fluoren-9-ylmethyl N-[2,6-bis(tert-butoxycarbonylamino)hexanoylamino]carbamate(191mg, 0.328mmol)に5%ピペリジン含有アセトニトリル溶液3mLを加え、室温で3時間攪拌した。TLCで原料の消失を確認後、減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、tert-Butyl N-[5-(tert-butoxycarbonylamino)-1-(hydrazinecarbonyl)pentyl]carbamateを得た(136mg)。

40

【0452】

MS(ESI) m/z: 361 [M+H]

50

【0453】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) = 7.97 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.12 - 4.04 (m, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.11 (q, J = 6.6, 2H), 1.84 - 1.77 (m, 1H), 1.72 - 1.65 (m, 1H), 1.54 - 1.37 (m, 4H), 1.45 (s, 18H).

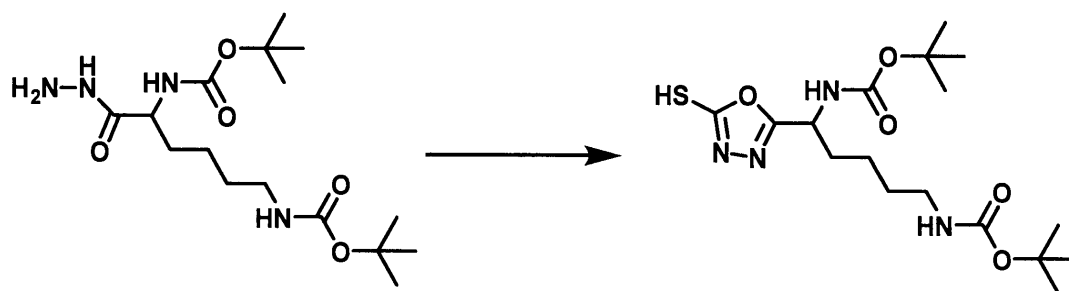
【0454】

(19-1-2) tert-butyl N-[5-(tert-butoxycarbonylamino)-1-(5-sulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pentyl]carbamate の合成

10

【0455】

【化95】



20

【0456】

tert-Butyl N-[5-(tert-butoxycarbonylamino)-1-(hydrazinyl)pentyl]carbamate (136.2 mg, 0.328 mmol) のエタノール溶液 (8 mL) に二硫化炭素 (0.034 mL, 0.567 mmol) 及び水酸化カリウム (66.4 mg, 1.18 mmol) を加え、70 で20時間攪拌した。反応液に1N塩酸を加えて減圧下濃縮した後、酢酸エチルで抽出した。次に有機層を減圧下濃縮して得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、tert-butyl N-[5-(tert-butoxycarbonylamino)-1-(5-sulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pentyl]carbamate を得た (94 mg, 0.234 mmol, 2工程収率71%)。

30

【0457】

MS (ESI) m/z : 401 [M-H]

【0458】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) = 5.14 (s, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.55 (s, 1H), 3.06 (d, J = 6.7, 2H), 1.84 - 1.76 (m, 2H), 1.46 - 1.41 (m, 2H), 1.38 (s, 18H), 1.22 - 1.20 (m, 2H), 0.81 (t, J = 6.8, 1H).

40

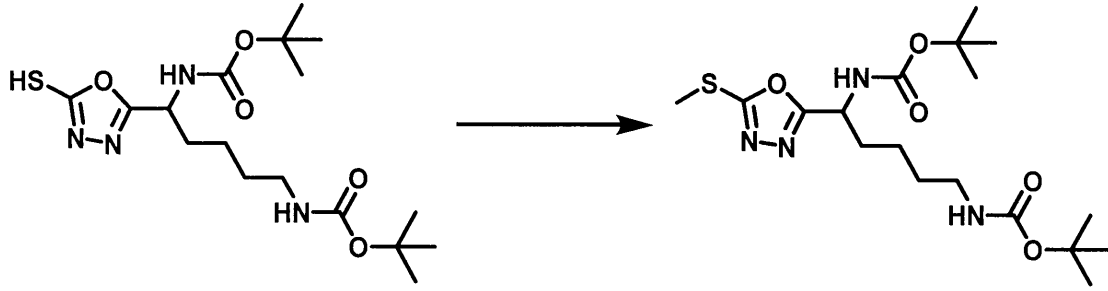
【0459】

(19-1-3) tert-butyl N-[5-(tert-butoxycarbonylamino)-1-(5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pentyl]carbamate の合成

【0460】

50

【化96】



10

【0461】

tert-butyl N-[5-(tert-butoxycarbonylamino)-1-(5-sulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pentyl]carbamate (94.1 mg, 0.234 mmol) の THF 溶液 (3 mL) を 0 に冷却し、ヨウ化メチル (0.044 mL, 0.702 mmol) 及びトリエチルアミン (0.097 mL, 0.702 mmol) を加えた。室温に戻して攪拌し TLC で原料の消失を確認した。反応液を減圧下濃縮して得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、tert-butyl N-[5-(tert-butoxycarbonylamino)-1-(5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pentyl]carbamate を得た (81 mg, 0.194 mmol, 収率 83%)。

20

【0462】

MS (ESI) m/z : 417 [M+H]

【0463】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-d) = 5.08 (s, 1H), 4.89 (s, 1H), 4.53 (s, 1H), 3.05 (q, $J=6.6$, 2H), 2.64 (s, 3H), 1.89-1.74 (m, 2H), 1.48-1.41 (m, 4H), 1.37 (d, $J=2.5$, 18H) .

