(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-503924
(P2024-503924A)
(43)公表日　令和6年1月29日(2024.1.29)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/40 (2006.01)		C07K	16/40	ZNA	4C084
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	T	4C085
A61P 35/00 (2006.01)		A61K	39/395	P	4H045
A61K 51/10 (2006.01)		A61K	39/395	Y	
C12N 15/09 (2006.01)		A61P	35/00		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全179頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-545254(P2023-545254)
(86)(22)出願日　令和4年1月26日(2022.1.26)
(85)翻訳文提出日　令和5年9月22日(2023.9.22)
(86)国際出願番号　PCT/IB2022/050673
(87)国際公開番号　WO2022/162549
(87)国際公開日　令和4年8月4日(2022.8.4)
(31)優先権主張番号　63/142,147
(32)優先日　令和3年1月27日(2021.1.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/144,586
(32)優先日　令和3年2月2日(2021.2.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　509087759
ヤンセン バイオテツク，インコーポレーテツド
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９０４４ホーシヤム・リツジビユードライブ８００／８５０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100095360
弁理士　片山 英二
(74)代理人　100093676
弁理士　小林 純子
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100153693
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　カリクレイン関連ペプチダーゼ２抗原結合ドメインを含む免疫コンジュゲート及びその使用

(57)【要約】
ｈＫ２に対する結合特異性を有する抗体又は抗原結合ドメインにコンジュゲートされた治療部分を含む免疫コンジュゲート、例えば放射性免疫コンジュゲートが、本明細書で提供される。特定の実施形態において、ｈＫ２特異的免疫複合体は、短い半減期を示す。癌細胞を選択的に標的とし、前立腺癌などの疾患を処置するために免疫コンジュゲートを使用する方法も本明細書で提供される。

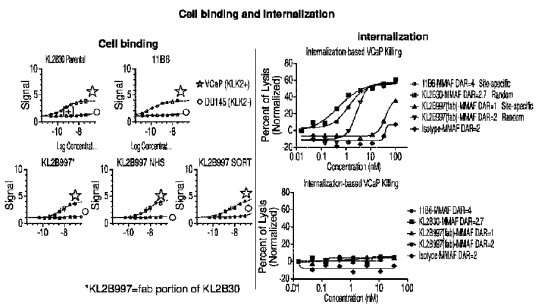
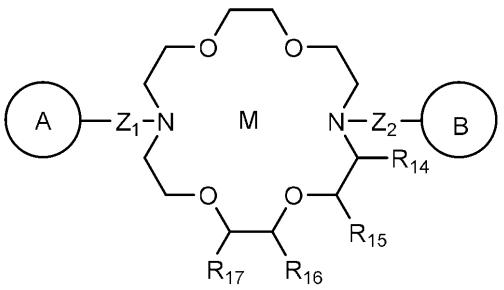


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにコンジュゲートされた治療部分を含む、免疫コンジュゲート。
【請求項２】
前記治療部分が細胞毒性薬である、請求項１に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項３】
前記治療部分が造影剤である、請求項１に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項４】
前記治療部分が放射性金属を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項５】
前記放射性金属が、^{225}Ａｃ、^{177}Ｌｕ、^{32}Ｐ、^{47}Ｓｃ、^{67}Ｃｕ、^{77}Ａｓ、^{89}Ｓｒ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{105}Ｒｈ、^{109}Ｐｄ、^{111}Ａｇ、^{131}Ｉ、^{149}Ｔｂ、^{152}Ｔｂ、^{155}Ｔｂ、^{153}Ｓｍ、^{159}Ｇｄ、^{165}Ｄｙ、^{166}Ｈｏ、^{169}Ｅｒ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{194}Ｉｒ、^{198}Ａｕ、^{199}Ａｕ、^{211}Ａｔ、^{212}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ、^{223}Ｒａ、^{255}Ｆｍ、^{227}Ｔｈ、^{177}Ｌｕ、^{62}Ｃｕ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{89}Ｚｒ、及び^{111}Ｉｎからなる群から選択される、請求項４に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項６】
前記治療部分が、^{225}Ａｃを含む細胞毒性薬である、請求項１に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項７】
前記治療部分が、^{111}Ｉｎを含む造影剤である、請求項１に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項８】
前記治療部分が、放射性金属錯体を含み、前記放射性金属錯体が、キレート剤に結合した放射性金属を含み、前記キレート剤が、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにコンジュゲートされている、請求項４～７のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項９】
前記キレート剤が、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）、Ｓ－２－（４－イソチオシアネートベンジル）－１，４，７－トリアザシクロノナン－１，４，７－三酢酸（ＮＯＴＡ）、１，４，８，１１－テトラアザシクロドデカン－１，４，８，１１－四酢酸（ＴＥＴＡ）、３，６，９，１５－テトラアザビシクロ［９．３．１］－ペンタデカ－１（１５），１１，１３－トリエン－４－（Ｓ）－（４－イソチオシアネートベンジル）－３，６，９－三酢酸（ＰＣＴＡ）、５－Ｓ－（４－アミノベンジル）－１－オキサ－４，７，１０－トリアザシクロドデカン－４，７，１０－トリス（酢酸）（ＤＯ３Ａ）又はその誘導体である、請求項８に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項１０】
前記キレート剤がＤＯＴＡである、請求項８に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項１１】
前記キレート剤がH_2ｂｐ１８ｃ６又はH_2ｂｐ１８ｃ６誘導体である、請求項８に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項１２】
前記放射性金属錯体が、式（Ｉ－ｍ）又は式（ＩＩ－ｍ）又は式（ＩＩＩ－ｍ）の放射性金属錯体であり、
式（Ｉ－ｍ）の前記放射性金属錯体が、以下の構造：

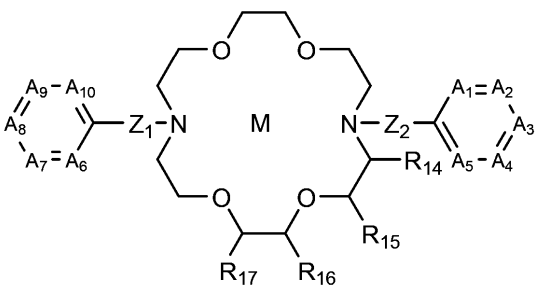
【化１】



（Ｉ－ｍ）

（式中、
Ｍは、放射性金属、好ましくはアルファ放出放射性金属イオン、より好ましくはアクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）であり；
環Ａ及び環Ｂの各々は、独立して、６～１０員のアリール又は５～１０員のヘテロアリールであり、環Ａ及び環Ｂの各々は、独立してハロ、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、－ＯＲ$_{13}$、－ＳＲ$_{13}$、－（ＣＨ$_2$）$_p$ＣＯＯＲ$_{13}$、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ$_{13}$、－Ｎ（Ｒ$_{13}$）$_2$、－ＣＯＮ（Ｒ$_{13}$）$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＣＮ－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ$_{13}$）$_2$、及びＸからなる群から選択される１つ以上の置換基で置換されていてもよく；
Ｚ$_1$及びＺ$_2$の各々は、独立して、（Ｃ（Ｒ$_{12}$）$_2$）$_m$－、又は－（ＣＨ$_2$）$_n$－Ｃ（Ｒ$_{12}$）（Ｘ）－（ＣＨ$_2$）$_n$－であり；
各Ｘは独立して－Ｌ$_1$－Ｒ$_{11}$であり；
各ｎは、独立して、０、１、２、３、４又は５であり、
各ｍは、独立して、１、２、３、４又は５であり、
各ｐは、独立して、０又は１であり、
Ｌ$_1$は、存在しないか、又はリンカーであり、
Ｒ$_{11}$は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含み；
各Ｒ$_{12}$は、独立して、水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル又はヘテロアリールであり；
各Ｒ$_{13}$は独立して、水素又はアルキルであり；
Ｒ$_{14}$、Ｒ$_{15}$、Ｒ$_{16}$及びＲ$_{17}$の各々は独立して、水素、アルキル又はＸであり、
あるいは、Ｒ$_{14}$及びＲ$_{15}$並びに／又はＲ$_{16}$及びＲ$_{17}$は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、Ｘで置換されていてもよい５員又は６員シクロアルキル環を形成し；ただし、放射性金属錯体は少なくとも１つのＸを含み、Ｘが環Ａ又は環Ｂ上に存在する場合、Ｌ$_1$はリンカーであるか、又はＲ$_{12}$及びＲ$_{14}$～Ｒ$_{17}$の少なくとも１つは水素ではない）を有し；
式（ＩＩ－ｍ）の前記放射性金属錯体が、以下の構造：

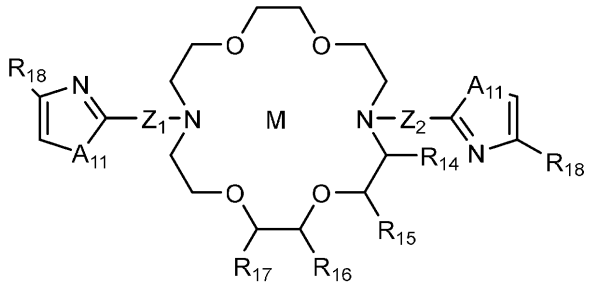
【化２】



（ＩＩ－ｍ）

（式中、
Ｍは、放射性金属、好ましくはアルファ放出放射性金属イオン、より好ましくはアクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）であり；
$Ａ_1$はＮ若しくは$ＣＲ_1$であるか、又は存在せず；
$Ａ_2$はＮ又は$ＣＲ_2$であり；
$Ａ_3$は、Ｎ又は$ＣＲ_3$であり；
$Ａ_4$は、Ｎ又は$ＣＲ_4$であり；
$Ａ_5$は、Ｎ又は$ＣＲ_5$であり；
$Ａ_6$は、Ｎ若しくは$ＣＲ_6$であるか、又は存在せず；
$Ａ_7$は、Ｎ又は$ＣＲ_7$であり；
$Ａ_8$は、Ｎ又は$ＣＲ_8$であり；
$Ａ_9$は、Ｎ又は$ＣＲ_9$であり；
$Ａ_{10}$は、Ｎ又は$ＣＲ_{10}$であり；
ただし、$Ａ_1$、$Ａ_2$、$Ａ_3$、$Ａ_4$、及び$Ａ_5$のうちの３つ以下がＮであり、$Ａ_6$、$Ａ_7$、$Ａ_8$、$Ａ_9$、及び$Ａ_{10}$のうちの３つ以下がＮであり；
$Ｒ_1$、$Ｒ_2$、$Ｒ_3$、$Ｒ_4$、$Ｒ_5$、$Ｒ_6$、$Ｒ_7$、$Ｒ_8$、$Ｒ_9$、及び$Ｒ_{10}$の各々は、独立して水素、ハロ、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、$ＯＲ_{13}$、$－ＳＲ_{13}$、$－（ＣＨ_2）_ｐＣＯＯＲ_{13}$、$－ＯＣ（Ｏ）Ｒ_{13}$、$－Ｎ（Ｒ_{13}）_2$、$－ＣＯＮ（Ｒ_{13}）_2$、$－ＮＯ_2$、$－ＣＮ－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ_{13}）_2$、及び－Ｘからなる群から選択され；
あるいは、任意の２つの直接隣接する$Ｒ_1$、$Ｒ_2$、$Ｒ_3$、$Ｒ_4$、$Ｒ_5$、$Ｒ_6$、$Ｒ_7$、$Ｒ_8$、$Ｒ_9$、及び$Ｒ_{10}$は、それらが結合している原子と一緒になって、５員又は６員の置換又は非置換炭素環又は窒素含有環を形成し；
$Ｚ_1$及び$Ｚ_2$の各々は、独立して、$（Ｃ（Ｒ_{12}）_2）_ｍ－$、又は$－（ＣＨ_2）_ｎ－Ｃ（Ｒ_{12}）（Ｘ）－（ＣＨ_2）_ｎ－$であり；
各Ｘは独立して$－Ｌ_1－Ｒ_{11}$であり；
各ｎは、独立して、０、１、２、３、４又は５であり、
各ｍは、独立して、１、２、３、４又は５であり、
各ｐは、独立して、０又は１であり、
$Ｌ_1$は、存在しないか、又はリンカーであり、
$Ｒ_{11}$は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含み；
各$Ｒ_{12}$は、独立して、水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル又はヘテロアリールであり；
各$Ｒ_{13}$は独立して、水素又はアルキルであり；
$Ｒ_{14}$、$Ｒ_{15}$、$Ｒ_{16}$及び$Ｒ_{17}$の各々は独立して、水素、アルキル又はＸであり、
あるいは、$Ｒ_{14}$及び$Ｒ_{15}$並びに／又は$Ｒ_{16}$及び$Ｒ_{17}$は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、Ｘで置換されていてもよい５員又は６員シクロアルキル環を形成し；
ただし、放射性金属錯体は少なくとも１つのＸを含み、$Ｒ_1$、$Ｒ_2$、$Ｒ_3$、$Ｒ_4$、$Ｒ_5$、$Ｒ_6$、$Ｒ_7$、$Ｒ_8$、$Ｒ_9$、及び$Ｒ_{10}$のいずれか１つがＸである場合、$Ｌ_1$はリンカーであるか、又は$Ｒ_{12}$及び$Ｒ_{14}$～$Ｒ_{17}$の少なくとも１つは水素ではない）を有し；
式（ＩＩＩ－ｍ）の前記放射性金属錯体が、以下の構造：

【化３】

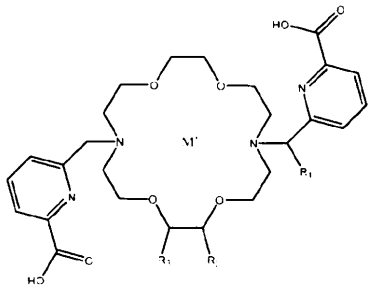


（ＩＩＩ－ｍ）

（式中、
Ｍは、放射性金属、好ましくはアルファ放出放射性金属イオン、より好ましくはアクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）であり；
各Ａ$_{11}$は、独立して、Ｏ、Ｓ、ＮＭｅ又はＮＨであり；
Ｚ$_1$及びＺ$_2$の各々は、独立して、（Ｃ（Ｒ$_{12}$）$_2$）$_m$－、又は－（ＣＨ$_2$）$_n$－Ｃ（Ｒ$_{12}$）（Ｘ）－（ＣＨ$_2$）$_n$－であり；
各Ｘは独立して－Ｌ$_1$－Ｒ$_{11}$であり；
各ｎは、独立して、０、１、２、３、４又は５であり、
各ｍは、独立して、１、２、３、４又は５であり、
各ｐは、独立して、０又は１であり、
Ｌ$_1$は、存在しないか、又はリンカーであり、
Ｒ$_{11}$は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含み；
各Ｒ$_{12}$は、独立して、水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル又はヘテロアリールであり；
各Ｒ$_{13}$は独立して、水素又はアルキルであり；
Ｒ$_{14}$、Ｒ$_{15}$、Ｒ$_{16}$及びＲ$_{17}$の各々は独立して、水素、アルキル又はＸであり、
あるいは、Ｒ$_{14}$及びＲ$_{15}$並びに／又はＲ$_{16}$及びＲ$_{17}$は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、Ｘで置換されていてもよい５員又は６員のシクロアルキル環を形成し；
各Ｒ$_{18}$は、独立して、水素、ハロ、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、ＯＲ$_{13}$、－ＳＲ$_{13}$、－（ＣＨ$_2$）$_p$ＣＯＯＲ$_{13}$、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ$_{13}$、－Ｎ（Ｒ$_{13}$）$_2$、－ＣＯＮ（Ｒ$_{13}$）$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＣＮ－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ$_{13}$）$_2$、及び－Ｘからなる群から選択され、
ただし、前記放射性金属錯体は少なくとも１つのＸを含み、Ｒ$_{18}$がＸである場合、Ｌ$_1$はリンカーであるか、又はＲ$_{12}$及びＲ$_{14}$～Ｒ$_{17}$の少なくとも１つは水素ではない）を有する、
請求項８に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項１３】
前記放射性金属錯体が、式（ＩＶ－ｍ）又は式（Ｖ－ｍ）又は式（ＶＩ－ｍ）の放射性金属錯体であり、
前記式（ＩＶ－ｍ）の放射性金属錯体が、以下の構造：

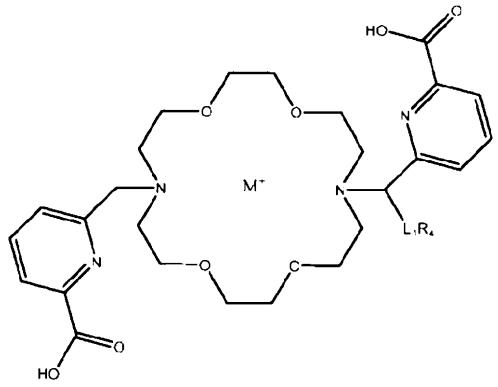
【化４】



（ＩＶ－ｍ）

（式中、
Ｍ$^{+}$は放射性金属であり、好ましくは、アクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）、ラジウム－２２３（^{233}Ｒａ）、ビスマス－２１３（^{213}Ｂｉ）、鉛－２１２（^{212}Ｐｂ（ＩＩ）及び／又は^{212}Ｐｂ（ＩＶ））、テルビウム－１４９（^{149}Ｔｂ）、テルビウム－１５２（^{152}Ｔｂ）、テルビウム－１５５（^{155}Ｔｂ）、フェルミウム－２５５（^{255}Ｆｍ）、トリウム－２２７（^{227}Ｔｈ）、トリウム－２２６（^{226}Ｔｈ$^{4+}$）、アスタチン－２１１（^{211}Ａｔ）、セリウム－１３４（^{134}Ｃｅ）、ネオジム１４４（^{144}Ｎｄ）、ランタン－１３２（^{132}Ｌａ）、ランタン－１３５（^{135}Ｌａ）及びウラン－２３０（^{230}Ｕ）からなる群から選択され；
Ｒ$_{1}$は水素であり、かつ、Ｒ$_{2}$は－Ｌ$_{1}$－Ｒ$_{4}$であり、
あるいは、Ｒ$_{1}$は－Ｌ$_{1}$－Ｒ$_{4}$であり、かつ、Ｒ$_{2}$は水素であり、
Ｒ$_{3}$は水素であり、
あるいは、Ｒ$_{2}$及びＲ$_{3}$は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員シクロアルキルを形成し、５員又は６員シクロアルキルは、－Ｌ$_{1}$－Ｒ$_{4}$で任意選択的に置換されており、
Ｌ$_{1}$は、存在しないか、又はリンカーであり、
Ｒ$_{4}$は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む）を有するか、又はその医薬的に許容される塩であり；
前記式（Ｖ－ｍ）の放射性金属錯体が、以下の構造：

【化５】



（Ｖ－ｍ）

（式中、
Ｍ$^{+}$は放射性金属であり、好ましくは、アクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）、ラジウム－２２３（^{233}Ｒａ）、ビスマス－２１３（^{213}Ｂｉ）、鉛－２１２（^{212}Ｐｂ（ＩＩ）及び／又は^{212}Ｐｂ（ＩＶ））、テルビウム－１４９（^{149}Ｔｂ）、テルビウム－１５２（^{152}Ｔｂ）、テルビウム－１５５（^{155}Ｔｂ）、フェルミウム－２５５（^{255}Ｆｍ）、トリウム－２２７（^{227}Ｔｈ）、トリウム－２２６（^{226}Ｔｈ$^{4+}$）、アスタチン－２１１（^{211}Ａｔ）、セリウム－１３４（^{134}Ｃｅ）、ネオジム１４

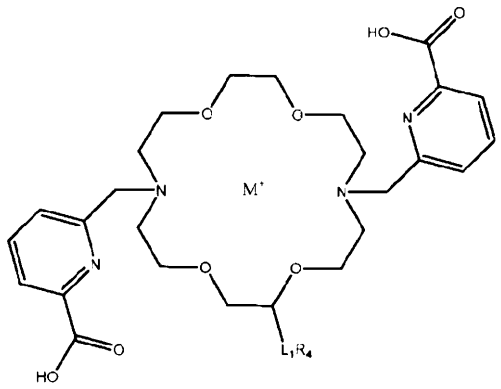
４（^{144}Ｎｄ）、ランタン－１３２（^{132}Ｌａ）、ランタン－１３５（^{135}Ｌａ）及びウラン－２３０（^{230}Ｕ）からなる群から選択され；

L_1は、存在しないか、又はリンカーであり、

R_4は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む）を有するか、又はその医薬的に許容される塩であり；

前記式（ＶＩ－ｍ）の放射性金属錯体が、以下の構造：

【化６】



（ＶＩ－ｍ）

（式中、

M^+は放射性金属であり、好ましくは、アクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）、ラジウム－２２３（^{233}Ｒａ）、ビスマス－２１３（^{213}Ｂｉ）、鉛－２１２（^{212}Ｐｂ（ＩＩ）及び又は^{212}Ｐｂ（ＩＶ））、テルビウム－１４９（^{149}Ｔｂ）、テルビウム－１５２（^{152}Ｔｂ）、テルビウム－１５５（^{155}Ｔｂ）、フェルミウム－２５５（^{255}Ｆｍ）、トリウム－２２７（^{227}Ｔｈ）、トリウム－２２６（^{226}Ｔｈ$^{4+}$）、アスタチン－２１１（^{211}Ａｔ）、セリウム－１３４（^{134}Ｃｅ）、ネオジム１４４（^{144}Ｎｄ）、ランタン－１３２（^{132}Ｌａ）、ランタン－１３５（^{135}Ｌａ）及びウラン－２３０（^{230}Ｕ）からなる群から選択され；

L_1は、存在しないか、又はリンカーであり、

R_4は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む）を有するか、又はその医薬的に許容される塩である、

請求項８に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項１４】

前記治療部分がアウリスタチン誘導体である、請求項１に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項１５】

前記治療部分がＭＭＡＥ（モノメチルアウリスタチンＥ）である、請求項１４に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項１６】

前記治療部分がＭＭＡＦ（モノメチルアウリスタチンＦ）である、請求項１４に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項１７】

ｈＫ２に結合する前記抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖ、（ｓｃＦｖ）$_2$、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ、ｄＡｂ又はＶＨＨである、請求項１～１６のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項１８】

ｈＫ２に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインがＦａｂである、請求項１～１６のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項１９】

前記抗原結合ドメインが、それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４

及び１７５のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２０】
ｈＫ２に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号１６２のＶＨに対して少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＨ、及び配列番号１６３のＶＬと少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＬを含む、請求項１～１９のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２１】
ｈＫ２に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含む、請求項１～１９のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２２】
前記抗原結合ドメインが、
ａ．それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４及び１７５のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３；並びに／又は
ｂ．配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含むＦａｂである、請求項１～１８のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２３】
短半減期免疫コンジュゲートである、請求項１～２２のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲート。
【請求項２４】
対象におけるｈＫ２発現癌を処置する方法であって、治療有効量の請求項１～２３のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートを前記対象に投与することを含む、方法。
【請求項２５】
対象におけるｈＫ２発現腫瘍細胞の量を減少させる方法であって、請求項１～２３のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートを、ｈＫ２発現腫瘍細胞の量を減少させるのに十分な時間、対象に投与することを含む、前記方法。
【請求項２６】
対象の前立腺癌を処置する方法であって、治療有効量の請求項１～２３のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートを前記対象に投与することを含む、前記方法。
【請求項２７】
前記前立腺癌が、再発性、難治性、悪性、若しくは去勢抵抗性前立腺癌、又はそれらの任意の組み合わせである、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記前立腺癌が転移性去勢抵抗性前立腺癌である、請求項２６に記載の方法。
【請求項２９】
対象における前立腺癌の存在を検出する方法であって、前立腺癌を有すると疑われる対象に、請求項１～２３のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートを投与し、前記コンジュゲートが結合した生物学的構造を視覚化することにより、前立腺癌の存在を検出することを含む、前記方法。
【請求項３０】
カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインに、前記治療部分をコンジュゲートさせることを含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートを製造する方法。
【請求項３１】
カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにコンジュゲートされたキレート剤に放射性金属を結合させることを含む、放射免疫コンジュゲートを作製する方法。
【請求項３２】

前記キレート剤がＤＯＴＡである、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記キレート剤がH_2ｂｐ１８ｃ６又はH_2ｂｐ１８ｃ６誘導体である、請求項３１に記載の方法。
【請求項３４】
前記キレート剤が、本明細書に記載の式（Ｉ）、式（ＩＩ）及び式（ＩＩＩ）のキレート剤からなる群から選択され、式中、R_{11}が、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む、請求項３１に記載の方法。
【請求項３５】
前記キレート剤が、本明細書に記載の式（ＩＶ）、式（Ｖ）及び式（ＶＩ）のキレート剤からなる群から選択され、式中、R_4が、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む、請求項３１に記載の方法。
【請求項３６】
ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖ、$(scFv)_2$、Ｆｖ、Ｆａｂ、$(Fab')_2$、Ｆｄ、ｄＡｂ又はＶＨＨである、請求項３１～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインがＦａｂである、請求項３１～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
抗原結合ドメインが、それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４及び１７５のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む、請求項３１～３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインが、配列番号１６２のＶＨと少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＨ、及び配列番号１６３のＶＬと少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＬを含む、請求項３１～３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】
ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインが、配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含む、請求項３１～３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１】
前記抗原結合ドメインが、
ａ．それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４及び１７５のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３；並びに／又は
ｂ．配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含むＦａｂである、
請求項３１～３７のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願への相互参照）
本出願は、２０２１年１月２７日に出願された米国仮出願第６３／１４２，１４７号及び２０２１年２月２日に出願された米国仮出願第６３／１４４，５８６号の優先権の利益を主張し、これらの内容は、その全体があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
（配列表）
本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出済みである、その全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。２０２２年１月２０日に作成された当該ＡＳＣＩ

Ｉコピーは、名称がＪＢＩ　６４６２　ＷＯＰＣＴ　１＿Ｓｅｑ　Ｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔであり、サイズが７５５ＫＢである。

【０００３】

（発明の分野）

本発明は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）タンパク質に結合する抗原結合ドメインを含む免疫コンジュゲート、例えば放射性コンジュゲート、並びにそれらを製造及び使用する方法を提供する。

【背景技術】

【０００４】

前立腺癌は、男性において２番目に高頻度に診断される癌であり、癌による死亡原因の第６位であり、世界中の男性における全新規癌症例の約１４％、癌による死亡の約６％を占めている。前立腺癌の診断から死亡までの過程は、疾患の程度、ホルモン状態、及び検出可能な転移の有無：限局性疾患、放射線療法又は手術後に検出可能な転移なく前立腺特異的抗原（prostate-specific antigen、ＰＳＡ）のレベルが上昇していること、並びに非去勢病期又は去勢病期における臨床的転移に基づいて、一連の臨床段階として最善に分類される。手術、放射線照射、又はこれら両方の併用は、限局性疾患の患者にとって治癒的なものになり得るが、これらの患者のうちのかなりの割合は、ＰＳＡレベルの上昇をエビデンスとする再発性疾患を有し、これは、特に高リスク群における転移の発生、すなわち、疾患の終末期への移行につながる場合がある。

【０００５】

アンドロゲン枯渇療法（androgen depletion therapy、ＡＤＴ）が標準的治療であり、全般的に予測可能な転帰は、ＰＳＡの低下、腫瘍が増殖しない安定期、続いて、ＰＳＡの上昇、及び去勢抵抗性疾患としての再成長である。長年にわたり、ＡＤＴは、転移性前立腺癌の患者のための標準治療であった。

【０００６】

カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２、ＨＫ２）は、前立腺組織及び前立腺癌に特異的なアンドロゲン受容体（ＡＲ）駆動発現を有するトリプシン様酵素である。ｈＫ２の発現は前立腺及び前立腺癌組織に限定されるが、ｈＫ２は、ステロイドホルモンによるＡＲ経路の適切な活性化後に乳癌株及び原発患者サンプルで検出可能であることが最近実証された（米国特許出願公開第２０１８／０３２６１０２号）。肥大又は悪性形質転換時に前立腺の高度に構造化された組織が損なわれた場合に、触媒的に不活性なｈＫ２の血液への逆行性放出が生じる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

治療目的及び診断目的のための次世代ｈＫ２標的療法が依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明の実施形態は、処置用途又は画像処理のための、放射性金属に結合するキレート剤とコンジュゲートした抗原結合ドメインを含む抗ｈｋ２放射性コンジュゲートに関する。特定の実施形態によれば、抗原結合ドメインを含む抗ｈＫ２放射性コンジュゲートは、全長抗体を含む抗ｈＫ２放射性コンジュゲートと比較して半減期が短い。

【０００９】

多くの場合、ヒトにおける免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）の循環半減期は約１０～２１日である。インタクトＩｇＧ中のＦｃドメインは、新生児型Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に結合することができ、抗体リサイクル及び最小限のエンドソーム分解をもたらす。ＦｃＲｎは、血清ＩｇＧホメオスタシス並びに母体から胎児へのＩｇＧ分子の胎盤移行において重要な役割を果たす。飲作用に続いて、初期エンドソームの酸性環境はＩｇＧ（並びにアルブミン）のＦｃＲｎへの結合を可能にし、これにより分解からの保護がもたらされ、ＩｇＧの細胞外環境への輸送が促進され、そこで分子は生理学的ｐＨに曝露されると解離して循

環に戻る。

【００１０】

Ｆａｂなどの抗原結合ドメインの循環半減期は、ＩｇＧの循環半減期よりもはるかに短い傾向がある。Ｆａｂ断片はＦｃドメインを欠くので、ＦｃＲｎ媒介性の半減期延長機構が欠如しており、したがって、Ｆａｂ単独では、半減期がより短い（例えば、２４時間未満、又は１２時間未満、場合によっては約２～３時間）。

【００１１】

本発明の一実施形態は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにコンジュゲートされた治療部分を含む免疫コンジュゲートを提供する。

【００１２】

特定の実施形態によれば、治療部分は細胞毒性薬である。

【００１３】

特定の実施形態によれば、治療部分は造影剤である。

【００１４】

特定の実施形態によれば、治療部分は放射性金属を含む。好適な放射性金属の非限定的な例としては、^{225}Ａｃ、^{177}Ｌｕ、^{32}Ｐ、^{47}Ｓｃ、^{67}Ｃｕ、^{77}Ａｓ、^{89}Ｓｒ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{105}Ｒｈ、^{109}Ｐｄ、^{111}Ａｇ、^{131}Ｉ、^{149}Ｔｂ、^{152}Ｔｂ、^{155}Ｔｂ、^{153}Ｓｍ、^{159}Ｇｄ、^{165}Ｄｙ、^{166}Ｈｏ、^{169}Ｅｒ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{194}Ｉｒ、^{198}Ａｕ、^{199}Ａｕ、^{211}Ａｔ、^{212}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ、^{223}Ｒａ、^{255}Ｆｍ、^{227}Ｔｈ、^{177}Ｌｕ、^{62}Ｃｕ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{89}Ｚｒ、及び^{111}Ｉｎが挙げられる。

【００１５】

特定の実施形態によれば、治療部分は、^{225}Ａｃを含む細胞毒性薬である。

【００１６】

特定の実施形態によれば、治療部分は、^{111}Ｉｎを含む造影剤である。

【００１７】

特定の実施形態によれば、治療部分は、放射性金属錯体を含み、放射性金属錯体は、キレート剤に結合した放射性金属を含み、キレート剤は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにコンジュゲートされている。

【００１８】

特定の実施形態によれば、キレート剤は、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）、Ｓ－２－（４－イソチオシアネートベンジル）－１，４，７－トリアザシクロノナン－１，４，７－三酢酸（ＮＯＴＡ）、１，４，８，１１－テトラアザシクロドデカン－１，４，８，１１－四酢酸（ＴＥＴＡ）、３，６，９，１５－テトラアザビシクロ［９．３．１］－ペンタデカ－１（１５），１１，１３－トリエン－４－（Ｓ）－（４－イソチオシアネートベンジル）－３，６，９－三酢酸（ＰＣＴＡ）、５－Ｓ－（４－アミノベンジル）－１－オキサ－４，７，１０－トリアザシクロドデカン－４，７，１０－トリス（酢酸）（ＤＯ３Ａ）又はその誘導体である。

【００１９】

特定の実施形態によれば、キレート剤はＤＯＴＡである。

【００２０】

特定の実施形態によれば、キレート剤は、H_2ｂｐ１８ｃ６又はH_2ｂｐ１８ｃ６誘導体である。

【００２１】

特定の実施形態によれば、放射性金属錯体は、本明細書に記載の式（Ｉ－ｍ）、又は式（ＩＩ－ｍ）、又は式（ＩＩＩ－ｍ）の放射性錯体であり、式中、R_{11}は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含み、Ｍは放射性金属である。

【００２２】

特定の実施形態によれば、放射性金属錯体は、本明細書に記載の式（ＩＶ－ｍ）、又は式（Ｖ－ｍ）、又は式（ＶＩ－ｍ）の放射性金属錯体であり、式中、R_4は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含み、Ｍ＋は、放射性金属である。

【００２３】

特定の実施形態によれば、治療部分は、ＭＭＡＥ（モノメチルアウリスタチンＥ）又はＭＭＡＦ（モノメチルアウリスタチンＦ）などのアウリスタチン誘導体である。

【００２４】

特定の実施形態によれば、ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインは、ｓｃＦｖ、$(scFv)_2$、Ｆｖ、Ｆａｂ、$F(ab')_2$、Ｆｄ、ｄＡｂ又はＶＨＨである。

【００２５】

特定の実施形態によれば、ｈＫ２に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインは、Ｆａｂである。

【００２６】

特定の実施形態によれば、抗原結合ドメインは、それぞれ、配列番号１７０（ＳＹＹＷＳ）、配列番号１７１（ＹＩＹＹＳＧＳＴＮＹＮＰＳＬＫＳ）、配列番号１７２（ＴＴＩＦＧＶＶＴＰＮＦＹＹＧＭＤＶ）、配列番号１７３（ＲＡＳＱＧＩＳＳＹＬＡ）、配列番号１７４（ＡＡＳＴＬＱＳ）及び配列番号１７５（ＱＱＬＮＳＹＰＬＴ）のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む。

【００２７】

特定の実施形態によれば、ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインは、配列番号１６２（ＱＶＱＬＱＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＴＶＳＧＧＳＩＳＳＹＹＷＳＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＷＩＧＹＩＹＹＳＧＳＴＮＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＶＤＴＳＫＮＱＦＳＬＫＬＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＹＣＡＧＴＴＩＦＧＶＶＴＰＮＦＹＹＧＭＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ）のＶＨに対して少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＨ、及び配列番号１６３（ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＦＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＧＩＳＳＹＬＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＦＬＩＹＡＡＳＴＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＬＮＳＹＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ）のＶＬに対して少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＬを含む。

【００２８】

特定の実施形態によれば、ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインは、配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含む。

【００２９】

特定の実施形態によれば、抗原結合ドメインは、Ａ）それぞれ配列番号１７０，１７１，１７２，１７３，１７４及び１７５のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３、並びに／又はＢ）配列番号１６２のＶＨ、及び配列番号１６３のＶＬを含むＦａｂである。

【００３０】

特定の実施形態によれば、免疫コンジュゲートは、短半減期免疫コンジュゲートである。

【００３１】

特定の実施形態によれば、対象におけるｈＫ２発現癌を処置する方法は、治療有効量の前述の実施形態のいずれかによる免疫コンジュゲートを対象に投与することを含む。

【００３２】

特定の実施形態によれば、対象におけるｈＫ２発現腫瘍細胞の量を減少させる方法は、治療有効量の前述の実施形態のいずれかによる免疫コンジュゲートを対象に投与することを含む。

【００３３】

特定の実施形態によれば、対象における前立腺癌を処置する方法は、治療有効量の前述の実施形態のいずれかによる免疫コンジュゲートを対象に投与することを含む。

【００３４】

いくつかの実施形態では、前立腺癌は、再発性、難治性、悪性、若しくは去勢抵抗性前立腺癌、又はそれらの任意の組み合わせである。

【００３５】

特定の実施形態によれば、前立腺癌は、転移性去勢抵抗性前立腺癌である。

【００３６】

特定の実施形態によれば、対象における前立腺癌の存在を検出する方法であって、前述の実施形態のいずれかに記載の免疫コンジュゲートを、前立腺癌を有する疑いのある対象に投与し、コンジュゲートが結合した生物学的構造（例えば、コンピュータ断層撮影法又は陽電子放射断層撮影法によって）を可視化し、それにより、前立腺癌の存在を検出することを含み、免疫コンジュゲートは、好ましくは、１１１－Ｉｎ又は６４－Ｃｕなどの造影剤を含む、方法である。特定の実施形態によれば、本方法は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を用いて治療部分を抗原結合ドメインにコンジュゲートさせることを含む。

【００３７】

特定の実施形態によれば、本明細書中に記載の放射性免疫コンジュゲートの作製方法は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにコンジュゲートしたキレート剤に放射性金属を結合させることを含む。

【００３８】

特定の実施形態によれば、短半減期放射性免疫コンジュゲートは、放射性金属錯体を含み、放射性金属錯体は、キレート剤に結合した^{225}Ａｃを含み、キレート剤は、ｈＫ２に対する結合特異性を有するＦａｂにコンジュゲートされ、当該Ｆａｂは、それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４及び１７５のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む。特定の実施形態では、当該Ｆａｂは、配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含む。

【図面の簡単な説明】

【００３９】

上述の「発明の概要」及び以降の「発明を実施するための形態」は、添付の図面と併せて読むことでより良好に理解されるであろう。本発明は、図面に示される正確な実施形態に限定されない点を理解する必要がある。

【００４０】

図面のうち：

【図１】図１は、ｈＫ２発現ＶＣａＰ細胞における、ＭＭＡＦ（モノメチルアウリスタチンＦ）にコンジュゲートしたＫＬ２Ｂ３０　Ｆａｂ（ＫＬ２Ｂ９９７として同定される）を含む本発明の免疫コンジュゲートの細胞結合及び内在化を示す。

【図２】図２は、ＫＬ２Ｂ９９７及びＫＬ２Ｂ１２５１のアミノ酸配列（重鎖及び軽鎖の配列）を示す。ＫＬ２Ｂ９９７は、重鎖上にＨｉｓ－ｔａｇ及びソルターゼタグ（図２において下線が引かれている）を有し、ＫＬ２Ｂ１２５１はタグを有しない。

【発明を実施するための形態】

【００４１】

「背景技術」において、また、本明細書全体を通じて各種刊行物、論文及び特許を引用又は記載し、これら参照文献の各々はその全容が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれる文書、操作、材料、デバイス、物品などの考察は、本発明のコンテキストを与えるためのものである。かかる考察は、これらの事物のいずれか又は全てが、開示又は特許請求されるいずれかの発明に対する先行技術の一部を構成することを容認するものではない。

【００４２】

別の定義がなされない限り、本明細書に使用される全ての技術用語及び科学用語は、本

発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。そうでない場合、本明細書で引用される特定の用語は、本明細書に記載される意味を有するものである。本明細書に引用する全ての特許、公開された特許出願及び刊行物は、参照によって恰もその全体が本明細書に記載されているものと同様にして組み込まれる。

【００４３】

本明細書に使用される場合、複数の列挙された要素間の「及び／又は」という接続的な用語は、個々の及び組み合わされた選択肢の両方を包含するものとして理解される。例えば、２つの要素が「及び／又は」によって接続される場合、第１の選択肢は、第２の要素なしの第１の要素の適用性を指す。第２の選択肢は、第１の要素なしに第２の要素が適用可能であることを指す。第３の選択肢は、第１及び第２の要素が一緒に適用可能であることを指す。これらの選択肢のうちのいずれか１つは、意味に含まれ、したがって、本明細書に使用される場合、用語「及び／又は」の要件を満たすことが理解される。選択肢のうちの２つ以上の同時適用性もまた、意味に含まれ、したがって、用語「及び／又は」の要件を満たすことが理解される。

【００４４】

本出願の読者を助けるため、明細書の記載は、様々な段落若しくはセクションに分けられているか、又は本出願の様々な実施形態に向けられている。これらの分離は、段落又はセクション又は実施形態の実体を別の段落又はセクション又は実施形態の実体から切り離すものとみなされるべきではない。反対に、当業者であれば、本明細書の記載が広範な用途を有し、想到され得る様々な段落、パラグラフ、及び文章の全ての組み合わせを包含することを理解するであろう。いかなる実施形態の考察も、単なる例示であることを意味するものであり、特許請求の範囲を含む本開示の範囲がこれらの実施例に限定されることを示唆することを意図するものではない。

【００４５】

本明細書で使用するとき、数値範囲の使用は、文脈上そうでない旨が明確に示されない限り、その範囲内の整数及び値の分数を含む、全ての可能な部分範囲、その範囲内の全ての個々の数値を明示的に含む。

【００４６】

リストが提示される場合、特に指定されない限り、そのリストの各個々の要素及びそのリストの全ての組み合わせは別個の実施形態であることを、理解されたい。例えば、「Ａ、Ｂ、又はＣ」として提示される実施形態のリストは、実施形態「Ａ」、「Ｂ」、「Ｃ」、「Ａ又はＢ」、「Ａ又はＣ」、「Ｂ又はＣ」、又は「Ａ、Ｂ、又はＣ」を含むと解釈されるべきである。

【００４７】

本明細書及び添付の「特許請求の範囲」において使用される場合、「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」という単数形は、その内容について別途明確に指示されない限り、複数の指示対象を包含する。したがって、例えば、「細胞（ａ ｃｅｌｌ）」という言及には、２つ又は３つ以上の細胞の組み合わせなどが含まれる。

【００４８】

移行句「備える／含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ ｏｆ）」、及び「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｏｆ）」は、特許用語において一般的に受け入れられている意味を含意することを意図しており、すなわち、（ｉ）「備える／含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」は、「含む」、「含有する」、又は「特徴とする」と同義であり、包括的又は非制限的なものであり、その他の列挙されていない要素又は方法工程を除外するものではなく、（ｉｉ）「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｏｆ）」は、特許請求の範囲において特定されていない、あらゆる要素、工程、又は成分を除外し、並びに（ｉｉｉ）「から本質的になる」は、特定される材料又は工程、並びに、特許請求される発明の「基本的かつ新しい特徴に実質的に影響しないもの」に、特許請求の範囲を制限する。語句「備える／含む」（又はその同等語）を伴って記載される実施形態はまた、「からなる」及び「から本質的になる」を伴って独立して記載される実施形態として提供する。

【００４９】
「約」は、当業者によって決定される特定の値について許容される誤差範囲内であることを意味し、これは、その値がどのように測定又は決定されるのか、すなわち、測定システムの制限に部分的に依存する。
【００５０】
「抗体依存性細胞傷害」、「抗体依存性細胞介在性細胞傷害」、又は「ＡＤＣＣ」とは、抗体でコーティングされた標的細胞と、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ）、単球、マクロファージ、及び好中球などの溶解活性を有するエフェクター細胞との、エフェクター細胞上で発現するＦｃガンマ受容体（ＦｃγＲ）を介した相互作用に依存する細胞死を誘導する機序を指す。
【００５１】
「抗体依存性細胞食作用」又は「ＡＤＣＰ」とは、マクロファージ又は樹状細胞などの食細胞による取り込みによって抗体被覆標的細胞を排除する機構を指す。
【００５２】
「抗原」は、免疫応答を媒介することができる抗原結合ドメイン又はＴ細胞受容体によって結合され得る任意の分子（例えば、タンパク質、ペプチド、多糖、糖タンパク質、糖脂質、核酸、その一部、又はそれらの組み合わせ）を指す。例示的な免疫応答には、抗体産生、及びＴ細胞、Ｂ細胞又はＮＫ細胞などの免疫細胞の活性化が含まれる。抗原は、組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞、又は他の生物学的成分を有する流体、生物、タンパク質／抗原のサブユニット、死滅若しくは不活性化された全細胞又は溶解物などの生体サンプルからの遺伝子によって発現し得る、当該サンプルから合成され得る、又は当該サンプルから精製され得る。
【００５３】
「抗原結合断片」又は「抗原結合ドメイン」は、抗原に結合する単離されたタンパク質の一部を指す。抗原結合断片は、合成ポリペプチド、酵素的に入手可能なポリペプチド、又は遺伝的に操作されたポリペプチドであってよく、これには、抗原に結合する免疫グロブリンの一部、例えば、ＶＨ、ＶＬ、ＶＨ及びＶＬ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ及びＦｖ断片、１つのＶＨドメイン又は１つのＶＬドメインからなるドメイン抗体（ｄＡｂ）、サメ可変ＩｇＮＡＲドメイン、ラクダ化ＶＨドメイン、ＶＨＨドメイン、ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４部分などの抗体のＣＤＲを模倣するアミノ酸残基からなる最小認識ユニット、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及び／又はＨＣＤＲ３、並びにＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及び／又はＬＣＤＲ３、抗原に結合するオルタナティブスカフォールド、並びに抗原結合断片を含む多重特異性タンパク質が挙げられる。抗原結合断片（ＶＨ及びＶＬなど）は、合成リンカーを介して互いに連結して、ＶＨ及びＶＬドメインが別々の一本鎖により発現された場合にＶＨ／ＶＬドメインが分子内又は分子間で対合して一価の抗原結合ドメイン、例えば一本鎖Ｆｖ（single chain Fv、ｓｃＦｖ）又はダイアボディを形成することができる、様々な種類の一本鎖抗体設計を形成することができる。本明細書中で使用される場合、「抗原結合断片」又は「抗原結合ドメイン」は、Ｆｃ領域を有する全長抗体を示さない。
【００５４】
「抗体」は、広義の意味を有し、マウス、ヒト、ヒト化及びキメラモノクローナル抗体を含むモノクローナル抗体、抗原結合断片、二重特異性、三重特異性、四重特異性、二量体、四量体又は多量体抗体などの多重特異性抗体、一本鎖抗体、ドメイン抗体、及び必要な特異性の抗原結合部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された構成を含む免疫グロブリン分子を包含する。「完全長抗体」は、ジスルフィド結合により相互接続された、２本の重鎖（heavy chain、ＨＣ）及び２本の軽鎖（light chain、ＬＣ）、並びにこれらの多量体（例えばＩｇＭ）から構成される。各重鎖は、重鎖可変領域（ＶＨ）、及び重鎖定常領域（ドメインＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、及びＣＨ３からなる）から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ＶＬ）及び軽鎖定常領域（light chain constant region、ＣＬ）から構成される。ＶＨ領域及びＶＬ領域は、フレームワーク領域（frame

work region、ＦＲ）が散在しており相補性決定領域（complementarity determining region、ＣＤＲ）と呼称される超可変領域に更に分類され得る。各ＶＨ及びＶＬは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順序：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、及びＦＲ４で配置された、３つのＣＤＲ及び４つのＦＲセグメントで構成される。免疫グロブリンは、重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、５つの主要なクラス、すなわちＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭに割り当てられ得る。ＩｇＡ及びＩｇＧは、アイソタイプのＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３及びＩｇＧ４として更に細分類される。どのような脊椎動物種の抗体軽鎖も、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、２つの明確に異なるタイプ、すなわち、カッパ（κ）及びラムダ（λ）のうちの一方に割り当てることができる。

【００５５】

「癌」は、身体における異常細胞の制御されていない成長を特徴とする様々な疾患の広範な群を指す。制御されていない細胞分裂及び成長は、隣接組織を浸潤する悪性腫瘍の形成をもたらし、リンパ系又は血流を介して身体の遠位部分にも転移し得る。「癌」又は「癌組織」は、腫瘍を含み得る。

【００５６】

「相補性決定領域（ＣＤＲ）」とは、抗原に結合する抗体の領域である。ＶＨには３つのＣＤＲ（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３）が存在し、ＶＬには３つのＣＤＲ（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３）が存在する。ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ（Ｗｕ ｅｔ ａｌ．（１９７０）Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １３２：２１１－５０、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．，１９９１）、Ｃｈｏｔｈｉａ（Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ １９６：９０１－１７）、ＩＭＧＴ（Ｌｅｆｒａｎｃ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｄｅｖ Ｃｏｍｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２７：５５－７７）、及びＡｂＭ（Ｍａｒｔｉｎ ａｎｄ Ｔｈｏｒｎｔｏｎ Ｊ Ｂｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２６３：８００－１５，１９９６）などの様々な描写を用いて定義することができる。様々な描写と、可変領域の付番との対応が記載されている（例えば、Ｌｅｆｒａｎｃ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｄｅｖ Ｃｏｍｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２７：５５－７７、Ｈｏｎｅｇｇｅｒ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ（２００１）３０９：６５７－７０、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ、ＩＭＧＴ）データベース、ウェブリソース、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ＿ｉｍｇｔ＿ｏｒｇを参照されたい）。ＵＣＬ Ｂｕｓｉｎｅｓｓ ＰＬＣによるａｂＹｓｉｓなどの利用可能なプログラムを使用して、ＣＤＲを描写することができる。本明細書で使用される場合、「ＣＤＲ」、「ＨＣＤＲ１」、「ＨＣＤＲ２」、「ＨＣＤＲ３」、「ＬＣＤＲ１」、「ＬＣＤＲ２」、及び「ＬＣＤＲ３」という用語は、明細書で別途明示的に記載のない限り、上述したＫａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、ＩＭＧＴ、又はＡｂＭの方法のいずれかにより定義されるＣＤＲを含む。

【００５７】

「減少する」、「低下する」、「低くする」、「低減する」、又は「軽減する」は、一般に、対照又はビヒクルによって媒介される応答と比較した場合に、試験分子が低減された応答（すなわち、下流効果）を媒介する能力を指す。例示的な応答は、Ｔ細胞拡大、Ｔ細胞活性化、又はＴ細胞媒介性腫瘍細胞死滅、又はタンパク質のその抗原若しくは受容体への結合、増強されたＦｃγへの結合、又は増強されたＡＤＣＣ、ＣＤＣ及び／若しくはＡＤＣＰなどの増強されたＦｃエフェクター機能である。減少は、試験分子と対照（又はビヒクル）との間の測定された応答の統計的に有意な差、又は約１．１、１．２、１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、若しくは３０倍、若しくはそれ以上、例えば、５００、６００、７００、８００、９００、若しくは１０００倍、若しくはそれ以上（１を上回る全ての整数及びその間の小数点、例えば、１．５、１．６、１．

７．１．８などを含む）の増加などの、測定された応答の増加であってもよい。

【００５８】

「分化」は、細胞の能力若しくは増殖を減少させるか、又は細胞をより発達的に制限された状態に移動させる方法を指す。

【００５９】

「コードする」又は「コードすること」は、定義されたヌクレオチドの配列（例えば、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、及びｍＲＮＡ）か、又は定義されたアミノ酸の配列のいずれかを有する、生物学的プロセスにおける他のポリマー及び巨大分子の合成のためのテンプレートとして機能する、遺伝子、ｃＤＮＡ、又はｍＲＮＡなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特異性配列の固有の特性、並びにそれから生じる生物学的特性を指す。したがって、細胞又は他の生物系において、遺伝子に対応するｍＲＮＡの転写及び翻訳がタンパク質を産生する場合、その遺伝子、ｃＤＮＡ、又はＲＮＡは、タンパク質をコードする。ヌクレオチド配列がｍＲＮＡ配列と同一であるコード鎖と、遺伝子又はｃＤＮＡの転写のテンプレートとして使用される非コード鎖とはいずれも、その遺伝子又はｃＤＮＡのタンパク質又は他の産物をコードするとして言及され得る。

【００６０】

「増強する（enhance）」、「促進する（promote）」、「増加させる（increase）」、「拡大する（expand）」、又は「改善する（improve）」という用語は、一般に、対照又はビヒクルによって媒介される応答と比較した場合、試験分子がより大きな応答（すなわち下流効果）を媒介する能力をいう。例示的な応答は、Ｔ細胞拡大、Ｔ細胞活性化、又はＴ細胞媒介性腫瘍細胞死滅、又はタンパク質のその抗原若しくは受容体への結合、増強されたＦｃγへの結合、又は増強されたＡＤＣＣ、ＣＤＣ及び／若しくはＡＤＣＰなどの増強されたＦｃエフェクター機能である。増強は、試験分子と対照（又はビヒクル）との間の測定された応答の統計的に有意な差、又は約１．１、１．２、１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、若しくは３０倍、若しくはそれ以上、例えば、５００、６００、７００、８００、９００、若しくは１０００倍、若しくはそれ以上（１を上回る全ての整数及びその間の小数点、例えば、１．５、１．６、１．７．１．８などを含む）の増加などの、測定された応答の増加であってもよい。

【００６１】

「エピトープ」とは、抗体が特異的に結合する抗原の一部分を指す。エピトープは、典型的には、化学的に活性な（極性、非極性又は疎水性など）部分の表面集団、例えばアミノ酸又は多糖側鎖からなり、特定の三次元構造特性並びに特定の電荷特性を有し得る。エピトープは、高次構造的空間単位を形成する連続的な及び／又は不連続なアミノ酸で構成され得る。不連続なエピトープでは、抗原の直鎖配列の異なる部分からのアミノ酸が、タンパク質分子の折り畳みにより三次元空間でごく近接するようになる。抗体「エピトープ」は、エピトープを識別するために使用する方法論によって異なる。

【００６２】

「拡大」は、細胞分裂及び細胞死の結果を指す。

【００６３】

「発現する」及び「発現」は、細胞内又はインビトロで起こる周知の転写及び翻訳を指す。したがって、発現産物、例えば、タンパク質は、細胞によって又はインビトロで発現し、細胞内、細胞外、又は膜貫通タンパク質であってもよい。

【００６４】

「発現ベクター」とは、発現ベクター中に存在するポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの翻訳を指示するために、生物系又は再構成された生物系において利用することができるベクターを指す。

【００６５】

「ｄＡｂ」又は「ｄＡｂ断片」は、ＶＨドメインで構成される抗体断片を指す（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４ ５４６（１９８９））。

【００６６】

「Ｆａｂ」又は「Ｆａｂ断片」又は「Ｆａｂ領域」は、抗原に結合する抗体領域を指す。従来のＩｇＧは通常、２つのＦａｂ領域を含み、各々がＹ字型ＩｇＧ構造の２つのアームのうちの１つに存在する。各Ｆａｂ領域は、典型的には、重鎖及び軽鎖の各々の１つの可変領域及び１つの定常領域で構成されている。より具体的には、Ｆａｂ領域における重鎖の可変領域及び定常領域は、ＶＨ及びＣＨ１領域であり、Ｆａｂ領域における軽鎖の可変領域及び定常領域は、ＶＬ及びＣＬ領域である。Ｆａｂ領域におけるＶＨ、ＣＨ１、ＶＬ、及びＣＬは、本開示に従って抗原結合能力を付与するために様々な方式で配置することができる。例えば、ＶＨ領域及びＣＨ１領域は、１つのポリペプチド上にあり、ＶＬ領域及びＣＬ領域は、従来のＩｇＧのＦａｂ領域と同様に、別個のポリペプチド上にあり得る。あるいは、ＶＨ、ＣＨ１、ＶＬ及びＣＬ領域は全て同じポリペプチド上にあり、種々の順序で配向することができる。

【００６７】

「Ｆ（ａｂ’）$_2$」又は「Ｆ（ａｂ’）$_2$断片」は、ヒンジ領域内のジスルフィド架橋によって接続された２つのＦａｂ断片を含む抗体断片を指す。

【００６８】

「Ｆｄ」又は「Ｆｄ断片」は、ＶＨ及びＣＨ１ドメインで構成される抗体断片を指す。

【００６９】

「Ｆｖ」又は「Ｆｖ断片」は、抗体の単一のアーム由来のＶＨドメイン及びＶＬドメインで構成される抗体断片を指す。Ｆｖ断片は、Ｆａｂ（ＣＨ１及びＣＬ）領域の定常領域を欠いている。Ｆｖ断片におけるＶＨ及びＶＬは、非共有結合性相互作用によって一緒に保持される。

【００７０】

二量体Ｆｃの「Ｆｃ」ポリペプチドは、二量体Ｆｃドメインを形成する２つのポリペプチドのうちの１つを指す。例えば、二量体ＩｇＧ　ＦＣのＦＣポリペプチドは、ＩｇＧ　ＣＨ２及びＩｇＧ　ＣＨ３定常ドメイン配列を含む）。

【００７１】

「完全長抗体」は、ジスルフィド結合によって相互に接続された、２本の重鎖（ＨＣ）及び２本の軽鎖（ＬＣ）、並びにこれらの多量体（例えば、ＩｇＭ）で構成される。各重鎖は、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び重鎖定常ドメインで構成され、重鎖定常ドメインは、サブドメインＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ３で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）及び軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）で構成される。ＶＨ及びＶＬは、フレームワーク領域（ＦＲ）が散在している、相補性決定領域（ＣＤＲ）と称される超可変性の領域に更に細分化され得る。各ＶＨ及びＶＬは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順序：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、及びＦＲ４で配置された、３つのＣＤＲ及び４つのＦＲセグメントで構成される。

【００７２】

「宿主細胞」は、異種核酸を含有する任意の細胞を指す。例示的な異種核酸は、ベクター（例えば、発現ベクター）である。

【００７３】

「ヒト抗体」は、ヒト対象に投与されるときに、最小の免疫応答を有するように最適化された抗体を意味する。ヒト抗体の可変領域は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する。ヒト抗体が定常領域又は定常領域の一部を含む場合、その定常領域もヒト免疫グロブリン配列に由来する。ヒト抗体は、ヒト抗体の可変領域がヒト生殖系列免疫グロブリン又は再編成された免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られた場合、ヒト起源の配列に「由来する」重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。このような例示的な系は、ファージにディスプレイされたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリ、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座を保有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばマウス又はラットである。「ヒト抗体」は、典型的には、ヒト抗体及びヒト免疫グロブリン遺伝子座を得るために使用した系の違い、フレームワーク若しくはＣＤＲへの体細胞変異の導入若しくは置換の意図的な導入、又はこれらの両方により、ヒトで発現した免疫グロブリンと比較したときにアミノ酸の

違いを含有する。典型的には、「ヒト抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン又は再編成された免疫グロブリン遺伝子によってコードされているアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列が少なくとも約８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％同一である。場合によっては、「ヒト抗体」は、例えばＫｎａｐｐｉｋ ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２９６：５７－８６に記載されるヒトフレームワーク配列分析に由来するコンセンサスフレームワーク配列、又は例えばＳｈｉ ｅｔ ａｌ．，（２０１０）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ３９７：３８５－９６及び国際公開第２００９／０８５４６２号に記載される、ファージ上に提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリに組み込まれた合成ＨＣＤＲ３を含有し得る。少なくとも１つのＣＤＲが非ヒト種に由来する抗体は、「ヒト抗体」の定義には含まれない。

【００７４】

「ヒト化抗体」は、少なくとも１つのＣＤＲが非ヒト種に由来し、少なくとも１つのフレームワークがヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体を意味する。ヒト化抗体は、フレームワークに置換を含むことができるため、フレームワークは、発現したヒト免疫グロブリン又はヒト免疫グロブリン生殖細胞系列遺伝子配列の厳密なコピーではない場合がある。

【００７５】

「～と組み合わせて」は、２つ又は３つ以上の治療剤を、混合物の状態で一緒に、単剤として同時に、又は単剤として任意の順序で順次、対象に投与することを意味する。

【００７６】

「単離／単離された」とは、組換え細胞などにおける分子が産生される系の他の成分から離して実質的に分離及び／又は精製された分子の均質な集団（例えば、合成ポリヌクレオチド又はポリペプチド）、並びに少なくとも１つの精製又は単離工程に供されたタンパク質を指す。「単離／単離された」とは、他の細胞材料及び／又は化学物質を実質的に含まない分子を指し、より高い純度、例えば８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の純度まで単離された分子を包含する。

【００７７】

「カリクレイン関連ペプチダーゼ２」、又は、「ｈＫ２」、（本明細書ではＫＬＫ２とも呼ばれる）、は、カリクレイン－２、顆粒状カリクレイン２、又はＨＫ２とも呼ばれる既知のタンパク質を指す。ｈＫ２は、プレプロタンパク質として産生され、タンパク質分解中に切断されて活性プロテアーゼを生成する。全てのｈＫ２アイソフォーム及びバリアントが、「ｈＫ２」に包含される。様々なアイソフォームのアミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＰ＿００５５４２．１、ＮＰ＿００１００２２３１．１、及びＮＰ＿００１２４３００９から検索可能である。完全長ｈＫ２のアミノ酸配列を配列番号６２に示す。配列は、シグナルペプチド（残基１～１８）及びプロペプチド領域（残基１９～２４）を含む。

【００７８】

配列番号６２

ＭＷＤＬＶＬＳＩＡＬＳＶＧＣＴＧＡＶＰＬＩＱＳＲＩＶＧＧＷＥＣＥＫＨＳＱＰＷＱＶＡＶＹＳＨＧＷＡＨＣＧＧＶＬＶＨＰＱＷＶ

ＬＴＡＡＨＣＬＫＫＮＳＱＶＷＬＧＲＨＮＬＦＥＰＥＤＴＧＱＲＶＰＶＳＨＳＦＰＨＰＬＹＮＭＳＬＬＫＨＱＳＬＲＰＤＥＤＳＳＨＤ

ＬＭＬＬＲＬＳＥＰＡＫＩＴＤＶＶＫＶＬＧＬＰＴＱＥＰＡＬＧＴＴＣＹＡＳＧＷＧＳＩＥＰＥＥＦＬＲＰＲＳＬＱＣＶＳＬＨＬＬＳ

ＮＤＭＣＡＲＡＹＳＥＫＶＴＥＦＭＬＣＡＧＬＷＴＧＧＫＤＴＣＧＧＤＳＧＧＰＬＶＣＮＧＶＬＱＧＩＴＳＷＧＰＥＰＣＡＬＰＥＫＰ

ＡＶＹＴＫＶＶＨＹＲＫＷＩＫＤＴＩＡＡＮＰ

【００７９】
「調節する」は、対照又はビヒクルによって媒介される応答と比較したときに、より多い又はより少ない応答を媒介する（すなわち、下流効果）試験分子の増強された又は低減された能力のいずれかを指す。
【００８０】
「モノクローナル抗体」とは、抗体分子の実質的に均質な母集団（すなわち、母集団を含む個別の抗体が、抗体重鎖からＣ末端リジンを除去する、又は、アミノ酸異性化若しくはアミド分解、メチオニン酸化若しくはアスパラギン若しくはグルタミンアミド分解などの翻訳後修飾といった、可能な周知の変更を除いて同一である）から入手される抗体を意味する。モノクローナル抗体は、典型的には、１つの抗原性エピトープに結合する。二重特異性モノクローナル抗体は、２つの異なる抗原性エピトープに結合する。モノクローナル抗体は、抗体集団内で不均一なグリコシル化を有し得る。モノクローナル抗体は、単一特異性であってよく、又は、二重特異性などの多重特異性であってよく、一価、二価、又は多価であってもよい。
【００８１】
「動作可能に連結された」及び類似の語句は、核酸又はアミノ酸に関して使用される場合、それぞれ、互いに機能的な関係で配置された核酸配列又はアミノ酸配列の動作上の連結を指す。例えば、動作可能に連結されたプロモータ、エンハンサエレメント、オープンリーディングフレーム、５’及び３’ＵＴＲ、並びにターミネータ配列は、核酸分子（例えば、ＲＮＡ）の正確な産生をもたらし、場合によっては、ポリペプチドの産生（すなわち、オープンリーディングフレームの発現）をもたらす。動作可能に連結されたペプチドは、ペプチドの機能ドメインが互いに適切な距離で配置されて、各ドメインの意図された機能を付与するペプチドを指す。
【００８２】
「パラトープ」という用語は、抗原の結合に関与し、抗原と相互作用する残基を含む抗体分子の区域又は領域を指す。パラトープは、高次構造的空間単位を形成する連続的及び／又は不連続なアミノ酸で構成され得る。所与の抗体のパラトープは、様々な実験及び計算方法を使用して、様々なレベルで詳細に定義及び特性評価することができる。実験方法は、水素／重水素交換質量分析（hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry、ＨＸ－ＭＳ）を含む。パラトープは、用いられるマッピング方法に応じて異なって定義される。
【００８３】
「医薬的組み合わせ」は、一緒に又は別々に投与される２つ又は３つ以上の活性成分の組み合わせを指す。
【００８４】
「医薬組成物」は、活性成分と医薬的に許容される担体とを組み合わせて得られる組成物を指す。
【００８５】
「医薬的に許容される担体」又は「賦形剤」は、対象に対して毒性のない、活性成分以外の医薬組成物中の成分を指す。例示的な医薬的に許容される担体は、バッファ、安定剤、又は防腐剤である。
【００８６】
「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、糖－リン酸骨格又は他の同等の共有結合化学によって共有結合されたヌクレオチド鎖を含む、合成分子を指す。ｃＤＮＡは、ポリヌクレオチドの典型例である。ポリヌクレオチドは、ＤＮＡ又はＲＮＡ分子であり得る。
【００８７】
疾患又は障害を「予防する」、「予防すること」、「予防」、又は「予防法」は、対象において障害が発生するのを防ぐことを意味する。
【００８８】
「増殖」は、細胞の対称的又は非対称的な分裂のいずれかである細胞分裂の増加を指す

。
【００８９】
「プロモータ」は、転写を開始させるために必要な最小配列を指す。プロモータはまた、それぞれ転写を増強又は抑制するエンハンサ又はリプレッサエレメントを含み得る。
【００９０】
本明細書では互換的に使用される「タンパク質」又は「ポリペプチド」は、各々がペプチド結合によって連結された少なくとも２つのアミノ酸残基で構成されている１つ又は２つ以上のポリペプチドを含む分子を指す。タンパク質は、モノマーであってもよく、又は同一若しくは異なる２つ若しくは３つ以上のサブユニットのタンパク質複合体であってもよい。５０個未満のアミノ酸からなる小分子ポリペプチドは、「ペプチド」と称され得る。タンパク質は、異種融合タンパク質、糖タンパク質、又はリン酸化、アセチル化、ミリストイル化、パルミトイル化、グリコシル化、酸化、ホルミル化、アミド化、シトルリン化、ポリグルタミル化、ＡＤＰ－リボシル化、ペグ化又はビオチン化などの翻訳後改変によって修飾されたタンパク質であり得る。タンパク質は、組換え発現し得る。
【００９１】
「組換え体」とは、組換え手段によって調製、発現、作製、又は単離されたポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、ウイルス、及び他の巨大分子を指す。
【００９２】
「調節エレメント」は、核酸配列の発現のある側面を制御する任意のシス又はトランス作用性遺伝要素を指す。
【００９３】
「再発性」とは、治療薬による前治療後の改善期間後に疾患又は疾患の徴候及び症状が再開することを指す。
【００９４】
「難治性」とは、治療に応答しない疾患を指す。難治性疾患は、治療前若しくは治療開始時に治療に抵抗性であり得るか、又は難治性疾患は、治療中に抵抗性疾患となり得る。
【００９５】
「一本鎖Ｆｖ」又は「ｓｃＦｖ」は、軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む少なくとも１つの抗体断片と、重鎖可変領域（ＶＨ）を含む少なくとも１つの抗体断片と、を含む融合タンパク質を指し、ＶＬ及びＶＨは、ポリペプチドリンカーを介して連続的に連結され、一本鎖ポリペプチドとして発現することができる。特に指定されない限り、本明細書で使用される場合、ｓｃＦｖは、ＶＬ及びＶＨ可変領域をいずれの順序で有していてもよく、例えば、ポリペプチドのＮ末端及びＣ末端に関して、ｓｃＦｖは、ＶＬ－リンカー－ＶＨを含んでいてもよく、又はＶＨ－リンカー－ＶＬを含んでいてもよい。
【００９６】
「$(scFv)_2$」又は「タンデムｓｃＦｖ」又は「ビスｓｃＦｖ」断片は、２つの軽鎖可変領域（ＶＬ）及び２つの重鎖可変領域（ＶＨ）を含む融合タンパク質を指し、２つのＶＬ領域及び２つのＶＨ領域は、ポリペプチドリンカーを介して連続的に連結されており、一本鎖ポリペプチドとして発現することができる。２つのＶＬ及び２つのＶＨは、ペプチドリンカーによって融合されて、二価分子VL_A－リンカー－VH_A－リンカー－VL_B－リンカー－VH_Bを形成して、２つの異なる抗原又はエピトープに同時に結合することができる２つの結合部位を形成する。
【００９７】
「特異的に結合する」、「特異的結合」、「特異的に結合している」、又は「結合する」とは、タンパク質性分子が、抗原又は当該抗原内のエピトープに、他の抗原に対する親和性よりも高い親和性で結合することを指す。典型的には、タンパク質性分子は、約1×10^{-7}Ｍ以下、例えば約5×10^{-8}Ｍ以下、約1×10^{-8}Ｍ以下、約1×10^{-9}Ｍ以下、約1×10^{-10}Ｍ以下、約1×10^{-11}Ｍ以下、又は約1×10^{-12}Ｍ以下の平衡解離定数（K_D）で抗原又は抗原内のエピトープに結合し、典型的には、K_Dは、非特異的抗原（例えば、ＢＳＡ、カゼイン）への結合についてのK_Dよりも少なくとも１０

０倍小さい。本明細書に記載の前立腺ネオ抗原の文脈において、「特異的結合」は、タンパク質性分子が、前立腺ネオ抗原がそのバリアントである野生型タンパク質に検出可能には結合することなく、前立腺ネオ抗原に結合することを指す。本明細書で使用される場合、「ｈＫ２に対する結合特異性を有する」抗体又は抗原結合ドメインは、それぞれｈＫ２に特異的に結合する抗体又は抗原結合ドメインを指す。

【００９８】

「対象」は、任意のヒト又は非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」としては、あらゆる脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの哺乳類及び非哺乳類が挙げられる。「対象」及び「患者」という用語は、本明細書において互換的に使用され得る。

【００９９】

「Ｔ細胞」及び「Ｔリンパ球」は互換的であり、本明細書において同義的に使用される。Ｔ細胞には、胸腺細胞、ナイーブＴリンパ球、メモリＴ細胞、未成熟Ｔリンパ球、成熟Ｔリンパ球、静止Ｔリンパ球、又は活性化Ｔリンパ球が含まれる。Ｔ細胞は、Ｔヘルパー（Ｔ helper、Ｔｈ）細胞、例えば、Ｔヘルパー１（Ｔｈ１）又はＴヘルパー２（Ｔｈ２）細胞であり得る。Ｔ細胞は、ヘルパーＴ細胞（ＨＴＬ、ＣＤ４$^+$Ｔ細胞）、ＣＤ４$^+$Ｔ細胞、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞）、腫瘍浸潤細胞傷害性Ｔ細胞（ＴＩＬ、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞）、ＣＤ４$^+$ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、又はＴ細胞の任意の他のサブセットであり得る。また、「ＮＫＴ細胞」も含まれ、これは、半不変αβＴ細胞受容体を発現するだけでなく、ＮＫ１．１などの典型的にはＮＫ細胞に関連する様々な分子マーカーも発現する、Ｔ細胞の特殊な集団を指す。ＮＫＴ細胞には、ＮＫ１．１$^+$及びＮＫ１．１$^-$、並びにＣＤ４$^+$、ＣＤ４$^-$、ＣＤ８$^+$、及びＣＤ８$^-$細胞が含まれる。ＮＫＴ細胞のＴＣＲは、ＭＨＣ　Ｉ様分子ＣＤ　Ｉｄによって提示される糖脂質抗原を認識するという点で独特である。ＮＫＴ細胞は、炎症又は免疫寛容のいずれかを促進するサイトカインを産生する能力により、保護効果又は有害効果のいずれかを有し得る。また、「ガンマデルタＴ細胞（γδＴ細胞）」も含まれ、これは、それらの表面に異なるＴＣＲを有するＴ細胞の小さなサブセットの特殊な集団を指し、ＴＣＲがα及びβ－ＴＣＲ鎖と表記される２つの糖タンパク質鎖から構成されるＴ細胞の大部分とは異なり、γδＴ細胞におけるＴＣＲは、γ鎖及びδ鎖から構成される。γδＴ細胞は、免疫監視及び免疫調節において役割を果たすことができ、ＩＬ－１７の重要な供給源であること、及び強固なＣＤ８$^+$細胞傷害性Ｔ細胞応答を誘導することが見出された。また、「調節性Ｔ細胞」又は「Ｔｒｅｇ」も含まれ、これは、異常又は過剰な免疫応答を抑制し、免疫寛容における役割を果たす、Ｔ細胞を指す。Ｔｒｅｇは、典型的には、転写因子Ｆｏｘｐ３陽性ＣＤ４$^+$Ｔ細胞であり、かつ、ＩＬ－１０産生ＣＤ４$^+$Ｔ細胞である転写因子Ｆｏｘｐ３陰性調節性Ｔ細胞も含み得る。

【０１００】

本明細書において互換的に使用される「治療有効量」又は「有効量」は、必要な投薬量及び期間で、所望される治療結果を得るのに有効な量を指す。治療有効量は、個体の病態、年齢、性別、及び体重などの要因、並びに個体において所望の応答を引き出す治療薬又は治療薬の組み合わせの能力によって様々であってよい。有効な治療薬又は治療薬の組み合わせの例示的な指標としては、例えば、患者の健康状態の改善、腫瘍量の低減、腫瘍の成長の停止若しくは減速、及び／又は体内の他の箇所への癌細胞の転移の不在が含まれる。

