

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7222347号
(P7222347)

(45)発行日 令和5年2月15日(2023.2.15)

(24)登録日 令和5年2月7日(2023.2.7)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

C 0 7 K 16/00

Z N A

C 0 7 K 1/107(2006.01)

C 0 7 K 1/107

A 6 1 K 39/395(2006.01)

A 6 1 K 39/395

L

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

請求項の数 15 (全259頁)

(21)出願番号 特願2019-514691(P2019-514691)

(86)(22)出願日 平成30年4月27日(2018.4.27)

(86)国際出願番号 PCT/JP2018/017345

(87)国際公開番号 WO2018/199337

(87)国際公開日 平成30年11月1日(2018.11.1)

審査請求日 令和3年4月16日(2021.4.16)

(31)優先権主張番号 特願2017-90679(P2017-90679)

(32)優先日 平成29年4月28日(2017.4.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(74)代理人 110002147

弁理士法人酒井国際特許事務所

(72)発明者 山田 慧

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

(72)発明者 松田 豊

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

(72)発明者 藤井 友博

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

(72)発明者 敷田 奈都紀

味の素株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

機能性物質を位置選択的に有する抗体またはその塩であって、

抗体が、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中においてリジン残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記リジン残基を5個以上含み、かつ

機能性物質が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、前記標的領域中に含まれる1個以上のリジン残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する抗体またはその塩。

【請求項2】

生体直交性官能基を位置選択的に有する抗体またはその塩であって、

抗体が、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中においてリジン残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記リジン残基を5個以上含み、かつ

生体直交性官能基が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、前記標的領域中に含まれる1個以上のリジン残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、生体直交性官能基を位置選択的に有する抗体またはその塩。

【請求項3】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項1または2記載の抗体またはその塩。

【請求項4】

抗体が I g G 抗体である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項記載の抗体またはその塩。

【請求項 5】

抗体がヒト由来である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項記載の抗体またはその塩。

【請求項 6】

抗体が、下記 (A) ～ (C) からなる群より選ばれるいずれか一つの F c 領域タンパク質を含み、かつ抗原結合能を有する抗体である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項記載の抗体またはその塩：

(A) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質；

(B) 配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質；または

(C) 配列番号 1 のアミノ酸配列と 90 % 以上の同一性を示すアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質。

【請求項 7】

前記標的領域が、連続する 1 ～ 3 個のアミノ酸残基からなる領域である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項記載の抗体またはその塩。

【請求項 8】

前記標的領域が、(a) ヒト I g G F c 領域における 246 ～ 248 位のアミノ酸残基からなる領域、(b) ヒト I g G F c 領域における 288 ～ 290 位のアミノ酸残基からなる領域、または (c) ヒト I g G F c 領域における 317 位のアミノ酸残基からなる領域である、請求項 7 記載の抗体またはその塩。

【請求項 9】

前記位置選択性が 90 % 以上である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項記載の抗体またはその塩。

【請求項 10】

前記抗体が、複数の重鎖を含む抗体であり、

抗体が、複数の重鎖における前記標的領域中の前記 1 個以上のリジン残基の位置において機能性物質を有する結果、複数の機能性物質を有する、請求項 1、3 ～ 9 のいずれか一項記載の抗体またはその塩。

【請求項 11】

機能性物質が、薬物、標識物質、または安定化剤である、請求項 1、3 ～ 9 のいずれか一項記載の抗体またはその塩。

【請求項 12】

機能性物質を位置選択的に有する抗体またはその塩であって、

抗体が、連続する 1 ～ 50 個のアミノ酸残基からなる標的領域中においてリジン残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記リジン残基を 5 個以上含み、

機能性物質が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、前記標的領域中の前記 1 個以上のリジン残基に対して 30 % 以上の位置選択性で結合しており、

機能性物質が、前記 1 個以上のリジン残基の側鎖を介して抗体に結合しており、

抗体が、2 個の重鎖を含み、

抗体が、2 個の重鎖における前記標的領域中の前記 1 個以上のリジン残基の位置において機能性物質を有する結果、2 個の機能性物質を有する、機能性物質を位置選択的に有する抗体またはその塩。

【請求項 13】

前記抗体が、複数の重鎖を含む抗体であり、

抗体が、複数の重鎖における前記標的領域中の前記 1 個以上のリジン残基の位置において生体直交性官能基を有する結果、複数の生体直交性官能基を有する、請求項 2 ～ 9 のいずれか一項記載の抗体またはその塩。

【請求項 14】

生体直交性官能基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルケン残基、ア

10

20

30

40

50

ルキン残基、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロ残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル基、 α -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、およびセレン残基からなる群より選ばれる1種以上の残基である、請求項2～9、13のいずれか一項記載の抗体またはその塩。

【請求項15】

生体直交性官能基を位置選択的に有する抗体またはその塩であって、

抗体が、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において1個以上のリジン残基を含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において5個以上のリジン残基を含み、

生体直交性官能基が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、前記標的領域中の前記1個以上のリジン残基に対して30%以上の位置選択性で結合しており、

生体直交性官能基が、前記1個以上のリジン残基の側鎖を介して抗体に結合しており、抗体が、2個の重鎖を含み、

抗体が、2個の重鎖における前記標的領域中の前記1個以上のリジン残基の位置において生体直交性官能基を有する結果、2個の生体直交性官能基を有する、生体直交性官能基を位置選択的に有する抗体またはその塩。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩などに関する。

【背景技術】

【0002】

近年、抗体薬物複合体 (Antibody Drug Conjugation: ADC) の研究開発が盛んに行われている。ADCはその名の通り、抗体に薬物 (例、抗がん剤) をコンジュゲーションした薬剤であり、がん細胞などに対して直接的な殺細胞活性を有する。代表的なADCとしては、Immunogene社およびRoche社が共同開発したT-DM1 (商品名: カドサイラ (登録商標)) がある (非特許文献1～3)。

【0003】

T-DM1を始めとするADCは、開発当初からその不均一性が問題となっている。すなわち、抗体中に70～80程度あるLys残基に対して、低分子薬物をランダムに反応させているため、薬物抗体比 (Drug Antibody Ratio: DAR) やコンジュゲーション位置が一定ではない。通常このようなランダムコンジュゲーション法になるとDARが0～8の範囲となり、薬物の結合数が異なる複数の薬剤が生じることが分かっている。近年ADCの薬物の結合数および結合位置を変化させると、体内動態や薬物の放出速度、効果が変化することが報告されている。これらのことから次世代型ADCではコンジュゲーションする薬物の個数と位置を制御することが求められている。個数および位置が一定であると、期待通りのefficacy、コンジュゲーション薬剤のバリエーション、ロット差いわゆるレギュレーションの問題が解決すると考えられている (非特許文献4)。

【0004】

抗体の位置選択的修飾法は世界中で研究されているが、そのほとんどが遺伝子工学的手法もしくは酵素を用いた修飾法である。遺伝子工学的修飾法に関しては、位置選択性、個数選択性は制御できるものの、抗体自体の発現効率が低下 (ADCを調製する際の総収率が低下) するなどの問題が指摘されている。また、抗体発現系の構築などに長い年月を要することが問題となっている (非特許文献5～7)。

【0005】

また、小分子プローブを利用して細胞内のような夾雑な環境下でタンパク質を化学修飾

10

20

30

40

50

する方法が近年報告されている。本手法は、イメージングや低分子薬物のリポジショニングを行う上で受容体の同定などに利用されている。また、ケミカルバイオロジー分野において、合成小分子プローブを用いた有機化学的なタンパク質修飾法が注目されている（非特許文献 8～10）。

【0006】

最近、C-CAP (Chemical Conjugation by Affinity Peptide) 法が開発された。本方法は、親和性ペプチド (Affinity Peptide) に対して NHS 活性化エステルおよび薬物が連結されたペプチド試薬を抗体と反応させる方法（すなわち、ペプチド部分を含むリンカーを介した ADC の作製方法）により、抗体の位置選択的な修飾に成功している。本方法は世界で初めて、化学合成的手法により、薬物で抗体 Fc 領域を位置選択的に修飾することに成功したものであり、しかも実用上も良好な結果（反応時間 30 分、収率 70% (DAR 1 の場合)、位置選択性 100%）が確認されている。ペプチド試薬を 5 等量程度加えることで、DAR を 2 で制御できることが実証されており、修飾位置も制御できる点で画期的である（特許文献 1）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【文献】国際公開第 2016/186206 号

【非特許文献】

【0008】

【文献】Reichert JM et al., Nat Biotechnol 2005; 23: 1073-8

Kubota T et al., Cancer Sci 2009; 100: 1566-72

Wu AM et al., Nat Biotechnol 2005; 23: 1137-46

Junutula JR et al., Nat Biotechnol 2008; 26: 925-32

Shen BQ et al., Nat Biotechnol 2012; 30: 184-9

Hofer T et al., Biochemistry 2009; 48: 12047-57

Liu W et al., Nat Methods 2007; 4: 239-44

S. T. Laughlin et al., Science 2008; 320, 664

A. E. Speers et al., ChemBioChem 2004; 5, 41

Y. Takaoka et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2013; 52, 4088

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、可溶性タンパク質の修飾、特に、可溶性タンパク質の位置選択的な修飾を可能にする技術を開発することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、鋭意検討した結果、（１）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および（２）その可溶性タンパク質を構成するアミノ酸残基に対する反応性基、ならびに（３）当該親和性物質と当該反応性基との間に切断性部分を含み、（４）切断性部分での切断により生体直交性官能基を反応性基側に有する構造単位（すなわち、生体直交性官能基および反応性基を含む構造単位）を生成できるという構造的特徴を有する、新規かつ独創的な設計思想に基づき開発された化合物が、可溶性タンパク質の位置特異的な修飾に有用であることを見出した（例、図 1-1、図 1-2、図 1-3、図 2）。本発明者らはまた、このような化合物を用いることにより、ペプチド部分をリンカーとして含まない、機能性

物質（例、薬物）を位置選択的に有する可溶性タンパク質（例、抗体薬物複合体（ADC））を調製できることなどを見出した。潜在的な免疫原性を有し、また血中で加水分解され易いペプチド部分を含むリンカーの使用の回避は、ADCの臨床応用において望ましいものである。すなわち、本発明者らの開発した方法は世界で初めて、化学合成的手法により、しかもペプチド部分を含むリンカーを使用することなく、薬物で抗体Fc領域を位置選択的に修飾することに成功したといえることができる。本発明者らはまた、上記（１）～（４）のような構造的特徴を具備する種々の化合物の開発などに成功し（例、図１－１、図１－２、図１－３、図２）、本発明を完成するに至った。

【００１１】

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

【００１２】

第１の実施形態では、本発明は、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩、ならびに当該化合物またはその塩を含む、可溶性タンパク質の位置選択的修飾試薬を提供する。

〔１〕下記式（Ⅰ）：

A-L-B-R (Ⅰ)

〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む２価の基である切断性リンカーであり、

Bは、（a）生体直交性官能基を含む２価の基、または（b）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Rは、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。）で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩。

〔２〕Lが、（i）切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む２価の基である切断性リンカー、または（ii）切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む２価の基である切断性リンカーである、〔１〕の化合物またはその塩。

〔３〕Lが前記（i）の切断性リンカーである、〔２〕の化合物またはその塩。

〔４〕Lが前記（i）の切断性リンカーであり、かつ、Bが前記（b）の２価の基である、〔２〕または〔３〕の化合物またはその塩。

〔５〕Lが前記（ii）の切断性リンカーであり、かつ、Bが前記（a）の２価の基である、〔２〕の化合物またはその塩。

〔６〕可溶性タンパク質に対する親和性物質がペプチドである、〔１）～〔５）のいずれかの化合物またはその塩。

〔７〕ペプチドが、モノクローナル抗体のFc領域に対する結合性ペプチドである、〔６）の化合物またはその塩。

〔８〕結合性ペプチドが、IgGのFc領域に対する結合性ペプチドである、〔７）の化合物またはその塩。

〔９〕前記親和性物質が、下記（A）～（C）からなる群より選ばれるいずれか一つのFc領域タンパク質を含み、かつ抗原結合能を有する抗体に対する親和性物質である、〔１）～〔８）のいずれかの化合物またはその塩：

（A）配列番号１のアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質；

（B）配列番号１のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質；または

（C）配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の同一性を示すアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質。

〔１０〕結合性ペプチドが、下記式（i）：

(X₁₋₃)-C-(X₂)-H-(X_{aa1})-G-(X_{aa2})-L-V-W-C-(X₁₋₃) (配列番号９４) (i)

〔式中、

10

20

30

40

50

X は、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、
 C は、システイン残基であり、
 H は、ヒスチジン残基であり、
 X a a 1 は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グル
 タミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、
 G は、グリシン残基であり、
 X a a 2 は、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、ま
 たはアスパラギン酸残基であり、
 L は、ロイシン残基であり、
 V は、バリン残基であり、かつ
 W は、トリプトファン残基である。]

10

によって表される、13～17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIg
 Gおよび／またはウサギIgGと結合可能であるペプチドまたはその塩である、〔7〕～
 〔9〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔11〕結合性ペプチドが、下記式(i-1)：

$(X_{1-3}) - C - (X_2) - H - (X_{aa1}) - G - (X_{aa2}) - L - V - W - C - (X_{1-3})$ (配列番号95) (i-1)

〔式中、

X は、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、
 C は、システイン残基であり、
 H は、ヒスチジン残基であり、
 X a a 1 は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、
 2-アミノスベリン酸残基、又はジアミノプロピオン酸残基であり、
 G はグリシン残基であり、
 X a a 2 はグルタミン酸残基又はアスパラギン残基であり、
 L はロイシン残基であり、
 V はバリン残基であり、かつ
 W はトリプトファン残基である。]

20

によって表される、13～17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIg
 Gおよび／またはウサギIgGと結合可能であるペプチドまたはその塩である、〔7〕～
 〔9〕のいずれかの化合物またはその塩。

30

〔12〕結合性ペプチドが、下記式(i-2)：

$(X_{1-3}) - C - (X_2) - H - (X_{aa1}) - G - (X_{aa2}) - L - V - W - C - (X_{1-3})$ (配列番号96) (i-2)

〔式中、

X は、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、
 C は、システイン残基であり、
 H は、ヒスチジン残基であり、
 X a a 1 は、アルギニン残基、またはロイシン残基であり、
 G は、グリシン残基であり、
 X a a 2 は、リジン残基、グルタミン残基、またはアスパラギン酸残基であり、
 L は、ロイシン残基であり、
 V は、バリン残基であり、かつ、

40

W は、トリプトファン残基である。〕によって表される、13～17アミノ酸残基から
 なるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGおよび／またはウサギIgGと結合可能である
 ペプチドまたはその塩である、〔7〕～〔10〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔13〕結合性ペプチドが、下記式(v)：

$(X_{1-3}) - C - (X_{aa3}) - (x_{aa4}) - H - (X_{aa1}) - G - (X_{aa2}) - L - V - W - C - (X_{aa5}) - (X_{aa6}) - (X_{aa7})$ (配列番号102) (v)

50

〔式中、

Xは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、
 Cは、システイン残基であり、
 X a a 3は、アラニン残基、またはリジン残基であり、
 X a a 4は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、
 Hは、ヒスチジン残基であり、
 X a a 1は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、
 Gは、グリシン残基であり、
 X a a 2は、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、またはアスパラギン酸残基であり、
 Lは、ロイシン残基であり、
 Vは、バリン残基であり、
 Wは、トリプトファン残基であり、
 X a a 5は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、
 X a a 6は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、かつ
 X a a 7は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕によって表される、
 13～17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGおよび／またはウサギIgGと結合可能であるペプチドまたはその塩である、〔7〕～〔12〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔14〕結合性ペプチドは、下記式(vi)：

D-C-(X a a 3)-(X a a 4)-H-(X a a 1)-G-(X a a 2)-L-V-W-C-(X a a 5)-(X a a 6)-(X a a 7) (配列番号103) (vi)

〔式中、

Dは、アスパラギン酸残基であり、
 Cは、システイン残基であり、
 X a a 3は、アラニン残基、またはリジン残基であり、
 X a a 4は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、
 Hは、ヒスチジン残基であり、
 X a a 1は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、
 Gは、グリシン残基であり、
 X a a 2は、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、またはアスパラギン酸残基であり、
 Lは、ロイシン残基であり、
 Vは、バリン残基であり、
 Wは、トリプトファン残基であり、
 X a a 5は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、
 X a a 6は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、
 X a a 7は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕で表される、13～15アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGおよび／またはウサギIgGと結合可能であることを特徴とするペプチドまたはその塩である、〔7〕～〔13〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔15〕結合性ペプチドが、下記式(vii)：

D-C-(X a a 3)-(X a a 4)-H-(X a a 1)-G-(X a a 2)-L-V-W-C-T (配列番号104) (vii)

〔式中、

Dは、アスパラギン酸残基であり、
 Cは、システイン残基であり、
 X a a 3は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

X a a 4 は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、
H は、ヒスチジン残基であり、
X a a 1 は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、
G は、グリシン残基であり、
X a a 2 は、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、またはアスパラギン酸残基であり、
L は、ロイシン残基であり、
V は、バリン残基であり、
W は、トリプトファン残基であり、かつ
T は、スレオニン残基である〕で表される、13 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒト I g G および／またはウサギ I g G と結合可能であることを特徴とするペプチドまたはその塩である、〔7〕～〔14〕のいずれかの化合物またはその塩。
〔16〕結合性ペプチドが、下記式 (v i i i) :

$$R-G-N-C-(X a a 3)-(X a a 4)-H-(X a a 1)-G-(X a a 2)-L-V-W-C-(X a a 5)-(X a a 6)-(X a a 7) \quad (\text{配列番号 } 105) \quad (v i i i)$$

〔式中、
R は、アルギニン残基であり、
G は、グリシン残基であり、
N は、アスパラギン残基であり、
C は、システイン残基であり、
X a a 3 は、アラニン残基、またはリジン残基であり、
X a a 4 は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、
H は、ヒスチジン残基であり、
X a a 1 は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、
G は、グリシン残基であり、
X a a 2 は、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、またはアスパラギン酸残基であり、
L は、ロイシン残基であり、
V は、バリン残基であり、
W は、トリプトファン残基であり、
X a a 5 は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、
X a a 6 は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、かつ
X a a 7 は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕で表される、13～15 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒト I g G および／またはウサギ I g G と結合可能であることを特徴とするペプチドまたはその塩である、〔7〕～〔13〕のいずれかの化合物またはその塩。
〔17〕結合性ペプチドが、ヒト I g G と結合可能であることを特徴とする、〔7〕～〔16〕のいずれかの化合物またはその塩。
〔18〕結合性ペプチドが、(a) F N M Q C Q R R F Y E A L H D P N L N E E Q R N A R I R S I R D D C (配列番号 92) のアミノ酸配列において、いずれかのアミノ酸残基が、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、およびジアミノプロピオン酸残基からなる群より選ばれる1つのアミノ酸残基により置換されており、かつ
(b) 配列番号 92 の前記アミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、親和性ペプチドまたはその塩である、〔7〕～〔9〕のいずれかの化合物またはその塩。
〔19〕切断性部分が、(a) 酸性物質、塩基性物質、還元剤、酸化剤、酵素からなる群

10

20

30

40

50

より選ばれる１種以上の物質による処理、（ｂ）光からなる群より選ばれる物理化学的刺激による処理、または（ｃ）自己分解性の切断性部分を含む切断性リンカーを用いた場合の放置のいずれかにより切断可能な部分である、〔１〕～〔１８〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔２０〕前記切断性部分が、ジスルフィド残基、アセタール残基、ケタール残基、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、シラン残基、ヒドラゾン含有残基、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基からなる群より選ばれる、〔１〕～〔１９〕のいずれかの化合物またはその塩。

10

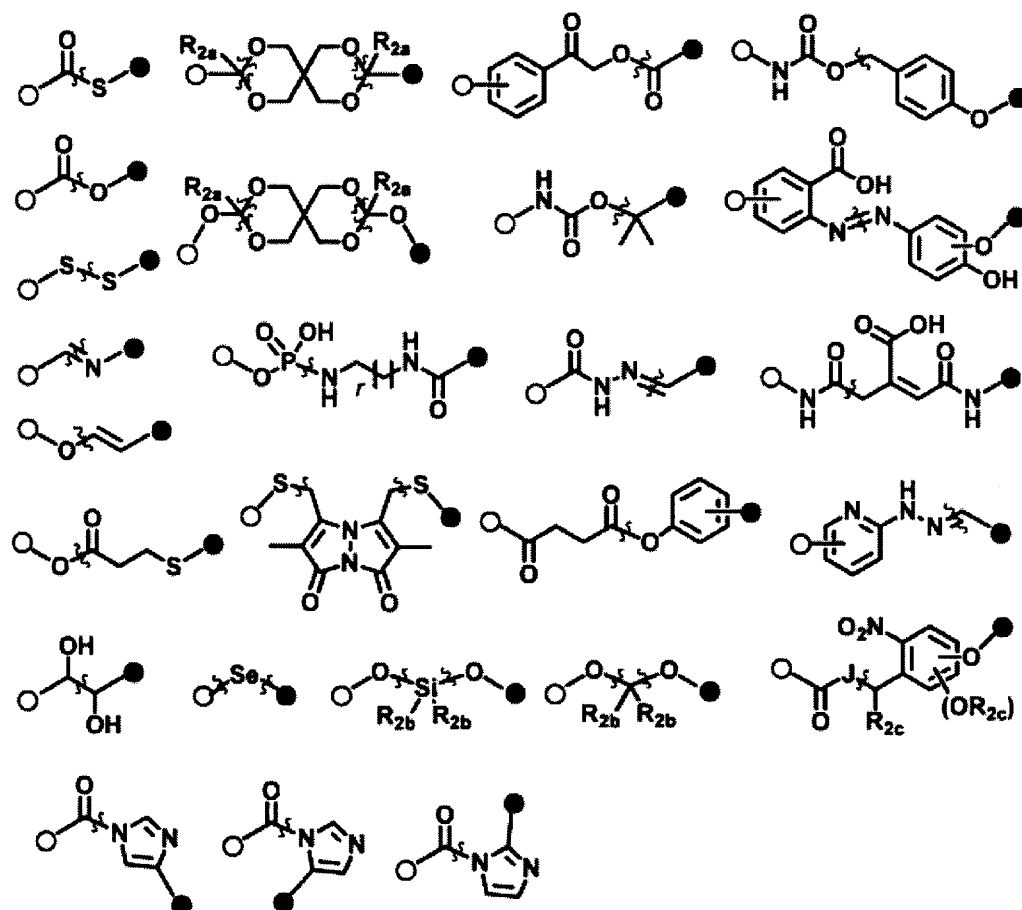
〔２１〕前記（ｉ）の切断性部分が、ジスルフィド残基、エステル残基、アセタール残基、ケタール残基、イミン残基、ビシナルジオール残基からなる群より選ばれる、〔２〕～〔２０〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔２２〕前記（ｉｉ）の切断性部分が、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、シラン残基、ヒドラゾン含有残基、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基からなる群より選ばれる、〔２〕～〔２０〕のいずれかの化合物またはその塩。

20

〔２３〕切断性部分が、下記：

〔化１〕



30

40

〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

複数の R_{2a} 、複数の R_{2b} 、および複数の R_{2c} は、同一または異なって、

（ｉ）水素原子、またはハロゲン原子；

50

(i i) 1価の炭化水素基；
 (i i i) アラルキル；
 (i v) 1価の複素環基；
 (v) R_c-O- 、 $R_c-C(=O)-$ 、 $R_c-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_c-C(=O)-O-(R_c$ は、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。)；
 (v i) NR_dR_e- 、 $NR_dR_e-C(=O)-$ 、 $NR_dR_e-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_d-C(=O)-NR_e-$ (R_d および R_e は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。)；または
 (v i i) ニトロ基、硫酸基、スルホン酸基、シアノ基、もしくはカルボキシル基
 からなる群より選ばれ、

10

Jは、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、または $-S-$ であり、

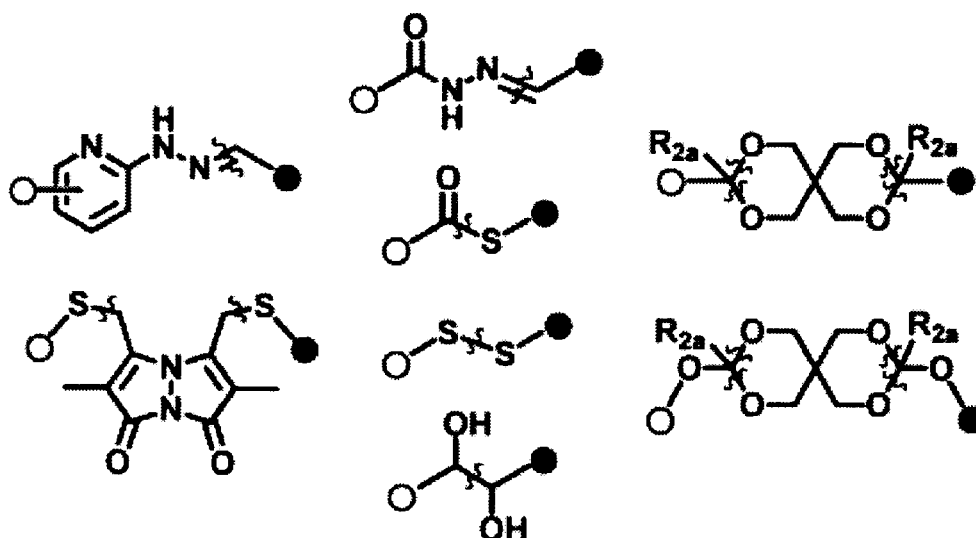
rは、1～4の任意の整数であり、

○(白丸)はAに対する結合を示し、●(黒丸)はBに対する結合を示す。

化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、●がAに対する結合を示し、○がBに対する結合を示していてもよい。) からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔1〕～〔20〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔24〕前記(i)の切断性部分が、以下：

〔化2〕



20

30

〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

R_{2a} は、〔23〕と同じであり、

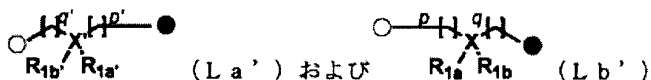
○(白丸)はAに対する結合を示し、●(黒丸)はBに対する結合を示す。

化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、●がAに対する結合を示し、○がBに対する結合を示していてもよい。) からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔2〕～〔19〕、〔21〕、〔23〕のいずれかの化合物またはその塩。

40

〔25〕前記(i i)の切断性部分が、以下：

50

[illegible]

q および q' は、同一または異なって、0 ~ 10 の任意の整数であり、

X および X' は、同一または異なって、炭素原子、窒素原子、または単結合（ここで、X が窒素原子である場合、R_{1b}は存在せず、X' が窒素原子である場合、R_{1b}は存在しない。X が単結合である場合、R_{1a}およびR_{1b}は存在せず、X' が単結合である場合、R_{1a} および R_{1b} は存在しない）であり、

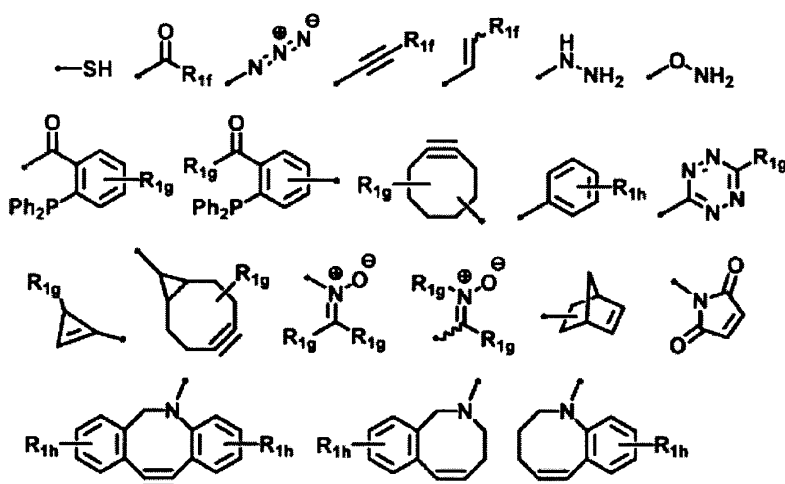
R_{1a}、R_{1b}、R_{1a} および R_{1b} は、同一または異なって、前記 (i) ~ (vii) からなる群より選ばれる原子または基である。）で表される、〔26〕の化合物またはその塩。

〔28〕生体直交性官能基を含む2価の基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル基、α-ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基を主鎖に含む2価の基である、〔1〕~〔27〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔29〕生体直交性官能基を含む2価の基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、α-ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基を側鎖に含む2価の基である、〔1〕~〔27〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔30〕生体直交性官能基が、下記：

〔化5〕



〔式中、

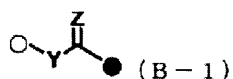
R_{1f}、単一もしくは複数のR_{1g}および単一もしくは複数のR_{1h}は、同一もしくは異なって、前記 (i) ~ (vii) からなる群より選ばれる原子もしくは基、または電子吸引基であり、

・は、結合手である。）で表されるいずれか一つである、〔1〕~〔29〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔31〕前記 (b) の2価の基が、置換されていてもよいアルキレン、置換されていてもよいシクロアルキレン、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよい2価の複素環基、-NR_a- (R_aは水素原子、または置換基を示す)、-O-、またはこれらの2以上の組み合わせからなる群より選ばれる、〔1〕~〔30〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔 3 2 〕 B が、下記式 (B - 1) :

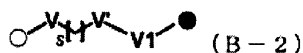
【化 6】



〔式中、

Y は、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、または下記式 (B - 2) :

【化 7】



〔式中、

V および V ' は、同一または異なって、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、または単結合であり、

V 1 は、生体直交性官能基を含む 2 価の基であり、

s は、0 ~ 10 の任意の整数であり、

式 (B - 2) における○および●は、それぞれ、式 (B - 1) における○および●と同じ配向である。) であり、

Z は、酸素原子、硫黄原子、または水素原子 (Z が水素原子である場合、 $-\text{C}(=\text{Z})-$ は、 $-\text{CH}_2-$ を示す。) であり、

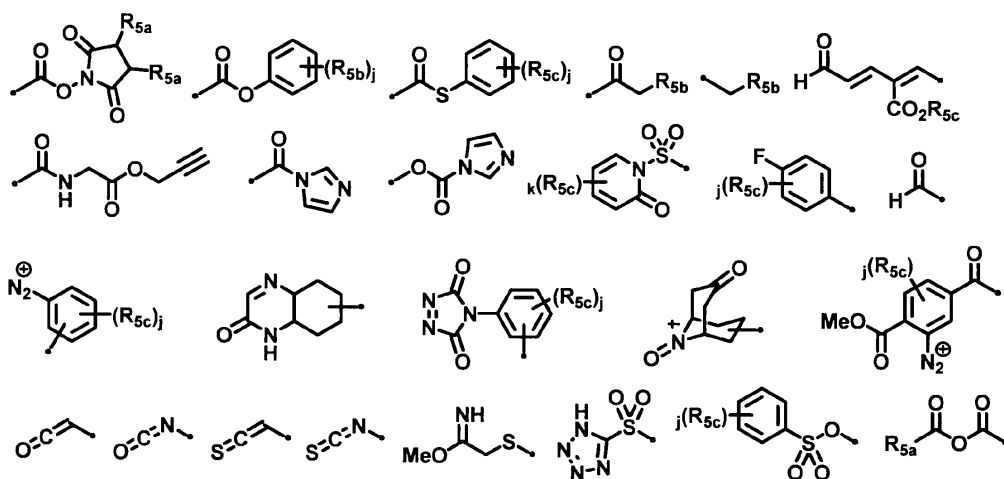
式 (B - 1) における○ (白丸) は、L 側の部分に対する結合を示し、● (黒丸) は R 側の部分に対する結合を示す。) で表される、〔 1 〕 ~ 〔 3 1 〕 のいずれかの化合物またはその塩。

〔 3 3 〕 反応性基が、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基のいずれか一つの側鎖に対して特異的な反応性基である、〔 1 〕 ~ 〔 3 2 〕 のいずれかの化合物またはその塩。

〔 3 4 〕 反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔 3 3 〕 の化合物またはその塩。

〔 3 5 〕 反応性基が、下記 :

【化 8】



〔ここで、

10

20

30

40

50

R_{5a}およびR_{5c}は、前記(i)～(vii)からなる群より選ばれる原子または基であり、

R_{5b}は、電子吸引基であり、

jは、1～5の任意の整数であり、

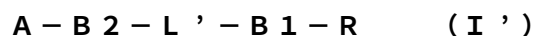
kは、1～4の任意の整数である。)からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔1〕～〔34〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔36〕AおよびRを連結する主鎖の原子数が4～20個である、〔1〕～〔35〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔37〕AおよびRを連結する主鎖が環構造を含まない、〔1〕～〔36〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔38〕L-Bで表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔1〕～〔37〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔39〕前記式(I)で表される化合物が、下記(I'):



〔式中、

AおよびRは、前記式(I)のものと同一であり

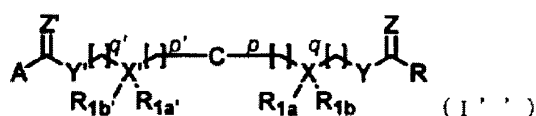
L'は、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

B₁およびB₂は、同一または異なって、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

B₁およびB₂は、L'を中心にした対称構造を有していてもよい。)で表される化合物である、〔1〕～〔38〕のいずれかの化合物またはその塩。

〔40〕前記式(I')で表される化合物が、下記(I''):

〔化9〕



〔式中、

AおよびRは、〔1〕記載の式(I)のものと同一であり、

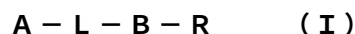
Cは、切断性部分であり、

p、p'、q、q'、X、X'、R_{1a}、R_{1b}、およびR_{1b}は、〔27〕記載の式(La')および(Lb')のものと同一であり、

YおよびY'は、同一または異なって、〔32〕記載の式(B-1)のYと同じであり、

ZおよびZ'は、同一または異なって、前記式(B-1)のZと同じである。)で表される、〔39〕の化合物またはその塩。

〔41〕下記式(I):



〔式中、

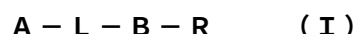
Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

Rは、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。)で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩を含む、可溶性タンパク質の位置選択的修飾試薬。

〔42〕下記式(I):



〔式中、

10

20

30

40

50

A は、抗体に対する親和性物質であり、
 L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、
 B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、
 R は、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である。) で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩。

〔43〕下記式 (I) :

下記式 (I) :

$A-L-B-R$ (I)

〔式中、

A は、抗体に対する親和性物質であり、
 L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、
 B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、
 R は、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である。) で表される、抗体に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩を含む、抗体の位置選択的修飾試薬。

〔0013〕

第 2 に、本発明は、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩、およびその製造方法を提供する。

(可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩)

〔44〕下記式 (II) :

$A-L-B-R'-T$ (II)

〔式中、

A は、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、
 L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、
 B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、
 R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、
 T は、可溶性タンパク質である。) で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔45〕可溶性タンパク質がモノクローナル抗体である、〔44〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔46〕可溶性タンパク質が IgG 抗体である、〔44〕または〔45〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔47〕可溶性タンパク質がヒト由来である、〔44〕～〔46〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔48〕可溶性タンパク質が、下記 (A) ～ (C) からなる群より選ばれるいずれか一つの Fc 領域タンパク質を含み、かつ抗原結合能を有する抗体である、〔44〕～〔47〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩 :

- (A) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む Fc 領域タンパク質 ;
- (B) 配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含む Fc 領域タンパク質 ; または
- (C) 配列番号 1 のアミノ酸配列と 90 % 以上の同一性を示すアミノ酸配列を含む Fc 領域タンパク質。

〔49〕可溶性タンパク質が、連続する 1 ～ 50 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を 5 個以上含み、

$A-L-B-R'$ で表される構造単位が、前記標的領域中に含まれる 1 個以上の特定の A

10

20

30

40

50

ミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、〔44〕～〔48〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔50〕前記標的領域が、連続する1～10個のアミノ酸残基からなる領域である、〔49〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔51〕前記標的領域が、連続する1～3個のアミノ酸残基からなる領域である、〔50〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔52〕前記標的領域が、(a) ヒトIgGFc領域における246～248位のアミノ酸残基からなる領域、(b) ヒトIgGFc領域における288～290位のアミノ酸残基からなる領域、または(c) ヒトIgGFc領域における317位のアミノ酸残基からなる領域である、〔51〕の可溶性タンパク質またはその塩。

10

〔53〕前記位置選択性が50%以上である、〔49〕～〔52〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔54〕前記位置選択性が70%以上である、〔53〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔55〕前記位置選択性が90%以上である、〔54〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔56〕前記特定のアミノ酸残基が、特定の位置に存在する特定のアミノ酸を中心としてそれぞれN末端側およびC末端側に対してa個(ここで、aは、1～10の任意の整数である)のアミノ酸残基の遠隔位置までの領域において、前記特定の位置に存在する特定のアミノ酸残基以外に、特定のアミノ酸残基と同種のアミノ酸残基を含まない、〔49〕～〔55〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔57〕前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

20

Tが、複数の単量体タンパク質中の対応する複数の標的領域において、A-L-B-R'で表される構造単位を有する結果、前記多量体タンパク質がA-L-B-R'で表される構造単位を複数個有する、〔44〕～〔56〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔58〕前記可溶性タンパク質が、複数の重鎖を含む抗体であり、

Tが、複数の重鎖中の対応する複数の標的領域において、A-L-B-R'で表される構造単位を有する結果、前記抗体がA-L-B-R'で表される構造単位を複数個有する、〔44〕～〔57〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔59〕重鎖の個数が2個である、〔58〕の可溶性タンパク質またはその塩。

30

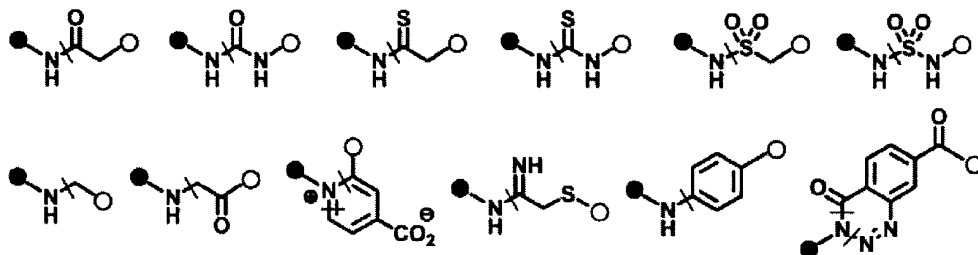
〔60〕可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分が、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基に対する、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基のいずれか一つの側鎖に対して特異的な反応性基の反応により生成する部分である、〔44〕～〔59〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔61〕可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分が、リジン残基と、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分である、〔44〕～〔60〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔62〕前記反応により生成する部分が、下記：

〔化10〕

40



〔ここで、●(黒丸)は、T側の部分に対する結合を示し、○(白丸)は、B側の部分に対する結合を示す。結合に直交する直線は、反応により生成する結合を示す。〕からなる

50

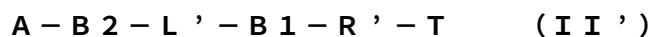
群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔４４〕～〔６１〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６３〕ＡおよびＲ'を連結する主鎖の原子数が４～２０個である、〔４４〕～〔６２〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６４〕ＡおよびＲを連結する主鎖が環構造を含まない、〔４４〕～〔６３〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６５〕Ｌ－Ｂで表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔４４〕～〔６４〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６６〕前記式（ⅠⅠ）で表される化合物が、下記（ⅠⅠ'）：



〔式中、

Ａ、Ｒ'およびＴは、前記式（ⅠⅠ）のものと同一であり

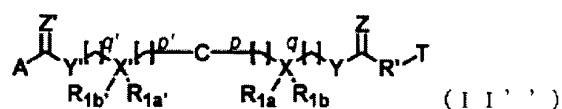
Ｌ'は、切断性部分を含む２価の基である切断性リンカーであり、

Ｂ１およびＢ２は、同一または異なって、（ａ）生体直交性官能基を含む２価の基、または（ｂ）生体直交性官能基を含まない２価の基であり、

Ｂ１およびＢ２は、Ｌ'を中心にした対称構造を有していてもよい。〕で表される化合物である、〔４４〕～〔６５〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔６７〕前記式（ⅠⅠ'）で表される化合物が、下記（ⅠⅠ''）：

〔化１１〕



〔式中、

Ａ、Ｒ'およびＴは、〔４４〕記載の式（ⅠⅠ）のものと同一であり、

Ｃは、切断性部分であり、

ｐおよびｐ'は、同一または異なって、０～１０の任意の整数であり、

ｑおよびｑ'は、同一または異なって、０～１０の任意の整数であり、

ＸおよびＸ'は、同一または異なって、炭素原子、窒素原子、または単結合（ここで、Ｘが窒素原子である場合、Ｒ_{1b}は存在せず、Ｘ'が窒素原子である場合、Ｒ_{1b}は存在しない。Ｘが単結合である場合、Ｒ_{1a}およびＲ_{1b}は存在せず、Ｘ'が単結合である場合、Ｒ_{1a}およびＲ_{1b}は存在しない）であり、

Ｒ_{1a}、Ｒ_{1b}、Ｒ_{1a}およびＲ_{1b}は、同一または異なって、

（ｉ）水素原子、またはハロゲン原子；

（ｉｉ）１価の炭化水素基；

（ｉｉｉ）アラルキル；

（ｉｖ）１価の複素環基；

（ｖ）Ｒ_c-O-、Ｒ_c-C(=O)-、Ｒ_c-O-C(=O)-、もしくはＲ_c-C(=O)-O-（Ｒ_cは、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。）；

（ｖｉ）ＮＲ_dＲ_e-、ＮＲ_dＲ_e-C(=O)-、ＮＲ_dＲ_e-C(=O)-O-、もしくはＲ_d-C(=O)-ＮＲ_e-（Ｒ_dおよびＲ_eは、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。）；または

（ｖｉｉ）ニトロ基、硫酸基、スルホン酸基、シアノ基、もしくはカルボキシル基からなる群より選ばれ、

ＹおよびＹ'は、同一または異なって、〔３２〕記載の式（Ｂ－１）のＹと同じであり、

ＺおよびＺ'は、同一または異なって、前記式（Ｂ－１）のＺと同じである。〕で表される、〔６６〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔６８〕下記式（ⅠⅠ）：

$A-L-B-R'-T$ (I I)

〔式中、

Aは、抗体に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または(b) 生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

R'は、抗体と、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体である。〕表される、抗体に対する親和性物質、および切断性部分を有する抗体またはその塩。

〔0014〕

(可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法)

〔69〕可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

下記式(I)：

$A-L-B-R$ (I)

〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または(b) 生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

Rは、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩を、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式(II)：

$A-L-B-R'-T$ (II)

〔式中、

A、L、およびBは、前記式(I)のものと同一であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔70〕可溶性タンパク質が抗体であり、反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔69〕の方法。

〔0015〕

第3に、本発明は、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩、およびその製造方法を提供する。

(可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩)

〔71〕下記式(III)：

$A-L-B'(-F)-R'-T$ (III)

〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

Fは、機能性物質であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩。

〔 7 2 〕 可溶性タンパク質がモノクローナル抗体である、〔 7 1 〕 の複合体またはその塩。

〔 7 3 〕 可溶性タンパク質が I g G 抗体である、〔 7 1 〕 または〔 7 2 〕 の複合体またはその塩。

〔 7 4 〕 可溶性タンパク質がヒト由来である、〔 7 1 〕 ～〔 7 3 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 7 5 〕 可溶性タンパク質が、下記 (A) ～ (C) からなる群より選ばれるいずれか一つの F c 領域タンパク質を含み、かつ抗原結合能を有する抗体である、〔 7 1 〕 ～〔 7 4 〕 のいずれかの複合体またはその塩：

(A) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質；

(B) 配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質；または

(C) 配列番号 1 のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の同一性を示すアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質。

〔 7 6 〕 可溶性タンパク質が、連続する 1 ～ 5 0 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を 5 個以上含み、

A - L - B ' (- F) - R ' で表される構造単位が、前記標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 3 0 % 以上の位置選択性で結合している、〔 7 1 〕 ～〔 7 5 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 7 7 〕 前記特定のアミノ酸残基が、特定の位置に存在する特定のアミノ酸を中心としてそれぞれ N 末端側および C 末端側に対して a 個（ここで、a は、1 ～ 1 0 の任意の整数である）のアミノ酸残基の遠隔位置までの領域において、前記特定の位置に存在する特定のアミノ酸残基以外に、特定のアミノ酸残基と同種のアミノ酸残基を含まない、〔 7 6 〕 の複合体またはその塩。

〔 7 8 〕 前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

T が、複数の単量体タンパク質中の対応する複数の標的領域において、A - L - B ' (- F) - R ' で表される構造単位を有する結果、前記多量体タンパク質が A - L - B ' (- F) - R ' で表される構造単位を複数個有する、〔 7 1 〕 ～〔 7 7 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 7 9 〕 前記可溶性タンパク質が、複数の重鎖を含む抗体であり、

T が、複数の重鎖中の対応する複数の標的領域において、A - L - B ' (- F) - R ' で表される構造単位を有する結果、前記抗体が A - L - B ' (- F) - R ' で表される構造単位を複数個有する、〔 7 1 〕 ～〔 7 8 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 8 0 〕 機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基が、ジスルフィド残基、アセタール残基、ケタール残基、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、シラン残基、ヒドラゾン含有残基、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基からなる群より選ばれる反応部分を含む 2 価の基である、〔 7 1 〕 ～〔 7 9 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 8 1 〕 前記反応により生成する部分が、下記：

10

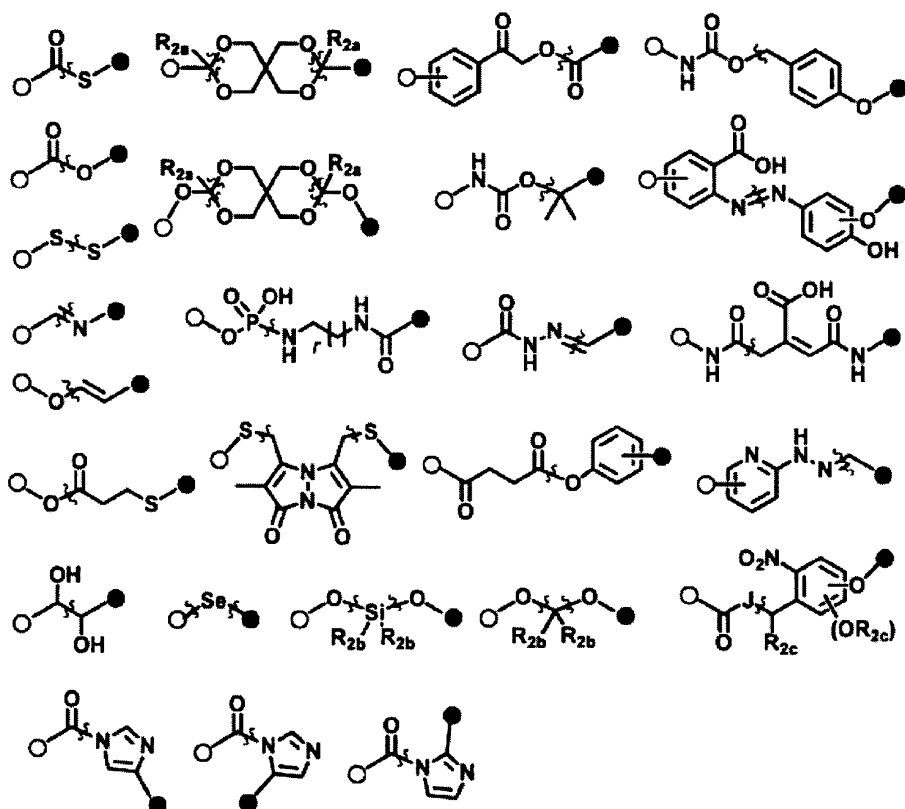
20

30

40

50

【化 12】



10

20

〔ここで、結合に直交する波線は、反応により生成する結合を示し、

複数の R_{2a} 、複数の R_{2b} 、および複数の R_{2c} は、同一または異なって、

(i) 水素原子、またはハロゲン原子；

(ii) 1価の炭化水素基；

(iii) アラルキル；

(iv) 1価の複素環基；

(v) R_c-O- 、 $R_c-C(=O)-$ 、 $R_c-O-C(=O)-$ 、もしくは $R_c-C(=O)-O-$ (R_c は、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。)；

(vi) NR_dR_e- 、 $NR_dR_e-C(=O)-$ 、 $NR_dR_e-C(=O)-O-$ 、もしくは $R_d-C(=O)-NR_e-$ (R_d および R_e は、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは一価の炭化水素基を示す。)；または

(vii) ニトロ基、硫酸基、スルホン酸基、シアノ基、もしくはカルボキシル基からなる群より選ばれ、

J は、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、または $-S-$ であり、

r は、1～4 の任意の整数であり、

○ (白丸) は A に対する結合を示し、● (黒丸) は B に対する結合を示す。

化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、●が A に対する結合を示し、○が B に対する結合を示していてもよい。〕からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔71〕～〔80〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔82〕可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分が、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基と、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基のいずれか一つの側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分である、〔71〕～〔81〕のいずれかの複合体またはその塩。

〔83〕可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分が、リジン残基と、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分である、

30

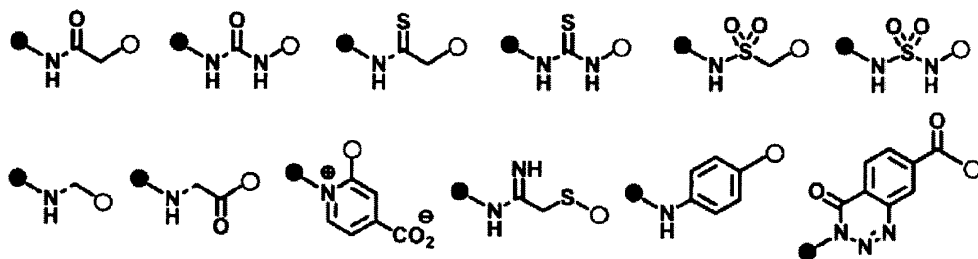
40

50

〔 7 1 〕 ～ 〔 8 2 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 8 4 〕 前記反応により生成する部分が、下記：

〔 化 1 3 〕



10

〔ここで、●（黒丸）は、T側の部分に対する結合を示し、○（白丸）は、B側の部分に対する結合を示す。〕からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔 7 1 〕 ～ 〔 8 3 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 8 5 〕 機能性物質が薬物または標識物質である、〔 7 1 〕 ～ 〔 8 4 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 8 6 〕 機能性物質が低分子化合物である、〔 7 1 〕 ～ 〔 8 5 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

20

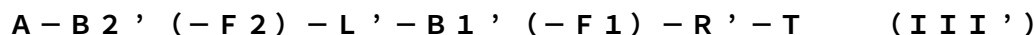
〔 8 7 〕 薬物が抗癌剤である、〔 8 5 〕 または〔 8 6 〕 の複合体またはその塩。

〔 8 8 〕 AおよびR'を連結する主鎖の原子数が4～20個である、〔 7 1 〕 ～ 〔 8 7 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 8 9 〕 AおよびRを連結する主鎖が環構造を含まない、〔 7 1 〕 ～ 〔 8 8 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 9 0 〕 L-Bで表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔 7 1 〕 ～ 〔 8 9 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 9 1 〕 前記式（ⅠⅠⅠ）で表される化合物が、下記式（ⅠⅠⅠ'）：



〔式中、

A、R'およびTは、前記式（ⅠⅠ）のものと同一であり、

L'は、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

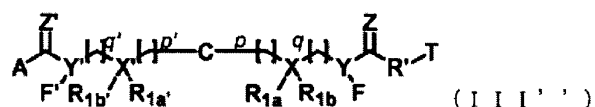
B1'およびB2'は、同一または異なって、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

F1およびF2は、同一または異なって、機能性物質であり、

B1'（-F1）およびB2'（-F2）は、L'を中心にした対称構造を有していてもよい。〕で表される、〔 7 1 〕 ～ 〔 9 0 〕 のいずれかの複合体またはその塩。

〔 9 2 〕 前記式（ⅠⅠⅠ'）で表される化合物が、下記（ⅠⅠⅠ''）：

〔 化 1 4 〕



40

〔式中、

A、R'およびTは、〔 7 1 〕 記載の式（ⅠⅠⅠ）のものと同一であり、

Cは、切断性部分であり、

pおよびp'は、同一または異なって、0～10の任意の整数であり、

qおよびq'は、同一または異なって、0～10の任意の整数であり、

50

XおよびX'は、同一または異なって、炭素原子、窒素原子、または単結合（ここで、Xが窒素原子である場合、 R_{1b} は存在せず、X'が窒素原子である場合、 R_{1b} は存在しない。Xが単結合である場合、 R_{1a} および R_{1b} は存在せず、X'が単結合である場合、 R_{1a} および R_{1b} は存在しない）であり、

R_{1a} 、 R_{1b} 、 R_{1a} および R_{1b} は、同一または異なって、前記(i)～(vii)からなる群より選ばれ、

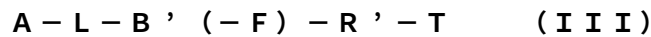
YおよびY'は、同一または異なって、〔32〕記載の式(B-1)のYから水素原子を一つ除いた残基であり、

ZおよびZ'は、同一または異なって、前記式(B-1)のZと同じであり、

FおよびF'は、同一または異なって、機能性物質である。〕で表される、〔91〕の複合体またはその塩。

10

〔93〕下記式(III)：



〔式中、

Aは、抗体に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

Fは、機能性物質であり、

R'は、抗体と、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であり、

20

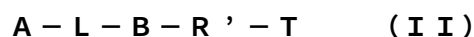
Tは、抗体である。〕で表される、親和性物質、機能性物質および抗体を有する複合体またはその塩。

〔0016〕

〔可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の製造方法〕

〔94〕可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の製造方法であって、

下記式(II)：



30

〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

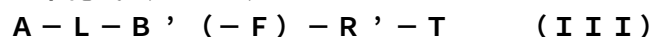
Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式(III)：



〔式中、

40

A、L、R'およびTは、前記式(II)のものと同じであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

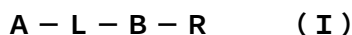
Fは、機能性物質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成することを含む、方法。

〔95〕可溶性タンパク質が抗体であり、反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔94〕の方法。

〔96〕可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の製造方法であって、

50

(A) 下記式 (I) :



〔式中、

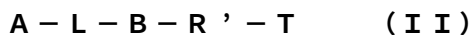
A は、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基であり、

R は、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される化合物またはその塩を、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式 (II) :



〔式中、

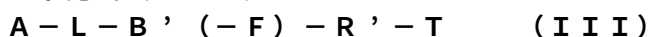
A、L、および B は、前記式 (I) のものと同じであり

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、ならびに

(B) 前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式 (III) :



〔式中、

A および L は、前記式 (I) のものと同じであり、

R' および T は、前記式 (II) のものと同じであり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

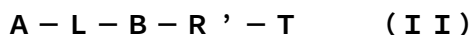
F は、機能性物質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成することを含む、方法。

【0017】

第 4 に、本発明は、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質の製造方法を提供する。

〔97〕生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

下記式 (IV) :



〔式中、

A は、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

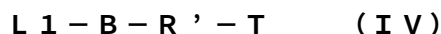
L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 (V) :



〔式中、

B、R' および T は、前記式 (IV) のものと同じであり、

L1 は、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または (ii') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基である。〕で表される、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔98〕L が、(i) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカー、または (ii) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む 2 価の基である切断性リ

10

20

30

40

50

ンカーである、〔 9 7 〕の方法。

〔 9 9 〕 L が前記 (i) の切断性リンカーであり、

L 1 が、(i ') 生体直交性官能基を含む 1 価の基であり、

B が、前記 (a) または (b) の 2 価の基である、〔 9 8 〕の方法。

〔 1 0 0 〕 L が前記 (i) の切断性リンカーであり、

L 1 が (i ') 生体直交性官能基を含む 1 価の基であり、

B が前記 (b) の 2 価の基である、〔 9 8 〕または〔 9 9 〕の方法。

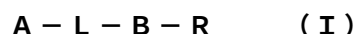
〔 1 0 1 〕 L が前記 (i i) の切断性リンカーであり、

L 1 が (i i ') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基であり、

B が前記 (a) の 2 価の基である、〔 9 8 〕の方法。

〔 1 0 2 〕可溶性タンパク質が抗体であり、反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔 9 7 〕～〔 1 0 1 〕のいずれかの方法。