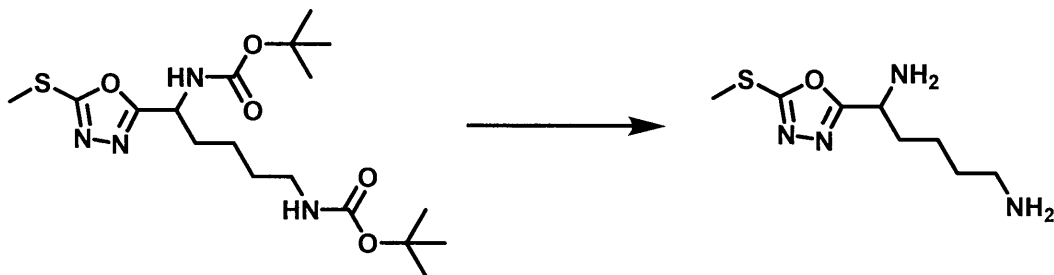
【0464】

(19-1-4) 1-(5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pentane-1,5-diamine の合成

30

【0465】

【化97】



40

【0466】

tert-butyl N-[5-(tert-butoxycarbonylamino)-1-(5-methylsulfanyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pentyl]carbamate (80.9 mg, 0.194 mmol) のジクロロメタン溶液 (5 mL) にトリフルオロ酢酸 (5 mL) を加え室温にて2時間攪拌した後、反応液を減圧下濃縮した。得られた残渣に1N塩酸と酢酸エチルを加えて目的物を水層に抽出し、凍結乾燥することで1-(5-methylsulfanyl-1,3

50

, 4 - oxadiazol - 2 - yl) pentane - 1 , 5 - diamine を得た (57 mg) 。

【 0467 】

MS (ESI) m / z : 217 [M + H]

【 0468 】

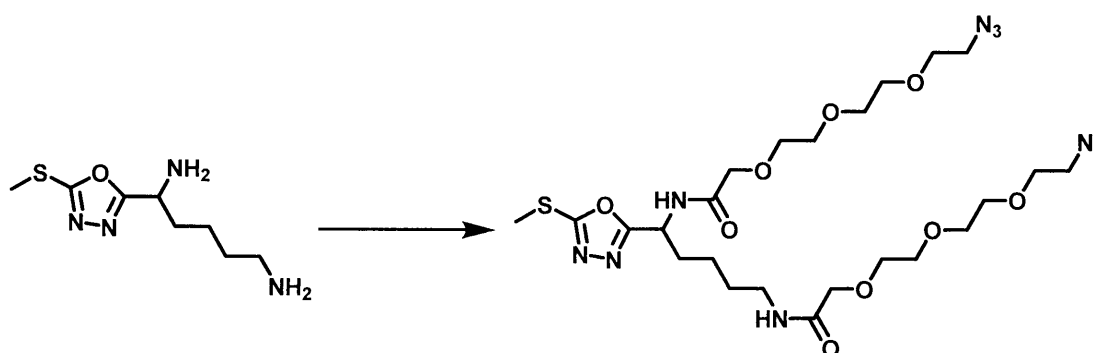
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz , Methanol - d) = 4.81 (dd , $J = 8.3, 5.8$, 1H) , 2.97 (t , $J = 7.7$, 2H) , 2.79 (s , 3H) , 2.22 - 2.09 (m , 2H) , 1.82 - 1.73 (m , 2H) , 1.61 - 1.50 (m , 2H) 。

【 0469 】

(19 - 1 - 5) 2 - [2 - [2 - (2 - azidoethoxy) ethoxy] ethoxy] - N - [5 - [[2 - [2 - [2 - (2 - azidoethoxy) ethoxy] ethoxy] acetyl] amino] - 5 - (5 - methylsulfonyl - 1 , 3 , 4 - oxadiazol - 2 - yl) pentyl] acetamide の合成

【 0470 】

【 化 98 】



【 0471 】

1 - (5 - methylsulfonyl - 1 , 3 , 4 - oxadiazol - 2 - yl) pentane - 1 , 5 - diamine (57.3 mg , 0.200 mmol) の DMF 溶液 (3 mL) に 1 - Ethyl - 3 - (3 - dimethylaminopropyl) carbodiimide , hydrochloride (134.2 mg , 0.700 mmol) 、 トリエチルアミン (0.139 mL , 1.00 mmol) 、 N , N - ジメチルアミノピリジン (4.9 mg , 0.040 mmol) 、 11 - Azido 3 , 6 , 9 - trioxaundecanoic acid (102.0 mg , 0.44 mmol) を加えた。室温にて 3 時間攪拌した後、まだ原料が残っていたので、1 - Ethyl - 3 - (3 - dimethylaminopropyl) carbodiimide , hydrochloride (40.0 mg , 0.209 mmol) 、 トリエチルアミン (0.070 mL , 0.505 mmol) 、 11 - Azido 3 , 6 , 9 - trioxaundecanoic acid (37.0 mg , 0.160 mmol) を追加し更に 1 時間攪拌した。反応液をアセトニトリル水で希釈して分取 HPLC にて精製し、生成物が含まれるフラクションを回収した。減圧下濃縮によりアセトニトリルを除いた後、水溶液を凍結乾燥することで (1 - 4) 2 - [2 - [2 - (2 - azidoethoxy) ethoxy] ethoxy] - N - [5 - [[2 - [2 - [2 - (2 - azidoethoxy) ethoxy] ethoxy] acetyl] amino] - 5 - (5 - methylsulfonyl - 1 , 3 , 4 - oxadiazol - 2 - yl) pentyl] acetamide を得た (48 mg , 0.0734 mmol , 2 工程収率 38 %) 。