【０１０１】

「形質導入」は、ウイルスベクターを使用する、外来核酸の細胞への導入を指す。

【０１０２】

癌などの疾患若しくは障害を「治療する」、「治療すること」、又は「治療」とは、以下、障害の重篤度及び／若しくは期間を低減する、治療される障害に特徴的な症状の悪化を抑制する、以前に障害を有していた対象における障害の再発を制限若しくは予防する、又は障害について以前に症候性であった対象における症状の再発を制限若しくは予防する

、のうちの１つ又は２つ以上を達成することを指す。
【０１０３】
「腫瘍細胞」又は「癌細胞」とは、インビボ、エクスビボ、又は組織培養のいずれかにおいて、自然発生的な又は誘発された表現型の変化を有する癌性、前癌性、又は形質転換細胞を指す。これらの変化は、必ずしも新たな遺伝物質の取り込みを伴うものではない。形質転換は、形質転換ウイルスの感染及び新たなゲノム核酸の組み込み、外因性核酸の取り込みにより発生させることもでき、自然発生的に又は発癌物質に曝露した後に発生し、それによって内因性の遺伝子が変異する場合もある。形質転換／癌は、インビトロ、インビボ、及びエクスビボにおける、形態学的変化、細胞の不死化、異常な増殖制御、病巣の形成、増殖、悪性病変、腫瘍特異的マーカーレベルの調節、浸潤性、ヌードマウスなどの好適な動物宿主における腫瘍の増殖などによって例示される。
【０１０４】
「バリアント」、「変異体」又は「変化した」とは、１つ又は２つ以上の改変、例えば、１つ又は２つ以上の置換、挿入、又は欠失によって参照ポリペプチド又は参照ポリヌクレオチドとは異なる、ポリペプチド又はポリヌクレオチドを指す。
【０１０５】
本明細書全体を通して、抗体定常領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、本明細書に別途明示的に記載のない限り、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１）に記載のＥＵインデックスに従う。
【０１０６】
Ｉｇ定常領域の変異は、以下のように称される。Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖは、１つの免疫グロブリン定常領域におけるＬ３５１Ｙ、Ｆ４０５Ａ及びＹ４０７Ｖ変異を指す。Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ／Ｔ３９４Ｗは、１つの多量体タンパク質中に存在する、第１のＩｇ定常領域におけるＬ３５１Ｙ、Ｆ４０５Ａ、及びＹ４０７Ｖ変異並びに第２のＩｇ定常領域におけるＴ３９４Ｗ変異を指す。
【０１０７】
「ＶＨＨ」は、重鎖の抗原結合ドメインで排他的に構成される単一ドメイン抗体又はナノボディを指す。ＶＨＨ単一ドメイン抗体は、従来のＦａｂ領域の軽鎖及び重鎖のＣＨ１ドメインを欠いている。
【０１０８】
化学命名法
一般に、水素又はＨなどのある特定の元素への言及は、その元素の全ての同位体を含むことを意味する。例えば、Ｒ基が水素又はＨを含むように定義される場合、重水素及びトリチウムも含む。したがって、トリチウム、C^{14}、P^{32}及びS^{35}などの放射性同位体を含む化合物は、本技術の範囲内である。そのような標識を本技術の化合物に挿入するための手順は、本明細書の開示に基づいて、当業者には容易に明らかになるであろう。
【０１０９】
用語「置換された」は、全ての通常の原子価が維持され、置換が安定した化合物をもたらすという条件で、少なくとも１つの水素原子が非水素基で置換されていることを意味する。特定の基が「置換される」場合、その基は置換基の列挙から独立して選択される、１個又は２個以上の置換基、好ましくは１～５個の置換基、より好ましくは１～３個の置換基、最も好ましくは１～２個の置換基を有することができる。例えば、「置換された」は、その中に含有される水素原子への１つ又は２つ以上の結合が非水素又は非炭素原子への結合によって置き換えられる、以下に定義されるような有機基（例えば、アルキル基）を指す。置換された基はまた、炭素又は水素原子への１つ又は２つ以上の結合が、二重結合又は三重結合を含む１つ又は２つ以上の結合でヘテロ原子に置き換えられる基も含む。したがって、別途指定されない限り、置換された基は、１つ又は２つ以上の置換基で置換さ

れる。いくつかの実施形態では、置換された基は、１、２、３、４、５、又は６個の置換基で置換されている。置換基の例としては、ハロゲン（すなわち、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、及びＩ）；ヒドロキシル；アルコキシ、アルケノキシ、アリールオキシ、アラルキルオキシ、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルオキシ、及びヘテロシクリルアルコキシ基；カルボニル（オキソ）；カルボキシラート；エステル；ウレタン；オキシム；ヒドロキシルアミン；アルコキシアミン；アラルコキシアミン；チオール；スルフィド；スルホキシド；スルホン；スルホニル；ペンタフルオロスルファニル（すなわち、ＳＦ）、スルホンアミド；アミン；Ｎ－オキシド；ヒドラジン；ヒドラジド；ヒドラゾン；アジド；アミド；尿素；アミジン；グアニジン；エナミン；イミド；イソシアネート；イソチオシアネート；シアネート；チオシアネート；イミン；ニトロ基；ニトリル（すなわち、ＣＮ）などなどが挙げられる。用語「独立して」は、置換基に関して使用されるとき、２つ以上のそのような置換基が可能である場合、そのような置換基は互いに同じ又は異なる得ることを意味する。

【０１１０】

置換されたシクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル、及びヘテロアリール基などの置換された環基は、水素原子への結合が炭素原子への結合で置き換えられている環及び環系も含む。したがって、置換されたシクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル、及びヘテロアリール基はまた、以下に定義されるような置換された又は非置換のアルキル、アルケニル、及びアルキニル基で置換され得る。

【０１１１】

本明細書で使用される場合、C_1～C_{11}、C_1～C_8、又はC_1～C_6などのＣｍ～Ｃｎは、基の前に使用される場合、ｍ～ｎ個の炭素原子を含有する基を指す。

【０１１２】

アルキル基としては、１～１２個の炭素原子、典型的には、１～１０個の炭素原子、又はいくつかの実施形態では、１～８個、１～６個、若しくは１～４個の炭素原子を有する直鎖及び分枝アルキル基が挙げられる。直鎖アルキル基の例としては、メチル、エチル、ｎ－プロピル、ｎ－ブチル、ｎ－ペンチル、ｎ－ヘキシル、ｎ－ヘプチル、及びｎ－オクチル基などの基が挙げられる。分枝アルキル基の例としては、イソプロピル、イソ－ブチル、ｓｅｃ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、ネオペンチル、イソペンチル、及び２，２－ジメチルプロピル基が挙げられるが、これらに限定されない。アルキル基は、置換又は非置換であり得る。代表的な置換アルキル基は、上記に列挙された置換基などの置換基で１回又は２回以上置換されていてもよく、ハロアルキル（例えば、トリフルオロメチル）、ヒドロキシアルキル、チオアルキル、アミノアルキル、アルキルアミノアルキル、ジアルキルアミノアルキル、アルコキシアルキル、カルボキシアルキルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１３】

シクロアルキル基は、環中に３～１２個の炭素原子、又はいくつかの実施形態では、３～１０個、３～８個、若しくは３～４個、５個、若しくは６個の炭素原子を有する単環式、二環式、又は三環式アルキル基を含む。例示的な単環式シクロアルキル基としては、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、シクロヘプチル、及びシクロオクチル基が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、シクロアルキル基は、３～８の環員を有するが、他の実施形態では、環炭素原子の数は、３～５個、３～６個、又は３～７個の範囲である。二環式及び三環式環系は、架橋シクロアルキル基及び縮合環の両方を含み、例えば、ビシクロ［２．１．１］ヘキサン、アダマンチル、デカリニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。シクロアルキル基は、置換又は非置換であり得る。置換されたシクロアルキル基は、上記で定義されたように、非水素基及び非炭素基で１回又は２回以上置換され得る。しかしながら、置換されたシクロアルキル基はまた、上記で定義された直鎖又は分枝鎖アルキル基で置換される環も含む。代表的な置換されたシクロアルキル基は、一置換されるか、又は限定されないが、２，２－、２，３－、２，４－２，５－、又は２，６－二置換シクロヘキシル基など、２回以上

置換され得、これらは、上記に列挙された置換基などの置換基で置換され得る。

【０１１４】

シクロアルキルアルキル基は、アルキル基の水素又は炭素結合が、上で定義したシクロアルキル基への結合で置き換えられている、上で定義したアルキル基である。いくつかの実施形態では、シクロアルキルアルキル基は、４～１６個の炭素原子、４～１２個の炭素原子、典型的には４～１０個の炭素原子を有する。シクロアルキルアルキル基は、置換又は非置換であり得る。置換シクロアルキルアルキル基は、基のアルキル部分、シクロアルキル部分、又はアルキル部分とシクロアルキル部分の両方で置換されていてもよい。代表的な置換シクロアルキルアルキル基は、一置換であるか、又は２か所以上置換されてもよく、例えば、上記に列挙された置換基での一置換、二置換、又は三置換であり得るが、これらに限定されない。

【０１１５】

アルケニル基は、少なくとも１つの二重結合が２つの炭素原子の間に存在することを除いて、上で定義された直鎖及び分枝鎖アルキル基を含む。アルケニル基は、２～１２個の炭素原子、典型的には、２～１０個の炭素原子、又はいくつかの実施形態では、２～８個、２～６個、若しくは２～４個の炭素原子を有する。いくつかの実施形態では、アルケニルは、１つの炭素－炭素二重結合、又は２、３、４個若しくはそれ以上の炭素－炭素二重結合などの複数の炭素－炭素二重結合を有することができる。アルケニル基の例としては、メテニル、エテニル、プロペニル、ブテニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。アルケニル基は置換又は非置換であってもよい。代表的な置換アルケニル基は、一置換であるか、又は２か所以上置換されてもよく、例えば、上記に列挙された置換基での一置換、二置換、又は三置換であり得るが、これらに限定されない。

【０１１６】

シクロアルケニル基は、少なくとも１つの二重結合が２つの炭素原子の間にある、上で定義されたシクロアルキル基を含む。シクロアルケニル基は、環中に３～１２個、より好ましくは３～８個の炭素原子を有し、かつ、２個の炭素原子間に少なくとも１つの二重結合を含む、単環式又は多環式アルキル基であり得る。シクロアルケニル基は、置換又は非置換であり得る。いくつかの実施形態では、シクロアルケニル基は、１つ、２つ、若しくは３つの二重結合、又は２つ、３つ、４つ、若しくはそれ以上の炭素－炭素二重結合などの複数の炭素－炭素二重結合を有していてもよいが、芳香族化合物は含まない。シクロアルケニル基は、３～１４個の炭素原子、又はいくつかの実施形態では、５～１４個の炭素原子、５～１０個の炭素原子、又は更には５個、６個、７個、若しくは８個の炭素原子を有する。シクロアルケニル基の例としては、シクロヘキセニル、シクロペンテニル、シクロヘキサジエニル、シクロブタジエニル、及びシクロペンタジエニルが挙げられる。

【０１１７】

シクロアルケニルアルキル基は、アルキル基の水素又は炭素結合が、上で定義したシクロアルケニル基への結合で置き換えられている、上で定義したアルキル基である。シクロアルケニルアルキル基は、置換又は非置換であり得る。置換シクロアルケニルアルキル基は、基のアルキル部分、シクロアルケニル部分、又はアルキル部分とシクロアルケニル部分の両方で置換されていてもよい。代表的な置換シクロアルケニルアルキル基は、上記に列挙された置換基などの置換基で１回又は２回以上置換され得る。

【０１１８】

アルキニル基は、少なくとも１つの三重結合が２つの炭素原子の間に存在することを除いて、上で定義された直鎖及び分枝鎖アルキル基を含む。アルキニル基は、２～１２個の炭素原子、典型的には、２～１０個の炭素原子、又はいくつかの実施形態では、２～８個、２～６個、若しくは２～４個の炭素原子を有する。いくつかの実施形態では、アルキニル基は、１つ、２つ、又は３つの炭素－炭素三重結合を有する。例としては、特に、－Ｃ＝ＣＨ、－Ｃ＝ＣＣＨ$_3$、－ＣＨ$_2$Ｃ＝ＣＣＨ$_3$、－Ｃ＝ＣＣＨ$_2$ＣＨ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$）$_2$が挙げられるが、これらに限定されない。アルキニル基は、置換又は非置換であり得る。末端アルキンは、三重結合炭素原子に結合した少なくとも１個の水素原子を有する。代表

的な置換アルキニル基は、一置換であるか、又は２か所以上置換されてもよく、例えば、上記に列挙された置換基での一置換、二置換、又は三置換であり得るが、これらに限定されない。「環状アルキン」又は「シクロアルキニル」は、２個の炭素原子間に少なくとも１つの三重結合を含むシクロアルキル環である。環状アルキン又はシクロアルキニル基の例としては、シクロオクチン、ビシクロノニン（ＢＣＮ）、二フッ素化シクロオクチン（ＤＩＦＯ）、ジベンゾシクロオクチン（ＤＩＢＯ）、ケト－ＤＩＢＯ、ビアリールアザシクロオクチノン（ＢＡＲＡＣ）、ジベンゾアザシクロオクチン（ＤＩＢＡＣ）、ジメトキシアザシクロオクチン（ＤＩＭＡＣ）、ジフルオロベンゾシクロオクチン（ＤＩＦＢＯ）、モノベンゾシクロオクチン（ＭＯＢＯ）及びテトラメトキシＤＩＢＯ（ＴＭＤＩＢＯ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１９】

アリール基は、ヘテロ原子を含有しない環状芳香族炭化水素である。本明細書におけるアリール基には、単環式、二環式、及び三環式環系が含まれる。したがって、アリール基には、フェニル、アズレニル、ヘプタレニル、ビフェニル、フルオレニル、フェナントレニル、アントラセニル、インデニル、インダニル、ペンタレニル、及びナフチル基が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アリール基は、６～１４個の炭素を含有し、他の場合では、基の環部分に６～１２個、又は更には６～１０個の炭素原子を含有する。いくつかの実施形態では、アリール基はフェニル又はナフチルである。アリール基は、置換又は非置換であり得る。「アリール基」という語句は、縮合芳香族－脂肪族環系（例えば、インダニル、テトラヒドロナフチルなど）などの縮合環を含有する基を含む。代表的な置換アリール基は、一置換であるか、又は２回以上置換され得る。例えば、一置換アリール基としては、限定されないが、２－、３－、４－、５－、若しくは６置換フェニル又はナフチル基が挙げられ、これらは、上記に列挙された置換基などの置換基で置換され得る。アリール部分は周知であり、例えば、Ｌｅｗｉｓ，Ｒ．Ｊ．，ｅｄ．，Ｈａｗｌｅｙ’ｓ Ｃｏｎｄｅｎｓｅｄ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ，１３th Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９７）に記載されている。アリール基は、単一の環構造（すなわち、単環式）であるか、又は縮合環構造である複数の環構造（すなわち、多環式）を含むことができる。好ましくは、アリール基は、単環式アリール基である。

【０１２０】

アルコキシ基は、水素原子への結合が上記で定義された置換された又は非置換のアルキル基の炭素原子への結合によって置き換えられるヒドロキシル基（－ＯＨ）である。直鎖アルコキシ基の例としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペントキシ、ヘキソキシなどが挙げられるが、これらに限定されない。分枝アルコキシ基の例としては、イソプロポキシ、ｓｅｃ－ブトキシ、ｔｅｒｔ－ブトキシ、イソペントキシ、イソヘキソキシなどが挙げられるが、これらに限定されない。シクロアルコキシ基の例としては、シクロプロピルオキシ、シクロブチルオキシ、シクロペンチルオキシ、シクロヘキシルオキシなどが含まれるが、これらに限定されない。アルコキシ基は、置換又は非置換であり得る。代表的な置換されたアルコキシ基は、上記に列挙された置換基などの置換基で１回又は２回以上置換され得る。

【０１２１】

同様に、アルキルチオ又はチオアルコキシは、－ＳＲ基を指し、式中、Ｒは、硫黄架橋を介して親分子に結合したアルキル、例えば、－Ｓ－メチル、－Ｓ－エチルなどである。アルキルチオの代表的な例としては、－ＳＣＨ$_3$、－ＳＣＨ$_2$ＣＨ$_3$などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２２】

本明細書で使用される用語「ハロゲン」は、臭素、塩素、フッ素、又はヨウ素を指す。相応して、用語「ハロ」は、フルオロ、クロロ、ブロモ、又はヨードを意味する。いくつかの実施形態では、ハロゲンは、フッ素である。他の実施形態では、ハロゲンは、塩素又は臭素である。

【０１２３】
用語「ヒドロキシ」及び「ヒドロキシル」は、互換的に使用することができ、－ＯＨを指す。
【０１２４】
用語「カルボキシ」は、－ＣＯＯＨを指す。
【０１２５】
用語「シアノ」は、－ＣＮを指す。
【０１２６】
用語「ニトロ」は、－NO_2を指す。
【０１２７】
用語「イソチオシアネート」は、－Ｎ＝Ｃ＝Ｓを指す。
【０１２８】
用語「イソシアネート」は、－Ｎ＝Ｃ＝Ｏを指す。
【０１２９】
用語「アジド」は、－N_3を指す。
【０１３０】
用語「アミノ」は、－NH_2を指す。用語「アルキルアミノ」は、窒素に結合した水素原子の１つ又は両方がアルキル基で置換されているアミノ基を指す。アルキルアミン基は、－NR_2として表すことができ、式中、各Ｒは、独立して、水素又はアルキル基である。例えば、アルキルアミンとしては、メチルアミン（－$NHCH_3$）、ジメチルアミン（－$N(CH_3)_2$）、－$NHCH_2CH_3$などが挙げられる。本明細書で使用される場合、「アミノアルキル」という用語は、１つ以上のアミノ基で置換された分岐及び直鎖飽和脂肪族炭化水素基の両方を含むことを意図している。アミノアルキル基の代表例としては、－CH_2NH_2、－$CH_2CH_2NH_2$、及び－$CH_2CH(NH_2)CH_3$が挙げられるが、これらに限定されない。
【０１３１】
本明細書で使用するとき、「アミド」は、－$C(O)N(R)_2$を指し、式中、各Ｒは、独立して、アルキル基又は水素である。アミドの例としては、－$C(O)NH_2$、－$C(O)NHCH_3$、及び－$C(O)N(CH_3)_2$が挙げられるが、これらに限定されない。
【０１３２】
用語「ヒドロキシルアルキル」及び「ヒドロキシアルキル」は、互換的に使用され、１つ又は２つ以上のヒドロキシル基で置換されたアルキル基を指す。アルキルは、分枝鎖又は直鎖脂肪族炭化水素であり得る。ヒドロキシルアルキルの例としてはヒドロキシルメチル（－CH_2OH）、ヒドロキシルエチル（－CH_2CH2OH）などが挙げられるが、これらに限定されない。
【０１３３】
本明細書で使用するとき、用語「ヘテロシクリル」は、硫黄、酸素、又は窒素などの少なくとも１個のヘテロ原子環員を含む安定な単環式及び多環式炭化水素を含む。本明細書で使用するとき、用語「ヘテロアリール」は、硫黄、酸素、又は窒素などの少なくとも１個のヘテロ原子環員を含む安定な単環式及び多環式芳香族炭化水素を含む。ヘテロアリールは、単環式又は多環式、例えば、二環式又は三環式であり得る。ヘテロ原子を含むヘテロシクリル又はヘテロアリール基の各環は、１個又は２個の酸素原子又は硫黄原子及び／又は１～４個の窒素原子を含むことができ、ただし、各環中のヘテロ原子の総数は４個以下であり、各環は少なくとも１個の炭素原子を有する。多環式、例えば二環式又は三環式であるヘテロアリール基は、少なくとも１つの完全芳香環を含む必要があるが、他の縮合環又は環は芳香族又は非芳香族であり得る。ヘテロシクリル又はヘテロアリール基は、ヘテロシクリル又はヘテロアリール基のうちの任意の環の任意の利用可能な窒素又は炭素原子に結合することができる。好ましくは、用語「ヘテロアリール」は、環のうちの少なくとも１つに少なくとも１個のヘテロ原子（Ｏ、Ｓ又はＮ）を有する５員又は６員の単環式

基及び９員又は１０員の二環式基を指し、ヘテロ原子含有環は、好ましくは、１、２又は３個のヘテロ原子を有し、より好ましくは、Ｏ、Ｓ及び／又はＮから選択される１又は２個のヘテロ原子を有する。ヘテロアリールの窒素ヘテロ原子は、置換又は非置換であり得る。更に、ヘテロアリールの窒素及び硫黄ヘテロ原子は、任意選択で酸化することができる（すなわち、Ｎ→Ｏ及びＳ（Ｏ）$_r$であり、式中、ｒは、０、１又は２である）。

【０１３４】

用語「エステル」は－Ｃ（Ｏ）$_2$Ｒ（式中、Ｒはアルキルである）を指す。

【０１３５】

用語「カルバメート」は、－ＯＣ（Ｏ）ＮＲ$_2$を指し、式中、各Ｒは、独立して、アルキル又は水素である。

【０１３６】

用語「アルデヒド」は、－Ｃ（Ｏ）Ｈを指す。

【０１３７】

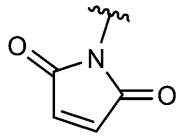
用語「炭酸塩」は、－ＯＣ（Ｏ）ＯＲを指し、式中、Ｒはアルキルである。

【０１３８】

用語「マレイミド」は、化学式Ｈ$_2$Ｃ$_2$（ＣＯ）$_2$ＮＨを有する基を指す。用語「マレイミド」は、別の基又は分子に共有結合したマレイミド基を指す。好ましくは、マレイミド基はＮ結合し、例えば以下のとおりである。

【０１３９】

【化１】



【０１４０】

用語「ハロゲン化アシル」は、－Ｃ（Ｏ）Ｘを指し、式中、Ｘはハロ（例えば、Ｂｒ、Ｃｌ）である。例示的なハロゲン化アシルとしては、塩化アシル（－Ｃ（Ｏ）Ｃｌ）及び臭化アシル（－Ｃ（Ｏ）Ｂｒ）が挙げられる。

【０１４１】

当該技術分野で使用される慣用に従って、

【０１４２】

【化２】



は、本発明の抗原結合ドメインなどのコア、親、又は骨格構造に対する部分、官能基、又は置換基の結合点である結合を示すために、本明細書の構造式で使用される。

【０１４３】

任意の変数が、化合物の任意の構成又は式において２回以上発生する場合、各発生におけるその定義は、他の全ての発生におけるその定義とは無関係である。したがって、例えば、ある基が０～３個のＲ基で置換されることが示されている場合、当該基は、最大３個のＲ基で任意選択で置換することができ、各々の場合に、Ｒは、Ｒの定義から独立して選択される。

【０１４４】

置換基への結合が環中の２つの原子を結合する結合を横断するように示される場合、そのような置換基は、環上の任意の原子に結合することができる。

【０１４５】

本明細書で使用される場合、「放射性金属イオン」又は「放射活性金属イオン」又は「放射性同位体」又は「放射性金属」という用語は、粒子及び／又は光子を放出する元素の

１つ以上の同位体を指す。本開示を考慮して当業者に既知の任意の放射性金属イオンを本発明で使用することができる。治療用途のために使用され得る他の放射性同位体としては、例えば、ベータ放射体又はアルファ放射体が挙げられ、例えば、^{225}Ｐ、^{177}Ｓｃ、^{32}Ｃｕ、^{47}Ａｓ、^{67}Ｃｕ、^{77}Ａｓ、^{89}Ｓｒ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{105}Ｒｈ、^{109}Ｐｄ、^{111}Ａｇ、^{131}Ｉ、^{149}Ｔｂ、^{152}Ｔｂ、^{155}Ｔｂ、^{153}Ｓｍ、^{159}Ｇｄ、^{165}Ｄｙ、^{166}Ｈｏ、^{169}Ｅｒ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{194}Ｉｒ、^{198}Ａｕ、^{199}Ａｕ、^{211}Ａｔ、^{212}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ、^{223}Ｒａ、^{255}Ｆｍ及び^{227}Ｔｈが挙げられる。本発明による造影剤として使用され得る放射性同位体の他の非限定的な例としては、例えば、^{177}Ｌｕ、^{62}Ｃｕ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{89}Ｚｒ、及び^{111}Ｉｎなどのγ線放射性同位体が挙げられる。特定の実施形態では、放射性金属イオンは、治療剤として、例えば、前立腺癌細胞などの癌細胞の増殖を低減若しくは阻害することができる、又は特に死滅させることができる細胞傷害剤として有用な放射性金属イオンを意味する「治療エミッタ」である。治療用放射体の例としては、β放射体又はα放射体、例えば、^{132}Ｌａ、^{135}Ｌａ、^{134}Ｃｅ、^{144}Ｎｄ、^{149}Ｔｂ、^{152}Ｔｂ、^{155}Ｔｂ、^{153}Ｓｍ、^{159}Ｇｄ、^{165}Ｄｙ、^{166}Ｈｏ、^{169}Ｅｒ、^{177}Ｌｕ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{194}Ｉｒ、^{198}Ａｕ、^{199}Ａｕ、^{211}Ａｔ、^{212}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ、^{223}Ｒａ、^{225}Ａｃ、^{255}Ｆｍ及び^{227}Ｔｈ、^{226}Ｔｈ、^{230}Ｕが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明で使用される放射性金属イオンは、α線放出放射性金属イオン、例えば、アクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）である。

【０１４６】

本明細書で使用される場合、「放射性金属錯体」は、大環状化合物であるキレート剤と会合した放射性金属イオンを含む錯体を指す。典型的には、放射性金属イオンは、配位結合を介して大環状化合物に結合又は配位される。大員環のヘテロ原子は、大員環化合物への放射性金属イオンの配位結合に関与し得る。大員環化合物は、１つ又は２つ以上の置換基で置換することができ、この１つ又は２つ以上の置換基はまた、大員環のヘテロ原子に加えて又はその代わりに、大員環化合物への放射性金属イオンの配位結合に関与し得る。

【０１４７】

免疫コンジュゲート（Immunoconjugates）

本発明の実施形態は、前立腺癌患者において有効な腫瘍細胞死を達成するために、短半減期のＦａｂベースの放射性コンジュゲートでｈＫ２を標的化するための組成物及び方法に関し；好ましくは、そのような放射性コンジュゲートは、（完全長抗体の代わりに）Ｆａｂを含み、完全長抗体ベースの放射性コンジュゲートと比較して改善された安全性プロファイル（例えば、骨髄毒性によって測定される場合）を示す。本発明のＦａｂベースの放射性コンジュゲートの実施形態は、ｈＫ２発現前立腺癌細胞を標的とし、半減期が短い。

【０１４８】

本明細書で使用される場合、「免疫コンジュゲート」は、毒素、薬剤、放射性金属イオン、キレート剤、放射性金属錯体などの第２の分子に（共有結合を介して結合した、例えば結合した）コンジュゲートされた抗体又は抗原結合ドメインを指す。「放射性免疫コンジュゲート」（本明細書では「放射性コンジュゲート」とも呼ばれる）は、特に、抗体又は抗原結合ドメインが放射性金属で標識されているか、又は放射性金属錯体にコンジュゲートされている免疫コンジュゲートである。

【０１４９】

本発明の実施形態によれば、免疫コンジュゲートは、ｈＫ２に対する結合特異性を有する本発明の抗原結合ドメインにコンジュゲートした治療部分を含む。本明細書で使用される場合、免疫コンジュゲートの一部を形成する「治療部分」は、治療用途及び／又は画像処理用途において、すなわち、それぞれ治療剤（例えば、細胞毒性薬）及び／又は造影剤として有用であり得る。例えば、本発明の治療部分は、放射性金属を含んでいてもよい。特定の放射性金属は、治療剤（例えば、^{225}Ａｃ）及び／又は造影剤（例えば、^{111}

Ｉｎ）として使用され得ることに留意されたい。適切な治療剤は、前立腺癌細胞などの癌細胞の増殖を低減又は阻害することができ、又は特に癌細胞を死滅させることができるものである。特定の実施形態では、抗原結合ドメインにコンジュゲートされた放射性同位体を含む放射性コンジュゲートは、癌細胞の表面抗原に結合し、細胞死を開始することによって、腫瘍の近傍でアルファ及び／又はベータ粒子を放出する能力を有する細胞傷害性ペイロードを送達することができる。

【０１５０】

好ましい実施形態によれば、本発明は、短半減期免疫コンジュゲート（例えば、半減期の短い放射性免疫コンジュゲート）に関する。本明細書で使用される場合、「短半減期免疫コンジュゲート」は、抗原結合ドメイン（例えば、Ｆａｂ）を含む免疫コンジュゲートを指し、ここで、免疫コンジュゲートは、比較対象の免疫コンジュゲートのインビボ半減期よりもインビボ半減期が短く、比較対象の免疫コンジュゲートは、比較対象の免疫コンジュゲートの抗原結合ドメインが、抗原結合ドメイン（例えば、Ｆｃ領域及び抗原結合ドメインを含む完全長ＩｇＧ）を含む全長抗体で置き換えられていることを除いて、短半減期免疫コンジュゲートと同一である。特定の実施形態では、本発明の短半減期免疫コンジュゲートは、３６時間以下、又は２４時間以下、又は１２時間以下、又は６時間以下、又は３時間以下の半減期を有する。例えば、本発明の短半減期免疫コンジュゲートは、約１時間～約３６時間、又は約１時間～約２４時間、又は約１時間～約１２時間、又は約１時間～約６時間、又は約１時間～約３時間、又は約２時間～約３時間の半減期を有し得る。

【０１５１】

アクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）は、医療用途にとって特に興味深いアルファ放出放射性同位体である。医療用途で関心が持たれている別の放射性同位体は、画像化に適したγ線照射及び放射線治療に適した中エネルギーβ線照射の両方を放出する、ルテチウム１７７（^{177}Ｌｕ）である。治療用途のために使用され得る他の放射性同位体としては、例えば、ベータ放射体又はアルファ放射体が挙げられ、例えば、^{225}Ｐ、^{177}Ｓｃ、^{32}Ｃｕ、^{47}Ａｓ、^{67}Ｃｕ、^{77}Ａｓ、^{89}Ｓｒ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{105}Ｒｈ、^{109}Ｐｄ、^{111}Ａｇ、^{131}Ｉ、^{149}Ｔｂ、^{152}Ｔｂ、^{155}Ｔｂ、^{153}Ｓｍ、^{159}Ｇｄ、^{165}Ｄｙ、^{166}Ｈｏ、^{169}Ｅｒ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{194}Ｉｒ、^{198}Ａｕ、^{199}Ａｕ、^{211}Ａｔ、^{212}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ、^{223}Ｒａ、^{255}Ｆｍ及び^{227}Ｔｈが挙げられる。本発明による造影剤として使用され得る放射性同位体の他の非限定的な例としては、例えば、^{177}Ｌｕ、^{62}Ｃｕ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{89}Ｚｒ、及び^{111}Ｉｎなどのγ線放射性同位体が挙げられる。

【０１５２】

特定の実施形態では、治療部分は、ＭＭＡＥ（モノメチルアウリスタチンＥ）又はＭＭＡＦ（モノメチルアウリスタチンＦ）などのアウリスタチン誘導体である細胞毒性薬である。例えば、アウリスタチン誘導体は、ペプチド性薬剤部分のＮ（アミノ）末端若しくはＣ（カルボキシル）末端を介して（国際公開第０２／０８８１７２号）、又は抗体若しくは抗原結合ドメインに操作された任意のシステインを介して、本発明の抗体若しくは抗原結合ドメインに結合し得る。

【０１５３】

抗ｈＫ２抗体及び抗原結合ドメイン

本明細書に記載のように、本発明の実施形態は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにコンジュゲートされた治療部分を含む免疫コンジュゲートに関する。特定の実施形態によれば、抗原結合ドメインは、ｓｃＦｖ、（ｓｃＦｖ）$_2$、ａＦｖ、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ、ｄＡｂ、又はＶＨＨである。好ましい実施形態によれば、ｈＫ２に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインはＦａｂである。

【０１５４】

特定の実施形態によれば、ｈＫ２（例えば、Ｆａｂ）に結合する抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４及び１７５のＨＣＤＲ１、Ｈ

ＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む。

【０１５５】

特定の実施形態によれば、ｈＫ２（例えば、Ｆａｂ）に結合する抗原結合ドメインは、配列番号１６２のＶＨと少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＨ、及び配列番号１６３のＶＬと少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＬを含む。例えば、ｈＫ２に結合する抗原結合ドメイン（例えば、Ｆａｂ）は、配列番号１６２のＶＨと少なくとも９５％同一のＶＨ、及び配列番号１６３のＶＬと少なくとも９５％同一のＶＬを含む。特定の実施形態によれば、ｈＫ２に結合する抗原結合ドメイン（例えば、Ｆａｂ）は、配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含む。

【０１５６】

特定の実施形態によれば、抗原結合ドメインは、「ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ」とも呼ばれる「ＫＬ２Ｂ３０　Ｆａｂ」（ａ）それぞれ配列番号１７０，１７１，１７２，１７３，１７４及び１７５のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３並びに／又は（ｂ）配列番号１６２と少なくとも９５％同一若しくは１００％同一のＶＨ及び配列番号１６３と少なくとも９５％同一若しくは１００％同一のＶＬを含むＦａｂである。

【０１５７】

ＫＬ２Ｂ３０　Ｆａｂの非限定的な例としては、ＫＬ２Ｂ９９７及びＫＬ２Ｂ１２５１が挙げられ、これらは以下の実施例の項に記載されている。ＫＬ２Ｂ９９７及びＫＬ２Ｂ１２５１の重鎖及び軽鎖配列を図２に示す。ＫＬ２Ｂ９９７は、重鎖上にＨｉｓ－ｔａｇ及びソルターゼタグ（図２において下線が引かれている）を有し、ＫＬ２Ｂ１２５１はタグを有しない。

【０１５８】

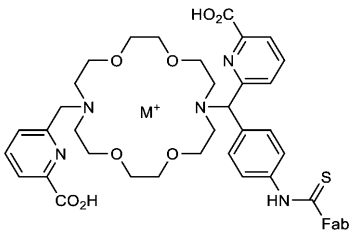
いくつかの実施形態では、本発明の免疫コンジュゲートは、ｍ１１Ｂ６、ｈｕ１１Ｂ６、ＨＣＦ３－ＬＣＤ６、ＨＣＧ５－ＬＣＢ７、ＫＬ２Ｂ３５７、ＫＬ２Ｂ３５８、ＫＬ２Ｂ３５９、ＫＬ２Ｂ３６０、ＫＬ２Ｂ４１３、ＫＬ２Ｂ３０、ＫＬ２Ｂ５３、ＫＬ２Ｂ２４２、ＫＬ２Ｂ４６７及びＫＬ２Ｂ４９４からなる群から選択される、以下に記載される特定の抗体のアミノ酸配列を有するＶＬ、ＶＨ又はＣＤＲを含む抗原結合ドメインを含む。前述の抗体及び抗原結合ドメイン、並びにそれらを作製する方法は、ＰＣＴ／ＩＢ　２０２０／０５６９７２に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【０１５９】

本発明の実施形態は、以下の構造（フェニルチオ尿素部分に連結したＦａｂのリジン残基を示さない）を有する放射性免疫コンジュゲートを提供する：

【０１６０】

【化３】



（ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－Ｆａｂともいう）、

式中、Ｍ$^{+}$は、放射性同位体、例えば、アクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）であり、

ＦａｂはｈＫ２、例えばＫＬ２Ｂ３０　Ｆａｂ（例えば、ＫＬ２Ｂ９９７又はＫＬ２Ｂ１２５１）に対する結合特異性を有する。Ｆａｂは好ましくは、（ａ）それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４及び１７５のＨＣＤＲ　１、ＨＣＤＲ　２、ＨＣＤＲ　３、ＬＣＤＲ　１、ＬＣＤＲ　２及びＬＣＤＲ　３、並びに／又は（ｂ）配列番

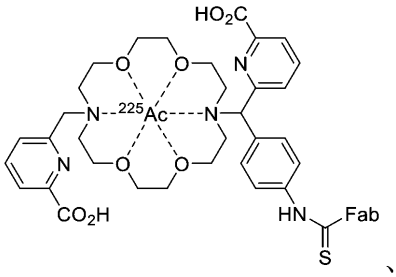
号１６２と少なくとも９５％同一であるか若しくは１００％同一のＶＨ及び配列番号１６３と少なくとも９５％同一であるか若しくは１００％同一のＶＬを含む。

【０１６１】

本発明の実施形態は、以下の構造（フェニルチオ尿素部分に連結したＦａｂのリジン残基を示さない）を有する放射性免疫コンジュゲートを提供する：

【０１６２】

【化４】



、

式中、ＦａｂはｈＫ２、例えばＫＬ２Ｂ３０　Ｆａｂ（例えば、ＫＬ２Ｂ９９７又はＫＬ２Ｂ１２５１）に対する結合特異性を有する。Ｆａｂは好ましくは、（ａ）それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４及び１７５のＨＣＤＲ　１、ＨＣＤＲ　２、ＨＣＤＲ　３、ＬＣＤＲ　１、ＬＣＤＲ　２及びＬＣＤＲ　３、並びに／又は（ｂ）配列番号１６２と少なくとも９５％同一であるか若しくは１００％同一のＶＨ及び配列番号１６３と少なくとも９５％同一であるか若しくは１００％同一のＶＬを含む。

【０１６３】

具体的な列挙された実施形態

本発明の例示的な番号付けされた実施形態を以下に示す。

１．カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにコンジュゲートされた治療部分を含む、免疫コンジュゲート。

２．治療部分が細胞毒性薬である、実施形態１に記載の免疫コンジュゲート。

３．治療部分が造影剤である、実施形態１に記載の免疫コンジュゲート。

４．治療部分が放射性金属を含む、実施形態１～３のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

５．放射性金属が、^{225}Ａｃ、^{177}Ｌｕ、^{32}Ｐ、^{47}Ｓｃ、^{67}Ｃｕ、^{77}Ａｓ、^{89}Ｓｒ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{105}Ｒｈ、^{109}Ｐｄ、^{111}Ａｇ、^{131}Ｉ、^{149}Ｔｂ、^{152}Ｔｂ、^{155}Ｔｂ、^{153}Ｓｍ、^{159}Ｇｄ、^{165}Ｄｙ、^{166}Ｈｏ、^{169}Ｅｒ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{194}Ｉｒ、^{198}Ａｕ、^{199}Ａｕ、^{211}Ａｔ、^{212}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ、^{223}Ｒａ、^{255}Ｆｍ、^{227}Ｔｈ、^{177}Ｌｕ、^{62}Ｃｕ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{89}Ｚｒ、及び^{111}Ｉｎからなる群から選択される、実施形態４に記載の免疫コンジュゲート。

６．治療部分が、^{225}Ａｃを含む細胞毒性薬である、実施形態１に記載の免疫コンジュゲート。

７．治療部分が、^{111}Ｉｎ又は^{64}Ｃｕを含む造影剤である、実施形態１に記載の免疫コンジュゲート。

８．治療部分が、放射性金属錯体を含み、放射性金属錯体は、キレート剤に結合した放射性金属を含み、キレート剤は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにコンジュゲートされている、実施形態４～７のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

９．キレート剤が、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）、Ｓ－２－（４－イソチオシアネートベンジル）－１，４，７－トリアザシクロノナン－１，４，７－三酢酸（ＮＯＴＡ）、１，４，８，１１－テトラアザシクロドデカン－１，４，８，１１－四酢酸（ＴＥＴＡ）、３，６，９，１５－テトラアザビシクロ［９．３．１］－ペンタデカ－１（１５），１１，１３－トリエン－４－（Ｓ

）－（４－イソチオシアネートベンジル）－３，６，９－三酢酸（ＰＣＴＡ）、５－Ｓ－（４－アミノベンジル）－１－オキサ－４，７，１０－トリアザシクロドデカン－４，７，１０－トリス（酢酸）（ＤＯ３Ａ）又はその誘導体である、実施形態８に記載の免疫コンジュゲート。

１０．キレート剤がＤＯＴＡ若しくはＮＯＴＡ又はそれらの誘導体である、実施形態８に記載の免疫コンジュゲート。

１１．キレート剤がH_2ｂｐ１８ｃ６又はH_2ｂｐ１８ｃ６誘導体である、実施形態８に記載の免疫コンジュゲート。

１２．放射性金属錯体が、本明細書に記載の式（Ｉ－ｍ）、又は式（ＩＩ－ｍ）、又は式（ＩＩＩ－ｍ）の放射性錯体であり、式中、R_{11}が、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含み、Ｍが放射性金属である、実施形態８に記載の免疫コンジュゲート。

１３．放射性金属錯体が、本明細書に記載の式（ＩＶ－ｍ）、又は式（Ｖ－ｍ）、又は式（ＶＩ－ｍ）の放射性金属錯体であり、式中、R_4が、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含み、Ｍ＋が、放射性金属である、実施形態８に記載の免疫コンジュゲート。

１４．治療部分がアウリスタチン誘導体である、実施形態１に記載の免疫コンジュゲート。

１５．治療部分がＭＭＡＥ（モノメチルアウリスタチンＥ）である、実施形態１４に記載の免疫コンジュゲート。

１６．治療部分がＭＭＡＦ（モノメチルアウリスタチンＦ）である、実施形態１４に記載の免疫コンジュゲート。

１７．ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖ、$(scFv)_2$、Ｆｖ、Ｆａｂ、$F(ab')_2$、Ｆｄ、ｄＡｂ又はＶＨＨである、実施形態１～１６又は５１～５６のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

１８．ｈＫ２に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインがＦａｂである、実施形態１～１６又は５１～５６のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

１９．抗原結合ドメインが、それぞれ、配列番号１７０（ＳＹＹＷＳ）、配列番号１７１（ＹＩＹＹＳＧＳＴＮＹＮＰＳＬＫＳ）、配列番号１７２（ＴＴＩＦＧＶＶＴＰＮＦＹＹＧＭＤＶ）、配列番号１７３（ＲＡＳＱＧＩＳＳＹＬＡ）、配列番号１７４（ＡＡＳＴＬＱＳ）及び配列番号１７５（ＱＱＬＮＳＹＰＬＴ）のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む、実施形態１～１８又は５１～５６のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

２０．ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインが、配列番号１６２（ＱＶＱＬＱＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＴＶＳＧＧＳＩＳＳＹＹＷＳＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＷＩＧＹＩＹＹＳＧＳＴＮＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＶＤＴＳＫＮＱＦＳＬＫＬＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＹＣＡＧＴＴＩＦＧＶＶＴＰＮＦＹＹＧＭＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ）のＶＨに対して少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＨ、及び配列番号１６３（ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＦＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＧＩＳＳＹＬＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＦＬＩＹＡＡＳＴＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＬＮＳＹＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ）のＶＬに対して少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＬを含む、実施形態１～１９又は５１～５６のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

２１．ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインが、配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含む、実施形態１～１９又は５１～５６のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

２２．抗原結合ドメインが、

ａ．それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５のＨＣＤＲ１

、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３；並びに／又は
ｂ．配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含むＦａｂである、実施形態１～１８又は５１～５６のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。
２３．短半減期免疫コンジュゲートである、実施形態１～２２又は５１～５６のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。
２４．対象におけるｈＫ２発現癌を処置する方法であって、治療有効量の実施形態１～２３又は５１～５６のいずれかに記載の免疫コンジュゲートを対象に投与することを含む、方法。
２５．治療有効量の実施形態１～２３又は５１～５６のいずれかに記載の免疫コンジュゲートを対象に投与することを含む、対象におけるｈＫ２発現腫瘍細胞の量を減少させる方法。
２６．対象の前立腺癌を処置する方法であって、治療有効量の請求項１～２３又は５１～５６のいずれかに記載の免疫コンジュゲートを対象に投与することを含む、方法。
２７．前立腺癌が、再発性、難治性、悪性、若しくは去勢抵抗性前立腺癌、又はそれらの任意の組み合わせである、実施形態２６に記載の方法。
２８．前立腺癌が転移性去勢抵抗性前立腺癌である、実施形態２６に記載の方法。
２９．対象における前立腺癌の存在を検出する方法であって、実施形態１～２３又は５１～５６のいずれかに記載の免疫コンジュゲートを、前立腺癌を有する疑いのある対象に投与し、コンジュゲートが結合した生物学的構造（例えば、コンピュータ断層撮影法又は陽電子放射断層撮影法によって）を可視化し、それにより、前立腺癌の存在を検出することを含み、免疫コンジュゲートは、好ましくは、１１１－Ｉｎ又は６４－Ｃｕなどの造影剤を含む、方法。
３０．カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインに、治療部分をコンジュゲートさせることを含む、実施形態１～２３又は５１～５６のいずれか一項に記載の免疫コンジュゲートを製造する方法。
３１．カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにコンジュゲートされたキレート剤に放射性金属を結合させることを含む、放射性免疫コンジュゲートを作製する方法。
３２．キレート剤がＤＯＴＡ若しくはＮＯＴＡ又はそれらの誘導体である、実施形態３１に記載の方法。
３３．キレート剤がH_2ｂｐ１８ｃ６又はH_2ｂｐ１８ｃ６誘導体である、実施形態３１に記載の方法。
３４．キレート剤が、本明細書に記載の式（Ｉ）、式（ＩＩ）及び式（ＩＩＩ）のキレート剤からなる群から選択され、式中、R_{11}が、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む、実施形態３１に記載の方法。
３５．キレート剤が、本明細書に記載の式（ＩＶ）、式（Ｖ）及び式（ＶＩ）のキレート剤からなる群から選択され、式中、R_4が、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む、実施形態３１に記載の方法。
３６．ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインが、ｓｃＦｖ、$(scFv)_2$、Ｆｖ、Ｆａｂ、$F(ab')_2$、Ｆｄ、ｄＡｂ又はＶＨＨである、実施形態３１～３５のいずれかに記載の方法。
３７．ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインが、Ｆａｂである、実施形態３１～３５のいずれかに記載の方法。
３８．抗原結合ドメインが、それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４及び１７５のＨＣＤＲ　１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む、請求項３１～３７のいずれかに記載の方法。
３９．ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインが、配列番号１６２のＶＨに対して少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＨ、及び配列番号１６３のＶＬに対して少なくとも

８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＬを含む、実施形態３１～３８のいずれか一項に記載の方法。

４０．ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインが、配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含む、実施形態３１～３８のいずれか一項に記載の方法。

４１．抗原結合ドメインが、

ａ．それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３；並びに／又は

ｂ．配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含むＦａｂである、実施形態３１～３７のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

４２．放射性金属錯体を含み、放射性金属錯体が、キレート剤に結合した^{225}Ａｃを含み、キレート剤は、ｈＫ２に対する結合特異性を有するＦａｂにコンジュゲートされ、当該Ｆａｂが、それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４及び１７５のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む、短半減期放射性免疫コンジュゲート。

４３．当該Ｆａｂが、配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含む、実施形態４２に記載の短半減期の放射性免疫コンジュゲート。

４４．キレート剤が、ＤＯＴＡ若しくはＮＯＴＡ又はその誘導体である、実施形態４２又は４３に記載の短半減期放射性免疫コンジュゲート。

４５．キレート剤が、H_2ｂｐ１８ｃ６又はH_2ｂｐ１８ｃ６誘導体である、実施形態４２又は４３に記載の短半減期放射性免疫コンジュゲート。

４６．放射性金属錯体が、本明細書に記載の式（Ｉ－ｍ）、式（ＩＩ－ｍ）及び式（ＩＩ－ｍ）のキレート剤からなる群から選択され、R_{11}がｈＫ２に対する結合特異性を有するＦａｂを含む、実施形態４２又は４３に記載の短半減期放射性免疫コンジュゲート。

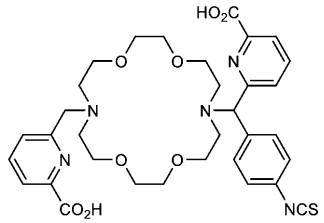
４７．放射性金属錯体が、本明細書に記載の式（ＩＶ－ｍ）、式（Ｖ－ｍ）及び式（ＶＩ－ｍ）のキレート剤からなる群から選択され、R_4がｈＫ２に対する結合特異性を有するＦａｂを含む、実施形態４２又は４３に記載の短半減期放射性免疫コンジュゲート。

４８．放射性金属をキレート剤に結合させる前に、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにキレート剤を結合させることを更に含む、実施形態３１～３７のいずれかに記載の方法。

４９．キレート剤を抗原結合ドメインにコンジュゲートさせる前に、キレート剤が

【０１６４】

【化５】

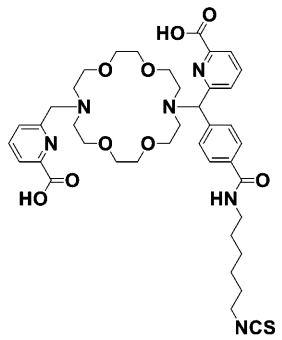


の構造を有する、実施形態４８に記載の方法。

５０．キレート剤を抗原結合ドメインにコンジュゲートさせる前に、キレート剤が

【０１６５】

【化６】



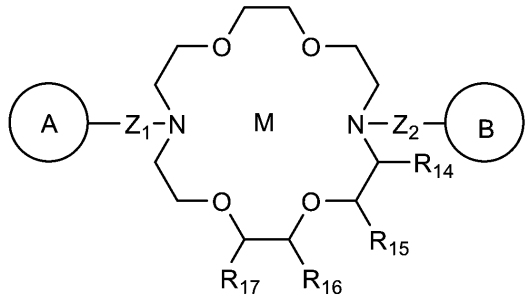
の構造を有する、実施形態４８に記載の方法。

５１．放射性金属錯体が、式（Ｉ－ｍ）の放射性金属錯体であり、

式（Ｉ－ｍ）の放射性金属錯体が、以下の構造：

【０１６６】

【化７】



（Ｉ－ｍ）

（式中、Ｍは、放射性金属、好ましくはアルファ放出放射性金属イオン、より好ましくはアクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）であり；

環Ａ及び環Ｂの各々は、独立して、６～１０員のアリール又は５～１０員のヘテロアリールであり、環Ａ及び環Ｂの各々は、独立してハロ、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、－ＯＲ$_{13}$、－ＳＲ$_{13}$、－（ＣＨ$_2$）$_p$ＣＯＯＲ$_{13}$、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ$_{13}$、－Ｎ（Ｒ$_{13}$）$_2$、－ＣＯＮ（Ｒ$_{13}$）$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＣＮ－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ$_{13}$）$_2$、及びＸからなる群から選択される１つ以上の置換基で置換されていてもよく；

Ｚ$_1$及びＺ$_2$の各々は、独立して、（Ｃ（Ｒ$_{12}$）$_2$）$_m$－、又は－（ＣＨ$_2$）$_n$－Ｃ（Ｒ$_{12}$）（Ｘ）－（ＣＨ$_2$）$_n$－であり；

各Ｘは独立して－Ｌ$_1$－Ｒ$_{11}$であり；

各ｎは、独立して、０、１、２、３、４又は５であり、

各ｍは、独立して、１、２、３、４又は５であり、

各ｐは、独立して、０又は１であり、

Ｌ$_1$は、存在しないか、又はリンカーであり、

Ｒ$_{11}$は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含み；

各Ｒ$_{12}$は、独立して、水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル又はヘテロアリールであり；

各Ｒ$_{13}$は独立して、水素又はアルキルであり；

Ｒ$_{14}$、Ｒ$_{15}$、Ｒ$_{16}$及びＲ$_{17}$の各々は独立して、水素、アルキル又はＸであり、

あるいは、Ｒ$_{14}$及びＲ$_{15}$並びに／又はＲ$_{16}$及びＲ$_{17}$は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、Ｘで置換されていてもよい５員又は６員シクロアルキル環を形成し；　ただし、放射性金属錯体は少なくとも１つのＸを含み、Ｘが環Ａ又は環Ｂ上に存在

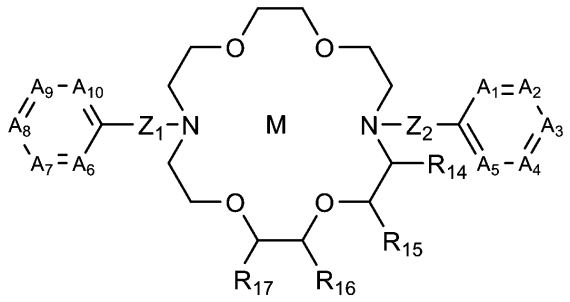
する場合、Ｌ１はリンカーであるか、又はＲ１２及びＲ１４～Ｒ１７の少なくとも１つは水素ではない）を有する、実施形態８に記載の免疫コンジュゲート。

５２．放射性金属錯体が、式（ＩＩ－ｍ）の放射性金属錯体であり、

式（ＩＩ－ｍ）の放射性金属錯体が、以下の構造：

【０１６７】

【化８】



（ＩＩ－ｍ）

（式中、Ｍは、放射性金属、好ましくはアルファ放出放射性金属イオン、より好ましくはアクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）であり；

Ａ１はＮ若しくはＣＲ１であるか、又は存在せず；

Ａ２はＮ又はＣＲ２であり；

Ａ３は、Ｎ又はＣＲ３であり；

Ａ４は、Ｎ又はＣＲ４であり；

Ａ５は、Ｎ又はＣＲ５であり；

Ａ６は、Ｎ若しくはＣＲ６であるか、又は存在せず；

Ａ７は、Ｎ又はＣＲ７であり；

Ａ８は、Ｎ又はＣＲ８であり；

Ａ９は、Ｎ又はＣＲ９であり；

Ａ１０は、Ｎ又はＣＲ１０であり；

ただし、Ａ１、Ａ２、Ａ３、Ａ４、及びＡ５のうちの３つ以下がＮであり、Ａ６、Ａ７、Ａ８、Ａ９、及びＡ１０のうちの３つ以下がＮであり；

Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、Ｒ６、Ｒ７、Ｒ８、Ｒ９、及びＲ１０の各々は、独立して水素、ハロ、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、ＯＲ１３、－ＳＲ１３、－（ＣＨ２）ｐＣＯＯＲ１３、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ１３、－Ｎ（Ｒ１３）２、－ＣＯＮ（Ｒ１３）２、－ＮＯ２、－ＣＮ－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ１３）２、及び－Ｘからなる群から選択され；

あるいは、任意の２つの直接隣接するＲ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、Ｒ６、Ｒ７、Ｒ８、Ｒ９、及びＲ１０は、それらが結合している原子と一緒になって、５員又は６員の置換又は非置換炭素環又は窒素含有環を形成し；

Ｚ１及びＺ２の各々は、独立して、（Ｃ（Ｒ１２）２）ｍ－、又は－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｒ１２）（Ｘ）－（ＣＨ２）ｎ－であり；

各Ｘは独立して－Ｌ１－Ｒ１１であり；

各ｎは、独立して、０、１、２、３、４又は５であり、

各ｍは、独立して、１、２、３、４又は５であり、

各ｐは、独立して、０又は１であり、

Ｌ１は、存在しないか、又はリンカーであり、

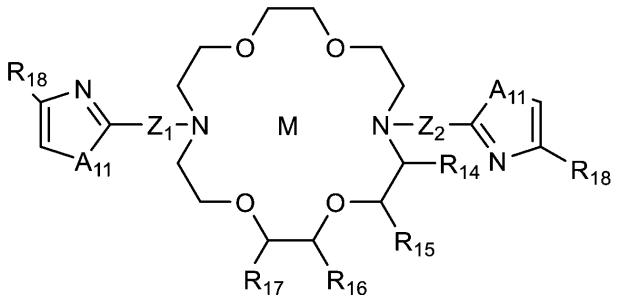
Ｒ１１は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含み；

各Ｒ１２は、独立して、水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル又はヘテロアリールであり；

各Ｒ１３は独立して、水素又はアルキルであり；

Ｒ１４、Ｒ１５、Ｒ１６及びＲ１７の各々は独立して、水素、アルキル又はＸであり、
あるいは、Ｒ１４及びＲ１５並びに／又はＲ１６及びＲ１７は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、Ｘで置換されていてもよい５員又は６員シクロアルキル環を形成し；
ただし、放射性金属錯体は少なくとも１つのＸを含み、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、Ｒ６、Ｒ７、Ｒ８、Ｒ９、及びＲ１０のいずれか１つがＸである場合、Ｌ１はリンカーであるか、又はＲ１２及びＲ１４～Ｒ１７の少なくとも１つは水素ではない）を有する、実施形態８に記載の免疫コンジュゲート。
５３．放射性金属錯体が、式（ＩＩＩ－ｍ）の放射性金属錯体であり、
式（ＩＩＩ－ｍ）の放射性金属錯体が、以下の構造：

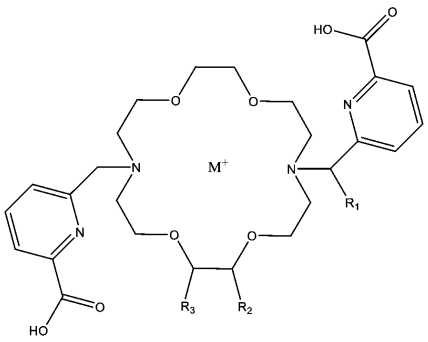
【０１６８】
【化９】



（ＩＩＩ－ｍ）

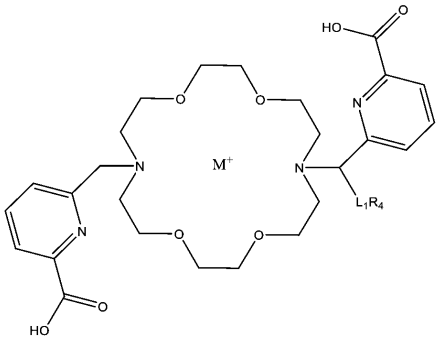
（式中、Ｍは、放射性金属、好ましくはアルファ放出放射性金属イオン、より好ましくはアクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）であり；
各Ａ１１は、独立して、Ｏ、Ｓ、ＮＭｅ又はＮＨであり；
Ｚ１及びＺ２の各々は、独立して、（Ｃ（Ｒ１２）２）ｍ－、又は－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｒ１２）（Ｘ）－（ＣＨ２）ｎ－であり；
各Ｘは独立して－Ｌ１－Ｒ１１であり；
各ｎは、独立して、０、１、２、３、４又は５であり、
各ｍは、独立して、１、２、３、４又は５であり、
各ｐは、独立して、０又は１であり、
Ｌ１は、存在しないか、又はリンカーであり、
Ｒ１１は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含み；
各Ｒ１２は、独立して、水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル又はヘテロアリールであり；
各Ｒ１３は独立して、水素又はアルキルであり；
Ｒ１４、Ｒ１５、Ｒ１６及びＲ１７の各々は独立して、水素、アルキル又はＸであり、
あるいは、Ｒ１４及びＲ１５並びに／又はＲ１６及びＲ１７は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、Ｘで置換されていてもよい５員又は６員のシクロアルキル環を形成し；
各Ｒ１８は、独立して、水素、ハロ、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、ＯＲ１３、－ＳＲ１３、－（ＣＨ２）ｐＣＯＯＲ１３、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ１３、－Ｎ（Ｒ１３）２、－ＣＯＮ（Ｒ１３）２、－ＮＯ２、－ＣＮ－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ１３）２、及び－Ｘからなる群から選択され、
ただし、放射性金属錯体は少なくとも１つのＸを含み、Ｒ１８がＸである場合、Ｌ１はリンカーであるか、又はＲ１２及びＲ１４～Ｒ１７の少なくとも１つは水素ではない）を有する、実施形態８に記載の免疫コンジュゲート。
５４．放射性金属錯体が、式（ＩＶ－ｍ）の放射性金属錯体であり、
式（ＩＶ－ｍ）の放射性金属錯体が、以下の構造：

【０１６９】
【化１０】



（ＩＶ－ｍ）

（式中、
Ｍ$^{+}$は放射性金属であり、好ましくは、アクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）、ラジウム－２２３（^{233}Ｒａ）、ビスマス－２１３（^{213}Ｂｉ）、鉛－２１２（^{212}Ｐｂ（ＩＩ）及び又は^{212}Ｐｂ（ＩＶ））、テルビウム－１４９（^{149}Ｔｂ）、テルビウム－１５２（^{152}Ｔｂ）、テルビウム－１５５（^{155}Ｔｂ）、フェルミウム－２５５（^{255}Ｆｍ）、トリウム－２２７（^{227}Ｔｈ）、トリウム－２２６（^{226}Ｔｈ$^{4+}$）、アスタチン－２１１（^{211}Ａｔ）、セリウム－１３４（^{134}Ｃｅ）、ネオジム１４４（^{144}Ｎｄ）、ランタン－１３２（^{132}Ｌａ）、ランタン－１３５（^{135}Ｌａ）及びウラン－２３０（^{230}Ｕ）からなる群から選択され；
Ｒ$_{1}$は水素であり、かつ、Ｒ$_{2}$は－Ｌ$_{1}$－Ｒ$_{4}$であり、
あるいは、Ｒ$_{1}$は－Ｌ$_{1}$－Ｒ$_{4}$であり、かつ、Ｒ$_{2}$は水素であり、
Ｒ$_{3}$は水素であり、
あるいは、Ｒ$_{2}$及びＲ$_{3}$は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員シクロアルキルを形成し、５員又は６員シクロアルキルは、－Ｌ$_{1}$－Ｒ$_{4}$で任意選択的に置換されており、
Ｌ$_{1}$は、存在しないか、又はリンカーであり、
Ｒ$_{4}$は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む）を有するか、又はその医薬的に許容される塩である、実施形態８に記載の免疫コンジュゲート。
５５．放射性金属錯体が、式（Ｖ－ｍ）の放射性金属錯体であり、
式（Ｖ－ｍ）の放射性金属錯体が、以下の構造：
【０１７０】
【化１１】



（Ｖ－ｍ）

（式中、
Ｍ$^{+}$は放射性金属であり、好ましくは、アクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）、ラジウム－２２３（^{233}Ｒａ）、ビスマス－２１３（^{213}Ｂｉ）、鉛－２１２（^{212}Ｐｂ（ＩＩ）及び又は^{212}Ｐｂ（ＩＶ））、テルビウム－１４９（^{149}Ｔｂ）、テルビウム

－１５２（^{152}Ｔｂ）、テルビウム－１５５（^{155}Ｔｂ）、フェルミウム－２５５（^{255}Ｆｍ）、トリウム－２２７（^{227}Ｔｈ）、トリウム－２２６（^{226}Ｔｈ$^{4+}$）、アスタチン－２１１（^{211}Ａｔ）、セリウム－１３４（^{134}Ｃｅ）、ネオジム１４４（^{144}Ｎｄ）、ランタン－１３２（^{132}Ｌａ）、ランタン－１３５（^{135}Ｌａ）及びウラン－２３０（^{230}Ｕ）からなる群から選択され；

L_1は、存在しないか、又はリンカーであり、

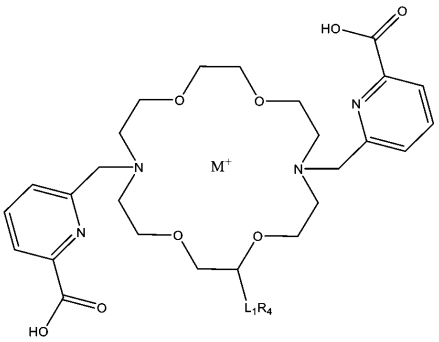
R_4は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む）を有するか、又はその医薬的に許容される塩である、実施形態８に記載の免疫コンジュゲート。

５６．放射性金属錯体が、式（ＶＩ－ｍ）の放射性金属錯体であり、

式（ＶＩ－ｍ）の放射性金属錯体が、以下の構造：

【０１７１】

【化１２】



（ＶＩ－ｍ）

（式中、

M^+は放射性金属であり、好ましくは、アクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）、ラジウム－２２３（^{233}Ｒａ）、ビスマス－２１３（^{213}Ｂｉ）、鉛－２１２（^{212}Ｐｂ（ＩＩ）及び又は^{212}Ｐｂ（ＩＶ））、テルビウム－１４９（^{149}Ｔｂ）、テルビウム－１５２（^{152}Ｔｂ）、テルビウム－１５５（^{155}Ｔｂ）、フェルミウム－２５５（^{255}Ｆｍ）、トリウム－２２７（^{227}Ｔｈ）、トリウム－２２６（^{226}Ｔｈ$^{4+}$）、アスタチン－２１１（^{211}Ａｔ）、セリウム－１３４（^{134}Ｃｅ）、ネオジム１４４（^{144}Ｎｄ）、ランタン－１３２（^{132}Ｌａ）、ランタン－１３５（^{135}Ｌａ）及びウラン－２３０（^{230}Ｕ）からなる群から選択され；

L_1は、存在しないか、又はリンカーであり、

R_4は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む）を有するか、又はその医薬的に許容される塩である、実施形態８に記載の免疫コンジュゲート。

５７．カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにコンジュゲートさせた治療部分を含む免疫コンジュゲートであって、抗原結合ドメインが、それぞれ、配列番号１７０（ＳＹＹＷＳ）、配列番号１７１（ＹＩＹＹＳＧＳＴＮＹＮＰＳＬＫＳ）、配列番号１７２（ＴＴＩＦＧＶＶＴＰＮＦＹＹＧＭＤＶ）、配列番号１７３（ＲＡＳＱＧＩＳＳＹＬＡ）、配列番号１７４（ＡＡＳＴＬＱＳ）及び配列番号１７５（ＱＱＬＮＳＹＰＬＴ）のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む、免疫コンジュゲート。

５８．　ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインが、配列番号１６２（ＱＶＱＬＱＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＥＴＬＳＬＴＣＴＶＳＧＧＳＩＳＳＹＹＷＳＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＷＩＧＹＩＹＹＳＧＳＴＮＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＶＤＴＳＫＮＱＦＳＬＫＬＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＹＣＡＧＴＴＩＦＧＶＶＴＰＮＦＹＹＧＭＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ）のＶＨに対して少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＨ、及び配列番号１６３（ＤＩＱ

ＭＴＱＳＰＳＦＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＧＩＳＳＹＬＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＦＬＩＹＡＡＳＴＬＱＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＬＮＳＹＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫ）のＶＬに対して少なくとも８０％（例えば、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％又は１００％）同一であるＶＬを含む、実施形態５７に記載の免疫コンジュゲート。

５９．ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインが、配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含む、実施形態５７に記載の免疫コンジュゲート。

６０．治療部分が細胞毒性薬である、実施形態５７～５９のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

６１．治療部分が造影剤である、実施形態５７～５９のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

６２．治療部分が放射性金属を含む、実施形態５７～５９のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

６３．放射性金属が、^{225}Ａｃ、^{177}Ｌｕ、^{32}Ｐ、^{47}Ｓｃ、^{67}Ｃｕ、^{77}Ａｓ、^{89}Ｓｒ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{105}Ｒｈ、^{109}Ｐｄ、^{111}Ａｇ、^{131}Ｉ、^{149}Ｔｂ、^{152}Ｔｂ、^{155}Ｔｂ、^{153}Ｓｍ、^{159}Ｇｄ、^{165}Ｄｙ、^{166}Ｈｏ、^{169}Ｅｒ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{194}Ｉｒ、^{198}Ａｕ、^{199}Ａｕ、^{211}Ａｔ、^{212}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ、^{223}Ｒａ、^{255}Ｆｍ、^{227}Ｔｈ、^{177}Ｌｕ、^{62}Ｃｕ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{86}Ｙ、^{89}Ｚｒ、及び^{111}Ｉｎからなる群から選択される、実施形態６２に記載の免疫コンジュゲート。

６４．治療部分が^{225}Ａｃを含む細胞毒性薬である、実施形態５７～５９のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

６５．治療部分が、^{111}Ｉｎ又は^{64}Ｃｕを含む造影剤である、実施形態５７～５９のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

６６．治療部分が、放射性金属錯体を含み、放射性金属錯体は、キレート剤に結合した放射性金属を含み、キレート剤は、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインにコンジュゲートされている、実施形態６２～６５のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。

６７．キレート剤が、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）、Ｓ－２－（４－イソチオシアネートベンジル）－１，４，７－トリアザシクロノナン－１，４，７－三酢酸（ＮＯＴＡ）、１，４，８，１１－テトラアザシクロドデカン－１，４，８，１１－四酢酸（ＴＥＴＡ）、３，６，９，１５－テトラアザビシクロ［９．３．１］－ペンタデカ－１（１５），１１，１３－トリエン－４－（Ｓ）－（４－イソチオシアネートベンジル）－３，６，９－三酢酸（ＰＣＴＡ）、５－Ｓ－（４－アミノベンジル）－１－オキサ－４，７，１０－トリアザシクロドデカン－４，７，１０－トリス（酢酸）（ＤＯ３Ａ）又はその誘導体である、実施形態６６に記載の免疫コンジュゲート。

６８．キレート剤がＤＯＴＡ若しくはＮＯＴＡ又はそれらの誘導体である、実施形態６６に記載の免疫コンジュゲート。

６９．キレート剤がH_2ｂｐ１８ｃ６又はH_2ｂｐ１８ｃ６誘導体である、実施形態６６に記載の免疫コンジュゲート。

７０．放射性金属錯体が、本明細書に記載の式（Ｉ－ｍ）、又は式（ＩＩ－ｍ）、又は式（ＩＩＩ－ｍ）の放射性錯体であり、式中、R_{11}が、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含み、Ｍが放射性金属である、実施形態６６に記載の免疫コンジュゲート。

７１．放射性金属錯体が、本明細書に記載の式（ＩＶ－ｍ）、又は式（Ｖ－ｍ）、又は式（ＶＩ－ｍ）の放射性金属錯体であり、式中、R_4が、カリクレイン関連ペプチダーゼ２（ｈＫ２）に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含み、Ｍ＋が、放射性金属である、実施形態６６に記載の免疫コンジュゲート。

７２．ｈＫ２に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインがＦａｂである、実施形態

５７～７１のいずれかに記載の免疫コンジュゲート。
【０１７２】
キレート剤
特定の実施形態によれば、本発明は、キレート剤、好ましくは配位結合を介して放射性金属をキレート化することができるキレート剤を含む免疫コンジュゲート、例えば放射性免疫コンジュゲートに関する。特定の実施形態によれば、本発明のキレート剤は、金属、好ましくは放射性金属を錯体化して放射性金属錯体を形成することができるキレート剤を指す。好ましくは、キレート剤は大環状化合物である。特定の実施形態では、キレート剤は、環原子として１つ以上のヘテロ原子、例えば酸素及び／又は窒素を含む大環状又は大環状環を含む。
【０１７３】
特定の実施形態によれば、キレート剤は、大環状キレート化部分を含む。大環状キレート化部分の例としては、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸（ＤＯＴＡ）、Ｓ－２－（４－イソチオシアネートベンジル）－１，４，７－トリアザシクロノナン－１，４，７－三酢酸（ＮＯＴＡ）、１，４，８，１１－テトラアザシクロドデカン－１，４，８，１１－四酢酸（ＴＥＴＡ）、３，６，９，１５－テトラアザビシクロ［９．３．１］－ペンタデカ－１（１５），１１，１３－トリエン－４－（Ｓ）－（４－イソチオシアネートベンジル）－３，６，９－三酢酸（ＰＣＴＡ）、５－Ｓ－（４－アミノベンジル）－１－オキサ－４，７，１０－トリアザシクロドデカン－４，７，１０－トリス（酢酸）（ＤＯ３Ａ）又はその誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの態様では、キレート剤は、１，４，７，１０テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０，四酢酸（ＤＯＴＡ）である。他の態様では、キレート剤は、Ｓ－２－（４－イソチオシアネートベンジル）－１，４，７－トリアザシクロノナン－１，４，７－三酢酸（ＮＯＴＡ）である。更なる態様では、キレート剤は、１，４，８，１１－テトラアザシクロドデカン－１，４，８，１１－四酢酸（ＴＥＴＡ）である。更に他の態様では、キレート剤は、３，６，９，１５－テトラアザビシクロ［９．３．１］－ペンタデカ－１（１５），１１，１３－トリエン－４－（Ｓ）－（４－イソチオシアネートベンジル）－３，６，９－三酢酸（ＰＣＴＡ）である。なお更なる態様では、キレート剤は、５－Ｓ－（４－アミノベンジル）－１－オキサ－４，７，１０－トリアザシクロドデカン－４，７，１０－トリス（酢酸）（ＤＯ３Ａ）である。他の態様では、キレート剤は、ＤＯＴＡ、ＤＦＯ、ＤＴＰＡ、ＮＯＴＡ、又はＴＥＴＡである。
【０１７４】
特定の実施形態では、キレート剤は、ＮＯＴＡ又はその誘導体を含む。
【０１７５】
特定の実施形態では、キレート剤は、４，１３－ジアザ－１８－クラウン－６の誘導体である大環状化合物を含む。４，１３－ジアザ－１８－クラウン－６は、様々な方法で調製してもよい（例えば、Ｇａｔｔｏら、Ｏｒｇ．Ｓｙｎｔｈ．１９９０，６８，２２７；ｄｏｉ：１０．１５２２７／ｏｒｇｓｙｎ．０６８．０２２７を参照されたい）。本発明の更なる実施形態によれば、キレート剤は、国際公開第２０２０／２２９９７４号に記載されているものなどのH_2ｂｐ１８ｃ６又はH_2ｂｐ１８ｃ６誘導体である。H_2ｂｐ１８ｃ６は、本明細書に記載のようなＮ，Ｎ’－ビス［（６－カルボキシ－２－ピリジル）メチル］－４，１３－ジアザ－１８－クラウン－６を指す。H_2ｂｐ１８ｃ６及びH_2ｂｐ１８ｃ６誘導体はまた、例えば、Ｔｈｉｅｌｅら、”Ａｎ Ｅｉｇｈｔｅｅｎ－Ｍｅｍｂｅｒｅｄ Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｌｉｇａｎｄ ｆｏｒ Ａｃｔｉｎｉｕｍ－２２５ Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ａｌｐｈａ Ｔｈｅｒａｐｙ”Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．（２０１７）５６，１４７１２－１４７１７、及びＲｏｃａ－Ｓａｂｉｏ ｅｔ ａｌ．“Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ｅｘｈｉｂｉｔｉｎｇ Ｕｎｐｒｅｃｅｄｅｎｔｅｄ Ｓｅｌｅｃｔｉｖｉｔｙ ｆｏｒ Ｌｉｇｈｔ Ｌａｎｔｈａｎｉｄｅｓ”Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（２００９）１３１，３３３１－３３４１に記載され、これらは全て参照により本明細書に組み込まれる。本発明による使用に適した追加