〔 1 0 3 〕生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、(A) 下記式 (I) :



〔式中、

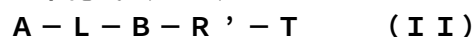
A は、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R は、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される化合物またはその塩を、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式 (I I) :



〔式中、

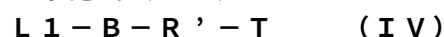
A、L、および B は、前記式 (I) のものと同じであり

R ' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、ならびに

(B) 前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 (I V) :



〔式中、

B、R ' および T は、前記式 (I I) のものと同じであり、

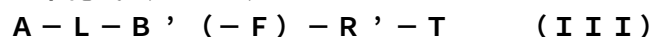
L 1 は、(i ') 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または (i i ') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基である。〕で表される、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔 0 0 1 8 〕

第 5 に、本発明は、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

〔 1 0 4 〕機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

下記式 (I I I) :



〔式中、

A は、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B ' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

F は、機能性物質であり、

10

20

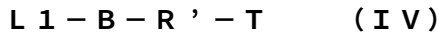
30

40

50

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、
T は、可溶性タンパク質である。) で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、あるいは

下記式 (I V) :



〔式中、

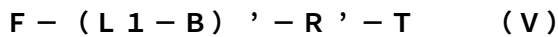
L1 は、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または (i i') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基であり、

B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、可溶性タンパク質である。) で表される、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、

下記式 (V) :



〔式中、

L1 は、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または (i i') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基であり、

B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

(L1 - B)' で表される構造単位は、機能性物質と、(i') および (a) における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分を含む 2 価の構造単位であり、

F は、機能性物質であり、

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、可溶性タンパク質である。) で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔105〕前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 (V1) :



〔式中、

L1 は、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または (i i') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基であり、

B'、F、R' および T は、前記式 (I I I) のものと同じである。) で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む方法である、〔104〕の方法。

〔106〕前記生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を、1 種または 2 種の機能性物質と反応させて、

下記式 (V2) :



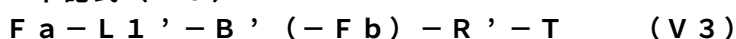
〔式中、

B、R' および T は、前記式 (I V) のものと同じであり、

L1' は、機能性物質と、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

F は、機能性物質である。) 、または

下記式 (V3) :



〔式中、

10

20

30

40

50

R'およびTは、前記式(IV)のものと同一であり、

L1'は、前記式(V2)のものと同一であり、

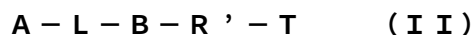
B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

FaおよびFbは、それぞれ、同一または異なる機能性物質である。)で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む方法である、〔104〕の方法。

〔107〕可溶性タンパク質が抗体であり、反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔104〕～〔106〕のいずれかの方法。

〔108〕機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

(A) 下記式(II)：



〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

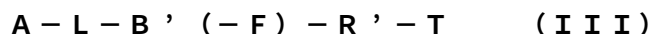
Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質である。)で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式(III)：



〔式中、

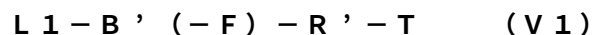
A、L、R'およびTは、前記式(II)のものと同一であり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

Fは、機能性物質である。)で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成すること、ならびに

(B) 前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式(V1)：



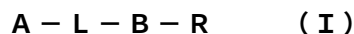
〔式中、

L1は、(i') 生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii') 生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

B'、F、R'およびTは、前記式(III)のものと同一である。)で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔109〕機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

(A) 下記式(I)：



〔式中、

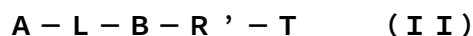
Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基であり、

Rは、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。)で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩を、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式(II)：



〔式中、

10

20

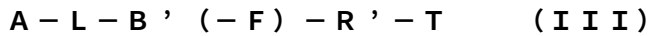
30

40

50

A、L、およびBは、前記式(I)のものと同一であり
 R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、
 Tは、可溶性タンパク質である。)で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、
 および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、
 (B) 前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式(III)：



〔式中、

AおよびLは、前記式(I)のものと同一であり、

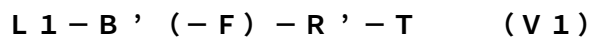
R'およびTは、前記式(II)のものと同一であり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

Fは、機能性物質である。)で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成すること、ならびに

(C) 前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式(V1)：



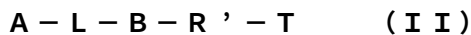
〔式中、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

B'、F、R'およびTは、前記式(III)のものと同一である。)で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔110〕機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

(A) 下記式(II)：



〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

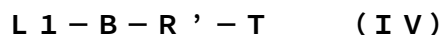
Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質である。)で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式(IV)：



〔式中、

B、R'およびTは、前記式(II)のものと同一であり、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基である。)で表される、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、ならびに

(B) 前記生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を、1種または2種以上の機能性物質と反応させて、

下記式(V2)



〔式中、

B、R'およびTは、前記式(IV)のものと同一であり、

L1'は、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により

10

20

30

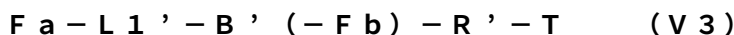
40

50

生成する部分を含む 2 価の基であり、

F は、機能性物質である。〕、または

下記式 (V3) :



〔式中、

R' および T は、前記式 (IV) のものと同じであり、

L 1' は、前記式 (V2) のものと同じであり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

F a および F b は、それぞれ、同一または異なる機能性物質である。〕で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔111〕機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

(A) 下記式 (I) :



〔式中、

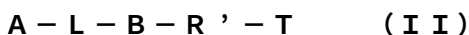
A は、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R は、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される化合物またはその塩を、可溶性タンパク質と反応させて、

下記式 (II) :



〔式中、

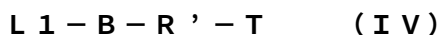
A、L、および B は、前記式 (I) のものと同じであり

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、可溶性タンパク質である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、

(B) 前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 (IV) :



〔式中、

B、R' および T は、前記式 (II) のものと同じであり、

L 1 は、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または (ii') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基である。〕で表される、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、ならびに

(C) 前記生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を、1 種または 2 種以上の機能性物質と反応させて、

下記式 (V2) :



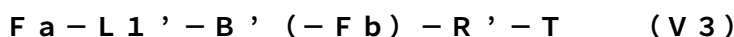
〔式中、

B、R' および T は、前記式 (IV) のものと同じであり、

L 1' は、機能性物質と、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

F は、機能性物質である。〕、または

下記式 (V3) :



〔式中、

R' および T は、前記式 (IV) のものと同じであり、

10

20

30

40

50

L 1' は、前記式 (V 2) のものと同じであり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

F a および F b は、それぞれ、同一または異なる機能性物質である。) で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

【0019】

第 6 に、本発明は、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、およびその製造方法を提供する。

(生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩)

〔1〕生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であって、可溶性タンパク質が、連続する 1 ～ 50 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を 5 個以上含み、かつ

生体直交性官能基が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、前記標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30 % 以上の位置選択性で結合している、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔2〕下記式 (I V) :

L 1 - B - R' - T (I V)

〔式中、

L 1 は、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または (i i') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基であり、

B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、連続する 1 ～ 50 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を 5 個以上含む。) で表され、かつ L 1 - B - R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30 % 以上の位置選択性で結合している、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔3〕可溶性タンパク質がモノクローナル抗体である、〔1〕または〔2〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔4〕可溶性タンパク質が I g G 抗体である、〔1〕～〔3〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔5〕可溶性タンパク質がヒト由来である、〔1〕～〔4〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔6〕可溶性タンパク質が、下記 (A) ～ (C) からなる群より選ばれるいずれか一つの F c 領域タンパク質を含み、かつ抗原結合能を有する抗体である、〔1〕～〔5〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩：

(A) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質；

(B) 配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質；または

(C) 配列番号 1 のアミノ酸配列と 90 % 以上の同一性を示すアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質。

〔7〕前記標的領域が、連続する 1 ～ 10 個のアミノ酸残基からなる領域である、〔1〕～〔6〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔8〕前記標的領域が、連続する 1 ～ 3 個のアミノ酸残基からなる領域である、〔1〕～〔7〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔9〕前記標的領域が、(a) ヒト I g G F c 領域における 246 ～ 248 位のアミノ

10

20

30

40

50

酸残基からなる領域、(b) ヒト IgG Fc 領域における 288～290 位のアミノ酸残基からなる領域、または (c) ヒト IgG Fc 領域における 317 位のアミノ酸残基からなる領域である、〔8〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔10〕前記位置選択性が 50% 以上である、〔1〕～〔9〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔11〕前記位置選択性が 70% 以上である、〔10〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔12〕前記位置選択性が 90% 以上である、〔11〕の可溶性タンパク質またはその塩。
〔13〕前記特定のアミノ酸残基が、特定の位置に存在する特定のアミノ酸を中心としてそれぞれ N 末端側および C 末端側に対して a 個（ここで、a は、1～10 の任意の整数である）のアミノ酸残基の遠隔位置までの領域において、前記特定の位置に存在する特定の
10 アミノ酸残基以外に、特定のアミノ酸残基と同種のアミノ酸残基を含まない、〔1〕～〔12〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔14〕前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

多量体タンパク質に含まれる複数の単量体タンパク質中の前記位置に存在する複数の特定の
アミノ酸残基において生体直交性官能基を有する結果、前記多量体タンパク質が複数の
生体直交性官能基を有する、〔1〕、〔3〕～〔13〕のいずれかの可溶性タンパク質
またはその塩。

〔15〕前記可溶性タンパク質が、複数の重鎖を含む抗体であり、

抗体に含まれる複数の重鎖中の前記位置に存在する複数の特定のアミノ酸残基において
生体直交性官能基を有する結果、抗体が複数の生体直交性官能基を有する、〔1〕、〔3〕
～〔14〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。
20

〔16〕前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

T が、複数の単量体タンパク質中の対応する複数の標的領域において、A-L-B-R' で表される構造単位を有する結果、多量体タンパク質が A-L-B-R' で表される構造単位を複数有する、〔2〕～〔13〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔17〕前記可溶性タンパク質が、複数の重鎖を含む抗体であり、

T が、複数の重鎖中の対応する複数の標的領域において、A-L-B-R' で表される構造単位を有する結果、抗体が A-L-B-R' で表される構造単位を複数有する、〔2〕～〔13〕、〔16〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。
30

〔18〕重鎖の個数が 2 個である、〔15〕または〔17〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔19〕L1 が、下記式 (L1-1)～(L1-2)：

C1-Lb (L1-1)

C1 (L1-2)

〔式中、

Lb は、2 価の基であり、

C1 は、生体直交性官能基、または生体直交性官能基以外の基である。〕のいずれか一つで表される、〔2〕～〔13〕、〔16〕～〔18〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。
40

〔20〕前記 Lb が、下記式 (Lb')：

【化 15】



〔式中、

p は、0～10 の任意の整数であり、

10

20

30

40

50

q は、0～10の任意の整数であり、

X は、炭素原子、窒素原子、または単結合（ここで、X が窒素原子である場合、R_{1b} は存在しない。X が単結合である場合、R_{1a} および R_{1b} は存在しない）であり、

R_{1a}、および R_{1b} は、同一または異なって、水素原子、または上述する置換基からなる群より選ばれる。

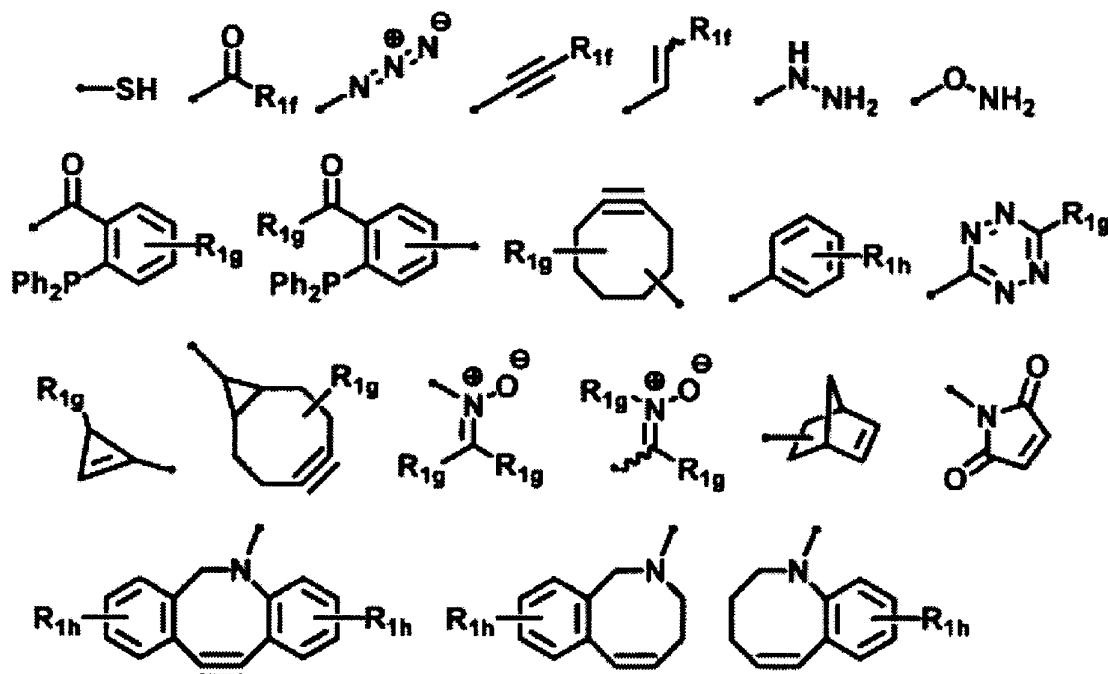
○（白丸）は、C 1 に対する結合を示し、●（黒丸）は B に対する結合を示す。）で表される、〔19〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔21〕生体直交性官能基を含む2価の基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル基、α-ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基を主鎖に含む2価の基である、〔1〕～〔20〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔22〕生体直交性官能基を含む2価の基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、α-ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基を側鎖に含む2価の基である、〔1〕～〔20〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔23〕生体直交性官能基が、下記：

〔化16〕



〔式中、

R_{1f}、単一もしくは複数の R_{1g} および単一もしくは複数の R_{1h} は、同一もしくは異なって、前記 (i) ～ (vii) からなる群より選ばれる原子もしくは基、または電子吸引基であり、

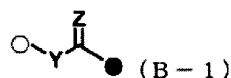
・は、結合手である。) で表されるいずれか一つである、〔1〕～〔22〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔24〕前記 (b) の2価の基が、置換されていてもよいアルキレン、置換されていてもよいシクロアルキレン、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよい2価の複

素環基、 $-NR_a-$ (R_a は水素原子、または置換基を示す)、 $-O-$ 、またはこれらの2以上の組み合わせからなる群より選ばれる、〔2〕～〔13〕、〔16〕～〔23〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔25〕Bが、下記式(B-1)：

【化17】



10

〔式中、

Yは、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、または下記式(B-2)：

【化18】



〔式中、

VおよびV'は、同一または異なって、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、または単結合であり、

V1は、生体直交性官能基を含む2価の基であり、

sは、0～10の任意の整数であり、

式(B-2)における○および●は、それぞれ、式(B-1)における○および●と同じ配向である。)であり、

Zは、酸素原子、硫黄原子、または水素原子(Zが水素原子である場合、 $-C(=Z)-$ は、 $-CH_2-$ を示す。)であり、

式(B-1)における○(白丸)は、L側の部分に対する結合を示し、●(黒丸)はR側の部分に対する結合を示す。)で表される、〔2〕～〔13〕、〔16〕～〔24〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔26〕生体直交性官能基が、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基のいずれか一つの側鎖を介して可溶性タンパク質に結合している、〔1〕～〔25〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔27〕生体直交性官能基が、リジン残基の側鎖を介して可溶性タンパク質に結合している、〔26〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔28〕反応性基が、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基のいずれか一つの側鎖に対して特異的な反応性基である、〔2〕～〔13〕、〔16〕～〔26〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔29〕反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔2〕～〔13〕、〔16〕～〔28〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔30〕反応性基が、下記：

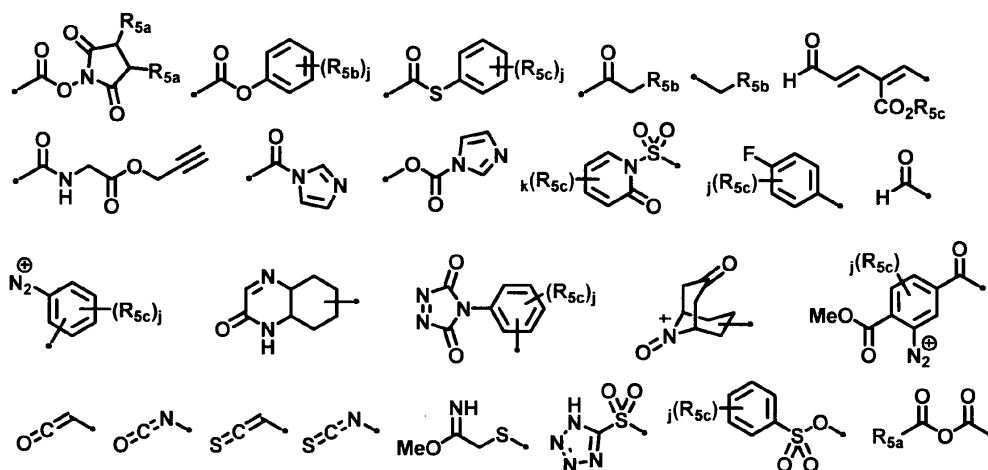
20

30

40

50

【化 1 9】



〔ここで、

R_{5a} および R_{5c} は、前記(i)～(vii)からなる群より選ばれる原子または基であり、

R_{5h}は、電子吸引基であり、

j は、1 ~ 5 の任意の整数であり、

k は、1～4の任意の整数である。) からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔2〕～〔13〕、〔16〕～〔29〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３１〕生体直交性官能基および特定のアミノ酸残基の側鎖を連結する主鎖の原子数が２～１０個であるリンカーを介して生体直交性官能基が可溶性タンパク質に結合している、〔１〕～〔３０〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３２〕生体直交性官能基および特定のアミノ酸残基の側鎖を連結する主鎖が環構造を含まないリンカーを介して生体直交性官能基が可溶性タンパク質に結合している、〔１〕～〔３１〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

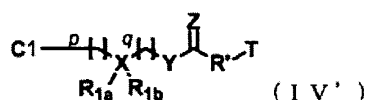
〔３３〕 Ｌ１末端部分およびＲ'を連結する主鎖の原子数が２～１０個である、〔２〕～〔１３〕、〔１６〕～〔３２〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔３４〕 AおよびRを連結する主鎖が環構造を含まない、〔２〕～〔１３〕、〔１６〕～〔３３〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔35〕 L1-Bで表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔2〕～〔13〕、〔16〕～〔34〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔 36 〕 前記式 (I V) で表される可溶性タンパク質が、下記 (I V ') :

【化 2 0】



〔式中、

C 1 は、生体直交性官能基、または生体直交性官能基以外の基である。

p 、 q 、 X 、 R_{1a} および R_{1b} は、前記式（ Lb' ）のものと同一であり、

Y および Z は、前記のものと同じであり、

R' および T は、前記式 (IV) のものと同じである。) で表される、〔2〕～〔13〕、〔16〕～〔35〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔37〕生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であって、可溶性タンパク質が、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含み、かつ

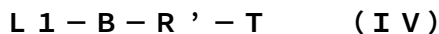
生体直交性官能基が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、前記標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合しており、生体直交性官能基がリジン残基の側鎖を介して可溶性タンパク質に結合しており、

可溶性タンパク質が、複数の重鎖を含む抗体であり、

抗体に含まれる複数の重鎖中の前記位置に存在する複数の特定のアミノ酸残基において生体直交性官能基を有する結果、抗体が複数の生体直交性官能基を有する、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

10

〔38〕下記式（I V）：



〔式中、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

R'は、抗体と、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であり、

20

Tは、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む。)で表され、かつL1-B-R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔0020〕

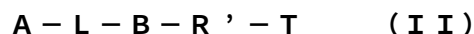
(生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法)

本発明はまた、上記〔1〕～〔38〕の可溶性タンパク質のうち、式(I V)またはその下位の式による特定を要する、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

30

〔39〕生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

下記式（I I）：



〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

40

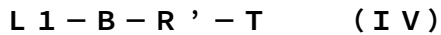
R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む。)で表され、かつL1-B-R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の切断性部分を切断して、

50

下記式 (I V) :



〔式中、

B、R' および T は、前記式 (I I) のものと同じであり、

L1 は、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または (i i') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基である。〕で表され、かつ

L1-B-R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合している、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

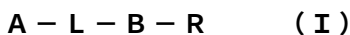
【0021】

好ましくは、上記〔39〕の方法は、以下であってもよい。

〔40〕可溶性タンパク質が抗体であり、反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔39〕の方法。

〔41〕生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

(A) 下記式 (I) :



〔式中、

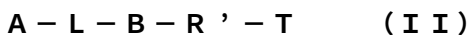
A は、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

R は、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される化合物またはその塩を、可溶性タンパク質（ここで、可溶性タンパク質は、連続する 1~50 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を 5 個以上含む。）と反応させて、

下記式 (I I) :



〔式中、

A、L、および B は、前記式 (I) のものと同じであり

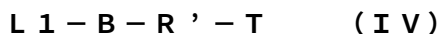
R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、可溶性タンパク質である。〕で表され、かつ

L1-B-R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合している、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、ならびに

(B) 前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 (I V) :



〔式中、

B、R' および T は、前記式 (I I) のものと同じであり、

L1 は、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または (i i') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基である。〕で表され、かつ

L1-B-R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合している生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

【0022】

第 7 に、本発明は、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、

およびその製造方法を提供する。

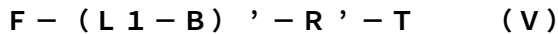
(機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩)

〔1〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であって、

可溶性タンパク質が、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含み、かつ

機能性物質が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、前記標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔2〕下記式(V)：



〔式中、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

(L1-B)'で表される構造単位は、機能性物質と、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分を含む2価の構造単位であり、

Fは、機能性物質であり、

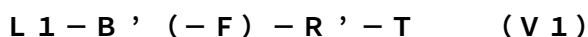
R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む。)で表され、かつ

F-(L1-B)'-R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔3〕前記可溶性タンパク質またはその塩が、下記式(V1)：



〔式中、

L1、F、R'およびTは、前記式(V)のものと同一であり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基である。)で表され、かつL1-B'-(F)-R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である、〔2〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔4〕前記可溶性タンパク質またはその塩が、下記式(V2)：

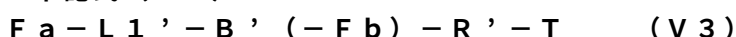


〔式中、

F、B、R'およびTは、前記式(V)のものと同一であり、

L1'は、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基である。)で表され、かつF-L1'-B-R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、あるいは

下記式(V3)：



〔式中、

R'およびTは、前記式(V)のものと同一であり、

10

20

30

40

50

L 1' は、前記式 (V 2) のものと同じであり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

F a および F b は、それぞれ、同一または異なる機能性物質である。〕で表され、かつ F a - L 1' - B' (- F b) - R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30 % 以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である、〔2〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔5〕の可溶性タンパク質がモノクローナル抗体である、〔1〕～〔4〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔6〕可溶性タンパク質が I g G 抗体である、〔1〕～〔5〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔7〕可溶性タンパク質がヒト由来である、〔1〕～〔6〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔8〕可溶性タンパク質が、下記 (A) ～ (C) からなる群より選ばれるいずれか一つの F c 領域タンパク質を含み、かつ抗原結合能を有する抗体である、〔1〕～〔7〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩：

(A) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質；

(B) 配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質；または

(C) 配列番号 1 のアミノ酸配列と 90 % 以上の同一性を示すアミノ酸配列を含む F c 領域タンパク質。

〔9〕前記標的領域が、連続する 1 ～ 10 個のアミノ酸残基からなる領域である、〔1〕～〔8〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔10〕前記標的領域が、連続する 1 ～ 3 個のアミノ酸残基からなる領域である、〔9〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔11〕前記標的領域が、(a) ヒト I g G F c 領域における 246 ～ 248 位のアミノ酸残基からなる領域、(b) ヒト I g G F c 領域における 288 ～ 290 位のアミノ酸残基からなる領域、または (c) ヒト I g G F c 領域における 317 位のアミノ酸残基からなる領域である、〔10〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔12〕前記位置選択性が 50 % 以上である、〔1〕～〔11〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔13〕前記位置選択性が 70 % 以上である、〔12〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔14〕前記位置選択性が 90 % 以上である、〔13〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔15〕前記特定のアミノ酸残基が、特定の位置に存在する特定のアミノ酸を中心としてそれぞれ N 末端側および C 末端側に対して a 個（ここで、a は、1 ～ 10 の任意の整数である）のアミノ酸残基の遠隔位置までの領域において、前記特定の位置に存在する特定のアミノ酸残基以外に、特定のアミノ酸残基と同種のアミノ酸残基を含まない、〔1〕～〔14〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔16〕前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

多量体タンパク質に含まれる複数の単量体タンパク質中の前記位置に存在する複数の特定のアミノ酸残基において機能性物質を有する結果、前記多量体タンパク質が複数の機能性物質を有する、〔1〕、〔5〕～〔15〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔17〕前記可溶性タンパク質が、複数の重鎖を含む抗体であり、

抗体に含まれる複数の重鎖中の前記位置に存在する複数の特定のアミノ酸残基において機能性物質を有する結果、抗体が複数の機能性物質を有する、〔1〕、〔5〕～〔16〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔18〕前記可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質であり、

10

20

30

40

50

Tが、複数個の単量体タンパク質中の対応する複数個の標的領域において、A-L-B-R'で表される構造単位を有する結果、前記多量体タンパク質がA-L-B-R'で表される構造単位を複数個有する、〔2〕～〔15〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔19〕前記可溶性タンパク質が、複数個の重鎖を含む抗体であり、

Tが、複数個の重鎖中の対応する複数個の標的領域において、A-L-B-R'で表される構造単位を有する結果、前記抗体がA-L-B-R'で表される構造単位を複数個有する、〔2〕～〔15〕、〔18〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔20〕重鎖の個数が2個である、〔17〕または〔19〕の可溶性タンパク質またはその塩。

10

〔21〕L1が、下記式(L1-1)～(L1-2)：

C1-Lb (L1-1)

C1 (L1-2)

〔式中、

Lbは、2価の基であり、

C1は、生体直交性官能基、または生体直交性官能基以外の基である。〕のいずれか一つで表される、〔2〕～〔15〕、〔18〕～〔20〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔22〕前記Lbが、下記式(Lb')：

〔化21〕

20



〔式中、

pは、0～10の任意の整数であり、

qは、0～10の任意の整数であり、

Xは、炭素原子、窒素原子、または単結合（ここで、Xが窒素原子である場合、R1bは存在しない。Xが単結合である場合、R1aおよびR1bは存在しない）であり、

30

R1a、およびR1bは、同一または異なって、水素原子、または上述する置換基からなる群より選ばれる。

○（白丸）は、C1に対する結合を示し、●（黒丸）はBに対する結合を示す。〕で表される、〔21〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔23〕生体直交性官能基を含む2価の基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、テトラジン残基、ニトロソ残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル基、α-ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基を主鎖に含む2価の基である、〔1〕～〔22〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

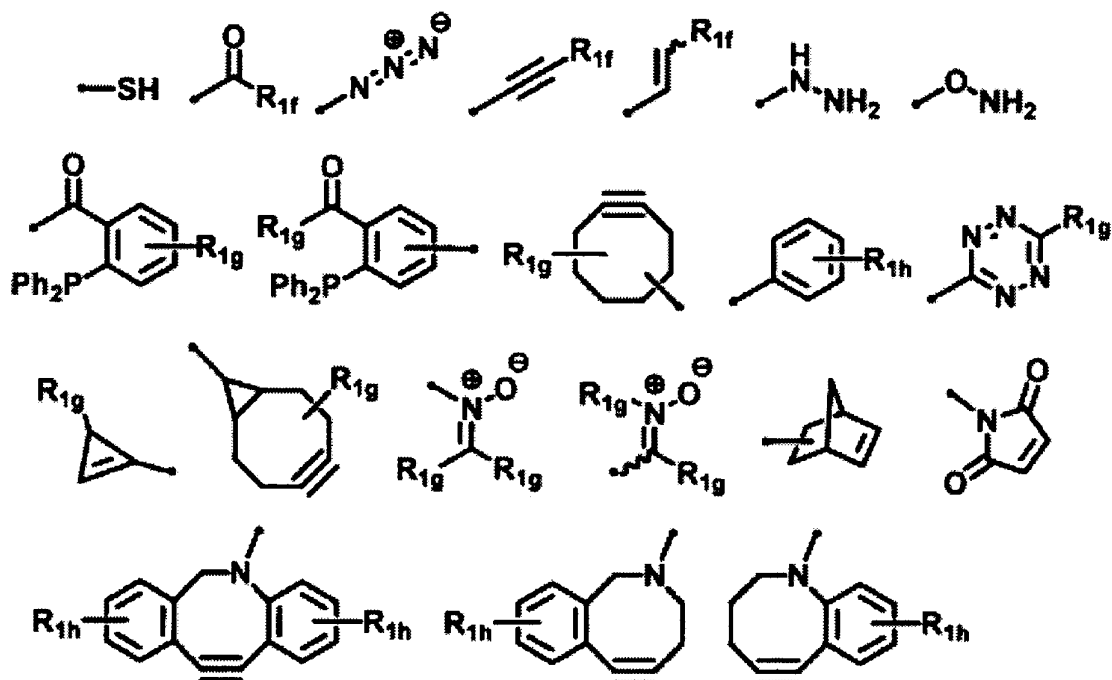
40

〔24〕生体直交性官能基を含む2価の基が、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロソ残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、α-ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基を側鎖に含む2価の基である、〔1〕～〔22〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔25〕生体直交性官能基が、下記：

50

【化 2 2】



10

20

〔式中、

R_{1f} 、単一もしくは複数の R_{1g} および単一もしくは複数の R_{1h} は、同一もしくは異なって、前記 (i) ~ (vii) からなる群より選ばれる原子もしくは基、または電子吸引基であり、

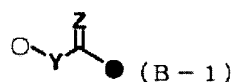
・は、結合手である。) で表されるいずれか一つである、〔1〕~〔24〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔26〕前記 (b) の 2 価の基が、置換されていてもよいアルキレン、置換されていてもよいシクロアルキレン、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよい 2 価の複素環基、 $-NR_a-$ (R_a は水素原子、または置換基を示す)、 $-O-$ 、またはこれらの 2 以上の組み合わせからなる群より選ばれる、〔1〕~〔25〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

30

〔27〕B が、下記式 (B-1) :

【化 2 3】



〔式中、

Y は、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、または下記式 (B-2) :

40

【化 2 4】



〔式中、

V および V' は、同一または異なって、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、または単結合であり、

V1 は、生体直交性官能基を含む 2 価の基であり、

s は、0 ~ 10 の任意の整数であり、

50

式（B-2）における○および●は、それぞれ、式（B-1）における○および●と同じ配向である。）であり、

Zは、酸素原子、硫黄原子、または水素原子（Zが水素原子である場合、 $-C(=Z)-$ は、 $-CH_2-$ を示す。）であり、

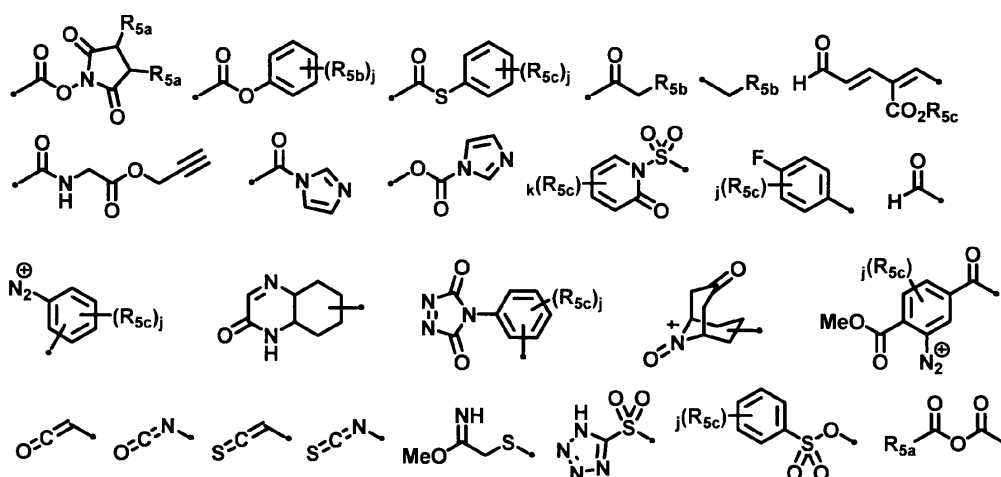
式（B-1）における○（白丸）は、L側の部分に対する結合を示し、●（黒丸）はR側の部分に対する結合を示す。）で表される、〔2〕～〔15〕、〔18〕～〔26〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔28〕反応性基が、リジン残基、チロシン残基、またはトリプトファン残基のいずれか一つの側鎖に対して特異的な反応性基である、〔2〕～〔15〕、〔18〕～〔27〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔29〕反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔2〕～〔15〕、〔18〕～〔28〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔30〕反応性基が、下記：

〔化25〕



〔ここで、

R_{5a}およびR_{5c}は、前記（i）～（vii）からなる群より選ばれる原子または基であり、

R_{5b}は、電子吸引基であり、

jは、1～5の任意の整数であり、

kは、1～4の任意の整数である。）からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する、〔2〕～〔15〕、〔18〕～〔29〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔31〕機能性物質および特定のアミノ酸残基の側鎖を連結する主鎖の原子数が2～10個であるリンカーを介して生体直交性官能基が可溶性タンパク質に結合している、〔1〕～〔30〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔32〕機能性物質および特定のアミノ酸残基の側鎖を連結する主鎖が環構造を含まないリンカーを介して生体直交性官能基が可溶性タンパク質に結合している、〔1〕～〔31〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔33〕L1末端部分およびR'を連結する主鎖の原子数が2～10個である、〔2〕～〔15〕、〔18〕～〔32〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

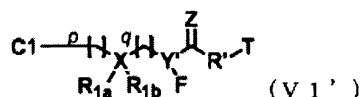
〔34〕AおよびRを連結する主鎖が環構造を含まない、〔2〕～〔15〕、〔18〕～〔33〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔35〕L1-Bで表される部分構造がペプチド部分を含まない、〔2〕～〔15〕、〔18〕～〔34〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔36〕前記式（V1）、（V2）および（V3）で表される、機能性物質を位置選択的

に有する可溶性タンパク質またはその塩が、それぞれ、下記（V 1'）、（V 2'）および（V 3'）：

【化 2 6】



〔式中、

C 1 は、生体直交性官能基、または生体直交性官能基以外の基である。

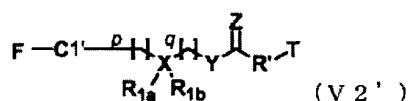
p、q、X、R_{1a}およびR_{1b}は、前記式（L b'）のものと同一であり、

Y' は、前記式（B - 1）の Y から水素原子を一つ除いた残基であり、

Z は、前記式（B - 1）のものと同一であり、

F、R' および T は、前記式（V）のものと同一である。〕、

【化 2 7】



〔式中、

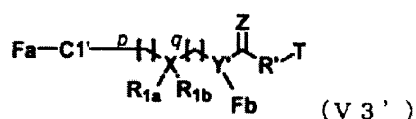
C 1' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分である。

p、q、X、R_{1a}およびR_{1b}は、前記式（L b'）のものと同一であり、

Y および Z は、前記式（B - 1）のものと同一であり、

F、R' および T は、前記式（V）のものと同一である。〕、あるいは

【化 2 8】



〔式中、

C 1' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分である。

p、q、X、R_{1a}およびR_{1b}は、前記式（L b'）のものと同一であり、

Y' は、前記式（B - 1）の Y から水素原子を一つ除いた残基であり、

Z は、前記式（B - 1）のものと同一であり、

F a および F b は、同一または異なる機能性物質であり、

R' および T は、前記式（V）のものと同一である。〕で表される、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である、〔2〕～〔15〕、〔18〕～〔35〕のいずれかの可溶性タンパク質またはその塩。

〔37〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であって、

可溶性タンパク質が、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含み、かつ

機能性物質が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、前記標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合しており、

機能性物質がリジン残基の側鎖を介して可溶性タンパク質に結合しており、

可溶性タンパク質が、複数の重鎖を含む抗体であり、

抗体に含まれる複数の重鎖中の前記位置に存在する複数の特定のアミノ酸残基において

10

20

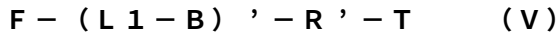
30

40

50

機能性物質を有する結果、抗体が複数の機能性物質を有する、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔38〕下記式（V）：



〔式中、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

(L1 - B)'で表される構造単位は、機能性物質と、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分を含む2価の構造単位であり、

Fは、機能性物質であり、

R'は、抗体のリジン残基と、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、抗体であり、

抗体は、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む。)で表され、かつF - (L1 - B)' - R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩。

〔39〕前記可溶性タンパク質またはその塩が、下記式（V1）：



〔式中、

L1、F、R'およびTは、前記式（V）のものと同じであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基である。)で表され、かつL1 - B' - (F) - R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である、〔38〕の可溶性タンパク質またはその塩。

〔40〕前記可溶性タンパク質またはその塩が、下記式（V2）：

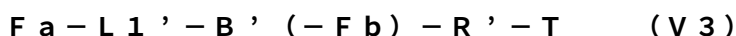


〔式中、

F、B、R'およびTは、前記式（V）のものと同じであり、

L1'は、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基である。)で表され、かつF - L1' - B - R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、あるいは

下記式（V3）：



〔式中、

R'およびTは、前記式（V）のものと同じであり、

L1'は、前記式（V2）のものと同じであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

FaおよびFbは、それぞれ、同一または異なる機能性物質である。)で表され、かつFa - L1' - B' - (Fb) - R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合し

ている、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である、〔38〕の可溶性タンパク質またはその塩。

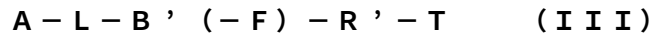
〔0023〕

(機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法)

本発明はまた、上記〔1〕～〔40〕の可溶性タンパク質のうち、式(V)またはその下位の式による特定を要する、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

〔41〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

下記式(III)：



〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

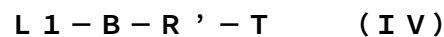
Fは、機能性物質であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む。)で表され、かつA-L-B'-(F)-R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、あるいは

下記式(IV)：



〔式中、

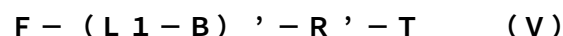
L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む可溶性タンパク質である。)で表され、かつA-L-B'-(F)-R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、

下記式(V)：



〔式中、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

(L1-B)'で表される構造単位は、機能性物質と、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分を含む2価の構造単位であり、

10

20

30

40

50

F は、機能性物質であり、

R' および T は、前記式 (I I I) または (I V) のものと同じである。) で表され、かつ F - (L 1 - B)' - R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む方法。

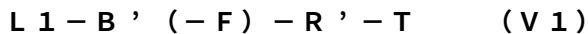
【0024】

好ましくは、上記〔41〕の方法は、以下であってもよい。

〔42〕前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、

10

下記式 (V 1) :



〔式中、

L1 は、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または (i i') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基であり、

B'、F、R' および T は、前記式 (I I I) のものと同じである。) で表され、かつ L1 - B' - (F) - R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む方法である、〔41〕の方法。

20

〔43〕前記生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を、1 種または 2 種の機能性物質と反応させて、

下記式 (V 2) :



〔式中、

B、R' および T は、前記式 (I V) のものと同じであり、

L1' は、機能性物質と、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

F は、機能性物質である。) で表され、かつ F - L1' - B - R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質、または

30

下記式 (V 3) :



〔式中、

R' および T は、前記式 (I V) のものと同じであり、

L1' は、前記式 (V 2) のものと同じであり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

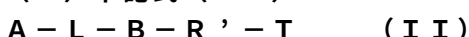
Fa および Fb は、それぞれ、同一または異なる機能性物質である。) で表され、かつ Fa - L1' - B' - (Fb) - R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む方法である、〔41〕の方法。

40

〔44〕可溶性タンパク質が抗体であり、反応性基が、リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である、〔41〕～〔43〕のいずれかの方法。

〔45〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

(A) 下記式 (I I) :



50

〔式中、

A は、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

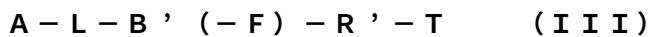
B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基であり、

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、連続する 1～50 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を 5 個以上含む。〕で表され、かつ A-L-B-R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合している、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式 (I I I) :



〔式中、

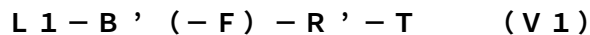
A、L、R' および T は、前記式 (I I) のものと同じであり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む 2 価の基であり、

F は、機能性物質である。〕で表され、かつ A-L-B'(-F)-R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合している、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に有する複合体またはその塩を生成すること、ならびに

(B) 前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 (V 1) :



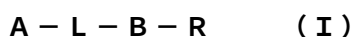
〔式中、

L1 は、(i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基、または (i i') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基であり、

B'、F、R' および T は、前記式 (I I I) のものと同じである。〕で表され、かつ L1-B'(-F)-R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔46〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

(A) 下記式 (I) :



〔式中、

A は、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

L は、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであり、

B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基であり、

R は、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を位置選択的に有する化合物またはその塩を、可溶性タンパク質(ここで、可溶性タンパク質は、連続する 1～50 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を 5 個以上含む。)と反応させて、

10

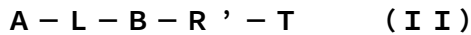
20

30

40

50

下記式 (I I) :



〔式中、

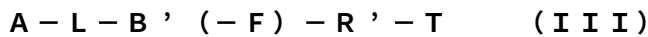
A、L、およびBは、前記式 (I) のものと同じであり

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

T は、可溶性タンパク質である。〕で表され、かつA-L-B-R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、

(B) 前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を、機能性物質と反応させて、

下記式 (I I I) :



〔式中、

AおよびLは、前記式 (I) のものと同じであり、

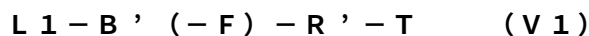
R' およびTは、前記式 (I I) のものと同じであり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

Fは、機能性物質である。〕で表され、かつA-L-B'(-F)-R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に有する複合体またはその塩を生成すること、ならびに

(C) 前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を位置選択的に有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 (V 1) :



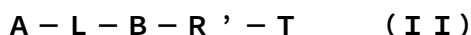
〔式中、

L1は、(i') 生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii') 生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

B'、F、R' およびTは、前記式 (I I I) のものと同じである。〕で表され、かつL1-B'(-F)-R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔47〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

(A) 下記式 (I I) :



〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または(b) 生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、連続する1~50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む。〕で表され、かつA-L-B-R' で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残

10

20

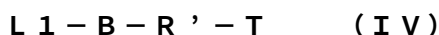
30

40

50

基に対して30%以上の位置選択性で結合している、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式 (I V) :



〔式中、

B、R'およびTは、前記式 (I I) のものと同じであり、

L1は、(i') 生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii') 生体直交性官能基を含まない1価の基である。) で表され、かつL1-B-R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、ならびに

(B) 前記生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を、1種または2種以上の機能性物質と反応させて、

下記式 (V 2)



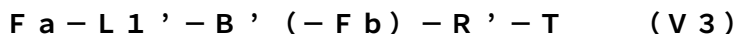
〔式中、

B、R'およびTは、前記式 (I V) のものと同じであり、

L1'は、機能性物質と、(i') 生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

Fは、機能性物質である。) で表され、かつF-L1'-B-R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、または

下記式 (V 3) :



〔式中、

R'およびTは、前記式 (I V) のものと同じであり、

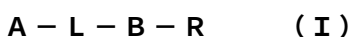
L1'は、前記式 (V 2) のものと同じであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

FaおよびFbは、それぞれ、同一または異なる機能性物質である。) で表され、かつFa-L1'-B'(-Fb)-R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

〔48〕機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法であって、

(A) 下記式 (I) :



〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または(b) 生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

Rは、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。) で表される化合物またはその塩を、可溶性タンパク質(ここで、可溶性タンパク質は、連続する1~50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む。)と反応させて、

下記式 (I I) :

$A-L-B-R'-T$ (I I)

〔式中、

A、L、およびBは、前記式(I)のものと同一であり

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質である。〕で表され、かつ $A-L-B-R'$ で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、

(B) 前記可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の切断性部分を切断して、

下記式(I V)：

$L1-B-R'-T$ (I V)

〔式中、

B、R'およびTは、前記式(I I)のものと同一であり、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基である。〕で表され、かつ $L1-B-R'$ で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること、ならびに

(C) 前記生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を、1種または2種以上の機能性物質と反応させて、

下記式(V 2)：

$F-L1'-B-R'-T$ (V 2)

〔式中、

B、R'およびTは、前記式(I V)のものと同一であり、

L1'は、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

Fは、機能性物質である。〕で表され、かつ $F-L1'-B-R'$ で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、または

下記式(V 3)：

$Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T$ (V 3)

〔式中、

R'およびTは、前記式(I V)のものと同一であり、

L1'は、前記式(V 2)のものと同一であり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

FaおよびFbは、それぞれ、同一または異なる機能性物質である。〕で表され、かつ $Fa-L1'-B'(-Fb)-R'$ で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を生成することを含む、方法。

【発明の効果】

【0025】

(I) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する本発明の化合物またはその塩は、例えば、可溶性タンパク質の位置選択的な修飾に有用である。

(I I) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を(位置選択的に)有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩、(I I I) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を(位置選択的に)有する本

10

20

30

40

50

発明の複合体またはその塩、ならびに（ⅠⅤ）生体直交性官能基を（位置選択的に）有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、例えば、機能性物質を（位置選択的に）有する可溶性タンパク質またはその塩の調製のための中間体として有用である。

（Ⅴ）機能性物質を（位置選択的に）有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、例えば、医薬、または試薬（例、診断薬、研究用試薬）として有用である。特に、可溶性タンパク質が抗体である場合、機能性物質を（位置選択的に）有する本発明の抗体またはその塩は、これらの用途に適している。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1-1】図1-1は、本発明の化合物〔可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物：A-L-B-R（Ⅰ）〕による可溶性タンパク質（例、抗体）の位置選択的修飾のコンセプトを示す模式図（その1）である。まず、本発明の化合物は、可溶性タンパク質に対する親和性物質（A）を介して、抗体等の可溶性タンパク質（T）に会合する。次に、本発明の化合物は、反応性基（R）（図中では活性化エステル）を介して、親和性物質と可溶性タンパク質との会合部位の近傍に存在する標的領域中の特定のアミノ酸残基の側鎖（図中ではリジン残基の側鎖）と反応して、本発明の化合物と可溶性タンパク質とのコンジュゲート〔可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む構造単位を位置選択的に有する可溶性タンパク質：A-L-B-R'-T（ⅠⅠ）〕を生成する。

10

【図1-2】図1-2は、本発明の化合物による可溶性タンパク質（例、抗体）の位置選択的修飾のコンセプトを示す模式図（その2）である。リンカー（L）中の切断性部分の切断により、生体直交性官能基で位置特異的に修飾された可溶性タンパク質（例、抗体）が生成する。

20

【図1-3】図1-3は、本発明の化合物による可溶性タンパク質（例、抗体）の位置選択的修飾のコンセプトを示す模式図（その3）である。生体直交性官能基と機能性物質（例、薬物）との反応により、機能性物質で位置特異的に修飾された可溶性タンパク質（例、抗体）が生成する。

【図2】図2は、本発明の各発明の関連性を示す図である（塩については表記を省略）。反応（1）では、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物を可溶性タンパク質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質を生成する。反応（2）では、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質を機能性物質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体を生成する。反応（3）では、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体の切断性部分を切断して、機能性物質を有する可溶性タンパク質を生成する（このとき、親和性物質の含有部分が副産物として生成する）。反応（4）では、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を有する可溶性タンパク質の切断性部分を切断して、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質を生成する（このとき、親和性物質の含有部分が副産物として生成する）。反応（5）では、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質を機能性物質と反応させて、機能性物質を有する可溶性タンパク質を生成する。反応（2）および（5）は同様に行うことができる。反応（3）および（5）もまた、同様に行うことができる。

30

40

【図3】図3は、ペプチド試薬（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）で特異的に修飾された抗HER2 IgG抗体トラスツズマブのHIC-HPLC解析（検出：225 nm）を示す図である。サンプルについては以下の条件で反応させた。a：トラスツズマブ+ペプチド試薬 12等量（反応後Amicon 10Kにより溶媒置換）；b：トラスツズマブ+ペプチド試薬 12等量；c：トラスツズマブ+ペプチド試薬 6等量；d：トラスツズマブ原料；e：ペプチド試薬のみ；f：DMFのみ。

【図4】図4は、ペプチド試薬（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体

50

）で特異的に修飾された抗HER2 IgG抗体トラスツズマブのHIC-HPLC解析（検出：280 nm）を示す図である。サンプルについては、図1と同様の条件で反応させた。

【図5】図5は、ペプチド試薬（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）で特異的に修飾された抗CD20抗体リツキシマブのHIC-HPLC解析（検出：225 nm）を示す図である。サンプルについては以下の条件で反応させた。a：リツキシマブ+ペプチド試薬 12等量（反応後Amicon 10Kにより溶媒置換）；b：リツキシマブ+ペプチド試薬 12等量；c：リツキシマブ+ペプチド試薬 6等量；d：リツキシマブ原料；e：ペプチド試薬のみ；f：DMFのみ。

【図6】図6は、ペプチド試薬（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）で特異的に修飾された抗CD20抗体リツキシマブのHIC-HPLC解析（検出：280 nm）を示す図である。サンプルについては以下の条件で反応させた。a：リツキシマブ+ペプチド試薬 12等量（反応後Amicon 10Kにより溶媒置換）；b：リツキシマブ+ペプチド試薬 12等量；c：リツキシマブ+ペプチド試薬 6等量；d：リツキシマブ原料；e：ペプチド試薬のみ；f：DMFのみ。

【図7】図7は、トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化により得られる生成物のRP-HPLCによる解析（検出：225 nm、および280 nm）を示す図である。a：トラスツズマブ；b：トラスツズマブ+ペプチド試薬 6等量；c：トラスツズマブをDTTにより還元；d：buffer pH 8.0，抗体濃度72 μMでD，L-ジチオトレイトールにより還元；e：dをデヒドロアスコルビン酸により再酸化3時間後；f：dをデヒドロアスコルビン酸により再酸化24時間後。

【図8】図8は、（1）糖鎖をPNGaseで切断したトラスツズマブの重鎖のアミノ酸配列、（2）糖鎖をPNGaseで切断したIgG1 Fc領域のアミノ酸配列、および（3）トラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列を示す図である。

【図9】図9は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体（+146.004 Da）を含む、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK（配列番号5）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（m/z 998.14796、3価）を示す図である。

【図10】図10は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体（+146.004 Da）を含む、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK（配列番号5）のペプチドフラグメントのCIDスペクトルを示す図である。

【図11】図11は、トラスツズマブのGlu-C消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体（+146.004 Da）を含む、LLGGPSVFLFPPKPKD（配列番号6）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（m/z 929.49651、2価）を示す図である。

【図12】図12は、トラスツズマブのGlu-C消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体（+146.004 Da）を含む、LLGGPSVFLFPPKPKD（配列番号6）のペプチドフラグメントのCIDスペクトルを示す図である。

【図13】図13は、IgG1 Fcのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体（+146.004 Da）を含む、THTCPPCPAPEAE GAPSVFLFPPKPK（配列番号7）のペプチドフラグメントの（m/z 994.12546、3価）のMSスペクトルを示す図である。

【図14】図14は、IgG1 Fcのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体（+146.004 Da）を含む、THTCPPCPAPEAE GAPSVFLFPPKPK（配列番号7）のペプチドフラグメントのCIDスペクトルを示す図である。

10

20

30

40

50

【図15】図15は、IgG1 FcのGlu-C消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体（+146.004Da）を含む、GAPSVFLFPKPKKDTLMISRTP E（配列番号8）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（ m/z 892.12624、3価）を示す図である。

【図16】図16は、IgG1 FcのGlu-C消化によるリジン残基への修飾部位（ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体（+146.004Da）を含む、GAPSVFLFPKPKKDTLMISRTP E（配列番号8）のペプチドフラグメントのCIDスペクトルを示す図である。

【図17】図17は、トラスツズマブの重鎖中のFc領域、およびIgG1 Fc領域のコンセンサスアミノ酸配列（配列番号1）を示す図である。

【図18】図18は、修飾されたトラスツズマブ（IgG1）について同定されたアミノ酸配列および修飾を示す図である。グレー部分が同定されたアミノ酸配列である。また、アミノ酸配列の上部に同定された修飾が記されている。囲われた二箇所のリジン残基（E U n u m b e r i n gによる246位・248位）のみ位置選択的なアジド導入体の修飾が確認された。

【図19】図19は、トラスツズマブのアジド導入体の修飾部位を示す図である。PSMs（Peptide Spectrum Matches）とは、該当するペプチドと一致するスペクトルが観測された回数のことであり、多いほど確かさが上がる。シグナル強度に関するフィルターをかけることで（2）のように246位のリジン残基のみに修飾が同定されるようになった。（1）でのみ同定されている修飾部位はノイズの可能性が高いと考えられる。

【図20】図20は、トラスツズマブのアジド導入体の修飾部位を含むペプチドのCIDスペクトルを示す図である。図18において囲われた部分のペプチドのCIDスペクトルに対応する。理論値と一致する m/z を持つスペクトルが示されている。

【図21】図21は、CIDスペクトルが同定された b/y イオンを示す図である。図20において同定された b/y イオンが示されている。 $b25$ イオンが同定されていることから、E U n u m b e r i n gによる246位が修飾されている可能性が高いことが分かる。

【図22】図22は、修飾トラスツズマブの非修飾トラスツズマブとの面積値比較を示す図である。修飾が起こった部位に関しては非修飾ペプチドの面積値が小さくなるとの予測に基づき、非修飾トラスツズマブで得られた面積値と比較したところ、E U n u m b e r i n gによる246位・248位のリジン残基を含むペプチドでのみ有意に面積値が減少していた。

【図23】図23は、Q-TOFMSによる修飾トラスツズマブのDARの解析を示す図である。ピークの観測結果より、平均DARは2であった。

【図24】図24は、検索に用いたアミノ酸配列データを示す図である。脱糖鎖を行うことでトラスツズマブの重鎖の300残基目のNがDに変わることが知られているため、重鎖のアミノ酸配列については二種類を解析に使用した。

【図25】図25は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（アジド導入体（+254.102Da））を含む、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKKDTLMISR（配列番号40）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（実測値： m/z 979.49982、理論値：979.49975、4価）を示す図である。

【図26】図26は、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（アジド導入体（+254.102Da））を含む、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKKDTLMISR（配列番号40）のペプチドフラグメントのCIDスペクトルを示す図である。

【図27】図27は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果（検出波長：UV225nmまたはUV280nm）を示す図である（実施例16）。

10

20

30

40

50

【図28】図28は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例17）。

【図29】図29は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例18）。

【図30】図30は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例19）。

【図31】図31は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例20）。

【図32】図32は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例21）。

10

【図33】図33は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例22）。

【図34】図34は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例23）。

【図35】図35は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例24）。

【図36】図36は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例25）。

【図37】図37は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例26）。

20

【図38】図38は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例27）。

【図39】図39は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例28）。

【図40】図40は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例29）。

【図41】図41は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 2 5 n mまたはU V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例30）。

【図42】図42は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例31）。縦軸のA Uは、吸光度を示す（以降の図面において同様）。