【 0472 】

MS (ESI) m / z : 647 [M + H]

【0473】

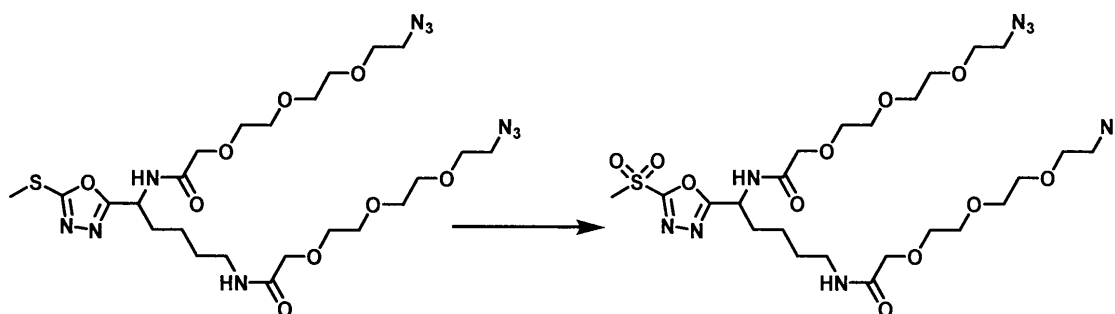
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-d) = 7.46 (d, $J=9.0$, 1H), 7.01 (t, $J=6.1$, 1H), 5.35 (td, $J=8.5$, 6.2, 1H), 4.07 (d, $J=3.2$, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.79-3.58 (m, 20H), 3.40 (dt, $J=5.7$, 4.3, 4H), 3.30 (q, $J=6.9$, 2H), 2.72 (s, 3H), 2.15-2.01 (m, 1H), 2.10-1.84 (m, 1H), 1.68-1.53 (m, 2H), 1.53-1.35 (m, 2H).

【0474】

(19-1-6) 2-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]-N-[5-[[2-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]acetyl]amino]-5-(5-methylsulfonyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pentyl]acetamide の合成

【0475】

【化99】



【0476】

2-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]-N-[5-[[2-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]acetyl]amino]-5-(5-methylsulfonyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pentyl]acetamide (47.5 mg, 0.0734 mmol) のジクロロメタン溶液 (2 mL) に、3-クロロ過安息香酸 (約30%水含む) (112.4 mg, 0.456 mmol) を加えた。室温にて5時間攪拌した後、反応液を減圧下濃縮して得られた残渣を分取HPLCにて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮してアセトニトリルを除いた後、水溶液を凍結乾燥することで目的物を得た (92 mg)。まだ不純物の残留が認められたためカラムクロマトグラフィーにて再精製を行った。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、2-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]-N-[5-[[2-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]acetyl]amino]-5-(5-methylsulfonyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pentyl]acetamide を得た (31 mg, 0.0457 mmol, 収率62%)。

【0477】

MS (ESI) m/z : 679 [M+H]

【0478】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-d) = 7.67 (d, $J=8.6$, 1H), 7.04 (t, $J=5.6$, 1H), 5.46 (td, $J=8.5$, 6.2, 1H), 4.10 (d, $J=5.4$, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.76-3.64 (m, 20H), 3.49 (s, 3H), 3.44-3.37 (m, 4H), 3.32 (q, $J=6.8$, 2H)

), 2.23 - 2.08 (m, 1H), 2.08 - 1.94 (m, 1H), 1.56 - 1.40 (m, 2H), 1.38 - 1.21 (m, 2H).

【0479】

(19-2) ブランチ型アジド試薬とチオール基導入抗体とのコンジュゲーション

実施例2(2)に記載の手法と同様の方法にてチオール基導入抗体に実施例19-1-6で合成したアジドリinkerを反応させた。

【0480】

既報(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)の手法に則りESI-TOFMSにより質量を測定したところ、アジド基が抗体に4つ導入された149620のピークが確認された。

10

【0481】

(19-3) クリック反応によるADCの合成

既報(WO2019/240287A1およびWO2019/240288A1)および実施例15-1に従って、実施例19-2で得られたブランチ型アジド導入トラスツズマブに対して、DBCO-VC-PAB-MMAE(ABZENA社製)のDMF溶液(5mM)を20当量加え、室温にて20時間攪拌後、NAP-5 Columns(GEヘルスケア社製)を用いて精製し、ADCを得た。

【0482】

既報(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)の手法に則りESI-TOFMSにより質量を測定したところ、DBCO-VC-PAB-MMAEが抗体に4つ導入された155284のピークが確認された。