のキレート剤は、国際公開第２０１８／１８３９０６号及び国際公開第２０２０／１０６８８６号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で使用される場合、「ＴＯＰＡ」という用語は、Ｈ２ｂｐ１８ｃ６として当技術分野で公知の大環状化合物を指し、あるいはＮ，Ｎ’－ビス［（６－カルボキシ－２－ピリジル）メチル］－４，１３ジアザ－１８－クラウン－６（例えば、Ｒｏｃａ－Ｓａｂｉｏらを参照されたい）と呼ばれてもよい。

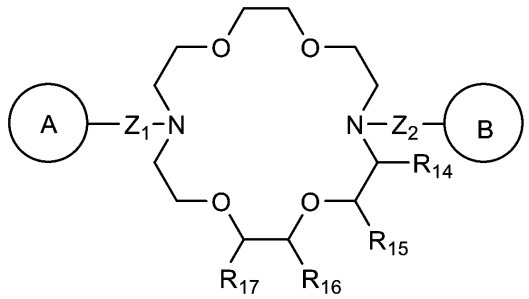
【０１７６】

式（Ｉ）、（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）のキレート剤

本発明による使用に適した追加のキレート剤は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０２０／２２９９７４号に記載されている。特定の実施形態によれば、例えば、国際公開第２０２０／２２９９７４号に記載されているように、キレート剤は、式（Ｉ）の構造：

【０１７７】

【化１３】



（Ｉ）

（式中、

環Ａ及び環Ｂの各々は、独立して、６～１０員のアリール又は５～１０員のヘテロアリールであり、環Ａ及び環Ｂの各々は、独立してハロ、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、－ＯＲ１３、－ＳＲ１３、－（ＣＨ２）ｐＣＯＯＲ１３、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ１３、－Ｎ（Ｒ１３）２、－ＣＯＮ（Ｒ１３）２、－ＮＯ２、－ＣＮ－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ１３）２、及びＸからなる群から選択される１つ以上の置換基で置換されていてもよく；

Ｚ１及びＺ２の各々は、独立して、（Ｃ（Ｒ１２）２）ｍ－、又は－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｒ１２）（Ｘ）－（ＣＨ２）ｎ－であり；

各Ｘは独立して－Ｌ１－Ｒ１１であり；

各ｎは、独立して、０、１、２、３、４又は５であり、

各ｍは、独立して、１、２、３、４又は５であり、

各ｐは、独立して、０又は１であり、

Ｌ１は、存在しないか、又はリンカーであり、

Ｒ１１は求核性部分若しくは求電子性部分であるか、又はＲ１１は抗原結合ドメインを含み；

各Ｒ１２は、独立して、水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル又はヘテロアリールであり；

各Ｒ１３は独立して、水素又はアルキルであり；

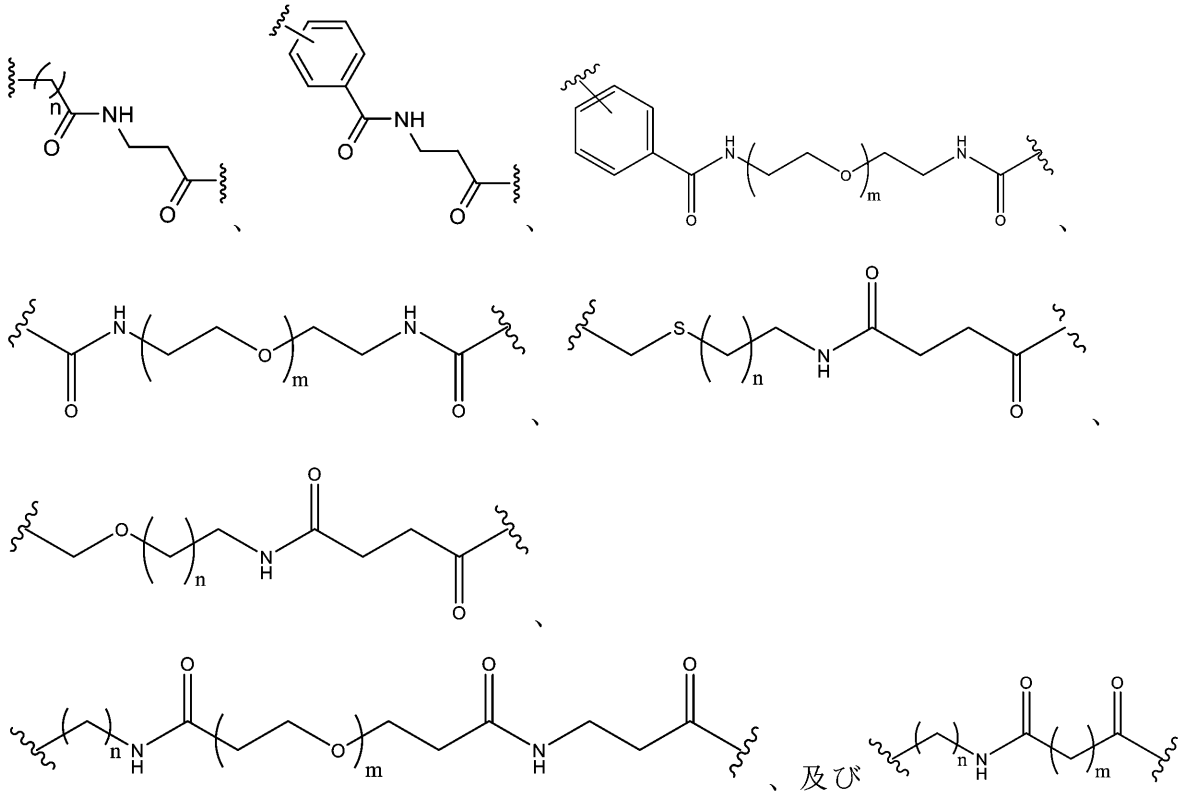
Ｒ１４、Ｒ１５、Ｒ１６及びＲ１７の各々は独立して、水素、アルキル又はＸであり、

あるいは、Ｒ１４及びＲ１５並びに／又はＲ１６及びＲ１７は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、Ｘで置換されていてもよい５員又は６員シクロアルキル環を形成し；

ただし、キレート剤は少なくとも１つのＸを含み、Ｘが環Ａ又は環Ｂ上に存在する場合、Ｌ１はリンカーであるか、又はＲ１２及びＲ１４～Ｒ１７のうちの少なくとも１つが水素ではない）を有する。

【０１７８】
本発明の実施形態によれば、キレート剤は、少なくとも１つのＸ基を含み、Ｘは－Ｌ$_{1}$－Ｒ$_{11}$であり、Ｌ$_{1}$は存在しないか、又はリンカーであり、Ｒ$_{11}$は求電子性部分又は求核性部分であるか、又はＲ$_{11}$は抗原結合ドメインを含む。Ｒ$_{11}$が求核性又は求電子性部分である場合、そのような部分は、直接的に又はリンカーを介して間接的に、抗原結合ドメインにキレート剤を結合させるために使用することができる。好ましい実施形態によれば、Ｒ$_{11}$は、ｈＫ２に対する結合特異性を有する抗体又は抗原結合ドメイン、例えばＫＬ２Ｂ３０のＦａｂを含む。
【０１７９】
特定の実施形態では、キレート剤は１つのＸ基を含み、好ましくはＸ基のＬ$_{1}$はリンカーである。
【０１８０】
本発明のキレート剤は、環Ａ又は環ＢがＸ基を含む場合、Ｌ$_{1}$がリンカーであるか、又はＲ$_{12}$及びＲ$_{14}$－Ｒ$_{17}$の少なくとも１つが水素ではない（すなわち、Ｚ$_{1}$、Ｚ$_{2}$の炭素原子及び／又は大環状環の炭素の少なくとも１つは、例えば、メチル又はエチルなどのアルキル基で置換されている）ことを条件として、大環状環の炭素原子、Ｚ$_{1}$若しくはＺ$_{2}$位、又は環Ａ若しくは環Ｂ上のＸで置換することができる。好ましくは、そのような位置での置換は、放射性金属イオン、特に^{225}Ａｃに対するキレート剤のキレート化効率に影響せず、いくつかの実施形態では、置換はキレート化効率を高めることができる。
【０１８１】
いくつかの実施形態では、Ｌ$_{1}$は存在しない。Ｌ$_{1}$が存在しない場合、Ｒ$_{11}$は、キレート剤に直接結合される（例えば、共有結合を介して）。
【０１８２】
いくつかの実施形態では、Ｌ$_{1}$はリンカーである。本明細書で使用される場合、「リンカー」という用語は、キレート剤を求核性部分、求電子性部分又は抗原結合ドメインに結合させる化学部分を指す。本開示を考慮して、当業者に既知の任意の好適なリンカーを本発明で使用することができる。リンカーは、例えば、置換若しくは非置換アルキル、置換若しくは非置換ヘテロアルキル部分、置換若しくは非置換アリール若しくはヘテロアリール、ポリエチレングリコール（polyethylene glycol、ＰＥＧ）リンカー、ペプチドリンカー、糖ベースのリンカー、又は切断可能なリンカー、例えば、ジスルフィド結合又はプロテアーゼ切断部位、例えば、バリン－シトルリン－ｐ－アミノベンジル（p-amino benzyl、ＰＡＢ）を含むことができる。本発明での使用に好適な例示的なリンカー構造としては：
【０１８３】

【化１４】



が挙げられるがこれらに限定されず、式中、ｎは、０～１０の整数、好ましくは１～４の整数であり、ｍは、０～１２の整数、好ましくは０～６の整数である。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、Ｒ１１は、求核性部分又は求電子性部分である。「求核性部分」又は「求核基」は、化学反応において共有結合を形成するために電子対を供与する官能基を指す。「求電子性部分」又は「求電子基」は、化学反応において共有結合を形成するために電子対を受容する官能基を指す。求核基は、化学反応において、新たな共有結合を形成するために求電子基と反応し、その逆もしかりである。本発明のキレート剤の求核基又は求電子基と、対応する反応パートナーを含む抗原結合ドメイン又は他の化学的部分（例えばリンカー）との反応により、本発明のキレート剤への抗原結合ドメイン又は化学的部分の共有結合が可能になる。

【０１８５】

求核基の例示的な例としては、アジド、アミン、及びチオールが挙げられるが、これらに限定されない。求電子基の例示としては、アミン反応性基、チオール反応性基、アルキニル及びシクロアルキニルが挙げられるが、これらに限定されない。アミン反応性基は、好ましくは、各ポリペプチド鎖のＮ末端及びリジン残基の側鎖に存在する第一級アミンを含む、第一級アミンと反応する。本発明での使用に好適なアミン反応性基の例としては、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（N-hydroxy succinimide、ＮＨＳ）、置換ＮＨＳ（スルホ－ＮＨＳなど）、イソチオシアネート（－ＮＣＳ）、イソシアネート（－ＮＣＯ）、エステル、カルボン酸、ハロゲン化アシル、アミド、アルキルアミド、並びにテトラフルオロフェニルエステル及びパーフルオロフェニルエステルが挙げられるが、これらに限定されない。チオール反応性基は、チオール又はスルフヒドリルと反応し、好ましくは、ポリペプチドのシステイン残基の側鎖に存在するチオールと反応する。本発明での使用に好適なチオール反応性基の例としては、マイケル受容体（例えば、マレイミド）、ハロアセチル、ハロゲン化アシル、活性化ジスルフィド、及びフェニルオキサジアゾールスルホンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１８６】

特定の実施形態では、R_{11}は、－NH_2、－ＮＣＳ（イソチオシアネート）、－ＮＣＯ（イソシアナート）、－N_3（アジド）、アルキニル、シクロアルキニル、カルボン酸、エステル、アミド、アルキルアミド、マレイミド、ハロゲン化アシル、テトラジン、又はトランス－シクロオクテン、より詳細には－ＮＣＳ、－ＮＣＯ、－N_3、アルキニル、シクロアルキニル、－Ｃ（Ｏ）R_{13}、－ＣＯＯR_{13}、－ＣＯＮ（R_{13}）$_2$、マレイミド、ハロゲン化アシル（例えば、－Ｃ（Ｏ）Ｃｌ、－Ｃ（Ｏ）Ｂｒ）、テトラジン、又はトランス－シクロオクテンであり、各R_{13}は独立して水素又はアルキルである。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、R_{11}は、アルキニル、シクロアルキニル又はアジド基であり、したがってクリック化学反応を使用して抗原結合ドメイン又は他の化学的部分（例えばリンカー）へのキレート剤の結合を可能にする。そのような実施形態では、実施することができるクリックケミストリー反応は、１，２，４－トリアゾールリンカー又は部分を形成するためのアジド（－N_3）とアルキニル基又はシクロアルキニル基との間のヒュスゲン環化付加又は１，３－双極子環化付加である。一実施形態では、キレート剤はアルキニル又はシクロアルキニル基を含み、抗原結合ドメイン又は他の化学的部分はアジド基を含む。別の実施形態では、キレート剤はアジド基を含み、抗原結合ドメイン又は他の化学的部分はアルキニル又はシクロアルキニル基を含む。

【０１８８】

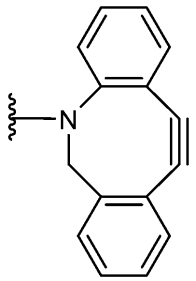
特定の実施形態では、R_{11}は、アルキニル基であり、より好ましくは、アジド基と反応性である末端アルキニル基又はシクロアルキニル基であり、特に歪み促進アジド－アルキン環化付加反応（ＳＰＡＡＣ）を介して反応性である。ＳＰＡＡＣによりアジド基と反応することができるシクロアルキニル基の例としては、シクロオクチニル又はビシクロノニニル（ＢＣＮ）、ジフッ素化シクロオクチニル（ＤＩＦＯ）、ジベンゾシクロオクチニル（ＤＩＢＯ）、ケト－ＤＩＢＯ、ビアリールアザシクロオクチノニル（ＢＡＲＡＣ）、ジベンゾアザシクロオクチニル（ＤＩＢＡＣ、ＤＢＣＯ、ＡＤＩＢＯ）、ジメトキシアザシクロオクチニル（ＤＩＭＡＣ）、ジフルオロベンゾシクロオクチニル（ＤＩＦＢＯ）、モノベンゾシクロオクチニル（ＭＯＢＯ）及びテトラメトキシジベンゾシクロオクチニル（ＴＭＤＩＢＯ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１８９】

特定の実施形態では、R_{11}は、以下の構造を有するジベンゾアザシクロオクチニル（ＤＩＢＡＣ、ＤＢＣＯ、ＡＤＩＢＯ）である：

【０１９０】

【化１５】



。

R_{11}がＤＢＣＯである実施形態では、ＤＢＣＯは、直接的に又はリンカーを介して間接的に化合物に共有結合することができ、好ましくは、リンカーを介して間接的に化合物に結合される。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、R_{11}は抗原結合ドメインを含む。抗原結合ドメインは、共有結合を介して直接的に、又はリンカーを介して間接的にキレート剤に連結することができる。好ましい実施形態では、抗原結合ドメインは抗体又はその抗原結合断片である。好ましい実施形態によれば、R_{11}は、ｈＫ２に対する結合特異性を有する抗原結合ドメイン、例えばＫＬ２Ｂ３０のＦａｂを含む。

【０１９２】
本発明の実施形態によれば、環Ａ及び環Ｂの各々は、独立して、６～１０員のアリール又は５～１０員のヘテロアリールである。代替的な実施形態では、環Ａ及び環Ｂの各々は、任意選択で置換されたヘテロシクリル環、例えば、オキサゾリンであることが企図される。環Ａ及び環Ｂの各々は、ハロ、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、－ＯＲ$_{13}$、－ＳＲ$_{13}$、－（ＣＨ$_2$）$_p$ＣＯＯＲ$_{13}$、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ$_{13}$、－Ｎ（Ｒ$_{13}$）$_2$、－ＣＯＮ（Ｒ$_{13}$）$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＣＮ－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ$_{13}$）$_2$及びＸからなる群から独立して選択される１つ以上の置換基で場合により、独立して置換することができる。この目的に適した６～１０員アリール基の例としては、フェニル及びナフチルが挙げられるが、これらに限定されない。この目的に好適な５～１０員のヘテロアリール基の例としては、ピリジニル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル及びイミダゾリルが挙げられるが、これらに限定されない。５～１０員のヘテロアリール基及び６～１０員のアリール基の適切な置換基の例としては、－ＣＯＯＨ、テトラゾリル及び－ＣＨ$_2$ＣＯＯＨが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、置換基は、－ＣＯＯＨ、又は－ＣＯＯＨのアイソスターであるテトラゾリルである。

【０１９３】
特定の実施形態では、環Ａ及び環Ｂの各々は、独立して、場合により、－ＣＯＯＨ及び－ＣＨ$_2$ＣＯＯＨであるが、これらに限定されない１つ以上のカルボキシル基で置換されている。

【０１９４】
特定の実施形態では、環Ａ及び環Ｂの各々は、独立してかつ任意選択でテトラゾリルで置換されている。

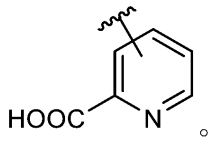
【０１９５】
一実施形態では、環Ａ及び環Ｂは同じであり、例えば、環Ａ及び環Ｂの両方がピリジニルである。別の実施形態では、環Ａ及び環Ｂは異なり、例えば、環Ａ及び環のうちの１つがピリジニルであり、他方がフェニルである。

【０１９６】
特定の実施形態では、環Ａ及び環Ｂの両方は、－ＣＯＯＨで置換されたピリジニルである。

【０１９７】
特定の実施形態では、環Ａ及び環Ｂの両方は、テトラゾリルで置換されたピリジニルである。

【０１９８】
別の特定の実施形態では、環Ａ及び環Ｂの両方は、以下の構造を有するピコリン酸基である：

【０１９９】
【化１６】



。

【０２００】
本発明の実施形態によれば、Ｚ$_1$及びＺ$_2$の各々は独立して、－（Ｃ（Ｒ$_{12}$）$_2$）$_m$又は－（ＣＨ$_2$）$_n$－Ｃ（Ｒ$_{12}$）（Ｘ）－（ＣＨ$_2$）$_n$－であり；各Ｘは独立して、－Ｌ$_1$－Ｒ$_{11}$であり；各Ｒ$_{12}$は、独立して、水素、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロシクリル又はヘテロアリールであり、各ｎは、独立して、０、１、２、３、４、又は５であり、各ｍは、独立して、１、２、３、４、又は５である。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、各R_{12}は、独立して、水素又はアルキルであり、より好ましくは、水素、－CH_3、又は－CH_2CH_3である。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、各R_{12}は、水素である。

【０２０３】

いくつかの実施形態では、Z_1及びZ_2は両方とも－（CH_2）$_m$－であり、各ｍは好ましくは１である。そのような実施形態では、大員環、環Ａ又は環Ｂの炭素原子は、Ｘ基で置換される。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、Z_1及びZ_2の一方は、－（CH_2）$_n$－Ｃ（R_{12}）（Ｘ）－（CH_2）$_n$－であり、他方は、－（CH_2）$_m$－である。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、Z_1及びZ_2－（CH_2）$_n$－Ｃ（R_{12}）（Ｘ）－（CH_2）$_n$－であり、他方は、－（CH_2）$_m$－であり；各ｎは、０であり、ｍは、１であり；Ｘは－L_1－R_{11}であり；L_1はリンカーである。

【０２０６】

いくつかの実施形態では、Z_1及びZ_2の両方は、－（CH_2）$_m$－であり；各ｍは独立して０、１、２、３、４又は５であり、好ましくは各ｍは１であり；R_{14}、R_{15}、R_{16}及びR_{17}の１つはＸであり、R_{14}、R_{15}、R_{16}及びR_{17}の残りはそれぞれ水素である。

【０２０７】

いくつかの実施形態では、R_{14}及びR_{15}は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員シクロアルキル環（すなわち、シクロペンチル又はシクロヘキシル）を形成する。そのような５員又は６員のシクロアルキル環は、Ｘ基で置換することができる。

【０２０８】

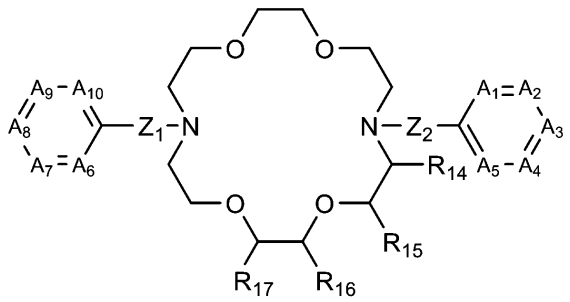
いくつかの実施形態では、R_{16}及びR_{17}は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員のシクロアルキル環（すなわち、シクロペンチル又はシクロヘキシル）を形成する。そのような５員又は６員のシクロアルキル環は、Ｘ基で置換することができる。

【０２０９】

特定の実施形態では、キレート剤は、式（ＩＩ）の構造：

【０２１０】

【化１７】



（ＩＩ）

（式中、

A_1はＮ若しくはCR_1であるか、又は存在せず；

A_2はＮ又はCR_2であり；

A_3は、Ｎ又はCR_3であり；

A_4は、Ｎ又はCR_4であり；

A_5は、Ｎ又はCR_5であり；

A_6は、N若しくはCR_6であるか、又は存在せず；
A_7は、N又はCR_7であり；
A_8は、N又はCR_8であり；
A_9は、N又はCR_9であり；
A_{10}は、N又はCR_{10}であり；
ただし、A_1、A_2、A_3、A_4、及びA_5のうちの３つ以下がNであり、A_6、A_7、A_8、A_9、及びA_{10}のうちの３つ以下がNであり；
R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、及びR_{10}の各々は、独立して水素、ハロ、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、OR_{13}、$-SR_{13}$、$-(CH_2)_pCOOR_{13}$、$-OC(O)R_{13}$、$-N(R_{13})_2$、$-CON(R_{13})_2$、$-NO_2$、$-CN-OC(O)N(R_{13})_2$、及び－Ｘからなる群から選択され；
あるいは、任意の２つの直接隣接するR_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、及びR_{10}は、それらが結合している原子と一緒になって、５員又は６員の置換又は非置換炭素環又は窒素含有環を形成し；
Z_1、Z_2、Ｘ、ｎ、ｍ、ｐ、L_1、及びR_{11}～R_{17}は、式（Ｉ）について上述した通りであり、
ただし、キレート剤は少なくとも１つのＸを含み、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9及びR_{10}のいずれか１つがＸである場合、L_1はリンカーであるか、又はR_{12}及びR_{14}～R_{17}の少なくとも１つは水素ではない）を有する。

【０２１１】
いくつかの実施形態では、任意の２つの直接隣接するR_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、及びR_{10}は、それらが結合している原子と一緒になって、５員又は６員の置換又は非置換炭素環式環又は窒素含有環を形成する。形成することができるそのような炭素環の例としては、ナフチルが挙げられるが、これに限定されない。形成することができるそのような窒素含有環の例としては、キノリニルが挙げられるが、これに限定されない。炭素環又は窒素含有環は、非置換であってもよく、又は１つ以上の好適な置換基、例えば、$-COOH$、$-CH_2COOH$、テトラゾリルなどで置換されてもよい。

【０２１２】
いくつかの実施形態では、L_1は存在しない。L_1が存在しない場合、R_{11}は、キレート剤に直接結合される（例えば、共有結合を介して）。

【０２１３】
いくつかの実施形態では、L_1はリンカーである。上記のものなどの、本開示を考慮して当業者に既知の任意の好適なリンカーを本発明で使用することができる。

【０２１４】
いくつかの実施形態では、A_1、A_2、A_3、A_4、及びA_5の１つは窒素であり、A_1、A_2、A_3、A_4、及びA_5の１つは$-COOH$で置換された炭素であり、残りはＣＨである、すなわち、カルボン酸で置換されたピリジニル環を形成する。

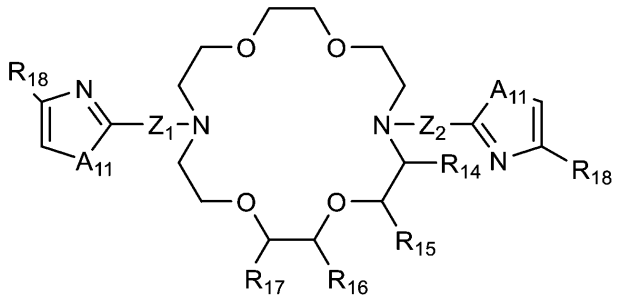
【０２１５】
いくつかの実施形態では、A_6、A_7、A_8、A_9及びA_{10}のうちの１つは窒素であり、A_6、A_7、A_8、A_9及びA_{10}の１つは$-COOH$で置換された炭素であり、残りはＣＨである、すなわち、カルボン酸で置換されたピリジニル環を形成する。

【０２１６】
一実施形態では、R_1、R_2、R_3、R_4及びR_5の少なくとも１つは$-COOH$である。一実施形態では、R_6、R_7、R_8、R_9及びR_{10}の少なくとも１つは$-COOH$である。別の実施形態では、R_1、R_2、R_3、R_4及びR_5の少なくとも１つは$-COOH$であり；R_6，R_7、R_8、R_9及びR_{10}の少なくとも１つは$-COOH$である。

【０２１７】
いくつかの実施形態では、A_1及びA_{10}の各々は窒素である。A_2はCR_2であり、

R_2は－ＣＯＯＨであり；
A_9はCR_9であり、R_9は－ＣＯＯＨであり；A_3～A_8の各々は、それぞれ、CR_2、CR_3、CR_4、CR_5、CR_6、CR_7、及びCR_8であり；R_3～R_8の各々は、水素である。
【０２１８】
いくつかの実施形態では、A_1、A_2、A_3、A_4及びA_5の１つは窒素であり、A_1、A_2、A_3、A_4及びA_5の１つはテトラゾリルで置換された炭素であり、残りはＣＨである。
【０２１９】
いくつかの実施形態では、A_6、A_7、A_8、A_9、及びA_{10}の１つは窒素であり、A_6、A_7、A_8、A_9、及びA_{10}の１つはテトラゾリルで置換された炭素であり、残りはＣＨである。
【０２２０】
一実施形態では、R_1、R_2、R_3、R_4及びR_5の少なくとも１つはテトラゾリルである。一実施形態では、R_6、R_7、R_8、R_9及びR_{10}の少なくとも１つはテトラゾリルである。別の実施形態では、R_1、R_2、R_3、R_4及びR_5の少なくとも１つはテトラゾリルであり；R_6，R_7、R_8、R_9及びR_{10}の少なくとも１つはテトラゾリルである。
【０２２１】
いくつかの実施形態では、各R_{12}は、水素である。
【０２２２】
いくつかの実施形態では、R_{11}は、アルキニル基又はシクロアルキニル基、好ましくはシクロオクチニル又はシクロオクチニル誘導体、例えばＤＢＣＯである。
【０２２３】
式（ＩＩ）のキレート剤の特定の実施形態では、
A_1及びA_{10}の各々は窒素であり；
A_2はCR_2であり、R_2は－ＣＯＯＨであり；
A_9はCR_9であり、R_9は－ＣＯＯＨであり；
A_3～A_8の各々は、それぞれ、CR_2、CR_3、CR_4、CR_5、CR_6、CR_7、及びCR_8であり；
R_3～R_8の各々は水素であり；
Z_1及びZ_2の一方は－（CH_2）$_m$であり、Z_1及びZ_2の他方が－（CH_2）$_n$－Ｃ（R_{12}）（Ｘ）－（CH_2）$_n$－であり；
R_{12}は水素であり；
ｍは、１であり；
各ｎは、０であり；
Ｘは－L_1－R_{11}であり、L_1はリンカーであり、－R_{11}は求電子基、例えば、シクロオクチニル又はＤＢＣＯなどのシクロオクチニル誘導体であり；
R_{14}及びR_{17}の各々は水素であり、あるいは、R_{16}及びR_{17}は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員シクロアルキルを形成する。
【０２２４】
特定の実施形態では、キレート剤は、式（ＩＩＩ）の構造：
【０２２５】

【化１８】



（ＩＩＩ）

（式中、
各Ａ１１は、独立して、Ｏ、Ｓ、ＮＭｅ又はＮＨであり；
各Ｒ１８は、独立して、水素、ハロ、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、－ＯＲ１３、－ＳＲ１３、－ＣＯＯＲ１３、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ１３、－Ｎ（Ｒ１３）２、－ＣＯＮ（Ｒ１３）２、－ＮＯ２、－ＣＮ－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ１３）２、及び－Ｘからなる群から選択され、
Ｚ１、Ｚ２、Ｘ、ｎ、ｍ、Ｌ１、Ｒ１１～Ｒ１７は、式（Ｉ）について上述した通りであり、
ただし、キレート剤は少なくとも１つのＸを含み、Ｒ１８がＸである場合、Ｌ１はリンカーであるか、又はＲ１２及びＲ１４～Ｒ１７の少なくとも１つは水素ではない）を有する。

【０２２６】
いくつかの実施形態では、各Ａ１１は同じであり、各Ａ１１は、Ｏ、Ｓ、ＮＭｅ又はＮＨである。例えば、各Ａ１１は、Ｓであり得る。他の実施形態では、各Ａ１１は異なっており、各々が、独立して、Ｏ、Ｓ、ＮＭｅ及びＮＨから選択される。

【０２２７】
いくつかの実施形態では、各Ｒ１８は独立して、－（ＣＨ２ｐ－ＣＯＯＲ１３又はテトラゾリルであり、Ｒ１３は水素であり、各ｐは独立して、０又は１である。

【０２２８】
いくつかの実施形態では、各Ｒ１８は、－ＣＯＯＨである。

【０２２９】
いくつかの実施形態では、各Ｒ１８は、－ＣＨ２ＣＯＯＨである。

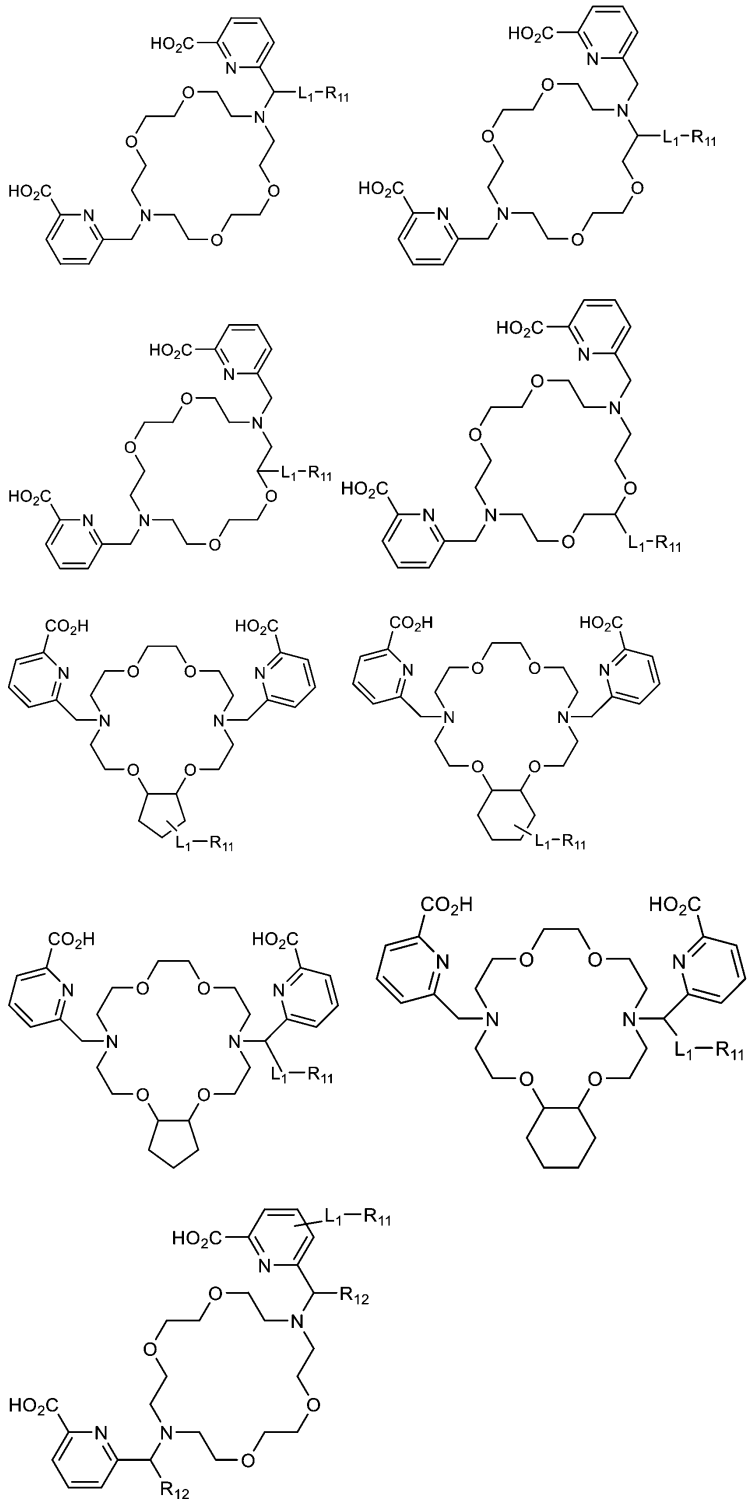
【０２３０】
いくつかの実施形態では、各Ｒ１８はテトラゾリルである。

【０２３１】
式（ＩＩＩ）のキレート剤の特定の実施形態では、
各Ｒ１８はＣＯＯＨであり；
Ｚ１及びＺ２の一方が－（ＣＨ２）ｍであり、Ｚ１及びＺ２の他方が－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｒ１２）（Ｘ）－（ＣＨ２）ｎ－であり；
Ｒ１２は水素であり；
ｍは、１であり；各ｎは、０であり；
Ｘは－Ｌ１－Ｒ１１であり、Ｌ１はリンカーであり、－Ｒ１１は求電子基、例えば、シクロオクチニル又はＤＢＣＯ若しくはＢＣＮなどのシクロオクチニル誘導体であり；
Ｒ１４及びＲ１７の各々は水素であり、あるいは、Ｒ１６及びＲ１７は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員シクロアルキルを形成する。

【０２３２】
本発明の特定の実施形態は、以下からなる群より選択されるキレート剤であり：

【０２３３】

【化１９】



式中、

L_1は、存在しないか、又はリンカーであり、

R_{11}は求核性部分若しくは求電子性部分であるか、又はR_{11}は抗原結合ドメイン（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）を含み；及び

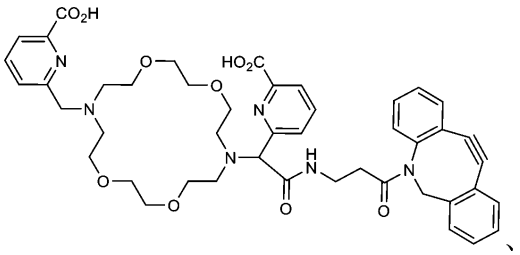
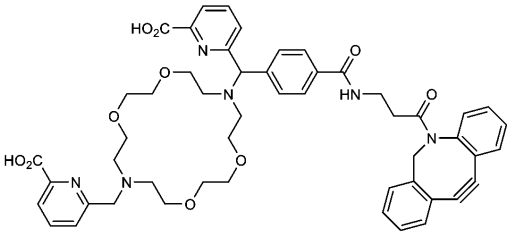
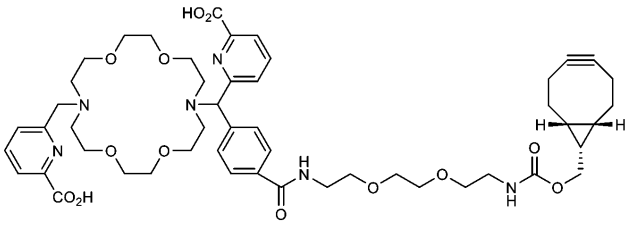
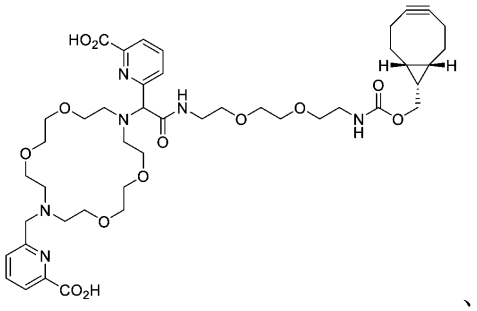
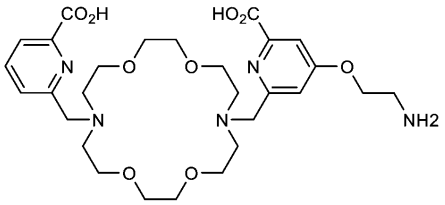
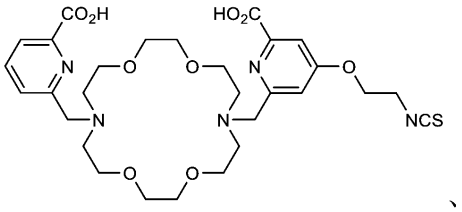
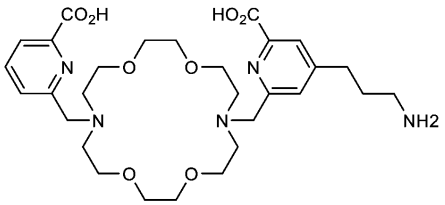
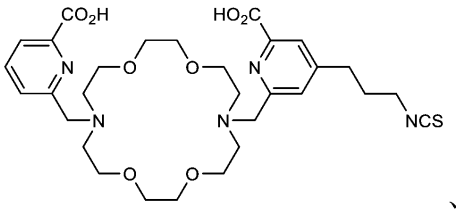
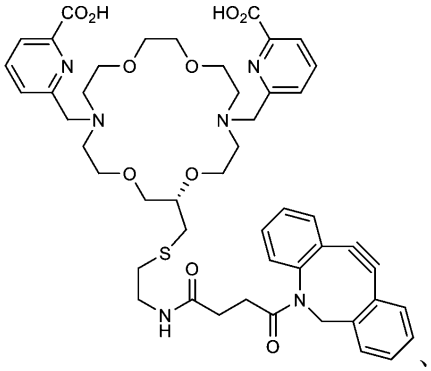
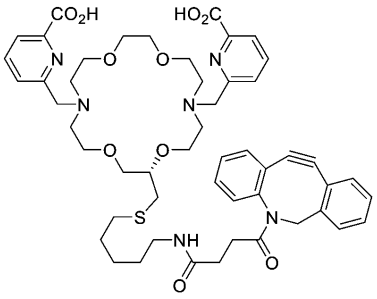
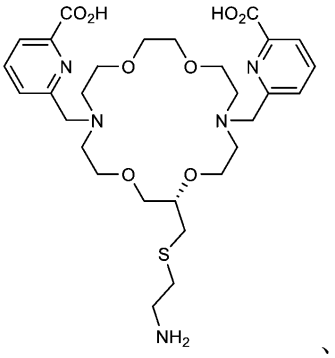
各R_{12}は、独立して、水素、－CH_3、又は－CH_2CH_3であるが、ただし、少なくとも１つのR_{12}は、－CH_3又は－CH_2CH_3である。

【０２３４】

いくつかの実施形態では、R_{11}は、－NH_2、－ＮＣＳ、－ＮＣＯ、－N_3、アルキニル、シクロアルキニル、－Ｃ（Ｏ）R_{13}、－$COOR_{13}$、－$CON(R_{13})_2$、

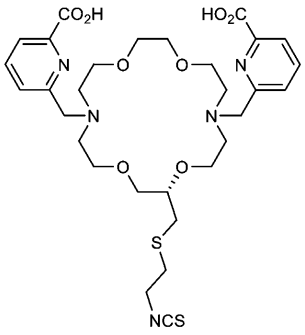
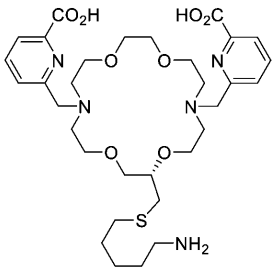
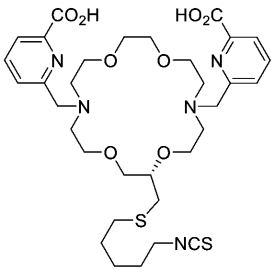
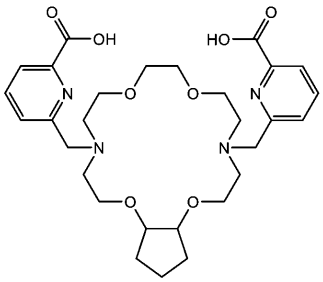
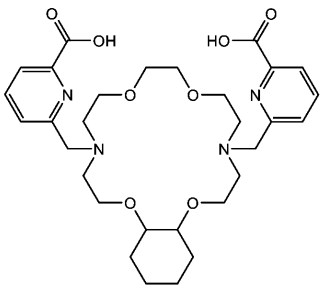
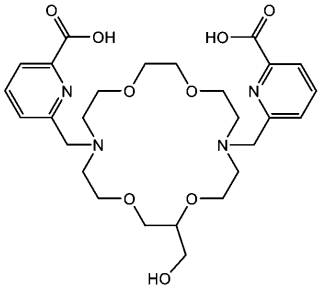
マレイミド、ハロゲン化アシル、テトラジン、又はトランス－シクロオクテンである。
【０２３５】
特定の実施形態では、R_{11}は、シクロオクチニル、又はビシクロノニニル（ＢＣＮ）、ジフッ素化シクロオクチニル（ＤＩＦＯ）、ジベンゾシクロオクチニル（ＤＩＢＯ）、ケト－ＤＩＢＯ、ビアリールアザシクロオクチノニル（ＢＡＲＡＣ）、ジベンゾアザシクロオクチニル（ＤＩＢＡＣ、ＤＢＣＯ、ＡＤＩＢＯ）、ジメトキシアザシクロオクチニル（ＤＩＭＡＣ）、ジフルオロベンゾシクロオクチニル（ＤＩＦＢＯ）、モノベンゾシクロオクチニル（ＭＯＢＯ）、及びテトラメトキシジベンゾシクロオクチニル（ＴＭＤＩＢＯ）からなる群から選択されるシクロオクチニル誘導体である。
【０２３６】
好ましくは、R_{11}は、アルキニル基又はシクロアルキニル基であり、より好ましくはシクロアルキニル基、例えば、ＤＢＣＯ又はＢＣＮである。
【０２３７】
本発明における例示的なキレート剤としては：
【０２３８】

【化２０】


、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

【０２３９】

【化２１】


、

、

、

、


、及び

が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２４０】

そのようなキレート剤は、国際公開第２０２０／２２９９７４号に記載されているように、クリック化学反応を介してキレート剤をアジド標識抗原結合ドメインと反応させて１，２，３トリアゾールリンカーを形成することによって、抗原結合ドメインに共有結合して免疫コンジュゲート又は放射性免疫コンジュゲートを形成することができる。

【０２４１】

本発明のキレート剤は、本開示を考慮して当該技術分野で既知の任意の方法によって製造することができる。例えば、ペンダント芳香族／ヘテロ芳香族基は、国際公開第２０２０／２２９９７４号に例示及び記載されているものなどの当技術分野で公知の方法によって大環状環部分に結合することができる。

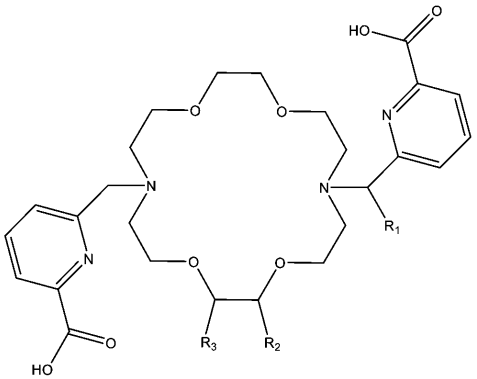
【０２４２】

式（ＩＶ）、（Ｖ）及び（ＶＩ）のキレート剤

一実施形態では、キレート剤は式（ＩＶ）

【０２４３】

【化２２】



（ＩＶ）

の化合物又はその医薬的に許容される塩（式中、

R_1は水素であり、かつ、R_2は－L_1－R_4であり、

あるいは、R_1は－L_1－R_4であり、かつ、R_2は水素であり、

Ｒ３は水素であり、
あるいは、Ｒ２及びＲ３は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員シクロアルキルを形成し、５員又は６員シクロアルキルは、－Ｌ１－Ｒ４で任意選択的に置換されており、
Ｌ１は、存在しないか、又はリンカーであり、
Ｒ４は、求核性部分、求電子性部分、又は抗原結合ドメイン（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）である）に関する。

【０２４４】

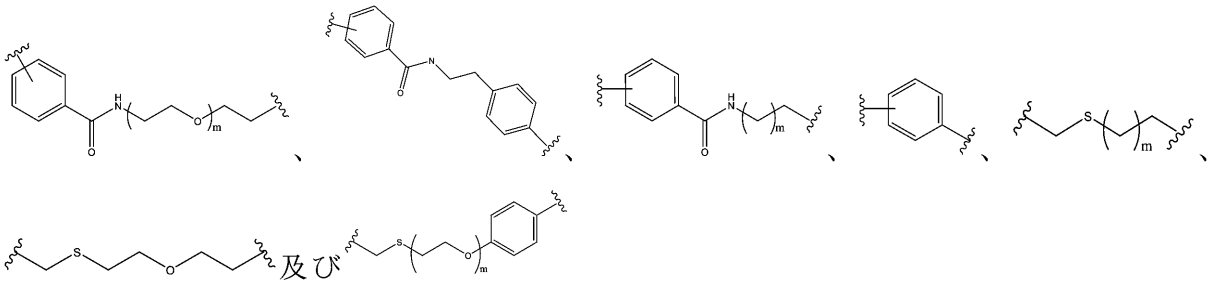
いくつかの実施形態では、Ｌ１は存在しない。Ｌ１が存在しない場合、Ｒ４は、化合物に直接結合される（例えば、共有結合を介して）。

【０２４５】

いくつかの実施形態では、Ｌ１はリンカーである。本明細書で使用される場合、「リンカー」という用語は、本発明の化合物を求核性部分、求電子性部分、又は抗原結合ドメインに結合させる化学部分を指す。本開示を考慮して、当業者に既知の任意の好適なリンカーを本発明で使用することができる。リンカーは、例えば、置換若しくは非置換アルキル、置換若しくは非置換ヘテロアルキル部分、置換若しくは非置換アリール若しくはヘテロアリール、ポリエチレングリコール（polyethylene glycol、ＰＥＧ）リンカー、ペプチドリンカー、糖ベースのリンカー、又は切断可能なリンカー、例えば、ジスルフィド結合又はプロテアーゼ切断部位、例えば、バリン－シトルリン－ｐ－アミノベンジル（p-aminobenzyl、ＰＡＢ）を有し得る。本発明での使用に好適な例示的なリンカー構造としては：

【０２４６】

【化２３】



が挙げられるがこれらに限定されず、式中、ｍは０～１２の整数である。

【０２４７】

いくつかの実施形態では、Ｒ４は、求核性部分又は求電子性部分である。「求核性部分」又は「求核基」は、化学反応において共有結合を形成するために電子対を供与する官能基を指す。「求電子性部分」又は「求電子基」は、化学反応において共有結合を形成するために電子対を受容する官能基を指す。求核基は、化学反応において、新たな共有結合を形成するために求電子基と反応し、その逆もしかりである。本発明の化合物の求核基又は求電子基を抗原結合ドメイン又は対応する反応パートナーを含む他の化学部分（例えば、リンカー）と反応させることにより、抗原結合ドメイン又は化学部分を本発明の化合物に共有結合させることが可能となる。

【０２４８】

求核基の例示的な例としては、アジド、アミン、及びチオールが挙げられるが、これらに限定されない。求電子基の例示としては、アミン反応性基、チオール反応性基、アルキニル及びシクロアルキニルが挙げられるが、これらに限定されない。アミン反応性基は、好ましくは、各ポリペプチド鎖のＮ末端及びリジン残基の側鎖に存在する第一級アミンを含む、第一級アミンと反応する。本発明での使用に好適なアミン反応性基の例としては、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（N-hydroxy succinimide、ＮＨＳ）、置換ＮＨＳ（スルホ－ＮＨＳなど）、イソチオシアネート（－ＮＣＳ）、イソシアネート（－ＮＣＯ）

、エステル、カルボン酸、ハロゲン化アシル、アミド、アルキルアミド、並びにテトラフルオロフェニルエステル及びパーフルオロフェニルエステルが挙げられるが、これらに限定されない。チオール反応性基は、チオール又はスルフヒドリルと反応し、好ましくは、ポリペプチドのシステイン残基の側鎖に存在するチオールと反応する。本発明での使用に好適なチオール反応性基の例としては、マイケル受容体（例えば、マレイミド）、ハロアセチル、ハロゲン化アシル、活性化ジスルフィド、及びフェニルオキサジアゾールスルホンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２４９】

特定の実施形態では、R_4は、－NH_2、－ＮＣＳ（イソチオシアネート）、－ＮＣＯ（イソシアネート）、－N_3（アジド）、アルキニル、シクロアルキニル、カルボン酸、エステル、アミド、アルキルアミド、マレイミド、ハロゲン化アシル、テトラジン、又はトランス－シクロオクテンであり、より具体的には、－ＮＣＳ、－ＮＣＯ、－N_3、アルキニル、シクロアルキニル、－Ｃ（Ｏ）R_{13}、－ＣＯＯR_{13}、－ＣＯＮ（R_{13}）$_2$、マレイミド、ハロゲン化アシル（例えば、－Ｃ（Ｏ）Ｃｌ、－Ｃ（Ｏ）Ｂｒ）、テトラジン、又はトランス－シクロオクテンであり、式中、各R_{13}は、独立して、水素又はアルキルである。

【０２５０】

いくつかの実施形態では、R_4は、アルキニル、シクロアルキニル又はアジド基であり、したがって、クリック化学反応を使用した抗原結合ドメイン又は他の化学的部分（例えばリンカー）への本発明の化合物の結合を可能にする。そのような実施形態では、実施することができるクリックケミストリー反応は、１，２，４－トリアゾールリンカー又は部分を形成するためのアジド（－N_3）とアルキニル基又はシクロアルキニル基との間のヒュスゲン環化付加又は１，３－双極子環化付加である。一実施形態では、本発明の化合物は、アルキニル基又はシクロアルキニル基を含み、抗原結合ドメイン又は他の化学的部分は、アジド基を含む。別の実施形態では、本発明の化合物はアジド基を含み、抗原結合ドメイン又は他の化学的部分はアルキニル又はシクロアルキニル基を含む。

【０２５１】

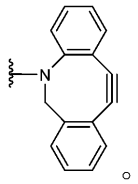
特定の実施形態では、R_4は、アルキニル基であり、より好ましくは、特に、歪み促進型アジド－アルキンシクロ環化付加（ＳＰＡＡＣ）によりアジド基と反応性である末端アルキニル基又はシクロアルキニル基である。ＳＰＡＡＣによりアジド基と反応することができるシクロアルキニル基の例としては、シクロオクチニル又はビシクロノニニル（ＢＣＮ）、ジフッ素化シクロオクチニル（ＤＩＦＯ）、ジベンゾシクロオクチニル（ＤＩＢＯ）、ケト－ＤＩＢＯ、ビアリールアザシクロオクチノニル（ＢＡＲＡＣ）、ジベンゾアザシクロオクチニル（ＤＩＢＡＣ、ＤＢＣＯ、ＡＤＩＢＯ）、ジメトキシアザシクロオクチニル（ＤＩＭＡＣ）、ジフルオロベンゾシクロオクチニル（ＤＩＦＢＯ）、モノベンゾシクロオクチニル（ＭＯＢＯ）及びテトラメトキシジベンゾシクロオクチニル（ＴＭＤＩＢＯ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２５２】

特定の実施形態では、R_4は、以下の構造を有するジベンゾアザシクロオクチニル（ＤＩＢＡＣ、ＤＢＣＯ、ＡＤＩＢＯ）である：

【０２５３】

【化２４】



。

R_4がＤＢＣＯである実施形態では、ＤＢＣＯは、直接的に又はリンカーを介して間接的に化合物に共有結合することができ、好ましくは、リンカーを介して間接的に化合物に

結合される。

【０２５４】

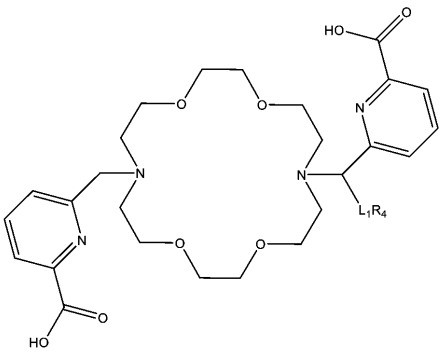
特定の実施形態では、R_4は抗原結合ドメインを含む。抗原結合ドメインは、共有結合を介して直接的に又はリンカーを介して間接的に化合物に結合することができる。好ましい実施形態では、抗原結合ドメインは、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂなどのｈＫ２に対する結合特異性を有する。

【０２５５】

別の一実施形態では、キレート剤は式（Ｖ）：

【０２５６】

【化２５】



（Ｖ）

の化合物又はその医薬的に許容される塩（式中、

L_1は、存在しないか、又はリンカーであり、

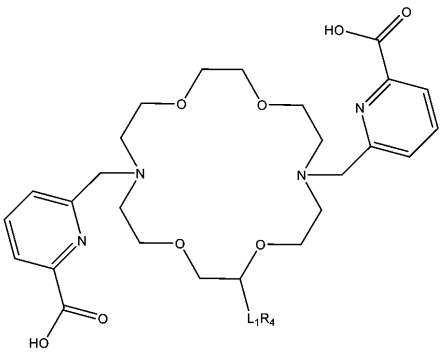
R_4は、求核性部分、求電子性部分、又は抗原結合ドメインである）に関する。

【０２５７】

別の一実施形態では、キレート剤は、式（ＶＩ）：

【０２５８】

【化２６】



（ＶＩ）

の化合物又はその医薬的に許容される塩（式中、

L_1は、存在しないか、又はリンカーであり、

R_4は、求核性部分、求電子性部分、又は抗原結合ドメイン（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）である）に関する。

【０２５９】

別の一実施形態では、本発明は、R_1が－L_1－R_4であり、R_2及びR_3は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員シクロアルキルを形成し、L_1が、存在しないか、又はリンカーであり、R_4が、求核性部分、求電子性部分、又は抗原結合ドメインであり；又はその医薬的に許容される塩に関する。

【０２６０】

更なる一実施形態では、本発明は、R_1がＨであり、R_2及びR_3は、それらが結合し

ている炭素原子と一緒になって、－Ｌ$_1$－Ｒ$_4$で置換されている５員又は６員のシクロアルキルを形成し、Ｌ$_1$が、存在しないか、又はリンカーであり、Ｒ$_4$が、求核性部分、求電子性部分、又は抗原結合ドメインであり；化合物、又はその医薬的に許容される塩に関する。

【０２６１】

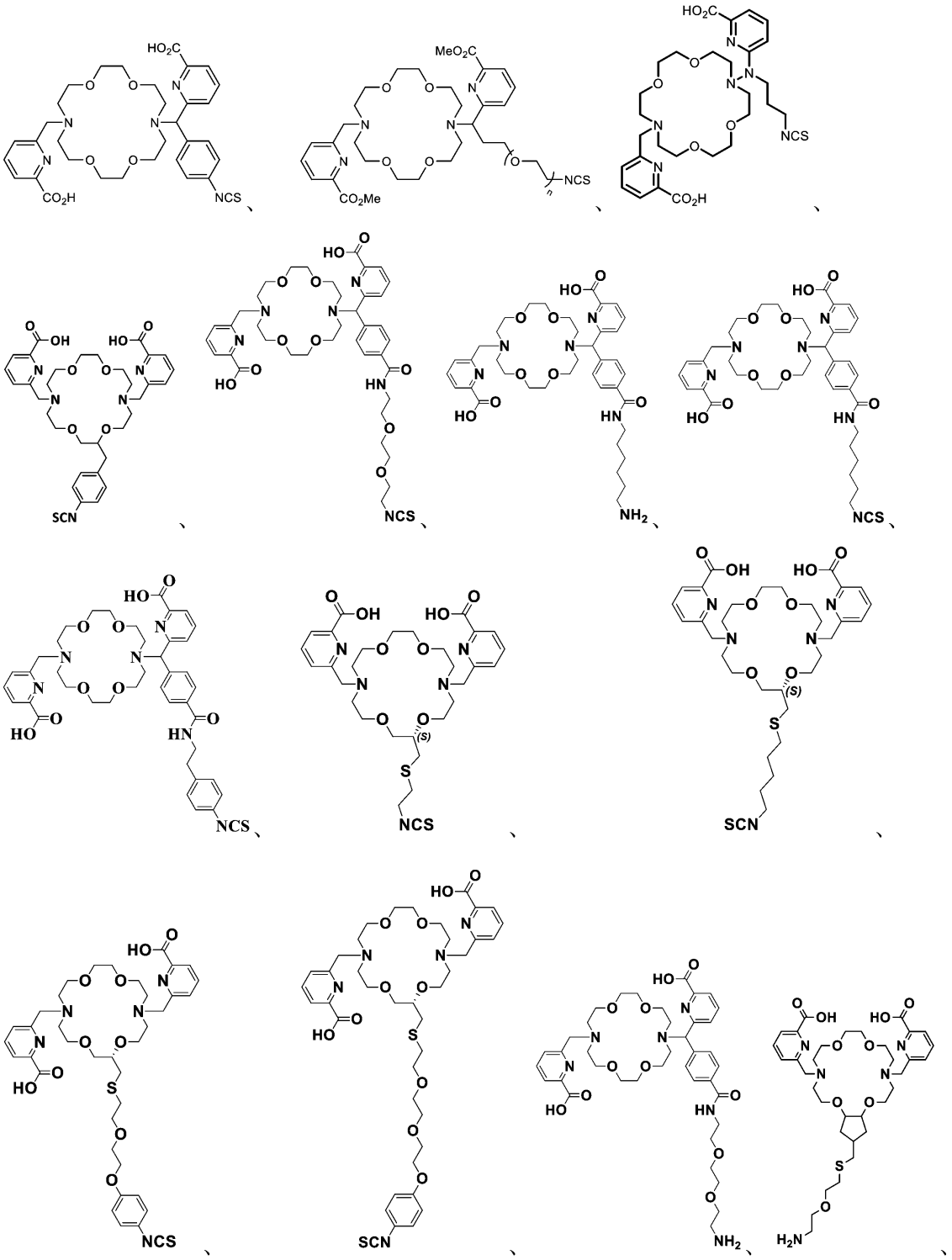
更なる実施形態は、Ｒ$_4$が抗原結合ドメインであるものを含む。好ましい実施形態によれば、Ｒ$_4$は、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂなどの、ｈＫ２に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む。

【０２６２】

一実施形態では、本発明の化合物は：

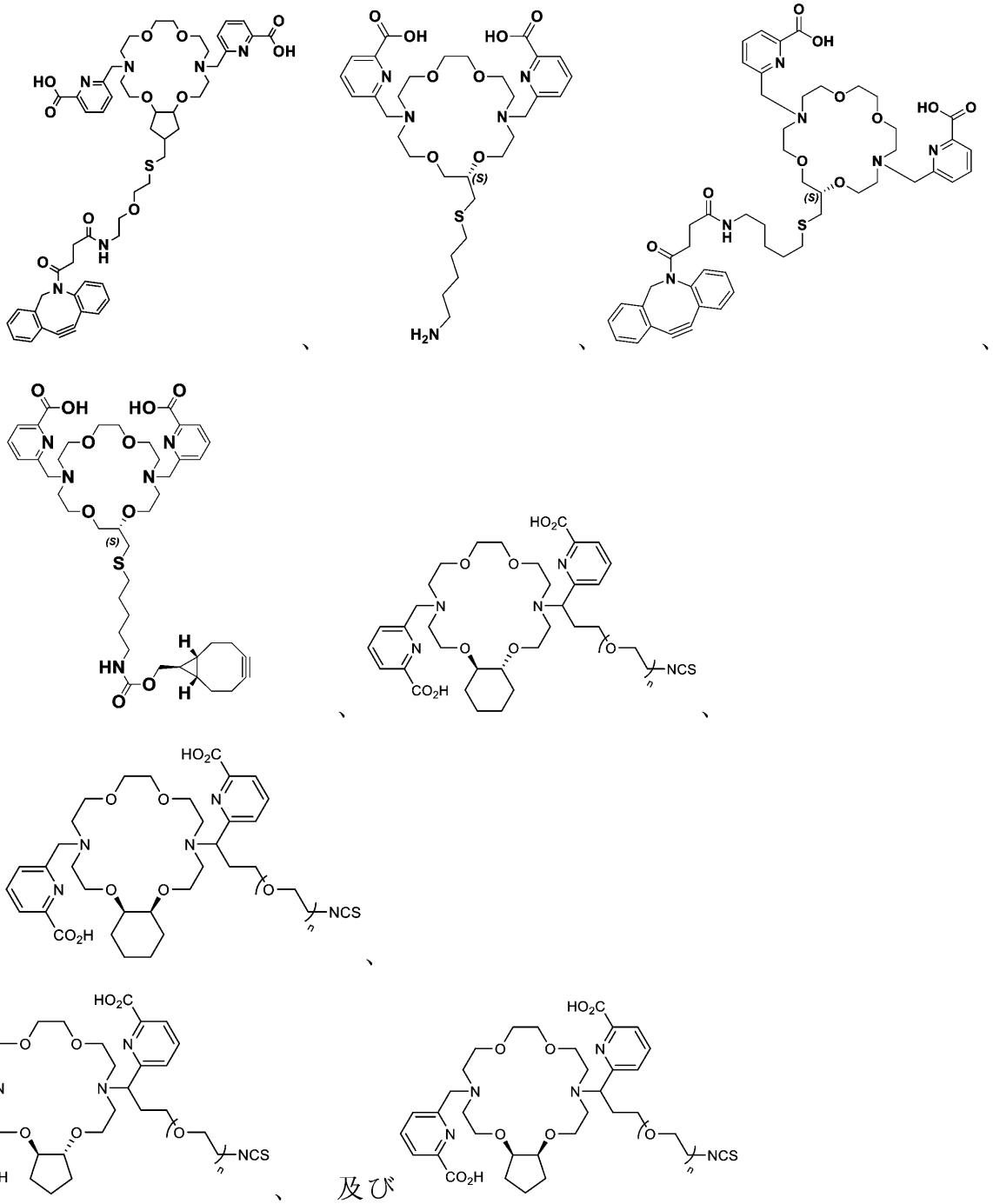
【０２６３】

【化２７】



【０２６４】

【化２８】



からなる群から独立して選択される任意の１つ又は２つ以上の化合物であり、式中、ｎは１～１０である。

【０２６５】

当該キレート剤は、例えば国際公開第２０２０／２２９９７４号に記載されているクリック化学反応を介して、化合物をアジド標識抗原結合ドメインと反応させて１，２，３－トリアゾールリンカーを形成することによって、抗原結合ドメイン（例えば、ＫＬ　２Ｂ　３０のＦａｂ）に共有結合して、免疫コンジュゲート又は放射性免疫コンジュゲートを形成することができる。

【０２６６】

本発明のキレート剤、放射性金属錯体及び放射性免疫コンジュゲートは、本開示を考慮して当技術分野で公知の任意の方法によって製造することができる。例えば、ペンダント芳香族／ヘテロ芳香族基は、国際公開第２０２０／２２９９７４号に例示及び記載されて

いるものなどの当技術分野で公知の方法によって大環状環部分に結合することができる。

【０２６７】

放射性金属錯体

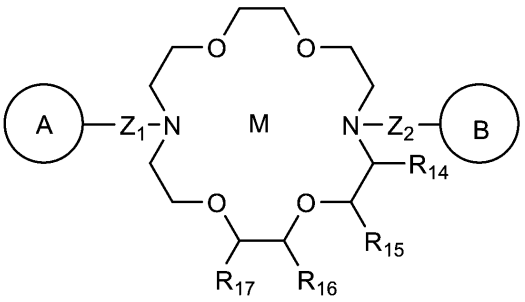
別の一般的な態様では、本発明は、配位結合により本発明のキレート剤に配位された放射性金属イオンを含む放射性金属錯体に関する。本明細書に記載される本発明のキレート剤のいずれも、放射性金属イオンを含むことができる。好ましくは、放射性金属イオンは、α線放出放射性金属イオン、より好ましくは^{225}Ａｃである。本発明のキレート剤は、金属不純物に関係なく、任意の比活性で放射性金属イオン、特に^{225}を強固にキレート化することができ、したがってインビボ及びインビトロで高いキレート化安定性を有し、負荷剤（ｃｈａｌｌｅｎｇｅａｇｅｎｔ）、例えばジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）に対して安定な放射性金属錯体を形成する。

【０２６８】

本発明の実施形態によれば、放射性金属錯体は、式（Ｉ－ｍ）の構造を有し：

【０２６９】

【化２９】



式中、可変基は、本発明のキレート剤、例えば、式（Ｉ）のキレート剤において上記で定義したとおりであり、Ｍは、放射性金属イオンである。放射性金属イオンＭは、配位結合によりキレート剤に結合して、放射性金属錯体を形成する。キレート剤の大環状環のヘテロ原子並びにペンダントアームの任意の官能基（すなわち、－Ｚ$_1$環Ａ及び／又は－Ｚ$_2$環Ｂ）は、放射性金属イオンの配位結合に関与することができる。

【０２７０】

上記の式（Ｉ）のキレート剤のいずれかを使用して、式（Ｉ－ｍ）の放射性金属錯体を形成することができる。

【０２７１】

特定の実施形態では、放射性金属イオンＭは、アルファ放出放射性金属イオンである。好ましくは、アルファ放出放射性金属イオンは^{225}Ａｃである。

【０２７２】

本発明の実施形態によれば、放射性金属錯体は、少なくとも１個のＸ基を含み、Ｘは－Ｌ$_1$－Ｒ$_{11}$であり、Ｌ$_1$は存在しないか、又はリンカーであり、Ｒ$_{11}$は求電子性部分又は求核性部分であるか、又はＲ$_{11}$は抗原結合ドメイン（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）を含む。Ｒ$_{11}$が求核性又は求電子性部分である場合、そのような部分は、放射性金属錯体を抗原結合ドメインに直接又はリンカーを介して間接的に結合させるために使用することができる。

【０２７３】

特定の実施形態では、放射性金属は１つのＸ基を含み、好ましくはＸ基のＬ$_1$はリンカーである。

【０２７４】

特定の実施形態では、Ｒ$_{11}$は、－ＮＨ$_2$、－ＮＣＳ（イソチオシアネート）、－ＮＣＯ（イソシアネート）、－Ｎ$_3$（アジド）、アルキニル、シクロアルキニル、カルボン酸、エステル、アミド、アルキルアミド、マレイミド、ハロゲン化アシル、テトラジン、又はトランス－シクロオクテンであり、より具体的には、－ＮＣＳ、－ＮＣＯ、－Ｎ$_3$、ア

ルキニル、シクロアルキニル、－Ｃ（Ｏ）Ｒ$_{13}$、－ＣＯＯＲ$_{13}$、－ＣＯＮ（Ｒ$_{13}$）$_2$、マレイミド、ハロゲン化アシル（例えば、－Ｃ（Ｏ）Ｃｌ、－Ｃ（Ｏ）Ｂｒ）、テトラジン、又はトランス－シクロオクテンであり、式中、各Ｒ$_{13}$は、独立して、水素又はアルキルである。

【０２７５】

いくつかの実施形態では、Ｒ$_{11}$は、アルキニル、シクロアルキニル又はアジド基であり、したがってクリック化学反応を使用して抗原結合ドメイン又は他の化学的部分（例えばリンカー）へのキレート剤の結合を可能にする。

【０２７６】

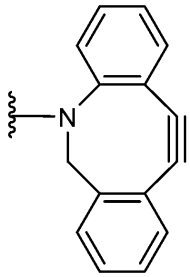
特定の実施形態では、Ｒ$_{11}$は、アルキニル基であり、より好ましくは、特に、歪み促進型アジド－アルキンシクロ環化付加（ＳＰＡＡＣ）によりアジド基と反応性である末端アルキニル基又はシクロアルキニル基である。ＳＰＡＡＣによりアジド基と反応することができるシクロアルキニル基の例としては、シクロオクチニル、又はビシクロノニニル（ＢＣＮ）、ジフッ素化シクロオクチニル（ＤＩＦＯ）、ジベンゾシクロオクチニル（ＤＩＢＯ）、ケト－ＤＩＢＯ、ビアリールアザシクロオクチノニル（ＢＡＲＡＣ）、ジベンゾアザシクロオクチニル（ＤＩＢＡＣ、ＤＢＣＯ、ＡＤＩＢＯ）、ジメトキシアザシクロオクチニル（ＤＩＭＡＣ）、ジフルオロベンゾシクロオクチニル（ＤＩＦＢＯ）、モノベンゾシクロオクチニル（ＭＯＢＯ）及びテトラメトキシジベンゾシクロオクチニル（ＴＭＤＩＢＯ）からなる群から選択されるシクロオクチニル誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２７７】

特定の実施形態では、Ｒ$_{11}$は、以下の構造を有するジベンゾアザシクロオクチニル（ＤＩＢＡＣ、ＤＢＣＯ、ＡＤＩＢＯ）である：

【０２７８】

【化３０】



【０２７９】

Ｒ$_{11}$がＤＢＣＯであるそのような実施形態では、ＤＢＣＯは、直接的又はリンカーを介して間接的にキレート剤に共有結合することができ、好ましくは、リンカーを介して間接的にキレート剤に結合する。

【０２８０】

別の特定の実施形態では、Ｒ$_{11}$は、ビシクロノニニル（ＢＣＮ）である。

【０２８１】

本発明の実施形態によれば、環Ａ及び環Ｂの各々は、独立して、６～１０員のアリール又は５～１０員のヘテロアリールである。代替的な実施形態では、環Ａ及び環Ｂの各々は、任意選択で置換されたヘテロシクリル環、例えば、オキサゾリンであることが企図される。環Ａ及び環Ｂの各々は、ハロ、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、－ＯＲ$_{13}$、－ＳＲ$_{13}$、－（ＣＨ$_2$）$_p$ＣＯＯＲ$_{13}$、－ＯＣ（Ｏ）Ｒ$_{13}$、－Ｎ（Ｒ$_{13}$）$_2$、－ＣＯＮ（Ｒ$_{13}$）$_2$、－ＮＯ$_2$、－ＣＮ－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ$_{13}$）$_2$及びＸからなる群から独立して選択される１つ以上の置換基で場合により、独立して置換することができる。この目的に適した６～１０員アリール基の例としては、フェニル及びナフチルが挙げられるが、これらに限定されない。この目的に好適な５～１０員のヘテロアリール基の例としては、ピリジニル、イ

ソチアゾリル、イソオキサゾリル及びイミダゾリルが挙げられるが、これらに限定されない。５～１０員のヘテロアリール基及び６～１０員のアリール基の適切な置換基の例としては、－ＣＯＯＨ、テトラゾリル及び－ＣＨ$_2$ＣＯＯＨが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２８２】

特定の実施形態では、環Ａ及び環Ｂの各々は、独立して、場合により、－ＣＯＯＨ及び－ＣＨ$_2$ＣＯＯＨであるが、これらに限定されない１つ以上のカルボキシル基で置換されている。

【０２８３】

一実施形態では、環Ａ及び環Ｂは同じであり、例えば、環Ａ及び環Ｂの両方がピリジニルである。別の実施形態では、環Ａ及び環Ｂは異なり、例えば、環Ａ及び環のうちの１つがピリジニルであり、他方がフェニルである。

【０２８４】

特定の実施形態では、環Ａ及び環Ｂの両方は、－ＣＯＯＨで置換されたピリジニルである。

【０２８５】

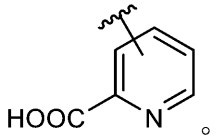
特定の実施形態では、環Ａ及び環Ｂの両方は、テトラゾリルで置換されたピリジニルである。