30

【図43】図43は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例32）。

【図44】図44は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例33）。

【図45】図45は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例34）。

【図46】図46は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例35）。

【図47】図47は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例36）。

40

【図48】図48は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例37）。

【図49】図49は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例38）。

【図50】図50は、トラスツズマブの特異的修飾のH I C - U P L C解析の結果（検出波長：U V 2 8 0 n m）を示す図である（実施例39）。

【図51】図51は、実施例39のバインダーペプチドを用いて修飾したトラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるC a r b a m i d o m e t h y l化を受けたチオール導入体（+ 1 4 5 . 0 1 9 D a））を含む、V

50

VSVLTVLHQDWLNGKEYK（配列番号66）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（ m/z 791.74872、3価）を示す図である。

【図52】図52は、実施例39のバインダーペプチドを用いて修飾したトラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含む、VSVLTVLHQDWLNGKEYK（配列番号66）のペプチドフラグメントのCIDスペクトルを示す図である。

【図53】図53は、実施例39のバインダーペプチドを用いて修飾したトラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含む、EEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK（配列番号67）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（ m/z 886.93408、4価）を示す図である。

10

【図54】図54は、実施例39のバインダーペプチドを用いて修飾したトラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含む、EEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK（配列番号67）のペプチドフラグメントのCIDスペクトルを示す図である。

【図55】図55は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果（検出波長：UV280nm）を示す図である（実施例40）。

【図56】図56は、実施例40のバインダーペプチドを用いて修飾したトラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含む、FNWYVDGVEVHNAKTKPR（配列番号69）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（ m/z 769.04688、3価）を示す図である。

20

【図57】図57は、実施例40のバインダーペプチドを用いて修飾したトラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含む、FNWYVDGVEVHNAKTKPR（配列番号69）のペプチドフラグメントのCIDスペクトルを示す図である。

【図58】図58は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果（検出波長：UV280nm）を示す図である（実施例41）。

30

【図59】図59は、チオール導入体を用いて修飾したトラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含む、THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISIR（配列番号40）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（ m/z 952.23145、4価）を示す図である。

【図60】図60は、チオール導入体を用いて修飾したトラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含む、THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISIR（配列番号40）のペプチドフラグメントのCIDスペクトルを示す図である。

40

【図61】図61は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果（検出波長：UV280nm）を示す図である（実施例42）。

【図62】図62は、チオール導入体を用いて修飾したトラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含む、THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISIR（配列番号40）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（ m/z 952.22968、4価）を示す図である。

【図63】図63は、チオール導入体を用いて修飾したトラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl

50

y l化を受けたチオール導入体 (+145.019 Da)) を含む、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR (配列番号40) のペプチドフラグメントのCIDスペクトルを示す図である。

【図64】図64は、トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果 (検出波長: UV280 nm) を示す図である (実施例43)。

【図65】図65は、チオール導入体を用いて修飾したトラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位 (ヨードアセトアミドによるCarbamidomethylationを受けたチオール導入体 (+145.019 Da)) を含む、FNWYVDGVEVHNAKTKPR (配列番号69) のペプチドフラグメントのMSスペクトル (m/z 769.04529, 3価) を示す図である。

10

【図66】図66は、チオール導入体を用いて修飾したトラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位 (ヨードアセトアミドによるCarbamidomethylationを受けたチオール導入体 (+145.019 Da)) を含む、FNWYVDGVEVHNAKTKPR (配列番号69) のペプチドフラグメントのCIDスペクトルを示す図である。

【図67】図67は、ヒトIgG2抗体の特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果 (検出波長: UV280 nm) を示す図である (実施例2-2)。

【図68】図68は、ヒトIgG2抗体の特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果 (検出波長: UV280 nm) を示す図である (実施例43)。

【図69】図69は、ヒトIgG4抗体の特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果 (検出波長: UV280 nm) を示す図である (実施例2-2)。

20

【図70】図70は、ヒトIgG4抗体の特異的修飾のHIC-UPLC解析の結果 (検出波長: UV280 nm) を示す図である (実施例43)。

【発明を実施するための形態】

【0027】

1. 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩

1-1. 概要

本発明は、式(I)で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩を提供する。

30

A-L-B-R (I)

〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または(b) 生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

Rは、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕

【0028】

本発明に関連して提示される式(I)および他の式において、- (ハイフン) は、その両側に存在する2つの単位が共有結合していることを示す。したがって、式(I)では、Aは、Lと共有結合しており、Lは、AおよびBと共有結合しており、Bは、LおよびRと共有結合しており、Rは、Bと共有結合している。

40

【0029】

1-2. 可溶性タンパク質に対する親和性物質(A)

式(I)において、Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質である。親和性物質とは、標的に対して非共有結合による結合能を有する物質である。

【0030】

本発明で用いられる親和性物質は、分泌タンパク質とも呼称される可溶性タンパク質を標的とする。このような可溶性タンパク質としては、例えば、抗体、可溶性受容体、リガンド、アルブミン、エリスロポエチン(EPO)、血管内皮細胞増殖因子(Anti-V

50

E G F)、骨形成タンパク質、卵胞刺激ホルモン(F S H)、グルカゴン、顆粒状コロニー刺激因子、顆粒状マクロファージコロニー刺激因子、纖毛性ゴナドトロピン、インスリン、インターロイキン、インターフェロン、血小板由来成長因子(P D G F)、増殖因子(T G Fファミリー、F G Fファミリー)が挙げられる。可溶性タンパク質は、生体分子(例、糖)で修飾されたタンパク質(例、糖タンパク質)であっても、生体分子で未修飾のタンパク質であってもよい。

【0031】

親和性物質の標的である可溶性タンパク質はまた、天然由来タンパク質、または人工タンパク質である。

【0032】

天然由来タンパク質としては、例えば、生物およびウイルス由来のタンパク質が挙げられる。生物由来のタンパク質としては、例えば、哺乳動物、鳥類(例、ニワトリ)等の動物、昆虫、微生物、植物、菌類、および魚類由来のタンパク質が挙げられる。好ましくは、天然由来タンパク質は、哺乳動物由来のタンパク質である。哺乳動物としては、例えば、霊長類(例、ヒト、サル、チンパンジー)、齧歯類(例、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ)、愛玩動物(例、イヌ、ネコ)、家畜(例、ウシ、ブタ、ヤギ)、使役動物(例、ウマ、ヒツジ)が挙げられる。天然由来タンパク質は、より好ましくは、霊長類または齧歯類由来のタンパク質であり、さらにより好ましくは、本発明の臨床応用の観点から、ヒト由来のタンパク質である。ウイルス由来のタンパク質としては、例えば、インフルエンザウイルス(例、トリインフルエンザウイルス、ブタインフルエンザウイルス)、エイズウイルス、エボラウイルス、ファージウイルスが挙げられる。

【0033】

人工タンパク質としては、例えば、天然由来タンパク質の改変タンパク質(例、置換、欠失および挿入からなる群より選ばれる1以上のアミノ酸残基の変異が天然由来タンパク質に導入されたタンパク質)、融合タンパク質、および人工的に設計されたモノクローナル抗体が挙げられる。人工的に設計されたモノクローナル抗体としては、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、所定の糖鎖が付加された抗体(例、N型糖鎖結合コンセンサス配列等の糖鎖結合コンセンサス配列を有するように改変された抗体)、二重特異性抗体、s c F v抗体、F a b抗体、F (a b ')₂抗体、V H H抗体、F c領域タンパク質、F c融合タンパク質が挙げられる。

【0034】

親和性物質の標的である可溶性タンパク質はさらに、単量体タンパク質、または多量体(例、二量体、三量体、または四量体)タンパク質であってもよい。親和性物質の標的であるタンパク質が多量体タンパク質である場合、多量体タンパク質は、ホモ多量体、またはヘテロ多量体である。多量体タンパク質は、共有結合(例、ジスルフィド結合)を介して多量体を形成するタンパク質(例、ジスルフィド結合を介して、軽鎖および重鎖からなる単位が2つ連結している構造を有する抗体)であっても、非共有結合(すなわち、会合)を介して多量体を形成するタンパク質であってもよいが、共有結合を介して多量体を形成するタンパク質が好ましい。親和性物質の標的である多量体タンパク質としては、例えば、2価の抗体(例、I g G、I g D、I g E)、4価以上の抗体(例、I g A抗体、I g M抗体)、アルブミンが挙げられる。

【0035】

親和性物質の標的である可溶性タンパク質はまた、任意のアミノ酸残基から構成されていてもよいが、好ましくは、タンパク質を通常構成する天然の20種のL- α -アミノ酸残基から構成される。このようなアミノ酸残基としては、例えば、L-アラニン(A)、L-アスパラギン(N)、L-システイン(C)、L-グルタミン(Q)、L-イソロイシン(I)、L-ロイシン(L)、L-メチオニン(M)、L-フェニルアラニン(F)、L-プロリン(P)、L-セリン(S)、L-スレオニン(T)、L-トリプトファン(W)、L-チロシン(Y)、L-バリン(V)、L-アスパラギン酸(D)、L-グルタミン酸(E)、L-アルギニン(R)、L-ヒスチジン(H)、またはL-リジン(K

）、及びグリシン（G）が挙げられる（以下、Lの表記を省略）。可溶性タンパク質は、例えば100個以上、好ましくは120個以上、より好ましくは150個以上、さらにより好ましくは180個以上、特に好ましくは200個以上のアミノ酸残基から構成されていてもよい。可溶性タンパク質はまた、例えば1000個以下、好ましくは900個以下、より好ましくは800個以下、さらにより好ましくは700個以下、特に好ましくは600個以下であってもよい。より具体的には、可溶性タンパク質は、例えば100～1000個、好ましくは120～900個、より好ましくは150～800個、さらにより好ましくは180～700個以上、特に好ましくは200～600個のアミノ酸残基から構成されていてもよい。可溶性タンパク質が抗体（例、上述したような人工的に設計されたモノクローナル抗体）である場合、上記個数のアミノ酸残基は、抗体の重鎖のアミノ酸残基に相当するものであってもよい。

10

【0036】

親和性物質の標的である可溶性タンパク質はさらに、後述するような反応性基が反応できる側鎖または末端（N末端および/またはC末端）、好ましくは側鎖を有する特定のアミノ酸残基を1つの位置または複数の位置（好ましくは複数の位置）で含むタンパク質である。このような特定のアミノ酸残基としては、例えば、後述するような14種のアミノ酸残基が挙げられるが、好ましくは、リジン残基、チロシン残基、トリプトファン残基、およびシステイン残基からなる群より選ばれるアミノ酸残基である。本発明の化合物が可溶性タンパク質を位置選択的に修飾できることに鑑みると、このような特定のアミノ酸残基を複数の位置で含む可溶性タンパク質が好ましい。複数の位置としては、2以上の位置である限り特に限定されないが、例えば3以上の位置、好ましくは5以上の位置、より好ましくは10以上の位置、さらにより好ましくは20以上の位置、特に好ましくは30以上の位置であってもよい。複数の位置はまた、例えば200以下の位置、好ましくは180以下の位置、より好ましくは150以下の位置、さらにより好ましくは120以下の位置、特に好ましくは100以下の位置であってもよい。より具体的には、複数の位置は、例えば3～200の位置、好ましくは5～180の位置、より好ましくは10～150の位置、さらにより好ましくは20～120の位置、特に好ましくは30～100の位置であってもよい。このような特定のアミノ酸残基を複数の位置で含む可溶性タンパク質であっても、本発明の化合物は、特定の一の位置に存在する特定のアミノ酸残基を位置選択的に修飾することができる。例えば、ヒトIgG1のリジン残基数は、可変領域中のアミノ酸組成にもよるが、一般的には70～90個程度と言われている。本発明では、このようなヒトIgG1の特定の位置に存在するリジン残基を位置選択的に修飾することに成功している。

20

30

【0037】

より具体的には、本発明では、抗体等のタンパク質の機能を維持しつつ（すなわち、タンパク質を変性させずにネイティブなフォールディングを維持しつつ）、タンパク質中の特定の位置に存在するアミノ酸残基を修飾する観点から、タンパク質の表面に露出しているアミノ酸残基の位置選択的な修飾が好ましい。例えば、ヒトIgG1等のヒトIgGでは、露出リジン残基および露出チロシン残基は、以下の位置に存在する（EUNumberingによる；http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IgHNumber.htmlを参照）。

40

（1）露出リジン残基

CH2ドメイン（246位、248位、274位、288位、290位、317位、320位、322位、338位）

CH3ドメイン（360位、414位、439位）

（2）露出チロシン残基

CH2ドメイン（278位、296位、300位）

CH3ドメイン（436位）

したがって、ヒトIgG1等のヒトIgGがリジン残基またはチロシン残基で修飾される場合、上記位置での修飾が好ましい。

50

【0038】

好ましくは、ヒトIgG1等のヒトIgGがリジン残基またはチロシン残基で修飾される場合、上記(1)および(2)の位置のなかでも、表面への露出性が高い以下の位置に存在するリジン残基またはチロシン残基が修飾されてもよい。

(1') 露出リジン残基

CH2ドメイン(246位、248位、274位、288位、290位、317位、320位、322位)

CH3ドメイン(360位、414位、439位)

(2') 露出チロシン残基

CH2ドメイン(278位、296位、300位)

CH3ドメイン(436位)

したがって、ヒトIgG1等のヒトIgGがリジン残基またはチロシン残基で修飾される場合、上記位置での修飾がより好ましい。

【0039】

より好ましくは、ヒトIgG1等のヒトIgGがリジン残基で修飾される場合、上記(1)の位置のなかでも、本発明において効率的に修飾することができるCH2ドメイン中の所定の位置(例、246位、248位、288位、290位、317位)に存在するリジン残基が修飾されてもよい。

【0040】

特定の実施形態では、親和性物質の標的である可溶性タンパク質は、上述したように特定のアミノ酸残基を複数の位置で含む場合、連続する1~50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において特定のアミノ酸残基を5個以上含むものであってもよい。標的領域は、好ましくは1~30個、より好ましくは1~20個、さらにより好ましくは1~10個、1~5個、または1~3個(すなわち、1個、2個、もしくは3個)のアミノ酸残基からなるものであってもよい。特に好ましくは、標的領域は、特定の位置に存在する特定のアミノ酸残基からなる領域であってもよい。このような特定の位置は、標的タンパク質および親和性物質の種類などによっても変動するが、例えば、抗体の定常領域中の特定領域(例、CH1、CH2、CH3)中の特定の位置であってよく、好ましくは抗体のCH2中の位置であってよい。より具体的には、標的領域は、ヒトIgG FcにおけるE u n n u m b e r i n g に従う下記残基であってよい：

(1) L y s 2 4 8 残基(以下、本明細書では単に「L y s 2 4 8」とも表記し、ヒトIgG CH2領域(配列番号1)の18番目の残基に相当する)またはL y s 2 4 6 残基(以下、本明細書では単に「L y s 2 4 6」とも表記し、ヒトIgG CH2領域(配列番号1)の16番目の残基に相当する)

：

(2) L y s 2 8 8 残基(以下、本明細書では単に「L y s 2 8 8」とも表記し、ヒトIgG CH2領域(配列番号1)の58番目の残基に相当する)またはL y s 2 9 0 残基(以下、本明細書では単に「L y s 2 9 0」とも表記し、ヒトIgG CH2領域(配列番号1)の60番目の残基に相当する)；

(3) L y s 3 1 7 残基(以下、本明細書では単に「L y s 3 1 7」とも表記し、ヒトIgG CH2領域(配列番号1)の87番目の残基に相当する)。

【0041】

本発明によれば、上記標的領域における特定のアミノ酸残基を高度に位置選択的に修飾することができる。このような位置選択性は、例えば30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらにより好ましくは60%以上、特に好ましくは70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または100%以上であってよい。

【0042】

標的領域はまた、特定の位置に存在する特定のアミノ酸残基が、当該特定の位置を中心

10

20

30

40

50

としてそれぞれN末端側およびC末端側に対してa個（ここで、aは、1～10の任意の整数である）のアミノ酸残基の遠隔位置までの領域において、当該特定の位置に存在する特定のアミノ酸残基以外に、特定のアミノ酸残基と同種のアミノ酸残基を含まないものであってもよい。aは、好ましくは1～5の整数であり、より好ましくは1～3の整数であり、さらにより好ましくは1または2であり、特に好ましくは1である。

【0043】

好ましい実施形態では、可溶性タンパク質に対する親和性物質は、抗体に対する親和性物質である。抗体は、ポリクローナル抗体、またはモノクローナル抗体である。抗体のアイソタイプとしては、例えば、IgG（例、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、IgM、IgA、IgD、IgE、およびIgYが挙げられる。抗体は、全長抗体、または抗体断片（例、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、単鎖抗体）であるが、全長抗体が好ましい。

10

【0044】

抗体は、任意の抗原に対する抗体である。例えば、このような抗原は、上述したような生物またはウイルスにおいて見出される成分であってもよい。このような抗原としてはまた、例えば、タンパク質（オリゴペプチド、ポリペプチドを含む。糖等の生体分子で修飾されたタンパク質（例、糖タンパク質）であってもよい）、糖鎖、核酸、低分子化合物が挙げられる。

【0045】

好ましくは、抗体は、タンパク質を抗原とする抗体であってもよい。タンパク質としては、例えば、細胞膜受容体、細胞膜受容体以外の細胞膜タンパク質（例、細胞外基質タンパク質）、リガンド、可溶性受容体が挙げられる。

20

【0046】

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

【0047】

(1) がん領域

PD-L1、GD2、PDGFR α （血小板由来成長因子受容体）、CD22、HER2、ホスファチジルセリン（PS）、EpCAM、フィブロネクチン、PD-1、VEGFR-2、CD33、HGF、gpNMB、CD27、DEC-205、葉酸受容体、CD37、CD19、Trop2、CEACAM5、S1P、HER3、IGF-1R、DLL4、TNT-1/B、CPAAs、PSMA、CD20、CD105（エンドグリン）、ICAM-1、CD30、CD16A、CD38、MUC1、EGFR、KIR2DL1, 2、, NKG2A、tenascin-C、IGF（Insulin-like growth factor）、CTLA-4、mesothelin、CD138、c-Met、Ang2、VEGF-A、CD79b、ENPD3、葉酸受容体 α 、TEM-1、GM2、グリピカン3、macrophage inhibitory factor、CD74、Notch1、Notch2、Notch3、CD37、TLR-2、CD3、CSF-1R、FGFR2b、HLA-DR、GM-CSF、EphA3、B7-H3、CD123、gpA33、Frizzled7受容体、DLL4、VEGF、RSP、LIV-1、SLITRK6、Nectin-4、CD70、CD40、CD19、SEMA4D（CD100）、CD25、MET、Tissue Factor、IL-8、EGFR、cMet、KIR3DL2、Bst1（CD157）、P-カドヘリン、CEA、GITR、TAM（tumor associated macrophage）、CEA、DLL4、Ang2、CD73、FGFR2、CXCR4、LAG-3、GITR、Fucosyl GM1、IGF-1、Angiopoietin 2、CSF-1R、FGFR3、OX40、BCMA、ErbB3、CD137（4-1BB）、PTK7、EFNA4、FAP、DR5、CEA、Ly6E、CA6、CEACAM5、LAMP1、tissue factor、EPHA2、DR5、B7-H3、FGFR4、FGFR2、 α 2-PI、A33、GDF15、CAIX、CD166、ROR1、GIT

30

40

50

R、BCMA、TBA、LAG-3、EphA2、TIM-3、CD-200、EGFRvIII、CD16A、CD32B、PIGF、Axl、MICA/B、Thomsen-Friedenreich、CD39、CD37、CD73、CLEC12A、Lgr3、トランスフェリン受容体、TGFβ、IL-17、5T4、RTK、Immune Suppressor Protein、NaPi2b、ルイス血液型B抗原、A34、Lysil-Oxidase、DLK-1、TROP-2、α9インテグリン、TAG-72 (CA72-4)、CD70

【0048】

(2) 自己免疫疾患・炎症性疾患

IL-17、IL-6R、IL-17R、INF-α、IL-5R、IL-13、IL-23、IL-6、ActRIIB、β7-Integrin、IL-4αR、HAS、Eotaxin-1、CD3、CD19、TNF-α、IL-15、CD3ε、Fibronectin、IL-1β、IL-1α、IL-17、TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin)、LAMP (Alpha4 Beta 7 Integrin)、IL-23、GM-CSFR、TSLP、CD28、CD40、TLR-3、BAFF-R、MAdCAM、IL-31R、IL-33、CD74、CD32B、CD79B、IgE (免疫グロブリンE)、IL-17A、IL-17F、C5、FcRn、CD28、TLR4、MCAM、B7RP1、CXCR1, 2 Ligands、IL-21、Cadherin-11、CX3CL1、CCL20、IL-36R、IL-10R、CD86、TNF-α、IL-7R、Kv1.3、α9インテグリン、LI

【0049】

(3) 脳神経疾患

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

【0050】

(4) 感染症

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

【0051】

(5) 遺伝性・希少疾患

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

【0052】

(6) 眼疾患

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

【0053】

(7) 骨・整形外科領域

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

【0054】

(8) 血液疾患

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

【0055】

(9) その他の疾患

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

【0056】

より好ましい実施形態では、可溶性タンパク質に対する親和性物質は、モノクローナル抗体に対する親和性物質である。モノクローナル抗体のアイソタイプは、抗体について上述したものと同様であるが、IgG (例、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) が好ましい。好ましくは、モノクローナル抗体は、全長モノクローナル抗体である。

【0057】

さらにより好ましい実施形態では、可溶性タンパク質に対する親和性物質は、全長モノクローナル抗体であるキメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体 (例、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のIgG) に対する親和性物質である。

【0058】

特に好ましい実施形態では、可溶性タンパク質に対する親和性物質は、下記 (A) ~ (C) からなる群より選ばれるいずれか一つのFc領域タンパク質を含み、かつ抗原結合能を有する抗体に対する親和性物質である：

(A) 配列番号1のアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質；

(B) 配列番号1のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸残基が挿入、付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質；または

(C) 配列番号1のアミノ酸配列と90%以上の同一性を示すアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質。

【0059】

配列番号1のアミノ酸配列は、Fc領域タンパク質である。このようなFc領域タンパク質は、分泌能を有することが知られている。したがって、上記 (A) ~ (C) のFc領域タンパク質は、分泌能を有することができる。また、このようなFc領域タンパク質を含む抗体は、抗原結合能を有することができる。配列番号1における18位のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であるが、好ましくは中性アミノ酸残基であり、より好ましくは後述するような非極性側鎖を有するアミノ酸残基であり、さらにより好ましくはロイシン、イソロイシンまたはアラニンであり、特に好ましくはロイシンまたはアラニンである。配列番号1における19位のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であるが、好ましくは中性アミノ酸残基または酸性アミノ酸残基であり、より好ましくは非極性側鎖を有するアミノ酸残基または酸性アミノ酸残基であり、さらにより好ましくはロイシンまたはグルタミン酸である。配列番号1における21位のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であるが、好ましくは中性アミノ酸残基であり、より好ましくは非極性側鎖を有するアミノ酸残基であり、さらにより好ましくはグリシンまたはアラニンである。配列番号1における140位のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であるが、好ましくは酸性アミノ酸残基であり、より好ましくはグルタミン酸またはアスパラギン酸である。配列番号1における142位のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であるが、好ましくは中性アミノ酸残基であり、より好ましくは非極性側鎖を有するアミノ酸残基であり、さらにより好ましくはメチオニン、ロイシンまたはイソロイシンであり、特に好ましくはメチオニンまたはロイシンである。配列番号1における177位のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基であるが、好ましくは中性アミノ酸残基であり、より好ましくは後述するような非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸残基または非極性側鎖を有するアミノ酸残基であり、さらにより好ましくはスレオニン、アラニンまたはグリシンであり、特に好ましくはスレオニンまたはアラニンである。

10

20

30

40

50

【0060】

好ましい実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列は、配列番号2または配列番号41のアミノ酸配列における220～449位のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列であってもよい。

【0061】

別の好ましい実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列は、配列番号3のアミノ酸配列における7～236位のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列であってもよい。

【0062】

特定の実施形態では、上述したようなアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質を含む抗体は、上述したようなアミノ酸配列を含むFc領域タンパク質、および抗体の定常領域を含む抗体であってもよい。このような抗体の定常領域としては、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体（例、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のIgG）の定常領域であってもよい。

【0063】

Fc領域タンパク質（B）では、アミノ酸残基の欠失、置換、付加および挿入からなる群より選ばれる1、2、3または4種の変異により、1個または数個のアミノ酸残基が改変され得る。アミノ酸残基の変異は、アミノ酸配列中の1つの領域に導入されてもよいが、複数の異なる領域に導入されてもよい。用語「1個または数個」は、タンパク質の活性を大きく損なわない個数を示す。用語「1個または数個」が示す数は、例えば、1～100個、好ましくは1～80個、より好ましくは1～50個、1～30個、1～20個、1～10個または1～5個（例、1個、2個、3個、4個、または5個）である。

【0064】

Fc領域タンパク質（C）では、配列番号1のアミノ酸配列との同一性％は、70％以上、75％以上、80％以上、85％以上、90％以上、91％以上、92％以上、93％以上、94％以上、95％以上、96％以上、97％以上、98％以上または99％以上であってもよい。本発明では、ペプチドまたはポリペプチド（タンパク質）の同一性％の算出は、アルゴリズムblastpにより行うことができる。より具体的には、ポリペプチドの同一性の算定％は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) において提供されているアルゴリズムblastpにおいて、デフォルト設定のScoring Parameters (Matrix: BLOSUM62; Gap Costs: Existence=11 Extension=1; Compositional Adjustments: Conditional compositional score matrix adjustment) を用いて行うことができる。また、ポリヌクレオチド（遺伝子）の同一性％の算出は、アルゴリズムblastnにより行うことができる。より具体的には、ポリヌクレオチドの同一性％の算定は、NCBI において提供されているアルゴリズムblastnにおいて、デフォルト設定のScoring Parameters (Match/Mismatch Scores=1, -2; Gap Costs=Linear) を用いて行うことができる。

【0065】

分泌能における分泌は、分泌タンパク質の分泌（いわゆる可溶性）と同じ意味である。したがって、「分泌能を有する」とは、通常の抗体と同様に、可溶性タンパク質として機能することを意味する。

【0066】

上記Fc領域タンパク質を含む抗体は、目的の特性（例、分泌能、抗原結合能）を保持する限り、特定の部位に、変異が導入されていてもよい。目的の特性を保持し得る、変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置は、当業者に明らかである。具体的には、当業者は、1) 同種の特性を有する複数のタンパク質のアミノ酸配列を比較し、2) 相対的に保存されている領域、および相対的に保存されていない領域を明らかにし、次いで、3) 相対的に保存されている領域および相対的に保存されていない領域から、それぞれ、機能に

重要な役割を果たし得る領域および機能に重要な役割を果たし得ない領域を予測できるので、構造・機能の相関性を認識することができる。したがって、当業者は、上記Fc領域タンパク質を含む抗体のアミノ酸配列において変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置を特定できる。

【0067】

アミノ酸残基が置換により変異される場合、アミノ酸残基の置換は、保存的置換であってもよい。本明細書中で用いられる場合、用語「保存的置換」とは、所定のアミノ酸残基を、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換することをいう。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で周知である。例えば、このようなファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β位分岐側鎖を有するアミノ酸（例、スレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、ヒドロキシル基（例、アルコール性、フェノール性）含有側鎖を有するアミノ酸（例、セリン、スレオニン、チロシン）、および硫黄含有側鎖を有するアミノ酸（例、システイン、メチオニン）が挙げられる。好ましくは、アミノ酸の保存的置換は、アスパラギン酸とグルタミン酸との間での置換、アルギニンとリジンとヒスチジンとの間での置換、トリプトファンとフェニルアラニンとの間での置換、フェニルアラニンとバリンとの間での置換、ロイシンとイソロイシンとアラニンとの間での置換、およびグリシンとアラニンとの間での置換であってもよい。

【0068】

上記(A)～(C)からなる群より選ばれるいずれか一つのFc領域を含む抗体としては、例えば、キメラ抗体（例、リツキシマブ、バシリキシマブ、インフリキシマブ、セツキシマブ、シルツキシマブ、ディヌツキシマブ、オルタトキサシマブ）、ヒト化抗体（例、ダクリズマブ、パリビズマブ、トラスツズマブ、アレクツズマブ、オマリズマブ、エファリズマブ、ベバシズマブ、ナタリズマブ（IgG4）、トシリズマブ、エクリズマブ（IgG2）、モガムリズマブ、ペルツツマブ、オビヌツツマブ、ベドリズマブ、ペンプロリズマブ（IgG4）、メポリズマブ、エロツツマブ、ダラツムマブ、イケセキヅマブ（IgG4）、レスリズマブ（IgG4）、アテゾリズマブ）、ヒト抗体（例、アダリムマブ、パニツムマブ、ゴリムマブ、ウステキヌマブ、カナキヌマブ、オファツムマブ、デノスマブ（IgG2）、イピリムマブ、ベリムマブ、ラキシバクマブ、ラムシルマブ、ニボルマブ（IgG4）、セクキヌマブ、エボロクマブ（IgG2）、アリロクマブ、ネシツムマブ、プロダルマブ（IgG2）、オララツマブ）が挙げられる（IgGサブタイプに言及していない場合、IgG1であることを示す）。

【0069】

上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質としては、例えば、ペプチド（オリゴペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質を含む）、低分子化合物、核酸、核酸-ペプチド複合体、ペプチド-低分子化合物複合体、核酸-低分子複合体挙げられる。

【0070】

特定の実施形態では、上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質は、ペプチド（オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質を含む。糖タンパク質であってもよい）であってもよい。このようなペプチドとしては、例えば、以下が報告されている：

(1) ヒトIgG全般（すなわち、ヒトIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4。以下同様）の特定領域（CH2領域）に親和性を有するIgG結合ペプチド（例、国際公開第2016/186206号、国際公開2013/027796号、国際公開第2008/054030号を参照）；

(2) ヒトIgG全般の特定領域（CH2領域）に親和性を有するProtein A M

10

20

30

40

50

imetic (PAM) peptide (例、Fassina G et al., JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, 1996, VOL. 6, 564-569を参照) ;

(3) ヒトIgG全般の特定領域(CH2領域)に親和性を有するEPIHRSTLTALL (配列番号9) (例、Ehrlich G. K et al., J. Biochem. Biophys. Methods, 2001, VOL. 49, 443-454を参照) ;

(4) ヒトIgG全般の特定領域(Fc領域)に親和性を有する(NH2-Cys1-X1-X2-X3-X4)2-Lys-Gly-OH (例、Ruvo M et al., ChemBioChem, 2005, VOL. 6, 1242-1253を参照) ;

(5) ヒトIgG全般の特定領域(Fc領域)に親和性を有するFARLVSSIRY (配列番号10)、FGRLVSSIRY (配列番号11)、およびTWKTSRISIF (配列番号12) (例、Krook M et al., Journal of Immunological Methods, 1998, VOL. 221, 151-157を参照) ;

(6) ヒトIgG全般の特定領域に親和性を有するQSYYP (配列番号13) (例、Jacobs J. M. et al., Bio. Techniques, 2003, VOL. 34, 132-141を参照) ;

(7) ヒトIgG全般の特定領域(Fc領域)に親和性を有するHWRGWV (配列番号14)、HYFKFD (配列番号15)、およびHFRRHL (配列番号16) (例、Carbonell R. G. et al., Journal of Chromatography A, 2009, VOL. 1216, 910-918を参照) ;

(8) ヒトIgG全般の特定領域(Fc領域)に親和性を有するDAAG (配列番号17) (例、Lund L. N. et al., Journal of Chromatography A, 2012, VOL. 1225, 158-167を参照) ;

(9) ヒトIgG全般の特定領域(Fc領域)に親和性を有するFc-I、Fc-II、およびFc-III (例、Warren L. Delano et al., Science, 2000, VOL. 287, 1279-1283; 国際公開2001/045746号を参照) ; ならびに

(10) ヒトIgG全般の特定領域(Fc領域)に親和性を有するNARKFYKG (配列番号18)、およびNKFRGKYK (配列番号19) (例、Biochemical Engineering Journal, 2013, VOL. 79, 33-40を参照)。

【0071】

別の特定の実施形態では、上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質は、ペプチド以外の物質であってもよい。このような物質としては、例えば、ヒトIgG (例、ヒトIgG1~4) の特定領域(CH2領域、特にLys340の側鎖)に親和性を有するアプタマー〔例、GGUGCUおよびGGUGAU等のGGUG(C/A)(U/T)モチーフ含有アプタマー〕が報告されている(例、国際公開第2007/004748号公報; Nomura Y et al., Nucleic Acids Res., 2010 Nov; 38(21): 7822-9; Miyakawa S et al., RNA, 2008 Jun; 14(6): 1154-63を参照)。

【0072】

上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質は、当該分野における任意の公知の方法により得ることができる。例えば、可溶性タンパク質全体、または可溶性タンパク質中の部分ペプチド(例、タンパク質表面露出領域が判明している場合、当該領域中に存在する部分ペプチド)を用いて、抗体を作製することにより(例、ハイブリドーマ法)、または親和性物質を入手可能なライブラリ(例、ペプチドライブラリ、抗体ライブラリ、抗体産生細胞ライブラリ、アプタマーライブラリ、ファージライブラリ、mRNAライブラリ、cDNAライブラリ)から親和性物質をスクリーニングすることにより(例、ファージディスプレイ法、SELEX法、mRNAディスプレイ法、リボソームディスプレイ

法、cDNAディスプレイ法、酵母ディスプレイ法)、取得することができる。また、可溶性タンパク質に対する親和性物質が抗体のFc領域(可溶性領域)に対する親和性物質である場合、各種抗体(例、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE)のFc領域の特定領域(例、CH1、CH2、CH3)中に存在する部分ペプチドを用いることにより、抗体のFc領域中の任意の部分に対して選択的に結合することができる親和性物質(例、抗体、アプタマー)を効率的に取得することができる。このようにして取得される親和性物質のなかには、親和的結合能が相対的に強いものおよび弱いものが混在する。しかし、親和的結合能が弱い親和性物質であっても、過剰量で用いることにより、その親和的結合能を補強することができる。

【0073】

上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質は、下記式(i)で表されるIgG結合性ペプチドまたはその塩であってもよい(例、実施例および国際公開第2016/186206号)。

$$(X_{1-3})-C-(X_2)-H-(X_{aa1})-G-(X_{aa2})-L-V-W-C-(X_{1-3}) \quad (\text{配列番号94}) \quad (i)$$

〔式中、

Xは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cは、システイン残基であり、

Hは、ヒスチジン残基であり、

X_{aa1}は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Gは、グリシン残基であり、

X_{aa2}は、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、またはアスパラギン酸残基であり、

Lは、ロイシン残基であり、

Vは、バリン残基であり、かつ

Wは、トリプトファン残基である。〕

によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGおよび/またはウサギIgGと結合可能であるペプチドまたはその塩。

X_{aa1}およびX_{aa2}はそれぞれ異なるアミノ酸残基であることが好ましい。

【0074】

本明細書において、N末端またはC末端のX₁₋₃という表記は、システイン(CまたはCys)以外の独立的に任意のアミノ酸残基Xが1~3個連続していることを意味し、それを構成するアミノ酸残基は同じか、または異なる残基であるが、好ましくは3個すべてが同じ残基でない配列からなる。同様に、X₂もシステイン(CまたはCys)以外の独立的に任意のアミノ酸残基Xが2個連続していることを意味し、それを構成するアミノ酸残基は同じか、または異なる残基であるが、好ましくは当該2個連続しているアミノ酸残基は同じ残基でない配列からなる。後述するX₁もシステイン(CまたはCys)以外の独立的に任意のアミノ酸残基Xが1個存在することを意味する。

【0075】

また、本明細書において、ペプチドの各アミノ酸配列の中に離間した少なくとも2つのシステイン残基は、ジスルフィド結合により環状ペプチドを形成することができる。通常、上記式(i)等の式のペプチドにおいて、外側の2つのシステイン残基は、ジスルフィド結合している。あるいは、上記式(i)等の式のペプチドにおいて、外側の2つのシステイン残基中のスルフィド基は、以下で表されるカルボニル基含有リンカーにより連結されていてもよい。

【0076】

10

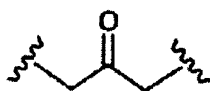
20

30

40

50

【化 29】



【0077】

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

10

【0078】

特定の実施形態では、上記式(i)の親和性物質は、下記式(i-1)で表されるIgG結合性ペプチドまたはその塩であってもよい(例、国際公開第2016/186206号)。

$(X_{1-3}) - C - (X_2) - H - (X_{aa1}) - G - (X_{aa2}) - L - V - W - C - (X_{1-3})$ (配列番号95) (i-1)

〔式中、

Xは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

20

Cは、システイン残基であり、

Hは、ヒスチジン残基であり、

X_{aa1}は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Gはグリシン残基であり、

X_{aa2}はグルタミン酸残基またはアスパラギン残基であり、

Lはロイシン残基であり、

Vはバリン残基であり、かつ

Wはトリプトファン残基である。〕

によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGおよび／またはウサギIgGと結合可能であるペプチドまたはその塩。

30

X_{aa1}およびX_{aa2}はそれぞれ異なるアミノ酸残基であることが好ましい。

【0079】

別の特定の実施形態では、上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質は、下記式(i-2)で表されるIgG結合性ペプチドまたはその塩であってもよい(例、実施例)。

$(X_{1-3}) - C - (X_2) - H - (X_{aa1}) - G - (X_{aa2}) - L - V - W - C - (X_{1-3})$ (配列番号96) (i-2)

〔式中、

Xは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

40

Cは、システイン残基であり、

Hは、ヒスチジン残基であり、

X_{aa1}は、アルギニン残基、またはロイシン残基であり、

Gは、グリシン残基であり、

X_{aa2}は、リジン残基、グルタミン残基、またはアスパラギン酸残基であり、

Lは、ロイシン残基であり、

Vは、バリン残基であり、かつ

Wは、トリプトファン残基である。〕によって表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGおよび／またはウサギIgGと結合可能であるペプチドまたはその塩。

50

このような特定の構造を有する国際公開第2016/186206号に未開示の親和性物質は、ヒトIgG FcにおけるEu numberingに従うLys248残基またはLys246残基、あるいはLys248残基またはLys246残基以外の他のアミノ酸残基の位置選択的な修飾に有用である（実施例）。

【0080】

式(i-1)のペプチドのアミノ酸配列においてアミノ酸残基Xをさらに特定した式(i-1')および式(i-1'')で表されるペプチドを以下に示す。

【0081】

すなわち、式(i-1')で表されるペプチドは、

(X₁₋₃) - C - (X1) - Y - H - (Xaa1) - G - N - L - V - W - C - (X₁₋₃) (配列番号97) (i-1')

10

〔式中、

Xは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cは、システイン残基であり、

Yは、チロシン残基であり、

Hは、ヒスチジン残基であり、

Xaa1は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Gは、グリシン残基であり、

Nは、アスパラギン残基であり、

20

Lは、ロイシン残基であり、

Vは、バリン残基であり、かつ

Wは、トリプトファン残基である。〕

で表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGおよび/またはウサギIgGと結合可能であることを特徴とする。

【0082】

式(i-1'')で表されるペプチドは、

(X₁₋₃) - C - A - (X1) - H - (Xaa1) - G - E - L - V - W - C - (X₁₋₃) (配列番号98) (i-1'')

30

〔式中、

Xは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cは、システイン残基であり、

Aは、アラニン残基であり、

Hは、ヒスチジン残基であり、

Xaa1は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Gは、グリシン残基であり、

Eは、グルタミン酸残基であり、

Lは、ロイシン残基であり、

Vは、バリン残基であり、かつ

40

Wは、トリプトファン残基である。〕

で表される、13~17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGおよび/またはウサギIgGと結合可能であることを特徴とする。

【0083】

また、式(i-1)のペプチドのアミノ酸配列においてアミノ酸残基Xをさらに特定した式(ii)で表されるペプチドを以下に示す。

【0084】

すなわち、式(ii)で表されるペプチドは、

(X₁₋₃) - C - (Xaa3) - (Xaa4) - H - (Xaa1) - G - (Xaa2) - L - V - W - C - (X₁₋₃) (配列番号99) (ii)

50

〔式中、

X は、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

C は、システイン残基であり、

H は、ヒスチジン残基であり、

X a a 1 は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、
2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

G は、グリシン残基であり、

X a a 2 は、グルタミン酸残基またはアスパラギン残基であり、

L は、ロイシン残基であり、

V は、バリン残基であり、

W は、トリプトファン残基であり、

X a a 3 は、アラニン残基、セリン残基またはスレオニン残基であり、かつ

X a a 4 は、チロシン残基またはトリプトファン残基である。〕

で表される、13～17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒト Ig G および／またはウサギ Ig G と結合可能であることを特徴とする。

【0085】

式(i)等の式のペプチドのアミノ酸配列において、17アミノ酸残基とした場合、N末端から1番目および2番目、ならびに16番目および17番目のアミノ酸残基Xは欠失していてもよく、そのようなペプチドは13アミノ酸長からなる。

【0086】

本明細書で使用する「17アミノ酸残基とした場合」とは、ペプチドのアミノ酸残基をアミノ酸番号で呼ぶときに、式(i)のペプチド等について最長のアミノ酸長である17残基のN末端から順番に1番目から17番目まで番号づけするために便宜的に表現した用語である。

【0087】

また、式(i-1)のペプチドのアミノ酸配列においてアミノ酸残基Xをさらに特定した式(iii)で表されるペプチドを以下に示す。

【0088】

すなわち、式(iii)で表されるペプチドは、

$(X_{1-3}) - C - A - Y - H - (X a a 1) - G - E - L - V - W - C - (X_{1-3})$
(配列番号100) (iii)

〔式中、

X は、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

C は、システイン残基であり、

A は、アラニン残基であり、

Y は、チロシン残基であり、

H は、ヒスチジン残基であり、

X a a 1 は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、
2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

G は、グリシン残基であり、

E は、グルタミン酸残基であり、

L は、ロイシン残基であり、

V は、バリン残基であり、かつ

W は、トリプトファン残基である。〕

で表される、13～17アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒト Ig G および／またはウサギ Ig G と結合可能であることを特徴とする。

【0089】

式(iii)のペプチドのアミノ酸配列において、17アミノ酸残基とした場合、N末端から1番目および2番目、ならびに16番目および17番目のアミノ酸残基Xは欠失していてもよく、そのようなペプチドは13アミノ酸長からなる。

【0090】

さらに、上記の各式のペプチドのアミノ酸配列のシステイン（C）以外のアミノ酸残基、すなわち、17アミノ酸残基とした場合、N末端から1～3、5、6、15～17番目の各アミノ酸残基は、以下のものから選択されることが好ましい。ここで、各大文字のアルファベットは、アミノ酸の一文字表記である：

1番目のアミノ酸残基＝S、G、Fまたは、なし

2番目のアミノ酸残基＝D、G、A、S、P、ホモシステインまたは、なし

3番目のアミノ酸残基＝S、D、T、N、EまたはR、

15番目のアミノ酸残基＝S、TまたはD、

16番目のアミノ酸残基＝H、G、Y、T、N、D、F、ホモシステインまたは、なし、

17番目のアミノ酸残基＝Y、F、H、Mまたは、なし。

5番目のアミノ酸残基＝AまたはT、

6番目のアミノ酸残基＝YまたはW。

【0091】

また、式（i-1）のペプチドのアミノ酸配列においてアミノ酸残基Xをさらに特定した式（iv）で表されるペプチドを以下に示す。

【0092】

すなわち、式（iv）で表されるペプチドは、

D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-T (配列番号101) (iv)

〔式中、

Dは、アスパラギン酸残基であり、

Cは、システイン残基であり、

Hは、ヒスチジン残基であり、

Xaa1は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、

2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Gは、グリシン残基であり、

Xaa2は、グルタミン酸残基またはアスパラギン酸残基であり、

Lは、ロイシン残基であり、

Vは、バリン残基であり、

Wは、トリプトファン残基であり、

Tは、スレオニン残基であり、

Xaa3は、アラニン残基またはスレオニン残基であり、かつ、

Xaa4は、チロシン残基またはトリプトファン残基である。〕で表される、13アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGおよび／またはウサギIgGと結合可能であることを特徴とする。

【0093】

式（i-1）のペプチドの具体例のいくつかを以下の（1）～（19）に列挙するが、これらに制限されないことはいうまでもない：

（1）DCAYH(Xaa1)GELVWCT (配列番号20)；

（2）GPDCA YH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号21)；

（3）RCAYH(Xaa1)GELVWCS (配列番号22)；

（4）GPRCA YH(Xaa1)GELVWCSFH (配列番号23)；

（5）SPDCA YH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号24)；

（6）GDDCA YH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号25)；

（7）GPSCA YH(Xaa1)GELVWCTFH (配列番号26)；

（8）GPDCA YH(Xaa1)GELVWCSFH (配列番号27)；

（9）GPDCA YH(Xaa1)GELVWCTHH (配列番号28)；

（10）GPDCA YH(Xaa1)GELVWCTFY (配列番号29)；

（11）SPDCA YH(Xaa1)GELVWCTFY (配列番号30)；

- (12) SDDCAYH (Xaa1) GELVWCTFY (配列番号31) ;
 (13) RGNCA YH (Xaa1) GQLVWCTYH (配列番号32) ;
 (14) G (Xaa2) DCAYH (Xaa1) GELVWCT (Xaa2) H (配列番号33) ;
 (15) RRGPD CAYH (Xaa1) GELVWCTFH (配列番号34) ;
 (16) DCTYH (Xaa1) GNLVWCT (配列番号35) ;
 (17) DCAYH (Xaa1) GNLVWCT (配列番号36) ;
 (18) DCTYH (Xaa1) GELVWCT (配列番号37) ; および
 (19) DCAWH (Xaa1) GELVWCT (配列番号38) 。

〔式中、

Xaa1 は、リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Xaa2 は、ホモシステインであり、

好ましくは、ホモシステイン同士は、互いにジスルフィド結合を形成している。〕。

【0094】

式(i-1)のペプチドの好ましい具体例としては、以下が挙げられる：

- (1) DCAYH (Xaa1) GELVWCT (配列番号20) ;
 (2) GPD CAYH (Xaa1) GELVWCTFH (配列番号21) ;
 (13) RGNCA YH (Xaa1) GQLVWCTYH (配列番号22) ;
 (14) G (Xaa2) DCAYH (Xaa1) GELVWCT (Xaa2) H (配列番号33) ; および
 (15) RRGPD CAYH (Xaa1) GELVWCTFH (配列番号34) 。

〔式中、

Xaa1 は、リジン残基であり、

Xaa2 は、ホモシステインであり、

好ましくは、システイン同士および／またはホモシステイン同士は、互いにジスルフィド結合を形成している。〕

【0095】

上記(13)のペプチドは、RGNCA YHKGQLVWCTYH (配列番号39) であつてもよい。

【0096】

別の特定の実施形態では、上記式(i)の親和性物質は、下記式(v)で表されるIgG結合性ペプチドまたはその塩であつてもよい(例、実施例)。

(X₁₋₃) - C - (Xaa3) - (xaa4) - H - (Xaa1) - G - (Xaa2) - L - V - W - C - (Xaa5) - (Xaa6) - (Xaa7) (配列番号102) (v)

〔式中、

Xは、同一または異なって、システイン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Cは、システイン残基であり、

Xaa3 は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Xaa4 は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Hは、ヒスチジン残基であり、

Xaa1 は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Gは、グリシン残基であり、

Xaa2 は、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、またはアスパラギン酸残基であり、

Lは、ロイシン残基であり、

Vは、バリン残基であり、

Wは、トリプトファン残基であり、

10

20

30

40

50

X a a 5 は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、
 X a a 6 は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、かつ
 X a a 7 は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。) によって表される、
 13～17 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒト I g G と結合可能である
 ペプチドまたはその塩。

【0097】

このような特定の構造を有する国際公開第 2016 / 186206 号に未開示の親和性
 物質は、ヒト I g G F c における E u n u m b e r i n g に従う L y s 248 残基また
 は L y s 246 残基、あるいは L y s 248 残基または L y s 246 残基以外の他のアミ
 ノ酸残基の位置選択的な修飾に有用である（実施例）。好ましくは、X a a 3、X a a 1
 、X a a 2、X a a 5、X a a 6、および X a a 7 のいずれかが一つが、リジン残基である
 。X a a 1 は、好ましくは、アルギニン残基、またはロイシン残基であってもよい。ある
 いは、X a a 1 は、好ましくは、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、
 2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、より好ましくは、
 リジン残基、アスパラギン酸残基、またはグルタミン酸残基であってもよい。

【0098】

式 (v) のペプチドのアミノ酸配列において、17 アミノ酸残基とした場合、N 末端か
 ら 1 番目および 2 番目、ならびに 16 番目および 17 番目のアミノ酸残基 X は欠失してい
 てもよく、そのようなペプチドは 13 アミノ酸長からなる。

【0099】

さらに、上記式 (v) のペプチドのアミノ酸配列のシステイン (C) 以外のアミノ酸残
 基、すなわち、17 アミノ酸残基とした場合、N 末端から 1～3 番目の各アミノ酸残基は
 、以下のものから選択されることが好ましい。ここで、各大文字のアルファベットは、ア
 ミノ酸の一字表記である：

1 番目のアミノ酸残基 = R、S、G、F または、なし（好ましくは、R、または、なし）
 2 番目のアミノ酸残基 = D、G、A、S、P、ホモシステインまたは、なし（好ましく
 は、G、またはなし）
 3 番目のアミノ酸残基 = S、D、T、N、E または R（好ましくは、N、または D）。

【0100】

式 (v) のペプチドの具体例のいくつかを以下の (16) ～ (34) に列举するが、こ
 れらに制限されないことはいうまでもない：

(16) R G N C A Y H (X a a 1) G Q L V W C T Y H (配列番号 73)

(17) R G N C A W H (X a a 1) G Q L V W C T Y H (配列番号 74)

(18) R G N C A W H (X a a 1) G E L V W C T Y H (配列番号 75)

(19) R G N C K W H (X a a 1) G Q L V W C T Y H (配列番号 76)

(20) R G N C K Y H (X a a 1) G E L V W C T Y H (配列番号 77)

(21) R G N C K Y H (X a a 1) G Q L V W C T Y H (配列番号 78)

(22) D C K W H (X a a 1) G E L V W C T (配列番号 79)

(23) D C K Y H (X a a 1) G E L V W C T (配列番号 80)

(24) D C K W H (X a a 1) G E L V W C T (配列番号 81)

(25) D C K W H (X a a 1) G Q L V W C T (配列番号 82)

(26) D C K Y H (X a a 1) G E L V W C T (配列番号 83)

(27) D C K Y H (X a a 1) G Q L V W C T (配列番号 84)

(28) D C K W H (X a a 1) G Q L V W C T (配列番号 85)

(29) D C K Y H (X a a 1) G Q L V W C T (配列番号 86)

(30) R G N C A W H (X a a 1) G Q L V W C K Y H (配列番号 87)

(31) R G N C A W H (X a a 1) G E L V W C K Y H (配列番号 88)

(32) R G N C A Y H (X a a 1) G Q L V W C T K H (配列番号 89)

(33) R G N C A Y H (X a a 1) G Q L V W C T Y K (配列番号 90)

(34) R G N C A Y H (X a a 1) G Q L V W C T K H (配列番号 91)。

〔式中、

X a a 1 は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基である。〕。

好ましくは、X a a 1 は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基であり、より好ましくはリジン残基である。

【0101】

また、I g G 結合性ペプチドは、広義の一次構造として、下記の式 (v i) :

D - C - (X a a 3) - (X a a 4) - H - (X a a 1) - G - (X a a 2) - L - V -
W - C - (X a a 5) - (X a a 6) - (X a a 7) (配列番号 103) (v i)

〔式中、

D は、アスパラギン酸残基であり、

C は、システイン残基であり、

X a a 3 は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

X a a 4 は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

H は、ヒスチジン残基であり、

X a a 1 は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

G は、グリシン残基であり、

X a a 2 は、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、またはアスパラギン酸残基であり、

L は、ロイシン残基であり、

V は、バリン残基であり、

W は、トリプトファン残基であり、

X a a 5 は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、

X a a 6 は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、

X a a 7 は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。〕で表される、13～15 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒト I g G および／またはウサギ I g G と結合可能であることを特徴とするペプチドである (例、実施例および国際公開第 2016/186206 号)。

好ましくは、X a a 3、X a a 1、X a a 2、X a a 5、X a a 6、および X a a 7 のいずれか一つが、リジン残基である。X a a 1 は、好ましくは、リジン残基、アルギニン残基、またはロイシン残基であり、X a a 2 は、好ましくは、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基である。

【0102】

特定の実施形態では、I g G 結合性ペプチドは、下記の式 (v i i) :

D - C - (X a a 3) - (X a a 4) - H - (X a a 1) - G - (X a a 2) - L - V -
W - C - T (配列番号 104) (v i i)

〔式中、

D は、アスパラギン酸残基であり、

C は、システイン残基であり、

X a a 3 は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

X a a 4 は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

H は、ヒスチジン残基であり、

X a a 1 は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

G は、グリシン残基であり、

X a a 2 は、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、またはアスパラギン酸残基であり、

L は、ロイシン残基であり、

V は、バリン残基であり、

10

20

30

40

50

Wは、トリプトファン残基であり、かつ

Tは、スレオニン残基である。)で表される、13アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGおよび／またはウサギIgGと結合可能であることを特徴とするペプチドである(例、国際公開第2016/186206号)。好ましくは、Xaa3、Xaa1、およびXaa2のいずれか一つが、リジン残基である。Xaa1は、好ましくは、リジン残基、アルギニン残基、またはロイシン残基であり、Xaa2は、好ましくは、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基である。

【0103】

別の特定の実施形態では、IgG結合性ペプチドは、下記の式(viii)：

R-G-N-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-
L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7) (配列番号105) (viii)

〔式中、

Rは、アルギニン残基であり、

Gは、グリシン残基であり、

Nは、アスパラギン残基であり、

Cは、システイン残基であり、

Xaa3は、アラニン残基、またはリジン残基であり、

Xaa4は、トリプトファン残基、またはチロシン残基であり、

Hは、ヒスチジン残基であり、

Xaa1は、アルギニン残基、ロイシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、またはジアミノプロピオン酸残基であり、

Gは、グリシン残基であり、

Xaa2は、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基、アスパラギン残基、またはアスパラギン酸残基であり、

Lは、ロイシン残基であり、

Vは、バリン残基であり、

Wは、トリプトファン残基であり、

Xaa5は、スレオニン残基、またはリジン残基であり、

Xaa6は、チロシン残基、リジン残基、または無しであり、かつ

Xaa7は、ヒスチジン残基、リジン残基、または無しである。)で表される、13～15アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、かつヒトIgGおよび／またはウサギIgGと結合可能であることを特徴とするペプチド(例、実施例)。このような特定の構造を有する国際公開第2016/186206号に未開示の化合物は、ヒトIgGFcにおけるEu numberingに従うLys248残基またはLys246残基、あるいはLys248残基またはLys246残基以外の他のアミノ酸残基の位置選択的な修飾に有用である(実施例)。好ましくは、Xaa3、Xaa1、Xaa2、Xaa5、Xaa6、およびXaa7のいずれか一つが、リジン残基である。Xaa1は、好ましくは、アルギニン残基、またはロイシン残基であってもよい。あるいは、Xaa1は、好ましくは、リジン残基、アルギニン残基、またはロイシン残基であり、Xaa2は、好ましくは、リジン残基、グルタミン残基、グルタミン酸残基である。

【0104】

ペプチドは、各アミノ酸配列の中に離間した少なくとも2つのシステイン(C)残基がジスルフィド結合して環状ペプチドを形成し、各システイン残基のN末端側およびC末端側には1または2個のシステイン以外の任意のアミノ酸残基を有していても良い。各システイン残基のN末端側およびC末端側には1または2個のアミノ酸残基を有する場合において、17アミノ酸残基とした場合、N末端から1～2、16～17番目の各アミノ酸残基は、上記例示のものである。また、上記ペプチドを構成するアミノ酸はL体またはD体のいずれであってもよいが、L体が好ましい(実施例ではペプチドを構成するアミノ酸残基は全てL体である)。