20

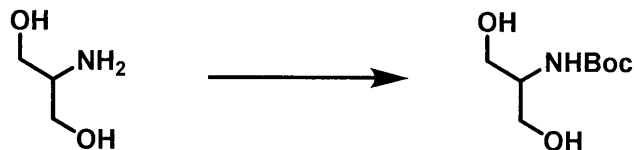
【0483】

(19-4) ブランチ型保護チオール試薬の合成

(19-4-1) tert-Butyl(1,3-dihydroxypropan-2-yl) carbamateの合成

【0484】

【化100】



30

【0485】

2-Amino-1,3-propanediol(186.2mg, 2.00mmol)のメタノール溶液(1.8mL)にt-ブチルアルコール(1.8mL)を加え、Di-tert-butyl dicarbonate(597.3mg, 2.60mmol)のt-ブチルアルコール溶液(1.4mL)を滴下した。室温にて17時間攪拌した後、反応液を減圧下濃縮した。得られた粗生成物にヘキサン(4mL)を加えると白い固体が析出した。ろ過をして固体をヘキサン(3mL)で洗浄後に真空ラインで乾燥し、tert-Butyl(1,3-dihydroxypropan-2-yl) carbamateを得た(352.9mg, 1.845mmol, 収率92%)。

40

【0486】

MS(ESI) m/z: 213 [M+Na]

【0487】

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) = 5.22 (s, 1H), 3.84 (qd, J=11.0, 4.3, 4H), 3.71 (s, 1H), 1.48 (s, 9H)

【0488】

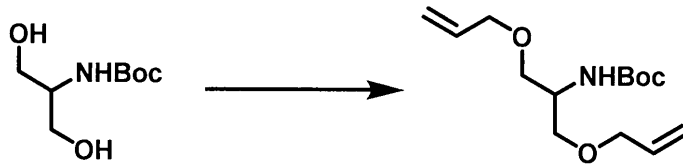
(19-4-2) tert-Butyl N-[2-allyloxy-1-(allyl

50

oxymethyl)ethyl] carbamateの合成

【0489】

【化101】



【0490】

tert-Butyl (1,3-dihydroxypropan-2-yl) carbamate (324.9 mg, 1.70 mmol) のDMF溶液 (4 mL) に Allyl bromide (0.547 mL, 6.34 mmol) を加え、水酸化カリウム (359.0 mg, 6.40 mmol) を少しずつ添加した。室温にて4時間攪拌した後、反応液を減圧下濃縮して得られた残渣にジクロロメタンと水を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、減圧下濃縮して得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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 tert-Butyl N-[2-allyloxy-1-(allyloxymethyl)ethyl] carbamate を得た (326.6 mg, 1.20 mmol, 収率71%)。

【0491】

MS (ESI) m/z : 294 [M+Na]

【0492】

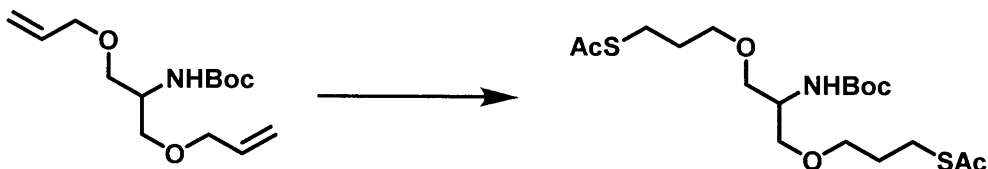
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-d) = 5.95 - 5.86 (m, 2H), 5.29 (dq, $J=17.2, 1.7$, 2H), 5.20 (dq, $J=10.4, 1.4$, 2H), 4.94 (s, 1H), 4.01 (dt, $J=5.5, 1.5$, 4H), 3.91 (s, 1H), 3.58 (dd, $J=9.4, 4.3$, 2H), 3.51 (dd, $J=9.4, 6.0$, 2H), 1.47 (s, 9H)。

【0493】

(19-4-3) S-[3-[3-acetylsulfanylpropoxy]-2-(tert-butoxycarbonylamino)propoxy]propyl]ethanethioateの合成

【0494】

【化102】



【0495】

tert-Butyl N-[2-allyloxy-1-(allyloxymethyl)ethyl] carbamate (323.8 mg, 1.19 mmol) のトルエン溶液 (7.4 mL) に 2,2-アゾビスイソブチロニトリル (1.993 g, 25.66 mmol) を加えた。懸濁状の反応液にチオ酢酸 (0.890 mL, 11.88 mmol) を5回に分けて加え、65℃にて21時間攪拌した。反応液を室温に戻し減圧下濃縮することにより得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、S-[3-[3-acetylsulfanylpropoxy]-2-(tert-butoxycarbonylamino)propoxy]propyl]ethanethioate を得た (3

10

20

30

40

50

62.0 mg, 0.854 mmol, 収率72%)。

【0496】

MS (ESI) m/z : 446 [M+Na]

【0497】

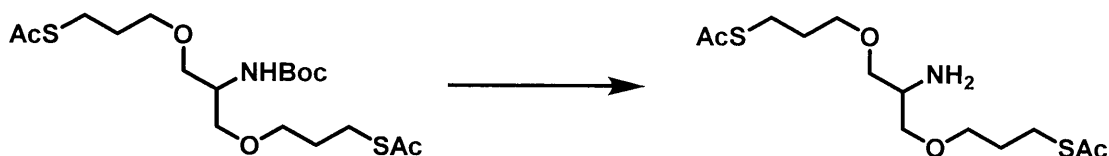
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) = 4.95 (s, 1H), 3.87 (s, 1H), 3.55 - 3.44 (m, 8H), 3.03 - 2.89 (m, 4H), 2.35 (s, 6H), 1.93 - 1.76 (m, 4H), 1.47 (s, 9H).