【０２８６】

別の特定の実施形態では、環Ａ及び環Ｂの両方は、以下の構造を有するピコリン酸基である：

【０２８７】

【化３１】



。

【０２８８】

本発明の実施形態によれば、Ｚ$_1$及びＺ$_2$の各々は独立して、－（Ｃ（Ｒ$_{12}$）$_2$）$_m$又は－（ＣＨ$_2$）$_n$－Ｃ（Ｒ$_{12}$）（Ｘ）－（ＣＨ$_2$）$_n$－であり；各Ｘは独立して、－Ｌ$_1$－Ｒ$_{11}$であり；各ｎは、独立して、０、１、２、３、４、又は５であり、各ｍは、独立して、１、２、３、４、又は５である。

【０２８９】

いくつかの実施形態では、Ｚ$_1$及びＺ$_2$は両方とも－（ＣＨ$_2$）$_m$－であり、各ｍは好ましくは１である。そのような実施形態では、大員環、環Ａ又は環Ｂの炭素原子は、Ｘ基で置換される。

【０２９０】

いくつかの実施形態では、Ｚ$_1$及びＺ$_2$の一方は、－（ＣＨ$_2$）$_n$－Ｃ（Ｒ$_{12}$）（Ｘ）－（ＣＨ$_2$）$_n$－であり、他方は、－（ＣＨ$_2$）$_m$－である。

【０２９１】

いくつかの実施形態では、Ｚ$_1$及びＺ$_2$－（ＣＨ$_2$）$_n$－Ｃ（Ｒ$_{12}$）（Ｘ）－（ＣＨ$_2$）$_n$－であり、他方は、－（ＣＨ$_2$）$_m$－であり；各ｎは、０であり、ｍは、１であり；Ｘは－Ｌ$_1$－Ｒ$_{11}$であり；Ｌ$_1$はリンカーである。

【０２９２】

いくつかの実施形態では、Ｚ$_1$及びＺ$_2$の両方は、－（ＣＨ$_2$）$_m$－であり；各ｍは独立して０、１、２、３、４又は５であり、好ましくは各ｍは１であり；Ｒ$_{14}$、Ｒ$_{15}$、Ｒ$_{16}$及びＲ$_{17}$の１つはＸであり、Ｒ$_{14}$、Ｒ$_{15}$、Ｒ$_{16}$及びＲ$_{17}$の残りはそれぞれ水素である。

【０２９３】

いくつかの実施形態では、R_{14}及びR_{15}は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員のシクロアルキル環（例えば、シクロペンチル又はシクロヘキシル）を形成する。そのような５員又は６員のシクロアルキル環は、Ｘ基で置換することができる。

【０２９４】

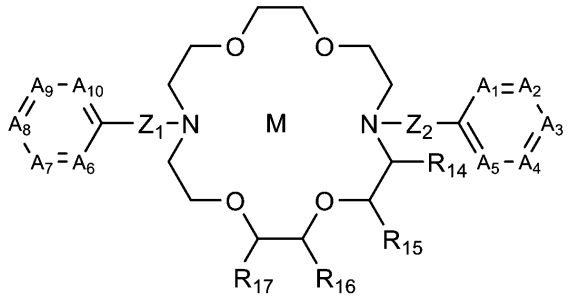
いくつかの実施形態では、R_{16}及びR_{17}は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員のシクロアルキル環（例えば、シクロペンチル又はシクロヘキシル）を形成する。そのような５員又は６員のシクロアルキル環は、Ｘ基で置換することができる。

【０２９５】

特定の実施形態では、放射性金属錯体は、式（ＩＩ－ｍ）の構造を有し：

【０２９６】

【化３２】



（ＩＩ－ｍ）

式中、可変基は、本発明のキレート剤、例えば、式（ＩＩ）のキレート剤において上記で定義したとおりであり、Ｍは、放射性金属イオン、好ましくはα線放出放射性金属イオン、より好ましくは^{225}Ａｃである。

【０２９７】

上記の式（ＩＩ）のキレート剤のいずれかを使用して、式（ＩＩ－ｍ）の放射性金属錯体を形成することができる。

【０２９８】

いくつかの実施形態では、A_1、A_2、A_3、A_4、及びA_5の１つは窒素であり、A_1、A_2、A_3、A_4、及びA_5の１つは－ＣＯＯＨで置換された炭素であり、残りはＣＨである、すなわち、カルボン酸で置換されたピリジニル環を形成する。

【０２９９】

いくつかの実施形態では、A_6、A_7、A_8、A_9及びA_{10}のうちの１つは窒素であり、A_6、A_7、A_8、A_9及びA_{10}の１つは－ＣＯＯＨで置換された炭素であり、残りはＣＨである、すなわち、カルボン酸で置換されたピリジニル環を形成する。

【０３００】

一実施形態では、R_1、R_2、R_3、R_4及びR_5の少なくとも１つは－ＣＯＯＨである。一実施形態では、R_6、R_7、R_8、R_9及びR_{10}の少なくとも１つは－ＣＯＯＨである。別の実施形態では、R_1、R_2、R_3、R_4及びR_5の少なくとも１つは－ＣＯＯＨであり；R_6，R_7、R_8、R_9及びR_{10}の少なくとも１つは－ＣＯＯＨである。

【０３０１】

いくつかの実施形態では、A_1及びA_{10}の各々は窒素である。A_2はCR_2であり、R_2は－ＣＯＯＨであり；

A_9はCR_9であり、R_9は－ＣＯＯＨであり；A_3～A_8の各々は、それぞれ、CR_2、CR_3、CR_4、CR_5、CR_6、CR_7、及びCR_8であり；R_3～R_8の各々は、水素である。

【０３０２】

一実施形態では、R_1、R_2、R_3、R_4及びR_5の少なくとも１つはテトラゾリルで

ある。一実施形態では、R_6、R_7、R_8、R_9及びR_{10}の少なくとも１つはテトラゾリルである。別の実施形態では、R_1、R_2、R_3、R_4及びR_5の少なくとも１つはテトラゾリルであり；R_6，R_7、R_8、R_9及びR_{10}の少なくとも１つはテトラゾリルである。

【０３０３】

いくつかの実施形態では、各R_{12}は、水素である。

【０３０４】

いくつかの実施形態では、R_{11}は、アルキニル基又はシクロアルキニル基、好ましくはシクロオクチニル又はシクロオクチニル誘導体、例えばＤＢＣＯである。

【０３０５】

式（ＩＩ－ｍ）の放射性金属錯体の特定の実施形態では、

Ｍは^{225}Ａｃであり；

A_1及びA_{10}の各々は窒素であり；

A_2はCR_2であり、R_2は－ＣＯＯＨであり；

A_9はCR_9であり、R_9は－ＣＯＯＨであり；

A_3～A_8の各々は、それぞれ、CR_2、CR_3、CR_4、CR_5、CR_6、CR_7、及びCR_8であり

R_3～R_8の各々は水素であり；

Z_1及びZ_2の一方が－（CH_2）$_m$であり、Z_1及びZ_2の他方が－（CH_2）$_n$－Ｃ（R_{12}）（Ｘ）－（CH_2）$_n$－であり；

R_{12}は水素であり；

ｍは、１であり；

各ｎは、０であり；

Ｘは－L_1－R_{11}であり、L_1はリンカーであり、－R_{11}は求電子基、例えば、シクロオクチニル又はＤＢＣＯなどのシクロオクチニル誘導体であり；

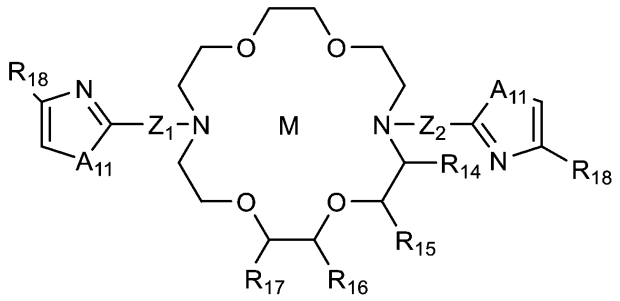
R_{14}及びR_{17}の各々は水素であり、あるいは、R_{16}及びR_{17}は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員シクロアルキルを形成する。

【０３０６】

特定の実施形態では、放射性金属錯体は、式（ＩＩＩ－ｍ）の構造を有し：

【０３０７】

【化３３】



（ＩＩＩ－ｍ）

式中、可変基は、本発明のキレート剤、例えば、式（ＩＩＩ）のキレート剤において上記で定義したとおりであり、Ｍは、放射性金属イオン、好ましくはα線放出放射性金属イオン、より好ましくは^{225}Ａｃである。

【０３０８】

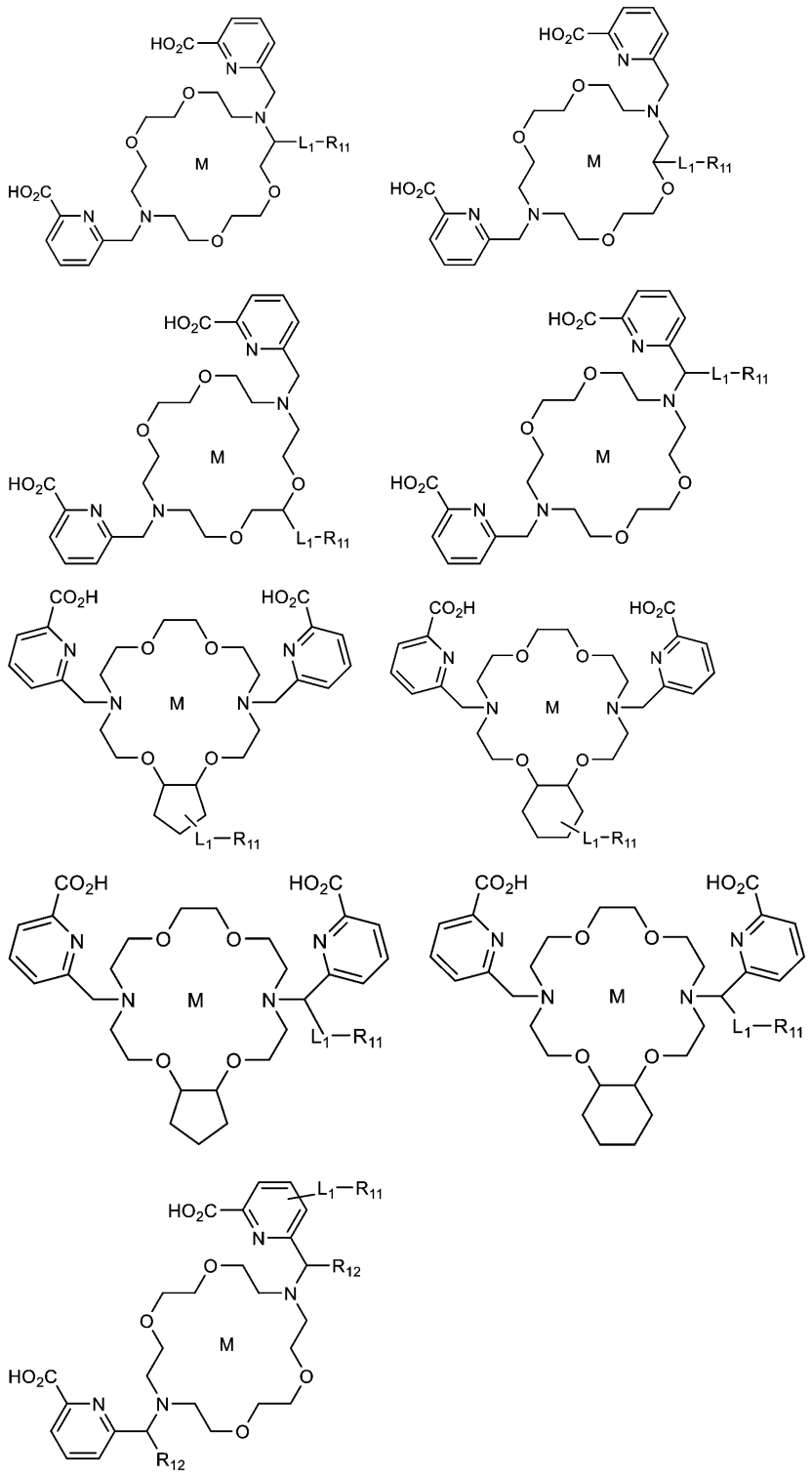
上記の式（ＩＩＩ）のキレート剤のいずれかを使用して、式（ＩＩＩ－ｍ）の放射性金属錯体を形成することができる。

【０３０９】

いくつかの実施形態では、各A_{11}は同じであり、各A_{11}は、Ｏ、Ｓ、ＮＭｅ又はＮＨである。例えば、各A_{11}は、Ｓであり得る。他の実施形態では、各A_{11}は異なって

おり、各々が、独立して、Ｏ、Ｓ、ＮＭｅ及びＮＨから選択される。
【０３１０】
いくつかの実施形態では、各R_{18}は独立して、－（CH_2）$_p$－ＣＯＯR_{13}であり、R_{13}は水素であり、各ｐは独立して、０又は１である。
【０３１１】
いくつかの実施形態では、各R_{18}は、－ＣＯＯＨである。
【０３１２】
いくつかの実施形態では、各R_{18}は、－CH_2ＣＯＯＨである。
【０３１３】
いくつかの実施形態では、各R_{18}はテトラゾリルである。
【０３１４】
式（ＩＩＩ－ｍ）の放射性金属錯体の特定の実施形態では、
各R_{18}はＣＯＯＨであり；
Z_1及びZ_2の一方が－（CH_2）$_m$であり、Z_1及びZ_2の他方が－（CH_2）$_n$－Ｃ（R_{12}）（Ｘ）－（CH_2）$_n$－であり；
R_{12}は水素であり、
ｍは、１であり；各ｎは、０であり、
Ｘは－L_1－R_{11}であり、L_1はリンカーであり、－R_{11}は求電子基、例えば、シクロオクチニル又はＤＢＣＯなどのシクロオクチニル誘導体であり；
R_{14}及びR_{17}の各々は水素であり、あるいは、R_{16}及びR_{17}は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員シクロアルキルを形成する。
【０３１５】
本発明の特定の実施形態では、放射性金属錯体は、以下の構造のうちの１つを有し：
【０３１６】

【化３４】



式中、

Ｍはアクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）であり、L_1は存在しないか、又はリンカーであり；

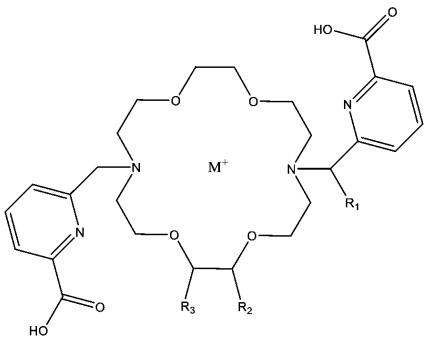
R_{11}は求核性部分若しくは求電子性部分であるか、又はR_{11}は抗原結合ドメイン（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）を含み；及び

各R_{12}は、独立して、水素、－CH_3、又は－CH_2CH_3であるが、ただし、少なくとも１つのR_{12}は、－CH_3又は－CH_2CH_3である。

【０３１７】

特定の実施形態では、本発明は、式（ＩＶ－ｍ）の放射性金属錯体構造体：

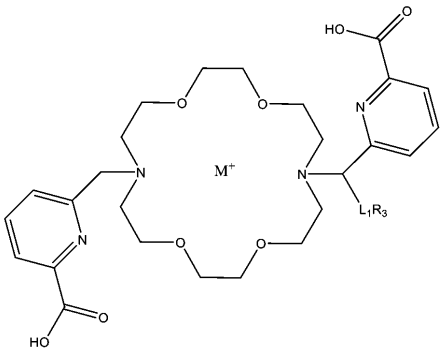
【０３１８】
【化３５】



（ＩＶ－ｍ）

（式中、
Ｍ$^{+}$は放射性金属イオンであり、Ｍ$^{+}$は、アクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）、ラジウム２２３（^{233}Ｒａ）、ビスマス２１３（^{213}Ｂｉ）、鉛２１２（^{212}Ｐｂ（ＩＩ）及び／又は^{212}Ｐｂ（ＩＶ））、テルビウム１４９（^{149}Ｔｂ）、テルビウム１５２（^{152}Ｔｂ）、テルビウム１５５（^{155}Ｔｂ）、フェルミウム２５５（^{255}Ｆｍ）、トリウム２２７（^{227}Ｔｈ）、トリウム２２６（^{226}Ｔｈ$^{4+}$）、アスタチン２１１（^{211}Ａｔ）、セリウム１３４（^{134}Ｃｅ）、ネオジム１４４（^{144}Ｎｄ）、ランタン１３２（^{132}Ｌａ）、ランタン１３５（^{135}Ｌａ）、及びウラン２３０（^{230}Ｕ）からなる群から選択され、
Ｒ$_{1}$は水素であり、かつ、Ｒ$_{2}$は－Ｌ$_{1}$－Ｒ$_{4}$であり、
あるいは、Ｒ$_{1}$は－Ｌ$_{1}$－Ｒ$_{4}$であり、かつ、Ｒ$_{2}$は水素であり、
Ｒ$_{3}$は水素であり、
あるいは、Ｒ$_{2}$及びＲ$_{3}$は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員シクロアルキルを形成し、５員又は６員シクロアルキルは、－Ｌ$_{1}$－Ｒ$_{4}$で任意選択的に置換されており、
Ｌ$_{1}$は、存在しないか、又はリンカーであり、
Ｒ$_{4}$は、求核性部分、求電子性部分、又は抗原結合ドメイン（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）である）又はその医薬的に許容される塩に関する。

【０３１９】
別の一実施形態では、本発明は、式（Ｖ－ｍ）の放射性金属錯体：
【０３２０】
【化３６】



（Ｖ－ｍ）

（式中、
Ｍ$^{+}$は放射性金属イオンであり、Ｍ$^{+}$は、アクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）、ラジウム２２３（^{233}Ｒａ）、ビスマス２１３（^{213}Ｂｉ）、鉛２１２（^{212}Ｐｂ（ＩＩ）及び／又は^{212}Ｐｂ（ＩＶ））、テルビウム１４９（^{149}Ｔｂ）、テルビウム１５２（^{152}Ｔｂ）、テルビウム１５５（^{155}Ｔｂ）、フェルミウム２５５（^{255}Ｆｍ）、

トリウム２２７（^{227}Ｔｈ）、トリウム２２６（^{226}Ｔｈ$^{4+}$）、アスタチン２１１（^{211}Ａｔ）、セリウム１３４（^{134}Ｃｅ）、ネオジム１４４（^{144}Ｎｄ）、ランタン１３２（^{132}Ｌａ）、ランタン１３５（^{135}Ｌａ）、及びウラン２３０（^{230}Ｕ）からなる群から選択され、

L_1は、存在しないか、又はリンカーであり、

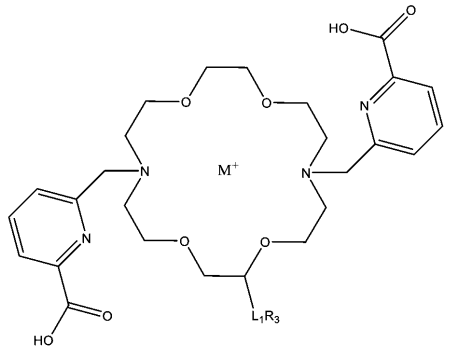
R_4は、求核性部分、求電子性部分、又は抗原結合ドメイン（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）である）又はその医薬的に許容される塩に関する。

【０３２１】

別の実施形態では、本発明は、式（ＶＩ－ｍ）の化合物：

【０３２２】

【化３７】



（ＶＩ－ｍ）

（式中、

M^+は放射性金属イオンであり、M^+は、アクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）、ラジウム２２３（^{233}Ｒａ）、ビスマス２１３（^{213}Ｂｉ）、鉛２１２（^{212}Ｐｂ（ＩＩ）及び／又は^{212}Ｐｂ（ＩＶ））、テルビウム１４９（^{149}Ｔｂ）、テルビウム１５２（^{152}Ｔｂ）、テルビウム１５５（^{155}Ｔｂ）、フェルミウム２５５（^{255}Ｆｍ）、トリウム２２７（^{227}Ｔｈ）、トリウム２２６（^{226}Ｔｈ$^{4+}$）、アスタチン２１１（^{211}Ａｔ）、セリウム１３４（^{134}Ｃｅ）、ネオジム１４４（^{144}Ｎｄ）、ランタン１３２（^{132}Ｌａ）、ランタン１３５（^{135}Ｌａ）、及びウラン２３０（^{230}Ｕ）からなる群から選択され、L_1は、存在しないか、又はリンカーであり、

R_4は、求核性部分、求電子性部分、又は抗原結合ドメイン（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）である）又はその医薬的に許容される塩に関する。

【０３２３】

別の実施形態では、本発明は、式中、

M^+は放射性金属イオンであり、M^+は、アクチニウム２２５（^{225}Ａｃ）、ラジウム２２３（^{233}Ｒａ）、ビスマス２１３（^{213}Ｂｉ）、鉛２１２（^{212}Ｐｂ（ＩＩ）及び／又は^{212}Ｐｂ（ＩＶ））、テルビウム１４９（^{149}Ｔｂ）、テルビウム１５２（^{152}Ｔｂ）、テルビウム１５５（^{155}Ｔｂ）、フェルミウム２５５（^{255}Ｆｍ）、トリウム２２７（^{227}Ｔｈ）、トリウム２２６（^{226}Ｔｈ$^{4+}$）、アスタチン２１１（^{211}Ａｔ）、セリウム１３４（^{134}Ｃｅ）、ネオジム１４４（^{144}Ｎｄ）、ランタン１３２（^{132}Ｌａ）、ランタン１３５（^{135}Ｌａ）、及びウラン２３０（^{230}Ｕ）からなる群から選択され、R_1は－L_1－R_4であり、

R_2及びR_3は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、５員又は６員シクロアルキルを形成し、

L_1は、存在しないか、又はリンカーであり、

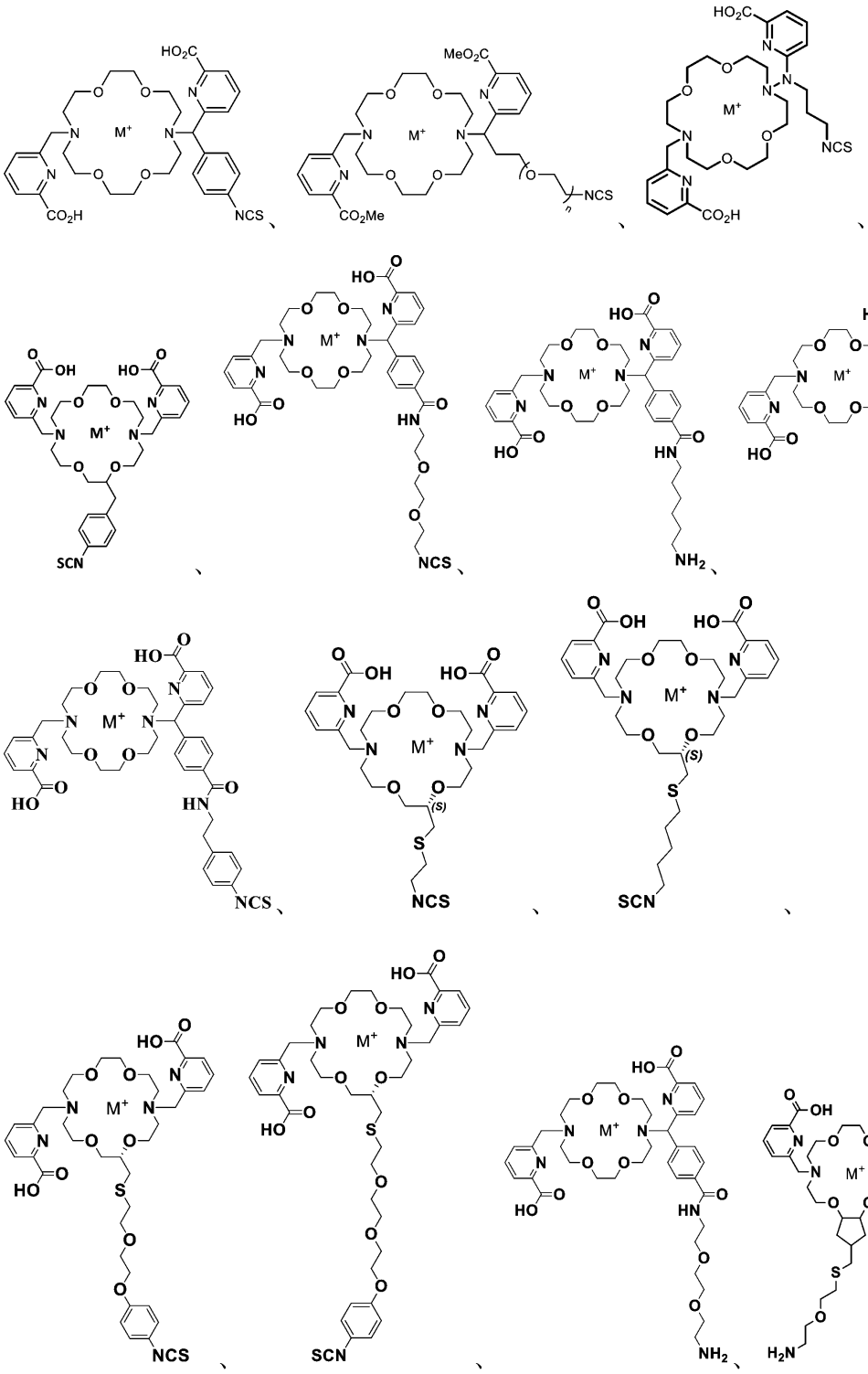
R_4は、求核性部分、求電子性部分、又は抗原結合ドメイン（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）である、

放射性金属錯体、又はその医薬的に許容される塩に関する。

【０３２４】

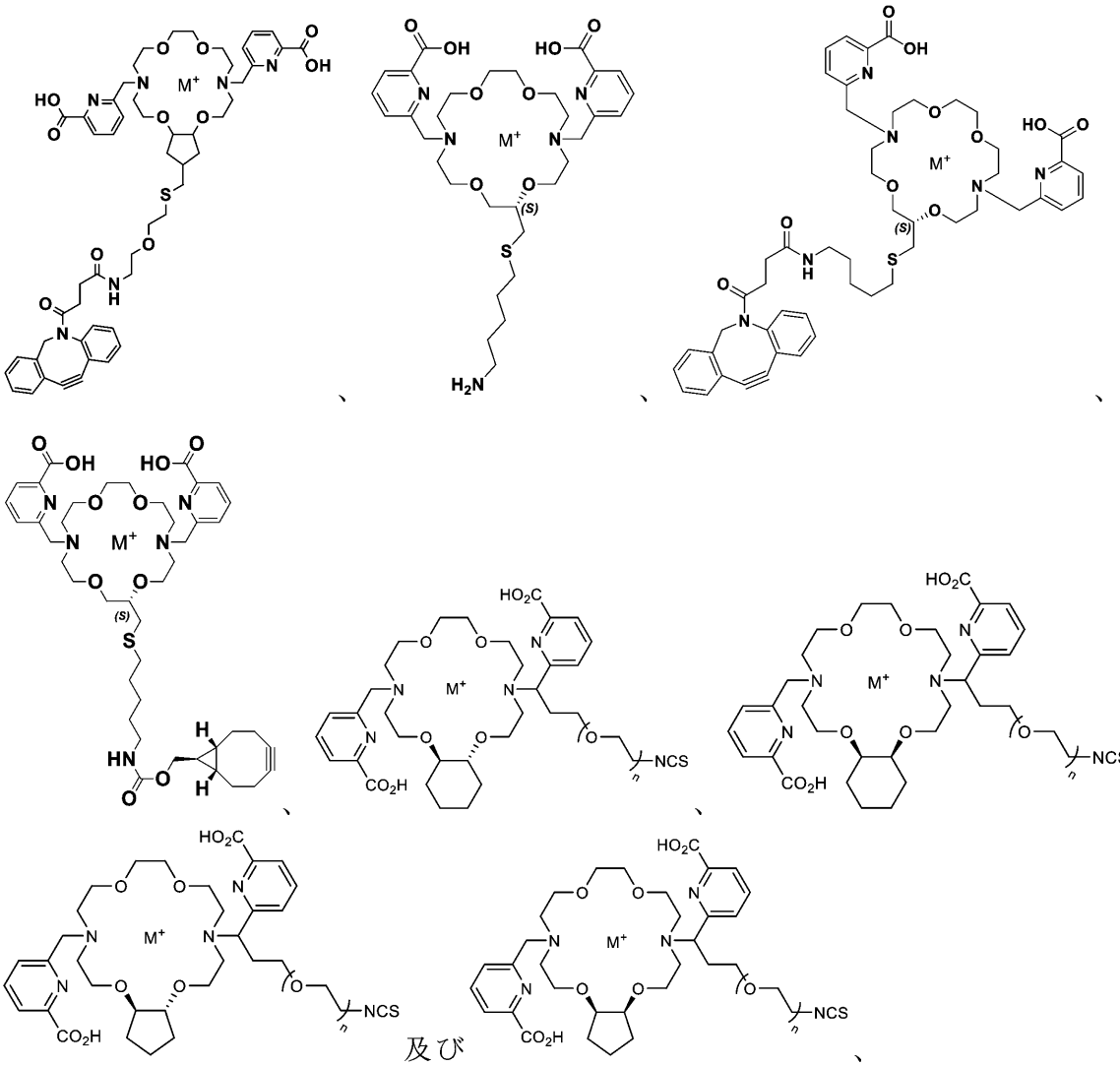
更なる一実施形態では、本発明は、式中、
M^+は放射性金属イオンであり、M^+は、アクチニウム２２５（^{225}Ac）、ラジウム２２３（^{233}Ra）、ビスマス２１３（^{213}Bi）、鉛２１２（^{212}Pb（ＩＩ）及び／又は^{212}Pb（ＩＶ））、テルビウム１４９（^{149}Tb）、テルビウム１５２（^{152}Tb）、テルビウム１５５（^{155}Tb）、フェルミウム２５５（^{255}Fm）、トリウム２２７（^{227}Th）、トリウム２２６（$^{226}Th^{4+}$）、アスタチン２１１（^{211}At）、セリウム１３４（^{134}Ce）、ネオジム１４４（^{144}Nd）、ランタン１３２（^{132}La）、ランタン１３５（^{135}La）、及びウラン２３０（^{230}U）からなる群から選択され、R_1は、Ｈであり、
R_2及びR_3は、それらが結合している炭素原子と一緒になって、$-L_1-R_4$で置換されている５員又は６員のシクロアルキルを形成し、
L_1は、存在しないか、又はリンカーであり、
R_4は、求核性部分、求電子性部分、又は抗原結合ドメイン（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）であり；
放射性金属錯体、又はその医薬的に許容される塩に関する。
【０３２５】
特定の実施形態では、本発明は：
【０３２６】

【化３８】



【０３２７】

【化３９】



からなる群から選択される任意の１つ又は２つ以上の放射性金属錯体を目的とし、式中、ｎは１～１０であり、M^+は放射性金属イオンであり、M^+は、アクチニウム２２５（^{225}Ac）、ラジウム２２３（^{233}Ra）、ビスマス２１３（^{213}Bi）、鉛２１２（^{212}Pb（ＩＩ）及び／又は^{212}Pb（ＩＶ））、テルビウム１４９（^{149}Tb）、テルビウム１５２（^{152}Tb）、テルビウム１５５（^{155}Tb）、フェルミウム２５５（^{255}Fm）、トリウム２２７（^{227}Th）、トリウム２２６（$^{226}Th^{4+}$）、アスタチン２１１（^{211}At）、セリウム１３４（^{134}Ce）、ネオジム１４４（^{144}Nd）、ランタン１３２（^{132}La）、ランタン１３５（^{135}La）、及びウラン２３０（^{230}U）からなる群から選択される。

【０３２８】

放射性金属錯体は、本開示を考慮して当該技術分野で既知の任意の方法によって製造することができる。例えば、本発明のキレート剤を、放射性金属イオンと混合することができ、混合物をインキュベートして、放射性金属錯体を形成することができる。例示的な実施形態では、化合物を$^{225}Ac(NO_3)_3$の溶液と混合して、配位結合を介してキレート剤に結合した^{225}Acを含む放射性錯体が形成される。上記のように、本発明のキレート剤は、放射性金属、特に^{225}Acを効率的にキレート化する。したがって、特定の実施形態では、本発明のキレート剤は、１：１０００、１：５００、１：４００、１：３００、１：２００、１：１００、１：５０、１：１０、又は１：５、好ましくは１：５～１：２００、より好ましくは１：５～１：１００の、本発明のキレート剤と^{225}Acイオンとの濃度比で、^{225}Acイオンの溶液と混合される。したがって、いくつかの実

施形態では、本発明のキレート剤と、放射性金属錯体を形成するために使用することができる^{225}Ａｃとの比は、他の既知の^{225}Ａｃキレート剤（例えば、ＤＯＴＡ）で達成できる比よりもはるかに低い。この放射性錯体は、インスタント薄層クロマトグラフィー（例えば、ｉＴＬＣ－ＳＧ）、ＨＰＬＣ、ＬＣ－ＭＳなどによって特徴付けることができる。例示的な方法は、例えば国際公開第２０２０／２２９９７４号に記載されている。

【０３２９】

免疫コンジュゲート及び放射性免疫コンジュゲートの追加の実施形態

本明細書に記載のように、本発明のキレート剤及び放射性金属錯体は、免疫物質のような抗原結合ドメインにコンジュゲート（すなわち、共有結合）して、例えば、標的化放射線治療のような対象、例えば、ヒトにおける医薬用途に好適な免疫コンジュゲート及び／又は放射性免疫コンジュゲートを作製することができる。本発明のキレート剤及び放射性金属錯体を使用して、目的の標的（癌細胞など）に特異的に結合することができる抗原結合ドメイン、特に抗体又はその抗原結合断片を、放射性金属イオンで部位特異的に標識して、放射性免疫コンジュゲートを生成することができる。特に、本発明のキレート剤及び／又は放射性金属錯体を使用して、放射性金属イオン、特に^{225}Ａｃの高収率キレート化及び所望のキレート剤－抗体比（ＣＡＲ）を有する放射性免疫コンジュゲートを製造することができる。特定の実施形態によれば、本発明の方法は、１０未満、８未満、６未満、若しくは４未満の平均ＣＡＲ、又は約２～約８、若しくは約２～約６、若しくは約２～約４、若しくは約２～約３のＣＡＲ、又は約２、若しくは約３、若しくは約４、若しくは約５、若しくは約６、若しくは約７、若しくは約８のＣＡＲを提供する。

【０３３０】

本発明の実施形態によれば、免疫コンジュゲートは、本発明のキレート剤、例えば、抗体又はその抗原結合断片（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）に、好ましくはリンカーを介して共有結合した、本明細書に記載の式（Ｉ）、式（ＩＩ）又は式（ＩＩＩ）のキレート剤を含む。キレート剤と抗体又はその抗原結合断片との間の異なる結合を有する多くの結合形態が、キレート剤及び抗体又はその抗原結合断片上の反応性官能基（すなわち、求核性及び求電子性）に応じて可能である。

【０３３１】

本発明の実施形態によれば、放射性免疫コンジュゲートは、本発明の放射性金属錯体、例えば、抗体又はその抗原結合断片（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）に、好ましくはリンカーを介して共有結合した、本明細書に記載の式（Ｉ－ｍ）、式（ＩＩ－ｍ）又は式（ＩＩＩ－ｍ）の放射性金属錯体を含む。

【０３３２】

本明細書に記載されるものなどの本発明のキレート剤又は放射性金属錯体のいずれかを使用して、本発明の免疫コンジュゲート又は放射性免疫コンジュゲートを生成することができる。

【０３３３】

いくつかの実施形態では、本発明の放射性免疫コンジュゲートの放射性金属錯体は、放射性錯体のキレート部分に配位されたα線放出放射性金属イオンを含む。好ましくは、α線放出放射性金属イオンは^{225}Ａｃである。

【０３３４】

特定の実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、トリアゾール部分を介して放射性錯体に結合し、本発明の放射性免疫コンジュゲートを形成する。

【０３３５】

特定の実施形態では、本出願の免疫コンジュゲート又は放射性免疫コンジュゲート中の抗体又は抗原結合断片は、腫瘍抗原に特異的に結合することができる。好ましくは、抗体又は抗原結合断片はｈＫ２に特異的に結合する。

【０３３６】

本発明の免疫コンジュゲート及び放射性免疫コンジュゲートは、化学的及び／又は酵素的方法を含む、リガンド、例えば抗体をキレート剤へのコンジュゲーションのための本開

示を考慮して当技術分野で既知の任意の方法によって調製することができる。例えば、免疫コンジュゲート及び放射性免疫コンジュゲートは、限定するものではないが、活性化酸又はハロゲン化アシルからのエステル、チオエステル、又はアミドの形成を含む、結合反応；求核置換反応（例えば、ハロゲン化環の求核置換又は歪みを有する環系の開環など）；アジド－アルキンヒュスゲン環化付加（例えば、１，２，３－トリアゾールリンカーを形成するためのアジドとアルキンとの間の１，３双極子環化付加）；チオリン付加反応；イミン形成；テトラジンとトランスシクロクテン（ＴＣＯ）との間のディールス・アルダー反応；及びマイケル付加（例えば、マレイミド付加）によって調製することができる。使用される反応性官能基に応じて、異なる結合を有する多くの他の付加様式が可能である。リガンドの結合は、放射性金属イオンに配位されているキレート剤又は放射性金属イオンに配位されていないキレート剤に対して行うことができる。

【０３３７】

実施形態によれば、放射性免疫コンジュゲートは、本発明の放射性金属錯体を、例えばクリック化学反応によって抗体又はその抗原結合断片に共有結合させることによって製造することができる。あるいは、放射性免疫コンジュゲートは、例えばクリックケミストリー反応によって、本発明のキレート剤を抗体又はその抗原結合断片に共有結合させることによって、本発明の免疫コンジュゲートを最初に調製し、その後、免疫コンジュゲートを放射性金属イオンで標識して、放射性免疫来ぬゲート（「一段階直接放射性標識」と呼ばれる）を製造することができる。残基特異的コンジュゲーション法及び部位特異的コンジュゲーション法のいずれも、本発明の免疫コンジュゲート及び放射性免疫コンジュゲートの製造に使用することができる。このような方法は、例えば、国際公開第２０２０／２２９９７４号に記載されている。

【０３３８】

本発明の実施形態によれば、放射性免疫コンジュゲートの製造方法は、R_{11}が求核性部分又は求電子性部分である本発明のキレート剤又は放射性錯体を、抗体若しくはその抗原結合断片（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）、又は求核性部分若しくは求電子性部分を含む修飾抗体若しくはその抗原結合断片と反応させることを含む。

【０３３９】

一実施形態では、方法は、本発明のキレート剤を、抗体若しくはその抗原結合断片又は求核性官能基若しくは求電子性官能基を含む修飾された抗体若しくはその抗原結合断片を反応させて、キレート剤と抗体若しくはその抗原結合断片又は修飾された抗体若しくは抗原結合断片との間に共有結合を有する免疫コンジュゲートを形成することと、放射性金属イオンが配位結合により免疫コンジュゲートのキレート剤に結合するように、免疫コンジュゲートを放射性金属イオンと反応させて、それにより、放射性免疫コンジュゲートを形成することと、を含む。この実施形態は、放射性金属を伴う化学反応ステップが１つしかないので、「一段階直接放射性標識」方法と呼ばれることがある。

【０３４０】

別の実施形態では、方法は、本発明の放射性錯体を、抗体若しくはその抗原結合断片又は求核性若しくは求電子性官能基を含む修飾された抗体若しくはその抗原結合断片を反応させ、それにより、放射性免疫コンジュゲートを形成することを含む。この実施形態は、「クリック放射性標識」法と呼ぶ場合がある。修飾された抗体又はその抗原結合断片は、本開示を考慮して当該技術分野で既知の任意の方法によって、例えば、上記の方法のうちの１つ又は２つ以上を使用して、特定の残基において、抗体を直交性反応性官能基で標識化することによって、あるいは、上記の方法のうちの１つ又は２つ以上を使用して、非天然アミノ酸（例えば、アジドアミノ酸又はアルキニルアミノ酸）を抗体に部位特異的に組み込むことによって、生成することができる。標識化の程度（degree of labeling、ＤＯＬ）は、置換度（degree of substitution、ＤＯＳ）と称する場合もあり、非天然アミノ酸によって修飾された抗体などのバイオコンジュゲートを特徴付ける及び最適化するための特に有用なパラメータである。これは、タンパク質分子（抗体など）に結合した非天然アミノ酸の平均数として、又は標識／タンパク質の形態でのモル比として表され

る。ＤＯＬは、当該分野における任意の既知の方法により、標識抗体の吸収スペクトルから決定することができる。

【０３４１】

特定の実施形態では、本明細書に記載されるように、本発明の免疫コンジュゲート及び放射性免疫コンジュゲートは、クリックケミストリー反応を用いて調製される。例えば、本発明の放射性免疫コンジュゲートは、「クリック放射性標識」と呼ばれるクリック化学反応を使用して調製することができる。クリック放射性標識化は、クリックケミストリー反応パートナー、好ましくはアジド及びアルキン（例えば、シクロオクチン又はシクロオクチン誘導体）を使用して、放射性錯体（キレート剤に結合した放射性金属イオン）と抗体又はその抗原結合断片との間にトリアゾール共有結合を形成する。抗体のクリック放射性標識化方法は、例えば、「Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｉｎｇ　ｏｆ　Ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ」と題する国際出願第ＵＳ１８／６５９１３号に記載されており、その関連する説明は参照により本明細書に組み込まれる。「１工程直接放射性標識化」と称する他の実施形態では、免疫コンジュゲートが、抗体又はその抗原結合断片とキレート剤との間のクリックケミストリー反応を使用して調製され、次いで、免疫コンジュゲートを放射性金属イオンと接触させて、放射性免疫コンジュゲートを形成する。

【０３４２】

一実施形態によれば、放射性免疫コンジュゲートを調製する方法は、放射性金属イオンを（例えば、配位結合により）本発明のキレート剤に結合することを含む。

【０３４３】

「１工程直接放射性標識化」方法の一実施形態は、免疫コンジュゲート（すなわち、ポリペプチド－キレート剤錯体）を放射性金属イオンと接触させて、それにより放射性免疫コンジュゲートを形成することを含み、免疫コンジュゲートは本発明のキレート剤を含む、放射性免疫コンジュゲートを調製する方法として記載し得る。特定の実施形態によれば、免疫コンジュゲートは、本発明のキレート剤とポリペプチドとの間のクリックケミストリー反応により形成されている。特定の実施形態によれば、放射性免疫コンジュゲートは、金属のない条件を用いずに（例えば、反応混合物から一般的な金属不純物を除去又は積極的に排除する任意の工程なしに）形成されている。これは、製造プロセスに重大な課題をもたらす鉄、亜鉛及び銅などの一般的な金属の競合的（非生産的）キレート化を回避するために、金属のない厳密な条件下で抗体を放射性標識化する必要がある特定の従来方法とは対照的である。

【０３４４】

特定の実施形態では、本発明の放射性免疫コンジュゲートを調製する方法は、

（ｉ）第１のクリック反応パートナー（例えば、アジド基）に共有結合したポリペプチド（例えば、抗体又はその抗原結合断片）を提供することと、

（ｉｉ）第２のクリック反応パートナー（例えば、アルキニル基又はシクロアルキニル基）に共有結合した本発明のキレート剤を含むキレート剤錯体を提供することと、

（ｉｉｉ）第１のクリック反応パートナー（例えば、アジド基）を第２のクリック反応パートナー（例えば、アルキニル基又はシクロアルキニル基）と反応させることを可能とする条件下で、修飾されたポリペプチドをキレート剤錯体と接触させて、それよりポリペプチド－キレート剤錯体（すなわち、免疫コンジュゲート）を形成することと、及び

（ｉｖ）ポリペプチド－キレート剤錯体を放射性金属イオンと接触させて、それにより放射性免疫コンジュゲートを調製すること（放射性免疫コンジュゲートは、放射性金属イオンで標識化されたポリペプチド、例えば、配位結合によりキレート剤に結合したα線放出放射性金属イオンで標識化された修飾された抗体又はその抗原結合断片を含む）と、を含む、「１工程直接放射性標識化」方法を含む。

【０３４５】

特定の実施形態によれば、工程（ｉｖ）は、金属のない条件下で実施される。

【０３４６】

別の実施形態では、放射性免疫コンジュゲートを調製する方法は、

（ｉ）アジド基に共有結合した抗体又はその抗原結合断片を含む、修飾された抗体又はその抗原結合断片を提供することと、
（ｉｉ）配位結合によりキレート剤に結合したα線放出放射性金属イオンを含む放射性錯体を提供することであって、キレート剤が、アルキニル基又はシクロアルキニル基に共有結合している、提供することと、
（ｉｉｉ）アジド基がアルキニル基又はシクロアルキニル基と反応することを可能にする条件下で、修飾された抗体又はその抗原結合断片を放射性錯体と接触させ、それにより、放射性免疫コンジュゲートを調製することと、を含む。

【０３４７】

クリックケミストリー反応を実施するための条件は、当該技術分野において知られており、本開示を考慮して当業者に既知のクリックケミストリー反応を実施するための任意の条件を本発明で使用することができる。条件の例としては、限定されないが、ｐＨ４～１０及び温度２０℃～７０℃において、１：１～１０００：１の比で、修飾ポリペプチド及び放射性錯体をインキュベートすることが挙げられる。

【０３４８】

上記のクリック放射性標識化方法は、低若しくは高ｐＨ及び／又は高温条件下での放射性金属イオンのキレート化を可能にして率を最大化し、これは、アルキン反応パートナーを不活性化するリスクなしに達成することができる。アジド標識化抗体又はその抗原結合断片と放射性錯体との間の効率的なキレート化及び効率的なＳＰＡＡＣ反応により、アジド：抗体の低い比でも高い放射化学的収率で放射性免疫コンジュゲートを生成することが可能となる。微量金属を除外しなければならない唯一の工程は、キレート化部分に対する放射性金属イオンキレート化であり、抗体の生産、精製、及びコンジュゲーションの工程は、金属を含まない条件下で行われる必要はない。

【０３４９】

本発明のキレート剤及び放射性金属錯体はまた、部位特異的放射性標識化ポリペプチド（例えば、抗体）の生成に使用することもできる。本明細書に記載のクリック放射性標識化方法は、アジド基を抗体上に部位特異的に導入するための確立された方法を利用することにより、放射性免疫コンジュゲートの部位特異的な生成を容易にする（Ｌｉ，Ｘ．，ｅｔ ａｌ．Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｗｅｌｌ－ｄｅｆｉｎｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｔｈｒｏｕｇｈ ｇｌｙｃａｎ ｒｅｍｏｄｅｌｉｎｇ ａｎｄ ｓｔｒａｉｎ－ｐｒｏｍｏｔｅｄ ａｚｉｄｅ－ａｌｋｙｎｅ ｃｙｃｌｏａｄｄｉｔｉｏｎｓ．Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ Ｅｎｇｌ，２０１４．５３（２８）：ｐ．７１７９－８２、Ｘｉａｏ，Ｈ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｔｉｃ ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｕｎｎａｔｕｒａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄｓ ｉｎｔｏ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ．Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ Ｅｎｇｌ，２０１３．５２（５２）：ｐ．１４０８０－３）。部位特異的方法でタンパク質又は抗体に分子を付着させる方法は、当該技術分野において知られており、当業者に既知の抗体を部位特異的に標識する任意の方法を、本開示を考慮して本発明で使用することができる。本発明での使用に好適な抗体を部位特異的に修飾する方法の例としては、限定されないが、修飾システイン残基（例えば、ＴＨＩＯＭＡＢ（商標））の組み込み、非天然アミノ酸又はグリカン（例えば、セレノシステイン、ｐ－ＡｃＰｈｅ、ホルミルグリシン生成酵素（ＦＧＥ、ＳＭＡＲＴａｇ（商標））など）の使用、及び酵素法（例えば、グリコトランスフェラーゼ、エンドグリコシダーゼ、微生物又は細菌トランスグルタミナーゼ（ＭＴＧ又はＢＴＧ）、ソルターゼＡなど）が挙げられる。

【０３５０】

いくつかの実施形態では、本発明の免疫コンジュゲート又は放射性免疫コンジュゲートの生成に使用するための修飾された抗体又はその抗原結合断片は、抗体又はその抗原結合断片を、抗体のＦｃ－グリコシル化部位におけるコアＧｌｃＮａｃ残基間のβ－１，４結合に特異的な細菌エンドグリコシダーゼ、例えば、ＧｌｙｃＩＮＡＴＯＲ（Ｇｅｎｏｖｉ

ｓ）（これは、Ｆｃ上の最も内側のＧｌｃＮＡｃをインタクトなままとし、その部位でアジド糖の部位特異的な組み込みを可能にする）で切り出す（ｔｒｉｍ）ことによって得られる。次いで、短縮された抗体又はその抗原結合断片を、ＧａｌＴガラクトシルトランスフェラーゼ又はＧａｌＮＡｃトランスフェラーゼなどの糖転移酵素の存在下で、ＵＤＰ－Ｎ－アジドアセチルガラクトサミン（ＵＤＰ－ＧａｌＮａｚ）又はＵＤＰ－６－アジド６－デオキシＧａｌＮａｃなどのアジド標識化糖と反応させて、それにより修飾された抗体又はその抗原結合断片を得ることができる。

【０３５１】

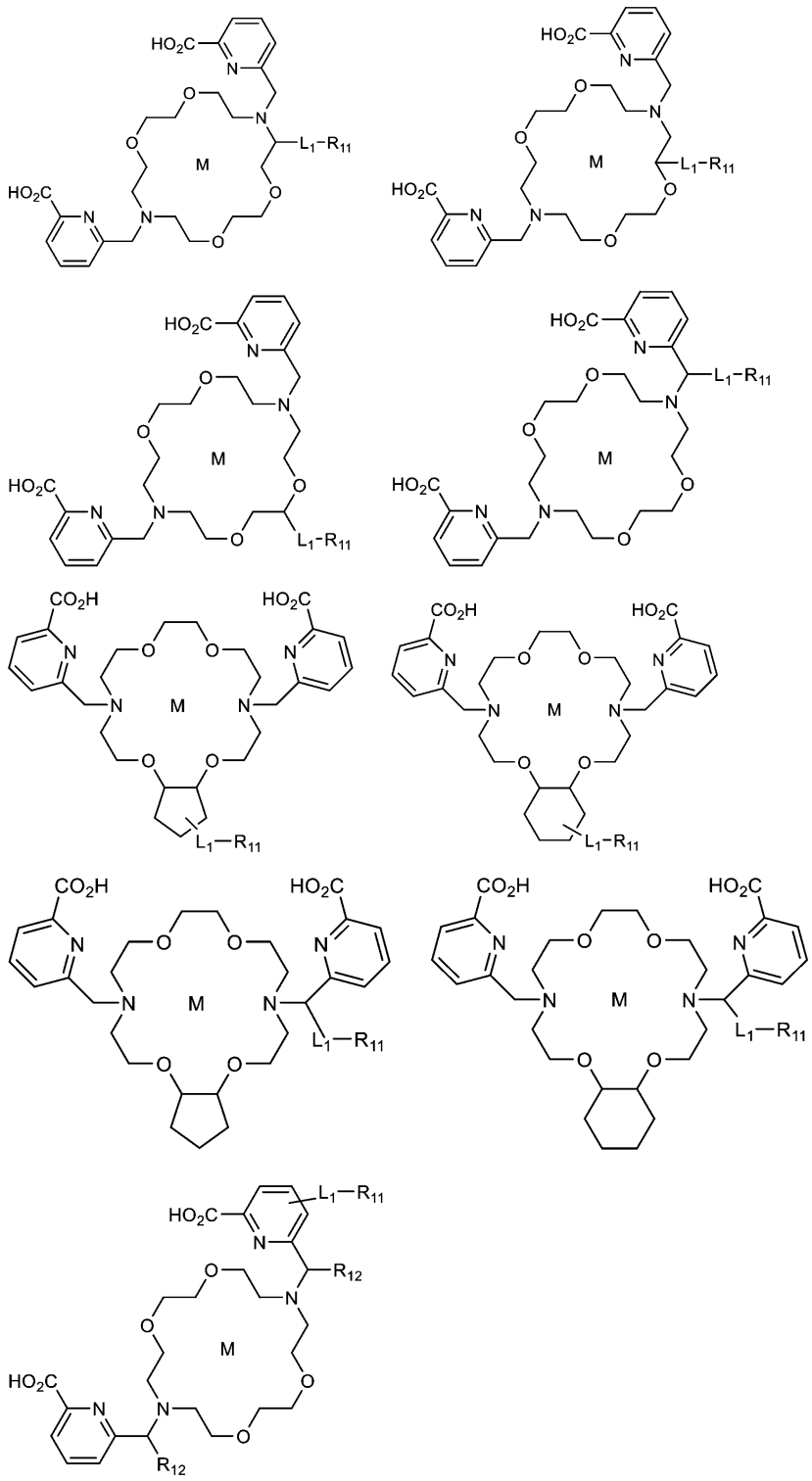
他の実施形態では、本発明の免疫コンジュゲート又は放射性免疫コンジュゲートの生成に使用するための修飾された抗体又はその抗原結合断片は、抗体又はその抗原結合断片をアミダーゼで脱グリコシル化することによって得られる。次いで、得られた脱グリコシル化抗体又はその抗原結合フ断片を、アジドアミン、好ましくは３－アジドプロピルアミン、６－アジドヘキシルアミン又は任意のアジドリンカーアミン若しくは任意のアジドアルキル／ヘテロアルキルアミン、例えば、アジド－ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）－アミン、例えば、Ｏ－（２－アミノエチル）－Ｏ’－（２－アジドエチル）テトラエチレングリコール、Ｏ－（２－アミノエチル）－Ｏ’－（２－アジドエチル）ペンタエチレングリコール、Ｏ－（２－アミノエチル）－Ｏ’－（２－アジドエチル）トリエチレングリコールなどと反応させ、あるいは微生物トランスグルタミナーゼの存在下で反応させて、修飾された抗体又はその抗原結合断片を得ることができる。

【０３５２】

本明細書に記載の任意の放射性金属錯体を使用して、本発明の放射性免疫コンジュゲートを生成することができる。特定の実施形態では、放射性金属錯体は、式（Ｉ－ｍ）、式（ＩＩ－ｍ）又は式（ＩＩＩ－ｍ）の構造を有する。特定の実施形態では、放射性金属錯体は、以下からなる群から選択される構造を有し：

【０３５３】

【化４０】



式中、Ｍは、放射性金属イオン、好ましくはα線放出放射性金属イオン、より好ましくは、アクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）であり、Ｒ$_{11}$は、シクロオクチニル、又はビシクロノニニル（ＢＣＮ）、ジフッ素化シクロオクチニル（ＤＩＦＯ）、ジベンゾシクロオクチニル（ＤＩＢＯ）、ケト－ＤＩＢＯ、ビアリールアザシクロオクチノニル（ＢＡＲＡＣ）、ジベンゾアザシクロオクチニル（ＤＩＢＡＣ、ＤＢＣＯ、ＡＤＩＢＯ）、ジメトキシアザシクロオクチニル（ＤＩＭＡＣ）、ジフルオロベンゾシクロオクチニル（ＤＩＦＢＯ）、モノベンゾシクロオクチニル（ＭＯＢＯ）及びテトラメトキシジベンゾシクロオクチニル（ＴＭＤＩＢＯ）からなる群から選択されるシクロオクチニル誘導体である。

【０３５４】

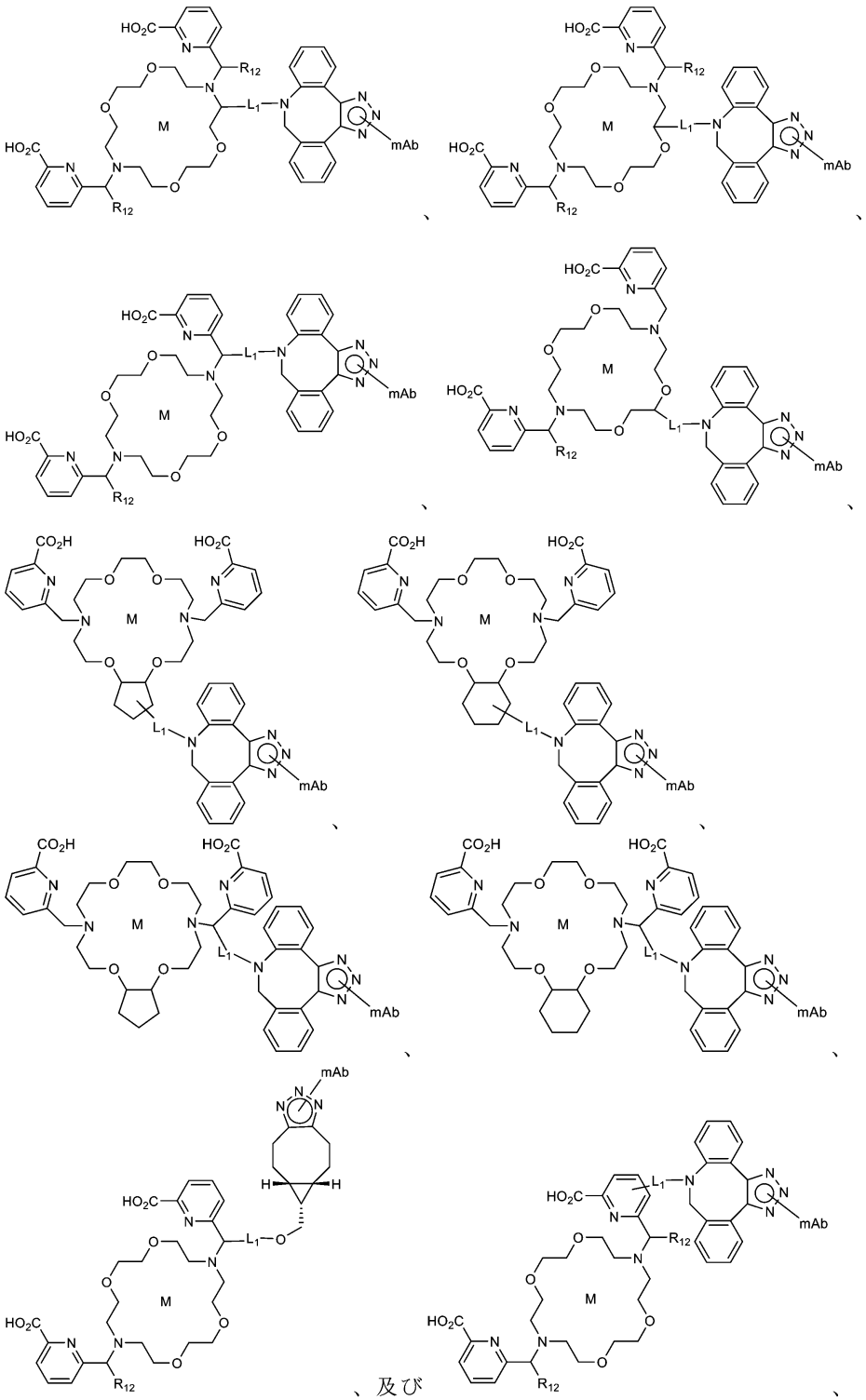
いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、本開示を考慮して当業者に既知の抗体及びポリペプチドの化学修飾又は酵素修飾のための任意の方法を使用して、アジド基に共有結合される。アジド及びアルキニル又はシクロアルキニル基をクリックケミストリー反応に供して１，２，３－トリアゾール部分を形成するのに十分な条件下で、アジド標識化抗体又はその抗原結合断片を、アルキニル又はシクロアルキニル基、好ましくはシクロオクチニル基、より好ましくはＤＢＣＯを含む、本発明のキレート剤又は放射性金属錯体と反応させる。

【０３５５】

特定の実施形態では、本出願の放射性免疫コンジュゲートとしては：

【０３５６】

【化４１】



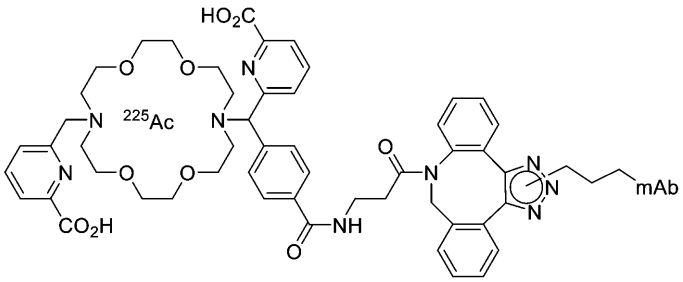
（式中、「ｍＡｂ」は、抗体又は抗原結合ドメイン（例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）であり；　Ｌ$_1$は、存在しないか、又はリンカーであり、好ましくはリンカーであり；各Ｒ$_{12}$は、独立して、水素、ＣＨ$_3$又はＣＨ$_2$ＣＨ$_3$であり、ただし、少なくとも１つのＲ$_{12}$は、－ＣＨ$_3$又は－ＣＨ$_2$ＣＨ$_3$であり；Ｍは、α線放射性核種、好ましくは^{225}Ａｃである）が挙げられるが、これらに限定されない。

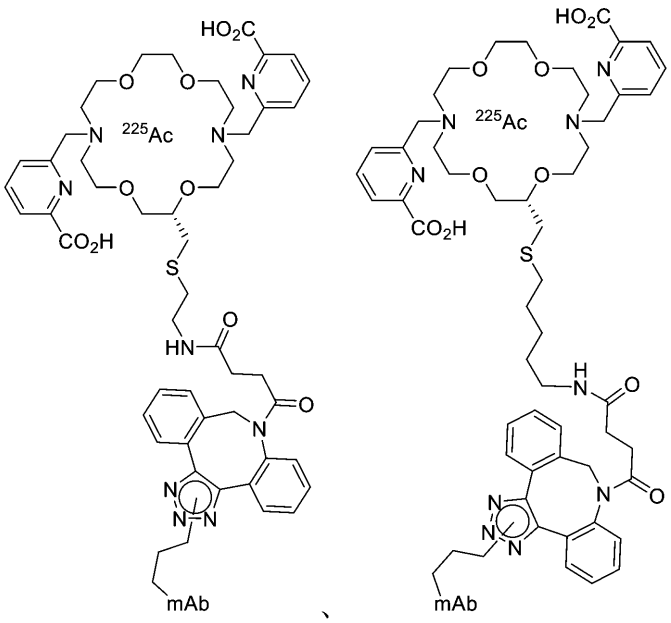
【０３５７】

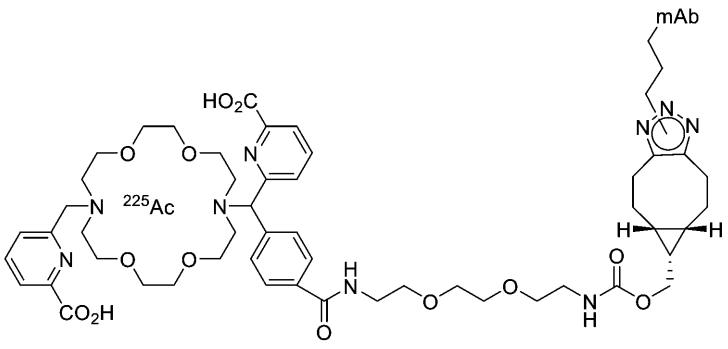
本出願の放射性免疫コンジュゲートの例には：

【０３５８】

【化４２】


、


、


、及び

、

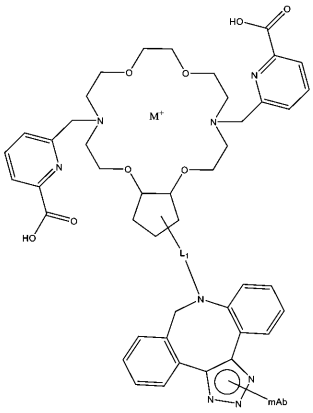
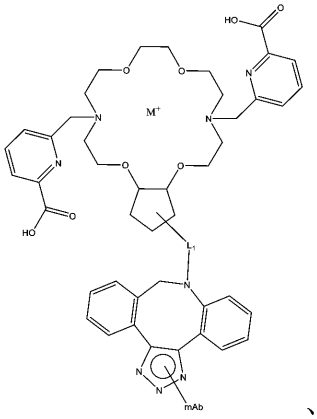
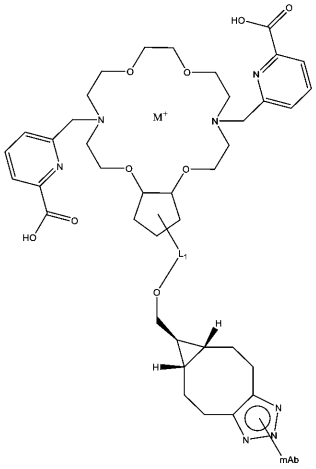
（式中、「ｍＡｂ」は、好ましくは、ｈＫ２に対する結合特異性を有する抗体又は抗原結合ドメイン、例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂであり、又は本明細書に別に記載される抗体又は抗原結合ドメインをいう）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３５９】

特定の実施形態では、放射性免疫コンジュゲートは：

【０３６０】

【化４３】


、

、及び


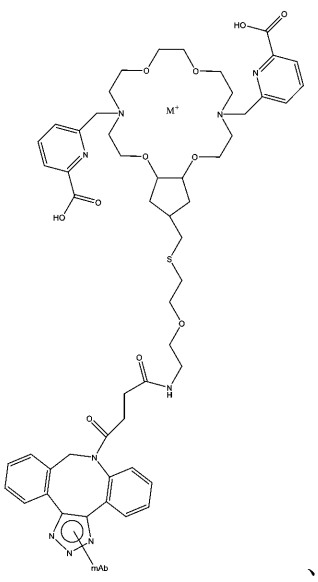
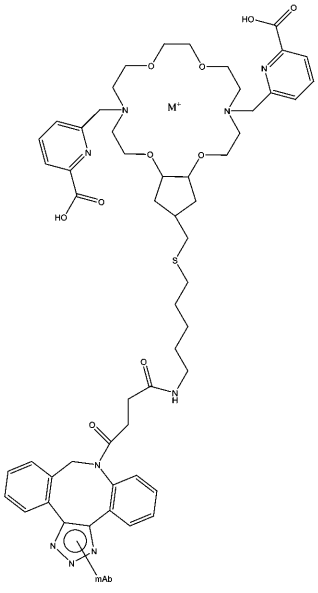
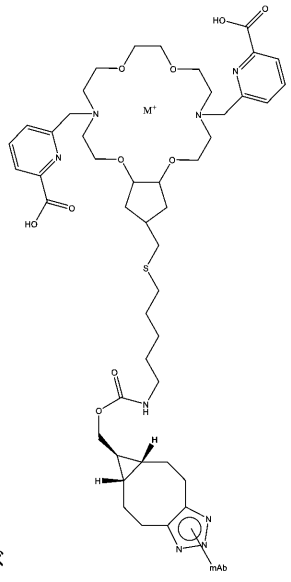
（式中、
M^+は放射性金属イオンであり、M^+は、アクチニウム２２５（^{225}Ac）、ラジウム２２３（^{233}Ra）、ビスマス２１３（^{213}Bi）、鉛２１２（^{212}Pb（ＩＩ）及び／又は^{212}Pb（ＩＶ））、テルビウム１４９（^{149}Tb）、テルビウム１５２（^{152}Tb）、テルビウム１５５（^{155}Tb）、フェルミウム２５５（^{255}Fm）、トリウム２２７（^{227}Th）、トリウム２２６（$^{226}Th^{4+}$）、アスタチン２１１（^{211}At）、セリウム１３４（^{134}Ce）、ネオジム１４４（^{144}Nd）、ランタン１３２（^{132}La）、ランタン１３５（^{135}La）、及びウラン２３０（^{230}U）からなる群から選択され、
L_1は、存在しないか、又はリンカーであり、
式中、「ｍＡｂ」は、好ましくは、ｈＫ２に対する結合特異性を有する抗体又は抗原結合ドメイン、例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂであり、又は本明細書に別に記載される抗体又は抗原結合ドメインをいう）からなる群から独立して選択される１以上の任意のものである。

【０３６１】

別の一実施形態では、放射性免疫コンジュゲートは：

【０３６２】

【化４４】


、

、及び


（式中、「ｍＡｂ」は、好ましくは、ｈＫ２に対する結合特異性を有する抗体又は抗原結合ドメイン、例えば、ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ、又は本明細書に別に記載される抗体又は

抗原結合ドメインをいう）からなる群から選択される１以上の任意のものである。

【０３６３】

本明細書に記載の方法によって生成された放射性免疫コンジュゲートは、本開示を考慮して当業者に既知の方法を使用して分析することができる。例えば、ＬＣ／ＭＳ分析を使用して、キレート剤と、標識されたポリペプチド、例えば、抗体又はその抗原結合断片との比率を決定することができ、分析サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、ポリペプチド及びポリペプチドコンジュゲート、例えば、抗体及び抗体コンジュゲートのオリゴマー状態を決定することができ、放射化学的収率は、インスタント薄層クロマトグラフィー（例えば、ｉＴＬＣ－ＳＧ）によって決定することができ、放射化学純度は、サイズ排除ＨＰＬＣによって決定することができる。

【０３６４】

医薬組成物及び使用方法

別の一般的な態様では、本発明は、本発明のキレート剤、放射性金属錯体、免疫コンジュゲート、又は放射性免疫コンジュゲート及び医薬的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。医薬組成物はまた、１つ又は２つ以上の医薬的に許容される担体を含み得る。

【０３６５】

一実施形態では、医薬組成物は、本発明の放射性金属錯体、及び医薬的に許容される担体を含む。

【０３６６】

別の一実施形態では、医薬組成物は、本発明の放射性免疫コンジュゲート、及び医薬的に許容される担体を含む。

【０３６７】

本明細書で使用するとき、用語「担体」は、任意の賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定剤、可溶化剤、油、脂質、脂質含有小胞、ミクロスフェア、リポソーム封入体、又は医薬製剤で使用するための当該技術分野において周知である他の材料を指す。担体、賦形剤又は希釈剤の特性は、特定の用途の投与経路によって決まる点は理解されよう。本明細書に使用される場合、用語「医薬的に許容される担体」は、本発明による組成物の有効性にも本発明による組成物の生物学的活性にも干渉しない非毒性性材料を指す。特定の実施形態によれば、本開示を考慮して、抗体に基づく又は放射性錯体に基づく医薬組成物での使用に好適な、任意の医薬的に許容可能な担体を本発明において使用することができる。

【０３６８】

特定の実施形態によれば、本明細書に記載される組成物は、対象への想定される投与経路に好適であるように製剤化される。例えば、本明細書に記載の組成物は、非経口投与、例えば、静脈内、皮下、筋肉内又は腫瘍内投与に好適であるように製剤化することができる。

【０３６９】

他の一般的な態様では、本発明は、放射線治療及び腫瘍性疾患又は障害を治療するために腫瘍性細胞を選択的に標的化する方法に関する。本明細書に記載の放射性錯体又は放射性免疫コンジュゲートのいずれか及びそれらの医薬組成物を本発明の方法で使用することができる。

【０３７０】

「腫瘍（ｎｅｏｐｌａｓｍ）」は、細胞が必要以上に分裂したとき、又は死滅しなければいけない場合に死滅しないときに生じる異常な組織塊である。腫瘍は、良性（癌ではない）又は悪性（癌）であり得る。腫瘍（ｎｅｏｐｌａｓｍ）は腫瘍（ｔｕｍｏｒ）とも呼ばれる。腫瘍疾患又は障害は、癌などの腫瘍に関連する疾患又は障害である。腫瘍疾患又は障害の例としては、播種性癌及び固形腫瘍癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３７１】

実施形態によれば、前立腺癌（例えば、転移性前立腺癌又は転移性去勢抵抗性前立腺癌）の処置を必要とする対象の前立腺癌を処置する方法は、治療有効量の本明細書に記載の

放射性免疫コンジュゲートを対象に投与することを含み、放射性免疫コンジュゲートは、ＫＬ２Ｂ３０ＦａｂなどのｈＫ２に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインに抱合した本明細書に記載の放射性金属錯体を含む。

【０３７２】

本発明の一実施形態では、放射線治療のために腫瘍性細胞を選択的に標的化する方法は、放射性免疫コンジュゲート又は本発明の医薬組成物を対象に投与することを含む。

【０３７３】

本発明の一実施形態では、腫瘍性疾患又は障害を治療する方法は、それを必要とする対象に本発明の放射性免疫コンジュゲート又は医薬組成物を対象に投与することを含む。

【０３７４】

本発明の一実施形態では、癌を治療する必要のある対象において癌を治療する方法は、本発明の放射性免疫コンジュゲート又は医薬組成物を対象に投与することを含む。

【０３７５】

放射性免疫コンジュゲートは、例えば、抗原結合ドメインによって標的化される細胞などに放射線を直接運ぶ。好ましくは、放射性免疫コンジュゲートは、^{225}Ａｃなどのα線放出放射性金属イオンを担持する。標的化すると、α線放出放射性金属イオン、例えば、^{225}Ａｃ及びその娘からのα粒子が標的化細胞に送達され、当該細胞に対して細胞毒性効果を引き起こし、それにより放射線治療及び／又は腫瘍疾患若しくは障害の治療を行うために腫瘍細胞を選択的に標的化する。