【0105】

上記のとおり、IgG結合性ペプチドにおいて、上記Xaaのアミノ酸残基が架橋剤によって容易に修飾できるアミノ酸残基（リジン残基、システイン残基、アスパラギン酸残基、またはグルタミン酸残基等のタンパク質構成アミノ酸、あるいはジアミノプロピオン酸残基または2-アミノスベリン酸残基等の非タンパク質構成アミノ酸）である場合、これらのアミノ酸のなかでもリジン残基が好ましい。このような架橋剤としては、例えば、DSG（disuccinimidyl glutarate、ジスクシンイミジルグルタレート）、DSS（disuccinimidyl suberate、ジスクシンイミジルスベレート）等のスクシンイミジル基を好ましくは2以上含む架橋剤、DMA（dimethyl adipimide・2HCl、アジプイミド酸ジメチル二塩酸塩）、DMP（dimethyl pimelimide・2HCl、ピメルイミド酸ジメチル二塩酸塩）、及びDMS（dimethyl suberimide・2HCl、スベルイミド酸ジメチル二塩酸塩）等のイミド酸部分を好ましくは2以上含む架橋剤、並びにDTBP（dimethyl 3,3'-dithiobispropionimide・2HCl、3,3'-ジチオビスプロピオンイミド酸ジメチル二塩酸塩）及びDSP（dithiobis(succinimidyl propionate)、ジチオビススクシンイミジルプロピオン酸）等のSS結合を有する架橋剤が挙げられる（例、国際公開第2016/186206号）。IgG結合性ペプチドを架橋剤によって修飾する際の部位特異性を高めるため、IgG結合性ペプチドは、その配列中にXaa1と同じ残基を、全く有さないか、ほとんど有さない（例えば、1個または2個しか有さない）ことが好ましい。例えば、Xaa1がリジン残基である場合には、IgG結合性ペプチドは、その配列中にXaa1以外の場所にリジン残基を全く有さないか、ほとんど有さないことが好ましい。

【0106】

IgG結合性ペプチドは、IgGのFcドメインに結合する。IgG結合性ペプチドは、上記Xaa1等の上記Xaaのアミノ酸残基において、IgG Fcの特定の領域、すなわち、ヒトIgG FcにおけるEu numberingに従うLys248残基またはLys246残基、好ましくはLys248と近接する（実施例および国際公開第2016/186206号を参照）。あるいは、IgG結合性ペプチドにおいて、上記Xaaのアミノ酸残基は、ヒトIgG FcにおけるEu numberingに従うLys248残基またはLys246残基以外の他のアミノ酸残基と近接することができる。

【0107】

より具体的には、上記式(i)～(viii)で表されるペプチドは、以下のとおりである。

- (1') RGNCAYHKGQLVWCTYH（配列番号39）
- (2') RGNCKYHRGQLVWCTYH（配列番号42）
- (3') RGNCAWHRGKLVWCTYH（配列番号43）
- (4') RGNCKWHRGELVWCTYH（配列番号44）
- (5') RGNCKWHRGQLVWCTYH（配列番号45）
- (6') RGNCKYHLGELVWCTYH（配列番号46）
- (7') RGNCKYHLGQLVWCTYH（配列番号47）
- (8') DCKWHLGELVWCT（配列番号48）
- (9') DCKYHLGELVWCT（配列番号49）
- (10') DCKWHRGELVWCT（配列番号50）
- (11') DCKWHLGQLVWCT（配列番号51）
- (12') DCKYHRGELVWCT（配列番号52）
- (13') DCKYHLGQLVWCT（配列番号53）
- (14') DCKWHRGQLVWCT（配列番号54）
- (15') DCKYHRGQLVWCT（配列番号55）
- (16') RGNCAWHLGQLVWCKYH（配列番号56）

(17') RGNCAWHLGELVWCKYH (配列番号57)
(18') RGNCA YHLGQLVWCTKH (配列番号58)
(19') RGNCA YHLGQLVWCTYK (配列番号59)
(20') RGNCA YHRGQLVWCTKH (配列番号60)
【0108】

また、上述したような可溶性タンパク質に対する親和性物質は、

(a) FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSI RDDC (配列番号92) のアミノ酸配列において、いずれかのアミノ酸残基が、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、およびジアミノプロピオン酸残基（架橋剤によって容易に修飾できるアミノ酸残基）からなる群より選ばれる1つのアミノ酸残基（好ましくは、リジン残基、アスパラギン酸残基、またはグルタミン酸残基、より好ましくはリジン残基）により置換されており、かつ

(b) 配列番号92の前記アミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、親和性ペプチドであってもよい。

【0109】

好ましくは、(a) および (b) の特性を有する上記アミノ酸配列は、本明細書中に記載されるようなヒトIgGと結合可能である。

【0110】

配列番号92のアミノ酸配列からなるペプチドは、ペプチド試薬合成上の都合により、Z34Cとして知られている親和性ペプチドにおいてN末端から数えて26番目と28番目の2つのK（リジン）をR（アルギニン）に変更したものであり、さらにN末端をアセチル化し、かつC末端をアミド化して用いることができる。より具体的には、このような親和性ペプチドとしては、Ac-FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNA RIRSI RDDC-NH₂（配列番号92）が挙げられる。このような特定の構造を有する親和性物質は、ヒトIgG FcにおけるEu numberingに従うLys248残基またはLys246残基、Lys288またはLys290、Lys317、あるいはそれら残基以外の他のアミノ酸残基の位置選択的な修飾に有用である（実施例）。なお、上記Z34Cのアミノ酸配列は、FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNA KIKSI RDDC（配列番号93）である（例、Starovasnik, M. A. et al., Structural mimicry of a native protein by a minimized binding domain., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 10080-10085 (1997) を参照）。

【0111】

親和性ペプチドは、ヒトIgG（例、上述したようなヒトIgG。好ましくはヒトIgG1）に対する親和性を有することができる。上記親和性ペプチドは、5位および34位のシステイン残基がジスルフィド結合して環状ペプチドを形成していてもよい。

【0112】

架橋剤によって修飾が容易であるアミノ酸残基が導入される位置としては、ヒトIgG1等のヒトIgGに対する親和性を有する限り任意の位置を利用することができる。このような位置については、当業者であれば容易に同定することができる。好ましくは、架橋剤によって容易に修飾できるアミノ酸残基が導入される位置は、ジスルフィド結合していてもよい5位および34位のシステイン残基以外のアミノ酸残基である。より好ましくは、架橋剤によって容易に修飾できるアミノ酸残基が導入される位置としては、例えば、1位、3位、6位、7位、13位、20位、24位、31位、および32位のアミノ酸残基が挙げられる。

【0113】

好ましくは、(a) および (b) の特性を有する上記アミノ酸配列は、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、およびジアミノプロピオン酸残基（架橋剤によって容易に修飾できるアミノ酸残基）からなる群より選ばれる

1つの特定のアミノ酸残基（好ましくは、リジン残基、アスパラギン酸残基、またはグルタミン酸残基であり、より好ましくはリジン残基）を所定の位置に有し、かつ、天然タンパク質を構成する通常の20種のアミノ酸残基（好ましくは、リジン残基、アスパラギン酸残基、およびグルタミン酸残基以外の17種のアミノ酸残基であり、より好ましくはリジン残基以外の19種のアミノ酸残基）の変異を当該所定の位置以外の位置に有することもまた好ましい。このような所定の位置は、特に限定されず、例えば、1位、3位、6位、7位、13位、20位、24位、31位、および32位が挙げられる。（a）および（b）の特性を有する上記アミノ酸配列は、5位および34位の2つのシステイン残基が維持されており、これらの2つのシステイン残基はジスルフィド結合により結合していてもよい。配列番号92の前記アミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列は、アミノ酸残基の欠失、置換、付加および挿入からなる群より選ばれる1、2、3または4種の変異（好ましくは置換）により、1～3個（好ましくは1または2個、より好ましくは1個）のアミノ酸残基が改変されたものであってもよい。アミノ酸残基の変異は、アミノ酸配列中の1つの領域に導入されてもよいが、複数の異なる領域に導入されてもよい。

10

【0114】

より好ましくは、（a）および（b）の特性を有する上記アミノ酸配列は、以下（c）または（d）であってもよい。

（c）以下（1）～（9）のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列：

（1）KNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSI RDDC（配列番号61）；

20

（2）FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSI RDDC（配列番号62）；

（3）FNMQCQRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSI RDDC（配列番号63）；

（4）FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRKARIRSI RDDC（配列番号64）；

（5）FNMQCQRRFYEA LHDPNLNKEQRNARIRSI RDDC（配列番号65）；

（6）FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSI KDDC（配列番号68）；

30

（7）FNKQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSI RDDC（配列番号70）；

（8）FNMQC KRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSI RDDC（配列番号71）；および

（9）FNMQCQRRFYEA LHDPNLNEEQRNARIRSI RKDC（配列番号72）；あるいは

（d）上記（1）～（9）のいずれかのアミノ酸配列において、1つのリジン残基および2つのシステイン残基以外の位置（例、1位、3位、6位、7位、13位、20位、24位、31位、および32位の位置）において、リジン残基以外の19種のアミノ酸残基の変異を有する、上記（1）～（9）のいずれかのアミノ酸配列に対して90%以上の同一性（上述したような個数のアミノ酸残基の修飾であってもよい）を有するアミノ酸配列。

40

（d）の上記アミノ酸配列は、5位および34位の2つのシステイン残基が維持されていることが好ましく、これらの2つのシステイン残基はジスルフィド結合により結合していてもよい。（d）の上記アミノ酸配列を有する親和性ペプチドは、本明細書中に記載されるようなヒトIgGと結合可能であることが好ましい。

【0115】

上記親和性ペプチドは、配列番号92の前記アミノ酸配列または上記（1）～（9）のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有する限り、架橋剤によって修飾が容易である1つのアミノ酸残基の導入以外にも、さらなるアミノ酸残基の変異を有していてもよい

50

。さらなるアミノ酸の変異を導入できる位置については、当業者であれば容易に同定することができる。このような位置としては、例えば、5位および34位のシステイン残基以外の位置を利用することができる。例えば、1位のフェニルアラニン残基、6位のアルギニン残基、13位のロイシン残基、20位のグルタミン酸残基、24位のアスパラギン残基、または31位のアルギニン残基（架橋剤によって容易に修飾できるアミノ酸残基が既に導入された位置を除く）であっても利用することができる。さらなるアミノ酸の変異により導入できるアミノ酸としては、例えば、アラニン（A）、アスパラギン（N）、システイン（C）、グルタミン（Q）、グリシン（G）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、フェニルアラニン（F）、プロリン（P）、セリン（S）、スレオニン（T）、トリプトファン（W）、チロシン（Y）、バリン（V）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、アルギニン（R）、ヒスチジン（H）、およびリジン（L）が挙げられる。好ましくは、リジン以外のこれらの19種のアミノ酸が利用されてもよい。アミノ酸はL体またはD体のいずれであってもよいが、L体が好ましい（実施例ではペプチドを構成するアミノ酸残基は全てL体である）。

【0116】

配列番号92の前記アミノ酸配列または（1）～（9）の前記アミノ酸配列に対する同一性の程度は、上述したとおりに決定することができる。同一性の程度は、好ましくは92%以上、より好ましくは94%以上、さらにより好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上（すなわち、配列番号92のアミノ酸配列に対して、リジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、2-アミノスベリン酸残基、およびジアミノプロピオン酸残基からなる群より選ばれる1つのアミノ酸残基の変異のみを有するもの）であってもよい。

【0117】

親和性物質がペプチドである場合、ペプチドの末端にあるアミノ基およびカルボキシ基は、保護されていてもよい。N-末端アミノ基の保護基としては、例えば、アルキルカルボニル基（アシル基）（例、アセチル基、プロポキシ基、tert-ブトキシカルボニル基等のブトキシカルボニル基）、アルキルオキシカルボニル基（例、フルオレニルメトキシカルボニル基）、アリールオキシカルボニル基、アリールアルキル（アラルキル）オキシカルボニル基（例、ベンジルオキシカルボニル基）が挙げられる。N-末端アミノ基の保護基としては、アセチル基が好ましい。C-末端カルボキシ基の保護基としては、例えば、エステルまたはアミドを形成可能な基が挙げられる。エステルまたはアミドを形成可能な基としては、例えば、アルキルオキシ基（例、メチルオキシ、エチルオキシ、プロピルオキシ、ブチルオキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ）、アリールオキシ基（例、フェニルオキシ、ナフチルオキシ）、アラルキルオキシ基（例、ベンジルオキシ）、アミノ基が挙げられる。C-末端カルボキシ基の保護基としては、アミノ基が好ましい。親和性物質が2以上のシステイン残基を含むペプチドである場合、システイン残基の側鎖にあるチオール基を介してジスルフィド結合が形成されていてもよい。

【0118】

1-3. リンカー（L）

式（I）において、Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーである。

【0119】

Lで表される切断性リンカーは、切断性部分を含む2価の基である。切断性部分は、タンパク質の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない条件（温和な条件）下での特定の処理により切断可能な部位である。したがって、切断性部分は、温和な条件下での特定の切断処理により切断可能な部位（アミド結合以外の結合）であるということができる。このような特定の処理としては、例えば、（a）酸性物質、塩基性物質、還元剤、酸化剤、酵素からなる群より選ばれる1種以上の物質による処理、（b）光からなる群より選ばれる物理化学的刺激による処理、または（c）自己分解性の切断性部分を含む切断性リンカーを用いた場合の放置が挙げられる。このような切断性リンカーおよびその切断条件は、当該分野における技術常識である（例、G. L e r i c h e, L. C h i

10

20

30

40

50

sholm, A. Wagner, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 20, 571 (2012); Feng P. et al., Journal of American Chemical Society. 132, 1500 (2010).; Bessodes M. et al., Journal of Controlled Release, 99, 423 (2004).; DeSimone, J. M., Journal of American Chemical Society. 132, 17928 (2010); Thompson, D. H., Journal of Controlled Release, 91, 187 (2003); Schoenmarks, R. G., Journal of Controlled Release, 95, 291 (2004)。このような切断性部分としては、例えば、ジスルフィド残基、アセタール残基、ケタール残基、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基（例、tert-ブチルオキシカルバメート残基）、シラン残基、ヒドラゾン含有残基（例、ヒドラゾン残基、アシルヒドラゾン残基、ビスアリールヒドラゾン残基）、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基が挙げられる。

【0120】

電子吸引基を有する芳香族環基は、アリール、アラルキル、芳香族複素環基、芳香族複素環基を有するアルキルからなる群より選ばれる芳香族環基を有するものが好ましく、アラルキル、芳香族複素環基を有するアルキルがより好ましい。電子吸引基は、環の2位に結合していることが好ましい。さらにより好ましくは、電子吸引基を有する芳香族環含有残基は、例えば、2位に電子吸引基を有するアラルキル（例、ベンジル）である。電子吸引基としては、例えば、ハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されたアルキル（例、トリフルオロメチル）、ボロン酸残基、メシル、トシル、トリフレート、ニトロ、シアノ、フェニル基、ケト基（例、アシル）が挙げられる。

【0121】

切断性部分としての残基の名称に関連して接頭語、接尾語等の用語として見出されるアルキル、アシル（すなわち、アルキルカルボニル）、アルコキシ（すなわち、アルキルオキシ）、アリール、アラルキル等の基の定義、例、および好ましい例は、後述するものと同様である。

【0122】

エステル残基としては、例えば、炭素原子および酸素原子から構成される通常のエステル残基（例、アルキルエステル（例、tert-ブチルオキシカルボニル等の三級アルキルオキシカルボニル）、アリールエステル（例、フェナシルエステル、2-（ジフェニルホスフィノ）ベンゾエート）、グリコシルエステル残基、オルトエステル残基、硫黄原子および酸素原子を含むエステル残基（例、 α -チオフェニルエステル残基、アルキルチオエステル残基等のチオエステル残基）、リン原子および酸素原子を含むエステル残基（例、ホスホジエステル残基、ホスホトリエステル残基）、活性化エステル残基（例、N-ヒドロキシスクシンイミド残基）が挙げられる。

【0123】

スルホン含有残基としては、例えば、スルホン残基、キノリニルベンゼンスルフォナート残基が挙げられる。

【0124】

シラン残基は、好ましくは、アルキル、アリール、アラルキル、およびアルコキシからなる群より選ばれる基を有するシラン残基である。このようなシラン残基としては、例えば、ジアルキルジアルコキシシラン残基（例、ジメチルジアルコキシシラン、ジエチルジアルコキシシラン）、またはジアリールジアルコキシシラン残基（例、ジフェニルジアルコキシシラン）が挙げられる。

【0125】

アルコキシアルキル（すなわち、アルキルオキシアルキル）残基としては、後述するアルキルオキシおよびアルキルを組み合わせた基であり（アルキルオキシおよびアルキルの定義、例および好ましい例は、後述するものと同様）、例えば、メトキシメチル残基、エトキシメチル残基、メトキシエチル残基、エトキシエチル残基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0126】

不飽和結合含有鎖残基は、炭素原子のみからなる不飽和結合部分を含む残基（例、炭素原子間二重結合を有する最小単位であるビニル（エテニル）、または炭素原子間三重結合を有する最小単位であるアセチレニル（エチニル））、または炭素原子およびヘテロ原子（例、窒素原子、硫黄原子、酸素原子）からなる不飽和結合部分（例、アルデヒド、シアノ）を含む残基である。不飽和結合含有鎖残基としては、例えば、ビニルエーテル残基、シアノエチル残基、エチレン残基、マロンジアルデヒド残基が挙げられる。

10

【0127】

酸性物質（求電子試薬とも称される）としては、例えば、塩酸、硫酸、硝酸等の無機酸性物質、およびギ酸、酢酸、4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジンプロパンスルホン酸、3-モルホリノプロパンスルホン酸、リン酸二水素ナトリウム、クエン酸、ドデシル硫酸、N-ドデカノイルサルコシン酸、トリフルオロ酢酸等の有機酸性物質が挙げられる。酸性物質により切断可能な部位としては、例えば、アルキルオキシアリアルキル残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、アセタール残基、シラン残基、イミン残基、ビニルエーテル残基、 β -チオプロピオネート残基、トリチル残基、ヒドラゾン残基、アコニチル残基、オルトエステル残基、カルバモイル残基、2-（ジフェニルホスフィノ）ベンゾエート残基が挙げられる。

20

【0128】

塩基性物質（求核試薬とも称される）としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウム等の無機塩基性物質、およびトリエチルアミン、N, N'-ジイソプロピルアミン等の有機塩基性物質が挙げられる。塩基性物質により切断可能な部位としては、例えば、シラン残基、シアノエチル残基、スルホン残基、エチレン残基、グリコシルジスクシネート残基、 α -チオフエニルエステル残基、不飽和ビニルスルフィド残基、マロンジアルデヒド残基、アシルヒドラゾン残基、アルキルチオエステル残基が挙げられる。

30

【0129】

還元剤としては、例えば、システイン、ジチオトレイトール、還元型グルタチオン、ヒドロキシルアミン、 β -メルカプトエタノールが挙げられる。還元剤により切断可能な部位としては、例えば、ジスルフィド残基、アルコキシアルキル残基、アゾ残基が挙げられる。

【0130】

酸化剤としては、例えば、過ヨウ素酸ナトリウム、酸化型グルタチオンが挙げられる。酸化剤により切断可能な部位としては、例えば、ビシナルジオール残基、セレン残基が挙げられる。

【0131】

酵素としては、例えば、トリプシン、パパイン、TEV、トロンビン、カテプシンB、カテプシンD、カテプシンK、カスパーゼ、プロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、リパーゼ、エンドグリコシターゼ、PNガーゼFが挙げられる。酵素により切断可能な部位としては、例えば、エステル残基、ホスホジエステル残基、グリコシル残基が挙げられる。

40

【0132】

光により切断可能な部位としては、例えば、2-ニトロベンジル残基、フェナシルエステル残基、8-キノリンベンゼンスルホナート残基、クマリン残基、ホスホトリエステル残基、ビスアリアルヒドラゾン残基、ピマンジチオプロピオン酸残基が挙げられる。

【0133】

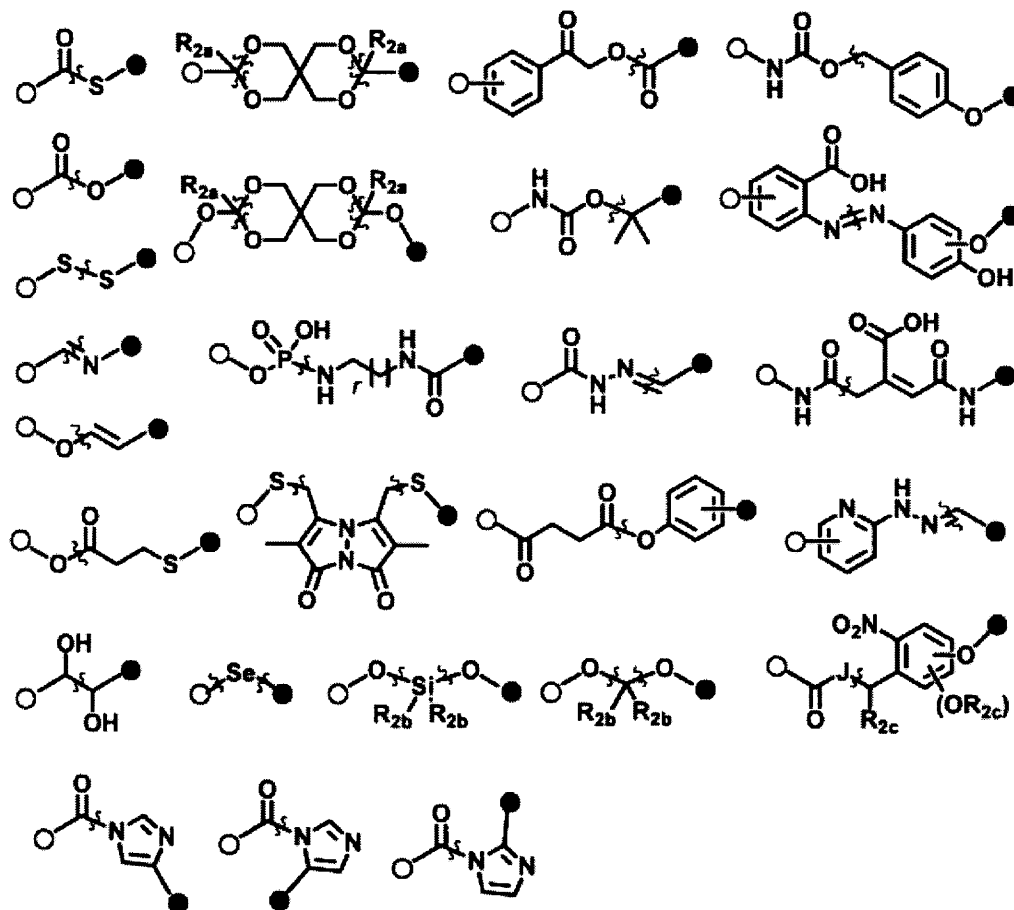
50

自己分解性の切断性部分としては、例えば、活性化エステル残基（例、N-ヒドロキシスクシンイミド残基）が挙げられる。

【 0 1 3 4 】

より具体的には、切断性部分は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

【化 3 0】



〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

複数の R_{2a} 、複数の R_{2b} 、および複数の R_{2c} は、同一または異なって、水素原子、または後述する置換基からなる群より選ばれ、

Jは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、または $-\text{S}-$ であり、

r は、 $1 \sim 4$ の任意の整数であり、

○（白丸）はA（または後述するL a）に対する結合を示し、●（黒丸）はB（または後述するL b）に対する結合を示す。

化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、●がA（または後述するLa）に対する結合を示し、○がB（または後述するLb）に対する結合を示していてもよい。）

【 0 1 3 5 】

Jは、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、または $-\text{S}-$ である。jは、好ましくは $-\text{CH}_2-$ または $-\text{O}-$ であり、より好ましくは好ましくは $-\text{CH}_2-$ である。

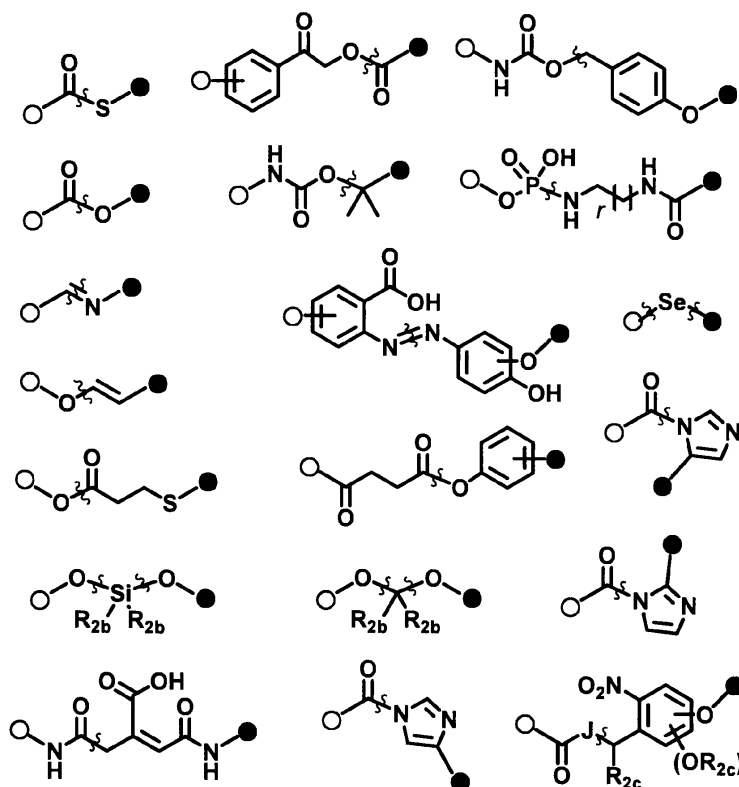
【 0 1 3 6 】

r は、 $1 \sim 4$ の任意の整数であり、好ましくは $1 \sim 3$ の任意の整数であり、より好ましくは 1 または 2 である。

【 0 1 3 7 】

一実施形態では、切断性リンカーは、(i) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む2価の基である切断性リンカー、もしくは(i, i) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む

【化 3 2】



10

20

〔ここで、結合に直交する波線は、切断部位を示し、

複数の R_{2b} 、複数の R_{2c} 、 J 、 r は、水素原子、または後述する置換基からなる群より選ばれ、

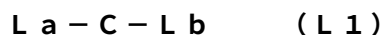
○（白丸）は A （または後述する L_a ）に対する結合を示し、●（黒丸）は B （または後述する L_b ）に対する結合を示す。

化学構造が、切断部位を中心にして非対称である場合、●が A （または後述する L_a ）に対する結合を示し、○が B （または後述する L_b ）に対する結合を示していてもよい。〕からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

30

【0142】

特定の実施形態では、切断性リンカー（ L ）は、下記式（ $L1$ ）～（ $L3$ ）のいずれか一つで表されてもよい：



〔式中、

L_a および L_b は、それぞれ、2 価の基であり、

C は、切断性部分である。〕

40

【0143】

2 価の基としては、例えば、置換基を有していてもよい 2 価の炭化水素基、置換基を有していてもよい 2 価の複素環基、 $-C(=O)-$ 、 $-NR_a-$ （ R_a は水素原子、または置換基を示す）、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(=S)-$ 、およびこれらの 2 以上（例えば 2～8、好ましくは 2～6、より好ましくは 2～4）の組み合わせからなる基が挙げられる。

【0144】

2 価の炭化水素基としては、直鎖、分岐鎖、または環状の 2 価の炭化水素基であり、好ましくは直鎖または分岐鎖の 2 価の炭化水素基である。2 価の炭化水素基としては、例えば、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリーレンが挙げられる。

50

【0145】

アルキレンとしては、炭素原子数1～12のアルキレンが好ましく、炭素原子数1～6のアルキレンがより好ましく、炭素原子数1～4のアルキレンが特に好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。アルキレンは、直鎖、分岐鎖、または環状のいずれであってもよいが、直鎖のアルキレンが好ましい。このようなアルキレンとしては、例えば、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレンが挙げられる。

【0146】

アルケニレンとしては、炭素原子数2～12のアルケニレンが好ましく、炭素原子数2～6のアルケニレンがより好ましく、炭素原子数2～4のアルケニレンが特に好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。アルケニレンは、直鎖、分岐鎖、または環状のいずれであってもよいが、直鎖のアルケニレンが好ましい。このようなアルケニレンとしては、例えば、エチレニレン、プロピニレン、ブテニレン、ペンテニレン、ヘキセニレンが挙げられる。

【0147】

アルキニレンとしては、炭素原子数2～12のアルキニレンが好ましく、炭素原子数2～6のアルキニレンがより好ましく、炭素原子数2～4のアルキニレンが特に好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。アルキニレンは、直鎖、分岐鎖、または環状のいずれであってもよいが、直鎖のアルキニレンが好ましい。このようなアルキニレンとしては、例えば、エチニレン、プロピニレン、ブチニレン、ペンチニレン、ヘキシニレンが挙げられる。

【0148】

アリーレンとしては、炭素原子数6～24のアリーレンが好ましく、炭素原子数6～18のアリーレンがより好ましく、炭素原子数6～14のアリーレンがさらに好ましく、炭素原子数6～10のアリーレンがさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。アリーレンとしては、例えば、フェニレン、ナフチレン、アントラセニレンが挙げられる。

【0149】

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

【0150】

2価の芳香族複素環基としては、炭素原子数3～21の2価の芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数3～15の2価の芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数3～9の2価の芳香族複素環基がさらに好ましく、炭素原子数3～6の2価の芳香族複素環基がさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。より具体的には、2価の芳香族複素環基としては、例えば、ピレンジイル、ピロールジイル、フランジイル、チオフェンジイル、ピリジンジイル、ピリダジンジイル、ピリミジンジイル、ピラジンジイル、トリアジンジイル、ピロリンジイル、ピペリジンジイル、トリアゾールジイル、プリンジイル、アントラキノンジイル、カルバゾールジイル、フルオレンジイル、キノリンジイル、およびイソキノリンジイルが挙げられる。

【0151】

2価の非芳香族複素環基としては、炭素原子数3～21の非芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数3～15の非芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数3～9の非芳香族複素環基がさらに好ましく、炭素原子数3～6の非芳香族複素環基がさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。より具体的には、2価の非芳香族複素環基としては、例えば、ピロールジオンジイル、ピロリンジオンジイル、オキシランジイル、アジリジンジイル、アゼチジンジイル、オキセタンジイル、チエタンジイル、ピロリジンジイル、ジヒドロフランジイル、テトラヒドロフランジイル、ジオキサランジイ

ル、テトラヒドロチオフェンジイル、イミダゾリジンジイル、オキサゾリジンジイル、ピペリジンジイル、ジヒドロピランジイル、テトラヒドロピランジイル、テトラヒドロチオピランジイル、モルホリンジイル、チオモルホリンジイル、ピペラジンジイル、ジヒドロオキサジンジイル、テトラヒドロオキサジンジイル、ジヒドロピリミジンジイル、およびテトラヒドロピリミジンジイルが挙げられる。

【0152】

L_aおよびL_bで表される2価の基は、例えば1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1もしくは2個の置換基を有していてもよい。このような置換基は、上記R_aおよびR_bで表される置換基と同様である。このような置換基としては、例えば、以下が挙げられる：

(i) ハロゲン原子；

(ii) 1価の炭化水素基；

(iii) アラルキル；

(iv) 1価の複素環基；

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

(vi) NR_dR_e-、NR_dR_e-C(=O)-、NR_dR_e-C(=O)-O-、もしくはR_d-C(=O)-NR_e-(R_dおよびR_eは、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは1価の炭化水素基を示す。)；

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

【0153】

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

【0154】

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

【0155】

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

【0156】

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

【0157】

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

【0158】

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

【0159】

1 価の鎖状炭化水素基としては、アルキルが好ましい。

【0160】

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

【0161】

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

10

【0162】

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

【0163】

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

20

【0164】

1 価の脂環式炭化水素基としては、シクロアルキルが好ましい。

【0165】

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

30

【0166】

1 価の芳香族炭化水素基としては、フェニルが好ましい。

【0167】

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

40

【0168】

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

【0169】

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

50

黄原子及び窒素原子からなる群から選択される１種以上を含むことがより好ましい。

【０１７０】

１価の芳香族複素環基としては、炭素原子数３～１５の芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数３～９の芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数３～６の芳香族複素環基がさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。１価の芳香族複素環基としては、例えば、ピレニル、ピロリル、フラニル、チオフェニル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、ピロリニル、ピペリジニル、トリアゾニル、ブリニル、カルバゾニル、フルオレニル、キノリニル、及びイソキノリニルが挙げられる。

【０１７１】

１価の非芳香族複素環基としては、炭素原子数３～１５の非芳香族複素環基が好ましく、炭素原子数３～９の非芳香族複素環基がより好ましく、炭素原子数３～６の非芳香族複素環基がさらに好ましい。上記炭素原子数に置換基の炭素原子数は含まれない。１価の非芳香族複素環基としては、例えば、オキシラニル、アジリジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ピロリジニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロフラニル、ジオキサソラニル、テトラヒドロチオフェニル、イミダゾリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ピペラジニル、ジヒドロオキサジニル、テトラヒドロオキサジニル、ジヒドロピリミジニル、及びテトラヒドロピリミジニルが挙げられる。

【０１７２】

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

【０１７３】

好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

(i') ハロゲン原子；

(ii') 炭素原子数１～１２のアルキル、フェニル、もしくはナフチル；

(iii') 炭素原子数３～１５のアラルキル；

(iv') ５員または６員の複素環；

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

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

(vii') 上記(vi)で列挙したものと同一基。

【０１７４】

より好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

(i'') ハロゲン原子；

(ii'') 炭素原子数１～１２のアルキル；

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

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

(v'') 上記(vi)で列挙したものと同一基。

【０１７５】

さらにより好ましくは、置換基は、以下であってもよい：

(i''') ハロゲン原子；

(ii''') 炭素原子数１～６のアルキル；

(iii''') $R_E - O -$ 、 $R_C - C(=O) -$ 、 $R_C - O - C(=O) -$ 、もしくは $R_C -$

10

20

30

40

50

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

;または

(i v ' ' ') N R_e-、N R_d R_e-C(=O)-、N R_d R_e-C(=O)-O-、もしくはR_d-C(=O)-N R_e- (R_dおよびR_eは、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～6のアルキルを示す。) ;

(v ' ' ') 上記(v i i)で列挙したものと同一基。

【0176】

特に好ましくは、置換基は、以下であってもよい:

(i ' ' ' ') ハロゲン原子;

(i i ' ' ' ') 炭素原子数1～4のアルキル;

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

;または

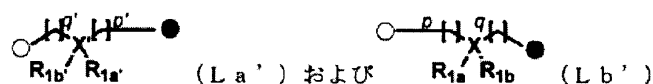
(i v ' ' ' ') N R_e-、N R_d R_e-C(=O)-、N R_d R_e-C(=O)-O-、もしくはR_d-C(=O)-N R_e- (R_dおよびR_eは、同一もしくは異なって、水素原子、もしくは炭素原子数1～4のアルキルを示す。) ;

(v ' ' ' ') 上記(v i i)で列挙したものと同一基。

【0177】

特定の実施形態では、L a および L b は、それぞれ、下記(L a ') および(L b ') :

【化33】



〔式中、

p および p ' は、同一または異なって、0～10の任意の整数であり、

q および q ' は、同一または異なって、0～10の任意の整数であり、

X および X ' は、同一または異なって、炭素原子、窒素原子、または単結合(ここで、X が窒素原子である場合、R_{1b}は存在せず、X ' が窒素原子である場合、R_{1b}は存在しない。X が単結合である場合、R_{1a}およびR_{1b}は存在せず、X ' が単結合である場合、R_{1a} および R_{1b} は存在しない)であり、

R_{1a}、R_{1b}、R_{1a} および R_{1b} は、同一または異なって、水素原子、または上述する置換基からなる群より選ばれる。)で表されてもよい。

【0178】

p および p ' は、同一または異なって、0～10の任意の整数であり、好ましくは0～8の整数であり、より好ましくは0～6の整数であり、さらにより好ましくは0～4の整数であり、特に好ましくは0、1または2である。好ましくは、p および p ' は、同一である。

【0179】

q および q ' は、同一または異なって、0～10の任意の整数であり、好ましくは0～8の整数であり、より好ましくは0～6の整数であり、さらにより好ましくは0～4の整数であり、特に好ましくは0、1または2である。好ましくは、q および q ' は、同一である。

【0180】

X および X ' は、同一または異なって、炭素原子、窒素原子、または単結合であり、好ましくは炭素原子または単結合である。好ましくは、X および X ' は、同一である。

【0181】

R_{1a}、R_{1b}、R_{1a} および R_{1b} は、同一または異なって、水素原子、または後述する置換基からなる群より選ばれる。置換基の定義、例、および好ましい例は、上述したと

おりである。好ましくは、 R_{1a} 、 R_{1b} 、 R_{1a} および R_{1b} は、水素原子である。

【0182】

1-4. (a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない2価の基 (B)

式 (I) において、B は、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない2価の基である。

【0183】

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

【0184】

親和性物質の標的が可溶性タンパク質である場合、生体直交性官能基は、タンパク質に対する生体直交性官能基である。タンパク質に対する生体直交性官能基とは、タンパク質を構成する天然の20種のアミノ酸残基の側鎖と反応せずに、所定の官能基と反応する基である。タンパク質を構成する天然の20種のアミノ酸は、アラニン (A)、アスパラギン (N)、システイン (C)、グルタミン (Q)、グリシン (G)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、フェニルアラニン (F)、プロリン (P)、セリン (S)、スレオニン (T)、トリプトファン (W)、チロシン (Y)、バリン (V)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、アルギニン (R)、ヒスチジン (H)、およびリジン (L) である。これらの天然の20種のアミノ酸のうち、側鎖がない (すなわち、水素原子である) グリシン、ならびに側鎖が炭化水素基である (すなわち、硫黄原子、窒素原子、および酸素原子からなる群より選ばれるヘテロ原子を側鎖に含まない) アラニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、およびバリンは、通常の反応に対して不活性である。したがって、タンパク質に対する生体直交性官能基は、通常の反応に対して不活性である側鎖を有するこれらのアミノ酸の側鎖に加えて、アスパラギン、グルタミン、メチオニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、およびリジンの側鎖に対しても反応できない官能基である。

【0185】

タンパク質に対して反応できないこのような生体直交性官能基としては、例えば、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルケン残基 (換言すれば、炭素原子間二重結合を有する最小単位であるビニレン (エチニレン) 部分を有していればよい。以下同様)、アルキン残基 (換言すれば、炭素原子間三重結合を有する最小単位であるエチニレン部分を有していればよい。以下同様)、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロ残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル基、 α -ハロカルボニル残基 (例、 α 位にフッ素原子、塩素原子、臭素原子またはヨウ素原子を有するカルボニル残基。以下同様)、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基が挙げられる。タンパク質としては、遊離のチオール (システイン) を含む得るタンパク質 (例、抗体以外のタンパク質)、および遊離のチオールを含まないタンパク質 (例、抗体) が存在する。遊離のチオールを含まないタンパク質においては、チオールが生体直交性官能基として機能する。したがって、親和性物質の標的である可溶性タンパク質が遊離のチオールを含まないタンパク質 (例、抗体) である場合、生体直交性官能基にはチオールが含まれることが好ましい。また、可溶性タンパク質が遊離のチオールを含む得るタンパク質 (例、抗体以外のタンパク質) である場合、生体直交性官能基にはチオールが含まれないことが好ましい。1種または2種以上 (例、2種、

3 種、4 種) の生体直交性官能基が 2 価の基に含まれていてもよいが、好ましくは、1 種の生体直交性官能基が 2 価の基に含まれていてもよい。

【 0 1 8 6 】

一実施形態では、生体直交性官能基を含む2価の基は、アジド残基、アルデヒド基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、テトラジン残基、ニトロン残基、ヒドロキシアルミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル基、 α -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基を主鎖に含む2価の基であってもよい。

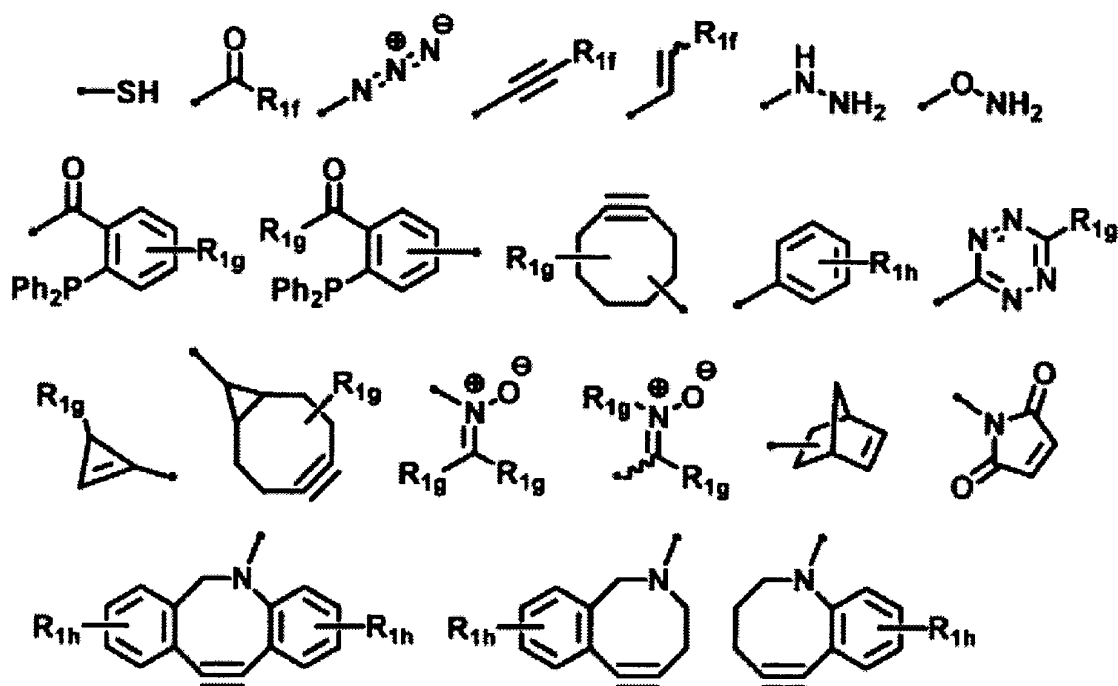
【 0 1 8 7 】

別の実施形態では、生体直交性官能基を含む2価の基は、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロ残基、ヒドロキシシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、 α -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基を側鎖に含む2価の基であってもよい。

【 0 1 8 8 】

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

【化 3 4】



〔式中、

R_{1f} 、単一もしくは複数の R_{1g} および単一もしくは複数の R_{1h} は、同一もしくは異なって、前記 (i) ~ (vii) からなる群より選ばれる原子もしくは基、または電子吸引基であり、

・は、結合手である。)

【 0 1 8 9 】

電子吸引基としては、例えば、上述したものが挙げられるが、ハロゲン原子、ボロン酸残基、メシル、トシル、トリフレートが好ましい。

【 0 1 9 0 】

一実施形態では、Bは、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基であってもよい。2価の基に含まれる生体直交性官能基の数は、単一または複数であり、例えば1～5、好まし

くは1～3、より好ましくは1または2、さらにより好ましくは1である。2価の基に含まれる生体直交性官能基の数が複数である場合、複数の生体直交性官能基は、同種であっても異種であってもよいが、単純な構造の採用等の観点では、同種であることが好ましい。

【0191】

特定の実施形態では、Bは、(a1) 生体直交性官能基を主鎖に含む2価の基であってもよい。生体直交性官能基を主鎖に含む2価の基は、アジド残基、アルデヒド基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、テトラジン残基、ニトロソ残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、チオエステル基、 α -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基自体を2価の基とするもの、またはこのような2価の生体直交性官能基のいずれか一方の末端または両端に上述した2価の基が連結されている基である。連結されるべき2価の基の定義、例および好ましい例は、上述した2価の基と同様である。

【0192】

別の特定の実施形態では、Bは、(a2) 生体直交性官能基を側鎖に含む2価の基であってもよい。生体直交性官能基を側鎖に含む2価の基は、アジド残基、アルデヒド残基、チオール残基、アルキン残基、アルケン残基、ハロゲン残基、テトラジン残基、ニトロソ残基、ヒドロキシルアミン残基、ニトリル残基、ヒドラジン残基、ケトン残基、ボロン酸残基、シアノベンゾチアゾール残基、アリル残基、ホスフィン残基、マレイミド残基、ジスルフィド残基、 α -ハロカルボニル残基、イソニトリル残基、シドノン残基、セレン残基からなる群より選ばれる生体直交性官能基またはそれを含む基で置換された2価の基である。置換されるべき2価の基の定義、例および好ましい例は、上述した2価の基と同様である。

【0193】

別の実施形態では、Bは、(b) 生体直交性官能基を含まない2価の基であってもよい。このような2価の基は、置換されていてもよいアルキレン、置換されていてもよいシクロアルキレン、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよい2価の複素環基、 $-NR_a-$ (R_a は水素原子、または置換基を示す)、 $-O-$ 、およびこれらの2以上の組み合わせ (例えば2～8、好ましくは2～6、より好ましくは2～4) からなる基であってもよい。置換されていてもよい場合の置換基、および R_a の置換基は、生体直交性官能基以外の置換基である。このような置換基としては、例えば、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、1価の複素環基、ヒドロキシル、アミノ、アルキルオキシ (アルコキシ)、シクロアルキルオキシ、アラルキルオキシが挙げられる。このような置換基の数は、例えば1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1もしくは2個、さらにより好ましくは1個である。

【0194】

生体直交性官能基以外の置換基について、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、1価の複素環基の定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。

【0195】

生体直交性官能基以外の置換基について、アルキルオキシ (アルコキシ) におけるアルキル、シクロアルキルオキシにおけるシクロアルキル、およびアラルキルオキシにおけるアラルキルの定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。より具体的には、アルキルオキシとしては、例えば、メチルオキシ、エチルオキシ、プロピルオキシ (例、*n*-プロピルオキシ、*iso*-プロピルオキシ)、ブチルオキシ (例、*n*-ブチルオキシ、*iso*-ブチルオキシ、*sec*-ブチルオキシ、*tert*-ブチルオキシ)、ペンチルオキシ (例、*n*-ペンチルオキシ)、ヘキシルオキシ (例、*n*-ヘキシルオキシ) が挙げられる。シクロアルキルオキシとしては、例えば、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が挙げられる。アラルキルオキシとしては、例えば、ベンゾイルオキシ、フェネチルオキシ、ナフチルメチルオキシ、ナフチ

ルエチルオキシが挙げられる。

【0196】

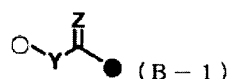
生体直交性官能基を含まない2価の基はまた、反応に対して高度に不活性な基であってもよい。したがって、このような2価の基は、炭素原子および水素原子のみから構成される基であってもよい。このような2価の基は、アルキレン、シクロアルキレン、またはアリール、およびこれらの2以上の組み合わせ（例えば2または3）である。生体直交性官能基を含まない2価の基が反応に対して高度に不活性な基である場合、このような2価の基は、反応に対して高度に不活性な置換基として、アルキレン、シクロアルキレン、およびアリールからなる群より選ばれる置換基を有していてもよい。反応に対して高度に不活性な置換基の数は、例えば1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1もしくは2個である。

10

【0197】

特定の実施形態では、Bは、下記式（B-1）：

【化35】



〔式中、

Yは、-NH-、-O-、-CH₂-、または下記式（B-2）：

【化36】



（式中、

VおよびV'は、同一または異なって、-NH-、-O-、-CH₂-、または単結合であり、

V1は、（a）生体直交性官能基を含む2価の基、または（b）生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

30

sは、0～10の任意の整数であり、

式（B-2）における○および●は、それぞれ、式（B-1）における○および●と同じ配向である。）であり、

Zは、酸素原子、硫黄原子、または水素原子（Zが水素原子である場合、-C（=Z）-は、-CH₂-を示す。）であり、

式（B-1）における○（白丸）は、L側の部分に対する結合を示し、●（黒丸）はR側の部分に対する結合を示す。）で表されてもよい。

【0198】

Yは、-NH-、-O-、-CH₂-、または上記式（B-2）で表される基である。構造の簡便化等の観点から、Yは、-NH-、-O-、または-CH₂-であってもよい。あるいは、炭素原子を基調とした構造の設計等の観点からは、Yは、-CH₂-、または上記式（B-2）で表される基であってもよい。

40

【0199】

Zは、酸素原子、硫黄原子、または水素原子であるが、好ましくは酸素原子または硫黄原子である。

【0200】

VおよびV'は、-NH-、-O-、-CH₂-、または単結合であり、好ましくは-CH₂-、または単結合である。

【0201】

50

V 1 は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基である。このような 2 価の基は、上述したものと同様である。

【0202】

好ましくは、V 1 における 2 価の基は、置換されていてもよい 2 価の炭化水素基、または置換されていてもよい 2 価の複素環基である。2 価の炭化水素基の定義、例および好ましい例は、上述したものと同様であるが、V 1 の場合、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、シクロアルキレン、シクロアルケニレン、シクロアルキニレン、アリーレンが好ましい。例えば、生体直交性官能基を含有する部分で置換されていない場合、アルケニレン、アルキニレン、シクロアルケニレン、シクロアルキニレンが好ましい。一方、生体直交性官能基を含有する部分で置換されている場合、アルキレン、シクロアルキレン、アリーレンが好ましい。これらの基の例および好ましい例は、上述したとおりである。2 価の複素環基の定義、例および好ましい例は、上述したものと同様であるが、V 1 の場合、5 員または 6 員の複素環基が好ましい。5 員または 6 員の複素環基の例および好ましい例は、上述したものと同様である。置換基の定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。V 1 は、(a) 生体直交性官能基を、例えば 1～5 個、好ましくは 1～3 個、より好ましくは 1 個または 2 個、さらにより好ましくは 1 個有していてもよい。2 価の基に含まれる生体直交性官能基の数が複数である場合、複数の生体直交性官能基は、同種であっても異種であってもよい。単純な構造の採用、および反応性の向上等の観点では、同種であることが好ましい。差別化された反応の確保等の観点では、異種であることが好ましい。V 1 はまた、(b) 置換基を 1～5 個、好ましくは 1～3 個、より好ましくは 1 もしくは 2 個を有していてもよい。

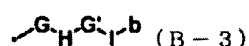
【0203】

s は、0～10 の任意の整数であり、好ましくは 0～8 の整数であり、より好ましくは 0～6 の整数であり、さらにより好ましくは 0～4 の整数であり、特に好ましくは 0、1 または 2 である。

【0204】

さらに特定の実施形態では、V 1 は、下記式 (B-3)：

【化37】



(式中、

G および G' は、同一または異なって、 ---NH--- 、 ---O--- 、 $\text{---CH}_2\text{---}$ 、単結合、または下記式 (B-4)：

【化38】



(式中、

W および W' は、同一または異なって、 ---NH--- 、 ---O--- 、 $\text{---CH}_2\text{---}$ 、または単結合であり、

W1 は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であり、

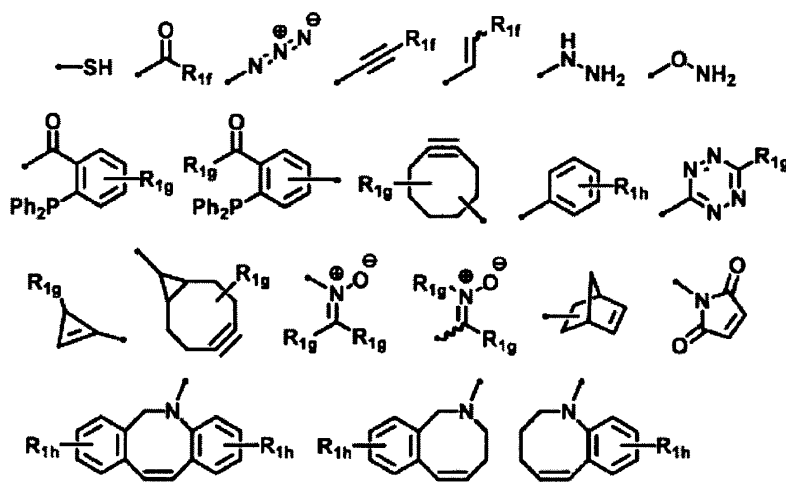
t は、0～10 の任意の整数である。

式 (B-4) における ○ (白丸) は、式 (B-3) における結合手 (・) の方向に対する結合を示し、● (黒丸) は b 側の方向に対する結合を示す。) で表される基であり、

H は、 $\text{---CH}_2\text{---}$ 、 ---C=O--- 、 ---C=S--- 、 ---NH--- 、または単結合であり、

I は、2 価の炭化水素基、2 価の複素環、または単結合であり、

b は、下記：
【化 3 9】



10

(式中、

R_{1f} 、単一もしくは複数の R_{1g} および単一もしくは複数の R_{1h} は、同一もしくは異なって、前記 (i) ~ (vii) からなる群より選ばれる原子もしくは基、または電子吸引基であり、

20

・は、結合手である。) で表されるいずれか一つの基である。) で表される基を側鎖として有する 2 価の基であってもよい。このような 2 価の基は、2 価の炭化水素基、または 2 価の複素環基であり、好ましくは、置換されていてもよい 2 価の炭化水素基であり、より好ましくは、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、シクロアルキレン、シクロアルケニレン、シクロアルキニレン、またはアリーレンであり、さらより好ましくは、アルキレン、シクロアルキレン、またはアリーレンであり、特に好ましくはアルキレンである。これらの基の例および好ましい例は、上述したとおりである。これらの基は、上記側鎖以外の置換基で置換されていてもよい。このような置換基の数は、1 ~ 5 個、好ましくは 1 ~ 3 個、より好ましくは 1 もしくは 2 個である。置換基の例および好ましい例は、上述したとおりである。

30

【0205】

G および G' は、同一または異なって、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、単結合、または上記式 (B-4) で表される基である。構造の簡便化等の観点から、G および G' は、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、または単結合であってもよい。あるいは、炭素原子を基調とした構造の設計等の観点からは、G および G' は、 $-CH_2-$ 、単結合、または上記式 (B-4) で表される基であってもよい。

【0206】

H は、 $-CH_2-$ 、 $-C=O-$ 、 $-C=S-$ 、 $-NH-$ 、または単結合である。好ましくは、H は、 $-CH_2-$ 、または単結合である。

40

【0207】

I は、2 価の炭化水素基、2 価の複素環、または単結合である。2 価の炭化水素基、および 2 価の複素環は、置換基で置換されていても、置換されていなくてもよい。2 価の炭化水素基、2 価の複素環、および置換基の定義、例および好ましい例は、V1 において上述したものと同様である。

【0208】

W および W' は、同一または異なって、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、または単結合であり、好ましくは $-CH_2-$ 、または単結合である。

【0209】

50

W1は、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または(b) 生体直交性官能基を含まない2価の基である。このような2価の基は、上述したものと同様である。

【0210】

tは、0～10の任意の整数であり、好ましくは0～8の整数であり、より好ましくは0～6の整数であり、さらにより好ましくは0～4の整数であり、特に好ましくは0、1または2である。

【0211】

1-5. 反応性基(R)

式(I)において、Rは、可溶性タンパク質に対する反応性基である。このような反応性基は、当該技術分野において技術常識である。

【0212】

反応性基は、生体直交性官能基と同種または異種の基である。

【0213】

例えば、Bが、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基である場合、反応性基は、その生体直交性官能基と異種の基であってもよい。反応性基が生体直交性官能基と同種の基であれば、可溶性タンパク質に対する反応性基の反応特異性が確保されないためである。また、そもそも生体直交性官能基は、可溶性タンパク質を構成する天然の20種のアミノ酸残基の側鎖と反応し得ない基のためである。