【0498】

(19-4-4) S-[3-[3-(3-acetylsulfanylpropoxy)-2-amino propoxy]propyl]ethanethioateの合成

【0499】

【化103】



【0500】

S-[3-[3-acetylsulfanylpropoxy]-2-(tert-butoxycarbonylamino) propoxy]propyl]ethanethioate (360.1 mg, 0.850 mmol) のジクロロメタン溶液 (2 mL) にトリフルオロ酢酸 (2 mL) を加え室温にて1時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮して得られた残渣に0.1 N塩酸 (10 mL) を加え、再び減圧下濃縮して得られた水溶液を凍結乾燥してS-[3-[3-(3-acetylsulfanylpropoxy)-2-amino propoxy]propyl]ethanethioateの塩酸塩を得た (384.4 mg)。

【0501】

MS (ESI) m/z : 324 [M+H]

【0502】

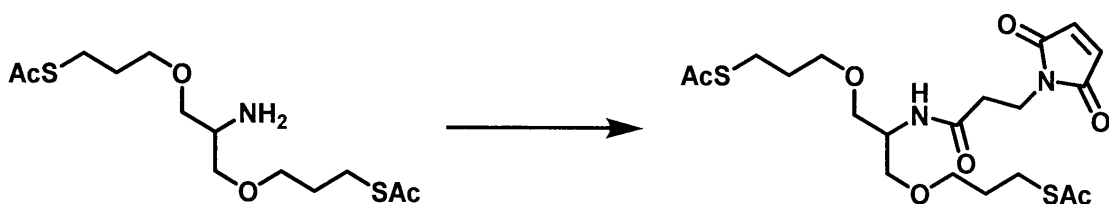
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) = 4.51 (s, 2H), 3.82 - 3.64 (m, 5H), 3.64 - 3.45 (m, 4H), 3.10 - 2.92 (m, 4H), 2.37 (s, 6H), 1.95 - 1.81 (m, 4H).

【0503】

(19-4-5) S-[3-[3-(3-acetylsulfanylpropoxy)-2-[3-(2,5-dioxopyrrol-1-yl)propanoylamino] propoxy]propyl]ethanethioateの合成

【0504】

【化104】



【0505】

3-マレイミドプロピオン酸 (17.6 mg, 0.10 mmol) のTHF溶液 (1.

10

20

30

40

50

5 mL) に *o*-Benzotriazol-1-yl-tetramethyluronium hexafluorophosphate (56.9 mg, 0.15 mmol)、トリエチルアミン (0.021 mL, 0.15 mmol)、及び *S*-[3-[3-(3-acetylsulfanylpropoxy)-2-amino propoxy]propyl]ethanethioate (53.2 mg, 0.11 mmol) の THF 溶液 (0.5 mL) を加えた。室温にて 2 時間攪拌した後、反応液を減圧下濃縮して得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィーにて精製した。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、*S*-[3-[3-(3-acetylsulfanylpropoxy)-2-[3-(2,5-dioxopyrrol-1-yl)propanoylamino]propoxy]propyl]ethanethioate を得た (18.7 mg, 0.039 mmol, 収率 41%)。

10

【0506】

MS (ESI) m/z : 475 [M+H]

【0507】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) = 6.72 (s, 2H), 6.43 (s, 1H), 4.18 (s, 1H), 3.88 (t, $J=7.0$, 2H), 3.59-3.38 (m, 8H), 3.07-2.88 (m, 4H), 2.61 (t, $J=7.1$, 2H) 2.36 (s, 6H), 1.88-1.84 (m, 4H)。

【0508】

20

(19-5) ブランチ型保護チオール試薬とチオール基導入抗体とのコンジュゲーション
実施例 2 (2) に記載の手法と同様の方法にてチオール基導入抗体に実施例 19-4-5 で合成したブランチ型リンカーを反応させた。

【0509】

既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) の手法に則り ESI-TOFMS により質量を測定したところ、保護チオール基が抗体に 4 つ導入された 149392 のピークが確認された。

【0510】

(19-6) チオエステル基の切断によるブランチ型チオール基導入抗体誘導体の製造
(19-5) で得られた抗体中間体に対し、既報 (WO2019/240287A1) に従いヒドロキシルアミン溶液を加え、室温で 1 時間静置した。2 時間後、20 mM PBS バッファー、10 mM EDTA (pH 7.4) へと置換し、チオール基導入抗体誘導体を得た。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、脱保護反応が進行した 149231 にピークが確認された。

30

【0511】

(19-7) ADC mimic の合成

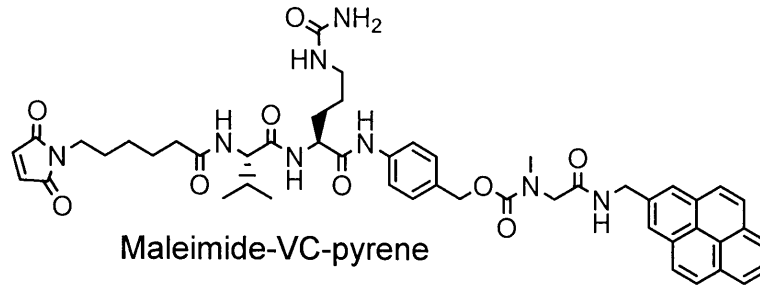
(19-7-1) Maleimide-VC-Pyrene の合成

Maleimide-VC-Pyrene は下記のように合成した。市販の MC-VC-PAB-PNP (CAS No: 159857-81-5) と既知の Sarcosine-pyrene (WO2018/218004A1) より 1 工程で合成した。