【０３７６】

放射線治療のため及び腫瘍性疾患又は障害を治療するために腫瘍性細胞を選択的に標的化するためのプレ標的化アプローチも、本発明によって企図される。プレ標的化アプローチによれば、アジド標識化抗体又はその抗原結合断片が投与され、抗体の標的抗原を有する細胞に結合し、循環から経時的に除去されるか又は除去剤で除去される。続いて、本発明の放射性錯体、好ましくはシクロオクチン又はシクロオクチン誘導体（例えば、ＤＢＣＯ）を含む放射性錯体は、投与されて、標的部位に結合したアジド標識化抗体とのＳＰＡＡＣ反応を受け、残りの非結合放射性錯体は、循環から急速に除去される。このプレ標的化技術は、対象における標的部位での放射性金属イオン局在を強化する方法を提供する。

【０３７７】

他の実施形態では、修飾されたポリペプチド、例えば、アジド標識化抗体又はその抗原結合断片及び本発明の放射性錯体は、標的化放射線治療又は腫瘍性疾患若しくは障害の治療を必要とする対象に、同じ組成物中又は異なる組成物中で投与される。

【０３７８】

いくつかの実施形態では、治療有効量の本発明の放射性免疫コンジュゲート又は医薬組成物は、癌などの対象における腫瘍疾患又は障害を治療するために対象に投与される。

【０３７９】

本発明の他の実施形態では、本発明の放射性免疫コンジュゲート及び医薬組成物は、腫瘍性疾患又は障害の治療に有効な他の薬剤と組み合わせて使用することができる。

【０３８０】

腫瘍性疾患若しくは障害の放射線治療及び／又は処置のため、及び又は腫瘍性疾患又は障害の診断のために腫瘍性細胞を選択的に標的化するのに使用するための、本明細書に記載の放射性免疫コンジュゲート及び医薬組成物、並びに腫瘍性疾患若しくは障害の放射線治療及び又は処置のために腫瘍性細胞を選択的に処置するための医薬の製造における本明細書に記載の医薬の製造における本明細書に記載の放射性免疫コンジュゲート又は医薬組成物の使用も提供される。

【実施例】

【０３８１】

以下の本発明の実施例は、本発明の本質を更に説明するためのものである。以下の実施例は本発明を限定するものではなく、本発明の範囲は添付の請求項によって定められる点を理解されたい。

【０３８２】
キレート剤及び免疫コンジュゲートの合成（実施例１～２１）
本明細書に記載のキレート剤の実施形態の合成方法は、例えば、国際公開第２０２０／２２９９７４号に提供されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。更なる合成方法は、ＰＣＴ／ＩＢ２０２１／０６０３５０（本明細書中に参考として援用される）及び以下の実施例１～２１に提供される。
【０３８３】
実施例１～２１では、いくつかの合成生成物が残基として単離されたものとして列挙されている。「残留物」という用語は、生成物が単離された物理的状態を限定するものではなく、例えば、固形物、油状物、泡状物、ガム、シロップなどを含み得ることは、当業者には理解されるであろう。
【０３８４】
本明細書、特にスキーム及び実施例で使用される略語は、以下の表Ａに列挙されるとおりである。
【０３８５】

【表１－１】

表Ａ：略語

ADP	＝	アデノシン二リン酸
Alexa633トレーサー	＝	Alexa Fluor（登録商標）633ヒドラジドトレーサー（ThermoFisher）
BSA	＝	ウシ血清アルブミン
ACN又はMeCN	＝	アセトニトリル
ATP	＝	アデノシン三リン酸
BINAP	＝	（2，2’－ビス（ジフェニルホスフィノ）－1，1’－ビナフチル）
Brij（商標）－35	＝	ポリエチレングリコールヘキサデシルエーテル
DBCO	＝	ジベンゾシクロオクチル
DCM	＝	ジクロロメタン
DIPEA又はDIEA	＝	ジイソプロピルエチルアミン
DMF	＝	N，N－ジメチルホルムアミド
DMSO	＝	ジメチルスルホキシド
DPPF又はdppf	＝	1，1’－ビス（ジフェニルホスフィノ）フェロセン
DTPA	＝	ジエチレントリアミン五酢酸
DTT	＝	ジチオトレイトール
EDTA	＝	エチレンジアミン四酢酸
eGFR	＝	推算糸球体濾過量
EtOH	＝	エタノール
F12培地	＝	Gibco（登録商標）F12栄養培地（ThermoFisher）
FBS	＝	ウシ胎児血清
G418	＝	Geneticin（登録商標）（G418）硫酸塩
GFR	＝	糸球体濾過速度
GLP－1	＝	グルカゴン様ペプチド1
GRK2	＝	Gタンパク質共役受容体キナーゼ2
HATU	＝	（1－[ビス（ジメチルアミノ）メチレン]－1H－1，2，3－トリアゾロ[4，5－b]ピリジニウム3－オキシドヘキサフルオロホスフェート
HBSS	＝	GIBCO（登録商標）ハンクス平衡塩溶液
HEPES	＝	4－（2－ヒドロキシエチル）－1－ピペリジンエタンスルホン酸
HPLC	＝	高圧液体クロマトグラフィー
HTRF	＝	均質時間分解蛍光
IFG	＝	空腹時血糖異常
IGT	＝	耐糖能異常
LCMS又はLC／MS	＝	液体クロマトグラフィー質量分析
LDA	＝	リチウムジイソプロピルアミド
LiHMDS	＝	リチウムビス（トリメチルシリル）アミド
MeOH	＝	メタノール
メシル又はMs	＝	メチルスルホニル（すなわち、$-SO_2-CH_3$）
メシレート又はOMs	＝	メタンスルホネート（すなわち、$-O-SO_2-CH_3$）
MOM	＝	メトキシメチル
Ms又はメシル	＝	$-SO_2-CH_3$
MsCl	＝	塩化メシル（すなわち、CH_3-SO_2-Cl）
$NaBH(OAc)_3$	＝	トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム
NAFLD	＝	非アルコール性脂肪性肝疾患
Na_2SO_4	＝	硫酸ナトリウム
NASH	＝	非アルコール性脂肪性肝炎
NBS	＝	N－ブロモスクシンイミド
$NH(PMB)_3$	＝	トリス（4－メトキシベンジル）－λ^4－アザン
NMO	＝	4－メチルモルホリンN－オキシド
NMP	＝	N－メチル－2－ピロリドン
NMR	＝	核磁気共鳴
OMs又はメシレート	＝	メタンスルホネート（すなわち、$-O-SO_2-CH_3$）
OTf又はトリフラート	＝	トリフルオロメタンスルホネート

【０３８６】

【表１－２】

（表Ａの続き）

OTs又はトシレート	＝	ｐ－トルエンスルホネート
Pd／C	＝	パラジウム炭素
$Pd(dba)_2$	＝	ビス（ジベンジリデンアセトン）ジパラジウム（０）
$Pd(dppf)Cl_2$	＝	［１，１’－ビス（ジフェニルホスフィノ）フェロセン］－パラジウム（II）ジクロリド
$Pd(dppf)Cl_2{\cdot}CHCl_3$	＝	［１，１’－ビス（ジフェニルホスフィノ）フェロセン］クロロパラジウム錯体及びクロロホルム
$(1-nap)_3P$又は$P(1-nap)_3$	＝	トリ（１－ナフチル）ホスフィン
$Pd(OAc)_2$	＝	酢酸パラジウム（II）
$Pd(OH)_2$	＝	水酸化パラジウム
$Pd(OH)_2$／C	＝	水酸化パラジウム／炭素（パールマン触媒）
$Pd(PPh_3)_4$	＝	テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（０）
PEG	＝	ポリエチレングリコール
PMB	＝	４－メトキシベンジルエーテル
PPh_3	＝	トリフェニルホスフィン
SNS	＝	中枢神経系
TBAB	＝	テトラ－ｎ－ブチルアンモニウムブロミド
TBAF	＝	テトラ－ｎ－ブチルアンモニウムフルオリド
TBAI	＝	テトラ－ｎ－ブチルアンモニウムヨージド
TBSOTf	＝	ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート
TEA	＝	トリエチルアミン
Tf又はトリフィル	＝	トリフルオロメチルスルホニル（すなわち、$-SO_2-CF_3$）
TFA	＝	トリフルオロ酢酸
THF	＝	テトラヒドロフラン
THP	＝	２－テトラヒドロピラニル
TLC	＝	薄層クロマトグラフィー
TMS	＝	トリメチルシリル
$TMSN_3$	＝	トリメチルシリルアジド
トシレート又はOTs	＝	ｐ－トルエンスルホネート
TOPA	＝	６，６’－（（１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸＝H2bp18c6
Ts又はトシル	＝	－ｐ－トルエンスルホニルクロリド
ｐ－TsCl	＝	ｐ－トルエンスルホニルクロリド
Tween－20（登録商標）	＝	非イオン性界面活性剤（Sigma Aldrich）

【０３８７】

本明細書で使用するとき、特に明記しない限り用語「単離形態」は、化合物が、他の化合物、溶媒系若しくは生物学的環境とのあらゆる固形混合物から分離された形で存在することを意味するものとする。本発明の一実施形態では、本明細書に記載されている化合物のいずれも、単離形態で存在する。

【０３８８】

本明細書で使用するとき、特に断りのない限り、用語「実質的に純粋な形態」は、単離した化合物中の不純物のモルパーセントが、約５モルパーセント未満、好ましくは約２モルパーセント未満、より好ましくは約０．５モルパーセント未満、最も好ましくは約０．１モルパーセント未満であることを意味するものとする。本発明の一実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、実質的に純粋な形態として存在する。

【０３８９】

本明細書で使用するとき、特に断りのない限り、用語「対応する塩形態を実質的に含まない」は、式（Ｉ）の化合物を説明するために用いるとき、単離した式（Ｉ）の塩基中の対応する塩形態のモルパーセントが、約５モルパーセント未満、好ましくは約２モルパーセント未満、より好ましくは約０．５モルパーセント未満、最も好ましくは約０．１モルパーセント未満であることを意味する。本発明の一実施形態では、式（Ｉ）の化合物は、対応する塩形態を実質的に含まない形態で存在する。

【０３９０】

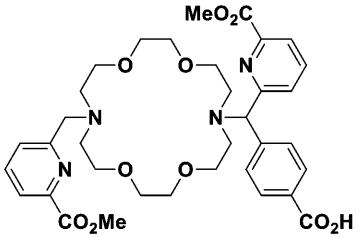
（実施例１）

４－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）安息香酸

（ＴＯＰＡ－［Ｃ－７］－フェニル－カルボン酸）

【０３９１】

【化４５】

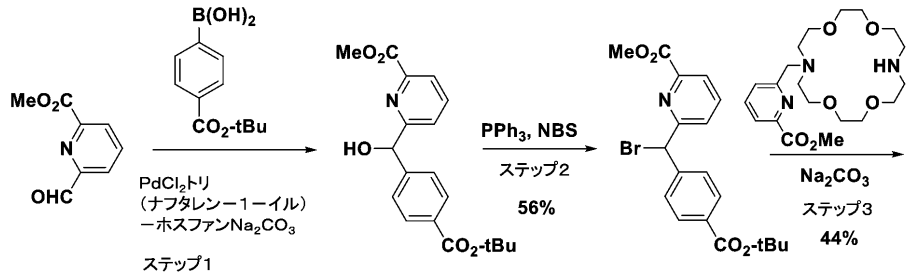


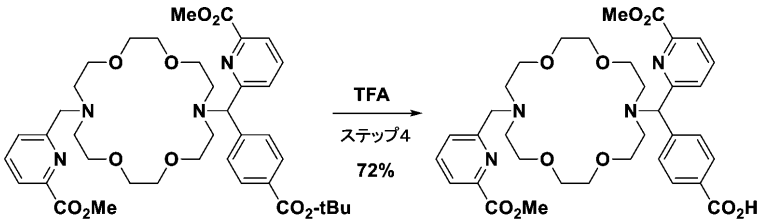
【０３９２】

スキーム１

【０３９３】

【化４６】





ステップ１：５００ｍＬ三口丸底フラスコ中、窒素下、－７８℃で、メチル６－ホルミルピコリナート（４．００ｇ、２４．２ｍｍｏｌ）、（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）ボロン酸（１０．７ｇ、４８．５ｍｍｏｌ）、$PdCl_2$（０．２１ｇ、１．２ｍｍｏｌ）、トリ（ナフタレン－１－イル）ホスフィン（０．５０ｇ、１．２ｍｍｏｌ）及び炭酸カリウム（１０．０ｇ、７２．７ｍｍｏｌ）の混合物に、テトラヒドロフラン（１００ｍＬ）を一度に加えた。混合物を窒素でパージし、室温で３０分間撹拌し、次に６５℃で２４時間加熱した。反応混合物を室温に冷却し、セライトパッドで濾過し、濾液を濃縮乾固させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー（０～５０％ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）により精製して、メチル６－（（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）（ヒドロキシ）メチル）ピコリナートを黄色油状物として得た（２．５ｇ、収率３０％）。

ステップ２：撹拌子、メチル６－（（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）（ヒドロキシ）メチル）ピコリナート（２．５０ｇ、７．３０ｍｍｏｌ）、PPh_3（３．４３ｇ、１３．１ｍｍｏｌ）、Ｎ－ブロモスクシンイミド（２．１３ｇ、１２．０ｍｍｏｌ）及びジクロロメタン（３０ｍＬ）を、窒素雰囲気下、室温で２５０ｍＬの三口丸底フラスコに加え、１時間撹拌した。反応溶液をシリカゲルカラムに充填し、クロマトグラフィー（０～３０％ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）により、化合物メチル６－（ブロモ（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）メチル）ピコリナート（１．６５ｇ、収率５６％）を黄色油状物として得た。

ステップ３：撹拌子、メチル６－（ブロモ（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フ

ェニル）メチル）ピコリナート（１．５２ｇ、３．６９ｍｍｏｌ）、メチル６－（（１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（１．５０ｇ、３．６９ｍｍｏｌ）、Na_2CO_3（１．１７ｇ、１１．１ｍｍｏｌ）、及びアセトニトリル（３０ｍＬ）を２５０ｍＬ三口丸底フラスコに加え、得られた不均一混合物を窒素雰囲気下、９０℃で１６時間加熱した。その後、反応混合物を室温に冷却し、セライトパッドを通して濾過し、真空中で濃縮乾固させて、粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ジクロロメタン）により精製して、メチル６－（（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナートを褐色油状物として得た（１．２ｇ、４４％）。

ステップ４：撹拌子、メチル６－（（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（１．２ｇ、１．６ｍｍｏｌ）、ＴＦＡ（０．６２ｍＬ、８．１ｍｍｏｌ）及びＤＣＭ（２０ｍＬ）を１００ｍＬ三口丸底フラスコに室温で添加し、１時間撹拌した。反応混合物を濃縮乾固させ、得られた粗生成物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥＣ１８（１９×１５０ｍｍ）５．０μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／ＡＣＮ；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、ＴＯＰＡ－［Ｃ－７］－フェニル－カルボン酸（０．８ｇ、７２％）を褐色油状物として得た。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：$C_{35}H_{44}N_4O_{10}$の計算値６８０．３１；観測値ｍ／ｚ　［Ｍ＋Ｈ］$^+$　６８１．５。ＬＣ－ＭＳによる純度：９９．８７％。ＨＰＬＣによる純度：９７．１４％（２１０ｎｍで９７．０１％、２５４ｎｍで９７．２０％及び２８０ｎｍで９７．２１％）。カラム：Ａｔｌａｎｔｉｓ　ｄＣ１８（２５０×４．６ｍｍ）、５μｍ；移動相Ａ：０．１％　ＴＦＡ水溶液、移動相Ｂ：アセトニトリル；流速：１．０ｍＬ／分％。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）：δ８．１２－８．０７（ｍ，４Ｈ），８．００－７．９８（ｍ，２Ｈ），７．７５－７．７３（ｍ，４Ｈ），６．１０（ｓ，１Ｈ），４．６７（ｓ，２Ｈ），３．９６（ｓ，３Ｈ），３．９１（ｓ，３Ｈ），３．８２（ｓ，８Ｈ），３．５６（ｓ，８Ｈ），３．５２（ｓ，８Ｈ）。

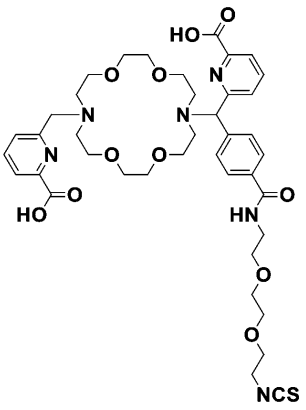
【０３９４】

（実施例２）

６－（（１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）（４－（（２－（２－（２－イソチオシアナトエトキシ）エトキシ）エチル）カルバモイル）フェニル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸

【０３９５】

【化４７】

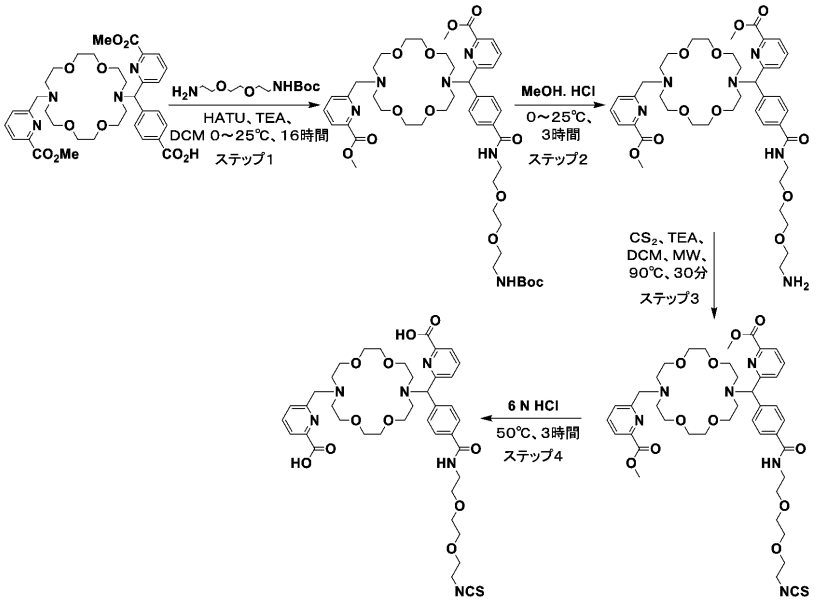


【０３９６】

スキーム２

【０３９７】

【化４８】



ステップ１：撹拌子、４－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）安息香酸（０．４０ｇ、０．６０ｍｍｏｌ）、ｔｅｒｔ－ブチル（２－（２－（２－アミノエトキシ）エトキシ）エチル）カルバメート（０．１５ｇ、０．６０ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（０．１８ｇ、０．７６ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（０．３３ｇ、０．９０ｍｍｏｌ）、及びＤＣＭ（４．０ｍＬ）を、２５ｍＬの三口丸底フラスコに０℃で窒素雰囲気下で加えた。混合物を室温で終夜撹拌した。反応物を水（１０ｍＬ）で処理し、ジクロロメタン（１０ｍＬ×３）で抽出した。合わせた抽出物を１０％$NaHCO_3$（１０ｍＬ）水溶液、ブライン（１０ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて油状物を得た。これをシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して、メチル６－（（４－（（２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－イル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナートを得た（０．１８ｇ）。

ステップ２：撹拌子、メチル６－（（４－（（２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－イル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１８ｇ、０．２０ｍｍｏｌ）、ＭｅＯＨ（１．８ｍＬ）、及びメタノール中のＨＣｌ（４Ｍ、１．０ｍＬ、４．０ｍｍｏｌ）を、１０ｍＬ一口丸底フラスコに０℃で添加し、次いで室温に加温し、２時間撹拌した。揮発物を真空下で除去して、メチル６－（（４－（（２－（２－（２－アミノエトキシ）エトキシ）エチル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１５ｇ）を得、これを精製せずに使用した。

ステップ３：撹拌子、メチル６－（（４－（（２－（２－（２－アミノエトキシ）エトキシ）エチル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシク

ロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１０ｇ、０．１２ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（３７ｍｇ、０．３７ｍｍｏｌ）、乾燥ＤＣＭ（２ｍＬ）、及び二硫化炭素（１４ｍｇ、０．１８ｍｍｏｌ）を、窒素雰囲気下、室温で圧力バイアルに加えた。バイアルを９０℃で３０分間マイクロ波照射した（出力１５０Ｗ）。次いで、バイアルを室温に冷却し、反応混合物をジクロロメタン（１０ｍＬ）で希釈し、次いで、水（５ｍＬ）、１Ｍ　ＨＣｌ（５ｍＬ）、及び水（５ｍＬ）で順次洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて、メチル６－（（４－（（２－（２－（２－イソチオシアナトエトキシ）エトキシ）エチル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（１００ｍｇ）を得て、これを精製せずに使用した。

ステップ４：撹拌子、メチル６－（（４－（（２－（２－（２－イソチオシアナトエトキシ）エトキシ）エチル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１０ｇ、０．１２ｍｍｏｌ）、及びＨＣｌ水溶液（６Ｎ、０．４ｍＬ、２．３４ｍｍｏｌ）を１０ｍＬの一口丸底フラスコに加え、５０℃で３時間撹拌した。反応混合物を室温に冷却し、真空下で濃縮乾固させて油状物を得、これを分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ、５．０μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／アセトニトリル；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、６－（（１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）（４－（（２－（２－（２－イソチオシアナトエトキシ）エトキシ）エチル）カルバモイル）フェニル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸（５．０ｍｇ）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：$C_{40}H_{52}N_6O_{11}S$の計算値：８２４．３４；観測値ｍ／ｚ　［Ｍ＋Ｈ］$^+$　８２４．８。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，CD_3OD）：δ８．２２－８．２０（ｍ，２Ｈ），８．１４－８．０５（ｍ，２Ｈ），７．９４（ｄ，Ｊ＝８．００Ｈｚ，２Ｈ），７．７９（ｄ，Ｊ＝８．００Ｈｚ，２Ｈ），７．７３－７．６７（ｍ，２Ｈ），６．１６（ｓ，１Ｈ），４．７７（ｓ，２Ｈ），３．９３－４．００（ｍ，８Ｈ），３．５９－３．７０（ｍ，２７Ｈ），３．４７－３．４４（ｍ，２Ｈ）。

【０３９８】

（実施例３）

６－（（４－（（６－アミノヘキシル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸

及び

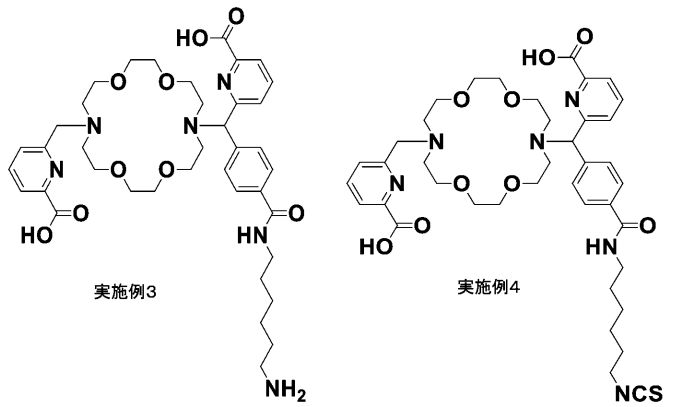
【０３９９】

（実施例４）

６－（（１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）（４－（（６－イソチオシアナトヘキシル）カルバモイル）フェニル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸

【０４００】

【化４９】

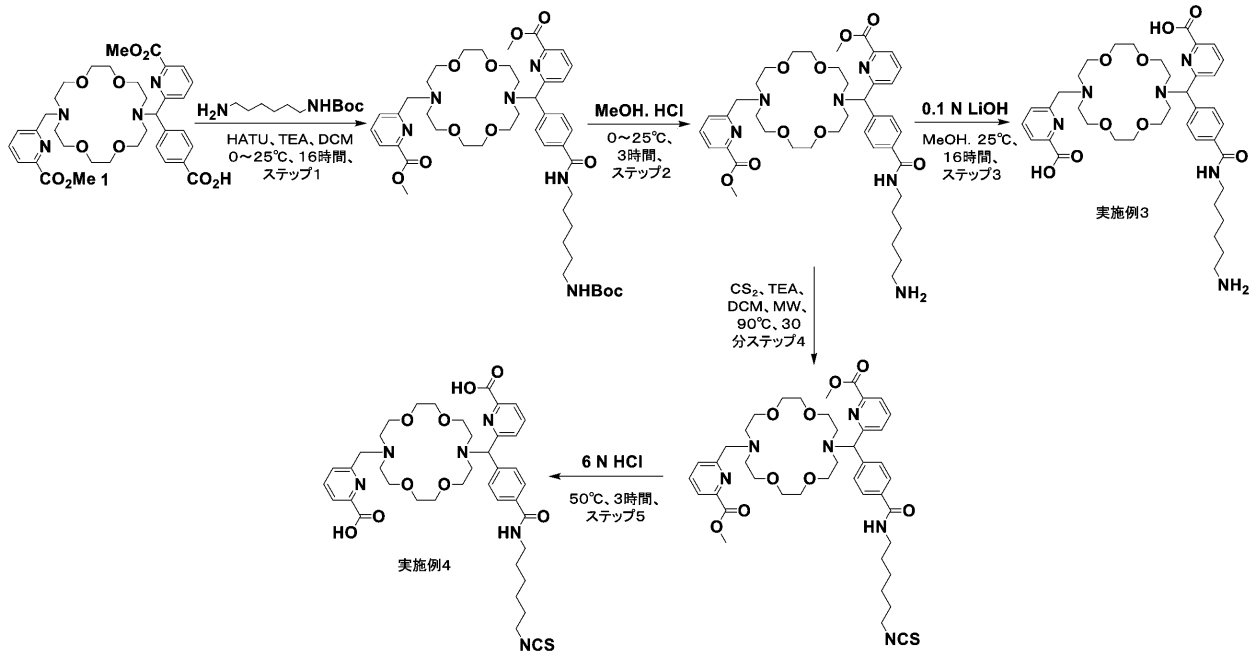


【０４０１】

スキーム３

【０４０２】

【化５０】



ステップ１：撹拌子、４－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）安息香酸（０．１２ｇ、０．１８ｍｍｏｌ）、ｔｅｒｔ－ブチル（６－アミノヘキシル）カルバメート（３８ｍｇ、０．１８ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（５４ｍｇ、０．５４ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（０．１０ｇ、０．２７ｍｍｏｌ）、及びＤＣＭ（４．０ｍＬ）を、２５ｍＬ三口丸底フラスコに０℃で窒素雰囲気下で加えた。次に、反応混合物を室温に加温し、終夜撹拌した。反応混合物を次に水（１０ｍＬ）で処理し、ジクロロメタン（１０ｍＬ×３）で抽出した。合わせた抽出物を１０％　ＮａＨＣＯ$_3$水溶液（１０ｍＬ）、ブライン（１０ｍＬ）で洗浄し、無水Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて油状物を得た。油状物をシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％　ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）により精製して、メチル６－（（４－（（６－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキシル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（７０ｍｇ）をゴム状油状物として得た。

ステップ２：撹拌子、メチル６－（（４－（（６－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）ヘキシル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（７０ｍｇ、０．０８０ｍｍｏｌ）、ＭｅＯＨ（１．５ｍＬ）、及びメタノール中のＨＣｌ（４Ｍ、０．４ｍＬ、１．６ｍｍｏｌ）を、２５ｍＬ丸底フラスコに０℃で添加し、続いて室温にし、２時間撹拌した。揮発物を真空下で除去して、メチル６－（（４－（（６－アミノヘキシル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（３０ｍｇ）を得、これを精製せずに使用した。

ステップ３：撹拌子、メチル６－（（４－（（６－アミノヘキシル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（３０ｍｇ、０．０３８ｍｍｏｌ）、ＬｉＯＨ水溶液（１．１ｍＬ、０．１Ｎ、０．１１ｍｍｏｌ）、及びＭｅＯＨ（１．０ｍＬ）を８ｍＬの反応バイアルに加え、室温で一晩撹拌した。次いで、反応混合物を酢酸で処理してｐＨ約６．５にし、続いて室温で真空下で濃縮乾固させた。得られた生成物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ、５．０μｍ；移動相：１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液／ＡＣＮ；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、実施例３：６－（（４－（（６－アミノヘキシル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸（１０ｍｇ）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：$C_{39}H_{54}N_6O_9$の計算値；７５０．４０；観測値ｍ／ｚ　[Ｍ＋Ｈ]$^+$　７５１．３。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，CD_3OD）：δ８．２２（ｄ，Ｊ　＝　１．６０Ｈｚ，２Ｈ），８．２１－８．０６（ｍ，２Ｈ），７．９２（ｄ，Ｊ＝８．４０Ｈｚ，２Ｈ），７．８０（ｄ，Ｊ＝８．４０Ｈｚ，２Ｈ），７．７５－７．６９（ｍ，２Ｈ），６．２０（ｓ，１Ｈ），４．７０（ｓ，２Ｈ），４．０２－３．９２（ｍ，８Ｈ），３．７６－３．６２（ｍ，１４Ｈ），３．５１－３．３２（ｍ，４Ｈ），２．９３（ｔ，Ｊ＝８．００Ｈｚ，２Ｈ），１．６７－１．６４（ｍ，４Ｈ），１．４６－１．４５（ｍ，４Ｈ）。

ステップ４：撹拌子、メチル６－（（４－（（６－アミノヘキシル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１０ｇ、０．１３ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（３９ｍｇ、０．３８ｍｍｏｌ）、乾燥ＤＣＭ（２ｍＬ）、及び二硫化炭素（１５ｍｇ、０．１９ｍｍｏｌ）を、窒素雰囲気下、室温で圧力バイアルに加えた。バイアルを９０℃で３０分間マイクロ波照射した（出力１５０Ｗ）。次いで、バイアルを室温に冷却し、反応混合物をジクロロメタン（１０ｍＬ）で希釈し、水（５ｍＬ）、１Ｍ　ＨＣｌ（５ｍＬ）、及び水（５ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて、メチル６－（（４－（（６－イソチオシアナトヘキシル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１ｇ）を得て、これを精製せずに使用した。

ステップ５：撹拌子、メチル６－（（４－（（６－イソチオシアナトヘキシル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１０ｇ、０．１２ｍｍｏｌ）、及びＨＣｌ水溶液（６Ｎ、０．４ｍＬ、２．４ｍｍｏｌ）を１０ｍＬ丸底フラスコに加え、次いで５０℃で３時間撹拌した。次いで、反応混合物を室温に冷却し、真空下で濃縮乾固させて残留物を得、これを分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ、３．５μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／アセトニトリル；流速：２．０ｍＬ／分）により精

製して、実施例４：６－（（１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）（４－（（６－イソチオシアナトヘキシル）カルバモイル）フェニル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸（１５ｍｇ）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：$C_{40}H_{52}N_6O_9S$の計算値：７９２．３５；観測値ｍ／ｚ　［Ｍ＋Ｈ］$^+$　７９２．８。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，CD_3OD）：δ８．２３－８．２０（ｍ，２Ｈ），８．１５－８．０６（ｍ，２Ｈ），７．９２（ｄ，Ｊ＝８．４０Ｈｚ，２Ｈ），７．７９（ｄ，Ｊ＝８．４０Ｈｚ，２Ｈ），７．７４　－　７．６８（ｍ，２Ｈ），６．１７（ｓ，１Ｈ），４．７７（ｓ，２Ｈ），４．０１－３．９３（ｍ，８Ｈ），３．７５－３．５６（ｍ，１６Ｈ），３．４２－３．３３（ｍ，５Ｈ），１．７４－１．６４（ｍ，４Ｈ），１．５０－１．４４（ｍ，４Ｈ）。

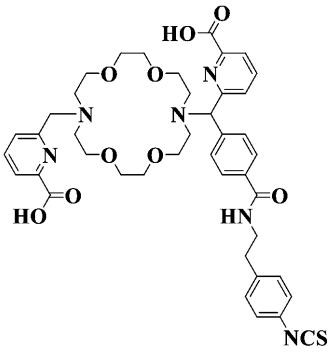
【０４０３】

（実施例５）

６－（（１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）（４－（（４－イソチオシアナトフェネチル）カルバモイル）フェニル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸

【０４０４】

【化５１】

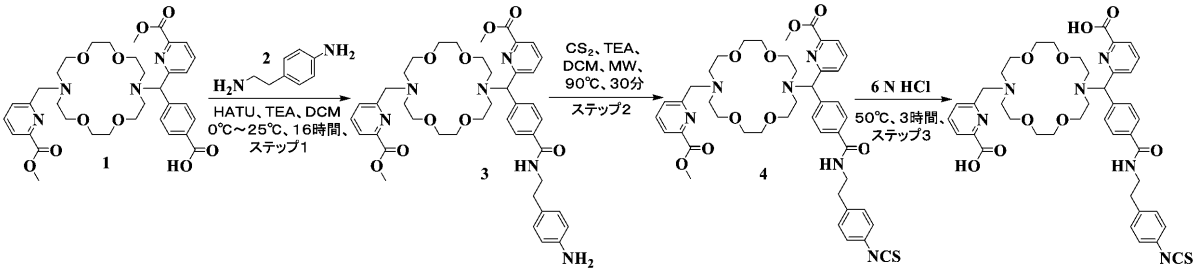


【０４０５】

スキーム４

【０４０６】

【化５２】



ステップ１：撹拌子、４－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）安息香酸（０．２５ｇ、０．３７ｍｍｏｌ）、４－（２－アミノエチル）アニリン（６０ｍｇ、０．３７ｍｍｏｌ）、ＴＥＡ（０．１１ｇ、０．１５ｍＬ、１．１ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（０．２１ｇ、０．５５ｍｍｏｌ、及びＤＣＭ（５ｍＬ）を、２５ｍＬの三口丸底フラスコに０℃で窒素雰囲気下で添加した。反応混合物を室温で一晩撹拌した後、水（１０ｍＬ）で処理して、ジクロロメタン（１０ｍＬ×３）で抽出した。合わせた抽出物を１０％　$NaHCO_3$水溶液（１０ｍＬ）及び食塩水（１０ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて生成物を得、これをシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％　ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して、メチル６－（（４－（（４－アミノフ

ェネチル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１２ｇ）を得た。

ステップ２：撹拌子、メチル６－（（４－（（４－アミノフェネチル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１２ｇ、０．１５ｍｍｏｌ）、ＴＥＡ（４５ｍｇ、６５μＬ、０．４５ｍｍｏｌ）、ＤＣＭ（３ｍＬ）、及びCS_2（１７ｍｇ、０．２３ｍｍｏｌ）を、窒素雰囲気下、室温で１０ｍＬマイクロ波圧力バイアルに添加した。反応混合物を９０℃で３０分間マイクロ波照射（出力１５０Ｗ）した。次いで、反応混合物を室温に冷却し、ジクロロメタン（１０ｍＬ）で希釈し、水（５ｍＬ）、１Ｍ　ＨＣｌ（５ｍＬ）、及び水（５ｍＬ）で順次洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮乾固させて、メチル６－（（４－（（４－イソチオシアネートフェネチル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１２ｇ）を得、これを精製せずに使用した。

ステップ３：撹拌子、メチル６－（（４－（（４－イソチオシアネートフェネチル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１２ｇ、０．１４ｍｍｏｌ）、及びＨＣｌ水溶液（０．５０ｍＬ、６Ｎ、２．８ｍｍｏｌ）を、１０ｍＬの一口丸底フラスコに添加し、５０℃で３時間撹拌した。反応混合物を室温に冷却し、減圧下で濃縮乾固させ、未精製の生成物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ、５．０μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／アセトニトリル；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、６－（（１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）（４－（（４－イソチオシアナトフェネチル）カルバモイル）フェニル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸（３０ｍｇ）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：$C_{42}H_{48}N_5O_{10}S$の計算値；　８１２．３２；観測値ｍ／ｚ　［Ｍ＋Ｈ］$^+$　８１２．９。^{1}Ｈ　ＮＭＲ　（４００ＭＨｚ，CD_3OD）：δ８．２２（ｄ，Ｊ＝０．８０Ｈｚ，２Ｈ），８．０６－８．２１（ｍ，２Ｈ），７．８５（ｄ，Ｊ＝８．４０Ｈｚ，２Ｈ），７．６８－７．７８（ｍ，４Ｈ），７．３１（ｄ，Ｊ＝８．４０Ｈｚ，２Ｈ），７．２１（ｄ，Ｊ＝２．００Ｈｚ，２Ｈ），６．１８（ｓ，１Ｈ），４．７７（ｓ，２Ｈ），３．７０－４．００（ｍ，７Ｈ），３．６０－３．６７（ｍ，１６Ｈ），３．４４－３．４９（ｍ，２Ｈ），２．９０－３．１０（ｍ，３Ｈ）。

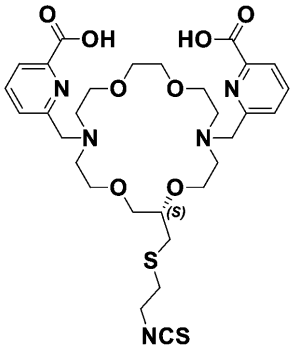
【０４０７】

（実施例６）

（Ｓ－６，６’－（（２－（（（２－イソチオシアナトエチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸

【０４０８】

【化５３】

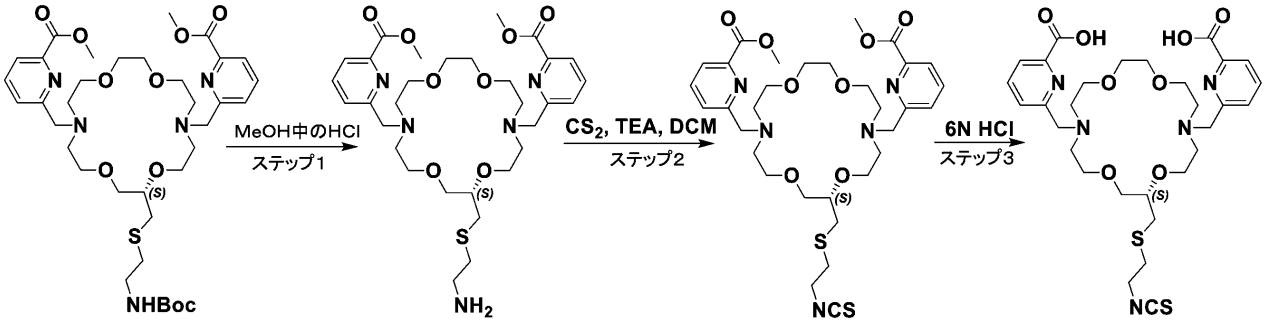


【０４０９】

スキーム５

【０４１０】

【化５４】



ステップ１：撹拌子、１（メチル６－（（４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート）（０．１０ｇ、０．１５ｍｍｏｌ）、ＭｅＯＨ（０．５ｍＬ）及びメタノール中ＨＣｌ（４Ｍ、０．６ｍＬ、４．０ｍｍｏｌ）を、２５ｍＬの一口丸底フラスコに０℃で加え、次いで室温にし、２時間撹拌した。揮発物を真空下で除去して、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－アミノエチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（５５ｍｇ）を得て、これを精製せずに次のステップで使用した。

ステップ２：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－アミノエチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（５０ｍｇ、０．１０ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（２４ｍｇ、０．２４ｍｍｏｌ）、ＤＣＭ（２ｍＬ）及び二硫化炭素（１２ｍｇ、０．１６ｍｍｏｌ）を、マイクロ波バイアルに室温で窒素雰囲気下で加えた。バイアルを９０℃で３０分間マイクロ波照射した（出力１５０Ｗ）。次いで、バイアルを室温に冷却し、反応混合物をジクロロメタン（１０ｍＬ）で希釈し、水（５ｍＬ）、１Ｍ　ＨＣｌ（５ｍＬ）、水（５ｍＬ）で順次洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮乾固させ、シリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％　ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）に供して、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－イソチオシアナトエチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナートを黄色の固体（２０ｍｇ）として得た。

ステップ３：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－イソチオシアナトエチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタ

デカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（２０ｍｇ、０．０３０ｍｍｏｌ）及びＨＣｌ水溶液（６Ｎ、０．１ｍＬ、０．６ｍｍｏｌ）を１０ｍＬの一口丸底フラスコに加え、室温で一晩撹拌した。反応混合物を真空中で濃縮乾固させ、得られた残留物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８（１９×１５０ｍｍ）５．０μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／アセトニトリル；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、（Ｓ）－６，６’－（（２－（（（２－イソチオシアナトエチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸（６ｍｇ）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：　$C_{30}H_{41}N_5O_8S_2$の計算値：６６３．２４；観測値ｍ／ｚ　［Ｍ＋Ｈ］$^+$　６６４．２。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）：δ９．７８（ｓ，１Ｈ），８．１０（ｓ，４Ｈ），７．７８（ｄ，Ｊ＝６．００Ｈｚ，２Ｈ），４．６９（ｓ，４Ｈ），３．９６－３．５２（ｍ，２３Ｈ），２．８５（ｔ，Ｊ＝６．４０Ｈｚ，２Ｈ），２．７０（ｔ，Ｊ＝８．００Ｈｚ，２Ｈ）。

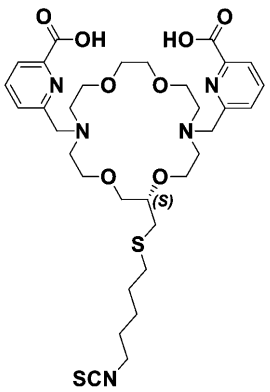
【０４１１】

（実施例７）

（Ｓ）－６，６’－（（２－（（（５－イソチオシアナトペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸

【０４１２】

【化５５】

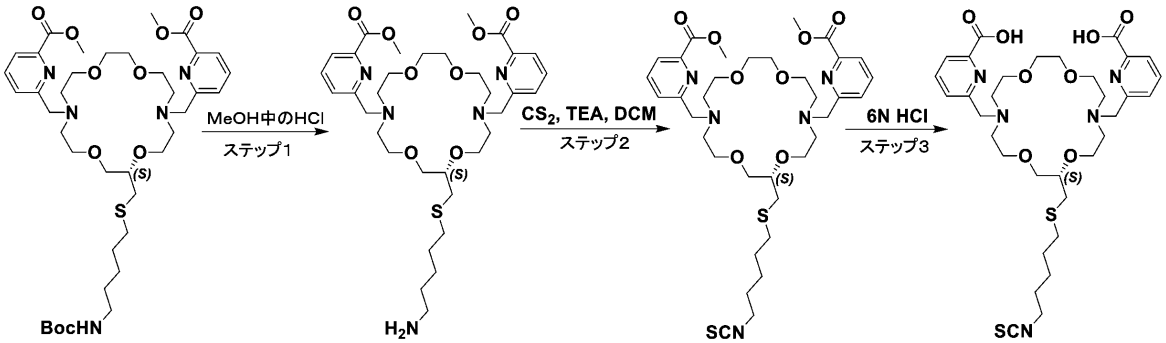


【０４１３】

スキーム６

【０４１４】

【化５６】



ステップ１：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（５－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）ペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１２ｇ、０．１５ｍｍｏｌ）、ＭｅＯＨ（０．５ｍＬ）、及びメタノール中のＨＣｌ（４Ｍ、０．６ｍＬ、４．０ｍｍｏｌ）を、２５ｍＬの一口丸底フラス

コに０℃で加え、室温にし、２時間撹拌した。次いで、揮発性物質を真空下で除去して、ジメチル６，６’－（（２－（（（５－アミノペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（７０ｍｇ）を得て、これを精製せずに使用した。

ステップ２：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（５－アミノペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（７０ｍｇ、０．１０ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（２０ｍｇ、０．２０ｍｍｏｌ）、乾燥ＤＣＭ（２ｍＬ）及び二硫化炭素（１５ｍｇ、０．２０ｍｍｏｌ）を、マイクロ波バイアルに室温で窒素雰囲気下で添加した。反応混合物にマイクロ波照射（出力１５０Ｗ）を９０℃で３０分間行った。バイアルを室温にし、反応混合物をジクロロメタン（１０ｍＬ）で希釈し、水（５ｍＬ）、１Ｍ　ＨＣｌ（５ｍＬ）及び水（５ｍＬ）で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウム（Na_2SO_4）で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて残留物を得た。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％　ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）に供して、ジメチル６，６’－（（２－（（（５－イソチオシアナトペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナートを黄色固体（３０ｍｇ）として得た。

ステップ３：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（５－イソチオシアナトペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（３０ｍｇ、０．０４０ｍｍｏｌ）、及びＨＣｌ水溶液（６Ｎ、０．２ｍＬ、０．８ｍｍｏｌ）を１０ｍＬの一口丸底フラスコに添加し、室温で一晩撹拌した。反応混合物を真空下で乾燥するまで濃縮し、濃縮物をＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ、５．０μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／アセトニトリル；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、（Ｓ）－６，６’－（（２－（（（５－イソチオシアナトペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸（１２ｍｇ）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：$C_{33}H_{47}N_5O_8S_2$の計算値：７０５．２９；観測値ｍ／ｚ　[Ｍ＋Ｈ]$^+$　７０６．２。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6）：δ１３．４０（ｓ，１Ｈ），９．９０（ｓ，１Ｈ），８．１７－８．０９（ｍ，４Ｈ），７．７８（ｄ，Ｊ＝６．８０Ｈｚ，２Ｈ），４．７０（ｓ，４Ｈ），３．９３－３．１７（ｍ，２７Ｈ），２．６８－２．６７（ｍ，２Ｈ），１．６４－１．６０（ｍ，２Ｈ），１．５３－１．４９（ｍ，２Ｈ），１．４０－１．３８（ｍ，２Ｈ）。

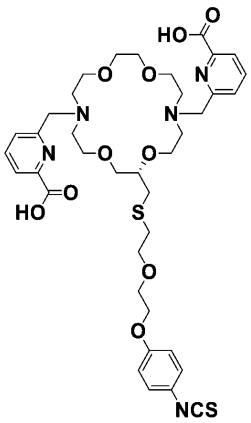
【０４１５】

（実施例８）

（Ｓ）－６，６’－（（２－（（（２－（２－（４－イソチオシアナトフェノキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸

【０４１６】

【化５７】

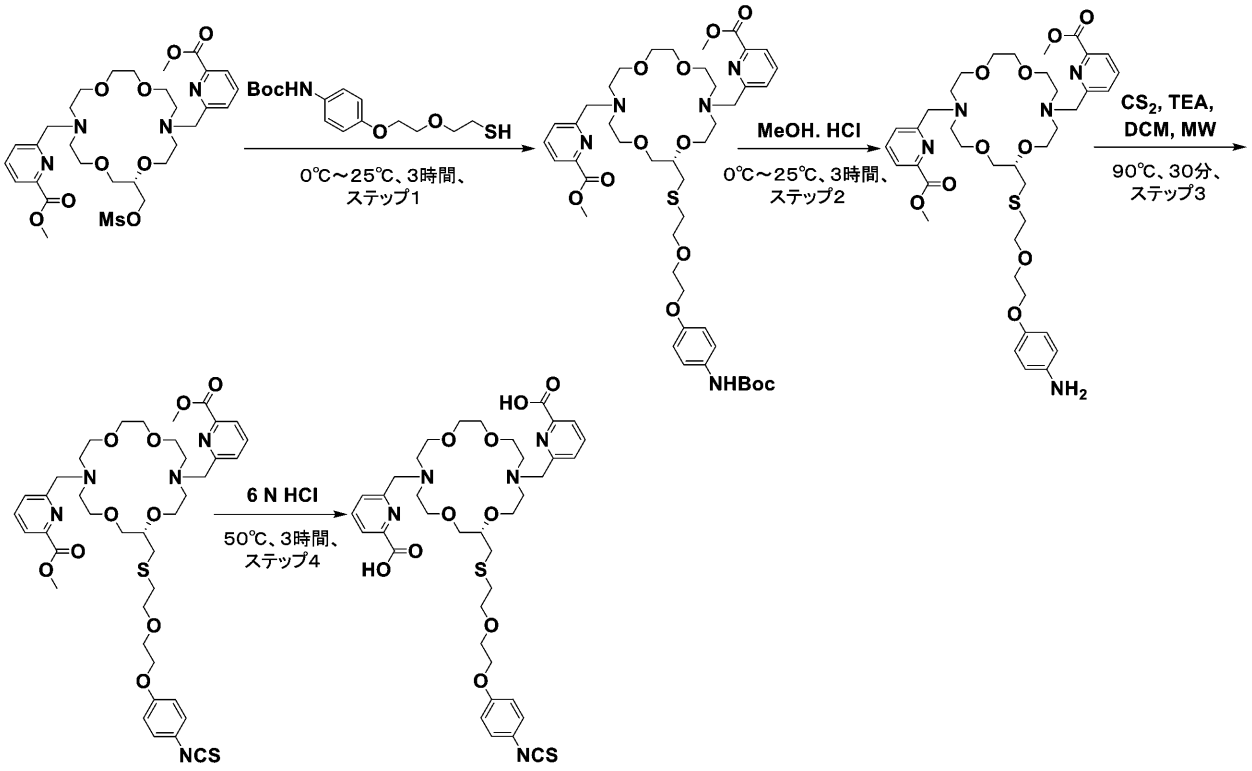


【０４１７】

スキーム７

【０４１８】

【化５８】

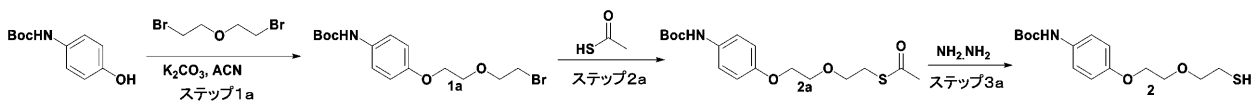


【０４１９】

スキーム７ａ

【０４２０】

【化５９】



スキーム７ａ、ステップ１ａ：撹拌子、ｔｅｒｔ－ブチル（４－ヒドロキシフェニル）カルバメート（４．５ｇ、２２ｍｍｏｌ）、１－ブロモ－２－（２－ブロモエトキシ）エタン（５．０ｇ、２２ｍｍｏｌ）、K_2CO_3（４．６ｇ、４３ｍｍｏｌ）及びＡＣＮ（４５ｍＬ）を窒素雰囲気下で２５０ｍＬ三口丸底フラスコに加え、得られた反応混合物を

窒素雰囲気下で８０℃で１６時間加熱した。反応混合物を室温に冷却し、Ｃｅｌｉｔｅ（登録商標）を通して濾過し、真空中で濃縮乾固させて濃縮物を得、これをシリカゲルクロマトグラフィー（０～２０％　ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）によって精製して、生成物ｔｅｒｔ－ブチル（４－（２－（２－ブロモエトキシ）エトキシ）フェニル）カルバメート（２．０ｇ）を得た。

ステップ２ａ：撹拌子、ｔｅｒｔ－ブチル（４－（２－（２－ブロモエトキシ）エトキシ）フェニル）カルバメート（２．０ｇ、５．６ｍｍｏｌ）、エタンチオＳ－酸（０．４２ｇ、５．６ｍｍｏｌ）、K_2CO_3（１．５ｇ、１１ｍｍｏｌ）及びＡＣＮ（５０ｍＬ）を、２５０ｍＬ三口丸底フラスコに窒素雰囲気下で加えた。反応混合物を８０℃で２時間撹拌し、次いで室温に冷却し、Ｃｅｌｉｔｅ（登録商標）を通して濾過し、真空中で濃縮乾固させた。濃縮物を、中性アルミナクロマトグラフィー（０～５０％　ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）を用いて精製して、Ｓ－（２－（２－（４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェノキシ）エトキシ）エチル）エタンチオエート（１．８ｇ）を得た。

ステップ３ａ：撹拌子、Ｓ－（２－（２－（４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェノキシ）エトキシ）エチル）エタンチオエート（１．８ｇ、５．１ｍｍｏｌ）、エタノール（２０ｍＬ）及びヒドラジン一水和物（０．２４ｇ、０．２４ｍＬ、７．６ｍｍｏｌ）を窒素下で２５０ｍＬの一口丸底フラスコに加え、８０℃で１時間撹拌した。次いで、反応混合物を室温に冷却し、真空中で濃縮乾固させて、濃縮物を得、これをシリカゲルクロマトグラフィー（５～１０％　ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）により精製して、ｔｅｒｔ－ブチル（４－（２－（２－メルカプトエトキシ）エトキシ）フェニル）カルバメート（０．５ｇ）を無色油状物として得た。

スキーム７、ステップ１：ｔｅｒｔ－ブチル（４－（２－（２－メルカプトエトキシ）エトキシ）フェニル）カルバメート（０．４０ｇ、１．０ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（３．０ｍＬ）からなる溶液を、水素化ナトリウム（０．０６０ｇ、鉱油中６０％、１．５ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（３．０ｍＬ）中の懸濁液を含有する５０ｍＬの三口丸底フラスコに、０℃及び窒素雰囲気下で５分間かけて滴下した。添加の完了後、反応混合物を室温に温め、１５分間撹拌した。混合物を０℃に再冷却し、ジメチル６，６’－（（２－（（（メチルスルホニル）オキシ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．５ｇ、０．７ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（３．０ｍＬ）からなる溶液を滴下した。添加が完了したら、反応混合物をゆっくりと室温に加温し、１．５時間撹拌した。反応物を飽和NH_4Cl（０．２ｍＬ）でゆっくり処理し、次いで、濃縮乾固して油状物を得た。油状物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ　５．０μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／アセトニトリル；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－（２－（４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェノキシル）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナートを褐色の油状物として得た（０．１５ｇ）。

ステップ２：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－（２－（４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェノキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１５ｇ、０．１６ｍｍｏｌ）、ＭｅＯＨ（１．０ｍＬ）及びメタノール中のＨＣｌ（４Ｍ、０．８０ｍＬ、３．２ｍｍｏｌ）を、２５ｍＬの一口丸底フラスコに０℃で添加し、次いで室温にし、３時間撹拌した。揮発物を減圧下で除去して、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－（２－（４－アミノフェノキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１２ｇ）を得て、これを精製せずに使用した。

ステップ３：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－（２－（４－アミノフェ

ノキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１２ｇ、０．１５ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（４６ｍｇ、０．４６ｍｍｏｌ）、乾燥ＤＣＭ（３ｍＬ）及び二硫化炭素（１７ｍｇ、０．２２ｍｍｏｌ）を、窒素雰囲気下、室温で圧力バイアルに加えた。反応混合物を９０℃で３０分間マイクロ波照射（出力１５０Ｗ）した。反応混合物を室温に冷却し、ジクロロメタン（１０ｍＬ）で希釈し、水（５ｍＬ）、１Ｍ　ＨＣｌ（５ｍＬ）及び水（５ｍＬ）で順次洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮乾固させて、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－（２－（４－イソチオシアナトフェノキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１２ｇ）を得た。これを精製せずに使用した。

ステップ４：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－（２－（４－イソチオシアネートフェノキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１２ｇ、０．１５ｍｍｏｌ）及びＨＣｌ水溶液（６Ｎ、０．５１ｍＬ、３．１ｍｍｏｌ）を１０ｍＬの一口丸底フラスコに添加し、５０℃で３時間撹拌した。反応混合物を室温に冷却し、減圧下で乾燥するまで濃縮し、濃縮物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ　５．０μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／アセトニトリル；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、（Ｓ）－６，６’－（（２－（（（２－（２－（４－イソチオシアナトフェノキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸（４０ｍｇ、３７％）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：$C_{38}H_{49}N_5O_{10}S_2$の計算値：７９９．２９；観測値ｍ／ｚ　［Ｍ＋Ｈ］$^+$　７９９．９。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，CD_3OD）：δ８．２３－８．２０（ｍ，２Ｈ），８．１５－８．０９（ｍ，２Ｈ），７．７４－７．７１（ｍ，２Ｈ），７．１９（ｄ，Ｊ＝８．８０Ｈｚ，２Ｈ），６．９２（ｄ，Ｊ＝９．２０Ｈｚ，２Ｈ），４．８１（ｓ，２Ｈ），４．７７（ｓ，２Ｈ），４．０９－４．１１（ｍ，４Ｈ），３．９２－３．９５（ｍ，６Ｈ），３．７９（ｔ，Ｊ＝４．００Ｈｚ，３Ｈ），３．６６－３．７１（ｍ，１６Ｈ），２．７０－２．７６（ｍ，４Ｈ）。

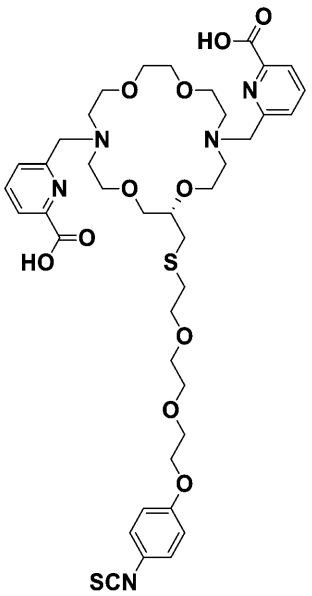
【０４２１】

（実施例９）

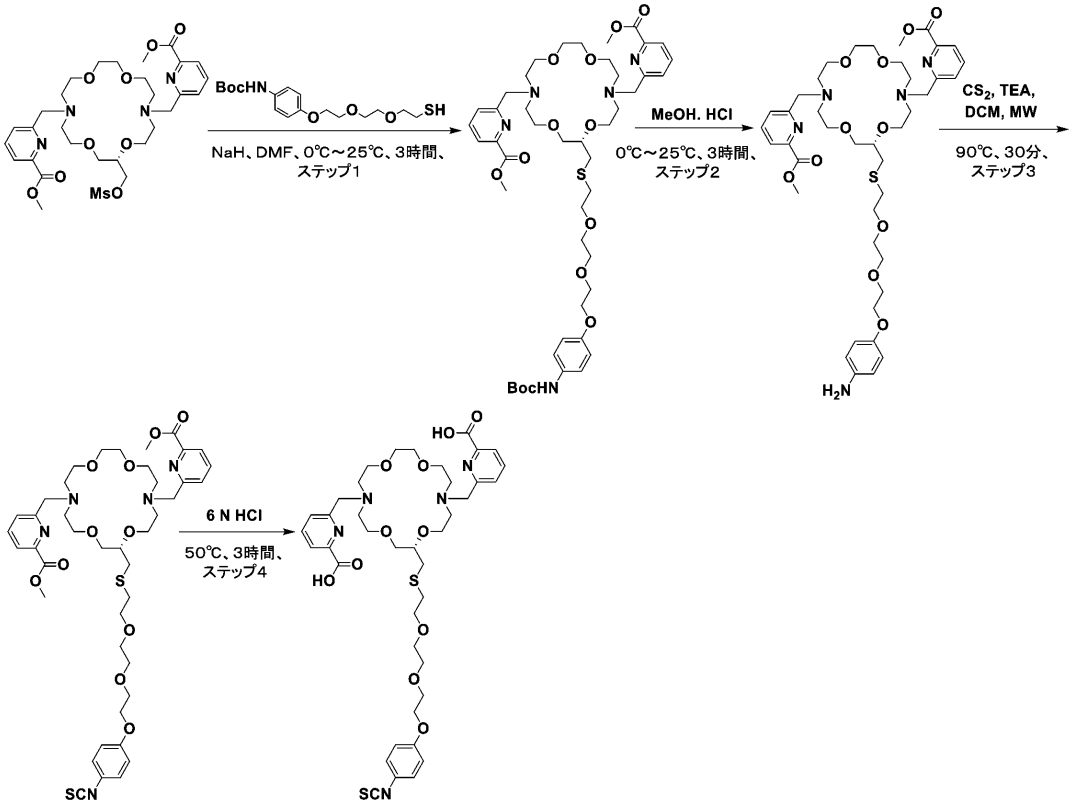
（Ｓ）－６，６’－（（２－（（（２－（２－（２－（４－イソチオシアナトフェノキシ）エトキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸

【０４２２】

【化６０】

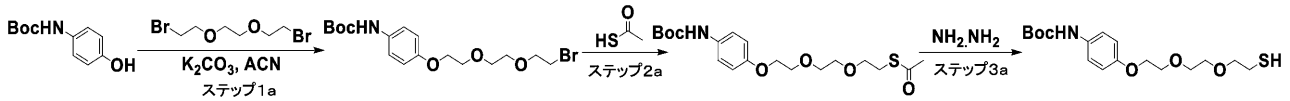


【０４２３】
スキーム８
【０４２４】
【化６１】



【０４２５】
スキーム８ａ
【０４２６】

【化６２】



スキーム８ａ、ステップ１ａ：撹拌子、ｔｅｒｔ－ブチル（４－ヒドロキシフェニル）カルバメート（３．５ｇ、１７ｍｍｏｌ）、１，２－ビス（２－ブロモエトキシ）エタン（４．６ｇ、１７ｍｍｏｌ）、K_2CO_3（４．６ｇ、３３ｍｍｏｌ）、及びＡＣＮ（４０ｍＬ）を２５０ｍＬの三口丸底フラスコに入れた後、窒素雰囲気下、８０℃で４８時間撹拌した。反応混合物を室温に冷却し、Ｃｅｌｉｔｅ（登録商標）を通して濾過し、真空中で濃縮乾固させて濃縮物を得、これをシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％　ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）により精製して、ｔｅｒｔ－ブチル（４－（２－（２－（２－ブロモエトキシ）エトキシ）エトキシ）フェニル）カルバメート（４．０ｇ）を褐色油状物として得た。

ステップ２ａ：撹拌子、ｔｅｒｔ－ブチル（４－（２－（２－（２－ブロモエトキシ）エトキシ）エトキシ）フェニル）カルバメート（４．０ｇ、９．９ｍｍｏｌ）、エタンチオＳ－酸（０．７５ｇ、９．９ｍｍｏｌ）、K_2CO_3（２．７ｇ、２０ｍｍｏｌ）及びＡＣＮ（５０ｍＬ）を２５０ｍＬ三口丸底フラスコに窒素雰囲気下で加え、反応混合物を６０℃で２時間、窒素雰囲気下で加熱した。反応混合物を室温に冷却し、Ｃｅｌｉｔｅ（登録商標）を通して濾過し、真空中で濃縮乾固させ、濃縮物をアルミナクロマトグラフィー（０～５０％　ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）によって精製して、Ｓ－（２－（２－（２－（４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェノキシ）エトキシ）エトキシ）エチル）エタンチオエート（３．０ｇ）を褐色油状物として得た。

ステップ３ａ：撹拌子、Ｓ－（２－（２－（２－（４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェノキシ）エトキシ）エトキシ）エチル）エタンチオエート（３．０ｇ、７．５ｍｍｏｌ）、エタノール（５０ｍＬ）及びヒドラジン一水和物（０．３６ｇ、０．３６ｍＬ、１１ｍｍｏｌ）を窒素下で２５０ｍＬの一口丸底フラスコに加え、８０℃で１時間撹拌した。反応混合物を室温に冷却し、真空中で濃縮乾固させ、濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィー（５～１０％　ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）によって精製して、ｔｅｒｔ－ブチル（４－（２－（２－（２－メルカプトエトキシ）エトキシ）エトキシ）フェニル）カルバメート（１．０ｇ）を無色油状物として得た。

スキーム７、ステップ１：ｔｅｒｔ－ブチル（４－（２－（２－（２－メルカプトエトキシ）エトキシ）エトキシ）フェニル）カルバメート（０．４０ｇ、１．０ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（３．０ｍＬ）からなる溶液を、水素化ナトリウム（０．０６０ｇ、鉱油中６０％、１．５ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（３．０ｍＬ）中の懸濁液を含有する５０ｍＬの三口丸底フラスコに、０℃及び窒素雰囲気下で５分間かけて滴下した。添加の完了後、反応混合物を室温にし、１５分間連続的に撹拌した。混合物を０℃に再冷却し、ジメチル６，６’－（（２－（（（メチルスルホニル）オキシ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．５ｇ、０．７ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（３．０ｍＬ）からなる溶液を１０分間かけて滴下した。添加の完了後、反応混合物をゆっくりと室温に温め、１．５時間撹拌した。次に、反応混合物を飽和NH_4Cl水溶液（０．２ｍＬ）でゆっくり処理し、濃縮乾固させて、油状物を得た。油状物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　（１９×１５０ｍｍ）５．０μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／アセトニトリル；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－（２－（２－（４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェノキシ）エトキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１５ｇ、２１％）を褐色の油状物として得た。

ステップ２：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－（２－（２－（４－（（

ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェノキシ）エトキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１５ｍｇ、０．１６ｍｍｏｌ）、ＭｅＯＨ（１．０ｍＬ）及びメタノール中ＨＣｌ（４　Ｍ、０．８０ｍＬ、３．２ｍｍｏｌ）を、２５ｍＬ一口丸底フラスコに０℃で添加した。反応混合物を放置して室温になるまで温め、

３時間撹拌した。揮発性物質を真空下で除去して、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－（２－（２－（４－アミノフェノキシ）エトキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１２ｇ）を得て、これを精製せずに次のステップで使用した。

ステップ３：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－（２－（２－（４－アミノフェノキシ）エトキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１２ｇ、０．１４ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（４４ｍｇ、０．４３ｍｍｏｌ）、乾燥ＤＣＭ（５ｍＬ）及び二硫化炭素（１７ｍｇ、０．２２ｍｍｏｌ）を、マイクロ波バイアルに室温で窒素雰囲気下で添加した。反応混合物を９０℃で３０分間マイクロ波照射した（出力１５０Ｗ）。次いで、反応混合物を室温に冷却し、ジクロロメタン（１０ｍＬ）で希釈し、水（５ｍＬ）、１Ｍ　ＨＣｌ（５ｍＬ）、及び水（５ｍＬ）で順次洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮乾固させて、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－（２－（２－（４－イソチオシアナトフェノキシ）エトキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１２ｇ）を得て、これを精製せずに次のステップで使用した。

ステップ４：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（２－（２－（２－（４－イソチオシネートトフェノキシ）エトキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１２ｍｇ、０．１４ｍｍｏｌ）及びＨＣｌ水溶液（６　Ｎ、０．５０ｍＬ、２．８ｍｍｏｌ）を１０ｍＬの一口丸底フラスコに添加し、５０℃で３時間撹拌した。反応混合物を室温に冷却し、減圧下で濃縮乾固させて残留物を得て、これを分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ　５．０μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／アセトニトリル；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、（Ｓ）－６，６’－（（２－（（（２－（２－（２－（４－イソチオシアナトフェノキシ）エトキシ）エトキシ）エチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸（５０ｍｇ）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：$C_{40}H_{53}N_5O_{11}S_2$の計算値：８４３．３２；観測値ｍ／ｚ　［Ｍ＋Ｈ］$^+$　８４３．９。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，CD_3OD）：δ８．２４－８．２１（ｍ，２Ｈ），８．２１－８．１１（ｍ，２Ｈ），７．７４（ｄ，Ｊ＝７．６０Ｈｚ，２Ｈ），７．２３－７．２０（ｍ，２Ｈ），６．９７－６．９５（ｍ，２Ｈ），４．８４－４．７９（ｍ，５Ｈ），４．１４－４．１２（ｍ，４Ｈ），３．９７－３．９４（ｍ，６Ｈ），３．８３－３．５９（ｍ，２３Ｈ），２．７５－２．６７（ｍ，４Ｈ）。

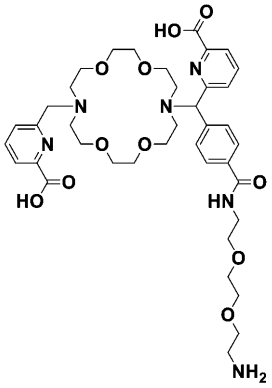
【０４２７】

（実施例１０）

６－（（４－（（２－（２－（２－アミノエトキシ）エトキシ）エチル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸

【０４２８】

【化６３】

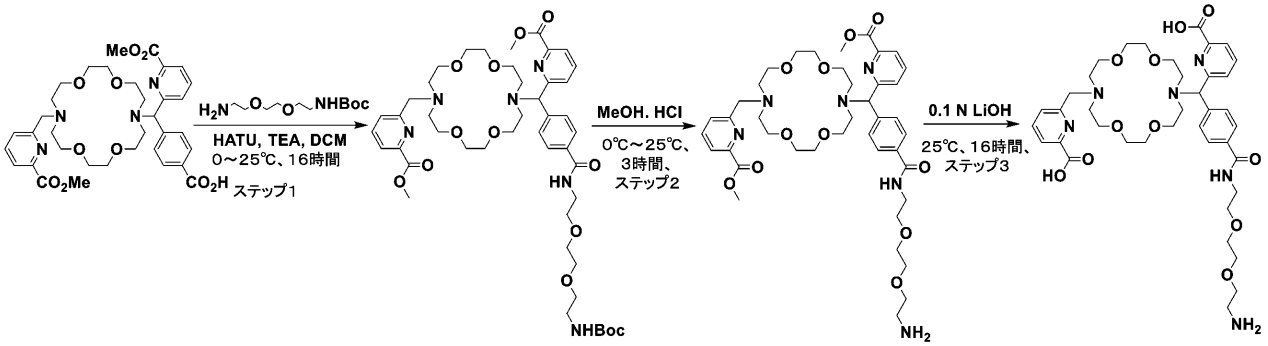


【０４２９】

スキーム９

【０４３０】

【化６４】



ステップ１：撹拌子、４－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）安息香酸（０．４０ｇ、０．６０ｍｍｏｌ）、ｔｅｒｔ－ブチル（２－（２－（２－アミノエトキシ）エトキシ）エチル）カルバメート（０．１５ｇ、０．６０ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（０．１８ｇ、０．７６ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（０．３３ｇ、０．９０ｍｍｏｌ）、及びＤＣＭ（４．０ｍＬ）を、２５ｍＬ三口丸底フラスコに０℃で窒素雰囲気下で加えた。混合物を室温で一晩撹拌し、水（１０ｍＬ）で希釈し、ジクロロメタン（１０ｍＬ×３）で抽出した。合わせた抽出物を１０％　$NaHCO_3$水溶液（１０ｍＬ）、及びブライン（１０ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて濃縮物を得た。これをシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％　ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）により精製して、メチル６－（（４－（（２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－イル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナートを得た（０．１８ｇ）。

ステップ２：撹拌子、メチル６－（（４－（（２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－イル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１８ｇ、０．２０ｍｍｏｌ）、ＭｅＯＨ（１．８ｍＬ）、及びメタノール中のＨＣｌ（４Ｍ、１．０ｍＬ、４．０ｍｍｏｌ）を１０ｍＬの一口丸底フラスコに０℃で加え、次いで室温にし、２時間撹拌した。揮発物を真空下で除去して、メチル６－（（４－（（２－（２－（２－アミノエトキシ）エトキシ）エチル）カルバモイル）フェニル）（

１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１５ｇ）を得、これを精製せずに使用した。

ステップ３：撹拌子、メチル６－（（４－（（２－（２－（２－アミノエトキシ）エトキシ）エチル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（０．１ｇ、０．１ｍｍｏｌ）、ＬｉＯＨ水溶液（３ｍＬ、０．１　Ｎ、０．３ｍｍｏｌ）、及びＭｅＯＨ（１．０ｍＬ）を８ｍＬの反応バイアルに室温で添加し、一晩撹拌した。反応混合物を酢酸でｐＨ約６．５に調整し、次いで室温で真空下で濃縮乾固させて濃縮物を得、これを分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ、５．０μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／ＡＣＮ；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、６－（（４－（（２－（２－（２－アミノエトキシ）エトキシ）エチル）カルバモイル）フェニル）（１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸（４０ｍｇ）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：$C_{39}H_{54}N_6O_{11}$の計算値；　７８２．３９；観測値ｍ／ｚ［Ｍ＋Ｈ］＋　７８３．０。

【０４３１】

（実施例１１）

６，６’－（（１８－（（（２－（２－アミノエトキシ）エチル）チオ）メチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸

及び

【０４３２】

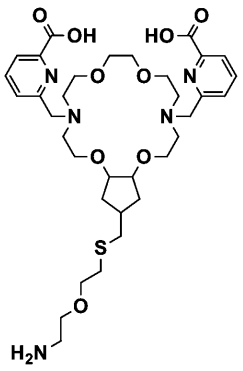
（実施例１２）

Ｎ－アシル－ＤＢＣＯタグ付き６，６’－（（１８－（（（２－（２－アミノエトキシ）エチル）チオ）メチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸

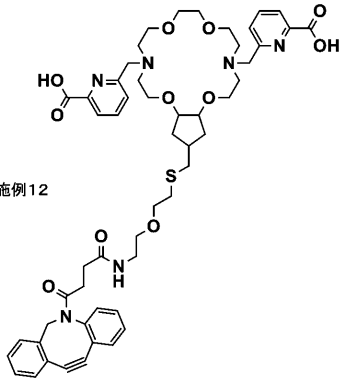
【０４３３】

【化６５】

実施例11



実施例12

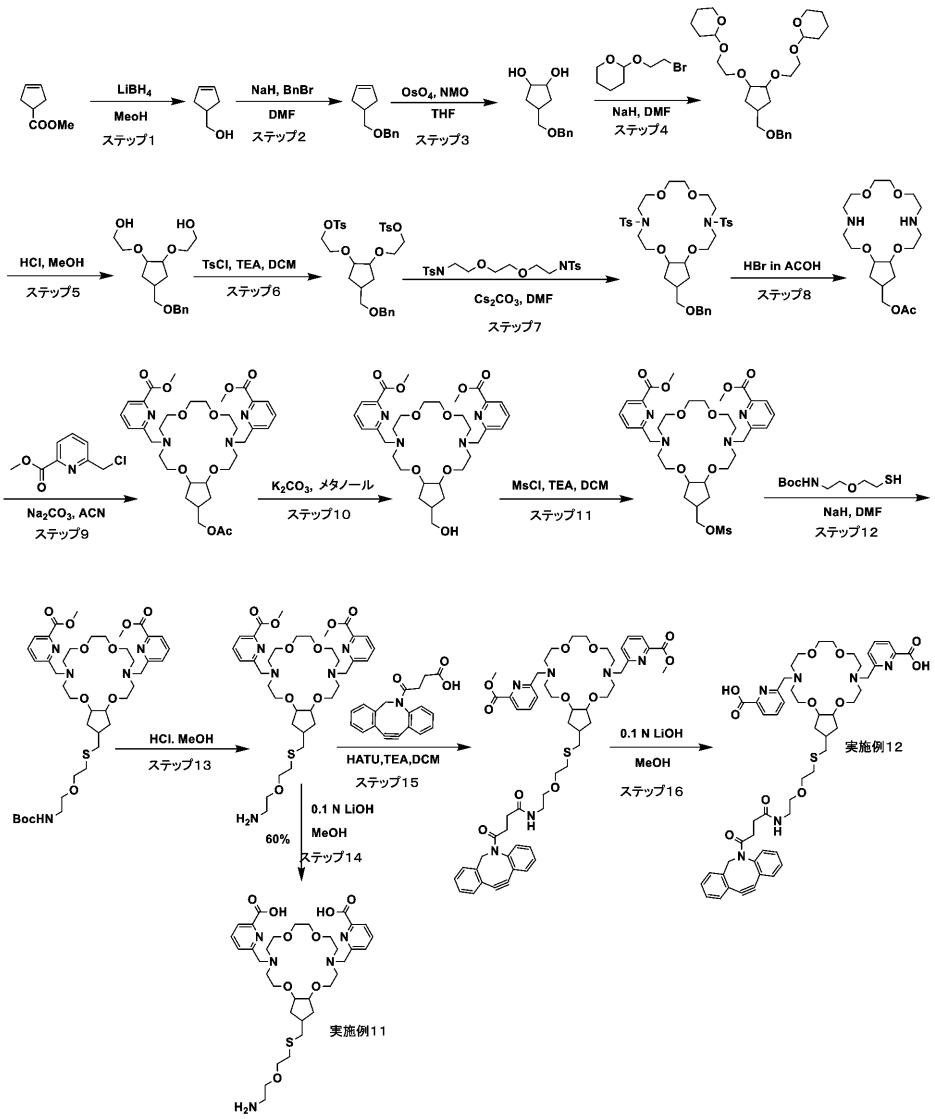


【０４３４】

スキーム１０

【０４３５】

【化６６】



ステップ１：撹拌子、メチルシクロペンター３－エン－１－カルボキシレート（２５．０ｇ、１９８ｍｍｏｌ）、ＴＨＦ（６００ｍＬ）、メタノール（１２．６ｇ、１６．０ｍＬ、３９７ｍｍｏｌ）及び水素化ホウ素リチウム（１９８ｍＬ、ＴＨＦ中２．０Ｍ、３９７ｍｍｏｌ）を３０００ｍＬ三口丸底フラスコに０℃で添加した。添加の完了後、反応混合物を７０℃で６時間撹拌した。次いで、反応混合物を室温に冷却し、氷水（２５０ｍＬ）でゆっくり処理し、更に０℃に冷却し、１．５Ｎ　ＨＣｌ（ｐＨ約２）でｐＨ約２にし、次いで、ＤＣＭ（１０００ｍＬ×３）で抽出した。合わせた抽出物を水（５００ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて濃縮物を得た。これをシリカゲルクロマトグラフィー（５０～８０％　ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）によって精製して、シクロペント－３－エン－１－イルメタノール（１３．８ｇ）を得た。

ステップ２：シクロペント－３－エン－１－イルメタノール（１３．７ｇ、１３９ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（５０ｍＬ）からなる溶液を、窒素雰囲気下、０℃で、ＤＭＦ（５０ｍＬ）中の水素化ナトリウム（６．６９ｇ、鉱油中６０％、１６７ｍｍｏｌ）の懸濁液を含有する１０００ｍＬ三口丸底フラスコに３０分かけて滴下で添加した。添加の完了後、反応混合物をゆっくりと室温に温め、撹拌を３０分間続けた後、混合物を０℃に再冷却し、臭化ベンジル（１９．８ｇ、１６７ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（５０ｍＬ）からなる溶液で１５分間かけて滴下処理した。添加の完了後、反応混合物をゆっくりと室温に温め、次いで１６時間撹拌した。反応混合物を飽和NH_4Cl（５０ｍＬ）でゆっくり処理し、次いで、酢酸エチル（１０００ｍＬ×３）で抽出した。合わせた抽出物を、水（５００ｍＬ×３

）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて濃縮物を得た。濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィー（０～２０％　ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）で精製して、（（シクロペント－３－エン－１－イルメトキシ）メチル）ベンゼン（２１．０ｇ）を得た。

ステップ３：撹拌子、ＮＭＯ（３８．０ｇ、H_2O中５０重量％、１５８ｍｍｏｌ）、ＴＨＦ（１８０ｍＬ）及び四酸化オスミウム（１６．２ｇ、３．２１ｍＬ、ｔ－ブタノール中２．５重量％、０．１５８ｍｍｏｌ）を、１０００ｍＬの三口丸底フラスコに０℃で添加した。反応混合物を室温にし、１０分間撹拌し、０℃に再冷却した。冷却した後、混合物を（（シクロペンタ－３－エン－１－イルメトキシ）メチル）ベンゼン（２０．０ｇ、１５８ｍｍｏｌ）及びＴＨＦ（１８０ｍＬ）の溶液で１５分間かけて滴下処理した。反応物を室温にし、１６時間撹拌した後、飽和$NaHCO_3$水溶液（１００ｍＬ）で処理し、ＤＣＭ（１０００ｍＬ×３）で抽出した。合わせた抽出物を水（５００ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて濃縮物を得た。これをシリカゲルクロマトグラフィー（０～２０％　ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）により精製して、４－（（ベンジルオキシ）メチル）シクロペンタン－１，２－ジオールを無色油状物として得た。異性体をＳＦＣによって分離した（装置：ＰＩＣ　１００；カラム：Ｃｈｉｒａｌｐａｋ　ＯＸＨ（２５０×３０）ｍｍ、５μｍ；移動相：CO_2：ＩＰＡ中０．５％イソプロピルアミン（６０：４０）；全流量：７０ｇ／分；背圧：１００ｂａｒ；波長：２２０ｎｍ；サイクル時間：８．０分）。これにより、４－（（ベンジルオキシ）メチル）シクロペンタン－１，２－ジオールのシス－１，２異性体両方を得た：第１溶出異性体（１０ｇ）、及び第２溶出異性体（５ｇ）。

ステップ４：４－（（ベンジルオキシ）メチル）シクロペンタン－１，２－ジオールの第１溶出異性体（１０．０ｇ、４５．０ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（６０ｍＬ）からなる溶液を、窒素雰囲気下、０℃で、ＤＭＦ（６０ｍＬ）中の水素化ナトリウム（８．６２ｇ、鉱油中６０％、２２５ｍｍｏｌ）の懸濁液を含有する２５０ｍＬ三口丸底フラスコに１時間かけて滴下で添加した。添加の完了後、反応混合物を室温にし、３０分間撹拌した後、混合物を０℃に再冷却し、２－（２－ブロモエトキシ）テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン（４７．０ｇ、２２５ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（６０ｍＬ）からなる溶液で１５分間かけて滴下処理した。添加の完了後、反応混合物をゆっくりと室温に温め、２時間撹拌した。次いで、混合物を飽和NH_4Cl水溶液（５０ｍＬ）でゆっくり処理し、次いで、酢酸エチル（５００ｍＬ×３）で抽出した。合わせた抽出物を水（５００ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて油状物を得た。これをシリカゲルクロマトグラフィー（０～３０％　ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）によって精製して、２，２’－（（（（４－（（ベンジルオキシ）メチル）シクロペンタン－１，２－ジイル）ビス（オキシ））ビス（エタン－２，１－ジイル））ビス（オキシ））ビス（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン）を得た（２１．０ｇ）。

ステップ５：撹拌子、２，２’－（（（（４－（（ベンジルオキシ）メチル）シクロペンタン－１，２－ジイル）ビス（オキシ））ビス（エタン－２，１－ジイル））ビス（オキシ））ビス（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン）（２９．０ｇ、６１．０ｍｍｏｌ）、ＭｅＯＨ（２００ｍＬ）及び１，４－ジオキサン中のＨＣｌ（４Ｍ、３．０ｍＬ、１２．０ｍｍｏｌ）を１０００ｍＬ三口丸底フラスコに加え、次いで、１時間加熱還流した。次いで、フラスコを室温に冷却し、揮発性物質を真空下で除去して、２，２’－（（４－（（ベンジルオキシ）メチル）シクロペンタン－１，２－ジイル）ビス（オキシ））ビス（エタン－１－オール）（２０．０ｇ）を残留物として得、これを精製せずに使用した。

ステップ６：窒素雰囲気下、１０００ｍＬ丸底フラスコに撹拌子、２，２’－（（４－（（ベンジルオキシ）メチル）シクロペンタン－１，２－ジイル）ビス（オキシ））ビス（エタン－１－オール）（２０．０ｇ）（２０．０ｇ、６４．４ｍｍｏｌ）、ＤＣＭ（２００ｍＬ）及びトリエチルアミン（３２．６ｍＬ、３２２ｍｍｏｌ）を加え、得られた混合物を１０℃に冷却した。次いで、混合物にｐＴｓＣｌ（３６．９ｇ、１９３ｍｍｏｌ）を少しずつ添加して処理し、次いで室温にした。添加の完了後、反応混合物を１６時間撹

拌し、その間に沈殿物が形成された。次いで、混合物をＤＣＭ（５００ｍＬ）で希釈し、冷ＨＣＩ水溶液（１Ｍ，５００ｍＬｘ３）及び氷冷水（５００ｍＬｘ２）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて残留物を得、これをシリカゲルクロマトグラフィー（０～３０％　ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）により精製して、（（４－（（ベンジルオキシ）メチル）シクロペンタン－１，２－ジイル）ビス（オキシ））ビス（エタン－２，１－ジイル）ビス（４－メチルベンゼンスルホナート）（２６．０ｇ）を得た。

ステップ７：撹拌子、Ｎ，Ｎ’－（（エタン－１，２－ジイルビス（オキシ））ビス（エタン－２，１－ジイル））ビス（４－メチルベンゼンスルホンアミド）（２１．０ｇ、４２．０ｍｍｏｌ）、Cs_2CO_3（４１．３ｇ、１２６ｍｍｏｌ）及び乾燥ＤＭＦ（２５０ｍＬ）を２０００ｍＬ三口丸底フラスコに窒素雰囲気下で添加し、得られた不均一混合物を室温で１．５時間撹拌した。次いで、混合物を（（４－（（ベンジルオキシ）メチル）シクロペンタン－１，２－ジイル）ビス（オキシ））ビス（エタン－２，１－ジイル）ビス（４－メチルベンゼンスルホナート）（２６．０ｇ、４２．０ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（２５０ｍＬ）からなる溶液で２時間かけて滴下処理した。撹拌を２０時間続けた後、混合物を真空中で濃縮乾固させて、ペースト状固体を得た。ペーストをＤＣＭ（１０００ｍＬ）に懸濁させ、３０分間撹拌し、真空濾過によって濾過した。濾液を真空下で濃縮乾固させて、濃縮物を得、これをシリカゲルクロマトグラフィー（０～４０％　ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）により精製して、１８－（（ベンジルオキシ）メチル）－４，１３－ジトシルテトラデカヒドロ－２Ｈ，１１Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン（２４ｇ）を得た。

ステップ８：ＨＢｒのＨＯＡｃ溶液（５０％、１１２ｍＬ、６９５ｍｍｏｌ）を、撹拌子及び１８－（（ベンジルオキシ）メチル）－４，１３－ジトシルテトラデカヒドロ－２Ｈ，１１Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン（２４．０ｇ、３２．８ｍｍｏｌ）を含有する５００ｍＬ丸底フラスコに、窒素雰囲気下で加えた。混合物を均一になるまで室温で撹拌し、次いでフェノール（１６．３ｇ、１７４ｍｍｏｌ）で処理した。次いで、反応混合物を６０℃で６時間加熱した後、室温に冷却し、真空中で濃縮乾固させて濃縮物を得た。濃縮物を逆相カラムクロマトグラフィー（カラム：Ｒｅｖｅｌｒｉｅｓ　Ｃ１８－３３０ｇ；移動相Ａ：０．１％　ＴＦＡ水溶液、移動相Ｂ：アセトニトリル；流速：６０ｍＬ／分）により精製して、（テトラデカヒドロ－２Ｈ，１１Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－１８－イル）酢酸メチル（８．０ｇ）を得た。

ステップ９：撹拌子、（テトラデカヒドロ－２Ｈ，１１Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－１８－イル）酢酸メチル（８．０ｇ、２１ｍｍｏｌ）、メチル６－（クロロメチル）ピコリナート（１２．２ｇ、５３．２ｍｍｏｌ）、Na_2CO_3（１１．１ｇ、１０６ｍｍｏｌ）及びアセトニトリル（１００ｍＬ）を、５００ｍＬ三口丸底フラスコに窒素雰囲気下で加え、得られた不均一混合物を窒素雰囲気下で９０℃で１６時間加熱した。次いで、得られた混合物を室温に冷却し、Ｃｅｌｉｔｅ（登録商標）のパッドを通して濾過し、濾液を真空中で濃縮乾固させて濃縮物を得た。濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）に供して、ジメチル６，６’－（（１８－（アセトキシメチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（５．０ｇ）を得た。

ステップ１０：２５０ｍＬ丸底フラスコに、窒素雰囲気下、撹拌子、ジメチル６，６’－（（１８－（アセトキシメチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（５．０ｇ，７．４ｍｍｏｌ）、K_2CO_3（０．１０ｇ，０．７４ｍｍｏｌ）及びメタノール（５０ｍＬ）を加え、得

られた混合物を室温で１０分間撹拌した。次いで、混合物を真空下で濃縮乾固させ、得られた残留物をシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％　ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して、６，６’－（（１８－（ヒドロキシメチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（３．０ｇ）を得た。

ステップ１１：撹拌子、６，６’－（（１８－（ヒドロキシメチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（２．０ｇ、３．１ｍｍｏｌ）、ＤＣＭ（２０ｍＬ）及びトリエチルアミン（１．２ｇ、９．５ｍｍｏｌ）を窒素雰囲気下で１００ｍＬの三口丸底フラスコに加え、得られた混合物を１０℃に冷却した。混合物をＭｓＣｌ（０．４８ｇ、６．３ｍｍｏｌ）で少しずつ処理し、添加の完了後、反応容器を室温にし、３０分間撹拌し、その間に沈殿物が形成された。不均一混合物をＤＣＭ（５０ｍＬ）で希釈し、冷ＨＣｌ水溶液（１Ｍ、５０ｍＬ×３）及び氷冷水（５０ｍＬ×２）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて、ゴム状固体を得た。ゴム状固体を中性アルミナカラムクロマトグラフィー（０～１０％　ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）によって精製して、ジメチル６，６’－（（１８－（（（メチルスルホニル）オキシ）メチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（１．５ｇ）を得た。

ステップ１２：ジメチル６，６’－（（１８－（（（メチルスルホニル）オキシ）メチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（０．６９ｇ、３．２ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（５ｍＬ）からなる溶液を、ＤＭＦ（０．５ｍＬ）中の水素化ナトリウム（１６２ｍｇ、鉱油中６０％、４．２２ｍｍｏｌ）の懸濁液を含有する２５ｍＬ三口丸底フラスコに、窒素雰囲気下、０℃で５分間かけて滴下で加えた。添加完了後、反応混合物を室温にし、１５分間撹拌した。次いで、反応混合物を０℃に再冷却し、ｔｅｒｔ－ブチル（２－（２－メルカプトエトキシ）エチル）カルバメート（１．５０ｇ、２．１１ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（３ｍＬ）からなる溶液で５分間かけて滴下処理した。添加完了後、反応混合物を室温までゆっくり加温し、次いで、１時間撹拌した。次いで、反応物を飽和NH_4Clでゆっくり処理した後、酢酸エチル（１０　ｍＬ×３回）で抽出した。合わせた抽出物を、水（１０ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて油状物を得た。油状物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍ）５．０μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／アセトニトリル；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（０．２ｇ）を得た。

ステップ１３：撹拌子、シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（０．２０ｇ、０．２４ｍｍｏｌ）、ＭｅＯＨ（１．０ｍＬ）、及びメタノール中のＨＣｌ（４Ｍ、１．２ｍＬ、４．８ｍｍｏｌ）を、２５ｍＬの一口丸底フラスコに０℃で添加し、得られた混合物を室温にし、２時間撹拌した。揮発性物質を真空下で除去して、ジメチル６，６’－（（１８－（（（２－（２－アミノエトキシ）エチル）チオ）メチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（１５０ｍｇ）を得て、これを精製せずに使用した。

ステップ１４：撹拌子、ジメチル６，６’－（（１８－（（（２－（２－アミノエトキシ）エチル）チオ）メチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（４０ｍｇ、０．０５４ｍｍｏｌ）、

ＬｉＯＨ水溶液（１．６ｍＬ、０．１Ｎ、０．１６ｍｍｏｌ）及びＭｅＯＨ（０．５ｍＬ）を８ｍＬの反応バイアルに室温で添加し、得られた混合物を一晩撹拌した。反応混合物のｐＨを酢酸でｐＨ約６．５に調整し、次いで室温で真空下で濃縮乾固させ、得られた濃縮物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ　５．０μｍ；移動相：１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液／ＡＣＮ；　流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、実施例１１：６，６’－（（１８－（（（２－（２－アミノエトキシ）エチル）チオ）メチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸（２３ｍｇ）を得た。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：$C_{34}H_{51}N_5O_9S$の計算値；７０５．３４；観測値ｍ／ｚ　［Ｍ＋Ｈ］$^+$　７０６．４。

ステップ１５：撹拌子、ジメチル６，６’－（（１８－（（（２－（２－アミノエトキシ）エチル）チオ）メチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（７０ｍｇ、０．９５ｍｍｏｌ）、１１，１２－ジデヒドロ－γ－オキソジベンズ［ｂ，ｆ］アゾシン－５（６Ｈ）－酪酸（２９ｍｇ、０．９５ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（２９ｍｇ、０．７６ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（５４ｍｇ、０．１４ｍｍｏｌ）及びＤＣＭ（０．５ｍＬ）を、窒素雰囲気下、０℃で２５ｍＬの三口丸底フラスコに加えた。得られた混合物を室温にし、終夜撹拌した。反応混合物を水（１０ｍＬ）で希釈し、ジクロロメタン（１０ｍＬ×３）で抽出した。合わせた抽出物を１０％　$NaHCO_3$水溶液（１０ｍＬ）、ブライン（１０ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて油状物を得た。油状物をシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％　ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）により精製して、Ｎ－アシル－ＤＢＣＯタグ付きジメチル６，６’－（（１８－（（（２－（２－アミノエトキシ）エチル）チオ）メチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（１０ｍｇ）を得た。

ステップ１６：撹拌子、Ｎ－アシル－ＤＢＣＯタグ付きジメチル６，６’－（（１８－（（（２－（２－アミノエトキシ）エチル）チオ）メチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（１０ｍｇ、０．０１ｍｍｏｌ）、ＬｉＯＨ水溶液（０．３ｍＬ、０．１　Ｎ、０．０３ｍｍｏｌ）及びメタノール（０．２５ｍＬ）を８ｍＬの反応バイアルに室温で加え、得られた混合物を一晩撹拌した。反応混合物を酢酸でｐＨ約６．５に調整し、減圧下室温で濃縮乾固させ、得られた濃縮物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８（１９×１５０ｍｍ）５．０μｍ；移動相：１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液／ＡＣＮ；　流量：１５．０ｍＬ／分で精製し、得た

実施例１２：Ｎ－アシル－ＤＢＣＯタグ付き６，６’－（（１８－（（（２－（２－アミノエトキシ）エチル）チオ）メチル）テトラデカヒドロ－４Ｈ，１３Ｈ，１７Ｈ－シクロペンタ［ｂ］［１，４，１０，１３］テトラオキサ［７，１６］ジアザシクロオクタデシン－４，１３－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸（３ｍｇ）。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：$C_{53}H_{64}N_6O_{11}S$の計算値；９９２．４４；観測値ｍ／ｚ　［Ｍ－Ｈ］$^-$：９９１．４。

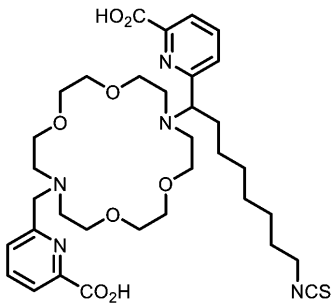
【０４３６】

（実施例１３）

６－（（１６－（１－（６－カルボキシピリジン－２－イル）－８－イソチオシアナトオクチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸

【０４３７】

【化６７】

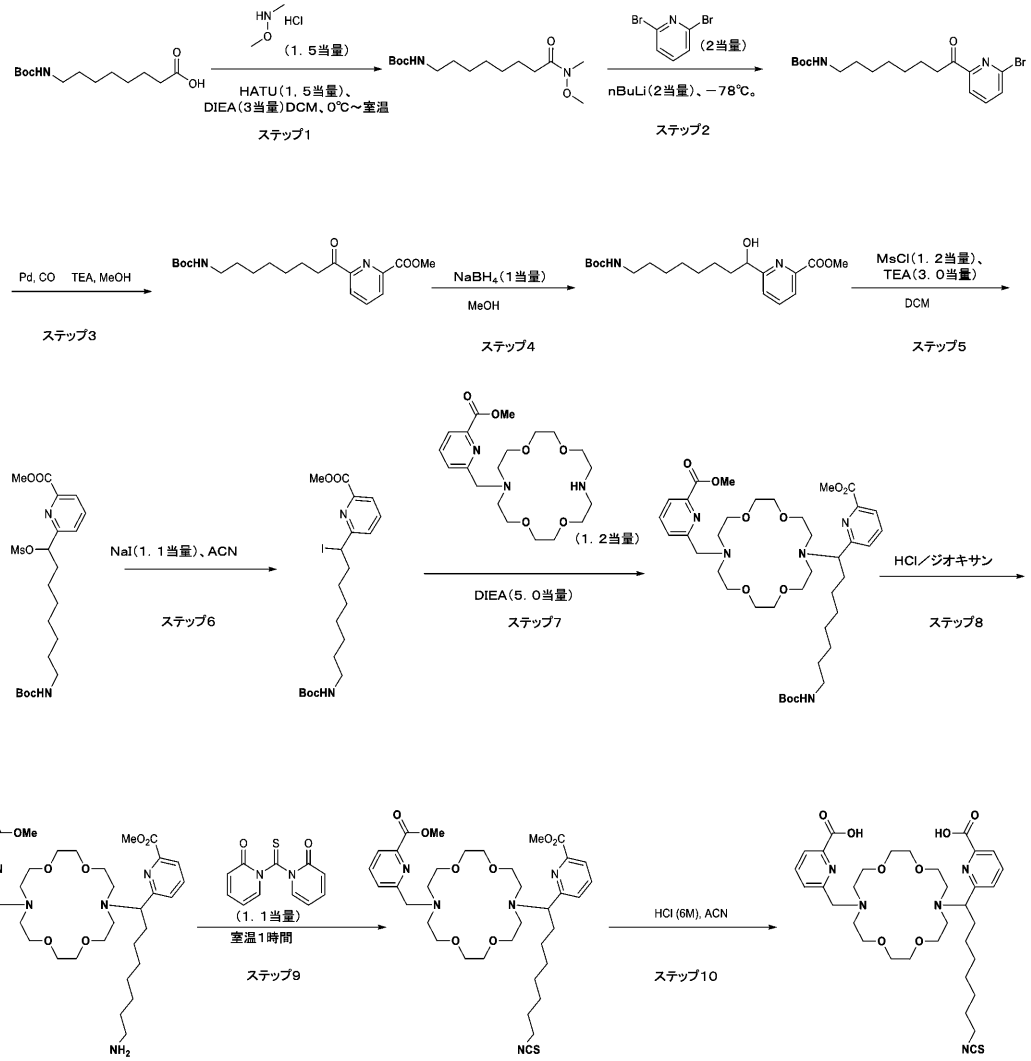


【０４３８】

スキーム１１

【０４３９】

【化６８】



ステップ１：窒素の不活性雰囲気でパージし維持された５００ｍＬの三口丸底フラスコに、８－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）オクタン酸（２０．０ｇ、７７．１ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（２００ｍＬ）溶液、Ｎ，Ｏ－ジメチルヒドロキシルアミン（７．０ｇ、１１５ｍｍｏｌ）、ジイソプロピルエチルアミン（２９．９０ｇ、２３１ｍｍｏｌ）を入れた。この後、０℃で撹拌しながら、ＨＡＴＵ（４３．９ｇ、１１５ｍｍｏｌ）を加えた。得られた溶液を室温で１時間撹拌した。次いで反応物に２００ｍＬの水を加えてクエンチした。得られた溶液をジクロロメタン（１００ｍＬ×２）で抽出した。

合わせた有機層をＨＣｌ（１Ｍ）（３００ｍＬ×２）、NH_4CO_3水溶液（４００ｍＬ×３）及びブライン（４００ｍＬ）で順次洗浄した。無水Na_2SO_4で乾燥させた後、濃縮して、ｔｅｒｔ－ブチル（８－（メトキシ（メチル）アミノ）－８－オキソオクチル）カルバメート（１５．４ｇ、収率６６％）を淡黄色油状物として得た。

ステップ２：窒素の不活性雰囲気でパージし維持された５００ｍＬの三口丸底フラスコに、ＴＨＦ（４００ｍＬ）中の２．６－ジブロモピリジン（２３．０ｇ、９２７ｍｍｏｌ）の溶液を入れた。これを－７８℃に冷却し、ｎ－ＢｕＬｉ（６０．４ｍＬ、９２７ｍｍｏｌ）を素早く滴下で添加した。１０分間撹拌した後、ＴＨＦ（４０ｍＬ）中のｔｅｒｔ－ブチル（８－（メトキシ（メチル）アミノ）－８－オキソオクチル）カルバメート（１４．０ｇ、４６３．５ｍｍｏｌ）を－７８℃で撹拌しながら滴下で加えた。得られた溶液を室温で３０分間撹拌した。反応物に５００ｍＬの水を加えてクエンチした。得られた溶液を酢酸エチル（２００ｍＬ×２）で抽出した。合わせた有機層をブライン（４００ｍＬ）で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させて濃縮乾固させ、粗生成物を得た。シリカゲルクロマトグラフィー（石油エーテル中０～１０％酢酸エチル）により、ｔｅｒｔ－ブチル（８－（６－ブロモピリジン－２－イル）－８－オキソオクチル）カルバメート（１１．８ｇ、収率５０％）を淡黄色固体として得た。

ステップ３：窒素の不活性雰囲気を維持した１Ｌの高圧反応容器に、ｔｅｒｔ－ブチル（８－（６－ブロモピリジン－２－イル）－８－オキソオクチル）カルバメート（１１．５ｇ、２８．８ｍｍｏｌ、１．０当量）のＭｅＯＨ溶液（５００ｍＬ）を入れ、続いてＰｄ（ｄｐｐｆ）Cl_2（２．１ｇ、２．８８ｍｍｏｌ）、ＴＥＡ（８．７ｇ、８６．４ｍｍｏｌ）を入れた。次いで、ＣＯ（２０ａｔｍ）を導入した。得られた溶液を１００℃で１６時間撹拌した。反応溶液を濾過し、次のステップに直接使用した。

ステップ４：上記のＭｅＯＨ溶液を０℃に冷却し、$NaBH_4$（１．０８ｇ、２８．８ｍｍｏｌ）を添加した。得られた溶液を室温で１時間撹拌した。反応物を５００ｍＬのNH_4CO_3水溶液の添加によってクエンチし、酢酸エチル（３００ｍＬ×２）で抽出した。合わせた有機層をブライン（６００ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮して、メチル６－（８－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－１－ヒドロキシオクチル）ピコリナート（１０ｇ）を褐色油状物として得た。

ステップ５：窒素の不活性雰囲気下でパージされ維持された２５０ｍＬの三口丸底フラスコに、ＤＣＭ（１００ｍＬ）中のメチル６－（８－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－１－ヒドロキシオクチル）ピコリナート（１０ｇ）の溶液を入れた。０℃に冷却した後、ＴＥＡ（７．９ｇ、７８．９ｍｍｏｌ）及び塩化メシル（３．６ｇ、３１．５ｍｍｏｌ）を加えた。得られた溶液を室温で１時間撹拌した。混合物を真空下で濃縮した。ＭｅＣＮ（１００ｍＬ）を加え、真空下で濃縮した。粗生成物メチル６－（８－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－１－（（メチルスルホニル）オキシ）オクチル）ピコリナートをそのまま次のステップに使用した。

ステップ６：上記の粗生成物メチル６－（８－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－１－（（メチルスルホニル）オキシ）オクチルピコリナートのＡＣＮ（１００ｍＬ）中溶液に、ＮａＩ（４．３ｇ、２８．９ｍｍｏｌ）を加えた。得られた溶液を、８０℃で１時間撹拌した。混合物を濾過し、濃縮した。粗生成物をフラッシュ分取ＨＰＬＣ（カラムＣ１８；移動相、３０分でH_2O／ＡＣＮ＝５０／５０％からH_2O／ＡＣＮ＝２０／８０％）で精製した。４ｇのメチル６－（８－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－１－ヨードオクチル）ピコリナートを褐色油状物として得た。

ステップ７：ＤＣＭ（２００ｍＬ）中のメチル６－（８－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－１－ヨードオクチル）ピコリナート（３．０ｇ、６．１２ｍｍｏｌ）の溶液に、メチル６－（（１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（３．０ｇ、７．３４ｍｍｏｌ）、ジイソプロピルエチルアミン（３．９ｇ、３０．６１ｍｍｏｌ）を添加した。得られた溶液を、８０℃で１６時間撹拌した。反応物を濃縮した。粗生成物をフラッシュ分取ＨＰＬＣ（カラム　Ｃ１８；移動相、Ａ：H_2O（０．０５％　ＴＦＡ）、Ｂ：ＣＡＮ；　２０分間

で２０％　Ｂから４０％　Ｂへ）で精製した。それによって、メチル６－（８－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－１－（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）オクチル）ピコリナート１．９ｇを褐色油状物として得た。

ステップ８：０℃のＤＣＭ（８．５ｍＬ）中のメチル６－（８－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）－１－（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）オクチル）ピコリナート（１．７ｇ、２．１９ｍｍｏｌ、ＬＣＭＳで７７％）の撹拌溶液に、ＨＣｌ／ジオキサンを滴下添加した。得られた溶液を室温で１時間撹拌した。反応物を、NH_4CO_3水溶液（２０ｍＬ×３）の少量ずつの添加によってクエンチした。得られた溶液をジクロロメタン（１００ｍＬ×２）で抽出した。合わせた有機層をブライン（４００ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮して、メチル６－（８－アミノ－１－（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）オクチル）ピコリナート１．３ｇを褐色油状物として得た。

ステップ９：メチル６－（８－アミノ－１－（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）オクチル）ピコリナート（１．０ｇ、１．４８ｍｍｏｌ）のＤＣＭ（１７ｍＬ）溶液に、N_2下、１，１’－チオカルボニルビス（ピリジン－２（１Ｈ）－オン）（０．３８ｇ、１．６３ｍｍｏｌ）を加えた。得られた溶液を室温で１時間撹拌した。これを濃縮して、メチル６－（（１６－（１－（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）－８－チオシアナトオクチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート１．６ｇを褐色油状物として得た。

ステップ１０：ＡＣＮ（４ｍＬ）中のメチル６－（（１６－（１－（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）－８－チオシアナトオクチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（１．４０ｇ、１．４２ｍｍｏｌ）の溶液に、ＨＣｌ（６Ｍ）（７ｍＬ）を添加した。得られた溶液を、油浴中５０℃で５時間撹拌した。これを１０ｍＬのH_2Oで希釈した。粗生成物をフラッシュ分取ＨＰＬＣ（カラム、Ｃ１８；移動相、Ａ：H_2O（０．０５％ＴＦＡ）、Ｂ：ＡＣＮ、２０分間で２０％Ｂから３６％Ｂ；検出器ＵＶ＠２１０ｎｍ）により精製した。生成物画分を濃縮してＡＣＮを除去した。水相を$NaHCO_3$水溶液でｐＨ　７～８に調整した。それを再びフラッシュ－分取ＨＰＬＣ（カラム、Ｃ１８；移動相、Ａ：H_2O、Ｂ：ＡＣＮ、２０分で９５％Ｂから１００％Ｂ）で精製した。生成物溶液を濃縮してＣＡＮを除去し、次いで凍結乾燥した。これにより、１９０ｍｇの６－（（１６－（１－（６－カルボキシピリジン－２－イル）－８－チオシアナトオクチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸を褐色固体として得た。^1H　ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，D_2O）δ７．９１（ｓ，４Ｈ），７．５４（ｓ，２Ｈ），４．５２（ｄ，Ｊ＝１７．９Ｈｚ，３Ｈ），３．７７（ｄ，Ｊ＝９．３Ｈｚ，８Ｈ），３．５６－３．４１（ｍ，１８Ｈ），２．１１（ｓ，２Ｈ），１．５１（ｓ，２Ｈ），１．１７（ｓ，７Ｈ），０．９７（ｓ，１Ｈ）。ＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：６８８．３（$M+H^+$）．

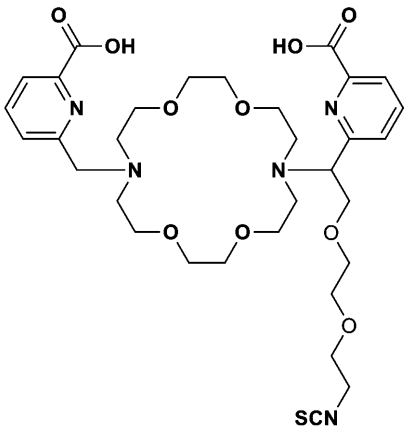
【０４４０】

（実施例１４）

６－（（１６－（１－（６－カルボキシピリジン－２－イル）－２－（２－（２－イソチオシアナトエトキシ）エトキシ）エチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸

【０４４１】

【化６９】

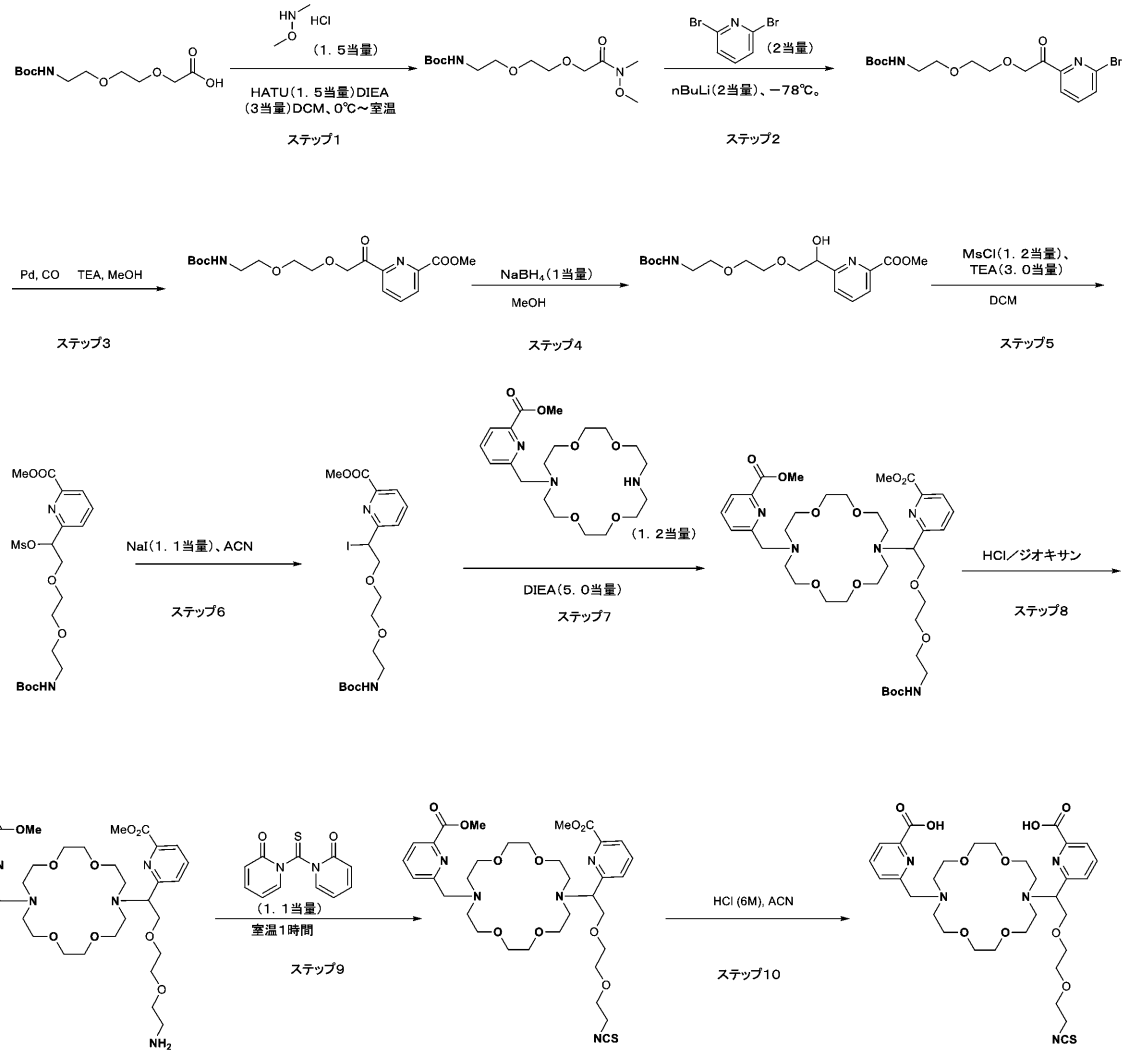


【０４４２】

スキーム１２

【０４４３】

【化７０】



ステップ１：窒素雰囲気下、０℃のジクロロメタン（１００ｍＬ）中の２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－オイック酸（１０．００ｇ、３７．９８ｍｍｏｌ）及びジイソプロピルエチルアミン（１４．７３ｇ、１１３．９４ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に、［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェ

ート（１５．１６ｇ、３９．８８ｍｍｏｌ）、Ｎ，Ｏ－ジメチルヒドロキシルアミン（５．５５ｇ、５６．９７ｍｍｏｌ）を滴下添加した。得られた混合物を室温で１時間撹拌した後、飽和ＮＨ４Ｃｌ水溶液に注いだ。得られた混合物をジクロロメタン（１００ｍＬ×２）で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させた。濾過後、濾液を減圧下で濃縮した。残留物をクロマトグラフィー（カラム、Ｃ１８；移動相Ａ：H_2O：０．０５％　ＴＦＡ、Ｂ：ＡＣＮ；２０分間で２０％Ｂから４０％Ｂへの勾配；検出器：ＵＶ＠２１０ｎｍ）によって精製した。ｔｅｒｔ－ブチル（３－メチル－４－オキソ－２，６，９－トリオキサ－３－アザウンデカン－１１－イル）カルバメート（９．９０ｇ、８５％収率）を薄黄色油状物として得た。

ステップ２：窒素雰囲気下、－７８℃の５００ｍＬの三口丸底フラスコ中のＴＨＦ（２６０ｍＬ）中の２，６－ジブロモ－ピリジン（１３．３ｇ、５６．１ｍｍｏｌ）の溶液に、ｎ－ＢｕＬｉ（２８．０ｍＬ、５６．１ｍｍｏｌ）を滴下添加した。溶液を－７８℃で１０分間撹拌した。ｔｅｒｔ－ブチル（３－メチル－４－オキソ－２，６，９－トリオキサ－３－アザウンデカン－１１－イル）カルバメート（７．０ｇ、２８．０ｍｍｏｌ）のＴＨＦ（３０ｍＬ）溶液を－７８℃で反応液に滴下で加え、室温で３０分間撹拌した。これに０℃の水／氷（２００ｍＬ）を加えて反応をクエンチした。水層を酢酸エチル（１００ｍＬ×３）で抽出した。合わせた有機層をNa_2SO_4で乾燥させ、真空下で濃縮した。残留物をクロマトグラフィー（カラム、Ｃ１８；移動相、移動相Ａ：H_2O：０．０５％　ＴＦＡ、Ｂ：ＡＣＮ；２０分で３８％Ｂから５８％Ｂへの勾配；検出器：ＵＶ＠２１０ｎｍ）によって精製した。ｔｅｒｔ－ブチル（２－（２－（２－（６－ブロモピリジン－２－イル）－２－オキソエトキシ）エトキシ）エチル）カルバメート（４．６ｇ、収率５０％）を黄色固体として得た。ＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：４２５，４２７（$M+Na^+$）。

ステップ３：２５０ｍＬの高圧反応容器に、ｔｅｒｔ－ブチル（２－（２－（２－（６－ブロモピリジン－２－イル）－２－オキソエトキシ）エトキシ）エチル）カルバメート（４．０ｇ、１８．１ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（５．５ｇ、５４．３ｍｍｏｌ）、Ｐｄ（ｄｐｐｆ）Cl_2（１．３ｇ、１．８ｍｍｏｌ）及びＭｅＯＨ（４０ｍＬ）を加えた。反応溶液を脱気し、N_2を充填した。次いで、ＣＯ（１０ａｔｍ）を導入した。得られた溶液を１００℃で一晩撹拌した。この反応混合物を濾過し、濾液を濃縮して乾燥させた。残留物をクロマトグラフィー（カラム、Ｃ１８；移動相Ａ：H_2O：０．０５％　ＴＦＡ、Ｂ：ＡＣＮ；２０分で３８％Ｂから５８％Ｂへの勾配；検出器：ＵＶ＠２１０ｎｍ）によって精製した。メチル６－（２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－オイル）ピコリナート（２．４ｇ、収率６３％）を褐色油状物として得た。ＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：４０５（$M+Na^+$）。

ステップ４：０℃でN_2雰囲気下、ＭｅＯＨ（４６ｍＬ）中のメチル６－（２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－オイル）ピコリナート（２．３０ｇ、６．０１ｍｍｏｌ）の溶液に、$NaBH_4$（０．２３ｇ、６．０１ｍｍｏｌ）を添加した。得られた溶液を室温で１時間撹拌し、５０ｍＬの飽和NH_4HCO_3水溶液を添加することによりクエンチした。得られた溶液を酢酸エチル（３０ｍＬ×２）で抽出した。合わせた有機層を、ブライン（６０ｍＬ）で洗浄し、Na_2SO_4で乾燥させ、濃縮した。２．２ｇの粗生成物メチル６－（１３－ヒドロキシ－２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－イル）ピコリナートが褐色油状物として得られた。

ステップ５：メチル６－（１３－ヒドロキシ－２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－イル）ピコリトリデカン－１３－イル）ピコリナート（２．２ｇ、５．７２ｍｍｏｌ）のジクロロメタン（２２ｍＬ）中溶液に、０℃、N_2雰囲気下で、トリエチルアミン（１．７４ｇ、１７．１６ｍｍｏｌ）及びＭｓＣｌ（０．７９ｇ、６．８６ｍｍｏｌ）を添加した。得られた溶液を室温で１時間撹拌し、H_2O（２２ｍＬ）でクエンチした。得られた混合物をジクロロメタン（２０ｍＬ×２）で抽出した。合わせた有機層を、ブライン（４０ｍＬ）で洗浄し、Na_2SO_4で乾

燥させ、濃縮した。２．２ｇの粗生成物メチル６－（２，２－ジメチル－１３－（（メチルスルホニル）オキシ）－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－イル）ピコリナートが褐色油状物として得られた。

ステップ６：N_2雰囲気下、メチル６－（２，２－ジメチル－１３－（（メチルスルホニル）オキシ）－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－イル）ピコリナート（２．２ｇ、４．７５ｍｍｏｌ）のＡＣＮ（２２ｍＬ）中溶液に、ＮａＩ（０．７８ｇ、５．２３ｍｍｏｌ）を加えた。得られた溶液を、８０℃で１時間撹拌した。混合物を濾過し、濃縮した。粗生成物をクロマトグラフィー（カラム、Ｃ１８；移動相Ａ：H_2O、Ｂ：ＡＣＮ；３０分間で５０％Ｂから８０％Ｂへの勾配；検出器：ＵＶ@２１０ｎｍ）によって精製した。メチル６－（１３－ヨード－２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－イル）ピコリナート（１．２ｇ）を褐色油状物として得た。ＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：５１７（Ｍ＋Na^+），４９５（Ｍ＋H^+）。

ステップ７：メチル６－（１３－ヨード－２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－イル）ピコリナート（８４０ｍｇ、１．６９ｍｍｏｌ）及びメチル６－（１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（８３９ｍｇ、２．０３ｍｍｏｌ）のＡＣＮ中溶液（１６．８ｍＬ）を、窒素雰囲気下、８０℃で一晩撹拌した。冷却した反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で濃縮した。粗生成物をクロマトグラフィー（カラム、Ｃ１８；移動相Ａ：H_2O、Ｂ：ＡＣＮ；２０分間で４０％Ｂから６０％Ｂへの勾配；検出器：ＵＶ@２１０ｎｍ）によって精製した。メチル６－（（１６－（１３－（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）－２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－イル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（４５０ｍｇ）を褐色油状物として得た。ＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：７００（Ｍ＋Na^+），６７８（Ｍ＋H^+）。

ステップ８：０℃で、ジクロロメタン（２．５ｍＬ）中のメチル６－（（１６－（１３－（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）－２，２－ジメチル－４－オキソ－３，８，１１－トリオキサ－５－アザトリデカン－１３－イル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（４５０ｍｇ、５７９ｍｍｏｌ）の溶液に、ＨＣｌ／ジオキサン（２．５ｍＬ、４Ｍ）を添加した。得られた溶液を室温で２０分間撹拌した。反応物を、飽和Na_2CO_3水溶液を添加することによってクエンチした。水層をＤＣＭ：ＩＰＡ（５：１）で抽出した（３０ｍＬ×２）。合わせた有機層を無水Na_2SO_4で乾燥させ、減圧下で濃縮して、粗生成物メチル６－（２－（２－（２－アミノエトキシ）エトキシ）－１－（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）エチル）ピコリナート（３３０ｍｇ）を得た。この粗生成物を、次のステップに直接使用した。

ステップ９：ジクロロメタン（３ｍＬ）中のメチル６－（２－（２－（２－アミノエトキシ）エトキシ）－１－（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）エチル）ピコリナート（３００ｍｇ、０．４４ｍｍｏｌ）及び１－（２－オキソピリジン－１－カルボチオイル）ピリジン－２－オン（１１３．０８ｍｇ、０．４８ｍｍｏｌ）の溶液を、窒素雰囲気下、室温で１時間撹拌した。得られた混合物を減圧下で濃縮して、粗生成物メチル６－（２－（２－（２－イソチオシアナトエトキシ）エトキシ）－１－（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）エチル）ピコリナート（３８０ｍｇ）を得た。この粗生成物を、次のステップに直接使用した。

ステップ１０：ジクロロメタン（１．９ｍＬ）中のメチル６－（２－（２－（２－イソチオシアナトエトキシ）エトキシ）－１－（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリ

ジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）エチル）ピコリナート（３８０ｍｇ、０．５２ｍｍｏｌ）及びＨＣｌ（１．９ｍＬ、６Ｍ）の溶液を、窒素雰囲気下、５０℃で３時間撹拌した。得られた混合物を減圧下で濃縮し、飽和ＮａＨＣＯ$_3$水溶液でｐＨ　６～７に塩基性化した。残留物をクロマトグラフィー（カラム、Ｃ１８；移動相Ａ：０．０５％　ＴＦＡを含むＨ$_2$Ｏ、Ｂ：ＡＣＮ、２０分間で２０％Ｂから３６％Ｂへの勾配；検出器：ＵＶ＠２１０ｎｍ）により精製した。次いで、生成物画分を真空下で濃縮して、ＭｅＣＮを除去した。溶液を再びクロマトグラフィー（カラム、Ｃ１８；移動相Ａ：Ｈ$_2$Ｏ、Ｂ：ＡＣＮ、勾配９５％Ｂ～１００％Ｂ（２０分）により精製した。溶液を濃縮してほとんどのＭｅＣＮを除去し、水溶液を凍結乾燥させて、６－（（１６－（１－（６－カルボキシピリジン－２－イル）－２－（２－（２－イソチオシアネートエトキシ）エトキシ）エチル）－１，４，１０，１３テトラオキサ－７，１６ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸（１３０ｍｇ）を褐色固体として得た。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，Ｄ$_2$Ｏ）８．０３－７．８４（ｍ，２Ｈ），７．５７（ｄｄ，Ｊ＝２２．３，７．４Ｈｚ，１Ｈ），５．００（ｓ，０Ｈ），４．５９（ｓ，１Ｈ），４．２０（ｄｄ，Ｊ＝２３．４，９．５Ｈｚ，１Ｈ），３．８２（ｄ，Ｊ＝１５．４Ｈｚ，４Ｈ），３．７０－３．５８（ｍ，６Ｈ），３．５８－３．４９（ｍ，６Ｈ）。ＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：６９２．３（Ｍ＋Ｈ$^+$）。

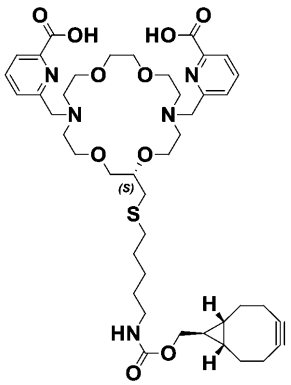
【０４４４】

（実施例１５）

６，６’－（（（Ｓ－２－（（（５－（（（（１Ｒ，８Ｓ，９ｒ－ビシクロ［６．１．０］ノナ－４－イン－９－イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）ペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸

【０４４５】

【化７１】

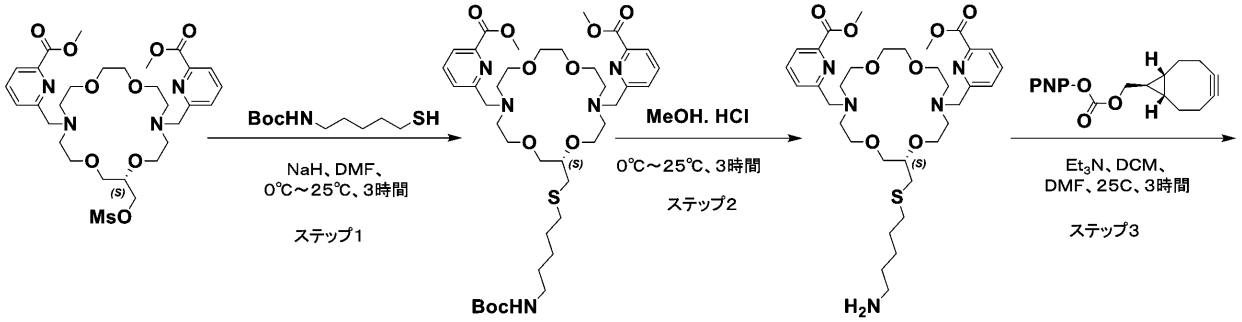


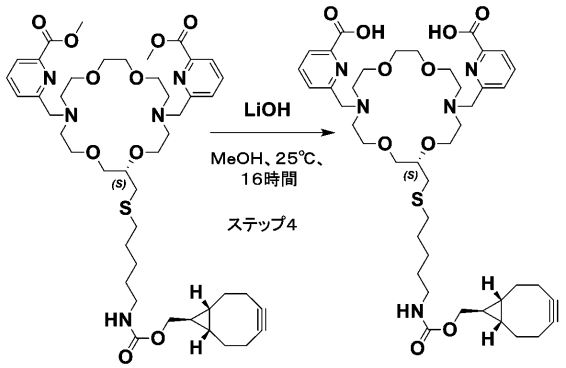
【０４４６】

スキーム１３

【０４４７】

【化７２】





ステップ１：０℃、窒素雰囲気下で、ｔｅｒｔ－ブチル（５－メルカプトペンチル）カルバメート（０．３０ｇ、１．０ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（３．０ｍＬ）からなる溶液を、水素化ナトリウム（０．０７ｇ、鉱油中６０％、２ｍｍｏｌ）のＤＭＦ（３．０ｍＬ）中懸濁液を含有する５０ｍＬの三口丸底フラスコに、５分間かけて滴下した。添加の完了後、反応混合物を室温にし、撹拌を１５分間続けた。次いで、反応混合物を再び０℃に冷却し、ジメチル６，６’－（（２－（（（メチルスルホニル）オキシ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ－ジピコリナート（０．６ｇ、０．９ｍｍｏｌ）及びＤＭＦ（３．０ｍＬ）からなる溶液を１０分間かけて滴下して処理した。添加の完了後、反応混合物をゆっくりと室温に温め、撹拌を１．５時間続けた。次いで、反応混合物を飽和NH_4Cl水溶液（１．０ｍＬ）で注意深く処理し、濃縮乾固させて油状物を得た。油状物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ、５．０μｍ；移動相：０．１％　ＴＦＡ水溶液／アセトニトリル；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、ジメチル６，６’－（（２－（（（５－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）ペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．２５ｇ）を得た。

ステップ２：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（５－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）ペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．２５ｇ、０．３２ｍｍｏｌ）、ＭｅＯＨ（１．０ｍＬ）、及びメタノール中のＨＣｌ（４Ｍ、１．５ｍＬ、６．３ｍｍｏｌ）を、２５ｍＬの丸底フラスコに０℃で添加し、続いてこれを室温にし、混合物を３時間撹拌した。次いで、揮発性物質を減圧下で除去して、ジメチル６，６’－（（２－（（（５－アミノペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．２１ｇ）を得、これを精製せずに使用した。

ステップ３：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（５－アミノペンチル）チオ）

メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ－ジピコリナート（０．１５ｇ、０．２２ｍｍｏｌ）、（（１Ｒ，８Ｓ，９ｒ）－ビシクロ［６．１．０］ノン－４－イン－９－イル）メチル４－ニトロフェニルカルボナート（６８ｍｇ、０．２２ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（６６ｍｇ、０．６５ｍｍｏｌ）、及びＤＣＭ（２ｍＬ）とＤＭＦ（０．１ｍＬ）の混合物を、２５ｍＬ三口丸底フラスコに０℃、窒素雰囲気下で加えた。得られた溶液を室温にゆっくり加温し、一晩撹拌した。次いで、混合物を濃縮乾固させて、ジメチル６，６’－（（（Ｓ－２－（（（５－（（（（１Ｒ，８Ｓ，９ｒ）－ビシクロ［６．１．０］ノン－４－イン－９－イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）ペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（０．１ｇ）を得て、これを精製せずに使用した。

ステップ４：撹拌子、ジメチル６，６’－（（（Ｓ－２－（（（５－（（（（（１Ｒ，８Ｓ，９ｒ）－ビシクロ［６．１．０］ノン－４－イン－９－イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）ペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリナート（０．１０ｇ、０．１２ｍｍｏｌ）、ＬｉＯＨ水溶液（３．５ｍＬ、０．１Ｎ、０．３５ｍｍｏｌ）、及びＭｅＯＨ（０．５ｍＬ）を８ｍＬの反応バイアルに加え、得られた混合物を室温で一晩撹拌した。次いで、反応混合物をｐＨが約６．５になるまで酢酸で処理し、続いて室温で真空中で濃縮乾固させて油状物を得、これを分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ、５．０μｍ；移動相：H_2O中０．１％ギ酸／ＡＣＮ；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、６，６’－（（（Ｓ）－２－（（（５－（（（（１　Ｒ，８Ｓ，９ｒ）－ビシクロ［６．１．０］ノン－４－イン－９－イル）メトキシ）カルボニル）アミノ）ペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））ジピコリン酸（４２ｍｇ）を得た。

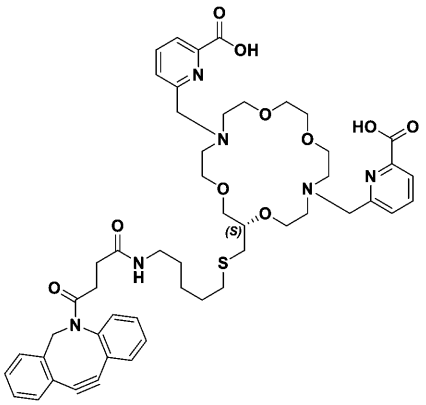
【０４４８】

（実施例１６）

Ｎ－アシル－ＤＢＣＯタグ付き６，６’－（（２－（（（５－アミノペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリン酸

【０４４９】

【化７３】

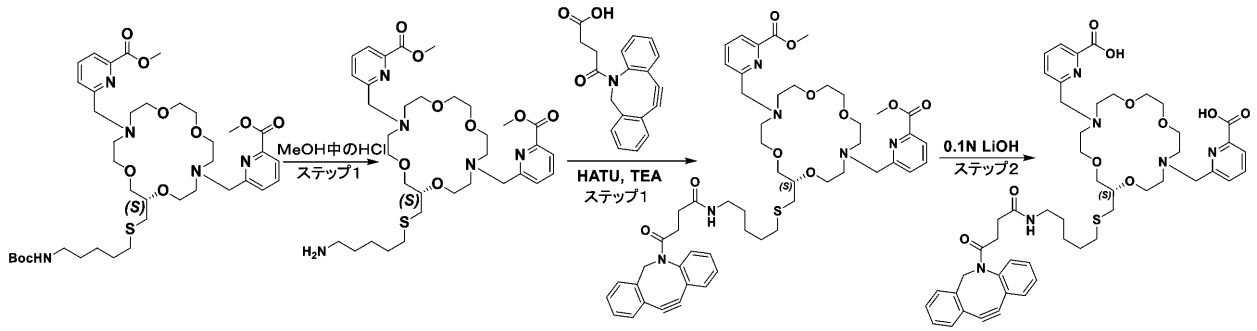


【０４５０】

スキーム１４

【０４５１】

【化７４】



ステップ１：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（５－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）ペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（０．１２ｇ、０．１５ｍｍｏｌ）、ＭｅＯＨ（０．５ｍＬ）、及びメタノール中のＨＣｌ（４Ｍ、０．７５ｍＬ、３．０ｍｍｏｌ）を、２５ｍＬ丸底フラスコに０℃で添加し、次いで室温にし、２時間撹拌した。揮発物を真空下で除去して、ジメチル６，６’－（（２－（（（５－アミノペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（７０ｍｇ）を得、これを精製せずに使用した。

ステップ２：撹拌子、ジメチル６，６’－（（２－（（（５－アミノペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（５０ｍｇ、０．０７０ｍｍｏｌ）、１１，１２－ジデヒドロ－γ－オキソジベンズ［ｂ，ｆ］アゾシン－５（６Ｈ）－ブタン酸（２０ｍｇ、０．０７０ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（２１ｍｇ、０．２１ｍｍｏｌ）、ＨＡＴＵ（３８ｍｇ、０．１０ｍｍｏｌ）、及びＤＣＭ（０．５ｍＬ）を、窒素雰囲気下、０℃で２５ｍＬ三口丸底フラスコに添加し、続いて室温にし、一晩撹拌した。反応混合物を水（１０ｍＬ）で処理し、ジクロロメタン（１０ｍＬ×３）で抽出し、合わせた抽出物を１０％　$NaHCO_3$水溶液（１０ｍＬ）及びブライン（１０ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて油状物を得た。油状物をシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％　ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）により精製して、Ｎ－アシル－ＤＢＣＯタグ付きジメチル６，６’－（（２－（（（５－アミノペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（１６ｍｇ）を得た。

ステップ３：撹拌子、Ｎ－アシル－ＤＢＣＯタグ付きジメチル６，６’－（（２－（（（５－アミノペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリナート（１６ｍｇ、０．０１６ｍｍｏｌ）、ＬｉＯＨ水溶液（０．４９ｍＬ、０．１Ｎ、０．０４９ｍｍｏｌ）、及びＭｅＯＨ（０．２５ｍＬ）を８ｍＬの反応バイアルに加え、混合物を室温で一晩撹拌した。次いで、反応混合物をｐＨが約６．５になるまで酢酸で処理し、室温で真空下で濃縮乾固させて濃縮物を得、これを分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ　Ｃ１８　１９×１５０ｍｍ　５．０μｍ；移動相：１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液／ＡＣＮ；流速：１５．０ｍＬ／分）により精製して、Ｎ－アシル－ＤＢＣＯタグ付き６，６’－（（２－（（（５－アミノペンチル）チオ）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７，１６－ジイル）ビス（メチレン））（Ｓ）－ジピコリン酸（５ｍｇ）をオフホワイトの固体として得た。ＬＣ－ＭＳ　ＡＰＣＩ：$C_{51}H_{62}N_6O_{10}S$の計算値；９５０．４２；観測値ｍ／ｚ　［Ｍ＋Ｈ］$^+$　９５１．４。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，D_2O）：δ７．８１－７．７５（ｍ，４Ｈ），７．５２－７．１７（ｍ，１０Ｈ），４．９７－４．９０（ｍ，１Ｈ），４

．８０（ｓ，４Ｈ），４．１４（ｓ，３Ｈ），３．７７－３．４６（ｍ，１６Ｈ），３．１０（ｓ，７Ｈ），２．８３－２．８０（ｍ，２Ｈ），２．５５－２．５３（ｍ，２Ｈ），２．４２－２．３８（ｍ，３Ｈ），２．１１－２．０８（ｍ，３Ｈ），１．３９－１．３５（ｍ，２Ｈ），１．２０－１．１０（ｍ，４Ｈ）．

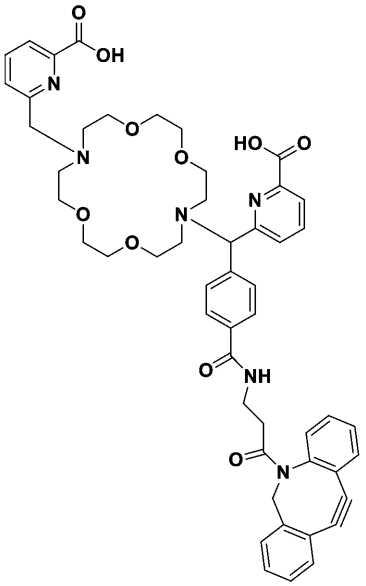
【０４５２】

（実施例１７）

Ｎ－アシル－ＤＢＣＯタグ付き６－（（４－（（６－アミノエチル）カルバモイル）フェニル）１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸（ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－ベンズイミド－ＤＢＣＯ）

【０４５３】

【化７５】

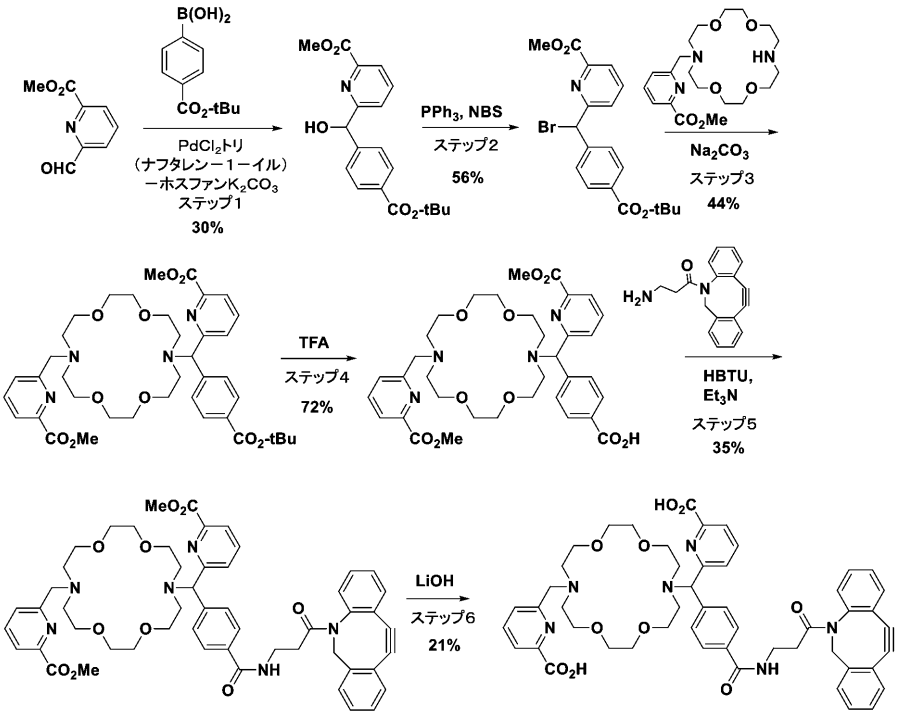


【０４５４】

スキーム１５

【０４５５】

【化７６】



ステップ１：５００ｍＬ三口丸底フラスコ中、窒素下、－７８℃で、メチル６－ホルミルピコリナート（４．００ｇ、２４．２ｍｍｏｌ）、（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）ボロン酸（１０．７ｇ、４８．５ｍｍｏｌ）、$PdCl_2$（０．２１ｇ、１．２ｍｍｏｌ）、トリ（ナフタレン－１－イル）ホスフィン（０．５０ｇ、１．２ｍｍｏｌ）及び炭酸カリウム（１０．０ｇ、７２．７ｍｍｏｌ）の混合物に、テトラヒドロフラン（１００ｍＬ）を一度に加えた。混合物を窒素でパージし、室温で３０分間撹拌し、次に６５℃で２４時間加熱した。反応混合物を室温に冷却し、Ｃｅｌｉｔｅ（登録商標）のパッドを通して濾過し、濾液を濃縮乾固させた。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー（０～５０％　ＥｔＯＡｃ／石油エーテル）に供して、メチル６－（（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）（ヒドロキシ）メチル）ピコリナート（２．５ｇ、３０％）を黄色油状物として得た。

ステップ２：撹拌子、メチル６－（（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）（ヒドロキシ）メチル）ピコリナート（２．５０ｇ、７．３０ｍｍｏｌ）、PPh_3（３．４３ｇ、１３．１ｍｍｏｌ）、Ｎ－ブロモスクシンイミド（２．１３ｇ、１２．０ｍｍｏｌ）及びＤＣＭ（３０ｍＬ）を、窒素雰囲気下、室温で２５０ｍＬの三口丸底フラスコに入れ、１時間撹拌した。反応溶液をシリカゲルカラムに装填し、石油エーテル中０～３０％酢酸エチルを用いて精製して、化合物メチル６－（ブロモ（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）メチル）ピコリナート（１．６５ｇ、５６％）を黄色油状物として得た。

ステップ３：撹拌子、メチル６－（（１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（１．５２ｇ、３．６９ｍｍｏｌ）、６－（ブロモ（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）メチル）ピコリナート（１．５０ｇ、３．６９ｍｍｏｌ）、Na_2CO_3（１．１７ｇ、１１．１ｍｍｏｌ）、及びアセトニトリル（３０ｍＬ）を２５０ｍＬ三口丸底フラスコに添加し、得られた不均一混合物を窒素雰囲気下、９０℃で１６時間加熱した。その後、反応塊を室温に冷却し、Ｃｅｌｉｔｅ（登録商標）のパッドを通して濾過し、真空中で濃縮乾固させて、粗生成物を得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％　ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）に供して、メチル６－（（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，

１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（１．２ｇ、４４％）を褐色油状物として得た。

ステップ４：撹拌子、メチル６－（（４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート（１．２ｇ、１．６ｍｍｏｌ）、ＴＦＡ（０．６２ｍＬ、８．１ｍｍｏｌ）及びＤＣＭ（２０ｍＬ）を１００ｍＬ三口丸底フラスコに室温で添加し、１時間撹拌した。反応混合物を濃縮乾固させ、得られた粗生成物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ Ｃ１８（１９×１５０ｍｍ）５．０μｍ；移動相：０．１％ ＴＦＡ水溶液／ＡＣＮ；流速：１５．０ｍＬ／分）に供して、４－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）安息香酸（０．８ｇ、７２％）を褐色油状物として得た。ＬＣ－ＭＳ ＡＰＣＩ：$C_{35}H_{44}N_4O_{10}$の計算値６８０．３１；観測値ｍ／ｚ ［Ｍ＋Ｈ］$^+$ ６８１．５。ＬＣ－ＭＳによる純度：９９．８７％。ＨＰＬＣによる純度：９７．１４％（２１０ｎｍで９７．０１％、２５４ｎｍで９７．２０％及び２８０ｎｍで９７．２１％）；カラム：Ａｔｌａｎｔｉｓ ｄＣ１８（２５０×４．６ｍｍ）、５μｍ；移動相Ａ：０．１％ ＴＦＡ水溶液、移動相Ｂ：アセトニトリル；流速：１．０ｍＬ／分％。^{1}Ｈ ＮＭＲ （４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）：δ８．１２－８．０７（ｍ，４Ｈ），８．００－７．９８（ｍ，２Ｈ），７．７５－７．７３（ｍ，４Ｈ），６．１０（ｓ，１Ｈ），４．６７（ｓ，２Ｈ），３．９６（ｓ，３Ｈ），３．９１（ｓ，３Ｈ），３．８２（ｓ，８Ｈ），３．５６（ｓ，８Ｈ），３．５２（ｓ，８Ｈ）．

ステップ５：撹拌子、４－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）安息香酸（０．２５ｇ、０．３７ｍｍｏｌ）、ＤＢＣＯ（０．１０ｇ、０．３７ｍｍｏｌ）、トリエチルアミン（０．１６ｍＬ、１．１ｍｍｏｌ）、ＨＢＴＵ（０．２１ｇ、０．５５ｍｍｏｌ）及びＤＣＭ（１０ｍＬ）を、２５ｍＬ三口丸底フラスコに、０℃で窒素雰囲気下、室温で加え、１６時間撹拌した。反応物を水（２０ｍＬ）でクエンチし、ＤＣＭ（３×２０ｍＬ）で抽出した。合わせた抽出物を１０％ $NaHCO_3$水溶液（２０ｍＬ）、ブライン（２０ｍＬ）で洗浄し、無水Na_2SO_4で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて、粗生成物を油状物として得た。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー（０～１０％ ＭｅＯＨ／ＤＣＭ）に供して、ＴＯＰＡジメチルエステル－［Ｃ７］－フェニル－ＤＢＣＯ（０．１２ｇ、３５％）を無色のゴム状油として得た。

ステップ６：撹拌子、ＴＯＰＡジメチルエステル－［Ｃ７］－フェニル－ＤＢＣＯ（０．１ｇ、０．１ｍｍｏｌ）、ＬｉＯＨ・H_2O水溶液（３ｍＬ、０．１Ｎ、０．３ｍｍｏｌ）及びＴＨＦ／ＭｅＯＨ／H_2O（４：１：１ ｖ／ｖ／ｖ、２ｍＬ）を８ｍＬの反応バイアルに室温で加え、２時間撹拌した。反応混合物をＨＣｌ水溶液（１Ｎ）でｐＨ約６．５に中和した。反応混合物を室温で真空中で濃縮乾固させ、得られた粗生成物を分取ＨＰＬＣ（カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ Ｃ１８（１９×１５０ｍｍ）５．０μｍ；移動相：１０ｍＭ酢酸アンモニウム水溶液／ＡＣＮ；流速：１５．０ｍＬ／分）に供して、ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニル－ＤＢＣＯ（２０ｍｇ、２１％）をオフホワイトの固体として得た。ＬＣ－ＭＳ ＡＰＣＩ：$C_{51}H_{54}N_6O_{10}$の計算値９１０．３９；観測値ｍ／ｚ ［Ｍ－Ｈ］$^+$ ９０９．３。ＬＣ－ＭＳによる純度：９２．４７％。ＨＰＬＣによる純度：９０．６８％（２１０ｎｍで８８．０４％、２５４ｎｍで９０．４３％及び２８０ｎｍで９３．５６％）；カラム：ＸＢＲＩＤＧＥ Ｃ８（５０×４．６ｍｍ）、３．５μｍ；移動相Ａ：１０ｍＭ重炭酸アンモニウム水溶液、移動相Ｂ：アセトニトリル；流速：１．０ｍＬ／分。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）：δ７．８４－７．８２（ｍ，４Ｈ），７．６０－７．２９（ｍ，１２Ｈ），７．１３－７．１０（ｍ，２Ｈ），５．１２－５．０２（ｍ，２Ｈ），３．９７（ｓ，２Ｈ），３．５９－３．４４（ｍ，２０

Ｈ），２．８５（ｓ，４Ｈ），２．７３－２．６８（ｍ，６Ｈ）．

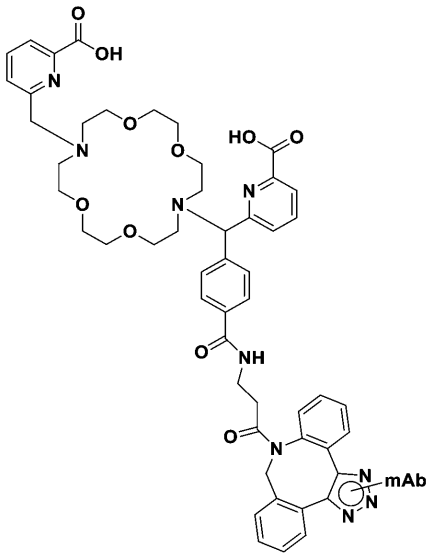
【０４５６】

（実施例１８）

ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－ベンジイミド－ＤＢＣＯ－トリアゾール－ＰＳＭＢ－１２７抗体コンジュゲート