【0214】

より具体的には、タンパク質を構成する上述したような天然の20種のアミノ酸のうち、側鎖がないグリシン、ならびに側鎖が炭化水素基であるアラニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、およびバリンは、通常の反応に対して不活性である。したがって、タンパク質に対する反応性基は、アスパラギン、グルタミン、メチオニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、およびリジンからなる14種のアミノ酸のいずれか1種または2種以上(例、2種、3種、4種)の側鎖に対して反応できる基である。タンパク質のアミノ酸組成等の条件に応じて、1種または2種以上(例、2種、3種、4種)の反応性基が式(I)で表される化合物に含まれていてもよいが、好ましくは、1種の反応性基が式(I)で表される化合物に含まれていてもよい。

【0215】

好ましくは、反応性基は、タンパク質を構成する上述したような14種のアミノ酸のうちのいずれか1種のアミノ酸の側鎖と反応できる基である。

【0216】

より好ましくは、反応性基は、リジン、チロシン、トリプトファン、またはシステインのいずれか1種のアミノ酸の側鎖に対して特異的な反応性基であってもよい。

【0217】

さらにより好ましくは、反応性基は、リジン、チロシン、またはトリプトファンのいずれか1種のアミノ酸の側鎖に対して特異的な反応性基であってもよい。

【0218】

また、タンパク質がヒトIgG1等のヒトIgGである場合、反応性基は、リジンまたはチロシンの側鎖に対して特異的な反応性基であることが好ましい。

【0219】

リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基は、リジン残基の側鎖中に存在するアミノ基(NH₂)と特異的に反応できる基であり、例えば、活性化エステル残基(例、N-ヒドロキシスクシンイミド残基)、ビニルスルホン残基、スルホニルクロライド残基、イソシアネート残基、イソチオシアネート残基、アルデヒド残基、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸残基、2-イミノ-2-メトキシエチル残基、ジアゾニウムテレフタル酸残基が挙げられる。

【0220】

リジン残基の側鎖に対して特異的な上述の反応性基と、リジン残基の側鎖中に存在する

10

20

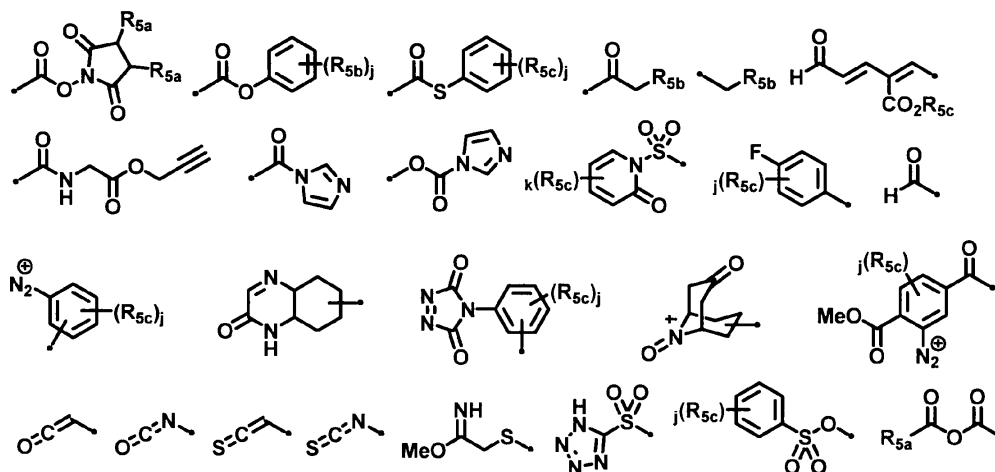
30

40

50

【 0 2 2 1 】

【化 4 0】



k は、1～4の任意の整数である。]

【 0 2 2 2 】

【 0 2 2 3 】

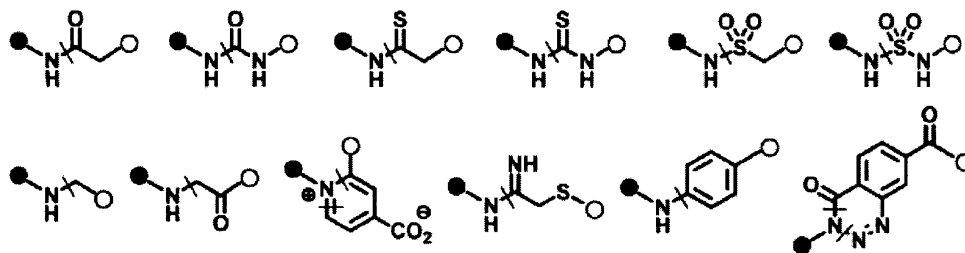
【 0 2 2 4 】

【 0 2 2 5 】

【 0 2 2 6 】

リジン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である上記化学構造と、リジン残基の側鎖中に存在するアミノ基（ NH_2 ）との間の反応により生成する連結部分は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

【化 4 1】



〔ここで、●（黒丸）は、T側の部分に対する結合を示し、○（白丸）は、B側の部分に対する結合を示す。結合に直交する直線は、反応により生成する結合を示す。〕

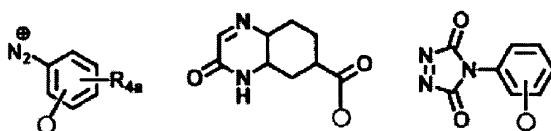
【0227】

チロシン残基の側鎖に対して特異的な反応性基は、チロシン残基の側鎖中に存在するフェノール性ヒドロキシル基（OH）のオルト位の原子と特異的に反応できる基であり、例えば、ジアゾニウム残基、ジアゾジカルボキレート残基、2,3-ジヒドロ-1H-ピラジン-6-オン残基が挙げられる。

【0228】

より具体的には、チロシン残基の側鎖に対して特異的な反応性基は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応しているもよい。

【化 4 2】



〔ここで、R_{4a}は、水素原子、または上述した置換基であり、○は、Bに対する結合を示す。〕

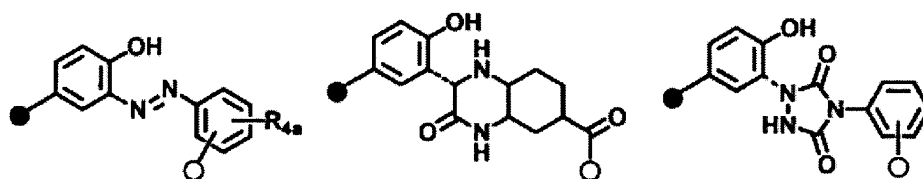
【0229】

R_{4a}は、水素原子、または上述した置換基である。置換基の定義、例、および好ましい例は、上述したものと同様である。

【0230】

チロシン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である上記化学構造と、チロシン残基の側鎖中に存在するフェノール性ヒドロキシル基（OH）のオルト位の原子との間の反応により生成する連結部分は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応しているもよい。

【化 4 3】



〔ここで、R_{4a}は、水素原子、または上述した置換基であり、●は、Tに対する結合を示し、○は、Bに対する結合を示す。〕

【0231】

R_{4a}は、水素原子、または上述した置換基である。置換基の定義、例、および好ましい例は、上述したものと同様である。

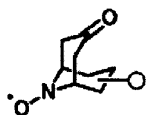
【0232】

トリプトファン残基の側鎖に対して特異的な反応性基は、トリプトファン残基の側鎖中に存在するインドール基の3位の環構成原子と特異的に反応できる基であり、例えば、9-アザビシクロ[3.3.1]ノナン-3-オン-N-オキシル残基が挙げられる。

【0233】

より具体的には、トリプトファン残基の側鎖に対して特異的な反応性基は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

【化44】



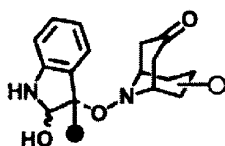
10

〔ここで、○は、Bに対する結合を示す。〕

【0234】

トリプトファン残基の側鎖に対して特異的な反応性基である上記化学構造と、トリプトファン残基の側鎖中に存在するインドール基の3位の環構成原子との間の反応により生成する連結部分は、下記からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応していてもよい。

【化45】



20

〔ここで、●は、Tに対する結合を示し、○は、Bに対する結合を示す。〕

【0235】

特に好ましくは、反応性基は、リジンの側鎖に対して特異的な反応性基であってもよい。

【0236】

1-6. 部分構造「L-B」

1-6-1. AおよびRを連結する部分構造「L-B」中の主鎖の長さ

式(I)において、A(親和性物質)およびR(反応性基)を連結する主鎖(L-B中の直鎖部分)の長さは、可溶性タンパク質および親和性物質の種類、ならびに可溶性タンパク質における親和性物質の標的部位と、Rが反応して結合すべきである、上述したような標的領域(例、特定の位置)中の特定のアミノ酸残基の位置および数との関係などの種々の因子に応じて、適宜設計することができる。式(I)で表される化合物は、親和性物質が可溶性タンパク質に会合し、次いで、L-Bを介して親和性物質と共有結合している反応性基が、上記標的部位の近傍に存在する特定のアミノ酸残基の側鎖中の基(例、リジン残基の側鎖中のアミノ基)と反応することにより、可溶性タンパク質と共有結合することができる。このとき、Rが反応して結合すべきである特定のアミノ酸残基の近傍領域、上記標的部位の近傍領域、および当該特定のアミノ酸残基と上記標的部位との間の領域において当該特定のアミノ酸残基が他に存在しない場合、主鎖の長さを厳密に制御せずとも、反応性基は、当該特定のアミノ酸残基に対して位置選択的に結合することができる。勿論、このような領域において当該特定のアミノ酸残基が他に存在する場合であっても、主鎖の長さを制御することにより、反応性基は、当該特定のアミノ酸残基に対して位置選択的に結合することができる。

30

40

【0237】

AおよびRを連結する主鎖の長さは、可溶性タンパク質およびそれに対する親和性物質の種類、ならびに可溶性タンパク質中の標的部位中の特定のアミノ酸残基の位置および数

50

の関係などの因子に応じて変動し得るが、約 5 Å 以上、好ましくは約 7.5 Å、より好ましくは約 10.5 Å 以上であってもよい。このような主鎖の長さはまた、例えば約 30 Å 以下、好ましくは約 23 Å 以下、より好ましくは約 16.5 Å 以下であってもよい。より具体的には、このような主鎖の長さは、例えば約 5.0～30 Å、好ましくは約 7.5～23 Å、より好ましくは約 10.5～16.5 Å であってもよい。

【0238】

ところで、原子間の長さ（距離）の関係については、下表のとおりであることが、当該技術分野における技術常識である。したがって、当業者であれば、下表の原子間の長さを参考にして、上述したような主鎖の長さ（Å）に対応する個数の原子を有する主鎖を適宜設計することができる。

【0239】

【表1】

表1. 直鎖アルキレンにおける両末端の炭素原子間の長さ（距離）の関係

	長さ (Å)
直鎖アルキレン	
CH ₂ —CH ₂ (C2)	約1.5
CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ (C3)	約3.0
C4	約4.5
C5	約6.0
C6	約7.5
C7	約9.0
C8	約10.5
C9	約12.0
C10	約13.5
直鎖アルケニレン	
CH=CH	約1.5

【0240】

より具体的には、AおよびRを連結する主鎖の長さは、主鎖（水素原子および置換基を除く）を構成する原子数として規定することもできる。主鎖を構成する原子数は、例えば4個（約5.0 Å）以上、好ましくは6個（約7.5 Å）、より好ましくは8個（約10.5 Å）以上であってもよい。主鎖の原子数はまた、例えば20個（約30 Å）以下、好ましくは16個（約23 Å）以下、より好ましくは12個（約16.5 Å）以下であってもよい。より具体的には、主鎖の原子数は、例えば4～20個、好ましくは6～16個、より好ましくは8～12個であってもよい。

【0241】

主鎖が環構造を含まない構造である場合、主鎖の原子数は、鎖状構造中の原子数を数えることにより決定することができる。

【0242】

一方、主鎖が環構造を含む構造である場合、主鎖の原子数と上述した長さとは必ずしも対応せず、主鎖の原子数により規定され得る長さは、上述した長さよりも短くなる傾向がある。このような場合であっても、主鎖の長さを規定する観点から、主鎖の原子数を便宜的に数えることができる。具体的には、このような場合における主鎖の原子数は、主鎖において2価の環構造を含まない鎖状構造中の原子数に加えて、環構造中の2つの結合手を連絡する最短経路の原子数を数えることにより決定することができる（例えば、以下（a）～（d）の太字経路を参照）。

10

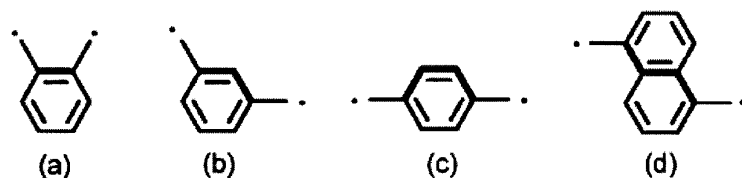
20

30

40

50

【化 4 6】



・は、結合手である。

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

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

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

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

【0 2 4 3】

好ましくは、L-B で表される A と R との連結部分（側鎖を除く）は、2 価の環構造を含まない鎖状構造であってもよい。この場合、L-B で表される A と R との連結鎖部分において 2 価の環基が含まれないように L および B を適宜設計することができる。

【0 2 4 4】

1-6-2. 部分構造「L-B」の具体的構造

上記式 (I) において、L および B は、互いに関連し得る構造である。したがって、上記式 (I) において、L および B は、「L-B」で表される部分構造として規定することができる。

【0 2 4 5】

一実施形態では、切断性リンカーは、(i) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカー、もしくは (i i) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカーであってもよい。

【0 2 4 6】

特定の実施形態では、L が上記 (i) の切断性リンカーである場合、B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基である。

【0 2 4 7】

好ましくは、L が上記 (i) の切断性リンカーである場合、B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基である。この場合、(i) において生成される生体直交性官能基は、(a) における生体直交性官能基と同種であっても異種であってもよい。より単純な構造の採用、および/または単一の機能性物質に対する反応性の向上等の観点では、(i) において生成される生体直交性官能基は、(a) における生体直交性官能基と同種であってもよい。一方、2 種以上の機能性物質に対する差別化された反応性の確保、および反応における一部の生体直交性官能基の不使用等の観点では、(i) において生成される生体直交性官能基は、(a) における生体直交性官能基と異種であってもよい。

【0 2 4 8】

あるいは、L が上記 (i) の切断性リンカーである場合、B は、(b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であってもよい。この場合、式 (I) で表される化合物またはその塩は、より単純な構造を有することになるので、合成が容易である。

【0 2 4 9】

別の特定の実施形態では、L が上記 (i i) の切断性リンカーである場合、B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基である。

【0250】

特定の実施形態では、L-Bで表される部分構造は、好ましくは、ペプチド部分を含まない。この場合、本発明の化合物を用いて得られる本発明の機能性物質を有する可溶性タンパク質（例、抗体薬物複合体）は、免疫原性を有し得るペプチド部分をリンカーとして含み得ないという利点がある。

【0251】

特定の実施形態では、「L-B」で表される部分構造は、AおよびRを連結する主鎖（L-B中の直鎖部分）の中心位置に存在する原子（例、主鎖を構成する原子数が奇数の場合）、または当該主鎖の中心位置に存在する結合部位（例、主鎖を構成する原子数が偶数の場合）を基準として、対称構造〔例、シス型（すなわち、Z）、トランス型（すなわち、E）〕を有していてもよい。例えば、中心位置に存在する結合部位を、上述したような切断リンカー中の切断性部分として設計することもできる。「L-B」で表される部分構造が対称構造を有する場合、「L-B」で表される部分構造は、容易に合成することができる。例えば、反応して切断性部分を形成できる官能基を一方の末端に有する同じ2価の基（例、SH基を一方の末端に有する鎖状の2価の基）を互いに反応させることにより、主鎖の中心位置に切断性部分を含む対称構造（鎖状の2価の基-S-S-鎖状の2価の基）を実現することができる。

【0252】

したがって、「L-B」で表される部分構造は、「B2-L'-B1」で表される部分構造（すなわち、Lが、B2-L'で表される2価の基であり、BがB1である。）であっててもよい。この場合、上記式（I）で表される化合物は、下記式（I'）で表される化合物として規定することができる。



〔式中、

AおよびRは、前記式（I）のものと同一であり

L'は、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

B1およびB2は、同一または異なって、（a）生体直交性官能基を含む2価の基、または（b）生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

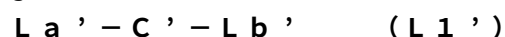
B1およびB2は、L'を中心にした対称構造を有していてもよい。〕

【0253】

B1およびB2は、同一または異なって、Bの定義、例および好ましい例と同様である。

【0254】

特定の実施形態では、L'は、下記式（L1'）～（L3'）のいずれか一つで表されてもよい：



〔式中、

La'およびLb'は、それぞれ、2価の基であり、

C'は、切断性部分である。〕

【0255】

La'およびLb'で表される2価の基は、それぞれ、La'およびLb'で表される2価の基の定義、例および好ましい例と同様である。

【0256】

C'で表される切断性部分は、Cで表される切断性部分の定義、例および好ましい例と同様である。

【0257】

別の特定の実施形態では、L-Bで表される構造単位は、下記式（LB'）で表されてもよい。

10

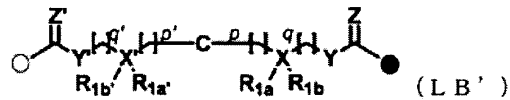
20

30

40

50

【化 4 7】



〔式中、

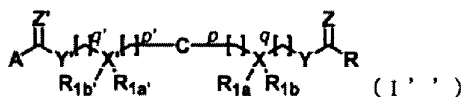
C、p、p'、q、q'、X、X'、 Δ R、R_{1a}、R_{1b}、R_{1b}、Y、Y'、ZおよびZ'の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

○（白丸）は、Aに対する結合を示し、●（黒丸）は、Rに対する結合を示す。〕

【0258】

したがって、上記式（I）は、下記式（I'）として規定することができる。

【化 4 8】



〔式中、

A、R、C、p、p'、q、q'、X、X'、 Δ R、R_{1b}、R_{1a}、R_{1b}、Y、Y'、ZおよびZ'の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一である。〕

【0259】

上記式（LB'）および（I'）において、C=ZにおけるC（炭素原子）からC=Z'におけるC（炭素原子）までの長さは、AおよびRを連結する主鎖の長さと同様である。これらの式において、C=ZにおけるCからC=Z'におけるCまでの長さはまた、C=ZにおけるCからC=Z'におけるCを連結する部分構造の連結鎖（水素原子および置換基を除く）を構成する原子数として規定することもできる。このような原子数は、AおよびRを連結する主鎖を構成する原子数と同様である。C=ZにおけるCからC=Z'におけるCを連結する部分構造の連結鎖（水素原子および置換基を除く）は、環構造を含んでいなくても含んでいてもよいが、環構造を含んでいないことが好ましい。当該連結鎖（水素原子および置換基を除く）は、好ましくは、ペプチド部分を含まないものであってもよい。

【0260】

1-8. 製造方法

可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩は、適宜調製することができる。可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物は、式（I）、好ましくは式（I'）、より好ましくは式（I'）で表される。

【0261】

親和性物質としては、任意の官能基を有するものを適宜選択することができる。したがって、当該官能基と反応することができる反応性基を利用することにより、親和性物質を、L-B-Rで表される構造単位、またはR-L-B-Rで表される構造単位（2つの反応性基は同一または異なる）と反応させて、A-L-B-Rで表される構造単位を調製することができる。例えば、このような反応は、適切な反応系、例えば有機溶媒系または水溶液系において、適温（例、約15～200℃）で行うことができる。反応系は、適切な触媒を含んでいてもよい。反応時間は、例えば1分～20時間、好ましくは10分～15時間、より好ましくは20分～10時間、さらにより好ましくは30分～8時間である。

【0262】

反応系において、親和性物質（X）に対する、L-B-Rで表される構造単位、またはR-L-B-Rで表される構造単位（Y）のモル比率（Y/X）は、当該構造単位および

親和性物質の種類、当該構造単位によって修飾されるべき親和性物質中の部位の数等に応じて変動することから特に限定されないが、例えば0.1～50であり、好ましくは0.5～40であり、より好ましくは1～35であり、さらにより好ましくは2～25であり、特に好ましくは3～15である。

【0263】

可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC）、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩は、クロマトグラフィー（例、上述したクロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィー）等の任意の方法により適宜精製することができる。

【0264】

1-9. その他

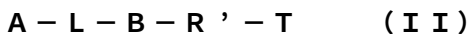
後述の発明〔例、式（II）～（v）およびその下位概念の式、ならびに部分構造式（例、（L1）～（L3）、（La'）、（Lb'）、（B-1）～（B-4））で表される発明〕では、任意の記号（例、A、L、B、R）、当該記号で表される用語、およびそれらの詳細（例えば、定義、例および好ましい例）は、上記式（I）で表される化合物またはその塩の発明と共通する。また、後述の発明を規定することができる特定の部分（例、切断性部分、切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する部分）、特定の基（例、生体直交性官能基、2価の基、アルキル基、置換基、電子吸引基）、および特定の数値、ならびに塩等の任意の技術要素（例、定義、例および好ましい例）についても、上記で説明したものと共通にすることができる。したがって、これらの事項は、特に言及することなく、後述の発明において適宜援用することができる。同様に、後述の発明で述べた特定の発明の技術要素は、本発明および他の発明の技術要素として、適宜援用することができる。

【0265】

2. 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩

2-1. 概要

本発明は、式（II）で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を提供する。



〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、（a）生体直交性官能基を含む2価の基、または（b）生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質である。〕

【0266】

2-2. 可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分（R'）

可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分において、可溶性タンパク質および反応性基の定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分は、当該技術分野において技術常識であり、可溶性タンパク質および反応性基の種類に応じて適宜決定することができる。

【0267】

好ましくは、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分は、可溶性タンパク質に含まれ得る14種のアミノ酸（アスパラギン、グルタミン、メチオニン、プ

ロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、およびリジン)のうちのいずれか1種のアミノ酸の側鎖と、それに対する反応性基との間の反応により生成する部分である。

【0268】

より好ましくは、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分は、リジン、チロシン、トリプトファン、またはシステインのいずれか1種のアミノ酸の側鎖と、それに対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であってもよい。

【0269】

さらに好ましくは、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分は、リジン、チロシン、またはトリプトファンのいずれか1種のアミノ酸の側鎖と、それに対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であってもよい。リジン、チロシン、またはトリプトファンのいずれか1種のアミノ酸の側鎖と、それに対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分としては、例えば、上記「1-5. 反応性基(R)」で述べた連結部分および/または化学構造が挙げられる。

【0270】

さらに一層好ましくは、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分は、リジンまたはチロシンの側鎖と、それに対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であってもよい(特に、可溶性タンパク質がヒトIgG1等のヒトIgGである場合)。リジンまたはチロシンの側鎖と、それに対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分としては、例えば、上記「1-5. 反応性基(R)」で述べた連結部分および/または化学構造が挙げられる。

【0271】

特に好ましくは、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分は、リジンの側鎖と、それに対して特異的な反応性基との間の反応により生成する部分であってもよい。

【0272】

2-3. 部分構造「L-B」

部分構造「L-B」の詳細は、上記「1-6. 部分構造「L-B」」で述べたとおりである。

【0273】

特定の実施形態では、「L-B」で表される部分構造は、「B2-L'-B1」で表される部分構造(すなわち、Lが、B2-L'で表される2価の基であり、BがB1である。)であってもよい。この場合、上記式(II)で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩は、下記式(II')で表されることができる。

$A-B2-L'-B1-R'-T$ (II')

〔式中、

A、R'およびTは、前記式(II)のものと同一であり

L'は、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

B1およびB2は、同一または異なって、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

B1およびB2は、L'を中心にした対称構造を有していてもよい。〕

【0274】

上記式(II')において、L'は、上述した式(L1')~(L3')のいずれか一つで表されてもよい。

【0275】

別の特の実施形態では、L-Bで表される構造単位は、下記式(LB')で表されてもよい。

10

20

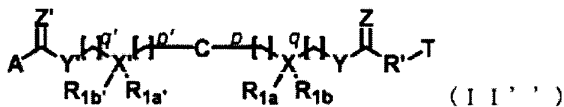
30

40

50

$$\begin{array}{c} \text{Z'} \\ || \\ \circ - C - Y^{q'} - X^{p'} - C - p - q - Y - C = Z \\ | \quad | \quad | \quad | \\ R_{1b}' \quad R_{1a}' \quad R_{1a} \quad R_{1b} \end{array} \quad (\text{LB}') \quad (7)$$

【化 5 0】



50

により達成することができる。

【0280】

具体的には、Tが、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む場合、可溶性タンパク質以外の部分構造は、当該標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合させることができる。標的領域および位置選択性の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

【0281】

2-5. 可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数

可溶性タンパク質(T)が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造(例、A-L-B-R')の個数は、変動することができる。例えば、Tが複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質である場合、Tは、複数の単量体タンパク質中の対応する複数の標的領域において、T以外の部分構造を有することができる。その結果、Tは、T以外の部分構造を複数個有することができる。したがって、式(II)、(II')、または(II'')で表される構造は、Tが、T以外の部分構造を1個または複数個有していてもよいことを示す。Tが有する、T以外の部分構造の個数は、可溶性タンパク質の種類、および可溶性タンパク質とそれに対して導入される構造単位との反応比率等の条件を適宜設定することで調節することができる。このような個数は、可溶性タンパク質の種類によっても異なるが、例えば1～8、好ましくは1～4、より好ましくは1または2であってもよい。

【0282】

特定の実施形態では、可溶性タンパク質が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数は、可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質から構成される多量体タンパク質である場合、複数個であってもよい。本発明によれば、複数の単量体タンパク質の同一標的領域に対して可溶性タンパク質以外の部分構造を複数個導入することができる。

【0283】

好ましい実施形態では、可溶性タンパク質は、複数の重鎖を含む抗体であってもよい。抗体の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。重鎖の個数は、抗体の種類によって異なる。例えば、IgG、IgE、およびIgDは、2個の重鎖を有することができる。IgAは、2個または4個の重鎖を有することができる。IgMは、8個の重鎖を有することができる。抗体(可溶性タンパク質)が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、DARと同義のものとして考慮することができる。本発明では、抗体が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、IgG、IgE、およびIgDについては1個または2個(好ましくは2個)であり、IgAについては1～4個(好ましくは4個)であり、IgMについては1～8個(好ましくは8個)であってもよい。

【0284】

2-6. 製造方法

本発明は、以下を含む、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

(A1) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩を可溶性タンパク質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

【0285】

可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物は、式(I)、好ましくは式(I')、より好ましくは式(I'')で表される。可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質は、式(II)、好ましくは式(II')、より好ましくは式(II'')で表される。

【0286】

可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩は、反応性基を有するため、可溶性タンパク質と反応することができる。このよう

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

【0287】

反応系において、可溶性タンパク質（X）に対する、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩（Y）のモル比率（Y/X）は、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物および可溶性タンパク質（例、抗体）の種類、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物によって修飾されるべき可溶性タンパク質中の部位の数（例、DAR）等に応じて変動することから特に限定されないが、例えば0.1～100であり、好ましくは0.5～80であり、より好ましくは1～70であり、さらにより好ましくは2～50であり、特に好ましくは3～30である。

【0288】

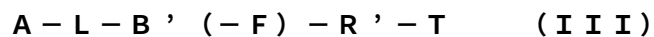
可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC）、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。位置選択性の確認は、例えば、ペプチドマッピングにより行うことができる。ペプチドマッピングは、例えば、プロテアーゼ（例、トリプシン、キモトリプシン、）処理および質量分析により行うことができる。プロテアーゼとしては、エンドプロテアーゼが好ましい。このようなエンドプロテアーゼとしては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、Glu-C、Lys-N、Lys-C、Asp-Nが挙げられる。可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数の確認は、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩は、クロマトグラフィー（例、上述したクロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィー）等の任意の方法により適宜精製することができる。

【0289】

3. 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩

3-1. 概要

本発明は、式（III）で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を提供する。



〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

Fは、機能性物質であり、

10

20

30

40

50

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、
T は、可溶性タンパク質である。) で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、
切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩。

【0290】

式 (III) または他の式において、R' は、F ではなく、B' に共有結合している。

【0291】

3-2. 機能性物質 (F)

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

【0292】

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

【0293】

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

【0294】

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

【0295】

機能性物質はまた、高分子化合物、中分子化合物、または低分子化合物であり、好ましくは、低分子化合物である。低分子化合物とは、分子量1500以下の化合物をいう。低

10

20

30

40

50

分子化合物は、天然化合物または合成化合物である。低分子化合物の分子量は、1200以下、1000以下、900以下、800以下、700以下、600以下、500以下、400以下、または300以下であってもよい。低分子化合物の分子量はまた、30以上、40以上、または50以上であってもよい。低分子化合物は、上述したような薬物または標識物質であってもよい。また、低分子化合物としては、例えば、アミノ酸、オリゴペプチド、ビタミン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、単糖、オリゴ糖、脂質、脂肪酸、およびそれらの塩が挙げられる。

【0296】

3-3. 機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基(B')

B'は、(a)の生体直交性官能基が機能性物質と反応していることを除き、上述したBにおける(a)生体直交性官能基を含む2価の基と同様である。したがって、B'における2価の基および直交性官能基の定義、例および好ましい例は、Bにおけるものと同様である。

【0297】

機能性物質は、その構造に応じた種々の官能基を有する。機能性物質が、生体直交性官能基と反応し易い官能基を有する場合、機能性物質の当該官能基と生体直交性官能基とを適宜反応させることができる。生体直交性官能基と反応し易い官能基は、生体直交性官能基の具体的な種類によっても異なり得る。当業者であれば、適切な官能基を、生体直交性官能基と反応し易い官能基として適宜選択することができる。生体直交性官能基と反応し易い官能基としては、例えば、生体直交性官能基がチオールの場合はマレイミドおよびジスルフィドが挙げられ、生体直交性官能基がアルキンの場合はアジドが挙げられ、生体直交性官能基がアルデヒドまたはケトンの場合はヒドラジンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0298】

一方、機能性物質が、生体直交性官能基と反応し易い官能基を有しない場合、機能性物質として、所望の官能基を有するように誘導体化されたものを使用することができる。例えば、機能性物質が可溶性タンパク質である場合、可溶性タンパク質が天然に有しない官能基を有するように誘導体化されたものを使用することができる。この場合、可溶性タンパク質の誘導体化は、本発明の方法により行われてもよい。この場合、所望の生体直交性官能基を位置選択的に有するように誘導体化された可溶性タンパク質を、機能性物質として使用することができる。

【0299】

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

【0300】

機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む２価の基において、機能性物質および生体直交性官能基の定義、例および好ましい例は、上述したとおりである。機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分は、当該技術分野において技術常識であり、機能性物質（機能性物質が誘導体化されている場合、その誘導体化部分）および生体直交性官能基の種類に応じて適宜決定することができる。

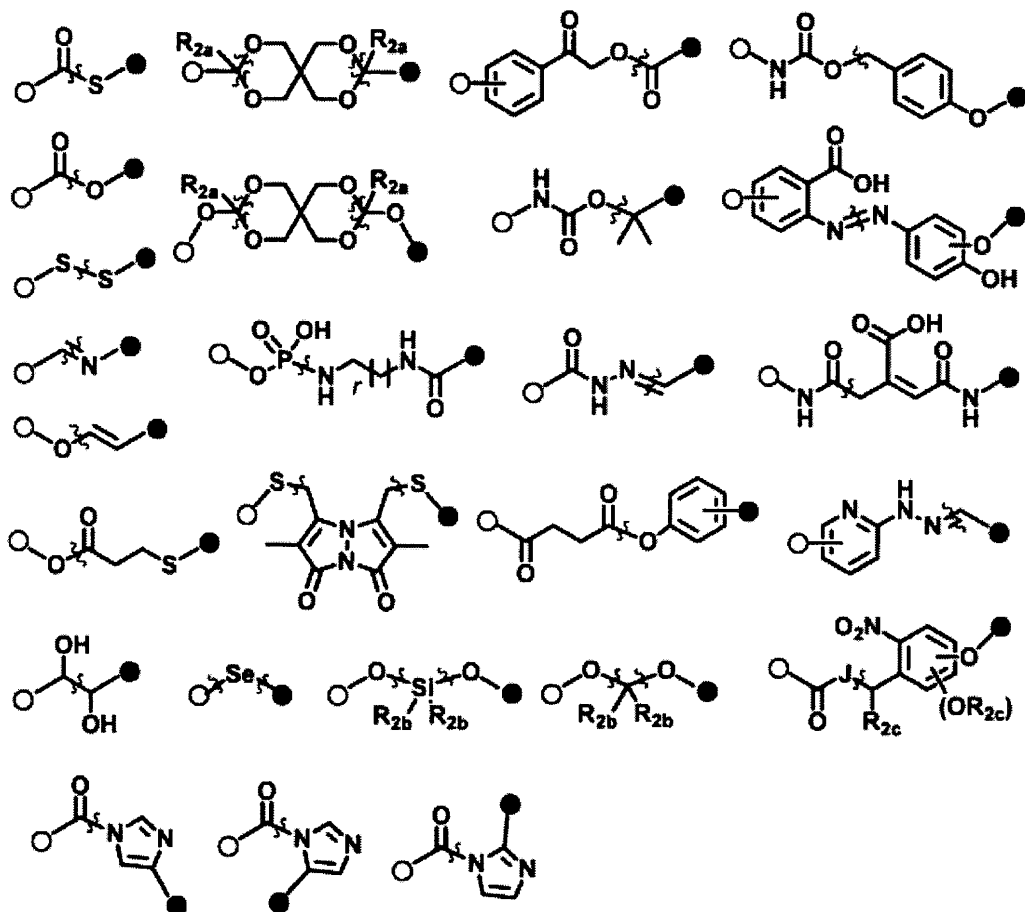
【０３０１】

機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む２価の基は、特に限定されるわけではないが、例えば、ジスルフィド残基、アセタール残基、ケタール残基、エステル残基、カルバモイル残基、アルコキシアルキル残基、イミン残基、三級アルキルオキシカルバメート残基、シラン残基、ヒドラゾン含有残基、フォスフォルアミデート残基、アコニチル残基、トリチル残基、アゾ残基、ビシナルジオール残基、セレン残基、電子吸引基を有する芳香族環含有残基、クマリン含有残基、スルホン含有残基、不飽和結合含有鎖残基、グリコシル残基からなる群より選ばれる残基を含む２価の基であってもよい。

【０３０２】

機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む２価の基はまた、特に限定されるわけではないが、例えば、下記：

【化５１】



〔ここで、結合に直交する波線は、反応により生成する結合を示し、

複数の R_{2a} 、複数の R_{2b} 、および複数の R_{2c} は、同一または異なって、上述した水素原子または置換基であり、

J は、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、または $-S-$ であり、

r は、 $1 \sim 4$ の任意の整数であり、

○（白丸）は F 側の部分に対する結合を示し、●（黒丸）は B' 側の部分に対する結合を示す。

化学構造が、切断性部分を中心にして非対称である場合、●がB'側の部分に対する結合を示し、○がF側の部分に対する結合を示していてもよい。) からなる群より選ばれるいずれか一つの化学構造に対応する残基を含む2価の基であってもよい。

【0303】

3-4. 部分構造「L-B'(-F)」

部分構造「L-B'(-F)」の詳細は、BがB'(-F)に変更されていることを除き、上記「1-6. 部分構造「L-B」」で述べたとおりである。

【0304】

一実施形態では、切断性リンカーは、(i) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む2価の基である切断性リンカー、もしくは(i i) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであってもよい。

10

【0305】

特定の実施形態では、切断性リンカーは、上記(i i)の切断性リンカーであってもよい。既にB'は機能性物質(F)と結合しているため、生体直交性官能基を反応性基側に生成する必要がないためである。

【0306】

別の特定の実施形態では、L-B'(-F)で表される部分構造は、B2'(-F2)-L'-B1'(-F1)で表される部分構造(すなわち、Lは、B2'(-F2)-L'であり、B'は、B1'である。)であってもよい。この場合、上記式(III)で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩は、下記式(III')で表されることができる。

20

A-B2'(-F2)-L'-B1'(-F1)-R'-T (III')

〔式中、

A、R'およびTは、前記式(III)のものと同一であり、

L'は、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

B1'およびB2'は、同一または異なって、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

F1およびF2は、同一または異なって、機能性物質であり、

B1'(-F1)およびB2'(-F2)は、L'を中心にした対称構造を有していてもよい。〕。

30

【0307】

B1'およびB2'は、同一または異なって、B'の定義、例および好ましい例と同様である。

【0308】

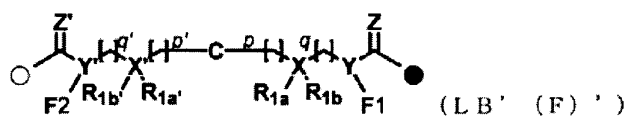
上記式(III')において、L'は、上述した式(L1')~(L3')のいずれか一つで表されてもよい。

【0309】

別の特定の実施形態では、L-B'(-F)で表される構造単位は、下記式(LB'(F)')で表されてもよい。

40

【化52】



〔式中、

C、F1、F2、p、p'、q、q'、X、X'、R、R1a、R1b、R1b、ZおよびZ'の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

50

Y および Y' は、同一または異なって、前記式 (B-1) の Y から水素原子を一つ除いた残基であり、

○ (白丸) は、A に対する結合を示し、● (黒丸) は、R' に対する結合を示す。]

【0310】

より具体的には、Y および Y' における、前記式 (B-1) の Y から水素原子を一つ除いた残基は、-N(-)-、-CH(-)-、または上記式 (B-2) から水素原子を一つ除いた基である。構造の簡便化等の観点から、Y は、-N(-)-、または -CH(-)- であってもよい。あるいは、炭素原子を基調とした構造の設計等の観点からは、Y は、-CH(-)-、または上記式 (B-2) から水素原子を一つ除いた基であってもよい。

【0311】

上記式 (B-2) から水素原子を一つ除いた基は、下記式 (B-2') :

【化53】



(式中、

V および V' は、同一または異なって、-NH-、-O-、-CH2-、または単結合であり、

V1 は、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

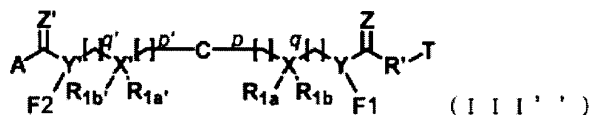
s は、0~10の任意の整数であり、

式 (B-2') における○および●は、それぞれ、式 (B-1) における○および●と同じ配向である。) である。) から水素原子を一つ除いた基である。式 (B-2') における s の定義、例および好ましい例は、式 (B-2) のものと同様である。したがって、式 (B-2') では、V および V' の一方が、-N(-)-、または -CH(-)- であってもよい。あるいは、式 (B-2') では、V1 は、上記 (a) または (b) の2価の基から水素原子が一つ除かれた3価の基であってもよい。あるいは、式 (B-2') では、s 個の -CH2- のうちの一つが -CH(-)- であってもよい。

【0312】

この場合、上記式 (III) は、下記式 (III') として規定することができる。

【化54】



(式中、

A、R、C、F1、F2、p、p'、q、q'、X、X'、R、R1b、R1a、R1b'、Y、Y'、Z および Z' の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一である。]

【0313】

上記式 (LB' (F)') および (III') において、C=Z における C (炭素原子) から C=Z' における C (炭素原子) までの長さは、上述したような A および R を連結する主鎖の長さと同様である。これらの式において、C=Z における C から C=Z' における C までの長さはまた、C=Z における C から C=Z' における C を連結する部分構造の連結鎖 (水素原子および置換基を除く) を構成する原子数として規定することもできる。このような原子数は、A および R を連結する主鎖を構成する原子数と同様である。C=Z における C から C=Z' における C を連結する部分構造の連結鎖 (水素原子および置換基を除く) は

、環構造を含んでいなくても含んでいてもよいが、環構造を含んでいないことが好ましい。当該連結鎖（水素原子および置換基を除く）は、好ましくは、ペプチド部分を含まないものであってもよい。

【0314】

3-5. 可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の結合部位（位置選択性）

可溶性タンパク質以外の部分構造（例、 $A-L-B'$ （ $-F$ ） $-R'$ ）は、可溶性タンパク質（ T ）における上述したような標的領域に位置選択的に結合させることができる。具体的には、 T が、連続する1~50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定の

10

【0315】

3-6. 可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数

可溶性タンパク質（ T ）が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造（例、 $A-L-B'$ （ $-F$ ） $-R'$ ）の個数は、変動することができる。例えば、 T が複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質である場合、 T は、複数の単量体タンパク質中の対応する複数の標的領域において、 T 以外の部分構造を有することができる。その結果、 T は、 T 以外の部分構造を複数個有することができる。したがって、式（ III ）、（ III' ）、または（ III'' ）で表される構造は、 T が、 T 以外の部分構造を1個または複数個有していてもよいことを示す。 T が有する、 T 以外の部分構造の個数は、可溶性タンパク質の種類、および可溶性タンパク質とそれに対して導入される構造単位との反応比率等の条件を適宜設定することで調節することができる。このような個数は、可溶性タンパク質の種類によっても異なるが、例えば1~8、好ましくは1~4、より好ましくは1または2であってよい。

20

【0316】

特定の実施形態では、可溶性タンパク質が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数は、可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質から構成される多量体タンパク質である場合、複数個であってよい。本発明によれば、複数の単量体タンパク質の同一標的領域に対して可溶性タンパク質以外の部分構造を複数個導入することができる。

30

【0317】

好ましい実施形態では、可溶性タンパク質は、複数の重鎖を含む抗体であってよい。抗体の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。本発明では、抗体が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、 IgG 、 IgE 、および IgD については1個または2個（好ましくは2個）であり、 IgA については1~4個（好ましくは4個）であり、 IgM については1~8個（好ましくは8個）であってよい。

【0318】

3-7. 製造方法

本発明は、以下を含む、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の製造方法を提供する：

（ $B1$ ）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成すること。

【0319】

可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質は、式（ II ）、好ましくは式（ II' ）、より好ましくは式（ II'' ）で表される。可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体は、式（ III ）、好ましくは式（ III' ）、より好ましくは式（ III'' ）で表

40

50

される。

【0320】

可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩は、機能性物質に対して反応することができる生体直交性官能基を有するため、機能性物質と反応することができる。このような反応は、上記「2-6. 製造方法」で述べたような、タンパク質の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない条件（温和な条件）下で適宜行うことができる。

【0321】

反応系において、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩（X）に対する機能性物質（Y）のモル比率（Y/X）は、可溶性タンパク質（例、抗体）および機能性物質の種類、機能性物質によって修飾されるべき可溶性タンパク質中の部位の数（例、DAR）等に応じて変動することから特に限定されないが、例えば0.1~100であり、好ましくは0.5~80であり、より好ましくは1~70であり、さらにより好ましくは2~50であり、特に好ましくは3~30である。

【0322】

可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC）、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。位置選択性の確認、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数の確認、および精製は、上記「2-6. 製造方法」で述べた方法により適宜行うことができる。

【0323】

本発明はまた、以下を含む、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の製造方法を提供する：

（B2）可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩を可溶性タンパク質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を生成すること；および

（B3）可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成すること。

【0324】

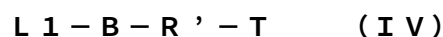
上記（B2）の工程は、上記「2-6. 製造方法」で述べた上記（A1）の工程と同様にして行うことができる。上記（B3）の工程は、上記（B1）の工程と同様にして行うことができる。上記（B2）および（B3）の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記（B2）および（B3）の工程は、可溶性タンパク質中の反応標的である特定のアミノ酸残基と反応性基との反応対、および機能性物質中の官能基と生体直交性官能基との反応対の組合せに応じて、同時に行うことができる。

【0325】

4. 生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩

4-1. 製造方法の概要

本発明は、式（IV）で表される、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。



〔式中、

L1は、（i'）生体直交性官能基を含む1価の基、または（ii'）生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

Bは、（a）生体直交性官能基を含む2価の基、または（b）生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

10

20

30

40

50

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、
T は、可溶性タンパク質である。]

【0326】

4-2. (i') 生体直交性官能基を含む1価の基、または(i i') 生体直交性官能基を含まない1価の基(L1)

式(IV)において、L1は、(i') 生体直交性官能基を含む1価の基、または(i i') 生体直交性官能基を含まない1価の基である。このような1価の基は、上述したような切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーの切断により生成し得る1価の基である。したがって、L1は、上述したような切断性部分の残基または化学構造の切断により生成し得る1価の基であってもよい。より具体的には、(i') 生体直交性官能基を含む1価の基は、上述した(i) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーの切断により生成し得る1価の基であってもよく、(i i') 生体直交性官能基を含まない1価の基は、(i i) 切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーの切断により生成し得る1価の基であってもよい。

10

【0327】

特定の実施形態では、L1は、下記式(L1-1)または(L1-2)のいずれか一つで表されてもよい：

C1-Lb (L1-1)

C1 (L1-2)

20

〔式中、

Lbは、2価の基であり、

C1は、生体直交性官能基、または生体直交性官能基以外の基である。〕

【0328】

2価の基としては、例えば、置換基を有していてもよい2価の炭化水素基、置換基を有していてもよい2価の複素環基、-C(=O)-、-NR_a- (R_aは水素原子、または置換基を示す)、-O-、-S-、-C(=S)-、およびこれらの2以上(例えば2~8、好ましくは2~6、より好ましくは2~4)の組み合わせからなる基が挙げられる。2価の炭化水素基、2価の複素環基、および置換基の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

30

【0329】

生体直交性官能基の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

【0330】

生体直交性官能基以外の基としては、例えば、上述した置換基のうち、生体直交性官能基以外のものが挙げられる。生体直交性官能基以外のこのような基としては、例えば、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、1価の複素環基、ヒドロキシル、アミノ、アルキルオキシ(アルコキシ)、シクロアルキルオキシ、アラルキルオキシ)が挙げられる。これらの基およびこれらの基の構成要素(例、アルキルオキシ(アルコキシ)におけるアルキル、シクロアルキルオキシにおけるシクロアルキル、およびアラルキルオキシにおけるアラルキル)の定義、例および好ましい例については、上述したものと同様である。

40

【0331】

特定の実施形態では、Lbは、下記(Lb')：

【化55】



〔式中、

pは、0~10の任意の整数であり、

50

q は、0～10の任意の整数であり、

X は、炭素原子、窒素原子、または単結合（ここで、X が窒素原子である場合、 R_{1b} は存在しない。X が単結合である場合、 R_{1a} および R_{1b} は存在しない）であり、

R_{1a} 、および R_{1b} は、同一または異なって、水素原子、または上述する置換基からなる群より選ばれる。

○（白丸）は、C1 に対する結合を示し、●（黒丸）は B に対する結合を示す。）で表されてもよい。

【0332】

p、q、および X、ならびに R_{1a} 、および R_{1b} （置換基）の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

【0333】

4-3. 部分構造「L1-B」

4-3-1. L1 末端部分および R' を連結する部分構造「L1-B」の長さ

式 (IV) において、切断により生成した L1 末端部分（または C1 末端部分）および R' を連結する部分構造（「L1-B」中の直鎖部分）の長さ（あるいは、式 (IV) 等の特定の式に限定されない、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩における、生体直交性官能基および特定のアミノ酸残基の側鎖を連結する主鎖の原子数。以下同様）は、上記「1-6-1. A および R を連結する部分構造「L-B」中の主鎖の長さ」で述べたような種々の因子に応じて、適宜設計することができる。

【0334】

切断により生成した L1 末端部分（または C1 末端部分）および R' を連結する部分構造の長さは、例えば約 2.5 Å 以上、好ましくは約 4 Å 以上、より好ましくは約 5 Å 以上であってもよい。部分構造の長さはまた、例えば約 15 Å 以下、好ましくは約 12 Å 以下、より好ましくは約 8 Å 以下であってもよい。より具体的には、部分構造の長さは、例えば約 2.5～15 Å、好ましくは約 4～12 Å、より好ましくは約 5～8 Å であってもよい。

【0335】

より具体的には、切断により生成した L1 末端部分（または C1 末端部分）および R' を連結する部分構造の長さは、部分構造の連結鎖（水素原子および置換基を除く）を構成する原子数として規定することもできる。連結鎖を構成する原子数は、例えば 2 個（約 2.5 Å）以上、好ましくは 3 個（約 4 Å）以上、より好ましくは 4 個（約 5 Å）以上であってもよい。連結鎖を構成する原子数はまた、例えば 10 個（約 15 Å）以下、好ましくは 8 個（約 12 Å）以下、より好ましくは 6 個（約 8 Å）以下であってもよい。より具体的には、連結鎖を構成する原子数は、例えば 2～10 個、好ましくは 3～8 個、より好ましくは 4～6 個であってもよい。

【0336】

切断により生成した L1 末端部分（または C1 末端部分）および R' を連結する部分構造の連結鎖が 2 個の環構造を含まない鎖状構造である場合、連結鎖の原子数は、連結鎖中の原子数を数えることにより決定することができる。

【0337】

一方、切断により生成した L1 末端部分（または C1 末端部分）および R' を連結する部分構造の連結鎖が 2 個の環構造を含む構造である場合、連結鎖の原子数と上述した長さとは必ずしも対応せず、連結鎖の原子数により規定され得る長さは、上述した長さよりも短くなる傾向がある。このような場合であっても、原子数により連結鎖の長さを規定する観点から、連結鎖の原子数を便宜的に数えることができる。具体的には、このような場合における連結鎖の原子数は、上述したように、連結鎖において 2 個の環構造を含まない鎖状構造中の原子数に加えて、2 個の環構造中の 2 つの結合手を連絡する最短経路の原子数を数えることにより決定してもよい。

【0338】

好ましくは、切断により生成した L1 末端部分（または C1 末端部分）および R' を連結する部分構造の連結鎖は、2 個の環構造を含まない鎖状構造であってもよい。この場合、

切断により生成した末端部分および R' を連結する部分構造の連結鎖において 2 価の環基が含まれないように L1-B を適宜設計することができる。

【0339】

特定の実施形態では、L1-B で表される部分構造は、好ましくは、ペプチド部分を含まない。この場合、本発明の生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質を用いて得られる本発明の機能性物質を有する可溶性タンパク質（例、抗体薬物複合体）は、免疫原性を有し得るペプチド部分をリンカーとして含み得ないという利点がある。

【0340】

4-3-2. 部分構造「L1-B」の具体的構造

上記式 (IV) において、L1 および B は、互いに関連し得る構造である。したがって、上記式 (IV) において、L1 および B は、「L1-B」で表される部分構造として規定することができる。

【0341】

特定の実施形態では、L1 が (i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基である場合、B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基、または (b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基である。

【0342】

好ましくは、L1 が (i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基である場合、B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基である。この場合、(i') における生体直交性官能基は、(a) における生体直交性官能基と同種であっても異種であってもよい。より単純な構造の採用、および/または単一の機能性物質に対する反応性の向上等の観点では、(i') における生体直交性官能基は、(a) における生体直交性官能基と同種であってもよい。一方、2 種以上の機能性物質に対する差別化された反応性の確保等、および反応における一部の生体直交性官能基の不使用の観点では、(i') における生体直交性官能基は、(a) における生体直交性官能基と異種であってもよい。

【0343】

あるいは、L1 が (i') 生体直交性官能基を含む 1 価の基である場合、B は、(b) 生体直交性官能基を含まない 2 価の基であってもよい。この場合、式 (IV) で表される、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩は、より単純な構造を有することになるので、合成が容易である。

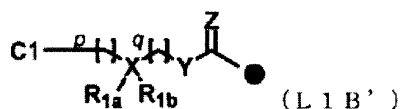
【0344】

別の特定の実施形態では、L1 が (ii') 生体直交性官能基を含まない 1 価の基である場合、B は、(a) 生体直交性官能基を含む 2 価の基である。

【0345】

特定の実施形態では、L1-B で表される構造単位は、下記式 (L1B') で表されてもよい。

【化56】



〔式中、

C1、p、q、X、R1a、R1b、Y、および Z の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

● (黒丸) は、R' に対する結合を示す。〕

【0346】

したがって、上記式 (IV) は、下記式 (IV') として規定することができる。

10

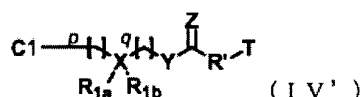
20

30

40

50

【化 5 7】



〔式中、

C1、p、q、X、R_{1a}、R_{1b}、Y、Z、R'、およびTの定義、例および好ましい例は、上述したものと同一である。〕

【0347】

上記式（L1B'）および（IV'）において、C=ZにおけるCからC1までの長さは、切断により生成したL1末端部分（またはC1末端部分）およびR'を連結する部分構造の長さと同様である。これらの式において、C=ZにおけるCからC1までの長さはまた、C=ZにおけるCからC1までの部分構造の連結鎖（水素原子および置換基を除く）を構成する原子数として規定することもできる。このような原子数は、切断により生成したL1末端部分（またはC1末端）およびR'を連結する部分構造（水素原子および置換基を除く）を構成する原子数と同様である。C=ZにおけるCからC1を連結する部分構造の連結鎖（水素原子および置換基を除く）は、環構造を含んでいなくても含んでいてもよいが、環構造を含んでいないことが好ましい。当該連結鎖（水素原子および置換基を除く）は、好ましくは、ペプチド部分を含まないものであってもよい。

【0348】

4-4. 可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の結合部位（位置選択性）

可溶性タンパク質以外の部分構造（例、L1-B-R'）は、可溶性タンパク質（T）における上述したような標的領域に位置選択的に結合させることができる。具体的には、Tが、連続する1~50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む場合、可溶性タンパク質以外の部分構造は、当該標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合させることができる。標的領域および位置選択性の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

【0349】

4-5. 可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数

可溶性タンパク質（T）が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造（例、L1-B-R'）の個数は、変動することができる。例えば、Tが複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質である場合、Tは、複数の単量体タンパク質中の対応する複数の標的領域において、T以外の部分構造を有することができる。その結果、Tは、T以外の部分構造を複数個有することができる。したがって、式（IVI）、（IV'）、またはIV'、）で表される構造は、Tが、T以外の部分構造を1個または複数個有していてもよいことを示す。Tが有する、T以外の部分構造の個数は、可溶性タンパク質の種類、および可溶性タンパク質とそれに対して導入される構造単位との反応比率等の条件を適宜設定することで調節することができる。このような個数は、可溶性タンパク質の種類によっても異なるが、例えば1~8、好ましくは1~4、より好ましくは1または2であってもよい。

【0350】

特定の実施形態では、可溶性タンパク質が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数は、可溶性タンパク質が、複数の単量体タンパク質から構成される多量体タンパク質である場合、複数個であってもよい。本発明によれば、複数の単量体タンパク質の同一標的領域に対して可溶性タンパク質以外の部分構造を複数個導入することができる。

【0351】

好ましい実施形態では、可溶性タンパク質は、複数の重鎖を含む抗体であってもよい

。抗体の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。本発明では、抗体が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、IgG、IgE、およびIgDについては1個または2個（好ましくは2個）であり、IgAについては1～4個（好ましくは4個）であり、IgMについては1～8個（好ましくは8個）であってもよい。

【0352】

4-6. 製造方法

本発明は、以下を含む、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

(C1) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩の切断性部分を切断して、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

【0353】

可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質は、式(II)、好ましくは式(II')、より好ましくは式(II'')で表される。生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質は、式(IV)、好ましくは式(IV')、より好ましくは式(IV'')で表される。

【0354】

可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩は、上述したような切断処理により切断することができる切断性部分を有するため、切断することができる。このような切断反応は、上記「2-6. 製造方法」で述べたような、タンパク質の変性・分解（例、アミド結合の切断）を引き起こし得ない条件（温和な条件）下で適宜行うことができる。

【0355】

切断処理としては、例えば、(a) 酸性物質、塩基性物質、還元剤、酸化剤、酵素からなる群より選ばれる1種以上の物質による処理、(b) 光からなる群より選ばれる物理化学的刺激による処理、または(c) 自己分解性の切断性部分を含む切断性リンカーを用いた場合の放置が挙げられる。このような切断処理の条件は、当該分野における技術常識である（例、G. Leriche, L. Chisholm, A. Wagner, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 571 (2012); Feng P. et al., *Journal of American Chemical Society*, 132, 1500 (2010).; Bessodes M. et al., *Journal of Controlled Release*, 99, 423 (2004).; DeSimone, J. M., *Journal of American Chemical Society*, 132, 17928 (2010); Thompson, D. H., *Journal of Controlled Release*, 91, 187 (2003); Schoenmarks, R. G., *Journal of Controlled Release*, 95, 291 (2004)）。