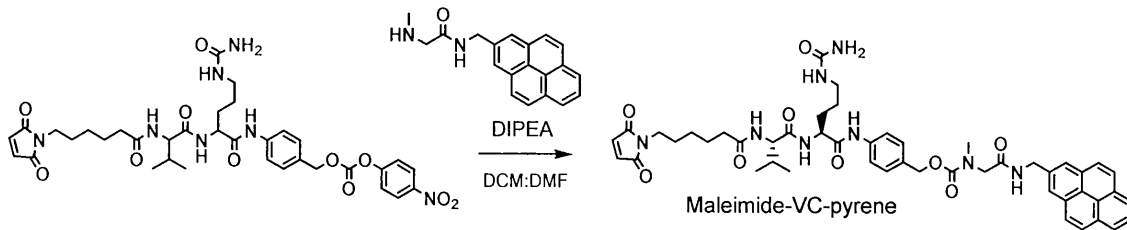
40

【0512】

【化105】



10



20

【0513】

市販のMC-VC-PAB-PNP (CAS No: 159857-81-5) (15.5 mg, 0.021 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解させ、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.025 mL, 0.142 mmol)、既知のSarcosine-pyrene (WO2018/218004A1) (7.6 mg, 0.025 mmol)、のジメチルホルムアミド溶液 (0.5 mL) を加え、17時間攪拌した。逆相分取クロマトグラフィーにて精製した後、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アセトニトリルを除去し、凍結乾燥を行うことにより、Maleimide-VC-Pyrene (7.3 mg, 0.008 mmol) を得た。

【0514】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) 9.98 (s, 1H), 8.34 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 8.32 - 8.23 (m, 4H), 8.16 (s, 2H), 8.10 - 8.00 (m, 4H), 7.80 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.99 (s, 2H), 5.96 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.95 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.38 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.03 - 2.92 (m, 3H), 2.67 (m, 1H), 2.33 (m, 1H), 2.20 - 2.07 (m, 2H), 1.97 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.51 - 1.45 (m, 6H), 1.26 - 1.15 (m, 3H), 0.83 (dd, $J = 12.8, 6.8$ Hz, 6H)

40

【0515】

MS (ESI) m/z : 901.45 [M+H] $^+$

【0516】

(19-7-2) ADC mimic の合成

実施例19-6で得られたチオール基導入抗体のbuffer (pH 7.4 PBSバッファー) 溶液 (20 μM) に実施例19-7-1で合成したMaleimide-VC-PyreneのDMF溶液 (1.25 mM) を10当量加え、室温にて2時間静置後、NAP-5 Columns (GEヘルスケア社製) を用いて精製してADC mimicを得た。

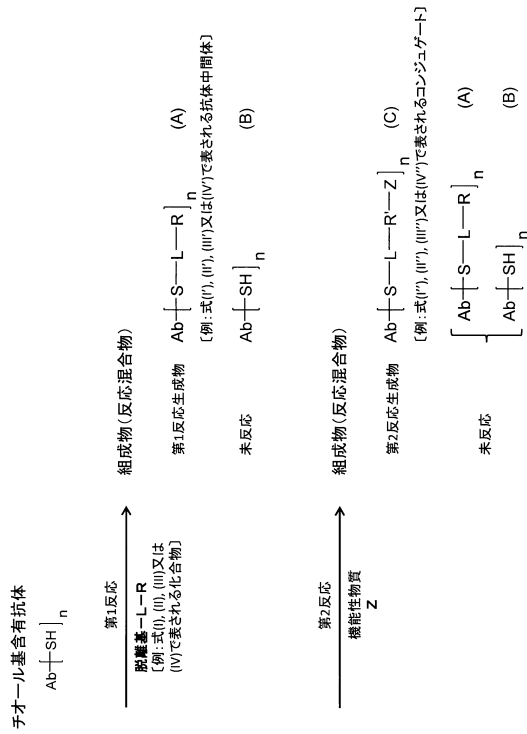
【0517】

50

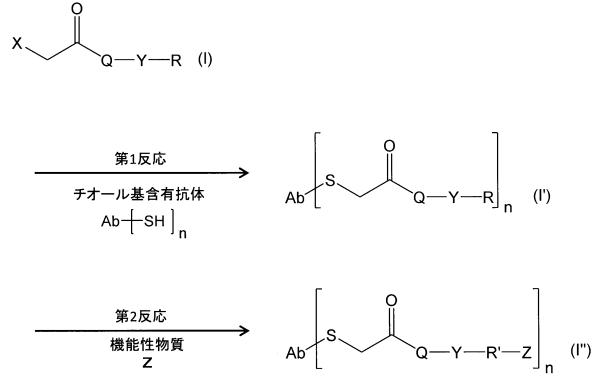
既報 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) の手法に則り ESI-TOFMS により質量を測定したところ、Maleimide-VC-Pyrene が抗体に 4 つ導入された 152843 のピークが確認された。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