【０４５７】

【化７７】



ステップ１．ｍＡｂのアジド修飾及びクリック反応：ＰＳＭＢ１２７を、１００倍モル過剰の３－アジドプロピルアミン及び微生物トランスグルタミナーゼ（ＭＴＧ；Ａｃｔｉｖａ ＴＩ）で３７℃で部位選択的に修飾した。Ａｇｉｌｅｎｔ Ｇ２２４機器でのインタクト質量ＥＳＩ－ＴＯＦ ＬＣ－ＭＳにより、ｍＡｂの重鎖上の２つのアジドの付加をモニタリングした。過剰な３－アジドプロピルアミン及びＭＴＧを除去し、アジド修飾ｍＡｂ（アジド－ｍＡｂ）を、１ｍＬ ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ＭａｂＳｅｌｅｃｔカラムを使用して精製した。１００ｍＭクエン酸ナトリウム（ｐＨ３．０）を使用して、アジド－ｍＡｂを樹脂から溶出し、次いで７Ｋ Ｚｅｂａ（登録商標）脱塩カラムを使用して、２０ｍＭのＨｅｐｅｓ、１００ｍＭのＮａＣｌ（ｐＨ７．５）に交換する。１０倍モル過剰のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニル－ＤＢＣＯを、振盪せずに、３７℃で１時間、部位特異的アジド－ＰＳＭＢ１２７（ＤＯＬ＝２）と反応させた。インタクト質量分析によって、ＤＢＣＯ－アジドクリック反応の完了をモニタリングした。過剰な遊離キレート剤は、Ｚｅｂａ（登録商標）７Ｋ脱塩カラムでコンジュゲートを２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、１００ｍＭ ＮａＣｌ（ｐＨ７．５）に脱塩し、続いて、３回の１５倍段階希釈工程、及び３０Ｋ ＭＷＣＯ Ａｍｉｃｏｎ濃縮器デバイスを使用して、３８００Ｘｇで回転させることにより、２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、１００ｍＭ ＮａＣｌ（ｐＨ７．５）中に濃縮する工程により除去した。これにより、ＣＡＲ＝２の最終部位特異的ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニル－ＤＢＣＯ－ＰＳＭＢ１２７コンジュゲートを得た。Ｔｏｓｏｈ ＴＳＫｇｅｌ Ｇ３０００ＳＷｘｌ ７．８ｍｍ×３０ｃｍ、５ｕカラム、カラム温度：室温で、カラムをＤＰＢＳ緩衝液（×１、カルシウム及びマグネシウムを含まない）、流量：０．７ｍＬ／分、１８分の運転、注入量：１８μＬで溶出する分析サイズ排除クロマトグラフィーにより、最終コンジュゲートがモノマーであることが確認された。

ステップ２．キレート化：以下の金属塩のストック溶液を純水中で調製した。

【０４５８】

【表２】

塩	カタログ番号	濃度
塩化セリウム(III)	Sigmaカタログ番号429406	10mM
塩化ネオジム(III)六水和物	Sigmaカタログ番号289183	10mM
塩化テルビウム(III)	Sigmaカタログ番号451304	10mM
塩化ルテニウム(III)	Sigmaカタログ番号450960	10mM
塩化ツリウム(III)	Sigmaカタログ番号451304	10mM
塩化イットリウム(III)	Sigmaカタログ番号451363	10mM
塩化ホルミウム(III)	Sigmaカタログ番号450901	10mM

金属溶液を、５倍モル過剰で、１０ｍＭ酢酸ナトリウムで溶出する分析サイズ排除クロマトグラフィーにより、最終コンジュゲートがモノマーであることが確認された。（ｐＨ５．２）中のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニル－ＤＢＣＯ－ＰＳＭＢ１２７（６．８μＭ抗体、３４μＭ金属イオン）に加え、３７℃で２時間インキュベートした。過剰な金属を、Ｚｅｂａ（登録商標）カラム（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ（登録商標））で脱塩し、続いて１０倍希釈及び５０Ｋ　ＭＷＣＯ　Ａｍｉｃｏｎ濃縮器（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ（登録商標））での濃縮を２サイクル行うことによって除去した。キレート化を、インタクト及び還元質量ＬＣ－ＭＳによって評価した。

ステップ３．安定性決定：キレートの安定性を決定するために、ＤＴＰＡチャレンジを行った。５０μＬの試料（６．３μＭ抗体）を５０μＬの１０ｍＭ　ＤＴＰＡ（ｐＨ６．５）と合わせ、３７℃で一晩インキュベートした。キレート化を、インタクト及び還元質量ＬＣ－ＭＳによって評価した。ＬＣ－ＭＳを、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｇ６２２４　ＭＳ－ＴＯＦ質量分析計に接続されたＡｇｉｌｅｎｔ　１２６０　ＨＰＬＣシステムで行った。ＬＣを、Ａｇｉｌｅｎｔ　ＲＰ－ｍＡｂ　Ｃ４カラム（２．１×５０ｍｍ、３．５ミクロン）で、流速１ｍＬ／分、移動相水中０．１％ギ酸（Ａ）及びアセトニトリル中０．１％ギ酸（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈカタログ番号３４６８８）（Ｂ）、並びに２０％　Ｂ（０～２分）、２０～６０％　Ｂ（２～３分）、６０～８０％　Ｂ（３～５．５分）の勾配で実行した。機器を正のエレクトロスプレーイオン化モードで操作し、ｍ／ｚ６００から６０００までスキャンした。質量電荷スペクトルを、最大エントロピーアルゴリズムを使用してデコンボリューションし、関連種の相対量を、デコンボリューションされた質量のピーク高さによって推定した。機器設定には、キャピラリー電圧３５００Ｖ、フラグメンター１７５Ｖ、スキマー６５Ｖ；ガス温度３２５Ｃ、乾燥ガス流量５．０Ｌ／分、ネブライザー圧力３０ｐｓｉｇ、０．４２スキャン速度の取得モード範囲１００～７０００が含まれた。

セリウム及びネオジム試料について、ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニル－ＤＢＣＯ－ＰＳＭＢ１２７に対するＭＷの変化が観察された。セリウムと共にインキュベートしたコンジュゲートのインタクトな質量は、１個又は２個のセリウムイオンの付加に対応して、１３９Ｄａ（ピーク面積で２０％）又は２７６Ｄａ（７７％）のＭＷの増加を示した。ＤＴＰＡチャレンジ後、質量は類似したままであり、存在度も類似していた（＋１３８及び＋２７４種について３０％及び６７％）。

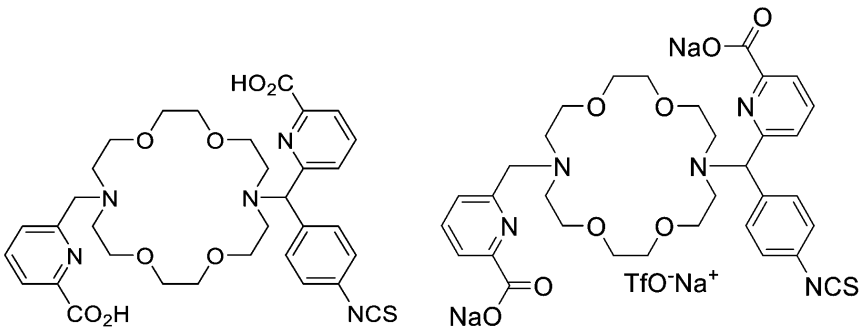
【０４５９】

（実施例１９）

６－（（１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）（４－イソチオシアナトフェニル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸（Ｈ２ｂｐ１８ｃ６ベンジル－フェニル）（ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルイソチオシアネート及びナトリウム塩形態

【０４６０】

【化７８】

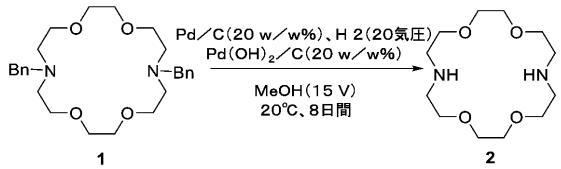


【０４６１】

化合物２は、既存の方法（Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．１９８７、５２、５１７２を参照されたい）と同様の方法で調製した。

【０４６２】

【化７９】



【０４６３】

化合物３は、既存の方法（Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ－ａ Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ；２０１５，２１，１０１７９．を参照されたい）と同様の方法で調製した。

【０４６４】

【化８０】

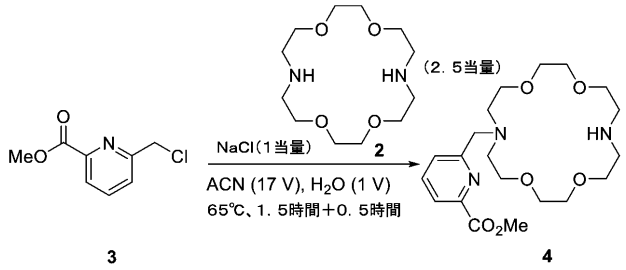


【０４６５】

化合物４の調製：

【０４６６】

【化８１】



１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン（４９４ｇ、１．８８ｍｏｌ、２．５当量）、ＮａＣｌ（４４．１ｇ、０．７５ｍｏｌ、１．０当量）、H_2O（１４０ｍＬ、化合物３に対して１体積）及びアセトニトリル（２．１Ｌ、１５体積）を、N_2雰囲気下、１５～２０℃で１０Ｌ反応器に投入し、６５℃に加熱した。得られた混合物に、６５℃で１時間かけて、アセトニトリル（２８０ｍＬ、２体積）中の化合物３（１４０ｇ、０．７５ｍｏｌ）の溶液を、滴下で加えた。この溶液を６５℃で０．５時間エイジングした。混合物のＬＣＭＳ分析は、反応が完了したことを示した。混合

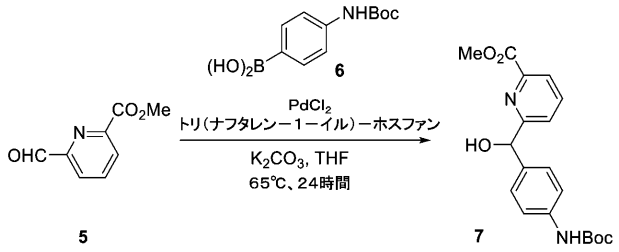
物を室温まで放冷し、減圧下で濃縮した。アセトン（７００ｍＬ、５体積）を混合物に加え、懸濁液を更に１時間撹拌した。混合物を濾過した（濾過された固体は未反応化合物２であった）。濾液を真空下で濃縮し、次いで、ＤＣＭ（１．４Ｌ、１０体積）に溶解した。有機相を水（３×７５０ｍＬ）で洗浄し、有機相をNa_2SO_4で乾燥させ、次いで真空下で濃縮して、２１２ｇの化合物４（収率６３％、アッセイ：８５％ｗ／ｗ）を得た。ＬＣＭＳ：（ＥＳ，ｍ／ｚ）：４１２．１５　［Ｍ＋Ｈ］$^+$　^{1}Ｈ－ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6，ｐｐｍ）：δ７．９８－７．８７（ｍ，２Ｈ），７．８１（ｄｄ，Ｊ＝６．４，２．６Ｈｚ，１Ｈ），３．８７（ｓ，３Ｈ），３．８１（ｓ，２Ｈ），３．６１－３．３８（ｍ，１６Ｈ），２．７７（ｄｔ，Ｊ＝１９．０，５．２Ｈｚ，８Ｈ）．

【０４６７】

化合物７の調製：

【０４６８】

【化８２】



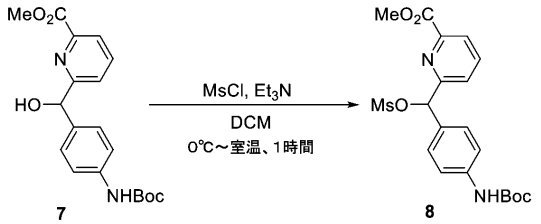
メチル６－ホルミルピコリナート５（２５０ｇ、１．０当量）、（４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェニル）ボロン酸６（５３８ｇ、１．５当量）及び脱気したＴＨＦ（６．５Ｌ、５に対して２６体積）を、N_2雰囲気下、１５～２０℃で１０Ｌ反応器に投入した。これに続いて、$PdCl_2$（１４．０ｇ、０．０５当量）、トリ（ナフタレン－１－イル）－ホスファン（３１ｇ、０．０５当量）及びK_2CO_3（６５０ｇ、３．１当量）を添加した。得られた溶液を２０℃で０．５時間撹拌した。次に、この混合物を６５℃に加熱し、１７時間エイジングした。ＬＣＭＳによる分析は、この反応が完了したことを示した。得られた溶液を室温で冷却し、氷水（２．５Ｌ、１０体積）及び酢酸エチル（５Ｌ、２０体積）で希釈した。混合物をセライトパッドを通して濾過した。溶液を分離させ、水性下層を廃棄した。有機相を水（２×１．５Ｌ、１２体積）で洗浄した。層を分離し、有機層をNa_2SO_4で乾燥させ、真空下で濃縮した。得られた残留物をヘプタン（１．２５Ｌ、５体積）で処理し、得られた懸濁液を０．５時間撹拌した。混合物を濾過し、濾過ケーキをｎ－ヘプタン（５００ｍＬ、２体積）で洗浄して、５３０ｇ（収率９８％、ＬＣＡＰ純度：９０％）の所望の生成物７を黄色固体として得、これを更に精製することなく次のステップに直接使用した。ＬＣＭＳ：（ＥＳ，ｍ／ｚ）：３８１．１０　［Ｍ＋Ｎａ］$^+$　^{1}Ｈ－ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－d_6，ｐｐｍ）：δ９．２７（ｓ，１Ｈ），８．０３－７．８５（ｍ，２Ｈ），７．７９（ｄｄ，Ｊ＝７．７，１．４Ｈｚ，１Ｈ），７．３９（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ），７．２６（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ），６．１３（ｄ，Ｊ＝４．０Ｈｚ，１Ｈ），５．７２（ｄ，Ｊ＝３．９Ｈｚ，１Ｈ），３．８７（ｓ，３Ｈ），１．４６（ｓ，９Ｈ）．

【０４６９】

化合物８の調製：

【０４７０】

【化８３】



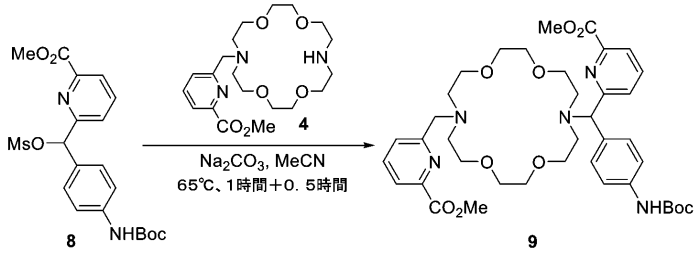
メチル６－（（４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェニル）（ヒドロキシ）メチル）ピコリナート７（３１０ｇ、１．０当量）、トリエチルアミン（２１９ｇ、２．５当量）及びＤＣＭ（６．２Ｌ、７に対して２０体積）を、窒素雰囲気下、１５～２０℃で１０Ｌ反応器に投入し、溶液を０℃に冷却した。塩化メタンスルホニル（９９．２ｇ、１．０当量）を、温度を０℃に維持しながら３０分かけて滴下で加えた。冷却浴を除去し、温度を周囲温度にし、この温度で１時間エイジングした。溶液を真空下、１０～１５℃で濃縮し、次いで残留物をアセトニトリル（４３８ｍＬ、２容量）に溶解させた。得られた溶液を真空下で濃縮して、５１８ｇ（粗）の所望の生成物８を得た。粗生成物を更に精製することなく次ステップで直接使用した。

【０４７１】

化合物９の調製：

【０４７２】

【化８４】



メチル６－（（４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェニル）－（（メチルスルホニル）オキシ）メチル）ピコリネート８（２１２ｇ、１．０当量、Ｑ－ＮＭＲによる純度８５％）、Na_2CO_3（１３７．６ｇ、３．０当量）及びアセトニトリル（３．５６Ｌ、８に対して２０体積）を、窒素雰囲気下、室温で１０Ｌの反応器に投入し、次いで混合物を６５℃に加熱し、１時間熟成した。メチル６－（（１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート４（３７７．８ｇ、２．０当量）のアセトニトリル溶液（３Ｌ、１０体積）を、６５℃で０．５時間かけて滴下で加えた。この反応が完了したことがＨＰＬＣ分析により示されるまで、混合物をこの温度でエイジングした。得られた溶液を室温で冷却し、次いで濾過し、濾過ケーキをＭｅＯＨ（２×１体積）で洗浄した。濾液を真空下で濃縮し、得られた残留物をＥＡ（７００ｍＬ）に溶解し、次いでシリカゲル（８００ｇ、タイプ：ＺＣＸ－２、１００～２００メッシュ、２．１１ｗ／ｗ）を添加した。温度を３５℃未満に維持しながら、混合物を真空下で濃縮した。シリカゲル（９．６ｋｇ、タイプ：ＺＣＸ－２、１００～２００メッシュ、２６．３ｗ／ｗ）をカラムに充填し、続いて、吸着した粗生成物９を含有する用意した乾燥シリカゲルを充填した。カラムを酢酸エチル：石油エーテル；ジクロロメタン（３：３：１）／メタノール：ジクロロメタン（１：１）（１００：０～９０：１０までの勾配、４Ｌ±０．５Ｌ毎にサンプル収集）で溶出した。画分をＴＬＣ（酢酸エチル：酢酸エチル：石油エーテル；ジクロロメタン：メタノール＝４：４：１：１）で分析した。生成物を有する画分を合わせ、濃縮して、２６０ｇの化合物９を黄色固体として得た（ＨＰＬＣ：９４％、ＱＮＭＲ：９２％）。更に７０ｇの化合物９を黄色油状物として得た（ＨＰＬＣ：７５％、ＱＮＭＲ：６０％）。ＬＣＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：７５

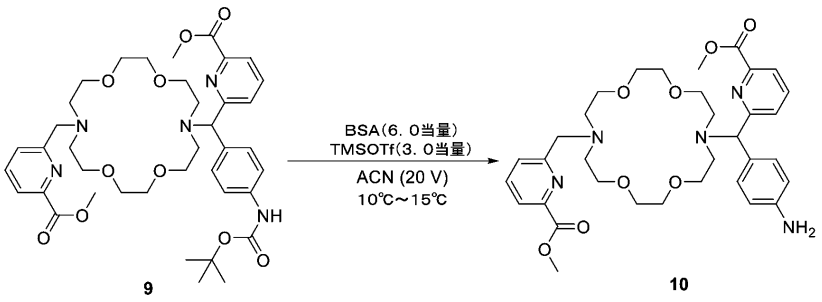
２．３０　［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$　観測値　ｍ／ｚ　^{1}Ｈ－ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ$_{3}$，ｐｐｍ）：δ７．５３－７．３２（ｍ，３Ｈ），７．２８－７．１８（ｍ，３Ｈ），６．８６（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ），６．７６（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，２Ｈ），６．０９（ｓ，１Ｈ），４．６３（ｓ，１Ｈ），３．４８（ｓ，３Ｈ），３．４４（ｂｓ，５Ｈ），３．１７－２．９２（ｍ，１６Ｈ），２．３８（ｄｑ，Ｊ＝２５．０，７．２，６．８Ｈｚ，８Ｈ），０．９７（ｓ，９Ｈ）．

【０４７３】

化合物１０の調製：

【０４７４】

【化８５】



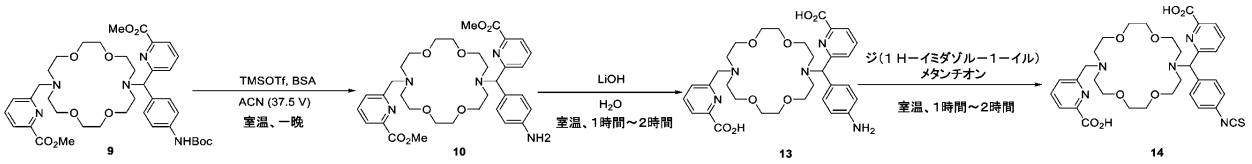
化合物９（２６０ｇ、ＱＮＭＲ：９２％、１．０当量）、Ｎ，Ｏ－ビス（トリメチルシリル）アセトアミド（ＢＳＡ、６．０当量）及びアセトニトリル（４Ｌ、１５体積）を、窒素雰囲気下、１５～２０℃で１０Ｌの反応容器に入れた。混合物を２０℃で４０分間撹拌した。アセトニトリル（１．３Ｌ、５体積）中のＴＭＳＯＴｆ（２１２．９ｇ、３．０当量）の溶液を、内部温度を１５～２０℃に維持しながら０．５時間かけて滴下で加えた。得られた溶液を、１５～２０℃で１時間エイジングした。プロセス分析（試料調製：溶液系０．１ｍＬ＋ＡＣＮ　０．９ｍＬ＋ジイソプロピルエチルアミン１滴）により、出発物質の完全な転化が示されたら、温度を５～１０℃に維持しながら、ジイソプロピルエチルアミン（６１７ｇ、１５．０当量）で混合物をクエンチした。混合物を５～１０℃で２０分間撹拌し、次いで温度を５～１０℃に維持しながら、飽和ＮＨ$_{4}$Ｃｌ水溶液（２．６Ｌ、１０体積）を投入した。混合物をこの温度で更に３０分間エイジングした。水相（固体を含有）を回収し、２－ＭｅＴＨＦ（５２０ｍＬ、２体積）で抽出した。有機相を合わせ、ＫＦ（ＫＦ：９．１８％）により含水量をチェックし、次いで無水Ｎａ$_{2}$ＳＯ$_{4}$（５００ｇ、１０．０当量）で乾燥させた。固体を濾過によって除去し、濾過ケーキをアセトニトリル（２×５２０ｍＬ、２体積）で洗浄した。次に、濾液を無水Ｎａ$_{2}$ＳＯ$_{4}$（５００ｇ、１０．０当量）で乾燥させた。濾過後、濾過ケーキをアセトニトリル（２×５２０ｍＬ、２体積）で洗浄し、含水量をＫＦによってチェックした（ＫＦ：８．１５％）。アセトニトリル／２－ＭｅＴＨＦ抽出液１０を次のステップに直接使用した。（生成物はＬＣＭＳ条件に対して安定ではなかった）。

【０４７５】

化合物１４（遊離酸）の調製

【０４７６】

【化８６】



メチル６－（（４－（（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）アミノ）フェニル）（１６－（（６－（メトキシカルボニル）ピリジン－２－イル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリナート

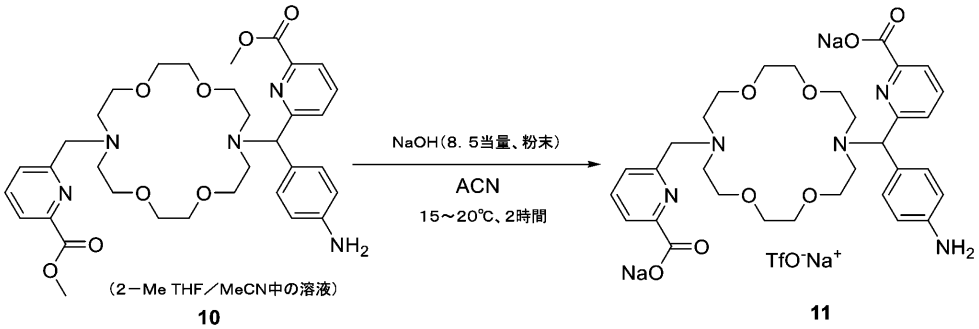
（６．０ｇ、１．０当量）及びＢＳＡ（９．７ｇ、６．０当量）及びＭｅＣＮ（１２０ｍＬ、９に対して２０体積）を、５００ｍＬ反応容器に窒素雰囲気下、室温で投入した。ＭｅＣＮ（１２０ｍＬ、２０体積）中のＴＭＳＯＴｆ（５．４ｇ、２．３当量）の溶液を室温で３０分かけて滴下で加えた。混合物を室温で一晩エイジングした。混合物の分析（試料調製：溶液系０．１ｍＬ＋ＡＣＮ　０．９ｍＬ＋ジイソプロピルエチルアミン１滴）により、反応が完了に達したことが示された。混合物をジイソプロピルエチルアミン（１５．４ｇ、１５．０当量）でクエンチし、温度を０～５℃に維持した。混合物を０～５℃で５分間撹拌し、次いで温度を０～５℃に維持しながら、飽和NH_4Cl溶液（６０ｍＬ、１０体積）を滴下で加えた。水相を抽出により除去し、有機相を回収し、次のステップに直接使用した。有機相を５００ｍＬの三口丸底瓶に入れ、水（６０ｍＬ、１０体積）中のＬｉＯＨ（１．１５ｇ、６．０当量）の溶液を、室温で溶液に添加した。溶液を室温で１時間撹拌した。混合物の分析（試料調製：溶液系０．１ｍＬ＋アセトニトリル０．９ｍＬ）は、完全な転化を示さなかった。更にＬｉＯＨ（５７６ｍｇ、３．０当量）を加え、溶液を室温で更に１時間撹拌した。混合物の分析（試料調製：溶液系０．１ｍＬ＋アセトニトリル０．９ｍＬ）により、反応が完了に達したことが示された。次に、ＴＣＤＩ（５．６ｇ、３．９当量）を加え、溶液を室温で１時間撹拌した。混合物の分析（試料調製：溶液系０．１ｍＬ＋アセトニトリル０．９ｍＬ）は、完全な転化を示さなかった。更にＴＣＤＩ（２．８ｇ、２．０当量）を加え、溶液を室温で更に１時間撹拌した。混合物の分析（試料調製：溶液系０．１ｍＬ＋アセトニトリル０．９ｍＬ）により、反応が完了に達したことが示された。反応溶液を逆相Ｃｏｍｂｉ－ＦｌａｓｈによＯって分離した。方法：カラムＣ１８、Ａ溶液H_2O（０．０１％ギ酸含有）、Ｂ溶液ＡＣＮ。４０分間で５％から３５％へ、流量（１００ｍＬ／分）、生成物は２０分～２５分。溶液を回収する。溶液を濃縮してＡＣＮを除去し、逆相Ｃｏｍｂｉ－ＦｌａｓｈによＯって再び分離した。方法：カラムＣ１８、Ａ溶液H_2O、Ｂ溶液ＡＣＮ。５％１０分、５分で５％～３５％、９５％１０分、流量（１００ｍＬ／分）、生成物は１３分～２５分。溶液を回収する。溶液を減圧下、２０℃未満で濃縮し、凍結乾燥により乾燥させた。これにより、２．５ｇ（３ステップで収率４７％）の化合物１４が黄色固体として得られた。化合物１４（６－（（１６－（（６－カルボキシピリジン－２－イル）（４－イソチオシアナトフェニル）メチル）－１，４，１０，１３－テトラオキサ－７，１６－ジアザシクロオクタデカン－７－イル）メチル）ピコリン酸）は、－８０℃で保存する必要があった。ＬＣＭＳ：（ＥＳ，ｍ／ｚ）：６６６．３　［Ｍ＋Ｈ］$^+$　^{1}Ｈ－ＮＭＲ：（４００ＭＨｚ，D_2O，ｐｐｍ）：７．９４－７．８４（ｍ，４Ｈ），７．５６－７．４０（ｍ，４Ｈ），７．１６－７．１４（ｍ，２Ｈ），５．８３（ｓ，１Ｈ），４．５６（ｓ，２Ｈ），３．８０－３．７５（ｍ，８Ｈ），３．６０－３．４９（ｍ，１４Ｈ），３．３６－３．３３（ｍ，２Ｈ）．

【０４７７】

化合物１１（ナトリウム塩）の調製：

【０４７８】

【化８７】



ＡＣＮ及び２－ＭｅＴＨＦ中の化合物１０の調製された溶液を、１０Ｌの四口反応容器に入れ、溶液を５～１０℃に冷却した。温度を５～１０℃に維持しながら、粉末ＮａＯＨ

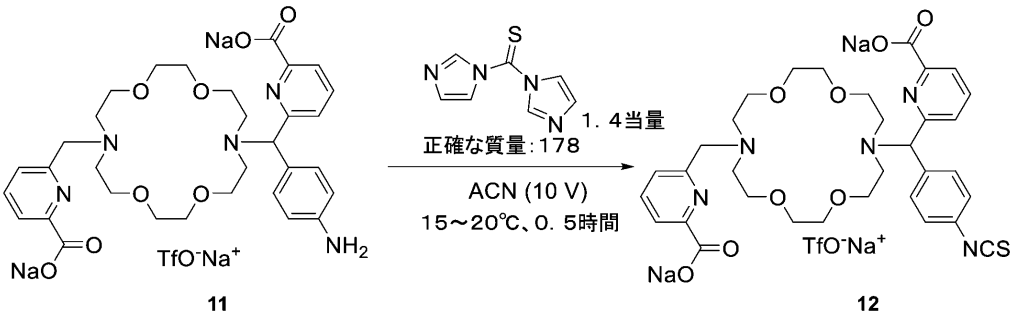
（５６．９ｇ、４．５当量）を添加した。得られた溶液を、１５～２０℃で０．５時間撹拌した。混合物の分析（試料調製：溶液系０．１ｍＬ＋アセトニトリル０．９ｍＬ）は、転化を示さなかった。追加の粉末ＮａＯＨ（２５．３ｇ、２．０当量）を５～１０℃で加えた。溶液を１５～２０℃で更に０．５時間エイジングした。第２のＩＰＣを分析したところ、５０％の転化率であることが示された。粉末ＮａＯＨの最終添加（２５．３ｇ、２．０当量）を５～１０℃で加えた。混合物を１５～２０℃で更に０．５時間撹拌した。分析により、出発物質１０の完全な転化が示された。この混合物を濾過し、濾過ケーキをアセトニトリル（２×５２０ｍＬ、２体積）で洗浄した。最終溶液（約７．５Ｌ、２８．８体積）を、１５～２０℃の温度を維持しながら１～２体積に濃縮した。次いで、残留物をアセトニトリル（２Ｌ、７．７体積）で処理し、含水量をＫＦによってチェックした（ＫＦ：５．７％）。この混合物を濾過し、濾過ケーキをＡＣＮ（２×５２０ｍＬ、２体積）で洗浄した。次いで、溶液を真空下、１５～２０℃で１～２体積に濃縮した。含水量を再びＫＦによってチェックした（ＫＦ：５．５％）。溶液をアセトニトリル（３９０ｍＬ、１．５体積）で希釈し、温度を１５～２０℃の間に維持しながら、ＭＴＢＥ（２．６Ｌ、１０体積）に０．５時間かけて滴下で加えた。溶媒をデカントして粘性油状物を残し、これをアセトニトリル（５２０ｍＬ、２体積）に再溶解させ、ＭＴＢＥ（２．６Ｌ、１０体積）に加えた。このプロセスを、更に４回繰り返した。粘性油状物を得て、これを最終的にアセトニトリル（５２０ｍＬ、２体積）に溶解させ、乾燥させ、次いで減圧下１５～２０℃で濃縮した。次いで、１５～２０℃でオイルポンプを用いて蒸発させることにより残留溶媒を除去した。乾燥後、３３５ｇの化合物１１が黄色がかった固体として得られた（ＱＮＭＲ：７０％、２ステップにわたる全収率８７％）。ＬＣＭＳ（ＥＳ，ｍ／ｚ）：６２４．３　［Ｍ－ＴｆＯＮａ－２Ｎａ＋３Ｈ］$^{+}$　^{1}Ｈ－ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，Ｍｅｔｈａｎｏｌ－ｄ$_{4}$，ｐｐｍ）：δ７．９７（ｄｄ，Ｊ＝７．８，２．１Ｈｚ，２Ｈ），７．８４（ｔ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），７．７５（ｔ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，１Ｈ），７．３６（ｄｄ，Ｊ＝７．８，１．１Ｈｚ，１Ｈ），７．２３（ｄ，Ｊ＝７．７Ｈｚ，１Ｈ），７．１１（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），６．７２（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，２Ｈ），３．９６（ｓ，１Ｈ），３．８３－３．３６（ｍ，１８Ｈ），３．０３　－　２．６２（ｍ，６Ｈ），２．５５（ｄ，Ｊ＝１４．３Ｈｚ，２Ｈ）．

【０４７９】

化合物１２（ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルイソチオシアネートナトリウム塩）の調製：

【０４８０】

【化８８】



11　　12

ＴＣＤＩ（６８．７ｇ、１．４当量）及びアセトニトリル（２．６Ｌ、８体積）を、窒素雰囲気下、１５～２０℃で１０Ｌ反応容器に入れた。温度を１５～２０℃に維持しながら、アセトニトリル（６６０ｍＬ、２体積）中の化合物１１（３３０ｇ、Ｎａ$^{+}$塩、ＱＮＭＲ：７０％、１．０当量）の溶液を３０分かけて滴下で加えた。混合物を１５～２０℃で０．５時間エイジングした。混合物の分析（試料調製：溶液系３０μＬ＋ＡＣＮ　３００μＬ＋水１滴）により、反応が完了に達したことが示された。含水量をＫＦによってチェックした（ＫＦ：０．１９％）。溶液系を、１５～２０℃で減圧下で乾燥させ濃縮した。得られた残留物をアセトニトリル（９４５ｍＬ、２．９体積）に溶解させ、含水量をＫ

Ｆによって測定した（ＫＦ：０．３４％）。酢酸イソプロピル（６６０ｍＬ、２体量）を１５～２０℃で４０分間かけて溶液に加えた。核形成は観察されず、追加の酢酸イソプロピル（６．６Ｌ、１８体積）を１５～２０℃で４０分かけてゆっくりと滴下投入して、生成物１２の沈殿をもたらし、これを濾過によって黄色がかった固体として回収した。固体をアセトニトリル（３３０ｍＬ、１体積）に溶解させ、ＩＰＡｃ（６．６Ｌ、２０体積）を１５～２０℃で４０分間かけてゆっくりと滴下で加えた。混合物を濾過して、２３０ｇの生成物を黄色がかった固体として得た（ＬＣＡＰ：８０．９９％、ＱＮＭＲ：５９％、１０％　ＩＰＡｃ）。ウェットケーキを真空下、１５～２０℃で２時間乾燥させて、２２４ｇの粗生成物１２を黄色がかった固体として得た（ＬＣＡＰ：８０．９％、ＱＮＭＲ：６０．４％、約６％　ＩＰＡｃ）。粗生成物１２をアセトニトリル（３３０ｍＬ、１体積）に再溶解させ、酢酸イソプロピル（４１２ｍＬ、１．２５体積）を１５～２０℃で４０分間かけてゆっくりと滴下で加えた。得られた混合物を濾過し、１２を回収した（３０．５ｇ、ＨＰＬＣ＝６０．９％、アッセイ：２５．５％）。母液を、１５～２０℃で４０分間かけて加えた酢酸イソプロピル（６．６Ｌ、２０体量）で希釈した。混合物を濾過し、ケーキを乾燥させて、１７３．５ｇの粗生成物１２を黄色がかった固体として得た（ＬＣＡＰ：８５．４％、ＱＮＭＲ：６６％、３．９％　ＩＰＡｃ、ＲＲＴ１．１９＝３．９％）。１９０ｇの未精製の生成物１２を７６０ｍＬのアセトニトリル：酢酸イソプロピル（２：１）に溶解し、混合物をシリカゲルカラム（３８０ｇ、２×）に通した。シリカをアセトニトリル：酢酸イソプロピル（２：１、５．７Ｌ）、次いで１２Ｌのアセトニトリルでフラッシュした（非常に少量の生成物）。生成物含有画分を濃縮して、１１８ｇの生成物１２を黄色がかった固体として得た（ＬＣＡＰ：９５％）。次いで、シリカパッドを$MeCN/H_2O$（１２Ｌ、１０：１）で洗い流した。溶媒を真空中で除去して、追加の６０ｇの粗生成物１２を黄色がかった固体として得て、これをアセトニトリル（１．５Ｌ）に溶解させ、３０分間撹拌し、次いで濾過した。次いで、母液を濃縮して、２４ｇの粗生成物１２を黄色がかった固体として得た（ＬＣＡＰ＝９２％）。上記のように調製した粗生成物１２（１１８ｇ）及び粗生成物１２（２４ｇ）をアセトニトリル（３３０ｍＬ、１体積）に溶解させ、酢酸イソプロピル（６．６Ｌ、２０体積）を１５～２０℃で４０分間かけて滴下で加えた。次いで、混合物を濾過して、１３３ｇの生成物１２を適切な純度の黄色がかった固体として得た（ＬＣＡＰ：９５％、ＱＮＭＲ：６０．８％、７．８％　ＩＰＡｃ）。注記：化合物１２は－２０℃での貯蔵が必要であった。ＬＣＭＳ：（ＥＳ，ｍ／ｚ）：６６６．６１　［Ｍ－ＴｆＯＮａ－２Ｎａ＋３Ｈ］$^{+}$　^{1}Ｈ－ＮＭＲ：（４００ＭＨｚ，メタノール－d_4，ｐｐｍ）：δ８．００（ｄｄｄ，Ｊ＝１３．８，７．７，１．０Ｈｚ，２Ｈ），７．８４（ｄｔ，Ｊ＝２０．４，７．７Ｈｚ，２Ｈ），７．５８－７．４９（ｍ，２Ｈ），７．４０（ｄｄ，Ｊ＝７．６，１．０Ｈｚ，１Ｈ），７．３６－７．２８（ｍ，２Ｈ），７．２８－７．２０（ｍ，１Ｈ），４．９６（ｈｅｐｔ，Ｊ＝６．３Ｈｚ，１Ｈ），３．９６－３．８８（ｍ，１Ｈ），３．８３（ｄ，Ｊ＝１５．１Ｈｚ，１Ｈ），３．７０－３．５２（ｍ，１１Ｈ），３．５５－３．３９（ｍ，４Ｈ），３．０７－２．７３（ｍ，６Ｈ），２．６２（ｄｔ，Ｊ＝１５．１，３．６Ｈｚ，２Ｈ）。

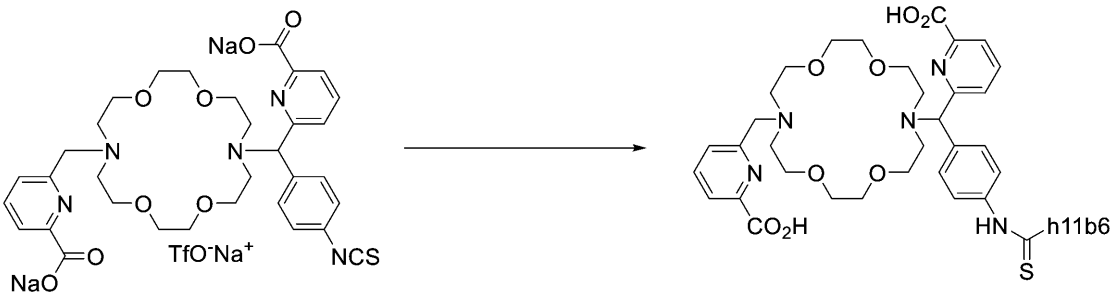
【０４８１】

（実施例２０）

ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６抗体コンジュゲート

【０４８２】

【化８９】



（上記のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６抗体コンジュゲートにおいて、構造は、フェニルチオ尿素部分に連結されたｈ１１Ｂ６のリジン残基を示さない。）

【０４８３】

ｍＡｂのＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素修飾：

ｈ１１ｂ６　ｍＡｂ（１０．２ｍｇ／ｍＬ）を１０ｍＭ酢酸ナトリウムｐＨ　５．２緩衝液中で１ｍｇ／ｍＬに希釈した。コンジュゲーションの直前に、ｐＨを重炭酸ナトリウム緩衝液（ＶＷＲ　１４４－５５－８）でｐＨ　９に調整した。ｐＨはｐＨ紙で確認した。次いで、１０倍モル過剰の二ナトリウム塩ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルイソチオシアネートナトリウム塩（水に溶解した５０ｍＭストック）をｈ１１ｂ６　ｍＡｂに加え、抗体とＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルイソチオシアネートナトリウム塩との混合物を振盪せずに室温で約１時間インキュベートした。ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルイソチオシアネートナトリウム塩の添加を、ＣＡＲ値が１．５～２．０になるまで、Ａｇｉｌｅｎｔ（登録商標）Ｇ２２４装置で、インタクト質量ＥＳＩ－ＴＯＦ　ＬＣ－ＭＳによってモニターした。１Ｍ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ　８．５（Ｔｅｋｎｏｖａ　Ｔ１０８５）を最終濃度１００ｍＭまで添加することによって、混合物を直ちにクエンチした。７Ｋ　Ｚｅｂａ（登録商標）脱塩カラムを使用して１０ｍＭ酢酸ナトリウムｐＨ　５．２中で反応物を脱塩することによって、過剰な遊離キレート剤を除去した。過剰なキレート剤が存在しないことを確認するために、１５ｍＬへの３回の試料希釈、続いて５０，０００　ＭＷＣＯ　Ａｍｉｃｏｎ濃縮装置を使用した１ｍＬへの濃縮を行った。次いで、試料を放射性標識のためにその最終濃度まで濃縮した。Ｔｏｓｏｈ　ＴＳＫｇｅｌ　Ｇ３０００ＳＷｘｌ　７．８ｍｍ×３０ｃｍ、５ｕカラム、カラム温度：室温で、カラムを０．２Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ　６．８）、流量：０．８ｍＬ／分、１８分の運転、注入量：１８μＬで溶出する分析サイズ排除クロマトグラフィーにより、最終コンジュゲートがモノマーであることが確認された。

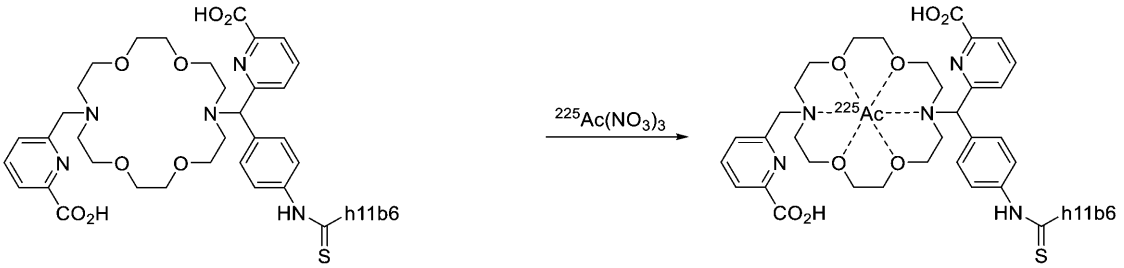
【０４８４】

（実施例２１）

Ａｃ－２２５標識ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６抗体コンジュゲート

【０４８５】

【化９０】



（上記のＡｃ－２２５標識ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６抗体コ

ンジュゲートにおいて、構造は、フェニルチオ尿素部分に連結されたｈ１１Ｂ６のリジン残基を示さない。）

【０４８６】

（ｉ）　３Ｍ　ＮａＯＡｃ緩衝液中のＡｃ－２２５によるＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６の標識：

プラスチックバイアル中のＮａＯＡｃの溶液（H_2O中３Ｍ、６０μＬ）に、Ａｃ－２２５（０．１Ｎ　ＨＣｌ中１０ｍＣｉ／ｍＬ、１５μＬ）及びＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６（１０ｍＭ　ＮａＯＡｃ　ｐＨ＝５．５中１．１３ｍｇ／ｍＬ、４４１μＬ、０．５ｍｇ）を順次加えた。混合後、ｐＨ試験紙により、ｐＨは約６．５であった。バイアルを３７℃で２時間放置した。

【０４８７】

標識反応混合物のｉＴＬＣ：

０．５μＬの標識反応混合物をｉＴＬＣ－ＳＧに充填し、これを１０ｍＭのＥＤＴＡ（ｐＨ　５～６）で展開した。乾燥したｉＴＬＣ－ＳＧを室温で一晩放置した後、Ｂｉｏｓｃａｎ　ＡＲ－２０００ラジオＴＬＣスキャナでスキャンした。本明細書に記載される溶出条件下で、ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６結合Ａｃ－２２５は起点に留まり、任意の遊離Ａｃ－２２５は溶媒と共に溶媒先端に移動したことになる。ｉＴＬＣのスキャンは、９９．９％のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６がＡｃ－２２５に結合していることを示した。

【０４８８】

標識反応混合物のＤＴＰＡチャレンジ：

更に、０．５μＬの標識反応混合物を、３７℃で１０ｍＭ　ＤＴＰＡ（ｐＨ＝６．５、１５μＬ）と混合した。３０分後、１０μＬの混合物をｉＴＬＣ－ＳＧ上にスポットし、１０ｍＭ　ＥＤＴＡによって展開した。乾燥したｉＴＬＣ－ＳＧを室温で一晩放置した後、Ｂｉｏｓｃａｎ　ＡＲ－２０００ラジオＴＬＣスキャナでスキャンした。本明細書に記載される溶出条件下で、ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６キレート化Ａｃ－２２５は起点に留まり、任意の遊離Ａｃ－２２５は溶媒と共に溶媒先端に移動したことになる。ｉＴＬＣのスキャンをスキャンすると、９９．７％のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６がＡｃ－２２５にキレート化していることが示された。

【０４８９】

ＰＤ１０カラムでの精製：

ＮａＯＡｃ緩衝液（２５ｍＭ　ＮａＯＡｃ、０．０４％　ＰＳ－２０、ｐＨ　５．５）を５ｍＬ×３回カラムに通し、洗浄液を廃棄することによって、ＰＤ－１０樹脂をＮａＯＡｃ緩衝液で調整した。全ての標識反応混合物をカラムのリザーバに適用し、溶出液を予め番号付けしたプラスチックチューブに回収した。反応バイアルを、ＮａＯＡｃ緩衝液（２５ｍＭ　ＮａＯＡｃ、０．０４％　ＰＳ－２０、ｐＨ　５．５）で０．２ｍＬ×３回洗浄し、洗浄液をＰＤ－１０カラムのリザーバにピペットで入れ、溶出液を回収した。各チューブは約１ｍＬの溶出液を含んでいた。ＰＤ－１０カラムのリザーバへのＮａＯＡｃ緩衝液（２５ｍＭ　ＮａＯＡｃ、０．０４％　ＰＳ－２０、ｐＨ　５．５）の継続的な適用を１０ｍＬの総溶出体積に達するまで行った。回収した画分の放射化学的純度をｉＴＬＣによってチェックした。１０ｕＬの各回収画分をｉＴＬＣ－ＳＧ上にスポットし、１０ｍＭ　ＥＤＴＡで展開した。乾燥したｉＴＬＣ－ＳＧを室温で一晩放置した後、Ｂｉｏｓｃａｎ　ＡＲ－２０００ラジオＴＬＣスキャナでスキャンした。純粋な画分は、ｉＴＬＣ－ＳＧの溶媒先端で放射活性シグナルを有さないはずである。

【０４９０】

精製した^{225}Ａｃ－ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６のＤＴＰＡチャレンジ：

ＰＤ－１０カラム後に回収した１０μＬの画分＃３を、１５μＬの１０ｍＭのＤＴＰＡ溶液（ｐＨ６．５）と混合し、３０分間インキュベートした。１０μＬの混合物をｉＴＬＣ－ＳＧに装填し、これを１０ｍＭのＥＤＴＡで展開し、一晩乾燥させた。これをＢｉｏ

ｓｃａｎ　ＡＲ－２０００ラジオＴＬＣスキャナでスキャンした。ｉＴＬＣ－ＳＧの溶媒先端では、放射能シグナルは観察されなかったが、これは、画分＃３中に遊離Ａｃ－２２５が存在しなかったことを示す。

【０４９１】

精製した^{225}Ａｃ－ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６のＨＰＬＣ分析：

ＰＤ－１０カラム後に回収した画分＃３をＨＰＬＣにより分析した。ＨＰＬＣ法：Ｔｏｓｏｈ　ＴＳＫｇｅｌ　Ｇ３０００ＳＷｘｌ　７．８ｍｍ×３０ｃｍ、５μｍカラム、カラム温度：室温で、このカラムをＤＰＢＳ緩衝液（×１、カルシウム及びマグネシウムを含まない）、流量：０．７ｍＬ／分、２０分の運転、注入量：４０μＬで溶出した。ＨＰＬＣ後、画分を３０秒又は１分の時間間隔で回収した。回収したＨＰＬＣ画分を室温で一晩放置した。回収した画分の各々の放射能をγ計数器で計数した。ＨＰＬＣ放射能トレースは、各ＨＰＬＣ画分中の放射能から構築された。ＨＰＬＣ放射能トレースは、ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６ピークに対応する放射能ピークをＨＰＬＣ　ＵＶトレース上で示した。

【０４９２】

（ｉｉ）　１．５Ｍ　ＮａＯＡｃ緩衝液中のＡｃ－２２５によるより高濃度のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６の標識：

プラスチックバイアル中のＮａＯＡｃの溶液（H_2O中１．５Ｍ、０．０４％　ＰＳ－２０含有、６３μＬ）に、Ａｃ－２２５（０．１Ｎ　ＨＣｌ中１０ｍＣｉ／ｍＬ、１０μＬ）及びＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６（１０ｍＭ　ＮａＯＡｃ　ｐＨ＝５．２中９．３６ｍｇ／ｍＬ、０．０４％　ＰＳ－２０、３６ｕＬ、３３７μｇ）を順次加えた。混合後、ｐＨ試験紙により、ｐＨは約６．５であった。バイアルを３７℃で２時間放置した。

【０４９３】

標識反応混合物のｉＴＬＣ：

次に０．５μＬの標識反応混合物をｉＴＬＣ－ＳＧに充填し、これを１０ｍＭのＥＤＴＡで展開した。乾燥したｉＴＬＣ－ＳＧを室温で一晩放置した後、Ｂｉｏｓｃａｎ　ＡＲ－２０００ラジオＴＬＣスキャナでスキャンした。本明細書に記載される溶出条件下で、ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６結合Ａｃ－２２５は起点に留まり、任意の遊離Ａｃ－２２５は溶媒と共に溶媒先端に移動したことになる。ｉＴＬＣのスキャンは、９９．９％のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６がＡｃ－２２５に結合していることを示した。

【０４９４】

標識反応混合物のＤＴＰＡチャレンジ：

更に、０．５μＬの標識反応混合物を、３７℃で１０ｍＭ　ＤＴＰＡ（ｐＨ＝６．５、１５μＬ）と混合した。３０分後、１０μＬの混合物をｉＴＬＣ－ＳＧ上にスポットし、１０ｍＭ　ＥＤＴＡによって展開した。乾燥したｉＴＬＣ－ＳＧを室温で一晩放置した後、Ｂｉｏｓｃａｎ　ＡＲ－２０００ラジオＴＬＣスキャナでスキャンした。本明細書に記載される溶出条件下で、ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６キレート化Ａｃ－２２５は起点に留まり、任意の遊離Ａｃ－２２５は溶媒と共に溶媒先端に移動したことになる。ｉＴＬＣをスキャンすると、９９．９％のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６がＡｃ－２２５にキレート化していることが示された。

【０４９５】

（ｉｉｉ）　１Ｍ　ＮａＯＡｃ緩衝液中のＡｃ－２２５によるより高濃度のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６の標識：

プラスチックバイアル中のＮａＯＡｃの溶液（H_2O中１．０Ｍ、０．０４％　ＰＳ－２０含有、６３μＬ）に、Ａｃ－２２５（０．１Ｎ　ＨＣｌ中１０ｍＣｉ／ｍＬ、１０μＬ）及びＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６（１０ｍＭ　ＮａＯＡｃ　ｐＨ＝５．２中９．３６ｍｇ／ｍＬ、０．０４％　ＰＳ－２０、３６ｕＬ、３３７μｇ）

を順次加えた。混合後、ｐＨ試験紙により、ｐＨは約６．５であった。バイアルを３７℃で２時間放置した。

【０４９６】

標識反応混合物のｉＴＬＣ：

次に０．５μＬの標識反応混合物をｉＴＬＣ－ＳＧに充填し、これを１０ｍＭのＥＤＴＡで展開した。乾燥したｉＴＬＣ－ＳＧを室温で一晩放置した後、Ｂｉｏｓｃａｎ　ＡＲ－２０００ラジオＴＬＣスキャナでスキャンした。本明細書に記載される溶出条件下で、ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６結合Ａｃ－２２５は起点に留まり、任意の遊離Ａｃ－２２５は溶媒と共に溶媒先端に移動したことになる。ｉＴＬＣのスキャンは、９９．９％のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６がＡｃ－２２５に結合していることを示した。

【０４９７】

標識反応混合物のＤＴＰＡチャレンジ：

更に、０．５μＬの標識反応混合物を、３７℃で１０ｍＭ　ＤＴＰＡ（ｐＨ＝６．５、１５μＬ）と混合した。３０分後、１０μＬの混合物をｉＴＬＣ－ＳＧ上にスポットし、１０ｍＭ　ＥＤＴＡによって展開した。乾燥したｉＴＬＣ－ＳＧを室温で一晩放置した後、Ｂｉｏｓｃａｎ　ＡＲ－２０００ラジオＴＬＣスキャナでスキャンした。本明細書に記載される溶出条件下で、ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６キレート化Ａｃ－２２５は起点に留まり、任意の遊離Ａｃ－２２５は溶媒と共に溶媒先端に移動したことになる。ｉＴＬＣをスキャンすると、９９．９％のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６がＡｃ－２２５にキレート化していることが示された。

【０４９８】

２５ｍＭ　ＮａＯＡｃ緩衝液中（０．４％　ｔｗｅｅｎ－２０含有、ｐＨ　５．５）のＡｃ－２２５によるより高濃度のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６の標識：

プラスチックバイアル中のＮａＯＡｃの溶液（H_2O中２５ｍＭ、０．０４％　ＰＳ－２０含有、ｐＨ　５．５、１０μＬ）に、Ａｃ－２２５（０．１Ｎ　ＨＣｌ中１０ｍＣｉ／ｍＬ、５μＬ）、ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６（１０ｍＭ　ＮａＯＡｃ（ｐＨ＝５．２）中１０．４ｍｇ／ｍＬ、１６ｕＬ、１６６μｇ）及びＮａＯＨ（０．１Ｍ、５μＬ）を順次加えた。混合後、ｐＨ試験紙により、ｐＨは約６．０であった。バイアルを３７℃で２時間放置した。

【０４９９】

標識反応混合物のｉＴＬＣ：

次に０．５μＬの標識反応混合物をｉＴＬＣ－ＳＧに充填し、これを１０ｍＭのＥＤＴＡで展開した。乾燥したｉＴＬＣ－ＳＧを室温で一晩放置した後、Ｂｉｏｓｃａｎ　ＡＲ－２０００ラジオＴＬＣスキャナでスキャンした。本明細書に記載される溶出条件下で、ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６結合Ａｃ－２２５は起点に留まり、任意の遊離Ａｃ－２２５は溶媒と共に溶媒先端に移動したことになる。ｉＴＬＣのスキャンは、９９．９％のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６がＡｃ－２２５に結合していることを示した。

【０５００】

標識反応混合物のＤＴＰＡチャレンジ：

更に、０．５μＬの標識反応混合物を、３７℃で１０ｍＭ　ＤＴＰＡ（ｐＨ＝６．５、１５μＬ）と混合した。３０分後、１０μＬの混合物をｉＴＬＣ－ＳＧ上にスポットし、１０ｍＭ　ＥＤＴＡによって展開した。乾燥したｉＴＬＣ－ＳＧを室温で一晩放置した後、Ｂｉｏｓｃａｎ　ＡＲ－２０００ラジオＴＬＣスキャナでスキャンした。本明細書に記載される溶出条件下で、ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６キレート化Ａｃ－２２５は起点に留まり、任意の遊離Ａｃ－２２５は溶媒と共に溶媒先端に移動したことになる。ｉＴＬＣのスキャンは、９９．８％のＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６がＡｃ－２２５にキレート化していることを示した。

【０５０１】
【表３】
ＴＯＰＡ－［Ｃ７］－フェニルチオ尿素－ｈ１１Ｂ６をＡｃ－２２５で標識するための反応条件

緩衝液中のTOPA－[C7]－フェニルチオ尿素－h11B6	標識反応の緩衝液	放射化学的収率（iTLC）	DTPAチャレンジ
10mM NaOAc(pH＝5.5)中 1.13mg／mL	3M NaOAc	＞99%	＞99%
10mM NaOAc(pH＝5.2)中 9.36mg／mL; 0.04% PS－20	1.5M NaOAc、 0.04% PS－20	＞99%	＞99%
10mM NaOAc(pH＝5.2)中 9.36mg／mL; 0.04% PS－20	1.0M NaOAc、 0.04% PS－20	＞99%	＞99%
10mM NaOAc(pH＝5.2)中 10.4mg／mL	NaOAc中25mM、 0.04%PS－20、pH 5.5	＞99%	＞99%

【０５０２】
実施例２２－抗ＫＬＫ２抗体の生成
ヒト免疫グロブリン遺伝子座を発現するトランスジェニックマウス（Ａｂｌｅｘｉｓ（登録商標））及びトランスジェニックラット（ＯｍｎｉＲａｔ（登録商標））を使用した抗体生成
ＯｍｎｉＲａｔ（登録商標）は、キメラヒト／ラットＩｇＨ遺伝子座（ラットＣＨ遺伝子座に連結された天然立体構造の２２のヒトＶＨ、全てのヒトＤ及びＪＨセグメントを含む）を、完全ヒトＩｇＬ遺伝子座（Ｊκ－Ｃκに連結された１２のＶκ及びＪλ－Ｃλに連結された１６のＶλ）と共に含む（例えば、Ｏｓｂｏｒｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ，２０１３，１９０（４）：１４８１－９０を参照のこと）。したがって、ラットは、ラット免疫グロブリンの発現の減少を示し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖及び軽鎖の導入遺伝子がクラススイッチ及び体細胞変異を受けて、完全ヒト可変領域を有する高親和性キメラヒト／ラットＩｇＧモノクローナル抗体を生成する。ＯｍｎｉＲａｔ（登録商標）の調製及び使用、並びにそのようなラットが有しているゲノム修飾は、国際公開第１４／０９３９０８号に記載されている。
【０５０３】
Ａｂｌｅｘｉｓ（登録商標）マウスは、ヒトＣＨ１及びＣＬドメインに連結されたヒト可変ドメイン、キメラヒト／マウスヒンジ領域、及びマウスＦｃ領域を有する抗体を生成する。Ａｂｌｅｘｉｓカッパマウス及びラムダマウス系統は、以下に記載されるように、その重鎖がヒト又はマウスのいずれであるかによって区別される。カッパマウスによって産生された抗体は、マウスＶＨ、ＤＨ、及びＪＨエクソン、並びにマウスＶκ、Ｊκ、及びＣκエクソンに由来する配列を欠く。内因性マウスＩｇλは、カッパマウスにおいて活性である。ヒトＩｇκ鎖は、約９０～９５％のナイーブレパートリを含み、マウスＩｇλ鎖は、この系統において約５～１０％のナイーブレパートリを含む。ラムダマウスによって産生された抗体は、マウスＶＨ、ＤＨ、及びＪＨエクソン、並びにマウスＶλ、Ｊλ、及びＣλエクソンに由来する配列を欠く。内因性マウスＩｇκは、ラムダマウスにおいて活性である。ヒトＩｇλ鎖は、約４０％のナイーブレパートリを含み、マウスＩｇκ鎖は、約６０％のナイーブレパートリを含む。Ａｂｌｅｘｉｓ（登録商標）の調製及び使用、並びにそのようなマウスが有しているゲノム修飾は、国際公開第１１／１２３７０８号に記載されている。
【０５０４】
Ａｂｌｅｘｉｓ（登録商標）マウス及びＯｍｎｉＲａｔｓ（登録商標）ラットを、可溶性完全長ＫＬＫ２タンパク質（ＶＰＬＩＥＧＲＩＶＧＧＷＥＣＥＫＨＳＱＰＷＱＶＡＶＹＳＨＧＷＡＨＣＧＧＶＬＶＨＰＱＷＶＬＴＡＡＨＣＬＫＫＮＳＱＶＷＬＧＲＨＮＬＦＥＰＥＤＴＧＱＲＶＰＶＳＨＳＦＰＨＰＬＹＮＭＳＬＬＫＨＱＳＬＲＰＤＥＤＳＳＨＤＬＭＬ

ＬＲＬＳＥＰＡＫＩＴＤＶＶＫＶＬＧＬＰＴＱＥＰＡＬＧＴＴＣＹＡＳＧＷＧＳＩＥＰＥＥＦＬＲＰＲＳＬＱＣＶＳＬＨＹＳＥＫＶＴＥＦＭＬＣＡＧＬＷＴＧＧＫＤＴＣＧＧＤＳＧＧＰＬＶＣＮＧＶＬＱＧＩＴＳＷＧＰＥＰＣＡＬＰＥＫＰＡＶＹＴＫＶＶＨＹＲＫＷＩＫＤＴＩＡＡＮＰＨＨＨＨＨＨ（配列番号４５４）のアミノ酸配列を有するヒトカリクレイン－２　６－Ｈｉｓタンパク質）で免疫した。

【０５０５】

Ａｂｌｅｘｉｓマウス及びＯｎｉＲａｔラット由来のリンパ球をリンパ節から抽出し、コホートごとに融合を行った。細胞を合わせ、ＣＤ１３８発現について選別した。可溶性ｈＫ２抗原を使用してハイスループット小型化ＭＳＤフォーマットで、ハイブリドーマスクリーニングを実施した。約３００個超のサンプルがｈＫ２バインダーであると同定された。Ｂｉａｃｏｒｅ　８Ｋ　ＳＰＲによる単一サイクル速度論法によって、３００個超の抗ｈＫＬＫ２上清サンプルのヒトＫＬＫ２タンパク質への結合を測定した。更に、上清サンプルをヒトＫＬＫ３タンパク質への結合についても同様に試験した。並行して、上清を、フローサイトメトリーによって、ＫＬＫ２発現細胞株ＶＣａｐ及び陰性細胞株ＤＵ１４５への結合についても試験した。選択された細胞バインダーを、上記のとおり、ＶＨ－ＶＬ及びＶＬ／ＶＨの両配向におけるｓｃＦｖ変換及び熱安定性試験に進めた。Ａｂｌｅｘｉｓマウス免疫キャンペーンから、ＫＬ２Ｂ４１３、ＫＬ２Ｂ３０、ＫＬ２Ｂ５３、及びＫＬ２Ｂ２４２が得られた。ＯｍｎｉＲａｔ免疫キャンペーンから、ＫＬ２Ｂ４６７及びＫＬ２Ｂ４９４が得られた。

【０５０６】

上記の様々な免疫化及びヒト化キャンペーンを通して生成された抗体を、ｆａｂフォーマット、ｍＡｂフォーマット、ＶＨ－リンカーＶＬ配向のｓｃＦｖフォーマット、又はＶＬ－リンカー－ＶＨ配向のｓｃＦｖフォーマットで発現させ、以下に記載の通り更に分析した。上記配列番号７のリンカー配列を使用して、ＶＨ／ＶＬ領域をコンジュゲートさせた。

【０５０７】

実施例２３．抗ＫＬＫ２抗体の構造的特性評価

細胞内アッセイにおいて最も高い性能を示した抗体可変ドメイン及びｓｃＦｖ抗体断片の配列を本明細書に提供する。可変ドメインは、ｆａｂフォーマット、ＶＨ－リンカーＶＬ配向のｓｃＦｖフォーマット、又はＶＬ－リンカー－ＶＨ配向のｓｃＦｖフォーマットで発現させた。

【０５０８】

可変ドメインＶＨ、ＶＬ、及びＣＤＲ

表３は、選択された抗ｈＫ２抗体のＶＨ及びＶＬアミノ酸配列を示す。表４は、選択された抗ｈＫ２抗体のＫａｂａｔ　ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３を示す。表５は、選択された抗ｈＫ２抗体のＫａｂａｔ　ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３を示す。表６は、選択された抗ｈＫ２抗体のＡｂＭ　ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３を示す。表７は、抗ｈＫ２のＡｂＭ　ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３を示す。表８は、選択されたｈＫ２抗体の可変ドメイン配列及び配列番号をまとめる。表９は、ＶＨ及びＶＬ領域のタンパク質及びＤＮＡの配列番号を示す。

【０５０９】

【表４－１】

表３．選択された抗ｈＫ２抗体のＶＨ及びＶＬのアミノ酸配列。

Ab名称	VH名	VHアミノ酸配列	VHの配列番号	VL名	VLのアミノ酸配列	VLの配列番号
m11B6	m11B6__VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYFCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	125	m11B6__VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHWYRQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIQPVEEDDFSMYFCQQTRKVPYTFGGGTKLEIK	124
h11B6	hu11B6__VH	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	5	hu11B6__VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	2
HCF3－LCD6	HCF3__VH	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	6	LCD6__VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	1
HCG5－LCB7	HCG5__VH	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	4	LCB7__VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	3
KL2B357	KL2B357__VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	159	KL2B357__VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	160
KL2B358	KL2B358__VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	161	KL2B358__VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	140

【０５１０】

【表４－２】

（表３の続き）

Ab名称	VH名	VHアミノ酸配列	VHの配列番号	VL名	VLのアミノ酸配列	VLの配列番号
KL2B359	KL2B359_VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	139	KL2B359_VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	140
KL2B360	KL2B360_VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	159	KL2B360_VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	140
KL2B413	KL2B413_VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTVTVSS	137	KL2B413_VL	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK	138
KL2B30	KL2B30_VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS	162	KL2B30_VL	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK	163
KL2B53	KL2B53_VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMDSLRVED SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVSS	164	KL2B53_VL	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIK	165
KL2B242	KL2B242_VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSS	166	KL2B242_VL	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	167

【０５１１】

【表４－３】

（表３の続き）

Ab名称	VH名	VHアミノ酸配列	VHの配列番号	VL名	VLのアミノ酸配列	VLの配列番号
KL2B467	KL2B467_VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSS	168	KL2B467_VL	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTV	169
KL2B494	KL2B494_VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMVTVSS	204	KL2B494_VL	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL	205
KL2B242LC_C33S	KL2B242_VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSS	166	KL2B242LC_C33S_VL	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	444

【０５１２】

【表５】

表４．選択された抗ＫＬＫ２抗体のＫａｂａｔ　ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３のアミノ酸配列。

	Kabat HCDR1		Kabat HCDR2		Kabat HCDR3	
Ab名称	配列	配列番号	配列	配列番号	配列	配列番号
m11B6	SDYAWN	63	YISYSGSTTY SPSLKS	64	GYYYGSGF	66
hu11B6	SDYAWN	63	YISYSGSTTY NPSLKS	65	GYYYGSGF	66
HCF3－LCD6	SDYAWN	63	YISYSGSTTY NPSLKS	65	GYYYGSGF	66
HCG5－LCB7	SDYAWN	63	YISYSGSTTY NPSLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B357	SDYAWN	63	YISYSGSTTY NPSLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B358	SDYAWN	63	YISYSGSTTY NPSLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B359	SDYAWN	63	YISYSGSTTY NPSLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B360	SDYAWN	63	YISYSGSTTY NPSLKS	65	GYYYGSGF	66
KL2B413	SYWMT	141	NIKQDGSER YYVDSVKG	142	DQNYDILTG HYGMDV	143
KL2B30	SYYWS	170	YIYYSGSTN YNPSLKS	171	TTIFGVVTP NFYYGMDV	172
KL2B53	SYDIH	176	IISYDGSKK DYTDSVKG	177	ESGWSHYY YYGMDV	178
KL2B242	SYYWS	170	RLYVSGFTN YNPSLKS	183	DSGNYWGW FDP	184
KL2B467	YYGMH	188	FISYDGSNK YYADSVKG	189	LPYSGSYW AFDY	190
KL2B494	HYAMS	206	TIGGSGGST YYADSVKG	207	PHIVMVTAL LYDGMDV	208

【０５１３】

【表６】

表５．選択された抗ｈＫ２抗体のＫａｂａｔ　ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３のアミノ酸配列。

	Kabat LCDR1		Kabat LCDR2		Kabat LCDR3	
Ab名称	配列	配列番号	配列	配列番号	配列	配列番号
m11B6	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
hu11B6	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCF3－LCD6	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCG5－LCB7	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
KL2B357	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B358	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B359	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B360	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B413	RASQGISSYLS	144	ATSTLQS	145	QQLNSYPRT	146
KL2B30	RASQGISSYLA	173	AASTLQS	174	QQLNSYPLT	175
KL2B53	RASQDISNYLA	179	AASTLHS	180	QKYNSAPYT	181
KL2B242	SGDQLGENYAC	185	QDSKRPS	186	QAWDNSIVV	187
KL2B467	GGDNIGSKSVH	191	DNSDRPS	192	QVWDSSSDHPVV	193
KL2B494	GGNNIGSKSVH	182	DDSDRPS	470	QVWDSSSDHVV	209

【０５１４】

【表７】

表６．選択された抗ｈＫ２抗体のＡｂＭ　ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３のアミノ酸配列。

	AbM HCDR1		AbM HCDR2		AbM HCDR3	
Ab名称	配列	配列番号	配列	配列番号	配列	配列番号
m11B6	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
hu11B6	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
HCF3－LCD6	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
HCG5－LCB7	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B357	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B358	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B359	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B360	GNSITSDYAWN	72	YISYSGSTT	73	GYYYGSGF	66
KL2B413	GFTFSSYWMT	147	NIKQDGSERY	148	DQNYDILTGHYGMDV	143
KL2B30	GGSISSYYWS	194	YIYYSGSTN	195	TTIFGVVTPNFYYGMDV	172
KL2B53	GFTFSSYDIH	196	IISYDGSKKD	197	ESGWSHYYYYGMDV	178
KL2B242	GGSISSYYWS	198	RLYVSGFTN	199	DSGNYWGWFDP	184
KL2B467	GFTFSYY	200	FISYDGSNKY	201	LPYSGSYWAFDY	190
KL2B494	GFTFSHYAMS	216	TIGGSGGSTYY	217	PHIVMVTALLYDGMDV	218

【０５１５】

【表８】

表７．選択されたヒトＫ２抗体のＡｂＭ　ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３のアミノ酸配列。

	AbM LCDR1		AbM LCDR2		AbM LCDR3	
Ab名称	配列	配列番号	配列	配列番号	配列	配列番号
m11B6	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
hu11B6	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCF3－LCD6	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
HCG5－LCB7	KASESVEYFGTSLMH	68	AASNRES	70	QQTRKVPYT	71
KL2B357	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B358	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B359	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B360	RASESVEYFGTSLMH	67	AASNVES	69	QQTRKVPYT	71
KL2B413	RASQGISSYLS	144	ATSTLQS	145	QQLNSYPRT	146
KL2B30	RASQGISSYLA	173	AASTLQS	174	QQLNSYPLT	175
KL2B53	RASQDISNYLA	179	AASTLHS	180	QKYNSAPYT	181
KL2B242	SGDQLGENYAC	185	QDSKRPS	186	QAWDNSIVV	187
KL2B467	GGDNIGSKSVH	191	DNSDRPS	192	QVWDSSSDHPVV	193
KL2B494	GGNNIGSKSVH	182	DDSDRPS	470	QVWDSSSDHVV	209

【０５１６】

【表９－１】

表８．選択された抗ｈＫ２抗体の可変ドメインのアミノ酸配列及び配列番号のまとめ

抗体名	領域	アミノ酸配列	配列番号
m11B6	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYSPSLKS	64
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH（m11B6_VH）	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSD YAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTTYSPS LKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYF CATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	125
	VL（m11B6_VL）	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYF GTSLMHWYRQKPGQPPKLLIYAASNVESGVP ARFSGSGSGTDFSLNIQPVEEDDFSMYFCQQ TRKVPYTFGGGTKLEIK	124
h11B6	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	KASESVEYFGTSLMH	68
	LCDR2	AASNRES	70
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH （hu11B6_VH）	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYY CATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	5
	VL （hu11B6_VL）	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYF GTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQT RKVPYTFGQGTKLEIK	2
HCF3－LCD6	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	KASESVEYFGTSLMH	68
	LCDR2	AASNRES	70
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH（HCF3_VH）	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYC ATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	6
	VL（LCD6_VL）	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYF GTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQT RKVPYTFGQGTKLEIK	1
HCG5－LCB7	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	KASESVEYFGTSLMH	68
	LCDR2	AASNRES	70
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	V（HCG5_VH）	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYY CATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	4
	VL（LCB7_VL）	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYF GTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQT RKVPYTFGQGTKLEIK	3

【０５１７】

【表９－２】

（表８の続き）

抗体名	領域	アミノ酸配列	配列番号
KL2B357	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH(KL2B357_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	159
	VL(KL2B_357_VL)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	160
KL2B358	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH(KL2B358_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	161
	VL(KL2B_358_VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	140
KL2B359	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH(KL2B359_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	139
	VL(KL2B_359_VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	140
KL2B360	HCDR1	SDYAWN	63
	HCDR2	YISYSGSTTYNPSLKS	65
	HCDR3	GYYYGSGF	66
	LICDR1	RASESVEYFGTSLMH	67
	LCDR2	AASNVES	69
	LCDR3	QQTRKVPYT	71
	VH(KL2B360_VH)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	159
	VL(KL2B_360_VL)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	140