【0356】

生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー（例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC）、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。位置選択性の確認、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数の確認、および精製は、上記「2-6. 製造方法」で述べた方法により適宜行うことができる。

【0357】

本発明はまた、以下を含む、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

(C2) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩を可溶性タンパク質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を生成すること；および

(C3) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩の切断性部分を切断して、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

【0358】

上記(C2)の工程は、上記「2-6. 製造方法」で述べた上記(A1)の工程と同様にして行うことができる。上記(C3)の工程は、上記(C1)の工程と同様にして行うことができる。上記(C2)および(C3)の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記(C2)および(C3)の工程は、反応性基と、切断により生成され得る生体直交性官能基との組合せ(非反応性)等の因子に応じて、同時に行うことができる。

【0359】

5. 機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法

5-1. 概要

本発明は、式(V)で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

$F - (L1 - B)' - R' - T$ (V)

〔式中、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

(L1-B)'で表される構造単位は、機能性物質と、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分を含む2価の構造単位であり、

Fは、機能性物質であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質である。〕

【0360】

5-2. 部分構造「F-(L1-B)′」

5-2-1. FおよびR′を連結する部分構造「L1-B」の長さ

式(V)において、FおよびR′を連結する部分構造「L1-B」(「L1-B」中の直鎖部分)の長さ(あるいは、式(V)等の特定の式に限定されない、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩における、機能性物質および特定のアミノ酸残基の側鎖を連結する主鎖の原子数、または機能性物質が生体直交性官能基を介して可溶性タンパク質に結合している場合には、生体直交性官能基および特定のアミノ酸残基の側鎖を連結する主鎖の原子数。以下同様)は、上記「1-6-1. AおよびRを連結する部分構造「L-B」中の主鎖の長さ」で述べたような種々の因子に応じて、適宜設計することができる。

【0361】

FおよびR′を連結する部分構造の長さは、例えば約2.5 Å以上、好ましくは約4 Å以上、より好ましくは約5 Å以上であってもよい。部分構造の長さはまた、例えば約15 Å以下、好ましくは約12 Å以下、より好ましくは約8 Å以下であってもよい。より具体的には、部分構造の長さは、例えば約2.5~15 Å、好ましくは約4~12 Å、より好ましくは約5~8 Åであってもよい。

【0362】

より具体的には、FおよびR′を連結する部分構造の長さは、部分構造の連結鎖(水素原子および置換基を除く)を構成する原子数として規定することもできる。連結鎖を構成する原子数は、例えば2個(約2.5 Å)以上、好ましくは3個(約4 Å)以上、より好ましくは4個(約5 Å)以上であってもよい。連結鎖を構成する原子数はまた、例えば10個(約15 Å)以下、好ましくは8個(約12 Å)以下、より好ましくは6個(約8 Å)以下であってもよい。より具体的には、連結鎖を構成する原子数は、例えば2~10個、

10

20

30

40

50

好ましくは3～8個、より好ましくは4～6個であってもよい。

【0363】

FおよびR'を連結する部分構造の連結鎖が2価の環構造を含まない鎖状構造である場合、連結鎖の原子数は、連結鎖中の原子数を数えることにより決定することができる。

【0364】

一方、FおよびR'を連結する部分構造の連結鎖が2価の環構造を含む構造である場合、連結鎖の原子数と上述した長さとは必ずしも対応せず、連結鎖の原子数により規定され得る長さは、上述した長さよりも短くなる傾向がある。このような場合であっても、原子数により連結鎖の長さを規定する観点から、連結鎖の原子数を便宜的に数えることができる。具体的には、このような場合における連結鎖の原子数は、上述したように、連結鎖において2価の環構造を含まない鎖状構造中の原子数に加えて、2価の環構造中の2つの結合手を連絡する最短経路の原子数を数えることにより決定してもよい。

10

【0365】

好ましくは、FおよびR'を連結する部分構造の連結鎖は、2価の環構造を含まない鎖状構造であってもよい。FおよびR'を連結する部分構造の連結鎖において2価の環基が含まれないようにL1-Bを適宜設計することができる。

【0366】

特定の実施形態では、L1-Bで表される部分構造は、好ましくは、ペプチド部分を含まない。この場合、本発明の機能性物質を有する可溶性タンパク質（例、抗体薬物複合体）は、免疫原性を有し得るペプチド部分をリンカーとして含まないという利点がある。

20

【0367】

5-2-2. 部分構造「F-(L1-B) 」の具体的構造

式(V)において、F-(L1-B) 'におけるL1およびBは、互いに連関し得る構造である。したがって、上記式(V)において、L1およびBは、「L1-B」で表される部分構造として規定することができる。

【0368】

また、F-(L1-B) 'で表される構造単位は、機能性物質と、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分である。反応に供された生体直交性官能基は、式(V)において、存在しない。したがって、式(V)において、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方は、存在しない。機能性物質と、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分と同じである。したがって、本明細書において、機能性物質と、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分の例（残基の名称）および具体例（化学構造式）は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分について上述したものと同一である。

30

【0369】

一実施形態では、L1が(i')生体直交性官能基を含む1価の基である場合、Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基である。

40

【0370】

好ましい実施形態では、L1が(i')生体直交性官能基を含む1価の基である場合、Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基である。この場合、(i')における生体直交性官能基は、(a)における生体直交性官能基と同種であっても異種であってもよい。より単純な構造の採用、および/または単一の機能性物質に対する反応性の向上等の観点では、(i')における生体直交性官能基は、(a)における生体直交性官能基と同種であってもよい。一方、2種以上の機能性物質に対する差別化された反応性の確保、および反応における一部の生体直交性官能基の不利用等の観点では、(i')における生体直交性官能基は、(a)における生体直交性官能基と異種であってもよい。

50

【0371】

別の好ましい実施形態では、L1が(i')生体直交性官能基を含む1価の基である場合、Bは、(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であってもよい。この場合、式(V)で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩は、より単純な構造を有することになるので、合成が容易である。

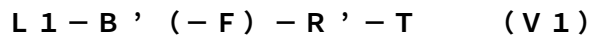
【0372】

別の実施形態では、L1が(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基である場合、Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基である。

【0373】

特定の実施形態では、(i')および(a)における生体直交性官能基が異種である場合、式(V)で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩は、式(V1)または(V2)で表されてもよい。

【0374】



〔式中、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

B'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

Fは、機能性物質であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質である。〕

【0375】



〔式中、

L1'は、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

Fは、機能性物質であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質である。〕

【0376】

L1'は、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基である。機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分と同じである。したがって、本明細書において、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分の例(残基の名称)および具体例(化学構造式)は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分について上述したものと同一である。したがって、機能性物質が生体直交性官能基と反応するので、機能性物質と、(i')生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基(L1')は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基と表現することもできる(以下同様)。L1'における、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基の定義、例および好ましい例は、B'における、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基のものと同様であってもよい。

【0377】

別の特定の実施形態では、(i')および(a)における生体直交性官能基が同種または異種である場合、式(V)で表される、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩は、式(V3)で表されてもよい。

10

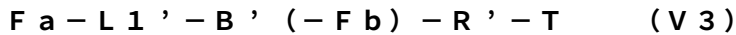
20

30

40

50

【0378】



〔式中、

L 1' は、機能性物質と、(i') 生体直交性官能基を含む1価の基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

B' は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基であり、

F a および F b は、それぞれ、同一または異なる機能性物質であり、

R' は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

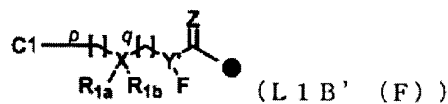
T は、可溶性タンパク質である。〕

10

【0379】

特定の実施形態では、上記式(V1)において、L 1 - B' (- F) で表される構造単位は、下記式(F L 1' B) で表されてもよい。

【化58】



〔式中、

20

F、C 1、p、q、X、R 1 a、R 1 b、および Z の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

Y' は、前記式(B-1)のYから水素原子を一つ除いた残基であり、

●(黒丸)は、R' に対する結合を示す。〕

【0380】

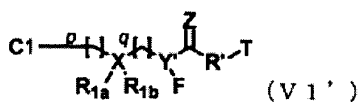
前記式(B-1)のYから水素原子を一つ除いた残基の定義、例および好ましい例は、上述したものと同様である。

【0381】

したがって、上記式(V1)は、下記式(V1')として規定することができる。

【化59】

30



〔式中、

F、C 1、p、q、X、R 1 a、R 1 b、Z、R'、および T の定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

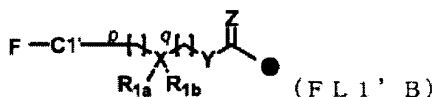
Y' は、前記式(B-1)のYから水素原子を一つ除いた残基である。〕

40

【0382】

特定の実施形態では、上記式(V2)において、F - L 1' - B で表される構造単位は、下記式(F L 1' B) で表されてもよい。

【化60】



〔式中、

50

F、p、q、X、R_{1a}、R_{1b}、Y、およびZの定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

C1'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分であり、

●（黒丸）は、R'に対する結合を示す。）

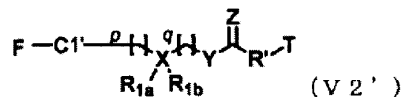
【0383】

C1'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分である。C1'における、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分の定義、例および好ましい例は、上記「3-3. 機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分を含む2価の基(B')」で述べたものと同様である（以下同様）。

【0384】

したがって、上記式(V2)は、下記式(V2')として規定することができる。

【化61】



〔式中、

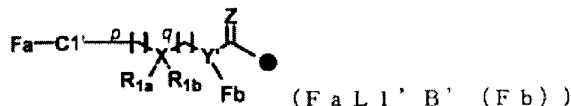
F、p、q、X、R_{1a}、R_{1b}、Y、Z、R'、およびTの定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

C1'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分である。）

【0385】

特定の実施形態では、上記式(V3)において、Fa-L1'-B'(-Fb)で表される構造単位は、下記式(FaL1'B'(-Fb))で表されてもよい。

【化62】



〔式中、

Fa、Fb、p、q、X、R_{1a}、R_{1b}、およびZの定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

C1'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分であり、

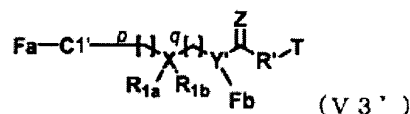
Y'は、前記式(B-1)のYから水素原子を一つ除いた残基であり、

●（黒丸）は、R'に対する結合を示す。）

【0386】

したがって、上記式(V3)は、下記式(V3')として規定することができる。

【化63】



〔式中、

Fa、Fb、p、q、X、R_{1a}、R_{1b}、Z、R'、およびTの定義、例および好ましい例は、上述したものと同一であり、

C1'は、機能性物質と生体直交性官能基との間の反応により生成する部分であり、

Y'は、前記式(B-1)のYから水素原子を一つ除いた残基である。）

【0387】

上記式 (L1B' (F))、(FL1' B)、および (FaL1' B' (F2))、ならびに (V1')、(V2') および (V3') において、C=Z における C から C1 までの長さは、切断により生成した L1 末端部分 (または C1 末端部分) および R' を連結する部分構造の長さと同様である。これらの式において、C=Z における C から C1 までの長さはまた、C=Z における C から C1 までの部分構造の連結鎖 (水素原子および置換基を除く) を構成する原子数として規定することもできる。このような原子数は、切断により生成した L1 末端部分 (または C1 末端) および R' を連結する部分構造 (水素原子および置換基を除く) を構成する原子数と同様である。C=Z における C から C1 を連結する部分構造の連結鎖 (水素原子および置換基を除く) は、環構造を含んでいなくても含んでいてもよいが、環構造を含んでいないことが好ましい。当該連結鎖 (水素原子および置換基を除く) は、好ましくは、ペプチド部分を含まないものであってもよい。

10

【0388】

5-3. 可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の結合部位 (位置選択性)

可溶性タンパク質以外の部分構造 (例、F-(L1-B)'-R') は、可溶性タンパク質 (T) における上述したような標的領域に位置選択的に結合させることができる。具体的には、T が、連続する 1~50 個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を 1 個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を 5 個以上含む場合、可溶性タンパク質以外の部分構造は、当該標的領域中に含まれる 1 個以上の特定のアミノ酸残基に対して 30% 以上の位置選択性で結合させることができる。標的領域および位置選択性の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。

20

【0389】

5-4. 可溶性タンパク質が有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数

可溶性タンパク質 (T) が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造 (例、F-(L1-B)'-R') の個数は、変動することができる。例えば、T が複数の単量体タンパク質を含む多量体タンパク質である場合、T は、複数個の単量体タンパク質中の対応する複数個の標的領域において、T 以外の部分構造を有することができる。その結果、T は、T 以外の部分構造を複数個有することができる。したがって、式 (V)、(V1)、(V2)、(V3)、(V1')、(V2')、または (V3') で表される構造は、T が、T 以外の部分構造を 1 個または複数個有していてもよいことを示す。T が有する、T 以外の部分構造の個数は、可溶性タンパク質の種類、および可溶性タンパク質とそれに対して導入される構造単位との反応比率等の条件を適宜設定することで調節することができる。このような個数は、可溶性タンパク質の種類によっても異なるが、例えば 1~8、好ましくは 1~4、より好ましくは 1 または 2 であってもよい。

30

【0390】

特定の実施形態では、可溶性タンパク質が保有する、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数は、可溶性タンパク質が、複数個の単量体タンパク質から構成される多量体タンパク質である場合、複数個であってもよい。本発明によれば、複数個の単量体タンパク質の同一標的領域に対して可溶性タンパク質以外の部分構造を複数個導入することができる。

40

【0391】

好ましい実施形態では、可溶性タンパク質は、複数個の重鎖を含む抗体であってもよい。抗体の定義、例、および好ましい例は、上述したとおりである。本発明では、抗体が保有する、抗体以外の部分構造の個数は、IgG、IgE、および IgD については 1 個または 2 個 (好ましくは 2 個) であり、IgA については 1~4 個 (好ましくは 4 個) であり、IgM については 1~8 個 (好ましくは 8 個) であってもよい。

【0392】

5-5. 製造方法

本発明は、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

50

本製造方法は、(D) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を原料として使用する方法(図2の反応(3)を参照)、および(E) 生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を原料として使用する方法(図2の反応(5)を参照)に分類することができる。

【0393】

(D) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を原料として使用する方法は、以下を含む：

(D1) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

10

【0394】

可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体は、式(III)、好ましくは式(III')、より好ましくは式(III'')で表される。機能性物質を有する可溶性タンパク質は、式(V)、好ましくは式(V1)、(V2)、または(V3)、より好ましくは式(V1')、(V2')、または(V3')で表される。

【0395】

可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩は、上述したような切断処理により切断することができる切断性部分を有するため、切断することができる。このような切断反応は、上記「4-6. 製造方法」で述べたような様式において行うことができる。

20

【0396】

機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の生成の確認は、その具体的な原料および生成物の分子量にもよるが、例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー(例、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、HPLC)、または質量分析により、好ましくは、質量分析により行うことができる。位置選択性の確認、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数の確認、および精製は、上記「2-6. 製造方法」で述べた方法により適宜行うことができる。

【0397】

本発明はまた、以下を含む、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

30

(D2) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成すること；および

(D3) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

【0398】

上記(D2)の工程は、上記「3-7. 製造方法」で述べた上記(B1)の工程と同様にして行うことができる。上記(D3)の工程は、上記(D1)の工程と同様にして行うことができる。上記(D2)および(D3)の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記(D2)および(D3)の工程は、切断性部分、機能性物質および生体直交性官能基との組合せ等の因子に応じて、同時に行うことができる。

40

【0399】

本発明はさらに、以下を含む、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

(D4) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩を可溶性タンパク質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を生成すること；

50

(D5) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩を生成すること；および

(D6) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を有する複合体またはその塩の切断性部分を切断して、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

【0400】

上記(D4)の工程は、上記「2-6. 製造方法」で述べた上記(A1)の工程と同様にして行うことができる。上記(D5)および(D6)の工程は、上記(D2)および(D3)の工程と同様にして行うことができる。上記(D5)の工程は、上記「3-7. 製造方法」で述べた上記(B1)の工程と同様にして行うことができる。上記(D6)の工程は、上記(D1)の工程と同様にして行うことができる。上記(D4)～(D6)の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記(D4)～(D6)の工程の少なくとも一部は、反応性基、切断性部分、機能性物質および生体直交性官能基との組合せ等の因子に応じて、同時に行うことができる。

【0401】

(E) 生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を原料として使用する方法は、以下を含む：

(E1) 生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

【0402】

生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質は、式(IV)、好ましくは式(IV')で表される。機能性物質を有する可溶性タンパク質は、式(V)、好ましくは式(V1)、

(V2)、または(V3)、より好ましくは式(V1')、(V2')、または(V3')で表される。

【0403】

生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩は、生体直交性官能基を有するため、機能性物質と反応することができる。このような反応は、上記「3-7. 製造方法」で述べたような様式において行うことができる。

【0404】

機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の生成の確認は、上述したような方法により行うことができる。位置選択性の確認、可溶性タンパク質以外の部分構造の個数の確認、および精製は、上記「2-6. 製造方法」で述べた方法により適宜行うことができる。

【0405】

本発明はまた、以下を含む、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

(E2) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩の切断性部分を切断して、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること；および

(E3) 生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

【0406】

上記(E2)の工程は、上記「4-6. 製造方法」で述べた上記(C1)の工程と同様にして行うことができる。上記(E3)の工程は、上記(E1)の工程と同様にして行うことができる。上記(E2)および(E3)の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記(E2)および(E3)の工程は、切断性部分、機能性物質および生体直交性官能基との組合せ等の因子に応じて、同時に行うことができる。

【0407】

本発明はさらに、以下を含む、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する：

(E 4) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を含む化合物またはその塩を可溶性タンパク質と反応させて、可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩を生成すること；

(E 5) 可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を含む可溶性タンパク質またはその塩の切断性部分を切断して、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること；および

(E 6) 生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩を機能性物質と反応させて、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩を生成すること。

10

【0408】

上記(E 4)の工程は、上記「2-6. 製造方法」で述べた上記(A 1)の工程と同様にして行うことができる。上記(E 5)および(E 6)の工程は、上記(E 2)および(E 3)の工程と同様にして行うことができる。上記(E 4)～(E 6)の工程は、別々に行うことができる。あるいは、上記(E 4)～(E 6)の工程の少なくとも一部は、反応性基、切断性部分、機能性物質および生体直交性官能基との組合せ等の因子に応じて、同時に行うことができる。

【0409】

6. 生体直交性官能基を位置特異的に有する特定の可溶性タンパク質またはその塩、およびその製造方法

20

本発明はまた、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を提供する。生体直交性官能基を位置選択的に有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、可溶性タンパク質が、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含み、かつ生体直交性官能基が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、前記標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である。

【0410】

特定の実施形態では、生体直交性官能基を位置選択的に有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、下記式(IV)：

30

$$L1-B-R'-T \quad (IV)$$

〔式中、

L1は、(i') 生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii') 生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

Bは、(a) 生体直交性官能基を含む2価の基、または(b) 生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、連続する1～50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む。)で表され、かつL1-B-R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であってもよい。

40

【0411】

本発明はまた、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

【0412】

従来の方法では、上記のような、生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパ

50

ク質またはその塩を製造することはできなかったが、本発明者らが開発した方法によれば、このような生体直交性官能基を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を製造することができる。生体直交性官能基、位置選択性、可溶性タンパク質、標的領域、リンカー等の要件、ならびにL1における(i')および(ii')、Bにおける(a)および(b)、R'、およびT、ならびにそれらの要件の一部の技術要素の定義、例および好ましい例は、上述したもの同様である。製造方法の工程の詳細もまた、位置選択性およびこれに関する技術要素(例、標的領域)を必須の要件としていることを除き、「4. 生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法」で述べたものと同様である。

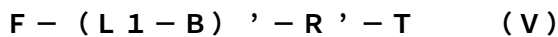
【0413】

7. 機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩、およびその製造方法

本発明はまた、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を提供する。機能性物質を位置選択的に有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、可溶性タンパク質が、連続する1~50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含み、かつ機能性物質が、ペプチド部分を含まないリンカーを介して、前記標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩である。

【0414】

特定の実施形態では、機能性物質を位置選択的に有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、下記式(V)：



〔式中、

L1は、(i')生体直交性官能基を含む1価の基、または(ii')生体直交性官能基を含まない1価の基であり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

(L1-B)'で表される構造単位は、機能性物質と、(i')および(a)における生体直交性官能基のいずれか一方または双方との間の反応により生成する部分を含む2価の構造単位であり、

Fは、機能性物質であり、

R'は、可溶性タンパク質と反応性基との間の反応により生成する部分であり、

Tは、可溶性タンパク質であり、

前記可溶性タンパク質は、連続する1~50個のアミノ酸残基からなる標的領域中において特定のアミノ酸残基を1個以上含み、かつ、前記標的領域以外の非標的領域中において前記特定のアミノ酸残基を5個以上含む。)で表され、かつ

F-(L1-B)'-R'で表される構造単位が、前記可溶性タンパク質の標的領域中に含まれる1個以上の特定のアミノ酸残基に対して30%以上の位置選択性で結合している、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩であってもよい。

【0415】

本発明はまた、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法を提供する。

【0416】

従来の方法では、上記のような、機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を製造することはできなかったが、本発明者らが開発した方法によれば、このような機能性物質を位置選択的に有する可溶性タンパク質またはその塩を製造することができる。機能性物質、位置選択性、可溶性タンパク質、標的領域、リンカー等の要件、ならびにL1における(i')および(ii')、Bにおける(a)および(b)、(L1-B)'、F、R'、およびT、ならびにそれらの要件の一部の技術要素の定義、例および好

10

20

30

40

50

ましい例は、上述したものと同様である。製造方法の工程の詳細もまた、位置選択性およびこれに関する技術要素（例、標的領域）を必須の要件としていることを除き、「５．機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩の製造方法」で述べたものと同様である。

【０４１７】

８．塩

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

【０４１８】

９．用途

可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する本発明の化合物またはその塩は、例えば、可溶性タンパク質の位置選択的な修飾に有用である。したがって、本発明は、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物またはその塩を含む、可溶性タンパク質の位置選択的修飾試薬を提供する。

【０４１９】

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

【０４２０】

可溶性タンパク質に対する親和性物質、および切断性部分を（位置選択的に）有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分、機能性物質および可溶性タンパク質を（位置選択的に）有する本発明の複合体またはその塩、ならびに生体直交性官能基を（位置選択的に）有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、例えば、機能性物質を（位置選択的に）有する可溶性タンパク質またはその塩の調製のための中間体として有用である。

【０４２１】

機能性物質を（位置選択的に）有する本発明の可溶性タンパク質またはその塩は、例えば、医薬、または試薬（例、診断薬、研究用試薬）として有用である。特に、可溶性タンパク質が抗体である場合、機能性物質を（位置選択的に）有する本発明の抗体またはその塩は、これらの用途に適している。

【０４２２】

特に、機能性物質を（位置選択的に）有する本発明の抗体またはその塩は、医薬として有用である。抗体薬物複合体（ADC）の薬物の結合数および結合位置を変化させると、

体内動態や薬物の放出速度、効果が変化することが上記のとおり報告されている。これらのことから次世代型ADCではコンジュゲーションする薬物の個数と位置を制御することが求められている。個数および位置が一定であると、期待通りのe f f i c a c y、コンジュゲーション薬剤のバリエーション、ロット差いわゆるレギュレーションの問題が解決すると考えられている。機能性物質を有する本発明の抗体またはその塩は、このようなレギュレーションの問題を解決することができる。したがって、機能性物質を有する本発明の抗体またはその塩は、医薬組成物の形態において提供されてもよい。このような医薬組成物は、機能性物質を有する可溶性タンパク質またはその塩に加えて、医薬上許容され得る担体を含んでいてもよい。医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。機能性物質を有する本発明の抗体またはその塩はまた、安定性を実現する任意の修飾（例、PEG化）を有していてもよい。

10

20

【0423】

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

【0424】

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

30

【0425】

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

【実施例】

【0426】

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

40

【0427】

【実施例1：IgG1Fc結合性ペプチドの合成】

（1）IgG1Fc結合性ペプチドの合成

（1-1）可溶性タンパク質に対する親和性物質（Ac-RGNCA Y H K G Q L V W C T Y H-NH₂（配列番号39）のペプチド）の合成

可溶性タンパク質に対する親和性物質であるAc-RGNCA Y H K G Q L V W C T Y H-NH₂（配列番号39）のペプチドをFmoc固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はBiotage社製Syrowaveを使用した。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用した。ResinはFmoc-NH-SAL-PEG Resin, HL

50

、アルギニン（R）、システイン（C）、ヒスチジン（H）はダブルカップリングを行った。Resinからの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール＝94：2.5：1.0：2.5の溶液中3時間攪拌の条件で行った。切り出し後Resinをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈殿を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを0.1%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.1%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行った。

10

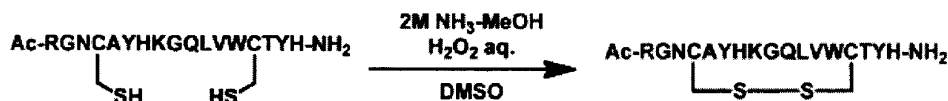
【0428】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 693 $[M+3H]^3+$, $z = 4$ 520 $[M+4H]^4+$

【0429】

(1-2) Ac-RGNCA^YHKGLVWCT^YH-NH₂ (配列番号39) のペプチドにおける4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化64】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号39である。

【0430】

(1-1) で合成したペプチドをDMSOに溶解し100mMとした後、2M NH₃-MeOHを2等量、過酸化水素水を1等量加え室温で12時間攪拌を行った。反応溶液に0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し逆相分取クロマトグラフィーで溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行った。5mg～100mgのスケールでいずれも収率は90%以上であった。

【0431】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 692 $[M+3H]^3+$, $z = 4$ 519 $[M+4H]^4+$

【0432】

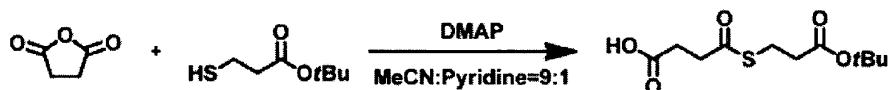
[実施例2：切断性リンカーの合成とIgG1Fc結合性ペプチドとの連結]

(2) 切断性リンカーの合成とペプチドとの連結

(2-1) チオエステルリンカーの合成とペプチドとの連結

(2-1-1) チオエステルリンカーの合成

【化65】



40

【0433】

コハク酸無水物 (0.2g, 2mmol) とN,N'-ジメチルアミノピリジン (12.2mg, 0.1mmol) をアセトニトリル：ピリジン＝9：1 溶媒に溶解させ、アルゴンガスで置換した。tert-ブチル-3-スルファニルプロパノエート (0.3g, 2.2mmol) を加え、室温で16時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、0.1M塩酸水溶液、水、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え5分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより4-(3-tert-ブトキシ-3-オキソプロピル)スルファニル-4-オキソブタン酸 (

50

0.47 g, 1.8 mmol) を得た。

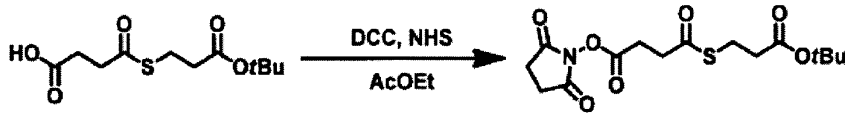
【0434】

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 3.12 (t, $J=7.0$ Hz, 2H), 2.91 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 2.72 (t, $J=6.9$ Hz, 2H), 2.55 (t, $J=7.0$ Hz, 2H), 1.46 (s, 9H).

MS (ESI) m/z : 263 $[\text{M}+\text{H}]^+$

【0435】

【化66】



10

【0436】

4-(3-tert-butoxy-3-oxopropyl)スルファニル-4-オキソブタン酸 (0.47 g, 1.8 mmol) に酢酸エチル 5 mL を加え溶解した。その後、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (0.39 g, 1.9 mmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド (0.22 g, 1.9 mmol) を加え1時間攪拌した。生じた白色結晶をろ過し母液を減圧下濃縮することで (2,5-ジオキソピロリジン-1-イル) 4-(3-tert-butoxy-3-oxopropyl)スルファニル-4-オキソブタノエート (0.61 g, 1.7 mmol) を得た。

20

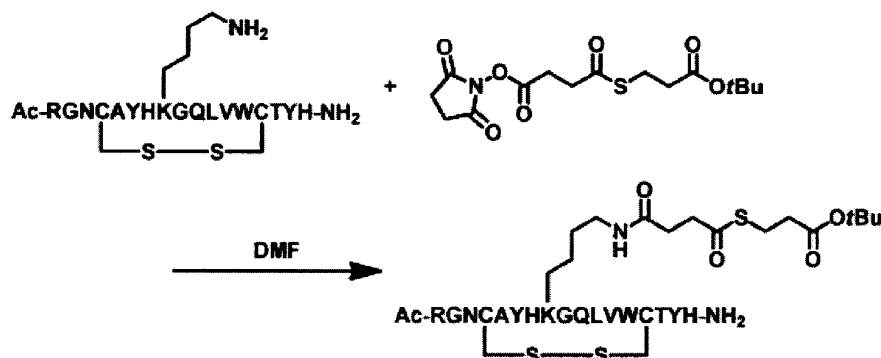
【0437】

MS (ESI) m/z : 360 $[\text{M}+\text{H}]^+$

【0438】

(2-1-2) チオエステルリンカーとペプチドの連結

【化67】



30

上記アミノ酸配列は、配列番号39である。

【0439】

実施例1-2で合成した Ac-RGNCA YHKGQLVWCT YH-NH₂ (配列番号39) のペプチド (42 mg, 20.3 μmol 、ただし、4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している。) をN,N'-ジメチルホルムアミド1 mL に溶解し、(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル) 4-(3-tert-butoxy-3-oxopropyl)スルファニル-4-オキソブタノエート (0.61 g, 1.7 mmol) をアセトニトリル1 mL に溶解した溶液に加えた。室温で12時間攪拌した後、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドリinker連結- t Bu体 (41.7 mg, 18 μmol) を得た。

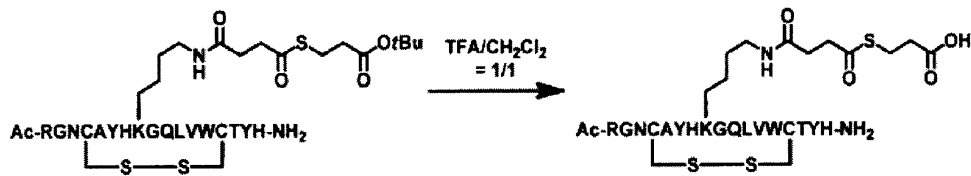
50

【0440】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 773 $[M + 3H]^+$, $z = 4$ 580 $[M + 4H]^+$

【0441】

【化68】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号39である。

【0442】

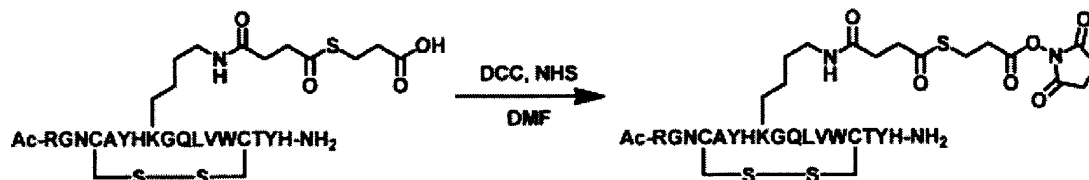
上記ペプチドリinker連結物(41.7mg, 18 μ mol)をジクロロメタン1.0mL中に溶解し、トリフルオロ酢酸を1.0mL加え室温中で1時間攪拌した。減圧濃縮を行った後、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドリinker連結物-カルボン酸体(40.7mg, 18 μ mol)を得た。

【0443】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 755 $[M + 3H]^+$, $z = 4$ 566 $[M + 4H]^+$

【0444】

【化69】



20

上記アミノ酸配列は、配列番号39である。

【0445】

上記ペプチドリinker連結物-カルボン酸体(40.7mg, 18 μ mol)をN,N'-ジメチルホルムアミド1mLに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(37.1mg, 0.18mmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド(20.7mg, 0.18mmol)を加え1時間攪拌した。生じた白色結晶をろ過し母液に0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドチオエステルリinker連結物-NHS活性化体(5.2mg, 2.24 μ mol)を得た。

30

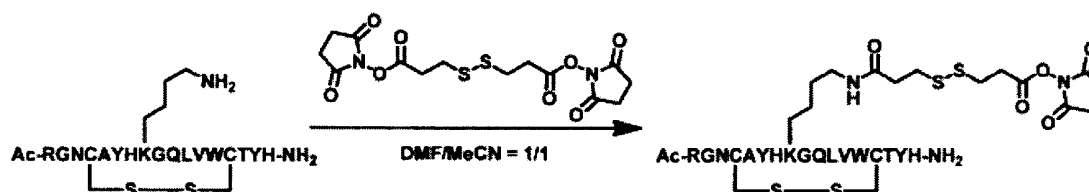
【0446】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 787 $[M + 3H]^+$, $z = 4$ 590 $[M + 4H]^+$

【0447】

(2-2) ジスルフィドリinkerとペプチドの連結

【化70】



40

50

上記アミノ酸配列は、配列番号 39 である。

【0448】

実施例 1-2 で合成した Ac-RGNCA YHKQLVWCT YH-NH₂ (配列番号 39) のペプチド (10 mg, 4.8 μmol、ただし、4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している。) を N, N'-ジメチルホルムアミド 1 mL に溶解し、3, 3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (0.2 g, 0.48 mmol) を 1 mL に溶解した溶液に加え室温で 12 時間攪拌した。0.5% トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (8.6 mg, 3.63 μmol) を得た。

10

【0449】

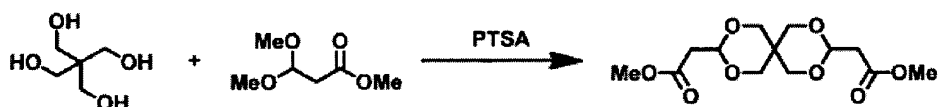
MS (ESI) m/z : z = 3 789 [M+3H]³⁺, z = 4 592 [M+4H]⁴⁺

【0450】

(2-3) アセタールリンカーの合成とペプチドの連結

(2-3-1) アセタールリンカーの合成

【化 71】



20

【0451】

ペンタエリトリール (1.98 g, 14.3 mmol)、ジメトキシプロピオン酸メチル (6.0 g, 31.7 mmol) と p-トルエンスルホン酸・一水和物 (33.0 mg, 0.143 mmol) を混合し、130℃で 16 時間攪拌した。16 時間後室温に戻し、析出した結晶をろ過により回収しメチル 2-[9-(2-メトキシ-2-オキソエチル)-2, 4, 8, 10-テトラオキソスピロ [5.5] ウンデカン-3-イル] アセテート (3.04 g, 10 mmol) を得た。

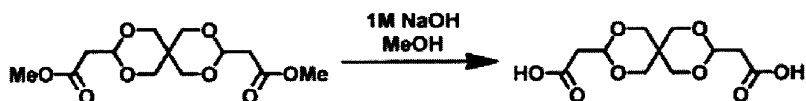
30

【0452】

MS (ESI) m/z : 305 [M+H]⁺

【0453】

【化 72】



40

【0454】

メチル 2-[9-(2-メトキシ-2-オキソエチル)-2, 4, 8, 10-テトラオキソスピロ [5.5] ウンデカン-3-イル] アセテート (50 mg, 0.164 mmol) をメタノール 1 mL に溶解し、氷冷下 1M NaOH aq. を 0.49 mL 加え、室温へと昇温後 2 時間攪拌した。陽イオン交換樹脂を添加し中性にした後、フィルトレーションにより樹脂を取り除き 2-[9-(2-メトキシ-2-オキソエチル)-2, 4, 8, 10-テトラオキソスピロ [5.5] ウンデカン-3-イル] 酢酸 (32 mg, 0.116 mmol) を得た。

【0455】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 4.85 (t, J = 5.4 Hz, 2

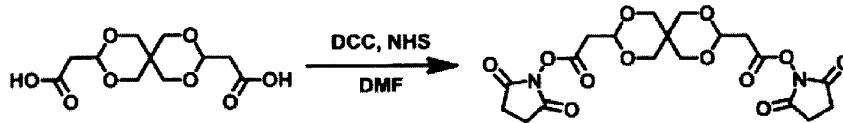
50

H), 4.26 (dd, $J=11.3$, 2.4 Hz, 2H), 3.67–3.61 (m, 2H), 3.60 (s, 8H), 3.42 (d, $J=11.6$ Hz, 2H), 2.69–2.56 (m, 4H).

MS (ESI) m/z : 277 [M+H]⁺

[0456]

【化73】



10

[0457]

2-[9-(2-メトキシ-2-オキソ-エチル)-2,4,8,10-テトラオキソスピロ[5.5]ウンデカン-3-イル]酢酸 (32 mg, 0.116 mmol) を酢酸エチル 1 mL に溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (37.1 mg, 0.18 mmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド (20.7 mg, 0.18 mmol) を加え 1 時間攪拌した。生じた白色結晶をろ過し母液を減圧下濃縮後、水を加え中性のアセトニトリルおよび水を溶媒として逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル) 2-[9-(2-メトキシ-2-オキソ-エチル)-2,4,8,10-テトラオキソスピロ[5.5]ウンデカン-3-イル]アセテート (13 mg, 27.6 μmol) を得た。

20

[0458]

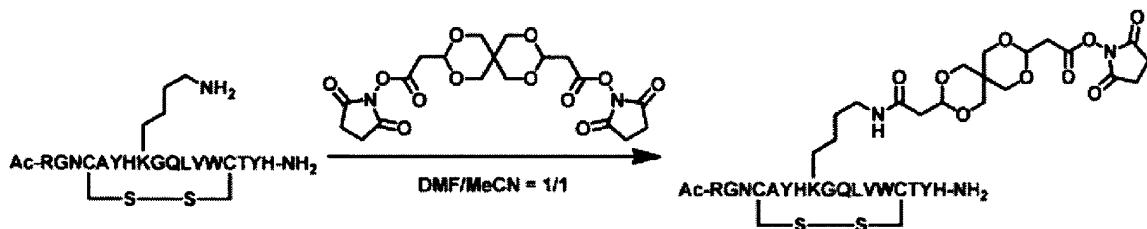
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 4.79 (t, $J=5.3$ Hz, 2H), 4.24 (dd, $J=11.2$, 2.3 Hz, 2H), 3.60–3.48 (m, 4H), 3.34 (d, $J=11.5$ Hz, 2H), 2.33 (d, $J=5.3$ Hz, 4H).

MS (ESI) m/z : 471 [M+H]⁺

[0459]

(2-3-2) アセタールリンカーとペプチドの連結

【化74】



30

上記アミノ酸配列は、配列番号 39 である。

40

[0460]

実施例 1-2 で合成した Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH₂ (配列番号 39) のペプチド (10 mg, 4.8 μmol、ただし、4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している。) を N,N'-ジメチルホルムアミド 1 mL に溶解し、(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル) 2-[9-(2-メトキシ-2-オキソ-エチル)-2,4,8,10-テトラオキソスピロ[5.5]ウンデカン-3-イル]アセテート (13 mg, 27.6 μmol) を 1 mL に溶解した溶液に加え室温で 12 時間攪拌した。水を加え中性のアセトニトリルおよび水を溶媒として逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記

50

ペプチドアセタールリンカー連結物-NHS活性化体 (8.6 mg, 3.63 μ mol) を得た。

【0461】

MS (ESI) m/z : $z=3$ 810 $[M+3H]^3+$, $z=4$ 608 $[M+4H]^4+$ 【0462】

[実施例3: IgG1 Fc 結合性ペプチド試薬による IgG1 Fc の特異的修飾と MALDI-TOFMS による解析]

(3-1) チオエステルリンカー結合性ペプチド試薬による IgG1 Fc の特異的修飾と MALDI-TOFMS による解析

IgG1 Fc は、R&D 社製 IgG1 Fc, Human, Recombinant, Carrier-free (製品番号: 110-HG-100) を用いた。実施例2の(2-1)で合成したペプチドチオエステルリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し0.4 mMとした。IgG1 Fc 15 μ gを0.1 M 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 15 μ Lに溶解し、0.4 mMのペプチド試薬を7 μ L (IgG1 Fc に対して5等量) 加え、室温で1時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57 mM PBSバッファー (pH 7.4) へと溶媒置換し反応を停止した。MALDI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のIgG1 Fc は m/z 28270にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが一つ導入された m/z 30532にピークが観測された。

【0463】

(3-2) ジスルフィドリンカー結合性ペプチド試薬による IgG1 Fc の特異的修飾と MALDI-TOFMS による解析

IgG1 Fc は、R&D 社製 IgG1 Fc, Human, Recombinant, Carrier-free (製品番号: 110-HG-100) を用いた。実施例2の(2-2)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し0.4 mMとした。IgG1 Fc 20 μ gを0.1 M 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 40 μ Lに溶解し、0.4 mMのペプチド試薬を10.7 μ L (IgG1 Fc に対して6等量) 加え、室温で1時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57 mM PBSバッファー (pH 7.4) へと溶媒置換し反応を停止した。MALDI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のIgG1 Fc は m/z 28183にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが一つ導入された m/z 30418にピークが観測された。

【0464】

(3-3) アセタールリンカー結合性ペプチド試薬による IgG1 Fc の特異的修飾と MALDI-TOFMS による解析

IgG1 Fc は、R&D 社製 IgG1 Fc, Human, Recombinant, Carrier-free (製品番号: 110-HG-100) を用いた。実施例2の(2-3)で合成したペプチドアセタールリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し0.4 mMとした。IgG1 Fc 20 μ gを0.1 M 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 40 μ Lに溶解し、0.4 mMのペプチド試薬を10.7 μ L (IgG1 Fc に対して6等量) 加え、室温で1時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57 mM PBSバッファー (pH 7.4) へと溶媒置換し反応を停止した。MALDI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のIgG1 Fc は m/z 28183にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが一つ導入された m/z 30541にピークが観測された。

【0465】

[実施例4: IgG1 Fc-ペプチド複合体のリンカー切断と MALDI-TOFMS による解析]

(4-1) チオエステルリンカーの切断と MALDI-TOFMS による解析

0.2 M PBSバッファー (pH 7.0)、25 mM システイン溶液 40 μ L に、実

10

20

30

40

50

施例3の(3-1)で合成したIgG1 Fc-ペプチドチオエステルリンカー複合体を溶解し、室温で16時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57mM PBSバッファ(pH7.0)へと溶媒置換し反応を停止した。MALDI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料の結合性ペプチドが一つ導入された複合体はm/z 30541にピークが観測され、反応後はm/z 28397にピークが観測された。

【0466】

(4-2) チオエステルリンカーの切断とMALDI-TOFMSによる解析

0.2M PBSバッファ(pH7.0) 40μLに、実施例3の(3-2)で合成したIgG1 Fc-ペプチドジスルフィドリンカー複合体を溶解し、10mM D,L-ジチオトレイトール 12.5μL (Fcに対して10等量)を添加し室温で16時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57mM PBSバッファ(pH7.0)へと溶媒置換し反応を停止した。MALDI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料の結合性ペプチドが一つ導入された複合体はm/z 30418にピークが観測され、反応後はm/z 28183にピークが観測された。

【0467】

(4-3) アセタールリンカーの切断とMALDI-TOFMSによる解析

任意のバッファ(pH3.0~pH6.0)に、実施例3の(3-3)で合成したIgG1 Fc-ペプチドアセタールリンカー複合体を溶解し、室温で攪拌することで、アセタール構造が分解し、アルデヒドがIgG1 Fc上に残る。これをMALDI-TOFMSにより質量を測定することができる。

【0468】

[実施例5：抗HER2 IgG抗体トラスツズマブと抗CD20抗体リツキシマブの特異的修飾とMALDI-TOFMSおよびHIC-HPLCによる解析]

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

実施例2の(2-2)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し0.4mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬) 500μgを50mM酢酸ナトリウムバッファ(pH5.5) 200μLに溶解させ、0.4mMのペプチド試薬を50.7μL(抗体に対して6等量)を加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57mM PBSバッファ(pH7.4)へと溶媒置換し反応を停止した。MALDI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブはm/z 147569にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが二つ導入されたm/z 151848にピークが観測された。

【0469】

(5-2) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析

(5-1)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはButyl-NPR(TOSO) 4.6x350mm 2.5μmを使用した。A_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH7.0、B_Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は1.0ml/min、グラジエントをB 0→100%, 12min(データ採取20min)、カラム温度は25℃、サーモスタット温度はRT、検出器はUV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)の2波長で検出した。

【0470】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ+ペプチド試薬 12等量(反応後Amicon 10Kにより溶媒置換) ;

b: トラスツズマブ+ペプチド試薬 12等量 ;

c: トラスツズマブ+ペプチド試薬 6等量 ;

d: トラスツズマブ原料 ;

e：ペプチド試薬のみ；

f：DMFのみ。

【0471】

Retention Time 9.417分はトラスツズマブ原料、10.943分および13.063分はペプチド試薬由来のピーク、0.44分はDMFであることが分かる（図3、4）。トラスツズマブにペプチド試薬を6等量反応させたところ9.417分のピークが消失し、9.99分および10.237分のピークが出現した（図3、4）。またペプチド試薬を12等量加えたところ9.99分のピークが消失したことから、9.99分のピークはペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物であると考えられる（図3、4）。aをMALDI-TOFMSにより解析したところ（5-1）で示したように m/z 151848のMSピークを示したペプチド試薬がトラスツズマブに対して2つ導入されたピークが観測された（図3、4）。

【0472】

（5-3）抗CD20抗体リツキシマブの特異的修飾とMALDI-TOFMSによる解析
実施例2の（2-2）で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN，N'-ジメチルホルムアミドに溶解し0.4mMとした。抗CD20抗体リツキシマブ500 μ gを50mM酢酸ナトリウムバッファー（pH5.5）200 μ Lに溶解させ、0.4mMのペプチド試薬を50.7 μ L（抗体に対して6等量）を加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57mM PBSバッファー（pH7.4）へと溶媒置換し反応を停止した。MALDI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のリツキシマブは m/z 144002にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが二つ導入された m/z 148169にピークが観測された。

【0473】

（5-4）抗CD20抗体リツキシマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析

（5-3）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはButyl-NPR（TOSO）4.6x350mm 2.5 μ mを使用した。A_Buffer：0.1M PiNa，2.3M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，pH7.0、B_Buffer：0.1M PiNa，pH7.0にて流速は1.0mL/min、グラジエントをB 0→100%，12min（データ採取20min）、カラム温度は25℃、サーモスタット温度はRT、検出器はUV225nm（Ch1）、280nm（Ch2）の2波長で検出した。

【0474】

a～fのサンプルについては以下の条件で反応させた。

a：リツキシマブ+ペプチド試薬 12等量（反応後Amicon 10Kにより溶媒置換）；

b：リツキシマブ+ペプチド試薬12等量；

c：リツキシマブ+ペプチド試薬6等量；

d：リツキシマブ原料；

e：ペプチド試薬のみ；

f：DMFのみ。

【0475】

Retention Time 9.417分はリツキシマブ原料、10.94分および13.02分はペプチド試薬由来のピーク、0.44分はDMFであることが分かる（図5、6）。リツキシマブにペプチド試薬を6等量反応させたところ10.36分のピークが消失し、10.763分および10.94分のピークが出現した（図5、6）。またペプチド試薬を12等量加えたところ10.763分のピークが消失したことから、10.763分のピークはペプチドがリツキシマブに1個導入された化合物であると考えられる（図5、6）。aをMALDI-TOFMSにより解析したところ（5-1）で示したように m/z 148169のペプチド試薬がリツキシマブに対して2つ導入されたピークが観測された（図5、6）。

【0476】

【実施例6：トラスツズマブ・ペプチド複合体およびリツキシマブ・ペプチド複合体の切断、および再酸化、およびそれらの生成物のMALDI-TOFMSとRP-HPLCによる解析】

(6-1) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化、およびそれらの生成物のMALDI-TOFMSによる解析

まず、実施例5の(5-1)で合成したトラスツズマブ・ペプチド複合体400 μgを60 mMリン酸バッファー(pH 8.0)に溶解し、72 μMとした後、20 mM D,L-ジチオトレイトール 10.0 μL(トラスツズマブ・ペプチド複合体に対して60等量)を添加し室温で16時間攪拌して、リンカー中のジスルフィド結合を切断した。

【0477】

次に、リンカー中のジスルフィド結合とともに切断された抗体中のジスルフィド結合を再度結合させるため、再酸化の工程を行った(Jagath R Junutula et al., NATURE BIOTECHNOLOGY, 26(8), 925-932(2008))。具体的には、反応液をAmicon 10Kにより9.57 mM PBSバッファー(pH 7.0)へと溶媒置換し、トラスツズマブ・ペプチド複合体の濃度を18 μMとした後、10 mM デヒドロアスコルビン酸 6.4 μL(トラスツズマブ・ペプチド複合体に対して20等量)を加えて3時間攪拌することにより、再酸化を行った。MALDI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物はチオプロピオニル基が二つ導入されたm/z 145329にピークが観測された。

【0478】

(6-2) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断と再酸化により得られる生成物のRP-HPLCによる解析

(6-1)の反応をRP-HPLCにより解析した。カラムはTSK gel, Protein C4-300(TOSOH) 4.6 x 150 mm 3.0 μmを使用した。A_Buffer: 0.1% TFA、B_Buffer: 0.1% TFA, 80% ACNにて流速は1.0 ml/min、グラジエントをB20→60%, 20 min(データ採取30 min)、カラム温度は60℃、サーモスタット温度は10℃、検出器はUV 225 nm(Ch1)、280 nm(Ch2)の2波長で検出した。

【0479】

a~fのサンプルについては以下の条件で反応させている。

a: トラスツズマブ;

b: トラスツズマブ+ペプチド試薬6等量;

c: トラスツズマブをDTTにより還元;

d: buffer pH 8.0, 抗体濃度72 μMでD, L-ジチオトレイトールにより還元;

e: dをデヒドロアスコルビン酸により再酸化3時間後;

f: dをデヒドロアスコルビン酸により再酸化24時間後。

【0480】

b、d、およびeまたはfの順番で反応しており、軽鎖と重鎖に分解した後(d)、デヒドロアスコルビン酸により再酸化しeまたはfになった(図7)。また、ピークのRetention Timeから、トラスツズマブの軽鎖と修飾体の軽鎖が同じ位置にできており、重鎖のリテンションタイムがずれていることから、重鎖が修飾されていることが分かる(図7)。

【0481】

(6-3) リツキシマブ・ペプチド複合体のリンカー切断とMALDI-TOFMSによる解析

実施例5の(5-3)で合成したリツキシマブ・ペプチド複合体400 μgを60 mMリン酸バッファー(pH 8.0)に溶解し、72 μMとした後、20 mM D,L-ジチオトレイトール 10.0 μL(リツキシマブ・ペプチド複合体に対して60等量)を添

加し室温で16時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57mM PBSバッファー (pH 7.0) へと溶媒置換し、濃度を18 μ Mとした後、10mM デヒドロアスコルビン酸6.4 μ L (リツキシマブ・ペプチド複合体に対して20等量) 加えて3時間攪拌して、リンカー中のジスルフィド結合を切断した。MALDI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物はチオプロピオニル基が二つ導入された m/z 144783にピークが観測された。

【0482】

[実施例7：トラスツズマブおよびリツキシマブのチオール導入体への蛍光標識と蛍光標識率の算出]

(7-1) トラスツズマブのチオール導入体への蛍光標識と蛍光標識率の算出

実施例6の(6-1)で合成した、トラスツズマブのチオール導入体を20mM PBSバッファーに溶解し0.3mMとした後、Thermo Fisher製 DyLight 550 (0.94mM、DMFに溶解)を20 μ L添加し、室温で12時間攪拌した。反応後、Dy Removal Columnにより蛍光色素を除去した。BECKMAN COULTER製DU 800 SPECTROPHOTOMETERにより280nmと557nmの吸光度を測定した。吸光度より、蛍光標識率を算出したところ、2であった。

【0483】

(7-2) リツキシマブのチオール導入体への蛍光標識と蛍光標識率の算出

実施例6の(6-3)で合成した、リツキシマブのチオール導入体を20mM PBSバッファーに溶解し0.3mMとした後、Thermo Fisher製 DyLight 550 (0.94mM、DMFに溶解)を20 μ L添加し、室温で12時間攪拌した。反応後、Dy Removal Columnにより蛍光色素を除去した。BECKMAN COULTER製DU 800 SPECTROPHOTOMETERにより280nmと557nmの吸光度を測定した。吸光度より、蛍光標識率を算出したところ、2であった。

【0484】

[実施例8：IgG1 Fcおよびトラスツズマブのチオール導入体のペプチドマッピング]

(8-1) IgG1 Fcおよびトラスツズマブ、リツキシマブのチオール導入体のトリプシン処理

1. 5mL低吸着マイクロテストチューブに8M尿素を含む100mM炭酸水素アンモニウム緩衝液を40 μ L分注し、サンプル溶液を12 μ L、100mM炭酸水素アンモニウム緩衝液に溶解した2%のProtease MAX (プロテアーゼ消化促進剤 Protease MAXTM Surfactant)を2 μ L加え、攪拌、混合した。その後、20mMのジチオスレイトール水溶液 20 μ Lを加えて65°Cで15分間加温後、30mMのヨード酢酸水溶液 42 μ Lを添加し、遮光下室温で30分間反応させた。反応後、100mM炭酸水素アンモニウム緩衝液を150 μ L加えて攪拌し、100mM炭酸水素アンモニウム緩衝液に溶解した2%のProtease MAXを1.4 μ L加え、100 μ g/mLのトリプシン水溶液 (Proteomics Grade, Code No. T6567-5 x 20 μ g (SIGMA))を10 μ L添加して37°Cで18時間酵素消化した。消化後、10%トリフルオロ酢酸水溶液15 μ L、2%アセトニトリルを含む0.01%トリフルオロ酢酸水溶液を4.6 μ L加え、LC-MS/MS測定に使用した。

【0485】

(8-2) IgG1 Fcおよびトラスツズマブのチオール導入体のGlu-C処理

1. 5mL低吸着マイクロテストチューブに8M尿素を含む100mM炭酸水素アンモニウム緩衝液を20 μ L分注し、サンプル溶液を8 μ L加え、攪拌、混合した。その後、100mMのジチオスレイトール水溶液5 μ Lを加えて65°Cで15分間加温後、200mMヨード酢酸水溶液6 μ Lを添加し、遮光下室温で30分間反応させた。反応後、100mMのジチオスレイトール水溶液2 μ Lを加え、さらに、100mM炭酸水素アンモニウム緩衝液を3 μ L加えて攪拌し、200 μ g/mLのGlu-C Protease水溶液 (PierceTM Glu-C Protease, MS Grade、製品番号

10

20

30

40

50

：90054)を5 μ L添加して37℃で18時間酵素消化した。消化後、10%トリフルオロ酢酸水溶液4 μ L加え、LC-MS/MS測定に使用した。

【0486】

(8-3) IgG1 FcおよびトラスツズマブのLC-MS/MS測定条件

(分析装置)

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

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

【0487】

(HPLC分析条件)

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

分析カラム：ESI-column (NTCC-360/75-3-125, 75 μ m $\times$ 12.5 cm, 3 μ m (日京テクノス株式会社))

移動相A：0.1%ギ酸水溶液

移動相B：0.1%ギ酸、アセトニトリル溶液

ローディング溶液：0.1%トリフルオロ酢酸水溶液

流速：300 nL/min

サンプル注入量：2 μ L (IgG1 Fc)、3 μ L (トラスツズマブ)

グラジエント条件 (B%)：2% (0.0-0.5分)、2% $\rightarrow$ 45% (0.5-33.5分)、45% $\rightarrow$ 75% (33.5-35.5分)、75% (35.5-45.0分)