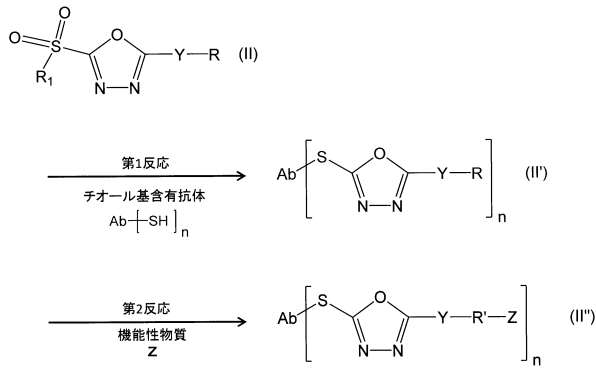
20

30

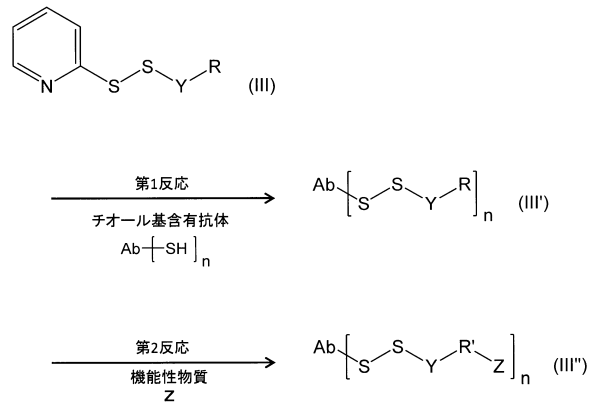
40

50

【図3】



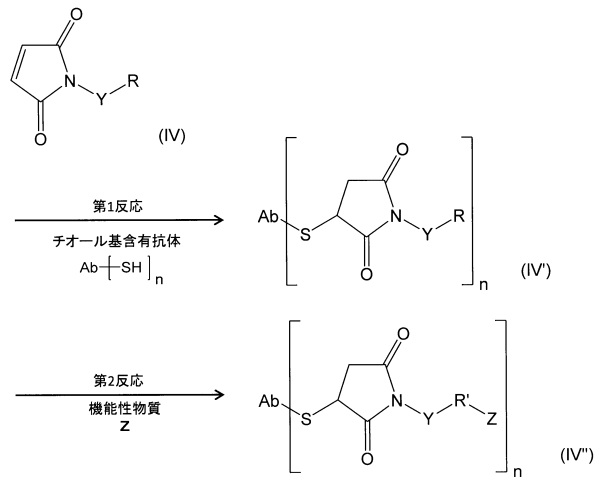
【図4】



10

20

【図5】



【図6】

(1) トラスツズマブの重鎖のアミノ酸配列

```

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN1KDTYIHWVRQA
PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY
LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNYHT
QKSLSLSPG (配列番号1)

```

(2) トラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列

```

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPK
GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPP
SDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (配列番号2)

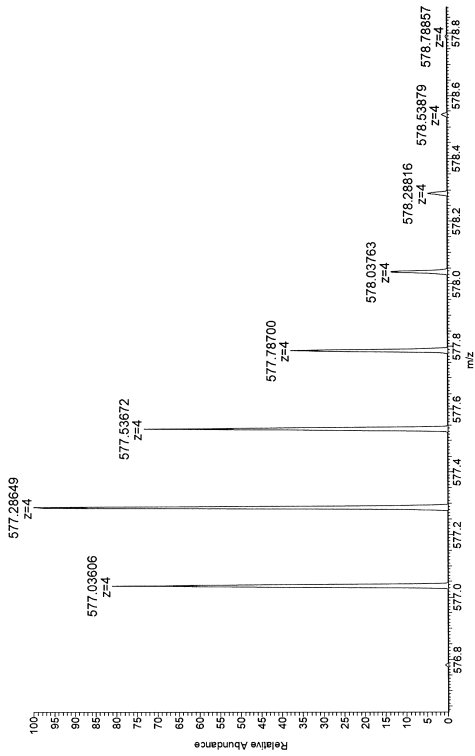
```