【０５１８】

【表９－３】

（表８の続き）

抗体名	領域	アミノ酸配列	配列番号
KL2B413	HCDR1	SYWMT	141
	HCDR2	NIKQDGSERYYVDSVKG	142
	HCDR3	DQNYDILTGHYGMDV	143
	LICDR1	RASQGISSYLS	144
	LCDR2	ATSTLQS	145
	LCDR3	QQLNSYPRT	146
	VH(KL2B413_VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTVTVSS	137
	VL(KL2B_413_VL)	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK	138
KL2B30	HCDR1	SYYWS	170
	HCDR2	YIYYSGSTNYNPSLKS	171
	HCDR3	TTIFGVVTPNFYYGMDV	172
	LICDR1	RASQGISSYLA	173
	LCDR2	AASTLQS	174
	LCDR3	QQLNSYPLT	175
	VH(KL2B30_VH)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS	162
	VL KL2B30_VL)	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK	163
KL2B53	HCDR1	SYDIH	176
	HCDR2	IISYDGSKKDYTDSVKG	177
	HCDR3	ESGWSHYYYYGMDV	178
	LICDR1	RASQDISNYLA	179
	LCDR2	AASTLHS	180
	LCDR3	QKYNSAPYT	181
	VH(KL2B53_VH)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMDSLRVED SAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVSS	164
	VL(KL2B53_VL)	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIK	165
KL2B242	HCDR1	SYYWS	170
	HCDR2	RLYVSGFTNYNPSLKS	183
	HCDR3	DSGNYWGWFDP	184
	LICDR1	SGDQLGENYAC	185
	LCDR2	QDSKRPS	186
	LCDR3	QAWDNSIVV	187
	VH(KL2B242_VH)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSS	166
	VL(KL2B242_VL)	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	167

【０５１９】

【表９－４】

（表８の続き）

抗体名	領域	アミノ酸配列	配列番号
KL2B467	HCDR1	YYGMH	188
	HCDR2	FISYDGSNKYYADSVKG	189
	HCDR3	LPYSGSYWAFDY	190
	LICDR1	GGDNIGSKSVH	191
	LCDR2	DNSDRPS	192
	LCDR3	QVWDSSSDHPVV	193
	VH（KL2B467_VH）	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSS	168
	VL（KL2B467_VL）	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTV	169
KL2B494	HCDR1	HYAMS	206
	HCDR2	TIGGSGGSTYYADSVKG	207
	HCDR3	PHIVMVTALLYDGMDV	208
	LCDR1	GGNNIGSKSVH	182
	LCDR2	DDSDRPS	470
	LCDR3	QVWDSSSDHVV	209
	VH（KL2B494_VH）	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMVTVSS	204
	VL（KL2B494_VL）	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL	205

【０５２０】

【表１０】

表９．選択されたｈＫ２抗体のＶＨ及びＶＬドメインのタンパク質及びＤＮＡ配列の配列番号。

抗体	VHタンパク質配列番号	VLタンパク質配列番号	VH cDNA 配列番号	VL cDNA 配列番号
m11B6	125	124	225	237
hu11B6	5	2	226	238
HCF3－LCD6	6	1	227	239
HCG5－LCB7	4	3	228	240
KL2B357	159	160	229	241
KL2B358	161	140	230	242
KL2B359	139	140	231	242
KL2B360	159	140	229	242
KL2B413	137	138	232	243
KL2B30	162	163	233	244
KL2B53	164	165	234	245
KL2B242	166	167	235	246
KL2B467	168	169	236	247
KL2B494	204	205	263	271

【０５２１】

配列番号２２５　（ｍ１１Ｂ６　ＶＨ　ｃＤＮＡ）

ＧＡＴＧＴＧＣＡＧＣＴＴＣＡＧＧＡＧＴＣＴＧＧＡＣＣＣＧＧＡＣＴＴＧＴＴＡＡＡ
ＣＣＡＡＧＴＣＡＧＴＣＴＣＴＧＴＣＣＣＴＧＡＣＣＴＧＴＡＣＣＧＴＣＡＣＣＧＧＣＡ

ＡＣＡＧＣＡＴＣＡＣＡＡＧＣＧＡＴＴＡＣＧＣＡＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＴＣＡＧＧＣＡ
ＧＴＴＣＣＣＴＧＧＡＡＡＴＣＧＡＣＴＣＧＡＡＴＧＧＡＴＧＧＧＣＴＡＣＡＴＴＴＣＡ
ＴＡＣＴＣＣＧＧＴＴＣＡＡＣＣＡＣＴＴＡＣＴＣＴＣＣＡＴＣＣＴＴＧＡＡＡＴＣＴＡ
ＧＧＴＴＣＡＧＣＡＴＣＡＣＣＣＧＴＧＡＴＡＣＣＴＣＡＡＡＧＡＡＣＣＡＡＴＴＴＴＴ
ＴＣＴＧＣＡＡＣＴＧＡＡＴＡＧＣＧＴＡＡＣＴＣＣＡＧＡＧＧＡＣＡＣＡＧＣＣＡＣＡ
ＴＡＴＴＴＣＴＧＣＧＣＣＡＣＴＧＧＧＴＡＴＴＡＣＴＡＴＧＧＣＴＣＡＧＧＴＴＴＣＴ
ＧＧＧＧＴＣＡＧＧＧＣＡＣＴＣＴＣＧＴＣＡＣＣＧＴＣＡＧＣＡＧＣ

【０５２２】

配列番号２２６　（ｈｕ１１Ｂ６　ＶＨ　ｃＤＮＡ）

ＣＡＧＧＴＣＣＡＡＣＴＧＣＡＡＧＡＧＡＧＣＧＧＡＣＣＧＧＧＣＣＴＧＧＴＡＡＡＧ
ＣＣＡＴＣＣＧＡＣＡＣＡＴＴＧＴＣＣＣＴＧＡＣＧＴＧＴＧＣＧＧＴＡＡＧＴＧＧＡＡ
ＡＣＴＣＴＡＴＣＡＣＴＡＧＣＧＡＣＴＡＴＧＣＧＴＧＧＡＡＴＴＧＧＡＴＡＡＧＡＣＡ
ＡＣＣＧＣＣＧＧＧＣＡＡＧＧＧＧＣＴＧＧＡＡＴＧＧＡＴＡＧＧＡＴＡＴＡＴＣＡＧＣ
ＴＡＴＴＣＣＧＧＴＴＣＴＡＣＧＡＣＡＴＡＣＡＡＴＣＣＴＴＣＣＣＴＧＡＡＡＡＧＣＡ
ＧＡＧＴＣＡＣＴＡＴＧＴＣＡＣＧＣＧＡＣＡＣＧＴＣＣＡＡＧＡＡＴＣＡＧＴＴＣＴＣ
ＡＴＴＧＡＡＡＴＴＧＴＣＡＴＣＣＧＴＡＡＣＧＧＣＣＧＴＴＧＡＣＡＣＴＧＣＧＧＴＴ
ＴＡＴＴＡＴＴＧＣＧＣＡＡＣＣＧＧＡＴＡＴＴＡＣＴＡＣＧＧＣＴＣＴＧＧＴＴＴＴＴ
ＧＧＧＧＡＣＡＧＧＧＡＡＣＡＣＴＴＧＴＴＡＣＴＧＴＴＡＧＴＴＣＡ

【０５２３】

配列番号２２７　（ＨＣＦ３－ＬＣＤ６　ＶＨ　ｃＤＮＡ）

ＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＣＡＧＧＡＧＡＧＣＧＧＣＣＣＡＧＧＣＣＴＧＧＴＧＡＡＧ
ＣＣＡＡＧＣＧＡＣＡＣＣＣＴＧＡＧＣＣＴＧＡＣＣＴＧＣＧＣＣＣＧＴＧＡＧＣＧＧＣＡ
ＡＣＡＧＣＡＴＣＡＣＣＡＧＣＧＡＣＴＡＣＧＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＴＣＣＧＣＣＡ
ＧＴＴＣＣＣＡＧＧＣＡＡＧＧＧＣＣＴＧＧＡＧＴＧＧＡＴＣＧＧＣＴＡＣＡＴＣＡＧＣ
ＴＡＣＡＧＣＧＧＣＡＧＣＡＣＣＡＣＣＴＡＣＡＡＣＣＣＡＡＧＣＣＴＧＡＡＧＡＧＣＣ
ＧＣＧＴＣＡＣＣＡＴＣＡＧＣＣＧＣＧＡＣＡＣＣＡＧＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＴＴＣＡＧ
ＣＣＴＧＡＡＧＣＴＧＡＧＣＡＧＣＧＴＧＡＣＣＣＣＴＧＴＧＧＡＣＡＣＣＧＣＣＧＴＧ
ＴＡＣＴＡＣＴＧＣＧＣＣＡＣＣＧＧＣＴＡＣＴＡＣＴＡＣＧＧＣＡＧＣＧＧＣＴＴＣＴ
ＧＧＧＧＣＣＡＧＧＧＣＡＣＣＣＴＧＧＴＧＡＣＣＧＴＧＡＧＣＡＧＣ

【０５２４】

配列番号２２８　（ＨＣＧ５－ＬＣＢ７　ＶＨ　ｃＤＮＡ）

ＣＡＧＧＴＧＣＡＧＣＴＧＣＡＧＧＡＧＡＧＣＧＧＣＣＣＡＧＧＣＣＴＧＧＴＧＡＡＧ
ＣＣＡＡＧＣＧＡＣＡＣＣＣＴＧＡＧＣＣＴＧＡＣＣＴＧＣＧＣＣＣＧＴＧＡＧＣＧＧＣＡ
ＡＣＡＧＣＡＴＣＡＣＣＡＧＣＧＡＣＴＡＣＧＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＴＣＣＧＣＣＡ
ＧＴＴＣＣＣＡＧＧＣＡＡＧＧＧＣＣＴＧＧＡＧＴＧＧＡＴＧＧＧＣＴＡＣＡＴＣＡＧＣ
ＴＡＣＡＧＣＧＧＣＡＧＣＡＣＣＡＣＣＴＡＣＡＡＣＣＣＡＡＧＣＣＴＧＡＡＧＡＧＣＣ
ＧＣＧＴＣＡＣＣＡＴＣＡＧＣＣＧＣＧＡＣＡＣＣＡＧＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＴＴＣＡＧ
ＣＣＴＧＡＡＧＣＴＧＡＧＣＡＧＣＧＴＧＡＣＣＣＣＴＧＴＧＧＡＣＡＣＣＧＣＣＧＴＧ
ＴＡＣＴＡＣＴＧＣＧＣＣＡＣＣＧＧＣＴＡＣＴＡＣＴＡＣＧＧＣＡＧＣＧＧＣＴＴＣＴ
ＧＧＧＧＣＣＡＧＧＧＣＡＣＣＣＴＧＧＴＧＡＣＣＧＴＧＡＧＣＡＧＣ

【０５２５】

配列番号２２９　（ＫＬ２Ｂ３５７，ＫＬ２Ｂ３６０　ＶＨ　ｃＤＮＡ）

ＣＡＧＧＴＴＣＡＧＣＴＧＣＡＡＧＡＧＴＣＴＧＧＡＣＣＡＧＧＣＣＴＧＧＴＣＡＡＧ
ＣＣＣＴＣＴＣＡＧＡＣＣＣＴＧＴＣＴＣＴＧＡＣＣＴＧＴＡＣＣＧＴＧＴＣＣＧＧＣＡ
ＡＣＴＣＣＡＴＣＡＣＣＴＣＴＧＡＣＴＡＣＧＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＴＴＣＧＧＣＡ
ＧＴＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＧＧＧＣＣＴＴＧＡＧＴＧＧＡＴＣＧＧＣＴＡＣＡＴＣＴＣＣ
ＴＡＣＴＣＣＧＧＴＴＣＣＡＣＣＡＣＣＴＡＣＡＡＣＣＣＣＡＧＣＣＴＧＡＡＧＴＣＣＣ
ＧＧＧＴＣＡＣＣＡＴＣＴＣＣＣＧＣＧＡＣＡＣＣＴＣＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＴＴＣＴＣ
ＣＣＴＧＡＡＧＣＴＧＴＣＣＴＣＣＧＴＧＡＣＣＧＣＴＧＣＴＧＡＴＡＣＣＧＣＣＧＴＧ
ＴＡＣＴＡＣＴＧＴＧＣＣＡＣＣＧＧＣＴＡＣＴＡＣＴＡＣＧＧＣＴＣＣＧＧＣＴＴＴＴ

GGGGACAGGGCACACTGGTTACCGTGTCTAGT

【０５２６】

配列番号２３０（ＫＬ２Ｂ３５８ ＶＨ ｃＤＮＡ）

CAGGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAG
CCCTCTCAGACCCTGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCA
ACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGAACTGGATTCGGCA
GCCACCTGGCAAGGGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCC
TACTCCGGTTCCACCACCTACAACCCCAGCCTGAAGTCCC
GGGTCACCATCTCCCGCGACACCTCCAAGAACCAGTTCTC
CCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTG
TACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTT
GGGGACAGGGCACACTGGTTACCGTGTCTAGT

【０５２７】

配列番号２３１（ＫＬ２Ｂ３５９ ＶＨ ｃＤＮＡ）

CAGGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCAGGCCTGGTCAAG
CCCTCTCAGACCCTGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCA
ACTCCATCACCTCTGACTACGCCTGGAACTGGATTCGGCA
GTTCCCTGGCAAGCGCCTTGAGTGGATCGGCTACATCTCC
TACTCCGGTTCCACCACCTACAACCCCAGCCTGAAGTCCC
GGGTCACCATCTCCCGCGACACCTCCAAGAACCAGTTCTC
CCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTG
TACTACTGTGCCACCGGCTACTACTACGGCTCCGGCTTTT
GGGGACAGGGCACACTGGTTACCGTGTCTAGT

【０５２８】

配列番号２３２（ＫＬ２Ｂ４１３ ＶＨ ｃＤＮＡ）

GAGGTGCAACTTGTGGAGAGCGGCGGAGGTCTGGTCCAA
CCCGGAGGAAGTCTCCGTCTCTCCTGTGCTGCTAGTGGCT
TCACTTTCAGCTCATATTGGATGACATGGGTGAGACAAGC
CCCAGGAAAGGGGCTCGAGTGGGTAGCTAACATTAAACAG
GACGGCTCCGAACGGTACTATGTTGATTCTGTGAAGGGAC
GGTTCACTATATCCAGGGATAATGCAAAAAATTCACTCTA
TCTTCAAATGAACTCACTCAGAGCAGAGGACACTGCCGTG
TATTATTGCGCCAGGGATCAAAATTATGACATACTGACCG
GTCATTATGGAATGGATGTTTGGGGCCAGGGAACAACCGT
TACCGTCTCAAGT

【０５２９】

配列番号２３３（ＫＬ２Ｂ３０ ＶＨ ｃＤＮＡ）

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCCAGGACTGGTGAAG
CCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTG
GCTCCATCAGTAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCC
CCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGATATATCTATTAC
AGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAG
TCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCT
GAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTAT
TACTGTGCGGGGACTACGATTTTTGGAGTGGTTACCCCCA
ACTTCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAC
GGTCACCGTCTCCTCA

【０５３０】

配列番号２３４（ＫＬ２Ｂ５３ ＶＨ ｃＤＮＡ）

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG

CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAT
TCACCTTCAGTAGTTATGACATACACTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATTTCATAT
GATGGAAGTAAAAAAGACTATACAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTA
TCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGTTGAGGACTCGGCTGTG
TATTCCTGTGCGAGAGAAAGTGGCTGGTCCCACTACTACT
ATTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAC
CGTCTCTTCA

【０５３１】

配列番号２３５　（ＫＬ２Ｂ２４２　ＶＨ　ｃＤＮＡ）

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG
CCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTG
GCTCCATCAGTAGTTACTATTGGAGCTGGCTCCGGCAGCC
CGCCGGGTCGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTTTATATGTC
AGTGGGTTCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAG
TCACCTTGTCACTAGACCCGTCCAGGAACCAGTTGTCCCT
GAAACTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTATAT
TATTGTGCGGGAGATAGTGGGAACTACTGGGGTTGGTTCG
ACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

【０５３２】

配列番号２３６　（ＫＬ２Ｂ４６７　ＶＨ　ｃＤＮＡ）

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAG
CCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT
TCACCTTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTATATCATAT
GATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTA
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTG
TATTACTGTGCCCACCTCCCTTATAGTGGGAGCTACTGGG
CCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTC
TTCA

【０５３３】

配列番号２６３　（ＫＬ２Ｂ４９４　ＶＨ　ｃＤＮＡ）

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG
CCTGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT
TCACCTTTAGTCATTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTGGTGGT
AGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTA
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTA
TATTACTGTGCGAAACCTCATATTGTAATGGTGACTGCTC
TTCTCTACGACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACAAT
GGTCACCGTCTCCTCA

【０５３４】

配列番号２３７　（ｍ１１Ｂ６　ＶＬ　ｃＤＮＡ）

GACATTGTGCTGACACAGAGTCCAGCATCCTTGGCAGTA
TCTTTGGGGCAGCGGGCAACAATTTCATGCCGTGCATCTG
AAAGTGTGGAGTATTTTGGAACTTCTCTTATGCACTGGTA
TCGCCAGAAGCCTGGGCAGCCTCCCAAACTCCTTATATAT

GCCGCTTCCAACGTGGAGTCCGGAGTACCAGCACGCTTTT
CCGGCTCTGGGTCCGGCACAGACTTTTCCCTCAATATCCA
ACCTGTTGAAGAAGACGATTTTTCCATGTATTTTTGCCAA
CAGACACGCAAGGTTCCATATACATTCGGCGGCGGCACTA
AACTTGAGATCAAA

【０５３５】

配列番号２３８　（ｈｕ１１Ｂ６　ＶＬ　ｃＤＮＡ）

GACATAGTCTTGACTCAGAGCCCGGATTCCCTTGCTGTG
TCTCTGGGAGAACGAGCTACGATCAACTGCAAGGCAAGTG
AATCCGTAGAATACTTCGGGACATCATTGATGCATTGGTA
TCAACAGAAACCGGGGCAACCGCCCAAATTGCTGATATAT
GCGGCTAGTAATAGAGAATCAGGAGTACCGGATAGGTTTA
GTGGTTCAGGATCAGGTACAGATTTCACCCTGACAATAAG
TAGCTTGCAAGCCGAAGACGTAGCAGTGTATTACTGCCAA
CAAACCCGAAAGGTGCCATATACGTTTGGACAGGGTACAA
AGTTGGAAATCAAA

【０５３６】

配列番号２３９　（ＨＣＦ３－ＬＣＤ６　ＶＬ　ｃＤＮＡ）

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGGCCGTG
AGCCTGGGCGAGCGCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCG
AGAGCGTGGAGTACTTCGGCACCAGCCTGATGCACTGGTA
CCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTAC
GCTGCCAGCAACCGCGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTCA
GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCCA
GAGCGTGCAGGCCGAGGACGTCTCCGTGTACTTCTGCCAG
CAGACCCGCAAGGTGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCA
AGCTGGAGATCAAG

【０５３７】

配列番号２４０　（ＨＣＧ５－ＬＣＢ７　ＶＬ　ｃＤＮＡ）

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGACAGCCTGGCCGTG
AGCCTGGGCGAGCGCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCG
AGAGCGTGGAGTACTTCGGCACCAGCCTGATGCACTGGTA
CCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAGCTGCTGATCTAC
GCTGCCAGCAACCGCGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTCA
GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAG
CAGCGTGCAGGCCGAGGACGTCGCCGTGTACTACTGCCAG
CAGACCCGCAAGGTGCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCA
AGCTGGAGATCAAG

【０５３８】

配列番号２４１　（ＫＬ２Ｂ３５７　ＶＬ　ｃＤＮＡ）

GACATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGACTCTCTGGCTGTG
TCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAGAGCCTCCG
AGTCCGTGGAATACTTCGGCACCTCTCTGATGCACTGGTA
CCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTAC
GCCGCCTCCAACGTGGAATCTGGCGTGCCCGATAGATTTT
CCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAG
CTCTCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTTCTGTCAG
CAGACCCGGAAGGTGCCCTACACATTTGGCGGCGGAACAA
AGGTGGAAATCAAG

【０５３９】

配列番号２４２（ＫＬ２Ｂ３５８，ＫＬ２Ｂ３５９，ＫＬ２Ｂ３６０ ＶＬ ｃＤＮＡ）
ＧＡＧＡＴＣＧＴＧＣＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣＴＧＣＣＡＣＡＣＴＧＴＣＡＣＴＧ
ＴＣＴＣＣＡＧＧＣＧＡＧＡＧＡＧＣＣＡＣＣＣＴＣＴＣＴＴＧＴＡＧＡＧＣＣＴＣＣＧ
ＡＧＴＣＣＧＴＧＧＡＡＴＡＣＴＴＣＧＧＣＡＣＣＴＣＴＣＴＧＡＴＧＣＡＣＴＧＧＴＡ
ＣＣＡＧＣＡＧＡＡＧＣＣＣＧＧＣＣＡＧＣＣＴＣＣＴＡＧＡＣＴＧＣＴＧＡＴＣＴＡＣ
ＧＣＣＧＣＣＴＣＣＡＡＣＧＴＣＧＡＡＴＣＴＧＧＣＡＴＣＣＣＣＧＣＴＡＧＡＴＴＣＴ
ＣＣＧＧＣＴＣＴＧＧＣＴＣＴＧＧＣＡＣＡＧＡＣＴＴＴＡＣＣＣＴＧＡＣＣＡＴＣＴＣ
ＣＴＣＣＧＴＧＧＡＡＣＣＣＧＡＧＧＡＴＴＴＣＧＣＴＧＴＧＴＡＣＴＴＴＴＧＣＣＡＧ
ＣＡＧＡＣＣＣＧＧＡＡＧＧＴＧＣＣＣＴＡＣＡＣＡＴＴＴＧＧＣＧＧＣＧＧＡＡＣＡＡ
ＡＧＧＴＧＧＡＡＡＴＣＡＡＧ

【０５４０】

配列番号２４３（ＫＬ２Ｂ４１３ ＶＬ ｃＤＮＡ）
ＧＡＡＡＴＣＧＴＡＣＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＣＣＣＴＴＣＴＴＴＣＴＴＧＡＧＴＧＣＡ
ＴＣＡＧＴＴＧＧＧＧＡＴＡＧＡＧＴＧＡＣＣＡＴＴＡＣＴＴＧＴＡＧＡＧＣＡＴＣＴＣ
ＡＡＧＧＴＡＴＴＴＣＴＴＣＡＴＡＣＴＴＧＴＣＴＴＧＧＴＡＴＣＡＡＣＡＡＡＡＡＣＣ
ＴＧＧＣＡＡＧＧＣＡＣＣＣＡＡＡＣＴＣＴＴＧＡＴＣＴＡＣＧＣＣＡＣＣＴＣＴＡＣＡ
ＴＴＧＣＡＡＡＧＴＧＧＧＧＴＴＣＣＴＴＣＴＡＧＧＴＴＴＴＣＡＧＧＣＴＣＣＧＧＣＴ
ＣＴＧＧＴＡＣＣＧＡＧＴＴＣＡＣＣＣＴＣＡＣＴＡＴＡＡＧＣＡＧＴＣＴＣＣＡＡＣＣ
ＴＧＡＡＧＡＴＴＴＣＧＣＴＡＣＴＴＡＴＴＡＴＴＧＴＣＡＧＣＡＧＣＴＴＡＡＴＴＣＴ
ＴＡＴＣＣＣＣＧＡＡＣＣＴＴＴＧＧＴＣＡＡＧＧＡＡＣＴＡＡＧＧＴＣＧＡＧＡＴＣＡ
ＡＡ

【０５４１】

配列番号２４４（ＫＬ２Ｂ３０ ＶＬ ｃＤＮＡ）
ＧＡＣＡＴＣＣＡＧＡＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣＴＴＣＣＴＴＣＣＴＧＴＣＴＧＣＡ
ＴＣＴＧＴＡＧＧＡＧＡＣＡＧＡＧＴＣＡＣＣＡＴＣＡＣＴＴＧＣＣＧＧＧＣＣＡＧＴＣ
ＡＧＧＧＣＡＴＴＡＧＣＡＧＴＴＡＴＴＴＡＧＣＣＴＧＧＴＡＴＣＡＧＣＡＡＡＡＡＣＣ
ＡＧＧＧＡＡＡＧＣＣＣＣＴＡＡＧＴＴＣＣＴＧＡＴＣＴＡＴＧＣＴＧＣＡＴＣＣＡＣＴ
ＴＴＧＣＡＡＡＧＴＧＧＧＧＴＣＣＣＡＴＣＡＡＧＧＴＴＣＡＧＣＧＧＣＡＧＴＧＧＡＴ
ＣＴＧＧＧＡＣＡＧＡＡＴＴＣＡＣＴＣＴＣＡＣＡＡＴＣＡＧＣＡＧＣＣＴＧＣＡＧＣＣ
ＴＧＡＡＧＡＴＴＴＴＧＣＡＡＣＴＴＡＴＴＡＣＴＧＴＣＡＡＣＡＧＣＴＴＡＡＴＡＧＴ
ＴＡＣＣＣＴＣＴＣＡＣＴＴＴＣＧＧＣＧＧＡＧＧＧＡＣＣＡＡＧＧＴＧＧＡＡＡＴＣＡ
ＡＡ

【０５４２】

配列番号２４５（ＫＬ２Ｂ５３ ＶＬ ｃＤＮＡ）
ＧＡＣＡＴＣＧＴＧＡＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＴＣＣＡＴＣＣＴＣＣＣＴＧＴＣＴＧＣＡ
ＴＣＴＧＴＡＧＧＡＧＡＣＡＧＡＧＴＣＡＣＣＡＴＣＡＣＴＴＧＣＣＧＧＧＣＧＡＧＴＣ
ＡＧＧＡＣＡＴＴＡＧＣＡＡＴＴＡＴＴＴＡＧＣＣＴＧＧＴＡＴＣＡＧＣＡＧＡＡＡＣＣ
ＡＧＧＧＡＡＡＧＴＴＣＣＴＡＡＧＴＴＣＣＴＧＡＴＣＴＡＴＧＣＴＧＣＡＴＣＣＡＣＴ
ＴＴＧＣＡＣＴＣＴＧＧＧＧＴＣＣＣＡＴＣＴＣＧＧＴＴＣＡＧＴＧＧＣＡＧＴＧＧＡＴ
ＣＴＧＧＧＡＣＡＧＡＴＴＴＣＡＣＴＣＴＣＡＣＣＡＴＣＡＧＣＡＧＣＣＴＧＣＡＧＣＣ
ＴＧＡＡＧＡＴＧＴＴＧＣＡＡＣＴＴＡＴＴＡＣＴＧＴＣＡＡＡＡＡＧＴＡＴＡＡＣＡＧＴ
ＧＣＣＣＣＧＴＡＣＡＣＴＴＴＴＧＧＣＣＡＡＧＧＧＡＣＡＣＧＡＣＴＧＧＡＧＡＴＴＡ
ＡＡ

【０５４３】

配列番号２４６（ＫＬ２Ｂ２４２ ＶＬ ｃＤＮＡ）
ＴＣＣＴＡＴＧＡＧＣＴＧＡＣＴＣＡＧＣＣＡＣＣＣＴＣＡＧＴＧＴＣＣＧＴＧＴＣＣ
ＣＣＡＧＧＡＧＡＧＡＣＡＧＣＣＡＧＣＡＴＣＡＣＣＴＧＣＴＣＴＧＧＡＧＡＴＣＡＡＴ
ＴＧＧＧＧＧＡＡＡＡＴＴＡＴＧＣＴＴＧＣＴＧＧＴＡＴＣＡＧＣＡＧＡＡＧＣＣＡＧＧ
ＣＣＡＧＴＣＣＣＣＴＧＴＧＴＴＧＧＴＣＡＴＣＴＡＴＣＡＡＧＡＴＡＧＴＡＡＧＣＧＧ
ＣＣＣＴＣＡＧＧＧＡＴＣＣＣＴＧＡＧＣＧＡＴＴＣＴＣＴＧＧＣＴＣＣＡＡＣＴＣＴＧ

ＧＧＡＡＣＡＣＡＧＣＣＡＣＴＣＴＧＡＣＣＡＴＣＡＧＣＧＧＧＡＣＣＣＡＧＧＣＴＣＴ
ＧＧＡＴＧＡＧＧＣＴＧＡＣＴＡＴＴＡＣＴＧＴＣＡＧＧＣＧＴＧＧＧＡＣＡＡＣＡＧＴ
ＡＴＴＧＴＧＧＴＡＴＴＣＧＧＣＧＧＡＧＧＧＡＣＣＡＡＧＣＴＧＡＣＣＧＴＣＣＴＡ

【０５４４】

配列番号２４７　（ＫＬ２Ｂ４６７　ＶＬ　ｃＤＮＡ）

ＣＡＧＴＣＴＧＴＧＣＴＧＡＣＴＣＡＧＣＣＡＣＣＣＴＣＧＧＴＧＴＣＡＧＴＧＧＣＣ
ＣＣＣＧＧＧＣＡＧＡＣＧＧＣＣＡＧＴＡＴＴＡＣＣＴＧＴＧＧＧＧＧＡＧＡＣＡＡＣＡ
ＴＴＧＧＡＡＧＴＡＡＡＡＧＴＧＴＧＣＡＣＴＧＧＴＡＣＣＡＧＣＡＧＡＡＧＣＣＡＧＧ
ＣＣＡＧＧＣＣＣＣＴＧＴＧＣＴＧＧＴＣＧＴＣＴＡＴＧＡＴＡＡＴＡＧＣＧＡＣＣＧＧ
ＣＣＣＴＣＡＧＧＧＡＴＣＣＣＴＧＡＧＣＧＡＴＴＣＴＣＴＧＧＣＴＣＣＡＡＣＴＣＴＧ
ＧＧＡＣＣＡＣＧＧＣＣＡＣＣＣＴＧＡＣＣＡＴＣＡＧＣＡＧＧＧＴＣＧＡＡＧＣＣＧＧ
ＧＧＡＴＧＡＧＧＣＣＧＡＣＴＡＴＴＡＣＴＧＴＣＡＧＧＴＧＴＧＧＧＡＴＡＧＴＡＧＴ
ＡＧＴＧＡＴＣＡＴＣＣＴＧＴＧＧＴＡＴＴＣＧＧＣＧＧＡＧＧＧＡＣＣＡＡＧＧＴＣＡ
ＣＣＧＴＣＣＴＡ

【０５４５】

配列番号２７１（ＫＬＫ２Ｂ４９４＿ＶＬ　ＤＮＡ）

ＴＣＴＴＣＴＧＡＧＣＴＧＡＣＴＣＡＧＣＣＡＣＣＣＴＣＧＧＴＧＴＣＡＧＴＧＧＣＣ
ＣＣＡＧＧＡＣＡＧＡＣＧＧＣＣＡＧＧＡＴＴＡＣＣＴＧＴＧＧＧＧＧＡＡＡＣＡＡＣＡ
ＴＴＧＧＡＡＧＴＡＡＡＡＧＴＧＴＧＣＡＣＴＧＧＴＡＣＣＡＧＣＡＧＡＡＧＣＣＡＧＧ
ＣＣＡＧＧＣＣＣＣＴＧＴＧＣＴＧＧＴＣＧＴＣＴＡＴＧＡＴＧＡＴＡＧＣＧＡＣＣＧＧ
ＣＣＣＴＣＡＧＧＧＡＴＣＣＣＴＧＡＧＣＧＡＴＴＣＴＣＴＧＧＣＴＣＣＡＡＣＴＣＴＧ
ＧＧＡＡＣＡＣＧＧＣＣＡＣＣＣＴＧＡＣＣＡＴＣＡＧＣＡＧＧＧＴＣＧＡＡＧＣＣＧＧ
ＧＧＡＴＧＡＧＧＣＣＧＡＣＴＡＴＴＡＣＴＧＴＣＡＧＧＴＧＴＧＧＧＡＴＡＧＴＡＧＴ
ＡＧＴＧＡＴＣＡＴＧＴＧＧＴＡＴＴＣＧＧＣＧＧＡＧＧＧＡＣＣＡＡＧＣＴＧＡＣＣＧ
ＴＣＣＴＡ

【０５４６】

Ｆａｂ－Ｆｃ及びｓｃＦｖ

ｈＫ２特異的ＶＨ／ＶＬ領域を、ＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ　ＣＨ２－ＣＨ３及びＶＬ－ＣＬとして遺伝子操作し、ＩｇＧ２若しくはＩｇＧ４として発現させたか、又はＶＨ－リンカー－ＶＬ若しくはＶＬ－リンカー－ＶＨ配向のいずれかのｓｃＦｖとして遺伝子操作した。ｓｃＦｖに使用したリンカーは、上記の配列番号７のリンカーであった。ｓｃＦＶを使用して、実施例７に記載の通り二重特異性抗体を作製した、又は実施例１１に記載の通りＣＡＲを作製した。

【０５４７】

表１０は、ｍＡｂフォーマットの選択された抗ｈＫ２抗体のＨＣアミノ酸配列を示す。表１１は、ｍＡｂにおける選択された抗ｈＫ２抗体のＬＣのアミノ酸配列を示す。表１２に、ｍＡｂフォーマットの選択された抗ｈＫ２抗体のＨＣ及びＬＣのＤＮＡ配列番号を要約する。表１３は、ＶＨ－リンカー－ＶＬ又はＶＬ－リンカー－ＶＨ配向の選択されたｓｃＦｖのアミノ酸配列を示す。

【０５４８】

【表１１－１】

表１０．ｍＡｂフォーマットの選択された抗ｈＫ２抗体のＨＣ（ＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）のアミノ酸配列。

hK2 重鎖	HCタンパク 質配列番号	HCのアミノ酸配列
m11B6_HC	202	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWIRQFPG NRLEWMGYISYSGSTTYSPSLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVT PEDTATYFCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAP VCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAV LQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPR GPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCV VVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSA LPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNY KNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLH NHHTTKSFSRTPGK
h11B6_HC	203	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPG KGLEWIGYISYSGSTTYNPSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVT AVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
KL2B30_HC	210	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGK GLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAGTTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
K2B53_HC	211	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDIHWVRQAPG KGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMDSL RVEDSAVYSCARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

【０５４９】

【表１１－２】

（表１０の続き）

hK2 重鎖	HCタンパク質配列番号	HCのアミノ酸配列
KL2B242_HC	212	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWLRQPAGS GLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVT AADTAVYYCAGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLGK
KL2B467_HC	213	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPG KGLEWVAFISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
KI2B494_HC	219	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMSWVRQAPG KGLEWVSTIGGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０５５０】

【表１２】

表１１．ｍＡｂ（Ｆａｂ－Ｆｃ）フォーマットの選択された抗ｈＫ２抗体のＬＣ（ＶＬ－ＣＬ）のアミノ酸配列。

HK2 軽鎖	LCタンパク質 配列番号	LCのアミノ酸配列
m11B6_LC	214	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHWYR QKPGQPPKLLIYAASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLNIQPV EEDDFSMYFCQQTRKVPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPP SSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLN SWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTST SPIVKSFNRNEC
h11B6_LC	215	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQ QKPGQPPKLLIYAASNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
KL2B30_LC	221	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPG KAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDF ATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
KL2B53_LC	222	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPG KVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDV ATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
KL2B242_LC	223	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYACWYQQKPG QSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDE ADYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS
KL2B467_LC	224	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPG QAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGDE ADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS TVEKTVAPTECS
KL2b494_LC	220	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPG QAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGD EADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS TVEKTVAPTECS

【０５５１】

【表１３】

表１２．選択されたｈＫ２抗体のＨＣ及びＬＣのｃＤＮＡ配列の配列番号

抗体	HCタンパク質配列番号	LCタンパク質配列番号	HC cDNA 配列番号	LC cDNA 配列番号
m11B6	202	214	284	296
hu11B6	203	215	285	297
KL2B30	210	221	292	450
KL2B53	211	222	293	451
KL2B242	212	223	294	305
KL2B467	213	224	295	306
KL2B494	219	220	274	282

【０５５２】

【表１４－１】

表１３．ＶＨ－リンカー－ＶＬ（ＨＬ）又はＶＬ－リンカー－ＶＨ（ＬＨ）フォーマットにおける、選択された抗ｈＫ２　ｓｃＦｖ抗体の可変ドメインのアミノ酸配列。

scFv名称	頭字語	scFvのアミノ酸配列	配列番号
scFv1	HCG5_LDC6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCA TGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSG SESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCK ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAAS NRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVS VYYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	8
scFv2	HCG5_hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCA TGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSG SESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCK ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAAS NRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	9
scFv3	HCF3_hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCAT GYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGS ESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKA SESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASN RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAV YYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	10
scFv4	HCG5_LCB7_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYYCA TGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSG SESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCK ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAAS NRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA VYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	11
scFv5	LCD6_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYN PSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVY YCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	12
scFv6	hu11B6_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNP SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYY CATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	13
scFv7	hu11B6_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYN PSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVY YCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	14

【０５５３】

【表１４－２】

（表１３の続き）

scFv名称	頭字語	scFvのアミノ酸配列	配列番号
scFv8	LCB7_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNP SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYY CATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	15
scFv9	LCB7_HCG5_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTTYN PSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVY YCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	16
scFv10	LCD6_HCF3_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNP SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTPVDTAVYY CATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	17
scFv11	hu11B6_LCB7_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYC ATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINC KASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDV AVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	18
scFv12	hu11B6_LCD6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYC ATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINC KASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDV SVYFCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	19
scFv13	hu11B6_HL	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSD YAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYC ATGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGS GSESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINC KASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAA SNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQQTRKVPYTFGQGTKLEIK	20
scFv14	LCD6_hu11B6_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTIQSVQAEDVSVYFCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYN PSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAV YYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	21

【０５５４】

【表１４－３】

（表１３の続き）

scFv名称	頭字語	scFvのアミノ酸配列	配列番号
scFv15	hu11B6_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYN PSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAV YYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	22
scFv16	LCB7_hu11B6_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQTR KVPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSI TSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYN PSLKSRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAV YYCATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	23
scFv17	KL2B413_HL	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY WMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDS VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTVTVSSGG SEGKSSGSGSESKSTGGSEIVLTQSPSFLSAS VGDRVTITCRASQGISSYLSWYQQKPGKAPKL LIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ PEDFATYYCQQLNSYPRTFGQGTKVEIK	133
scFv18	KL2B413_LH	EIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYL SWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPRTF GQGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDQNYDILTGHYGMDVWGQGTTVTVSS	134
scFv19	KL2B359_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT GYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGS ESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASN VESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVY FCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	135
scFv20	KL2B359_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKV PYTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGG SQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITS DYAWNWIRQFPGKRLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA TGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	136
scFv21	KL2B357_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT GYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGS ESKSTGGSDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRA SESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASN VESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	318

【０５５５】

【表１４－４】

（表１３の続き）

scFv名称	頭字語	scFvのアミノ酸配列	配列番号
scFv22	KL2B357_LH	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQTR KVPYTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKST GGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSI TSDYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNP SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	319
scFv23	KL2B358_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSD YAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA TGYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSG SESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAAS NVESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAV YFCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	320
scFv24	KL2B358_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKV PYTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGG SQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITS DYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPS LKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ATGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	321
scFv25	KL2B360_HL	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITSD YAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSLK SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT GYYYGSGFWGQGTLVTVSSGGSEGKSSGSGS ESKSTGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASN VESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVY FCQQTRKVPYTFGGGTKVEIK	322
scFv26	KL2B360_LH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVEYFG TSLMHWYQQKPGQPPRLLIYAASNVESGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFCQQTRKV PYTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGG SQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGNSITS DYAWNWIRQFPGKGLEWIGYISYSGSTTYNPSL KSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA TGYYYGSGFWGQGTLVTVSS	323
scFv27	KL2B467_HL	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYY GMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSSGGSEG KSSGSGSESKSTGGSQSVLTQPPSVSVAPGQ TASITCGGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVY DNSDRPSGIPERFSGSNSGTTATLTISRVEAGD EADYYCQVWDSSSDHPVVFGGGTKVTV	324
scFv28	KL2B467_LH	QSVLTQPPSVSVAPGQTASITCGGDNIGSKSV HWYQQKPGQAPVLVVYDNSDRPSGIPERFSG SNSGTTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSD HPVVFGGGTKVTVGGSEGKSSGSGSESKSTG GSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SYYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAHLPYSGSYWAFDYWGQGTQVTVSS	325

【０５５６】

【表１４－５】

（表１３の続き）

scFv名称	頭字語	scFvのアミノ酸配列	配列番号
scFv39	KL2B494_HL	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHY AMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMVTVSS GGSEGKSSGSGSESKSTGGSSSELTQPPSVS VAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAP VLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTV L	308
scFv40	KL2B494_LH	SSELTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSV HWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSG SNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSD HVVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTG GSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SHYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIGGSGGSTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKPHIVMVTALLYDGMDVWGQGTMVTV SS	316
scFv41	KL2B30_HL	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSY YWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAG TTIFGVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSSGGSE GKSSGSGSESKSTGGSDIQMTQSPSFLSASV GDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKFLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPE DFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK	404
scFv42	KL2B30_LH	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYL AWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTF GGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQV QLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYW SWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRV TISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAGTTIF GVVTPNFYYGMDVWGQGTTVTVSS	405
scFv43	KL2B53_HL	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSY DIHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMDSLRVEDSAVYSC ARESGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVSSGGS EGKSSGSGSESKSTGGSDIVMTQSPSSLSAS VGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKF LIYAASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDVATYYCQKYNSAPYTFGQGTRLEIK	406
scFv44	KL2B53_LH	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYL AWYQQKPGKVPKFLIYAASTLHSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPYTF GQGTRLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSEV QLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYDI HWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSKKDYTDSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMDSLRVEDSAVYSCAR ESGWSHYYYYGMDVWGQGTMVTVSS	407

【０５５７】

【表１４－６】

（表１３の続き）

scFv名称	頭字語	scFvのアミノ酸配列	配列番号
scFv45	KL2B242_HL	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSY YWSWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSL KSRVTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYC AGDSGNYWGWFDPWGQGTLVTVSSGGSEGK SSGSGSESKSTGGSSYELTQPPSVSVSPGETA SITCSGDQLGENYACWYQQKPGQSPVLVIYQD SKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEA DYYCQAWDNSIVVFGGGTKLTVL	408
scFv46	KL2B242_LH	SYELTQPPSVSVSPGETASITCSGDQLGENYA CWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQALDEADYYCQAWDNSIVVF GGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGGSQV QLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYW SWLRQPAGSGLEWIGRLYVSGFTNYNPSLKSR VTLSLDPSRNQLSLKLSSVTAADTAVYYCAGD SGNYWGWFDPWGQGTLVTVSS	409

【０５５８】

実施例２４．抗ｈＫ２抗体の生物物理学的特性評価

抗ｈＫ２抗体の親和性及び熱安定性。

可溶性ｈＫ２に対する選択されたｈＫ２抗体の親和性を、表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance、ＳＰＲ）によって測定した。ＳＰＲは、複合体の形成及び解離時の質量の変化を測定することによって、２つの結合パートナー間の相互作用の強度を試験するための無標識技術である。抗体を、抗Ｆｃ抗体でコーティングされたセンサチップ上に捕捉し、続いて、様々な濃度並びに指定の会合及び解離時間で可溶性ｈＫ２を注入した。解離後、表面を適切な溶液で再生して、次の相互作用の準備を行った。センサグラムを１：１ラングミュアモデルに適合させることによって、速度情報（オンレート及びオフレート定数）を抽出した。結合親和性（K_D）は、速度定数の比（k_{off}／k_{on}）として報告される。選択されたｈＫ２抗体のK_D値を表１４に列挙する。

【０５５９】

熱安定性は、自動化されたＰｒｏｍｅｔｈｅｕｓの機器を用いて、示差走査蛍光測定（ＮａｎｏＤＳＦ）で決定した。ＮａｎｏＤＳＦを使用して、リン酸緩衝生理食塩水、ｐＨ７．４中０．５ｍｇ／ｍＬの濃度の分子のＴｍを測定した。サンプルを３８４ウェルサンプルプレートから２４ウェルキャピラリーにロードすることによって、測定を行った。各サンプルについて、２回測定を行った。熱走査は、１．０°Ｃ／分の速度で２０°Ｃ～９５°Ｃに及んだ。固有のトリプトファン及びチロシンの蛍光を３３０ｎｍ及び３５０ｎｍの発光波長でモニタリングし、Ｆ３５０／Ｆ３３０ｎｍ比を温度に対してプロットして、アンフォールディング曲線を作成した。測定されたＴｍ値を表１４に列挙する。

【０５６０】

【表１５】

表１４．選択された分子のK_D及びＴｍ

分子	K_D（nM）	Tm（℃）
KL2B413（scFv－LH－Fc）	34.3	67
KL2B359（scFv－LH－Fc）	0.7～1	67
KL2B30（Fab）	0.460	70超
KL2B242（Fab）	0.040	70超
KL2B53（Fab）	0.080	70超
KL2B467（Fab）	0.078	70超
KL2B494（Fab）	0.053	70超

【０５６１】
Ａｂｌｅｘｉｓ免疫キャンペーンから生成されたＫＬ２Ｂ４１３　ｓｃＦｖは、Ｎａｎｏ　ＤＳＦによって測定したとき６７°Ｃの熱安定性（Ｔｍ）、及び約３４ｎＭのヒトｈＫ２に対する結合親和性（K_D）を有した。再ヒト化キャンペーンについて得られ、そして、マウス１１Ｂ６と同様の結合親和性を維持していたクローンＫＬ２Ｂ３５９を、追加のプロファイリングのためにｓｃＦｖ－Ｆｃ及びＣＡＲ－Ｔに変換した。ＫＬ２Ｂ３５９ｓｃＦｖは、６７°ＣのＴｍ及び約０．７～１ｎＭのｈＫ２に対する結合親和性（K_D）を示す。ＫＬ２Ｂ３０、ＫＬ２Ｂ２４２、ＫＬ２Ｂ５３、ＫＬ２Ｂ４６７、及びＫＬ２Ｂ４９４　Ｆａｂは、０．５ｎＭ未満の結合親和性、及び７０°Ｃを超えるＴｍ値を示した。

【０５６２】
エピトープのマッピング
水素－重水素交換質量分析（ＨＤＸ－ＭＳ）によって、選択された抗ｈＫ２抗体及び抗ｈＫ２／ＣＤ３二重特異性抗体のエピトープ及びパラトープを求めた。ヒトＫＬＫ２抗原を、エピトープ及びパラトープマッピング実験に使用した。

【０５６３】
簡潔に述べると、精製されたＫＬＫ２抗原を、重水標識バッファ中において抗ｈＫ２抗体又は抗ｈＫ２／ＣＤ３二重特異性抗体の有り及び無しでインキュベートした。水素－重水素交換（hydrogen-deuterium exchange、ＨＤＸ）混合物を、８Ｍ尿素、１ＭＴＣＥＰ、ｐＨ３．０の添加によって異なる時点でクエンチした。クエンチしたサンプルを、室温でバッファＡ（Ｈ２Ｏ中１％アセトニトリル、０．１％ＦＡ）で平衡化した固定化ペプシン／ＦＰＸＩＩＩカラムに６００μＬ／分で通した。消化性断片を、バッファＡを用いて６００μＬ／分で逆相トラップカラムにロードし、１分間脱塩した（６００μＬのバッファＡ）。脱塩された断片を、２０分かけて１００μＬ／分で８％→３５％バッファＢ（９５％アセトニトリル、５％Ｈ２Ｏ、０．００２５％ＴＦＡ）の線形勾配を有するＣ１８カラムによって分離し、質量分析によって分析した。２７５℃のキャピラリー温度、分解能１５０，０００、及び質量範囲（ｍ／ｚ）３００～１，８００で、ＬＴＱ（商標）Ｏｒｂｉｔｒａｐ　Ｆｕｓｉｏｎ　Ｌｕｍｏｓ質量分析計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して質量分析を実行した。ＢｉｏＰｈａｒｍａ　Ｆｉｎｄｅｒ３．０（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、ＨＤＸ実験の前に非重水素化サンプルのペプチド同定に使用した。ＨＤＥｘａｍｉｎｅｒ　ｖｅｒｓｉｏｎ　２．５（Ｓｉｅｒｒａ　Ａｎａｌｙｔｉｃｓ，Ｍｏｄｅｓｔｏ，ＣＡ）を使用して、ＨＤＸ実験についてのＭＳ生データファイルから質量中心値を抽出した。

【０５６４】
ｈＫ２抗体、ｈｕ１１Ｂ６、ＫＬ２Ｂ４９４、ＫＬ２Ｂ４６７、ＫＬ２Ｂ３０、ＫＬ２Ｂ４１３、及びＫＬ２Ｂ５３を溶解性ｈＫ２タンパク質と共にインキュベートした結果、異なるパターンの水素交換及び全体的な保護が得られた。保護されたセグメントをｈＫ２抗原の配列にマッピングして、結合エピトープを可視化した。ＫＬ２Ｂ４９４、ＫＬ２Ｂ４６７及びＫＬ２Ｂ３０は、（ｉ）残基１７４～１７８（配列番号１１１、ＫＶＴＥＦ）の共通配列に結合し（例えば、ＫＬ２Ｂ４９４、ＫＬ２Ｂ４６７及びＫＬ２Ｂ３０は、配列番号１１１の残基の少なくとも３つ、すなわち１７４～１７６のＫＶＴ残基に結合し）、及び（ｉｉ）残基２３０～２３４（配列番号１１２、ＨＹＲＫＷ）の共通配列に結合した（例えば、ＫＬ２Ｂ４９４、ＫＬ２Ｂ４６７及びＫＬ２Ｂ３０は、配列番号１１２の残基の少なくとも３つ、すなわち２３０～２３２のＨＹＲ残基に結合した）。ＫＬ２Ｂ４１３はまた、配列番号１１１の全ての残基及び配列番号１１２のＫＷ残基に結合した。本発明の実施形態は、ｈＫ２に結合する抗原結合ドメインを含む単離されたタンパク質であって、当該抗原結合ドメインが、配列番号１１１及び配列番号１１２の配列を有するエピトープ内のｈＫ２に結合する、単離されたタンパク質であり；例えば、当該抗原結合ドメインが、配列番号１１１の全ての残基、又は少なくとも４つの残基、又は少なくとも３つの残基に結合し、配列番号１１２の全ての残基、又は少なくとも４つの残基、又は少なくとも３つの残基に結合する、単離タンパク質を提供する。

【０５６５】
ＫＬ２Ｂ５３は、異なるパターンの保護を示し、残基２７～３２（配列番号１１３、ＳＨＧＷＡＨ）、６０～７５（配列番号１１４、ＲＨＮＬＦＥＰＥＤＴＧＱＲＶＰ）、及び１３８～１４７（配列番号１１５、ＧＷＧＳＩＥＰＥＥ）からなる配列に結合した。
【０５６６】
実施形態によれば、単離抗ｈＫ２／抗ＣＤ３タンパク質（例えば、ｈｕ１１Ｂ６、ＫＬ２Ｂ４９４、ＫＬ２Ｂ４６７、ＫＬ２Ｂ３０、ＫＬ２Ｂ４１３、又はＫＬ２Ｂ５３）は、配列番号１１１、１１２、１１３、１１４、及び１１５からなる群から選択される１つ又は２つ以上のアミノ酸配列を含むｈＫ２の不連続エピトープ（すなわち、残基が配列中に離れて配置されているエピトープ）に特異的に結合するｈｋ２特異性抗原結合ドメインを含む。
【０５６７】
抗ｈＫ２抗体ｈｕ１１Ｂ６、ＫＬ２Ｂ４９４、ＫＬ２Ｂ４６７、ＫＬ２Ｂ４１３、並びに抗ｈＫ２／ＣＤ３二重特異性抗体ＫＬＣＢ１１３及びＫＬＣＢ８０のパラトープを、ＨＤＥｘａｍｉｎｅｒ残基プロットからの重水素取り込みにおける有意差に基づいて同定した。ＫＬ２ＢＢ４９４は、３つのパラトープ領域を含み、そのうちの２つが、ＫＬ２Ｂ４９４重鎖可変ドメイン（ＧＦＴＦＳＨ（配列番号）４５５）及びＴＡＶＹＹＣＡＫＰＨＩＶＭＶＴＡＬ（配列番号４５６））に位置し、１つのパラトープ領域が、軽鎖可変ドメイン内（ＹＤＤＳＤＲＰＳＧＩＰＥＲ（配列番号４５７））に位置する。ＫＬ２Ｂ４６７は、３つのパラトープ領域を含み、そのうちの２つが、ＫＬ２Ｂ４６７重鎖可変ドメイン（ＦＴＦＳＹ（配列番号）４５８）及びＧＳＹＷＡＦＤＹ（配列番号４５９））に位置し、１つのパラトープ領域が、軽鎖可変ドメイン（ＤＮＳＤ（配列番号４６０））内に位置する。Ｈｕ１１Ｂ６は、重鎖（ＧＮＳＩＴＳＤＹＡ（配列番号４６１））に位置する１つのエピトープ領域を含む。ＫＬ２Ｂ４１３は、重鎖可変ドメイン（ＧＦＴＦ（配列番号４６２）及びＡＲＤＱＮＹＤＩＬ（配列番号４６３））に位置する２つのパラトープ領域を含む。二重特異性ＫＬＣＢ８０のＫＬ２Ｂ３０は、重鎖（アミノ酸残基ＴＩＦ及びＶＴＰＮＦ（配列番号４６４）を含む）に位置するパラトープ領域及び軽鎖（ＹＡＡＳＴＬＱＳＧ（配列番号４６５））に位置するパラトープ領域を含む。二重特異性ＫＬＣＢ１１３のＫＬ２Ｂ５３は、重鎖（アミノ酸残基ＥＳＧＷＳＨＹを含む（配列番号４６６））に位置する１つのパラトープ領域を含む。
【０５６８】
実施例２５－ＫＬ２Ｂ３０　ＦａｂへのＭＭＡＦコンジュゲーション
本発明の免疫コンジュゲートを、ＫＬ２Ｂ３０　Ｆａｂ（ＫＬ２Ｂ９９７として同定される）をＭＭＡＦにコンジュゲートすることによって作製した。コンジュゲーションは、ランダムコンジュゲーション及び部位特異的コンジュゲーションを介して行った。このような方法は、例えば、国際公開第２０２０／２２９９７４号に記載されている。本明細書に記載の場合、ＫＬ２Ｂ９９７（ＫＬ２Ｂ３０のＦａｂ）は、それぞれ配列番号１７０、１７１、１７２、１７３、１７４及び１７５のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含み、ＫＬ２Ｂ９９７は、配列番号１６２のＶＨ及び配列番号１６３のＶＬを含む。
【０５６９】
図１では、「ＤＡＲ」という用語は「薬物対抗体比」であり、抗体部分、すなわちＫＬ２Ｂ９９７に結合した薬物分子、すなわちＭＭＡＦの数を指す。抗体部分当たりの結合した薬物分子の数又は標識度は、当該技術分野で一般的に使用されるパラメータであり、「薬物－抗体比」の略である「ＤＡＲ」と呼ばれる。
【０５７０】
種々のコンジュゲーション変異体とのＫＬ２Ｂ３０　Ｆａｂの標的細胞結合を評価するために、ＶＣａＰ細胞をｈＫ２陽性標的細胞として使用し、ＤＵ１４５細胞をｈＫ２陰性細胞として使用した。ＫＬ２Ｂ３０親抗体（それぞれ配列番号２１０の重鎖及び配列番号２２１の軽鎖を含む）及びｈｕ１１Ｂ６（それぞれ配列番号２０３の重鎖及び配列番号２

１５の軽鎖を含み、本明細書でｈ１１Ｂ６とも呼ばれる抗ｈＫ２抗体）を陽性対照として含めた。ｈ１１Ｂ６抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第１０，１００，１２５号に記載されている。Ｆａｂベースの結合を検出するために、抗ヒトＦ（ａｂ’）２断片特異的二次検出抗体を使用した。試験抗体を標的細胞と共に４℃で６０分間インキュベートし、二次染色によって検出した。細胞結合を、二次抗体結合シグナルに基づくフローサイトメトリーによって定量化し、生細胞からゲーティングした。結果は、非コンジュゲートのＫＬ２Ｂ９９７、ＫＬ２Ｂ９９７のランダムなコンジュゲーション、及びＫＬ２Ｂ９９７の部位特異的なコンジュゲーション（図１にＫＬ２Ｂ９９７＊、ＫＬ２Ｂ９９７ＮＨＳ及びＫＬ２Ｂ９９７ＳＯＲＴとして示す）を含む３つの試験方法全てを使用して、陽性かつ用量依存的な細胞結合を示した。ＫＬ２Ｂ３０　Ｆａｂは、ｈＫ２陽性ＶＣａＰ細胞に特異的に結合し、ｈＫ２陰性ＤＵ１４５細胞には結合しないことが示された。図１に示すように、結果は、ＫＬ２Ｂ３０　ＦａｂがｈＫ２発現ＶＣａＰ細胞に結合し、ＭＭＡＦとコンジュゲートした場合に内在化し、内在化に基づく細胞死滅を引き起こすことができることを示した。

【０５７１】

上記の免疫コンジュゲートを、ランダムコンジュゲーション及び部位特異的コンジュゲーションを介して作製した。部位特異的コンジュゲーションのために、１×ｄＰＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　１４１９０１４４）中、２ｍｇ／ｍＬの２．１ｍｇのｈ１１Ｂ６を、５　ｕｌのＲａｐｉｄ　ＰＮＧａｓｅＦ（ＮＥＢ＃Ｐ　０７１１　Ｓ）を用いて３７℃で一晩脱グリコシル化した。細菌トランスグルタミナーゼ（ｂＴＧ；　ＡｊｉｎｏｍｏｔｏからのＡｃｔｉｖａ　ＴＩ）を、１０００倍モル過剰のアミノ－ＰＥＧ　４－（ＰＥＧ　３－アジド）２分岐基質（ＣＰ－２０５１　Ｃｏｎｊｕ－Ｐｒｏｂｅ　ＬＬＣ）と共に３０％　ｗ／ｖになるように添加し、室温で一晩インキュベートした。アジド修飾ｍＡｂを、１ｍＬのＭａｂｓｅｌｅｃｔカラム（ＧＥ１１００３４９３）を備えたＡＫＴＡＡｖａｎｔ装置で精製し、１０ｍＬのＺｅｂａ脱塩カラム（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて１×ｄＰＢＳに交換した。ＤＢＣＯ－ＰＥＧ　４－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦ（Ｌｅｖｅｎａ　Ｂｉｏｐｈａｒｍａ）を１０倍モル過剰で添加し、薬物：抗体比が４になるまでＬＣ－ＭＳで反応をモニターした。最終的なｈ１１Ｂ６－ｖｃＭＭＡＦＡＤＣをＺｅｂａ脱塩カラムで精製し、続いて濃縮し、Ａｍｉｃｏｎ濃縮器でダイアフィルトレーションした。

【０５７２】

ランダムなコンジュゲーションのために、ＫＬ２Ｂ３０を最初にＮＨＳ－ＰＥＧ４－アジド（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒカタログ番号２６１３０）と反応させた。１×ｄＰＢＳ中１ｍｇ／ｍｌの１．５ｍｇのＫＬ２Ｂ３０に、３０ｕｌの１Ｍ　ｐＨ９重炭酸ナトリウム（ＢＤＨ＃１４４－５５－８）を添加し、直後に７×モル比のＮＨＳ－ＰＥＧ４－アジドを添加した。標識化の程度が２～２．５に達するまで質量分析によって反応をモニターし、次いで、Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．５（ＴｅｋｎｏｖａＴ１０８５）を１００ｍＭの最終濃度まで添加することによってクエンチした。未反応のＮＨＳ－ＰＥＧ　４－アジドを除去した後、１０倍モル過剰のＤＢＣＯ－ＰＥＧ　４－ｖｃ－ＰＡＢ－ＭＭＡＦを添加し、３７℃で１時間インキュベートした。最終ＡＤＣ（ＤＡＲ＝２．７）を１０ｍｌのＺｅｂａ脱塩カラムによって精製した後、濃縮し、Ａｍｉｃｏｎ濃縮器を用いてダイアフィルトレーションした。

【０５７３】

ＫＬ２Ｂ９９７部位特異的ＡＤＣ（抗体－薬物コンジュゲート）を、ソルターゼタグを介したコンジュゲーションによって調製した。１ｍｇ／ｍｌのＫＬ２Ｂ９９７　１ｍｇを、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　ＣａＣｌ２緩衝液中、化膿レンサ球菌ソルターゼＡ酵素（２ｕＭ）［Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２０１１：１１３９９の参考文献］及び過剰のＧｌｙ３－ｖｃＭＭＡＦ（Ｌｅｖｅｎａ　Ｂｉｏｐｈａｒｍａ）と共にインキュベートした。反応物を３７°Ｃで１時間インキュベートした。コンジュゲートを、ＡＫＴＡ　Ａｖａｎｔ装置で１ｍＬのＨｉｓＴｒａｐカラ

ム（Ｃｙｔｉｖａ　１７５２４７０１）で精製した。ＡＤＣを１×ｄＰＢＳ中２４ｍｌのＳｕｐｅｒｄｅｘ７５　１０／３００（Ｃｙｔｉｖａ　２９１４８７２１）で更に精製して、凝集物又は残留基質を除去した。

【０５７４】

上記のように、ＮＨＳ－ＰＥＧ４－アジドを添加し、続いてＤＢＣＯ－ｖｃＭＭＡＦと反応させることによって、ＫＬ２Ｂ９９７ランダム結合ＡＤＣを調製した。

【０５７５】

実施例２６：ＴＯＰＡ－ＫＬ２Ｂ１２５１　Ｆａｂ

ＫＬ２Ｂ３０　Ｆａｂ（ＫＬ２Ｂ１２５１として同定される）をＴＯＰＡにコンジュゲートする方法を以下に提供する。

【０５７６】

ＴＯＰＡ－ＫＬ２Ｂ１２５１の調製。

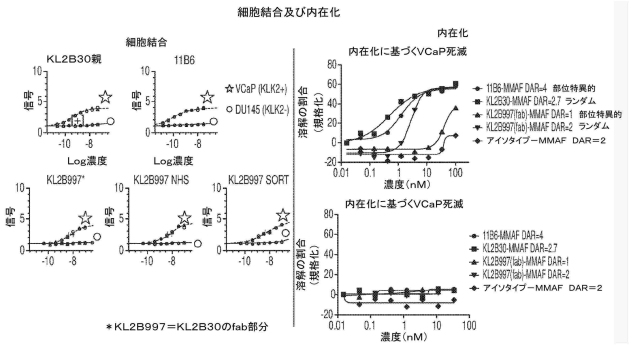
ＦａｂのランダムＴＯＰＡ修飾：ＫＬ２Ｂ１２５１Ｆａｂを滅菌１　ｘｄＰＢＳ中で１ｍｇ／ｍｌに希釈した。重炭酸ナトリウム緩衝液ｐＨ　９（ＶＷＲ　１４４－５５－８）でｍＡｂのｐＨを９．０に調整した。次に、８倍モル過剰のＴＯＰＡ（ＴＯＰＡ－フェニル－ＮＣＳ（中間体）；ＤＭＳＯに溶解した５０ｍＭストック）を添加し、プールを振盪せずに室温で約１時間インキュベートした。ＴＯＰＡの添加を、ＣＡＲ値が１．５～２．０の間になるまで、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｇ２２４装置を用いたインタクト質量ＥＳＩ－ＴＯＦ　ＬＣ－ＭＳによってモニターした。プールを、１Ｍ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．５（Ｔｅｋｎｏｖａ　Ｔ１０８５）を１００ｍＭの最終濃度まで添加することによってクエンチした。過剰な遊離キレート剤を、５５ｍｌのＨｉＰｒｅｐ　２６／１０脱塩カラム（１７５０８７０１－Ｃｙｔｉｖａ）で一度に１５ｍｌのコンジュゲートプールを溶出し、脱塩を連続して行うことによって除去した。平衡化及び溶出は全て１　ｘｄＰＢＳ中で行った。次いで、サンプルを２ｍｌに濃縮した。過剰なキレート剤が存在しないことを確認するために、１５ｍＬへの３回の試料希釈、続いて５０，０００　ＭＷＣＯ　Ａｍｉｃｏｎ濃縮装置を使用した１ｍＬへの濃縮を行った。Ｔｏｓｏｈ　ＴＳＫｇｅｌ　Ｇ３０００ＳＷｘｌ　７．８ｍｍ×３０ｃｍ、５ｕカラム、カラム温度：室温で、カラムを０．２Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ　６．８）、流量：０．８ｍＬ／分、１８分の運転、注入量：１８μＬで溶出する分析サイズ排除クロマトグラフィーにより、最終コンジュゲートがモノマーであることが確認された。

【０５７７】

本明細書に記載された実施例及び実施形態は、例示のみを目的としたものであり、上述の実施形態に対する変更は、その広範な発明概念から逸脱することなくなされ得ることが理解される。したがって、本発明は、開示された特定の実施形態に制限されず、添付の特許請求の範囲によって定義されるような本発明の趣旨及び範囲内の修正をも包含することを意図するものと理解される。

【図面】

【図１】



【図２】

KL2B997及びKL2B1251の重鎖（HC）及び軽鎖（LC）配列

KL2B997

HC（配列番号：472）

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCAGTTI FGVVTPNFYY GMDVWGQGTT VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK THTGSGSGSH HHHHHGSGLP ETGG

LC（配列番号：473）

DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASQGIS SYLAWYQQKP GKAPKFLIYA ASTLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCQQ LNSYPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

KL2B1251

HC（配列番号：474）

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYYWSWIRQP PGKGLEWIGY IYYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCAGTTI FGVVTPNFYY GMDVWGQGTT VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSC

LC（配列番号：475）

DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCRASQGIS SYLAWYQQKP GKAPKFLIYA ASTLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCQQ LNSYPLTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

【配列表】
20245039240000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/050673

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K51/10 A61K47/68 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/229974 A1 (JANSSEN BIOTECH INC [US]) 19 November 2020 (2020-11-19) cited in the application examples claims -----	1,2,4-6, 8-13, 17-28, 30-41
X	US 2019/169312 A1 (TIMMERMAND PAR OSKAR VILHELMSSON [SE] ET AL) 6 June 2019 (2019-06-06) examples claims ----- -/--	1,2,4-6, 8-13, 17-28, 30-41

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 June 2022	10/08/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Dullaart, Anwyn

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

International application No.
PCT/IB2022/050673

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2022/050673

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
6, 12, 13, 31-41(completely); 1, 2, 4, 5, 8-11, 17-28, 30(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/050673

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCDEVITT MICHAEL R. ET AL: "Feed-forward alpha particle radiotherapy ablates androgen receptor-addicted prostate cancer", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 9, no. 1, December 2018 (2018-12), XP055926958, DOI: 10.1038/s41467-018-04107-w Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41467-018-04107-w.pdf> abstract figures page 6, right-hand column, paragraph Discussion - page 8, right-hand column	1,2,4-6, 8-13, 17-28, 30-41
X	MORRIS MICHAEL J. ET AL: "Phase 0 study to assess [111In]-DOTA-h11B6 to target human kallikrein-2 (hk2) in men with metastatic castration-resistant prostate cancer.", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 38, no. 6_suppl, 19 February 2020 (2020-02-19), pages TPS249-TPS249, XP055926707, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2020.38.6_suppl.TPS249 the whole document	1,2,4-6, 8-13, 17-28, 30-41
X	TIMMERMAND OSKAR VILHELMSSON ET AL: "Preclinical efficacy of hK2 targeted [177 Lu]hu11B6 for prostate cancer theranostics", THERANOSTICS, vol. 9, no. 8, 2019, pages 2129-2142, XP055926956, ISSN: 1838-7640, DOI: 10.7150/thno.31179 abstract figures; tables page 2135	1,2,4-6, 8-13, 17-28, 30-41
X,P	WO 2021/019389 A1 (JANSSEN BIOTECH INC [US]) 4 February 2021 (2021-02-04) examples claims	1,2,4-6, 8-13, 17-28, 30-41

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

International Application No. PCT/IB2022/050673

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 6, 12, 13, 31-41(completely); 1, 2, 4, 5, 8-11, 17-28, 30(partially)

An immunoconjugate comprising a therapeutic moiety conjugated to an antigen binding domain with binding specificity for kallikrein related peptidase 2 (hK2), wherein the therapeutic moiety is a cytotoxic radiometal

---

2. claims: 14-16(completely); 1, 2, 4, 5, 8-11, 17-28, 30(partially)

An immunoconjugate comprising a therapeutic moiety conjugated to an antigen binding domain with binding specificity for kallikrein related peptidase 2 (hK2), wherein the therapeutic moiety is a cytotoxic moiety, not being a radiometal, more specifically an auristatin

---

3. claims: 3, 7, 29(completely); 1, 4, 5, 8-11, 17-23(partially)

An immunoconjugate comprising a therapeutic moiety conjugated to an antigen binding domain with binding specificity for kallikrein related peptidase 2 (hK2), wherein the therapeutic moiety is a diagnostic imaging moiety.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2022/050673

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020229974 A1	19-11-2020	AU 2020273654 A1	25-11-2021
		BR 112021022237 A2	29-03-2022
		CA 3139806 A1	19-11-2020
		CL 2021002960 A1	24-06-2022
		CN 114127059 A	01-03-2022
		CO 2021015713 A2	30-11-2021
		CR 20210556 A	17-12-2021
		EA 202193076 A1	16-02-2022
		EC SP21089217 A	31-01-2022
		EP 3966211 A1	16-03-2022
		IL 287909 A	01-01-2022
		JP 2022532157 A	13-07-2022
		KR 20220006613 A	17-01-2022
		MA 55885 A	16-03-2022
		PE 20220935 A1	31-05-2022
		SG 11202112100P A	29-11-2021
		US 2020353105 A1	12-11-2020
		WO 2020229974 A1	19-11-2020
US 2019169312 A1	06-06-2019	AU 2014351611 A1	30-06-2016
		AU 2020207775 A1	06-08-2020
		BR 112016011025 A2	05-12-2017
		CA 2930493 A1	28-05-2015
		CN 105980404 A	28-09-2016
		CN 112898431 A	04-06-2021
		DK 3071595 T3	01-07-2019
		EP 3071595 A1	28-09-2016
		EP 3553088 A1	16-10-2019
		ES 2728515 T3	25-10-2019
		HR P20191095 T1	20-09-2019
		HU E043875 T2	30-09-2019
		JP 6599859 B2	30-10-2019
		JP 7051777 B2	11-04-2022
		JP 2016540503 A	28-12-2016
		JP 2020022470 A	13-02-2020
		JP 2022062048 A	19-04-2022
		KR 20160096621 A	16-08-2016
		KR 20220020406 A	18-02-2022
		LT 3071595 T	10-05-2019
		PL 3071595 T3	30-09-2019
		PT 3071595 T	11-06-2019
		RU 2016124229 A	25-12-2017
		SI 3071595 T1	30-08-2019
		US 2016369009 A1	22-12-2016
		US 2019169312 A1	06-06-2019
		US 2022064333 A1	03-03-2022
		WO 2015075445 A1	28-05-2015
WO 2021019389 A1	04-02-2021	AU 2020322222 A1	24-03-2022
		BR 112022001368 A2	24-05-2022
		CA 3147735 A1	04-02-2021
		CN 114375302 A	19-04-2022
		CO 2022001891 A2	08-04-2022
		CR 20220025 A	04-05-2022
		EC SP22015276 A	31-03-2022
		EP 4004057 A1	01-06-2022
		IL 289897 A	01-03-2022
		KR 20220040483 A	30-03-2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2022/050673

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		PE 20220649 A1	28-04-2022
		TW 202118788 A	16-05-2021
		US 2021040210 A1	11-02-2021
		UY 38803 A	29-01-2021
		WO 2021019389 A1	04-02-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 103/40	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	51/10	１００	
Ａ６１Ｋ 103/20	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	51/10	２００	
Ａ６１Ｋ 103/10	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	Ｚ	
Ａ６１Ｋ 103/32	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	103:40		
Ａ６１Ｋ 103/34	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	103:20		
Ａ６１Ｋ 101/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	103:10		
Ａ６１Ｋ 103/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	103:32		
		Ａ６１Ｋ	103:34		
		Ａ６１Ｋ	101:02		
		Ａ６１Ｋ	103:00		

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

弁理士　岩田 耕一

(72)発明者　シェン，フェイ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，ウェルシュ アンド マッキーン ローズ

(72)発明者　マクデヴィット，テレサ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，ウェルシュ アンド マッキーン ローズ

(72)発明者　ゴールドバーグ，シャロム
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００

(72)発明者　ウィリー，クリステン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，ウェルシュ アンド マッキーン ローズ

(72)発明者　スミス，リャン エム．
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，ウェルシュ アンド マッキーン ローズ

(72)発明者　ヴェンカタラマニ，サチャデヴィ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，ウェルシュ アンド マッキーン ローズ

Ｆターム（参考）　4C084　AA12 NA05 ZB26
4C085　AA25 AA27 BB22 BB41 BB43 CC23 HH03 KA04 KB07 LL18
4H045　AA11 AA20 AA30 BA09 BA10 BA50 BA71 BA72 DA76 DA83
DA86 EA20 FA50 FA74 GA21