【0488】

(質量分析計分析条件)

イオン化法：ESI, Positiveモード

スキャンタイプ：Data Dependent Acquisition

Activation Type：Collision Induced Dissociation (CID)

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

【0489】

(8-4) IgG1 Fcおよびトラスツズマブの修飾部位の解析条件

LC-MS/MS測定結果に対する修飾部位解析については、Proteome Discoverer version 1.4 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて行った。

【0490】

Proteome Discovererでの解析は、Sequest HTを検索エンジンとして使用し、プリカーサーイオンの範囲を350~5000 Daとした。また、消化酵素に関しては、サンプルに合わせ、トリプシンまたはGlu-Cを消化酵素として設定し、Maximum Missed Cleavage Sitesは0とした。また、プリカーサーおよびフラグメントイオンのMass Toleranceは、それぞれ10 ppmおよび0.5 Daとした。Static Modificationにはヨード酢酸によるシステイン残基の修飾として、Carboxymethyl (+58.005 Da) を設定した。Dynamic Modificationsについては、メチオニンの酸化 (+15.995 Da) およびリジン残基への修飾体 (ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体 (+146.004 Da) を設定した。

【0491】

また、修飾部位の検索対象のアミノ酸配列のデータとして、図8に示される(1)~(3)を用いた。

10

20

30

40

50

【0492】

(8-5) IgG1 FcおよびトラスツズマブのLC-MS/MSによる修飾部位の解析結果

LC/MS/MSを用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位(ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体(+146.004Da))を含むアミノ酸26残基からなるペプチド、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK(配列番号5)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値: m/z 998.14874、理論値:998.14859、3価)が観測され(図9)、CIDスペクトルより重鎖のEU numberingにおける246位のリジン残基の修飾を示す、2価のb24に相当する m/z 1375.59(理論値:1375.14)のプロダクトイオンが確認された(図10)。また、トラスツズマブのGlu-C Protease消化によるリジン残基への修飾部位(ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体(+146.004Da))を含むアミノ酸16残基からなるペプチド、LLGGPSVFLFPPKPKD(配列番号6)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値: m/z 929.49573、理論値:929.49527、2価)が観測され(図11)、CIDスペクトルより重鎖のEU numberingにおける248位のリジン残基の修飾を示す、2価のy3に相当する m/z 505.22(理論値:505.20)のプロダクトイオンが確認された(図12)。

【0493】

さらに、IgG1 Fcのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位(ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体(+146.004Da))を含むアミノ酸26残基からなるペプチド、THTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK(配列番号7)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値: m/z 994.12885、理論値:994.12433、3価)が観測され(図13)、CIDスペクトルより重鎖のEU numberingにおける246位のリジン残基の修飾を示す、2価のb24に相当する m/z 1369.16(理論値:1369.10)のプロダクトイオンが確認された(図14)。また、IgG1 FcのGlu-C Protease消化によるリジン残基への修飾部位(ヨード酢酸によるCarboxymethyl化を受けたチオール導入体(+146.004Da))を含むアミノ酸23残基からなるペプチド、GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE(配列番号8)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値: m/z 892.12604、理論値:892.12611、3価)が観測され(図15)、CIDスペクトルより重鎖のEU numberingにおける248位のリジン残基の修飾を示す、2価のb12に相当する m/z 620.27(理論値:619.85)のプロダクトイオンが確認された(図16)。

以上より、EU numberingにおける246位および248位のリジン残基を含むペプチドフラグメントへの修飾が確認された(図9~16)。

【0494】

[実施例9:位置選択的トラスツズマブ-DM1コンジュゲートの合成、および平均DARの解析]

(9-1)位置選択的T-DM1*(トラスツズマブ-DM1)コンジュゲートの合成

実施例6の(6-1)で合成した生体直行性官能基が二つ導入された化合物0.35mgを200 μ Lの100mM PBS、10mM EDTAバッファーに溶解させ、1.75mg/mLとしたのち、10 μ LのN,N'-ジメチルホルムアミドとDM-1(Abzena社製)をN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し5mMとしたものを4.8 μ L添加し20℃で2時間攪拌した。2時間後、N-アセチルシステインを100mM PBS、10mM EDTAバッファーに溶解させて50mMとしたものを1 μ L添加しさらに20℃で1時間攪拌した。反応後、NAP-5カラムにより抽出し、DM-1を取り除いた。

【0495】

(9-2) SolovPEによる反応後の抗体濃度測定

280nmの波長で吸光度を測定し、モル吸光係数より抗体濃度を算出したところ、0.48mg/mLであった。溶液量は0.7mLであったので、収量は0.336mgと算出できる。

【0496】

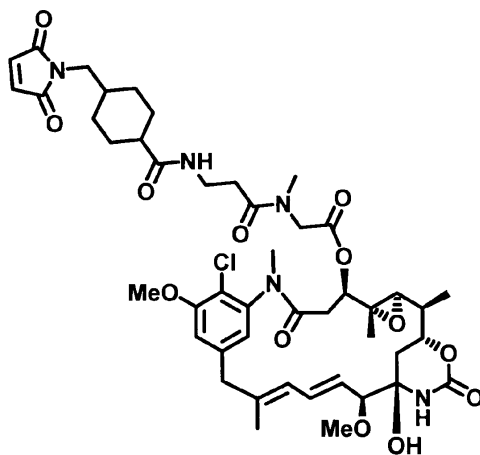
(9-3) Q-TOFMSによるDARの算出

Q-TOFMSはアジレント社製のAgilent 6550 coupled to Agilent 1290 UPLC with DAD detector, Autosampler cooling and Thermostatted column compartmentを使用した。ソフトウェアはMassHunterを使用し、DARを算出した。生成物はDM-1が2つ導入された149945にピークが観測され、平均DARは2と算出された(図23)。

【0497】

本実施例で用いたDM1*は、以下である。

【化75】



Chemical Formula: C₄₆H₆₀ClN₅O₁₃

Exact Mass: 925.3876

【0498】

[実施例10: Biacoreによる結合性評価]

(10-1) ELISAによる抗原HER2への結合性評価

実施例9の(9-1)で合成した位置選択的T-DM1(トラスツズマブ-DM1)コンジュゲートの抗原HER2への結合性をELISAにより評価した。コントロールとしてカドサイラ(T-DM1)も評価した。その結果、カドサイラの解離定数(KD値)は6.372±0.76pMであり、位置選択的T-DM1(トラスツズマブ-DM1)コンジュゲートは6.684±0.17pMであった。したがって、本手法により合成されたADCは抗原結合性を維持していると考えられる。

【0499】

(10-2) BiacoreによるFcRnへの結合性評価

実施例9の(9-1)で合成した位置選択的T-DM1(トラスツズマブ-DM1)コンジュゲートのneonatal Fc receptor(FcRn)への結合性をELISAにより評価した。抗体のFcRnへの結合性がより高い場合、抗体がより長い血中半減期を有することが知られている。コントロールとしてカドサイラ(T-DM1)も評価した。その結果、カドサイラの解離定数(KD値)は1.65±0.05μMであり、位置選択的T-DM1(トラスツズマブ-DM1)コンジュゲートは0.258±0.001μMであった。したがって、本手法により合成されたADCはFcRn結合性を維持

していると考えられ、既存のADCであるカドサイラよりも6倍程度FcRnへの親和性が高くなっていることが分かった。

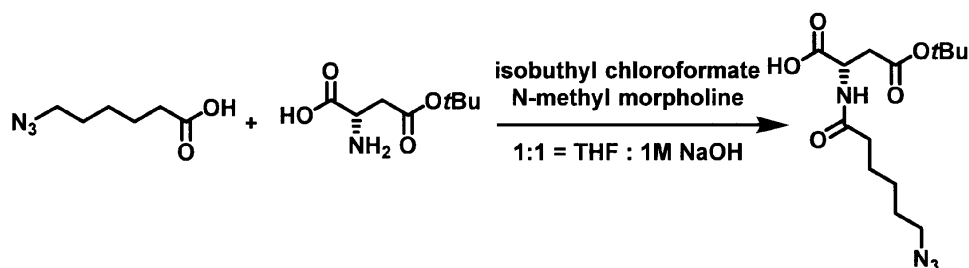
【0500】

【実施例11：（1）種々の切断性リンカーの合成、ならびに（2）合成したリンカーとIgG1 Fc結合性ペプチドとの連結による、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチド-アジド修飾チオエステルリンカー連結物-NHS活性化体、ペプチド-マレイミド修飾チオエステルリンカー連結物-NHS活性化体、ペプチド-アジド修飾エステルリンカー連結物-NHS活性化体、およびペプチドアセタールリンカー連結物-NHS活性化体）の合成]

（11-1）チオエステルリンカーの合成とペプチドとの連結

（11-1-1）チオエステルリンカーの合成

【化76】



【0501】

6-アジドヘキサン酸（300mg，1.91mmol）をTHF溶媒（20mL）に溶解させ、0℃にてクロロ炭酸イソブチル（284μL，2.10mmol）、N-メチルモルホリン（273μL，2.48mmol）を加え30分攪拌し、6-アジドヘキサン酸の混合酸無水物を調製した。室温にて4-（tert-ブトキシオキソ）-2-アミノ-ブタン酸（362mg，2.10mmol）を1M水酸化ナトリウム水溶液（2.10mL）に溶解させたのち、前述の6-アジドヘキサン酸の混合酸無水物のTHF溶液を室温にて滴下した。室温にて16時間攪拌した後、6M塩酸水溶液を加え、系内のpHを3.0に調整した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え5分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより粗生成物を得たのち、カラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン：メタノール=10：1）にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより、4-（tert-ブトキシオキソ）-2-（6-アジドヘキシル-1-オキソ）アミノ-ブタン酸（352mg，1.07mmol）を得た。

【0502】

^1H NMR（400MHz，Chloroform-d） δ 6.56（d，J=7.6Hz，1H），4.76（ddd，J=7.6，5.2，4.8Hz，1H），3.22（t，3.6Hz，2H），2.90（dd，J=17.2，4.8Hz，1H），2.70（dd，J=17.2，5.2Hz，1H），2.22（t，J=7.2Hz，2H），1.53-1.65（m，4H），1.37（s，9H），1.36-1.31（m，2H）。

MS（ESI） m/z：351 [M+Na]⁺

【0503】

10

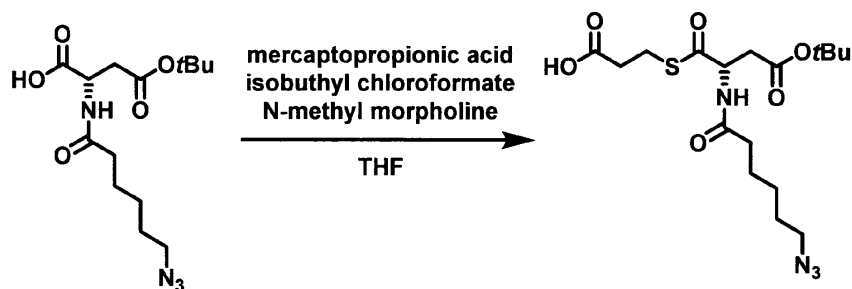
20

30

40

50

【化 77】



10

【0504】

4-(tert-butoxycarbonyl)-2-(6-azidohexyl-1-oxo)amino-
butanoic acid (50.0 mg, 0.152 mmol) を THF (1.5 mL) に溶解させ、
0℃にてクロロ炭酸イソブチル (30.9 μL, 0.228 mmol)、N-メチルモル
ホリン (28.5 μL, 0.258 mmol) を加え30分攪拌し、対応する混合酸無水
物を調製した。室温にてメルカプトプロピオン酸 (32.3 mg, 0.456 mmol)
を THF (mL) に溶解させたのち、前述の混合酸無水物の THF 溶液を室温にて滴下し
た。室温にて16時間攪拌した後、1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加え、系内の pH を 9
.0 に調整した。反応液を水と酢酸エチルで洗浄し、水相を回収した。水相に 6 M 塩酸水
溶液を加え、系内の pH を 3.0 に調整した後、酢酸エチルによる分液抽出を行った後、
有機相を食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え5分静置した。フィルトレーショ
ンにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより、3-[4-(tert-
butoxycarbonyl)-2-(6-azidohexyl-1-oxo)amino-1-oxo]
スルファニルプロパン酸 (60.1 mg, 0.144 mmol) を得た。

20

【0505】

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 6.69 (d, J=9.
6 Hz, 1H), 4.89 (dt, J=9.6, 4.4 Hz, 1H), 3.22 (t, 8
.5 Hz, 2H), 3.07 (t, 7.2 Hz, 2H), 2.82-2.60 (m, 3H)
, 2.29-2.22 (m, 3H), 1.70-1.52 (m, 4H), 1.42-1
.39 (m, 2H), 1.40 (s, 9H).

30

MS (ESI) m/z: 439 [M+H]⁺

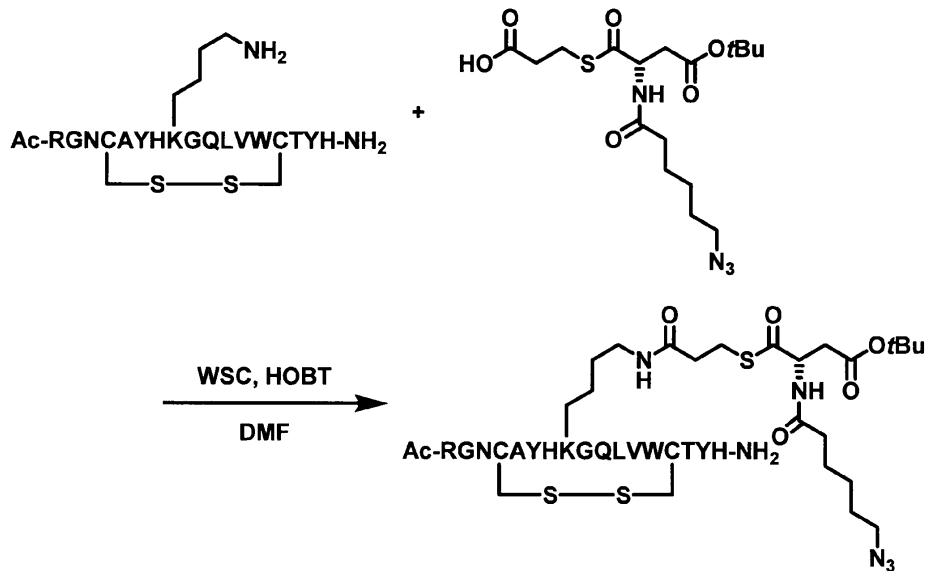
【0506】

(11-1-2) チオエステルリンカーとペプチドの連結

40

50

【化 7 8】



上記アミノ酸配列は、配列番号 39 である。

【0507】

実施例 1-2 で合成した $\text{Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH}_2$ (配列番号 39) のペプチド (20.0 mg, 9.64 μmol 、ただし、4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している。) を N, N'-ジメチルホルムアミド 1 mL に溶解し、3-[4-(tert-ブトキシオキソ)-2-(6-アジドヘキシ-1-オキソ)アミノ-1-オキソ]-スルファニルプロパン酸 (60.1 mg, 0.144 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (25.9 mg, 0.135 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (18.2 mg, 0.135 mmol) を DMF 1 mL に溶解させ、系中に加えた。室温で 12 時間攪拌した後、0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドリinker 連結-tBu 体 (15 mg, 7.23 μmol) を得た。

【0508】

MS (ESI) m/z : $z = 2$ 1237 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, $z = 3$ 824 $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$

【0509】

10

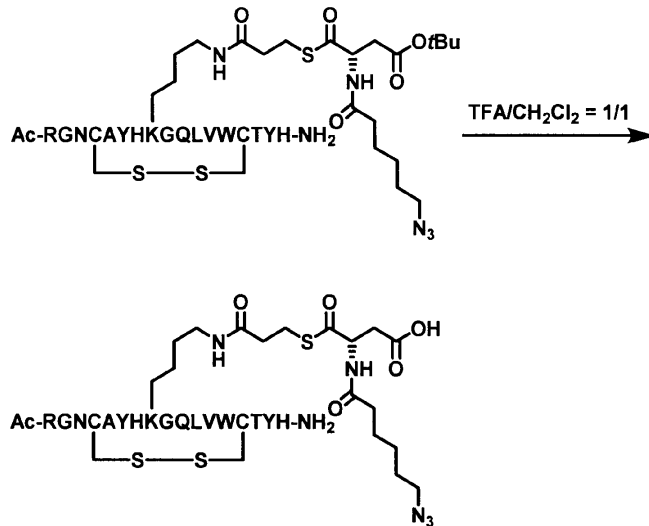
20

30

40

50

【化 7 9】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 39 である。

【0510】

上記ペプチドリinker連結物 (10.0 mg, 4.82 μmol) をジクロロメタン 0.250 mL 中に溶解し、トリフルオロ酢酸を 0.250 mL 加え室温中で 1 時間攪拌した。減圧濃縮を行った後、0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドリinker連結物-カルボン酸体 (6.2 mg, 2.57 μmol) を得た。

20

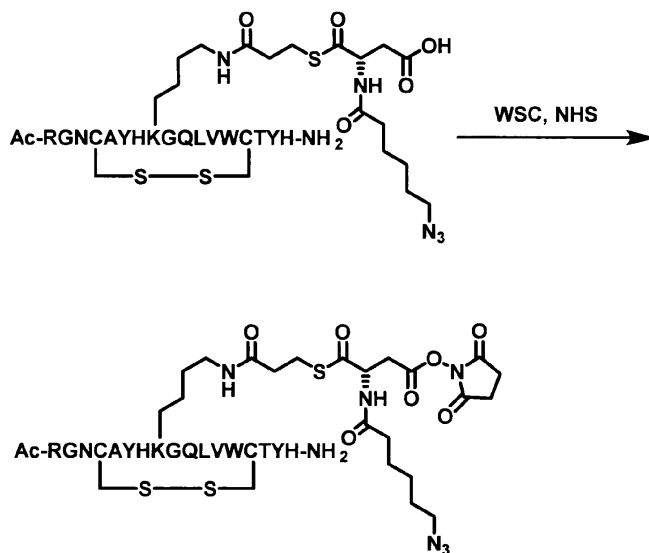
【0511】

MS (ESI) m/z : z = 2 1208 [M + 2H]²⁺, z = 3 806 [M + 3H]³⁺

【0512】

【化 8 0】

30



40

上記アミノ酸配列は、配列番号 39 である。

【0513】

上記ペプチドリinker連結物-カルボン酸体 (5.7 mg, 2.36 μmol) を N,

50

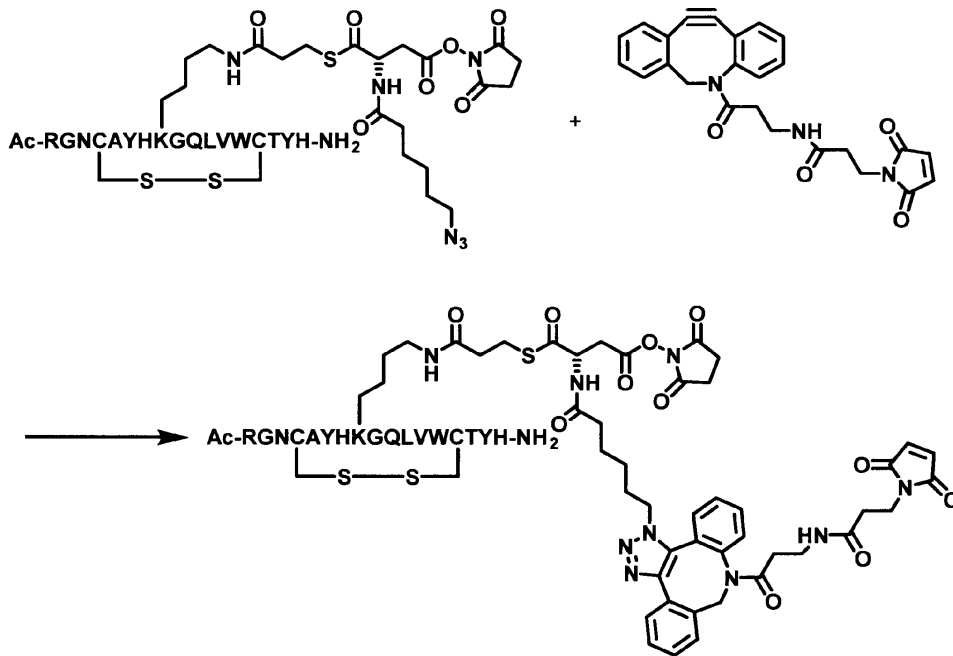
N'-ジメチルホルムアミド 0.5 mL に溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (9.1 mg, 47.2 μmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド (8.1 mg, 70.8 μmol) を加え 16 時間攪拌した。反応液に 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド-アジド修飾チオエステルリンカー連結物-NHS 活性化体 (3.0 mg, 1.19 μmol) を得た。

【0514】

MS (ESI) m/z : $z = 2$ 1257 $[M + 2H]^+$, $z = 3$ 838 $[M + 3H]^+$

【0515】

【化81】



上記アミノ酸配列は、配列番号 39 である。

【0516】

上記ペプチド-アジド修飾チオエステルリンカー連結物-NHS 活性化体 (3.0 mg, 1.20 μmol) を N, N'-ジメチルホルムアミド 0.5 mL に溶解し、上記ジベンゾシクロオクチン-マレイミド (0.6 mg, 1.2 μmol) を加え 16 時間攪拌した。反応液に 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド-マレイミド修飾チオエステルリンカー連結物-NHS 活性化体 (2.8 mg, 0.95 μmol) を得た。

【0517】

MS (ESI) m/z : $z = 2$ 1471 $[M + 2H]^+$, $z = 3$ 981 $[M + 3H]^+$

【0518】

(11-2) エステルリンカーの合成とペプチドとの連結

(11-2-1) エステルリンカーの合成

10

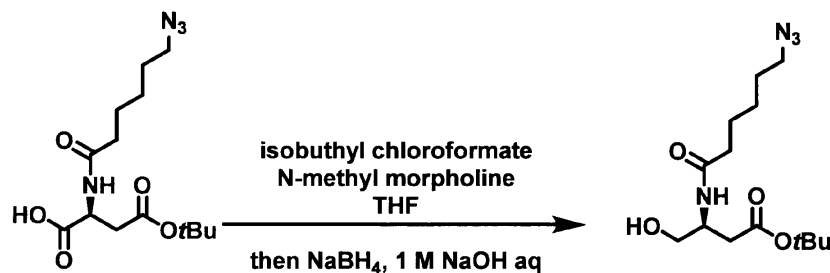
20

30

40

50

【化 8 2】



10

【0 5 1 9】

4-(tert-ブトキシ-オキソ)-2-[(6-アジドヘキシ-1-オキソ)アミノ]-ブタン酸(50 mg, 0.152 mmol)をTHF(1.5 mL)に溶解させ、0℃にてクロロ炭酸イソブチル(22.7 μL, 0.167 mmol)、N-メチルモルホリン(21.7 μL, 0.198 mmol)を加え30分攪拌し、対応する混合酸無水物を調製した。室温にて水素化ホウ素ナトリウム(28.7 mg, 0.76 mmol)を1 M水酸化ナトリウム水溶液(1.0 mL)に溶解させたのち、前述の混合酸無水物のTHF溶液を室温にて滴下した。室温にて16時間攪拌した後、系内に酢酸エチルを加え、水、食塩水で洗浄後、有機相を回収し、無水硫酸マグネシウムを加え5分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより粗生成物を得たのち、カラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン:メタノール=10:1)にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより、tert-ブチル 4-ヒドロキシ-3-[(6-アジドヘキシ-1-オキソ)アミノ]-ブタノエート(38.1 mg, 0.121 mmol)を得た。

20

【0 5 2 0】

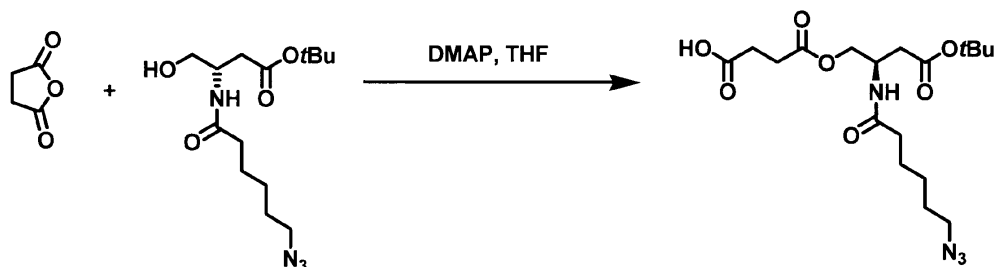
¹H NMR(400 MHz, Chloroform-d) δ 6.36(d, J=7.2 Hz, 1H), 4.20(m, 1H), 3.69(dt, 12.4, 4.4 Hz, 2H), 3.27(t, J=6.8 Hz, 2H), 2.50(d, J=6.0 Hz, 2H), 2.22(t, J=7.2 Hz, 2H), 1.53-1.72(m, 4H), 1.41(s, 9H), 1.40-1.38(m, 2H).

30

MS(ESI) m/z: 337 [M+Na]⁺

【0 5 2 1】

【化 8 3】



40

【0 5 2 2】

tert-ブチル 4-ヒドロキシ-3-[(6-アジドヘキシ-1-オキソ)アミノ]-ブタノエート(70.4 mg, 0.224 mmol)をTHF(2.2 mL)に溶解させ、室温にてコハク酸無水物(67.3 mg, 0.673 mmol)、N,N-ジメチルアミノピリジン(82.2 mg, 0.673 mmol)を加え、室温にて16時間攪拌した後、1 M水酸化ナトリウム水溶液を加え、系内のpHを9.0に調整した。反応液に水と酢酸エチルを加え分液操作をしたのち、水相を回収した。水相に6 M塩酸水溶液を加

50

え、系内の pH を 3.0 に調整した後、酢酸エチルによる分液抽出を行った後、有機相を食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え 5 分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより、4-[4-(tert-ブトキシ-オキシ)-2-(6-アジドヘキシ-1-オキシ)アミノ]オキシ-4-オキソ-プロパン酸 (78.9 mg, 0.190 mmol) を得た。

【0523】

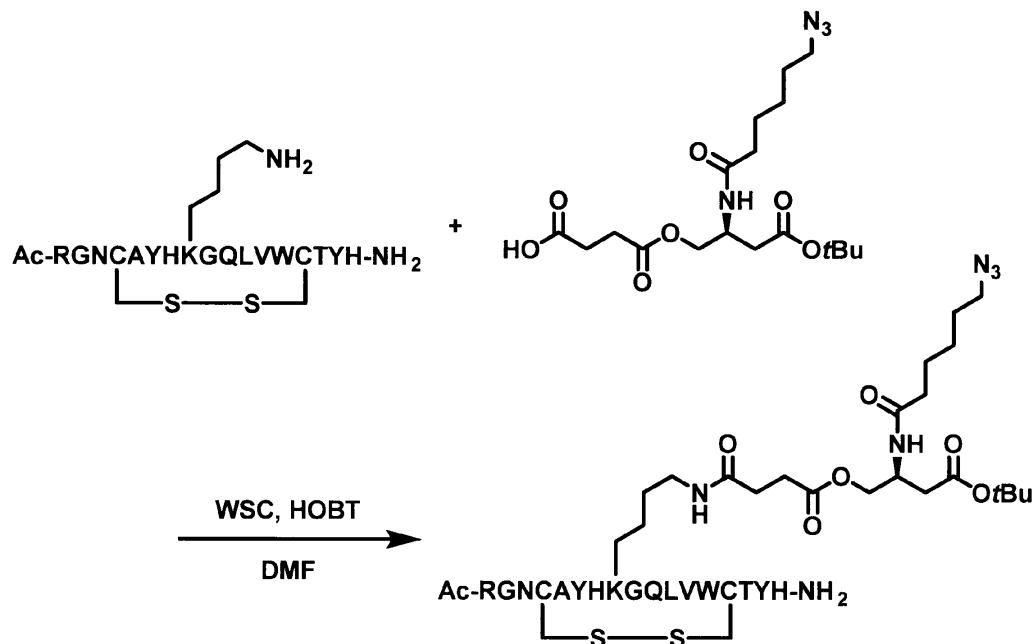
^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 6.28 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 4.52 (m, 1H), 4.29 (dd, $J=11.2, 4.4$, 1H), 4.15 (dd, $J=11.2, 5.6$), 3.28 (m, 2H), 2.66 (m, 4H), 2.49 (d, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.18 (t, $J=7.2$, 2H), 1.72-1.50 (m, 4H), 1.42 (s, 9H), 1.41-1.38 (m, 2H).

MS (ESI) m/z : 415 $[\text{M}+\text{H}]^+$

【0524】

(11-2-2) エステルリンカーとペプチドの連結

【化84】



上記アミノ酸配列は、配列番号 39 である。

【0525】

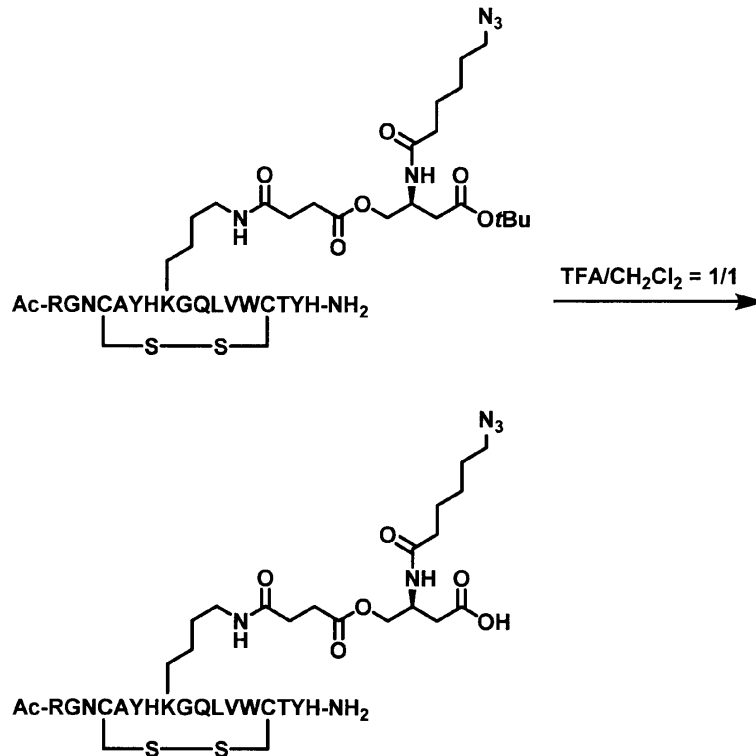
実施例 1-2 で合成した Ac-RGNCA YHKGQLVWCTYH-NH₂ (配列番号 39) のペプチド (20 mg, 9.63 μmol 、ただし、4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している。) を N, N'-ジメチルホルムアミド 1 mL に溶解し、(4-[4-(tert-ブトキシ-オキシ)-2-(6-アジドヘキシ-1-オキシ)アミノ]オキシ-4-オキソ-プロパン酸 (39.9 mg, 96.3 μmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (25.8 mg, 0.135 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (18.2 mg, 0.135 mmol) を DMF 1 mL に溶解させ、系中に加えた。室温で 12 時間攪拌した後、0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドリinker連結-tBu 体 (18.2 mg, 7.36 μmol) を得た。

【0526】

MS (ESI) m/z : $z = 2$ 1236 $[M + 2H]^+$, $z = 3$ 824 $[M + 3H]^+$

【0527】

【化85】



上記アミノ酸配列は、配列番号39である。

【0528】

上記ペプチドリンカー連結物 (16.5 mg, 6.67 μmol) をジクロロメタン 1.0 mL 中に溶解し、トリフルオロ酢酸を 1.0 mL 加え室温中で 1 時間攪拌した。減圧濃縮を行った後、0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドリンカー連結物-カルボン酸体 (15.2 mg, 6.29 μmol) を得た。

【0529】

MS (ESI) m/z : $z = 2$ 1208 $[M + 2H]^+$, $z = 3$ 805 $[M + 3H]^+$

【0530】

10

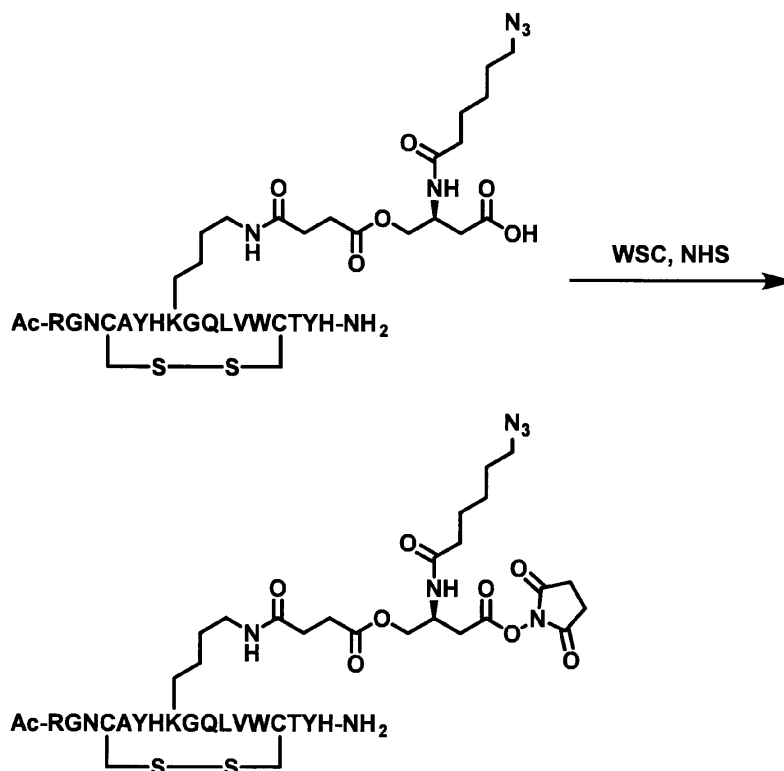
20

30

40

50

【化 8 6】



上記アミノ酸配列は、配列番号 39 である。

【0531】

上記ペプチドリinker連結物-カルボン酸体 (3.0 mg, 1.21 μmol) を N, N'-ジメチルホルムアミド 1 mL に溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (4.7 mg, 24.3 μmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド (4.2 mg, 36.4 μmol) を加え 16 時間攪拌した。反応液に 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド-アジド修飾エステルリinker連結物-NHS 活性化体 (3.0 mg, 1.19 μmol) を得た。

30

【0532】

MS (ESI) m/z : z = 2 1257 [M + 2H]²⁺, z = 3 837 [M + 3H]³⁺

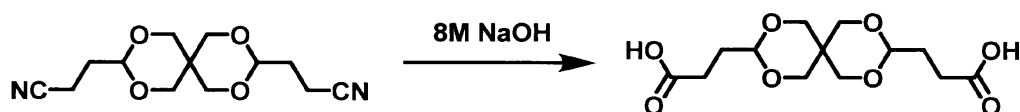
【0533】

(11-3) アセタールリinkerの合成とペプチドの連結

(11-3-1) アセタールリinkerの合成

40

【化 8 7】



【0534】

3,9-ビス(2-シアノエチル)-2,4,8,10-[5.5]テトラオキサスピロウンデカン (200 mg, 0.752 mmol) を 8 M 水酸化ナトリウム水溶液 20 mL

50

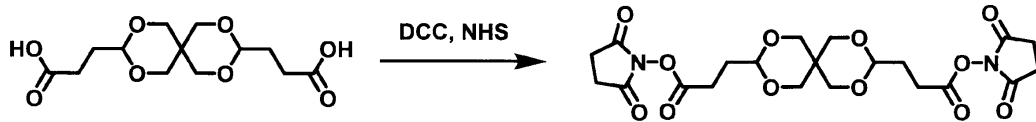
Lに溶解させ、100℃で16時間攪拌した。16時間後室温に戻し、水相に6M塩酸水溶液を加え、系内のpHを7.0に調整した後、アセトニトリル、食塩水を順次加え分液操作を行った。アセトニトリル相を回収後、無水硫酸ナトリウムを加え5分静置した。フィルトレーションにより硫酸ナトリウムを取り除き、減圧下濃縮することにより、2, 4, 8, 10-[5.5]テトラオキサスピロウンデカン-3, 9-ジプロパン酸(151 mg, 0.497 mmol)を得た。

【0535】

MS (ESI) m/z : 327 [M+Na]⁺

【0536】

【化88】



【0537】

2-[9-(2-メトキシ-2-オキソエチル)-2,4,8,10-テトラオキサスピロ[5.5]ウンデカン-3-イル]酢酸(30.0 mg, 0.099 mmol)を酢酸エチル0.5 mLに溶解し、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(22.4 mg, 0.109 mmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド(31.2 mg, 0.271 mmol)を加え2時間攪拌した。生じた白色結晶をろ過し母液を減圧下濃縮し、ビス(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)2,4,8,10-[5.5]テトラオキサスピロウンデカン-3,9-ジプロパノエート(15 mg, 31.8 μmol)を得た。

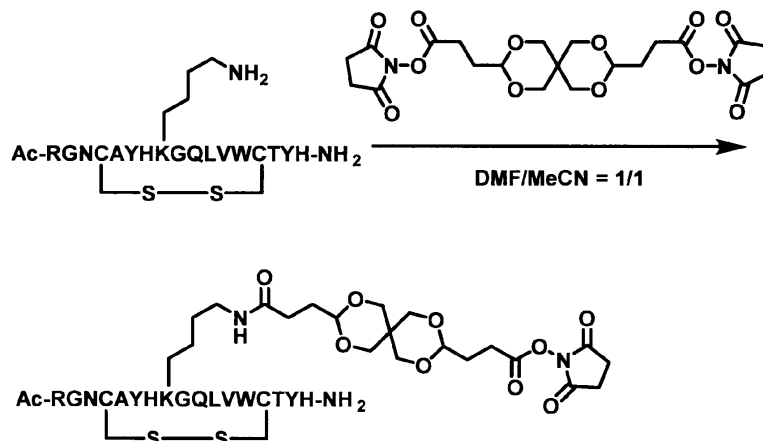
【0538】

MS (ESI) m/z : 521 [M+Na]⁺

【0539】

(11-3-2) アセタールリンカーとペプチドの連結

【化89】



上記アミノ酸配列は、配列番号39である。

【0540】

実施例1-2で合成したAc-RGNCA YHKGQLVWCT YH-NH₂(配列番号39)のペプチド(3.0 mg, 1.45 μmol、ただし、4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している。)をN,N'-ジメチルホルムアミド0.3 mLに溶解し、(ビス(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)2,4,8,10-[5.5]テトラオキサスピロウンデカン-3,9-ジプロパノエ

10

20

30

40

50

ート (14.4 mg, 28.9 μmol) を加え室温で12時間攪拌した。水を加え中性のアセトニトリルおよび水を溶媒として逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドアセタールリンカー連結物-NHS活性化体 (2.8 mg, 1.14 μmol) を得た。

【0541】

MS (ESI) m/z : $z = 2$ 1729 $[M + 2H]^+$, $z = 3$ 819 $[M + 3H]^+$

【0542】

【実施例12：種々の化合物による抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾、ならびにESI-TOFMSによる解析】

(12-1) アジド修飾チオエステルリンカー結合性ペプチド試薬によるIgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

実施例11の(11-1-2)で合成したペプチド-アジド修飾チオエステルリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し4mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ (中外製薬) 120 μg を50mM酢酸ナトリウムバッファ (pH 5.5) 39.8 μL に溶解させ、4mMのペプチド試薬を2.4 μL (抗体に対して12等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57mM PBSバッファ (pH 7.4) へと溶媒置換し反応を停止した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148225にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが二つ導入された153018にピークが観測された。

【0543】

(12-2) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(12-1)で生成した抗体・ペプチド複合体のPBS溶液に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2.0 μL (抗体に対して100等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595, 50757に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖に結合性ペプチドが導入された52995および53156にピークが観察され、原料と同じ23440に軽鎖ピークが観測された。

【0544】

(12-3) マレイミド修飾チオエステルリンカー結合性ペプチド試薬によるIgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

実施例11の(11-1-2)で合成したペプチド-マレイミド修飾チオエステルリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し4mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ (中外製薬) 120 μg を50mM酢酸ナトリウムバッファ (pH 5.5) 39.8 μL に溶解させ、4mMのペプチド試薬を2.4 μL (抗体に対して12等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57mM PBSバッファ (pH 7.4) へと溶媒置換し反応を停止した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148225にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが二つ導入された153901にピークが観測された。

【0545】

(12-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(12-3)で生成した抗体・ペプチド複合体のPBS溶液に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2.0 μL (抗体に対して100等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594, 50757に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、

生成物は重鎖に結合性ペプチドが導入された53421および53600にピークが観察され、原料と同じ23440に軽鎖ピークが観測された。

【0546】

(12-5) アジド修飾エステルリンカー結合性ペプチド試薬によるIgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

実施例11の(11-2-2)で合成したペプチド-アジド修飾エステルリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し4mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)120μgを50mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 5.5)39.8μLに溶解させ、4mMのペプチド試薬を2.4μL(抗体に対して12等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57mM PBSバッファー(pH 7.4)へと溶媒置換し反応を停止した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148225にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが二つ導入された153028にピークが観測された。

【0547】

(12-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(12-5)で生成した抗体・ペプチド複合体のPBS溶液に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2.0μL(抗体に対して100等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50594および50757に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖に結合性ペプチドが導入された52994および53154にピークが確認され、原料と同じ23440に軽鎖ピークが観測された。

【0548】

(12-7) アセタールリンカー結合性ペプチド試薬によるIgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

実施例11の(11-3-2)で合成したペプチド-アセタールリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し4mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)120μgを50mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 5.5)39.8μLに溶解させ、4mMのペプチド試薬を2.4μL(抗体に対して12等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57mM PBSバッファー(pH 7.4)へと溶媒置換し反応を停止した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148238にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが二つ導入された153522にピークが観測された。

【0549】

(12-8) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(12-7)で生成した抗体・ペプチド複合体のPBS溶液に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2.0μL(抗体に対して100等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595, 50757に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖に結合性ペプチドが導入された52940および53103にピークが観察され、原料と同じ23440に軽鎖ピークが観測された。

【0550】

[実施例13: トラスツズマブ・ペプチド複合体の切断、およびそれらの生成物のESI-TOFMSによる解析]

(13-1) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断、および生成物のESI-TOFMSによる解析

まず、実施例12の(12-1)で合成したトラスツズマブ・ペプチド複合体40μgを100mM Tris・塩酸バッファー(pH 8.5)に溶解し、2.0μMとした後

、室温で48時間攪拌して、リンカー中のチオエステル結合を切断した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、トラスツズマブ・ペプチド複合体は153018にピークが観測され、生成物はアジドが二つ導入された148729にピークが観測された。

【0551】

(13-2) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(13-1) で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2.0μL(抗体に対して100等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブ・ペプチド複合体は52995および53155に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジドが導入された50850および51010にピークが観測され、原料と同じ23440に軽鎖ピークが観測された。

【0552】

(13-3) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断、および生成物のESI-TOFMSによる解析

まず、実施例12の(12-3)で合成したトラスツズマブ・ペプチド複合体20μgを100mM Tris・塩酸バッファー(pH8.5)に溶解し、2.0μMとした後、室温で48時間攪拌して、リンカー中のチオエステル結合を切断した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、トラスツズマブ・ペプチド複合体は153901にピークが観測され、生成物はマレイミドが二つ導入された149476にピークが観測された。

【0553】

(13-4) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(13-3) で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2.0μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、トラスツズマブ・ペプチド複合体は53421、および53600に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にマレイミドが導入された51278および51439にピークが観測され、原料と同じ23440に軽鎖ピークが観測された。

【0554】

(13-5) エステルリンカーの切断とESI-TOFMSによる解析

任意のバッファー(pH4.5~9.0)に、実施例12の(12-5)で合成した抗体・ペプチドエステルリンカー複合体を溶解し、エステラーゼ系酵素を加え室温で攪拌することで、エステル構造が加水分解し、アジド基が抗体上に残る。これをESI-TOFMSにより質量を測定することができる。

【0555】

(13-6) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断、および生成物のESI-TOFMSによる解析

まず、実施例12の(12-7)で合成したトラスツズマブ・ペプチド複合体20μgを100mM グリシン・塩酸バッファー(pH2.0)に溶解し、2.0μMとした後、室温で攪拌して、リンカー中のアセタール結合を切断した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、トラスツズマブ・ペプチド複合体は1535223にピークが観測され、生成物はアルデヒドが二つ導入された148452にピークが観測された。

【0556】

(13-7) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(13-1) で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2.0μL(抗体に対して100等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料の抗体・ペプチド複合

10

20

30

40

50

体は52940, および53103に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアルデヒドが導入された50683および50845にピークが観察され、原料と同じ23440に軽鎖ピークが観測された。

【0557】

[実施例14: トラスツズマブ-アジド導入体と低分子化合物とのコンジュゲーション]

(14-1) トラスツズマブのアジド導入体と低分子化合物とのコンジュゲーション

実施例13の(13-1)で合成した、トラスツズマブのアジド導入体を20mM PBSバッファに溶解し0.3mMとした後、Sigma Aldrich製 Dibenzocyclooctyne-Cy3 (0.94mM、DMFに溶解)を20μL添加し、室温で12時間攪拌した。反応液をAmicon 10Kにより9.57mM PBSバッファ(pH7.4)へと溶媒置換し反応を停止した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブのアジド導入体は148706にピークが観測され、生成物は低分子が二つ導入された150688にピークが観測された。

【0558】

(14-2) トラスツズマブ-低分子化合物複合体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(14-1)で生成した抗体・低分子複合体のPBS溶液に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液2μL(抗体に対して100等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブのアジド導入体は50850および51010に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖に低分子が導入された51834および51990にピークが観察され、原料と同じ23440に軽鎖ピークが観測された。

【0559】

[実施例15: トラスツズマブのアジド導入体のペプチドマッピング]

(15-1) トラスツズマブのアジド導入体(実施例14)のトリプシン処理

1. 5mL低吸着マイクロテストチューブにサンプル溶液を10μL、50mM炭酸水素アンモニウム緩衝液、20%トリフルオロエタノールに溶解した20mMのジチオスレイトール水溶液10μLを加えて65℃で1時間加温後、50mMのヨードアセトアミド水溶液10μLを添加し、遮光下室温で30分間300rpmで振盪し反応させた。反応後、50mM炭酸水素アンモニウム緩衝液を40μL加えて攪拌し、20ng/μLのトリプシン水溶液(Proteomics Grade, Code No. T6567-5x20μg(SIGMA))を10μL添加して37℃で18時間酵素消化した。消化後、20%トリフルオロ酢酸水溶液2μL添加し反応を止めた。その後、終濃度0.25%トリフルオロ酢酸水溶液となるように2倍希釈し、LC-MS/MS測定に使用した。

【0560】

(15-2) トラスツズマブのLC-MS/MS測定条件

(分析装置)

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

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

【0561】

(HPLC分析条件)

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

分析カラム: ESI-column(NTCC-360/75-3-125, 75μm x 12.5cm, 3μm(日京テクノス株式会社))

移動相A: 0.1%ギ酸水溶液

移動相B: 0.1%ギ酸、アセトニトリル溶液

ローディング溶液: 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液

流速: 300nL/min

サンプル注入量：1 μ L

グラジエント条件 (B%)：2% (0.0–0.5分)、2%→30% (0.5–23.5分)、30%→75% (23.5–25.5分)、75% (25.5–35.0分)
【0562】

(質量分析計分析条件)

イオン化法：ESI, Positiveモード

スキャンタイプ：Data Dependent Acquisition

Activation Type: Collision Induced Dissociation (CID)

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

10

【0563】

(15–3) トラストズマブの修飾部位の解析条件

LC-MS/MS測定結果に対する修飾部位解析については、Proteome Discoverer version 1.4 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて行った。

【0564】

Proteome Discovererでの解析は、Sequest HTを検索エンジンとして使用し、プリカーサーイオンの範囲を350~5000Da、Total Intensity Thresholdを50000とした。また、トリプシンを消化酵素として設定し、Maximum Missed Cleavage Sitesは3とした。また、プリカーサーおよびフラグメントイオンのMass Toleranceは、それぞれ5ppmおよび0.5Daとした。Static Modificationにはヨードアセトアミドによるシステイン残基の修飾として、Carbamidomethyl (+57.021Da) を設定した。Dynamic Modificationsについては、メチオニンの酸化 (+15.995Da) およびリジン残基への修飾体 (アジド導入体 (+254.102Da)、アミン導入体 (+228.111Da)) を設定した。さらに、Peptide ConfidenceがHighのもののみとなるようフィルターをかけた。

20

【0565】

また、修飾部位の検索対象のアミノ酸配列のデータとして、図24に示される(1)~(3)を用いた。

【0566】

(15–4) トラストズマブのLC-MS/MSによる修飾部位の解析結果

LC-MS/MSを用いた解析の結果、トラストズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位 (アジド導入体 (+254.102Da)) を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS (配列番号40) のペプチドフラグメントのMSスペクトル (実測値： m/z 979.49982、理論値：979.49975、4価) が観測され (図25)、CIDスペクトルより重鎖のEU numberingにおける246位のリジン残基の修飾を示す、2価の y_{19} に相当する m/z 1192.87 (理論値：1192.64) のプロダクトイオンが確認された (図26)。

40

【0567】

[実施例16：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 (ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラストズマブの修飾およびその解析]

(16–1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCKYHRGQLVWCTYH-NH₂ (配列番号42) の配列をFmo

50

c 固相合成法により合成した。ペプチド合成装置は C E M 社製 L i b e r t y B l u e を使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。R e s i n は F m o c - N H - S A L - P E G R e s i n H L、アルギニン (R)、システイン (C) ヒスチジン (H) はダブルカップリングを行った。R e s i n からの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール＝94：2.5：1.0：2.5の溶液中3時間攪拌の条件で行った。切り出し後 R e s i n をフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈澱を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを L C - M S により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物 (36.4 mg, 16.8 μmol) を得た。

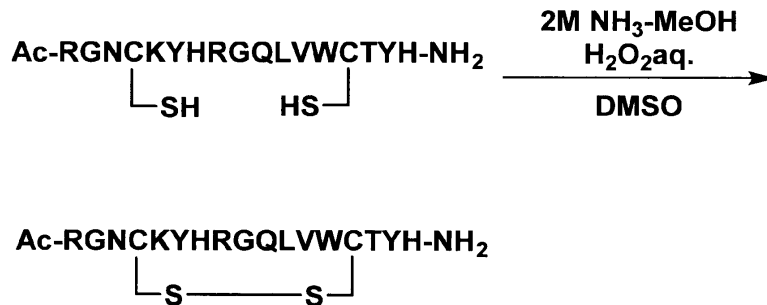
【0568】

M S (E S I) m/z : z = 3 721.80 [M + 3 H]³⁺, z = 4 541.60 [M + 4 H]⁴⁺

【0569】

(16-2) A c - R G N C K Y H R G Q L V W C T Y H - N H ₂ (配列番号42) の4位と14位の C y s での分子内ジスルフィド結合の形成

【化90】



上記アミノ酸配列は、配列番号42である。

【0570】

(16-1) で合成したペプチド (36.4 mg, 16.8 μmol) を D M S O (5.00 mL) に溶解し 2 M N H ₃ - M e O H (17.0 μL, 33.6 μmol)、過酸化水素水 (34.0 μL, 0.336 mmol) を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを L C - M S により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (20.3 mg, 9.40 μmol) を得た。

【0571】

M S (E S I) m/z : z = 3 721.25 [M + 3 H]³⁺, z = 4 541.20 [M + 4 H]⁴⁺

【0572】

(16-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

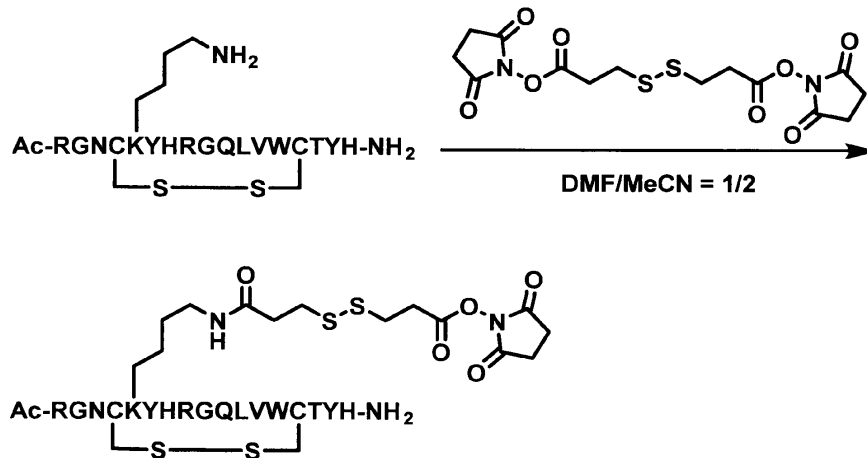
20

30

40

50

【化 9 1】



上記アミノ酸配列は、配列番号 42 である。

【0573】

(16-2) で合成した $\text{Ac-RGNCKYHRGQLVWCTYH-NH}_2$ (配列番号 42) (20.3 mg, 9.40 μmol 、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N -ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N -スクシンイミジル) (228 mg, 0.563 mmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (6.80 mg, 2.78 μmol) を得た。

【0574】

MS (ESI) m/z : $z=3$ 817.60 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, $z=4$ 613.45 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$

HPLC 純度: 100%

【0575】

(16-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾とMALDI-TOFMS による解析

(16-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N' -ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。MALDI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブ由来ピークは確認されず、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 152639 にピークが観測された。

【0576】

(16-5) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC 解析
(16-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHIC-HPLC により解析した。カラムはButyl-NPR (TOSO) 4.6 x 350 mm 2.5 μm を使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH

7.0、B__Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は1.0ml/min、グラジエントをB 0→100%, 12min (データ採取20min)、カラム温度は25℃、サーモスタット温度はRT、検出器はUV 225nm (Ch1)、280nm (Ch2)の2波長で検出した。

【0577】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

【0578】

UV 225nmの場合、Retention Time 9.454分はトラスツズマブ原料、9.845分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、10.173分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物であると考えられる。UV 280nmの場合、Retention Time 9.541分はトラスツズマブ原料、9.936分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、10.254分はペプチドがトラスツズマブに2個導入された化合物であると考えられる (図27)。

【0579】

【実施例17: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 (ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(17-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCAWHRGKLVWCTYH-NH₂ (配列番号43)の配列をFmoc固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はCEM社製Liberty Blueを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ResinはFmoc-NH-SAL-PEG Resin HL、アルギニン (R)、システイン (C) ヒスチジン (H) はダブルカップリングを行った。Resinからの切り出しはトリフルオロ酢酸: 水: トリイソプロピルシラン: エタンジチオール=94:2.5:1.0:2.5の溶液中3時間攪拌の条件で行った。切り出し後Resinをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテル加えエーテル沈澱を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物 (64.8mg, 30.5μmol)を得た。

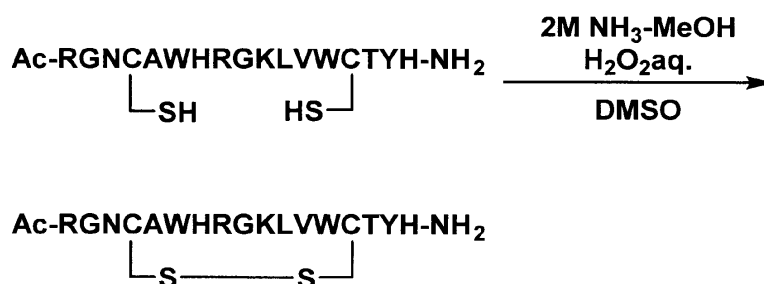
【0580】

MS (ESI) m/z: z=3 710.45 [M+3H]³⁺

【0581】

(17-2) Ac-RGNCAWHRGKLVWCTYH-NH₂ (配列番号43)の4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化92】



10

20

30

40

50

上記アミノ酸配列は、配列番号 43 である。

【0582】

(17-2) で合成したペプチド (64.8 mg, 30.5 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M $\text{NH}_3\text{-MeOH}$ (31.0 μL , 61.0 μmol)、過酸化水素水 (62.0 μL , 610 μmol) を加え室温で 20 時間攪拌した。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物 (35.3 mg, 16.6 μmol) を得た。