30

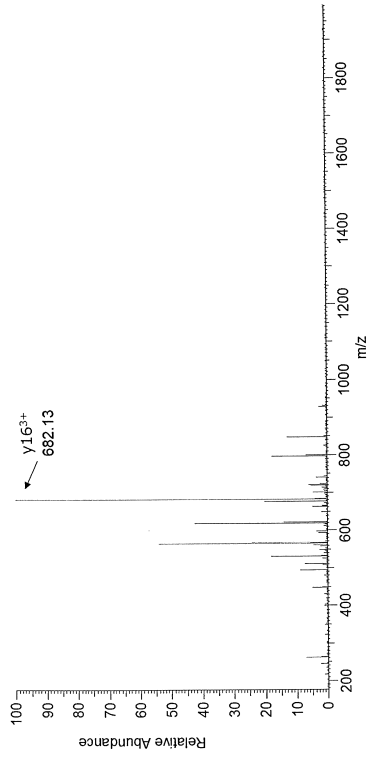
40

50

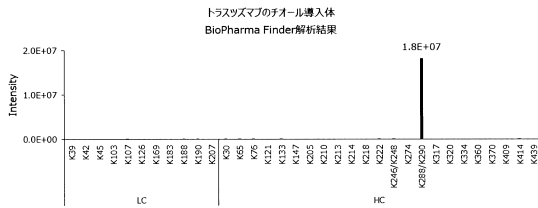
【 7 】



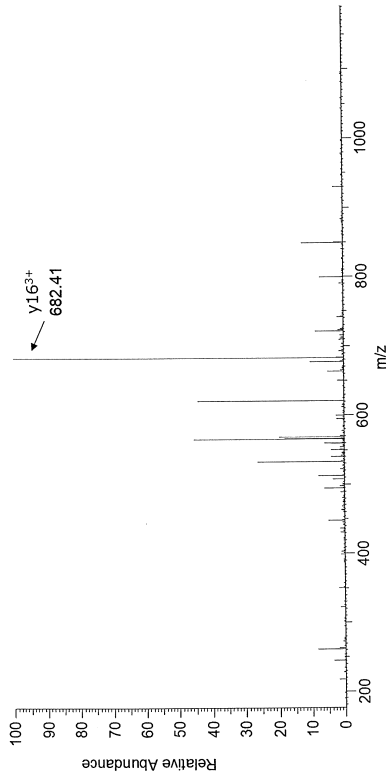
【 8 】



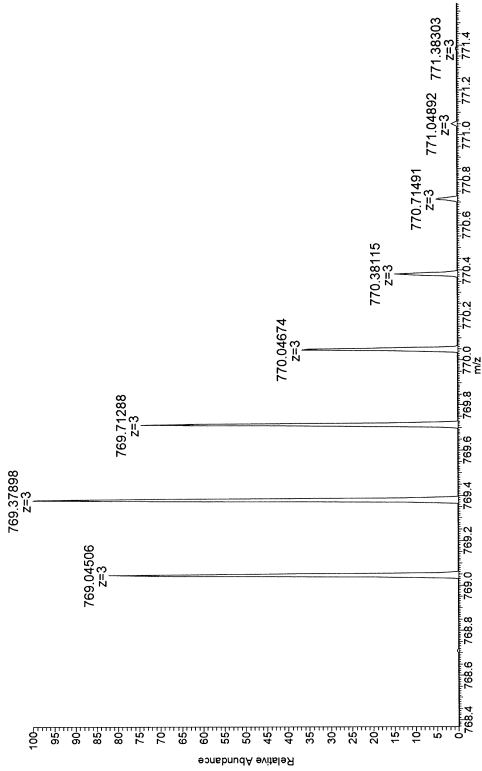
【 9 】



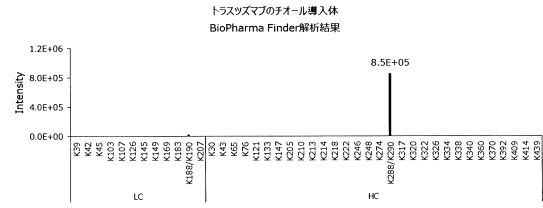
【 ☒ 1 1 】



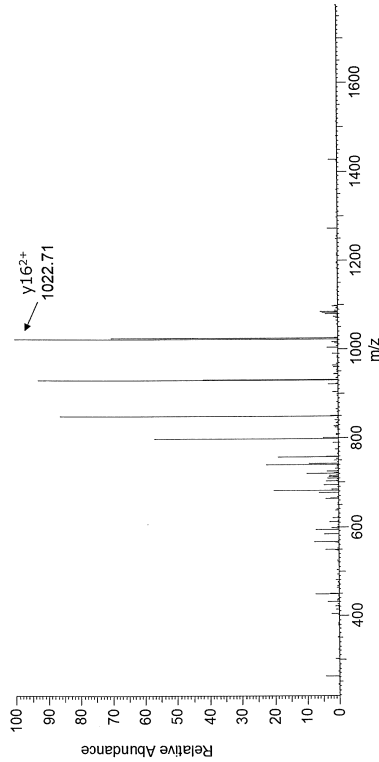
【 ☒ 1 3 】



【 ☒ 1 2 】



【 ☒ 1 4 】



10

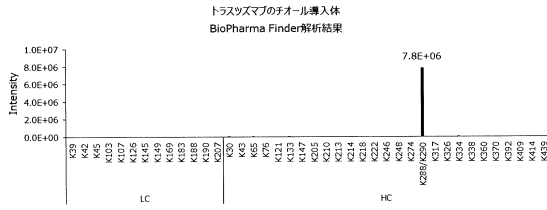
20

30

40

50

【 15 】



10

20

【 配列表 】

0007670072000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

F I

A 6 1 P 43/00 1 0 5

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

審査官 團野 克也

(56)参考文献

特表平11-514223(JP,A)

特開2020-121981(JP,A)

特表2008-539270(JP,A)

特表2011-508194(JP,A)

中国特許出願公開第112098640(CN,A)

国際公開第2014/144878(WO,A2)

国際公開第2019/240287(WO,A1)

特表2014-521319(JP,A)

KONIEV Oleksandr et al., Bioconjugate Chem., 2015年, Vol.26, pp.1863-1867

JEONG Sinyoung et al., Nanoscale, 2017年, Vol.9, Issue 7, pp.2548-2555

LEE Byeong Sung et al., Journal of Biological Engineering, 2019年, Vol.13, No.56, pp.1-13

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

IPC C07K16/00、A61K

DB等 CAplus/REGISTRY(STN)