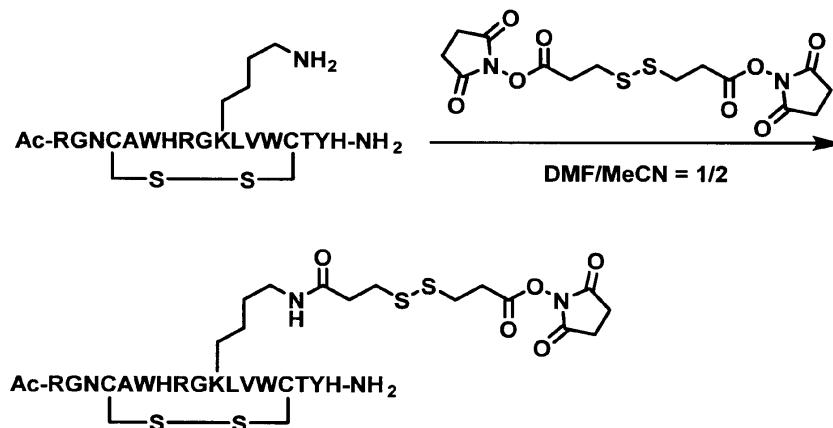
【0583】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 709.75 $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$, $z = 4$ 532.55 $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$

【0584】

(17-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化93】



上記アミノ酸配列は、配列番号 43 である。

【0585】

(17-2) で合成した $\text{Ac-RGNC(AWHRGKLVWCTYH)-NH}_2$ (配列番号 43) (35.3 mg, 16.6 μmol 、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N, N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3, 3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (269 mg, 0.664 mmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (17.5 mg, 7.25 μmol) を得た。

【0586】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 806.20 $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$, $z = 4$ 604.90 $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$

HPLC 純度: 100 %

【0587】

(17-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(17-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬) 500 µgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7) 46.9 µLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 µL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148235にピークが観測され、結合性ペプチドが導入された生成物由来のピークは観測されなかった。

【0588】

(17-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(17-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 µL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50594、50753および、原料と同じ23435に軽鎖ピークが観測された。

【0589】

(17-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析

(17-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはButyl-NPR(TOSOH) 4.6 x 350 mm 2.5 µmを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は1.0 ml/min、グラジエントをB 0→100%, 12 min(データ採取20 min)、カラム温度は25 °C、サーモスタット温度はRT、検出器はUV 225 nm(Ch1)、280 nm(Ch2)の2波長で検出した。

【0590】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量

【0591】

UV 225 nmの場合、Retention Time 9.469分はトラスツズマブ原料、10.180分はペプチド由来のピークであると考えられる。UV 280 nmの場合、Retention Time 9.563分はトラスツズマブ原料、10.270分はペプチド由来のピークであると考えられる(図28)。

【0592】

[実施例18: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(18-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCKWHRGELVWCTYH-NH₂(配列番号44)の配列をFmoc固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はCEM社製Liberty Blueを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ResinはFmoc-NH-SAL-PEG Resin HL、アルギニン(R)、システイン(C)ヒスチジン(H)はダブルカップリングを行った。Resinからの切り出しはトリフルオロ酢酸:水:トリイソプロピルシラン:エタンジチオール=94:2.5:1.0:2.5の溶液中3時間攪拌の条件で行った。切り出し後Resinをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈澱を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを0.05%トリフルオロ酢

10

20

30

40

50

酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物(77.8mg, 35.6 μmol)を得た。

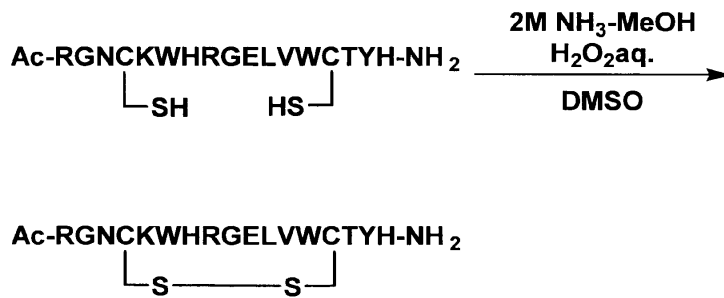
【0593】

MS (ESI) m/z: z = 3 729.70 [M+H]⁺, z = 4 547.60 [M+H]⁺

【0594】

(18-2) Ac-RGNCKWHRGELVWCTYH-NH₂ (配列番号44)の4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化94】



上記アミノ酸配列は、配列番号44である。

【0595】

(18-1)で合成したペプチド(77.8mg, 35.6 μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH₃-MeOH(71.0 μL, 142 μmol)、過酸化水素水(145 μL, 1.42 mmol)を加え室温で20時間攪拌した。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物(40.0mg, 18.3 μmol)を得た。

【0596】

MS (ESI) m/z: z = 3 729.00 [M+3H]³⁺, z = 4 547.05 [M+4H]⁴⁺

【0597】

(18-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

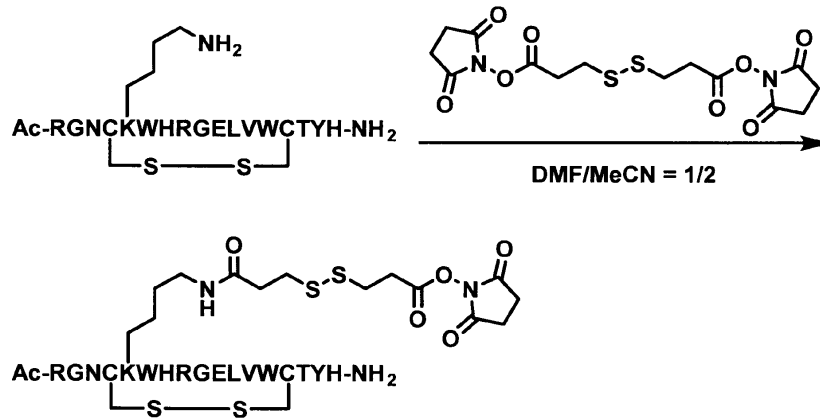
20

30

40

50

【化 9 5】



上記アミノ酸配列は、配列番号 44 である。

【0598】

(18-2) で合成した $\text{Ac-RGNCKWHRGELVWCTYH-NH}_2$ (配列番号 44) (40.0 mg, 18.3 μmol 、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N -ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N -スクシンイミジル) (296 mg, 0.733 mmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶媒で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (20.0 mg, 8.09 μmol) を得た。

【0599】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 825.55 $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$, $z = 4$ 619.45 $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$

HPLC 純度: 31%

【0600】

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

(18-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N' -ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148222 にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150583 にピークが観測された。

【0601】

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

(18-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が

導入された50680、50719および、原料と同じ23438に軽鎖ピークが観測された。

【0602】

(18-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析
(18-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHIC-HPLCにより解析した。カラムはButyl-NPR (TOSO) 4.6 x 350mm 2.5 μmを使用した。A__Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B__Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は1.0 ml/min、グラジエントをB 0→100%, 12 min (データ採取20 min)、カラム温度は25℃、サーモスタット温度はRT、検出器はUV 225 nm (Ch1)、280 nm (Ch2) の2波長で検出した。

10

【0603】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

【0604】

UV 225 nmの場合、Retention Time 9.462分はトラスツズマブ原料、10.142分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物であると考えられる。UV 280 nmの場合、Retention Time 9.554分はトラスツズマブ原料、10.230分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物であると考えられる (図29)。

20

【0605】

[実施例19: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 (ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(19-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCKWHRGQLVWCTYH-NH₂ (配列番号45) の配列をFmoc固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はCEM社製Liberty Blueを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ResinはFmoc-NH-SAL-PEG Resin HL、アルギニン (R)、システイン (C) ヒスチジン (H) はダブルカップリングを行った。Resinからの切り出しはトリフルオロ酢酸: 水: トリイソプロピルシラン: エタンジチオール=94:2.5:1.0:2.5の溶液中3時間攪拌の条件で行った。切り出し後Resinをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈澱を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物 (74.1 mg, 34.0 μmol) を得た。

30

40

【0606】

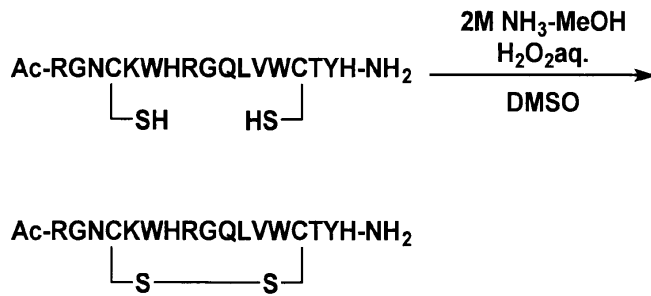
MS (ESI) m/z: z=3 729.40 [M+3H]³⁺, z=4 547.35 [M+4H]⁴⁺

【0607】

(19-2) Ac-RGNCKWHRGQLVWCTYH-NH₂ (配列番号45) の4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

50

【化 9 6】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 45 である。

【0608】

(19-2) で合成したペプチド (74.1 mg, 34.0 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH₃-MeOH (67.8 μL, 0.136 mmol)、過酸化水素水 (139 μL, 1.36 mmol) を加えて室温で 20 時間攪拌した。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物 (38.2 mg, 17.5 μmol) を得た。

20

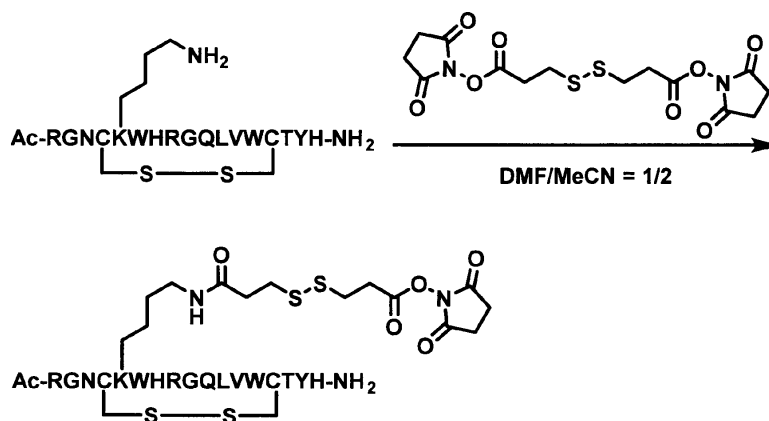
【0609】

MS (ESI) m/z: z = 3 728.80 [M+3H]³⁺, z = 4 546.85 [M+4H]⁴⁺

【0610】

(19-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化 9 7】



30

上記アミノ酸配列は、配列番号 45 である。

【0611】

(19-2) で合成した Ac-RGNCKWHRGQLVWCTYH-NH₂ (配列番号 45) (38.2 mg, 17.5 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (283 mg, 0.70 mmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した

50

後、0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(16.5mg, 6.68 μmol)を得た。

【0612】

MS (ESI) m/z: z = 3 825.25 [M+3H]³⁺, z = 4 619.25 [M+4H]⁴⁺

HPLC純度: 100%

10

【0613】

(19-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(19-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148064にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150600にピークが観測された。

20

【0614】

(19-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(19-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50683、50717および、原料と同じ23440に軽鎖ピークが観測された。

【0615】

(19-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析

(19-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHIC-HPLCにより解析した。カラムはButyl-NPR(TOSO) 4.6 x 350mm 2.5 μmを使用した。A__Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B__Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は1.0 ml/min、グラジエントをB 0→100%, 12min(データ採取20min)、カラム温度は25℃、サーモスタット温度はRT、検出器はUV 225nm(Ch1)、280nm(Ch2)の2波長で検出した。

30

【0616】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

40

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

【0617】

UV 225nmの場合、Retention Time 9.458分はトラスツズマブ原料、10.137分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物であると考えられる。UV 280nmの場合、Retention Time 9.550分はトラスツズマブ原料、10.225分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物であると考えられる(図30)。

【0618】

[実施例20: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有す

50

る化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物－NH S 活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 Ig G抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

〔20-1〕Ig G1 Fc 結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCKYHLGELVWCTYH-NH₂（配列番号46）の配列をFmoc 固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はCEM社製Liberty Blue を使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ResinはFmoc-NH-SAL-PEG Resin HL、アルギニン（R）、システイン（C）ヒスチジン（H）はダブルカップリングを行った。Resinからの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール＝94：2.5：1.0：2.5の溶液中3時間攪拌の条件で行った。切り出し後Resinをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈澱を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物（34.5 mg, 16.3 μmol）を得た。

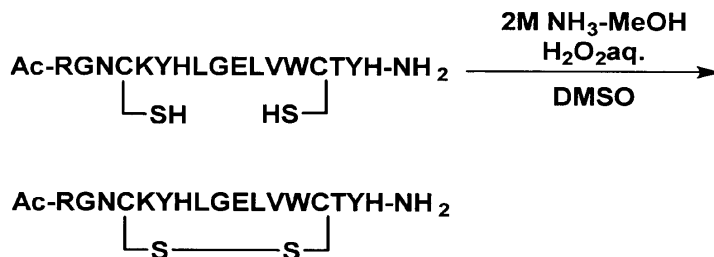
〔0619〕

MS (ESI) m/z: z = 3 707.80 [M+3H]³⁺, z = 4 531.10 [M+4H]⁴⁺

〔0620〕

〔20-2〕Ac-RGNCKYHLGELVWCTYH-NH₂（配列番号46）の4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

〔化98〕



上記アミノ酸配列は、配列番号46である。

〔0621〕

〔20-1〕で合成したペプチド（34.5 mg, 16.3 μmol）をDMSO（5.00 mL）に溶解し、2M NH₃-MeOH（17.0 μL, 32.6 μmol）、過酸化水素水（33.0 μL, 0.326 mmol）を加えて室温で20時間攪拌した。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物（15.6 mg, 7.37 μmol）を得た。

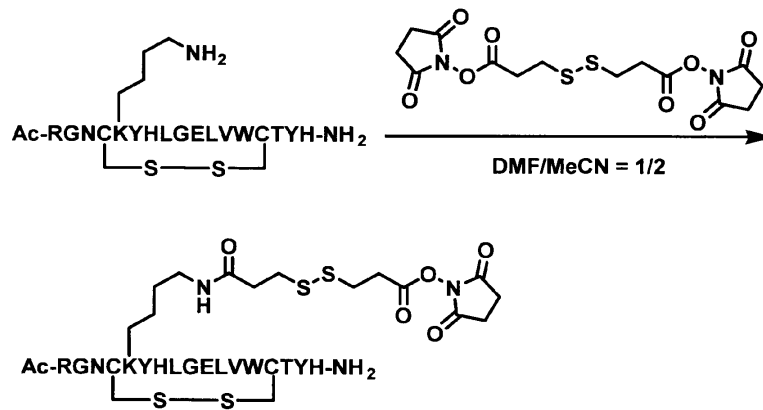
〔0622〕

MS (ESI) m/z: z = 3 707.10 [M+3H]³⁺, z = 4 530.60 [M+4H]⁴⁺

〔0623〕

〔20-3〕ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化 9 9】



上記アミノ酸配列は、配列番号 46 である。

【0624】

(20-2) で合成した $\text{Ac-RGNCKYHLGELVWCTYH-NH}_2$ (配列番号 46) (15.6 mg, 7.37 μmol 、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N -ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N -スクシンイミジル) (119 mg, 0.295 mmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (5.00 mg, 2.08 μmol) を得た。

【0625】

MS (ESI) m/z : $z=2$ 1204.85 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, $z=3$ 803.50 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$

HPLC 純度: 70%

【0626】

(20-4) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(20-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N' -ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。

【0627】

(20-5) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾の HIC-HPLC 解析

(20-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体を HIC-HPLC により解析した。カラムは Butyl-NPR (TOSO) 4.6 x 350 mm 2.5 μm を使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0、B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0 にて流速は 1.0 mL/min、グラジエントを B 0→100%, 12 min (データ採取 20 min)、カラム温度は 25°C、サーモスタット温度は RT、検出器は UV 225 nm (Ch1)、280 nm (Ch2) の 2 波長で検出した。

【0628】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a：トラスツズマブ原料

b：トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量；

【0629】

UV225nmの場合、Retention Time 9.581分にトラスツズマブ原料のピーク、10.089分にピークが観測された。UV280nmの場合、Retention Time 9.663分にトラスツズマブ原料のピーク、10.307分にピークが観測された（図31）。

【0630】

【実施例21：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析】

（21-1）IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCKYHLGQLVWCTYH-NH₂（配列番号47）の配列をFmoc固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はCEM社製Liberty Blueを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ResinはFmoc-NH-SAL-PEG Resin HL、アルギニン（R）、システイン（C）ヒスチジン（H）はダブルカップリングを行った。Resinからの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール=94：2.5：1.0：2.5の溶液中3時間攪拌の条件で行った。切り出し後Resinをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈澱を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物（53.0mg，25.0μmol）を得た。

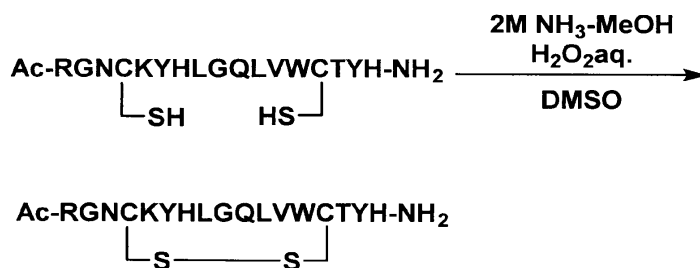
【0631】

MS (ESI) m/z： z=3 707.40 [M+3H]³⁺， z=4 530.80 [M+4H]⁴⁺

【0632】

（21-2）Ac-RGNCKYHLGQLVWCTYH-NH₂（配列番号47）の4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化100】



上記アミノ酸配列は、配列番号47である。

【0633】

（21-1）で合成したペプチド（53.0mg，25.0μmol）をDMSO（5.00mL）に溶解し、2M NH₃-MeOH（25.0μL，50.0μmol）、過酸化水素水（51.0μL，0.500mmol）を加えて室温で20時間攪拌した。

反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物 (23.2 mg, 10.9 μmol) を得た。

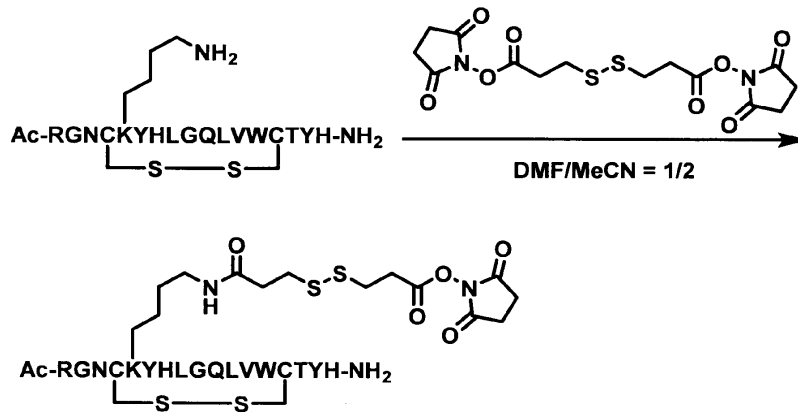
【0634】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 706.75 $[M + 3H]^+$, $z = 4$ 530.35 $[M + 4H]^+$

【0635】

(21-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化101】



上記アミノ酸配列は、配列番号 47 である。

【0636】

(21-2) で合成した Ac-RGNCKYHLGQLVWCTYH-NH₂ (配列番号 47) (23.2 mg, 10.9 μmol、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (176 mg, 0.436 mmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (6.40 mg, 2.66 μmol) を得た。

【0637】

MS (ESI) m/z : $z = 2$ 1204.30 $[M + 2H]^+$, $z = 3$ 803.15 $[M + 3H]^+$

HPLC 純度: 61%

【0638】

(21-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(21-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 4

10

20

30

40

50

6. 9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148069 にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物は 150515 にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物は 152972 にピークが観測された。

【0639】

(21-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(21-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 50683、50844、および、原料と同じ 23439 に軽鎖ピークが観測された。

【0640】

(21-6) 抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾の HIC-HPLC 解析

(21-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体を HIC-HPLC により解析した。カラムは Butyl-NPR (TOSO) 4.6 x 350 mm 2.5 μm を使用した。A-Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0、B-Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0 にて流速は 1.0 mL/min、グラジエントを B 0→100%, 12 min (データ採取 20 min)、カラム温度は 25°C、サーモスタット温度は RT、検出器は UV 225 nm (Ch1)、280 nm (Ch2) の 2 波長で検出した。

【0641】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 30 等量;

【0642】

UV 225 nm の場合、Retention Time 9.454 分はトラスツズマブ原料、9.877 分はペプチドがトラスツズマブに 1 個導入された化合物、10.230 分はペプチドが 2 個導入された化合物であると考えられる。UV 280 nm の場合、Retention Time 9.540 分はトラスツズマブ原料、9.966 分はペプチドがトラスツズマブに 1 個導入された化合物、10.317 分はペプチドが 2 個導入された化合物であると考えられる (図 32)。

【0643】

[実施例 22: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 (ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(22-1) IgG1 Fc 結合性ペプチドの合成

Ac-DCKWHLGELVWCT-NH₂ (配列番号 48) の配列を実施例 1 と同様に Fmoc 固相合成法により合成した。目的物 (71.1 mg, 43.6 μmol) を得た。

MS (ESI) m/z: z = 2 816.350 [M+2H]²⁺

【0644】

(22-2) Ac-DCKWHLGELVWCT-NH₂ (配列番号 48) の 2 位と 12 位の Cys での分子内ジスルフィド結合の形成

10

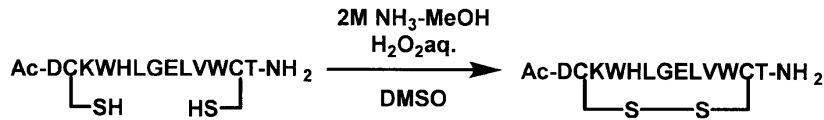
20

30

40

50

【化 1 0 2】



上記アミノ酸配列は、配列番号 48 である。

【0645】

(22-1) で合成したペプチド (71.1 mg, 43.6 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH₃-MeOH (43.6 μL, 87.2 μmol)、過酸化水素水 (88.8 μL, 87.2 μmol) を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (31.6 mg, 19.4 μmol) を得た。

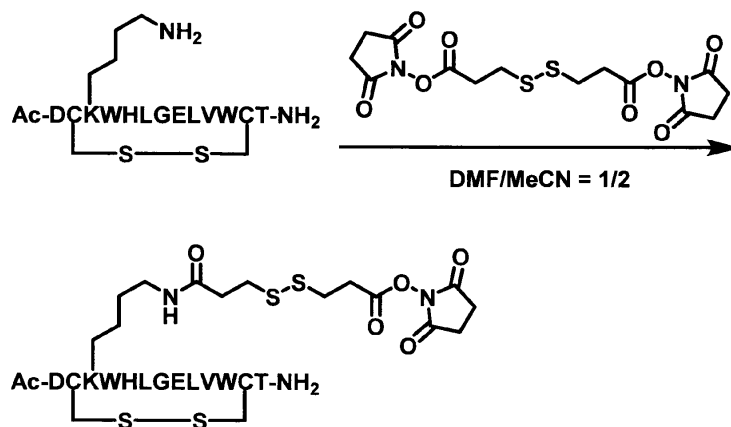
【0646】

MS (ESI) m/z : z = 2 815.350 [M + 2H]²⁺

【0647】

(22-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化 1 0 3】



上記アミノ酸配列は、配列番号 48 である。

【0648】

(22-2) で合成した Ac-DCKWHLGELVWCT-NH₂ (配列番号 48) (31.6 mg, 19.4 μmol、ただし 2 番目と 12 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N, N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3, 3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (312 mg, 776 μmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS

活性化体 (14.2 mg, 7.40 μmol) を得た。

【0649】

MS (ESI) m/z : z = 2 960.05 [M + 2H]²⁺

HPLC 純度 : 70%

【0650】

(22-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(22-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL (抗体に対して30等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。

【0651】

(22-5) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析

(22-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHIC-HPLCにより解析した。カラムはButyl-NPR (TOSO) 4.6 x 350 mm 2.5 μmを使用した。A__Buffer : 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B__Buffer : 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は1.0 mL/min、グラジエントをB 0→100%, 12 min (データ採取20 min)、カラム温度は25℃、サーモスタット温度はRT、検出器はUV 225 nm (Ch1)、280 nm (Ch2) の2波長で検出した。

【0652】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a : トラスツズマブ原料

b : トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量 ;

【0653】

UV 225 nmの場合、Retention Time 11.193分、11.981分にピークが観測された。UV 280 nmの場合、Retention Time 11.257分、12.057分にピークが観測された (図33)。

【0654】

【実施例23 : 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 (ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析】

(23-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-DCKYHLGELVWCT-NH₂ (配列番号49) の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物 (28.0 mg, 17.4 μmol) を得た。

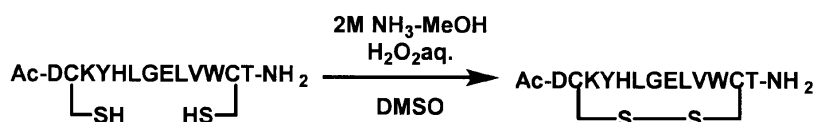
【0655】

MS (ESI) m/z : z = 2 804.80 [M + 2H]²⁺

【0656】

(23-2) Ac-DCKYHLGELVWCT-NH₂ (配列番号49) の2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化104】



10

20

30

40

50

上記アミノ酸配列は、配列番号 49 である。

【0657】

(23-1) で合成したペプチド (28.0 mg, 17.4 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M $\text{NH}_3\text{-MeOH}$ (17.4 μL , 34.8 μmol)、過酸化水素水 (35.4 μL , 348 μmol) を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (18.0 mg, 11.2 μmol) を得た。

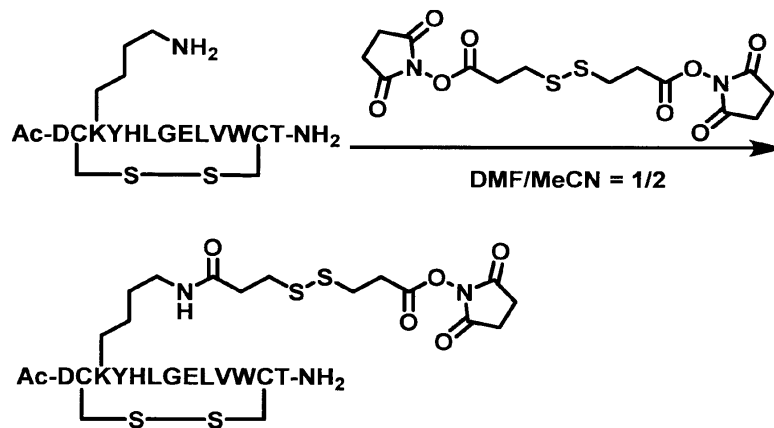
【0658】

MS (ESI) m/z : $z = 2$ 803.90 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$

【0659】

(23-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化105】



上記アミノ酸配列は、配列番号 49 である。

【0660】

(23-2) で合成した $\text{Ac-DCKYHLGELVWCT-NH}_2$ (配列番号 49) (18.0 mg, 11.2 μmol 、ただし 2 番目と 12 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N -ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N -スクシンイミジル) (181 mg, 448 μmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (2.75 mg, 1.45 μmol) を得た。

【0661】

MS (ESI) m/z : $z = 2$ 948.55 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$

HPLC 純度: 75%

【0662】

(23-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(23-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬) 500 μgを60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7) 46.9 μLに溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物は150001にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物は151618にピークが観測された。

【0663】

(23-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

10

(23-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50845および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0664】

(23-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析

(23-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHIC-HPLCにより解析した。カラムはButyl-NPR(TOSO) 4.6 x 350 mm 2.5 μmを使用した。A__Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B__Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は1.0 ml/min、グラジエントをB 0→100%, 12 min(データ採取20 min)、カラム温度は25℃、サーモスタット温度はRT、検出器はUV 225 nm(Ch1)、280 nm(Ch2)の2波長で検出した。

20

【0665】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 30等量;

【0666】

UV 225 nmの場合、Retention Time 10.347分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.015分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる。UV 280 nmの場合、Retention Time 10.434分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.100分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図34)。

30

【0667】

[実施例24: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(24-1) IgG1 Fc 結合性ペプチドの合成

40

Ac-DCKWHRGELVWCT-NH₂(配列番号50)の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物(52.8 mg, 31.5 μmol)を得た。

【0668】

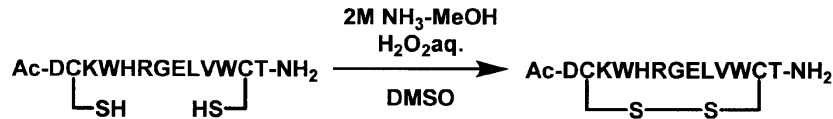
MS(ESI) m/z: z=2 837.85 [M+2H]²⁺, z=3 558.90 [M+3H]³⁺

【0669】

(24-2) Ac-DCKWHRGELVWCT-NH₂(配列番号50)の2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

50

【化 106】



上記アミノ酸配列は、配列番号 50 である。

【0670】

(24-1) で合成したペプチド (52.8 mg, 31.5 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH₃-MeOH (31.5 μL, 63.0 μmol)、過酸化水素水 (64.0 μL, 630 μmol) を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (26.9 mg, 16.1 μmol) を得た。

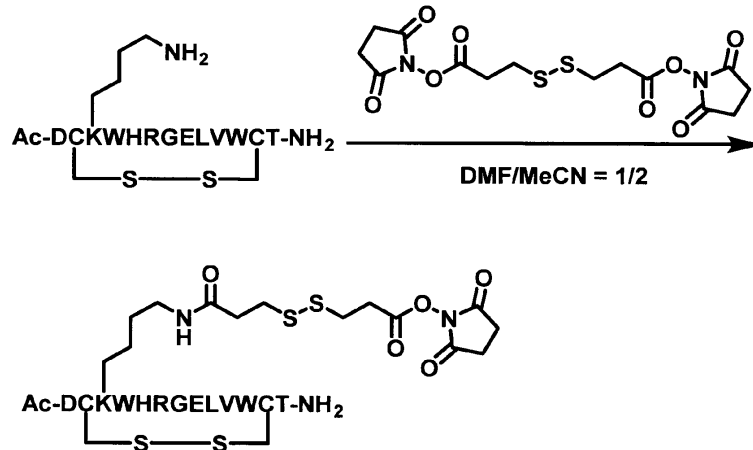
【0671】

MS (ESI) m/z : z = 2 836.75 [M + 2H]²⁺, z = 3 558.25 [M + 3H]³⁺

【0672】

(24-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化 107】



上記アミノ酸配列は、配列番号 50 である。

【0673】

(24-2) で合成した Ac-DCKWHRGELVWCT-NH₂ (配列番号 50) (26.9 mg, 16.1 μmol、ただし 2 番目と 12 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (260 mg, 644 μmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確

認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体（8.40mg, 4.28μmol）を得た。

【0674】

MS (ESI) m/z: z=2 981.50 [M+2H]²⁺, z=3 654.70 [M+3H]³⁺

HPLC純度: 78%

【0675】

(24-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

10

(24-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ（中外製薬）500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー（pH 4.7）46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL（抗体に対して30等量）加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物は150268にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物は152295にピークが観測された。

【0676】

(24-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

20

(24-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液5μL（抗体に対して等量）を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50841および、原料と同じ23438に軽鎖ピークが観測された。

【0677】

(24-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析

(24-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHIC-HPLCにより解析した。カラムはButyl-NPR (TOSO) 4.6x350mm 2.5μmを使用した。A__Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B__Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は1.0ml/min、グラジエントをB 0→100%, 12min（データ採取20min）、カラム温度は25℃、サーモスタット温度はRT、検出器はUV225nm (Ch1)、280nm (Ch2) の2波長で検出した。

30

【0678】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

【0679】

UV225nmの場合、Retention Time 10.749分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.679分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる。UV280nmの場合、Retention Time 10.849分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.782分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる（図35）。

40

【0680】

[実施例25: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(25-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

50

Ac-DCKWHLGQLVWCT-NH₂ (配列番号51) の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物(68.5mg, 42.0μmol)を得た。

【0681】

MS (ESI) m/z: z=2 815.90 [M+2H]²⁺, z=3 544.25 [M+3H]³⁺

【0682】

(25-2) Ac-DCKWHLGQLVWCT-NH₂ (配列番号51) の2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化108】

10



上記アミノ酸配列は、配列番号51である。

【0683】

(25-1) で合成したペプチド(68.5mg, 42.0μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH₃-MeOH(42.0μL, 84.0μmol)、過酸化水素水(85.7μL, 840μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(30.6mg, 18.8μmol)を得た。

20

【0684】

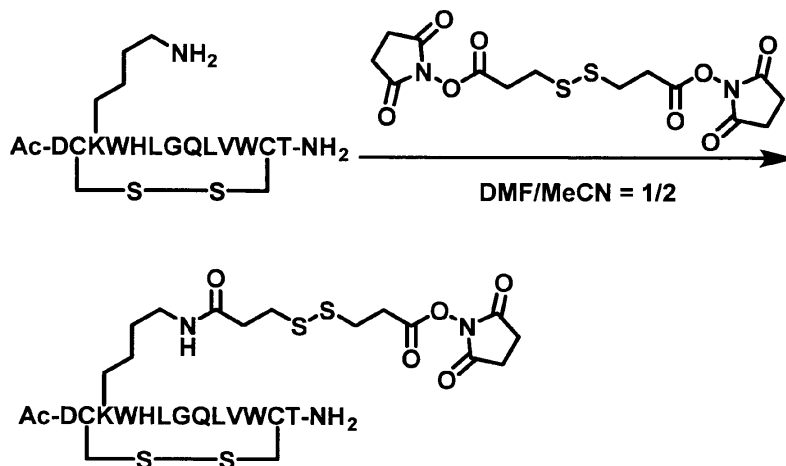
MS (ESI) m/z: z=2 814.90 [M+2H]²⁺

【0685】

(25-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化109】

30



40

上記アミノ酸配列は、配列番号51である。

【0686】

(25-2) で合成したAc-DCKWHLGQLVWCT-NH₂ (配列番号51)

50

(30.6 mg, 18.8 μmol 、ただし2番目と12番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN, N-ジメチルホルムアミド(1.00 mL)に溶解し、3, 3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(30.4 mg, 75.2 μmol)をアセトニトリル(2.00 mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(4.10 mg, 2.14 μmol)を得た。

10

【0687】

MS (ESI) m/z : $z = 2$ 959.45 $[M + 2H]^{2+}$

HPLC純度: 74%

【0688】

(25-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(42-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μg を60 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μL に溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL (抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物は150025にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物は151878にピークが観測された。

20

【0689】

(25-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(25-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL (抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

30

【0690】

(25-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析

(25-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHIC-HPLCにより解析した。カラムはButyl-NPR(TOSO)4.6 x 350 mm 2.5 μm を使用した。A__Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0、B__Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は1.0 mL/min、グラジエントをB 0→100%, 12 min(データ採取20 min)、カラム温度は25°C、サーモスタット温度はRT、検出器はUV 225 nm(Ch1)、280 nm(Ch2)の2波長で検出した。

40

【0691】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

【0692】

UV 225 nmの場合、Retention Time 10.761分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.722分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる。UV 280 nmの場合、Retention Time 10.8

50

49分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.807分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図36)。

【0693】

【実施例26：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析】

(26-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-DCKYHRGELVWCT-NH₂ (配列番号52)の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物(100mg, 60.8 μmol)を得た。

【0694】

MS (ESI) m/z : z = 2 826.35 [M+2H]²⁺, z = 3 551.25 [M+3H]³⁺

【0695】

(26-2) Ac-DCKYHRGELVWCT-NH₂ (配列番号52)の2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化110】



上記アミノ酸配列は、配列番号52である。

【0696】

(26-1)で合成したペプチド(100mg, 60.8 μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH₃-MeOH(60.8 μL, 122 μmol)、過酸化水素水(125 μL, 1.22 mmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(74.5mg, 45.2 μmol)を得た。

【0697】

MS (ESI) m/z : z = 2 825.30 [M+2H]²⁺, z = 3 550.60 [M+3H]³⁺

【0698】

(26-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

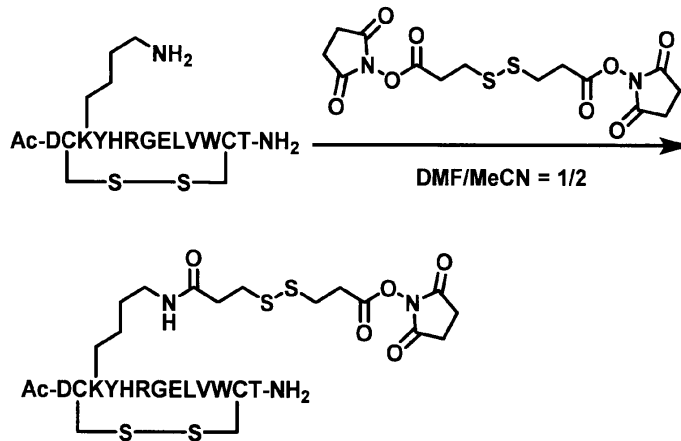
20

30

40

50

【化 1 1 1】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 52 である。

【0699】

(26-2) で合成した Ac-DCKYHRGELVWCT-NH₂ (配列番号 52) (74.5 mg, 45.2 μmol、ただし 2 番目と 12 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N, N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3, 3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (731 mg, 1.81 mmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NH₂S 活性化体 (23.0 mg, 18.9 μmol) を得た。

20

【0700】

MS (ESI) m/z : z = 2 970.00 [M+2H]²⁺

HPLC 純度 : 69%

30

【0701】

(26-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS による解析

(26-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NH₂S 活性化体は N, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 147074 にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物は 150062 にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物は 151873 にピークが観測された。154562 に副生成物によるピークが観測された。

40

【0702】

(26-5) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC 解析

(26-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHIC-HPLC により解析した。カラムはButyl-NPR (TOSO) 4.6 x 350 mm 2.5 μm を使用した。A Buffer : 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH₄)₂SO₄, pH

50

7.0、B__Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は1.0ml/min、グラジエントをB 0→100%, 12min (データ採取20min)、カラム温度は25℃、サーモスタット温度はRT、検出器はUV225nm (Ch1)、280nm (Ch2) の2波長で検出した。

【0703】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラストズマブ原料

b: トラストズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

【0704】

UV225nmの場合、Retention Time 9.464分はトラストズマブ原料、10.309分はペプチドがトラストズマブに1個導入された化合物、10.962分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる。UV280nmの場合、Retention Time 9.564分はトラストズマブ原料、10.395分はペプチドがトラストズマブに1個導入された化合物、11.054分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる (図37)。

【0705】

実施例27: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 (ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラストズマブの修飾およびその解析]

(27-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-DCKYHLGQLVWCT-NH₂ (配列番号53) の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物 (85.6mg, 53.3μmol) を得た。

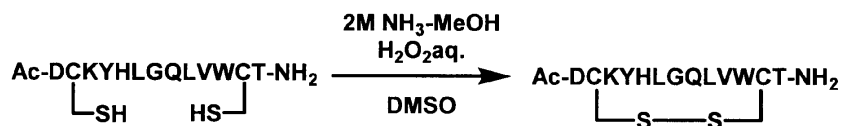
【0706】

MS (ESI) m/z: z=2 804.45 [M+2H]²⁺, z=3 536.60 [M+3H]³⁺

【0707】

(27-2) Ac-DCKYHLGQLVWCT-NH₂ (配列番号53) の2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化112】



上記アミノ酸配列は、配列番号53である。

【0708】

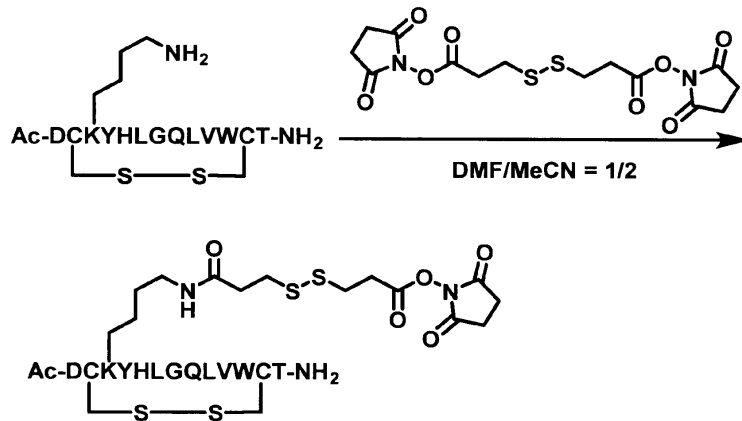
(27-1) で合成したペプチド (85.6mg, 53.3μmol) をDMSO (5.00mL) に溶解し、2M NH₃-MeOH (53.5μL, 107μmol)、過酸化水素水 (109μL, 1.07mmol) を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (34.2mg, 21.3μmol) を得た。

【0709】

MS (ESI) m/z: z=2 803.40 [M+2H]²⁺

【0710】

(27-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結
【化113】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号53である。

【0711】

(27-2) で合成した $\text{Ac-DCKYHLGQLVWCT-NH}_2$ (配列番号53) (34.2 mg, 21.3 μmol 、ただし2番目と12番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N -ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (345 mg, 852 μmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 (12.0 mg, 6.34 μmol) を得た。

20

【0712】

MS (ESI) m/z : $z=2$ 948.00 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$
HPLC 純度: 80%

【0713】

(27-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(27-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体は N,N' -ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を60 mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL (抗体に対して30等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは147285にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物は150031にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物は151947にピークが観測された。154885に副生成物によるピークが観測された。

40

【0714】

(27-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(27-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス (2-カルボキシエチル

50

）ホスフィン塩酸塩溶液 5 μ L（抗体に対して等量）を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 50685、50847 にピークが観測された。

【0715】

（27-6）抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析
（27-4）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHIC-HPLCにより解析した。カラムはButyl-NPR（TOSO）4.6 x 350mm 2.5 μ m を使用した。A__Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B__Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は1.0 mL/min、グラジエントをB 0→100%, 12min（データ採取20min）、カラム温度は25℃、サーモスタット温度はRT、検出器はUV 225 nm（Ch1）、280 nm（Ch2）の2波長で検出した。

10

【0716】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量；

【0717】

UV 225 nmの場合、Retention Time 9.468分はトラスツズマブ原料、10.360分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.045分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる。UV 280 nmの場合、Retention Time 9.575分はトラスツズマブ原料、10.449分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.137分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる（図38）。

20

【0718】

〔実施例28：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析〕

（28-1）IgG1 Fc 結合性ペプチドの合成

Ac-DCKWHRGQLVWCT-NH₂（配列番号54）の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物（89.4 mg, 57.4 μ mol）を得た。

30

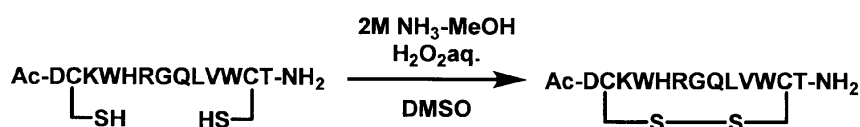
【0719】

MS (ESI) m/z: z = 2 837.30 [M+2H]²⁺, z = 3 558.60 [M+3H]³⁺

【0720】

（28-2）Ac-DCKWHRGQLVWCT-NH₂（配列番号54）の2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化114】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号54である。

【0721】

（28-1）で合成したペプチド（89.4 mg, 57.4 μ mol）をDMSO（5.00 mL）に溶解し、2M NH₃-MeOH（53.5 μ L, 107 μ mol）、過酸化水素水（109 μ L, 1.07 mmol）を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ

50

酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(64.4mg, 38.5 μmol)を得た。

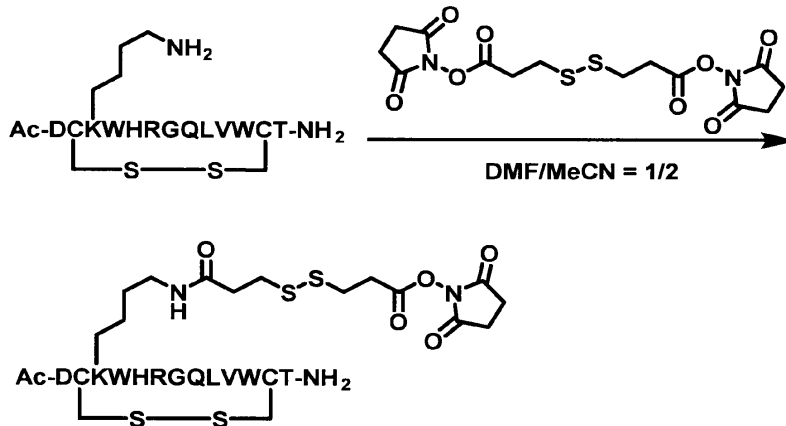
【0722】

MS (ESI) m/z : $z=2$ 836.35 $[M+2H]^{2+}$, $z=3$ 558.00 $[M+3H]^{3+}$

【0723】

(28-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化115】



上記アミノ酸配列は、配列番号54である。

【0724】

(28-2) で合成した $Ac-DCKWHRGQLVWCT-NH_2$ (配列番号54) (64.4mg, 38.5 μmol、ただし2番目と12番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N -ジメチルホルムアミド (1.00mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル) (623mg, 1.54mmol) をアセトニトリル (2.00mL) に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 (21.8mg, 11.1 μmol) を得た。

【0725】

MS (ESI) m/z : $z=2$ 981.05 $[M+2H]^{2+}$, $z=3$ 654.25 $[M+3H]^{3+}$

HPLC 純度: 82%

【0726】

(28-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(28-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体は N,N' -ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を60mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 μL (抗体に対して30等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止さ

10

20

30

40

50

せ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは147548にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物は150261にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物は152112にピークが観測された。154824に副生成物によるピークが観測された。

【0727】

(28-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(28-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50684、50845にピークが観測された。

【0728】

(28-6) 抗HER2IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析

(28-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHIC-HPLCにより解析した。カラムはButyl-NPR(TOSO H) 4.6x350mm 2.5 μ mを使用した。A__Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B__Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は1.0ml/min、グラジエントをB 0→100%, 12min(データ採取20min)、カラム温度は25℃、サーモスタット温度はRT、検出器はUV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)の2波長で検出した。

【0729】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

【0730】

UV225nmの場合、Retention Time 9.477分はトラスツズマブ原料、10.714分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.650分は副生成物であると考えられる。UV280nmの場合、Retention Time 9.573分はトラスツズマブ原料、10.812分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.742分は副生成物であると考えられる(図39)。

【0731】

[実施例29: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(29-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-DCKYHRGQLVWCT-NH₂(配列番号55)の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物(93.6mg, 56.7 μ mol)を得た。

【0732】

MS(ESI) m/z: z=2 825.80 [M+2H]²⁺, z=3 550.90 [M+3H]³⁺

【0733】

(29-2) Ac-DCKYHRGQLVWCT-NH₂(配列番号55)の2位と12位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

10

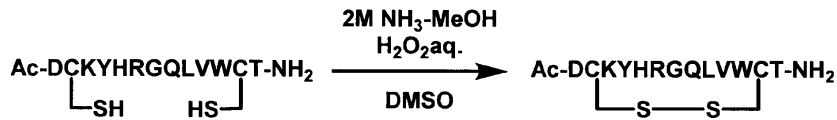
20

30

40

50

【化 1 1 6】



上記アミノ酸配列は、配列番号 55 である。

【0734】

(29-1) で合成したペプチド (93.6 mg, 56.7 μmol) を DMSO (5.00 mL) に溶解し、2 M NH₃-MeOH (56.5 μL, 113 μmol)、過酸化水素水 (115 μL, 1.13 mmol) を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド (71.6 mg, 46.2 μmol) を得た。

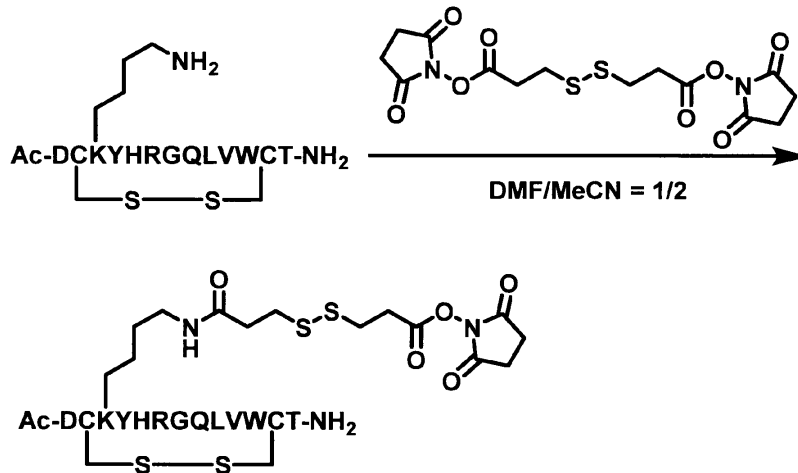
【0735】

MS (ESI) m/z : z = 2 824.85 [M + 2H]²⁺, z = 3 550.25 [M + 3H]³⁺

【0736】

(29-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化 1 1 7】



上記アミノ酸配列は、配列番号 55 である。

【0737】

(29-2) で合成した Ac-DCKYHRGQLVWCT-NH₂ (配列番号 55) (71.6 mg, 46.2 μmol、ただし 2 番目と 12 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (747 mg, 1.85 mmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により

確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(25.5mg, 13.2μmol)を得た。

【0738】

MS (ESI) m/z: z=2 969.45 [M+2H]²⁺, z=3 646.75 [M+3H]³⁺

HPLC純度: 82%

【0739】

(29-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

10

(29-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬) 500μgを60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7) 46.9μLに溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7μL(抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、結合性ペプチドが一つ導入された生成物は149884にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物は151873にピークが観測された。

【0740】

(29-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

20

(29-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50682、50844にピークが観測された。

【0741】

(29-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析

(29-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHIC-HPLCにより解析した。カラムはButyl-NPR(TOSO) 4.6x350mm 2.5μmを使用した。A__Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B__Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は1.0ml/min、グラジエントをB 0→100%, 12min(データ採取20min)、カラム温度は25℃、サーモスタット温度はRT、検出器はUV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)の2波長で検出した。

30

【0742】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

【0743】

UV225nmの場合、Retention Time 10.292分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、10.949分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる。UV280nmの場合、Retention Time 10.381分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物、11.038分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図40)。

40

【0744】

[実施例30: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(30-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCAWHLGQLVWCKYH-NH₂(配列番号56)の配列を実施例

50

1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物(54.2mg, 25.7μmol)を得た。

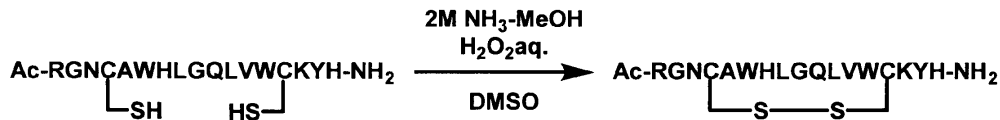
【0745】

MS (ESI) m/z: z = 3 705.05 [M+3H]³⁺, z = 4 529.10 [M+4H]⁴⁺

【0746】

(30-2) Ac-RGNCAWHLGQLVWCKYH-NH₂ (配列番号56)の4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化118】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号56である。

【0747】

(30-1)で合成したペプチド(54.2mg, 25.7μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH₃-MeOH(25.7μL, 51.4μmol)、過酸化水素水(52.5μL, 514μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(13.3mg, 5.54μmol)を得た。

20

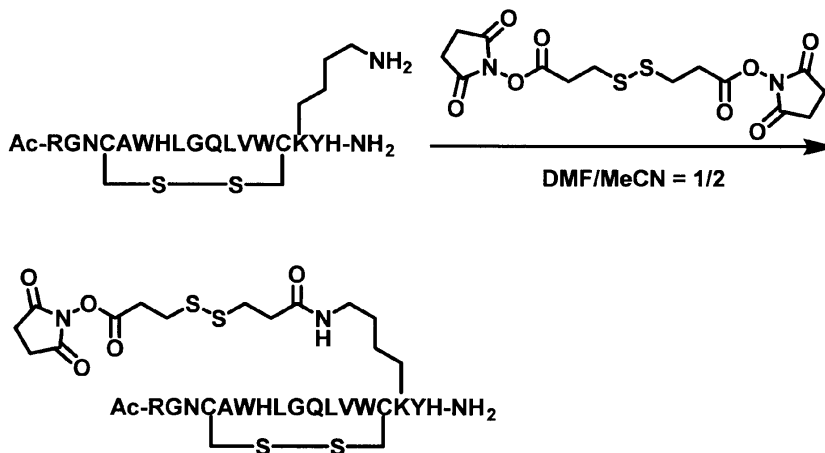
【0748】

MS (ESI) m/z: z = 3 704.45 [M+3H]³⁺, z = 4 528.60 [M+4H]⁴⁺

【0749】

(30-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化119】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号56である。

【0750】

(30-2)で合成したAc-RGNCAWHLGQLVWCKYH-NH₂ (配列番

50

号56) (13.3mg, 5.54 μmol 、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.00mL)に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ(N-スクシンイミジル)(89.6mg, 222 μmol)をアセトニトリル(2.00mL)に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体(7.00mg, 2.92 μmol)を得た。

10

【0751】

MS (ESI) m/z : $z=3$ 800.90 $[M+3H]^3+$, $z=4$ 600.80 $[M+4H]^4+$

HPLC純度: 69%

【0752】

(30-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(30-3)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬)500 μg を60mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)46.9 μL に溶解させ、21.6mMのペプチド試薬を4.7 μL (抗体に対して30等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148788にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が151375にピークが観測された。

20

【0753】

(30-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(30-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μL (抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50593、50756および、原料と同じ23337に軽鎖ピークが観測された。

30

【0754】

(30-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-HPLC解析

(30-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはButyl-NPR(TOSO)4.6 $\times$ 350mm 2.5 μm を使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は1.0mL/min、グラジエントをB 0 $\rightarrow$ 100%, 12min(データ採取20min)、カラム温度は25 $^\circ\text{C}$ 、サーモスタット温度はRT、検出器はUV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)の2波長で検出した。

40

【0755】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

【0756】

UV225nmの場合、Retention Time 9.556分はトラスツズマブ原料、10.259分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物由来のピーク

50

であると考えられる。UV 280 nm の場合、Retention Time 9.549 分はトラスツズマブ原料、10.382 分はペプチドがトラスツズマブに 1 個導入された化合物由来のピークであると考えられる（図 41）。

【0757】

【実施例 31：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析】

（31-1）IgG1 Fc 結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCAWHLGELVWCKYH-NH₂（配列番号 57）の配列を実施例 1 と同様に Fmoc 固相合成法により合成した。目的物（34.0 mg, 16.1 μmol）を得た。

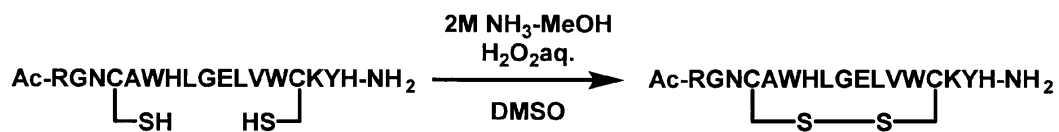
【0758】

MS (ESI) m/z : z = 3 705.40 [M+3H]³⁺, z = 4 529.30 [M+4H]⁴⁺

【0759】

（31-2）Ac-RGNCAWHLGELVWCKYH-NH₂（配列番号 57）の 4 位と 14 位の Cys での分子内ジスルフィド結合の形成

【化 120】



上記アミノ酸配列は、配列番号 57 である。

【0760】

（31-1）で合成したペプチド（34.0 mg, 16.1 μmol）を DMSO（5.00 mL）に溶解し、2 M NH₃-MeOH（16.1 μL, 32.2 μmol）、過酸化水素水（32.9 μL, 322 μmol）を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド（13.6 mg, 6.40 μmol）を得た。

【0761】

MS (ESI) m/z : z = 3 704.85 [M+3H]³⁺, z = 4 528.80 [M+4H]⁴⁺

【0762】

（31-3）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

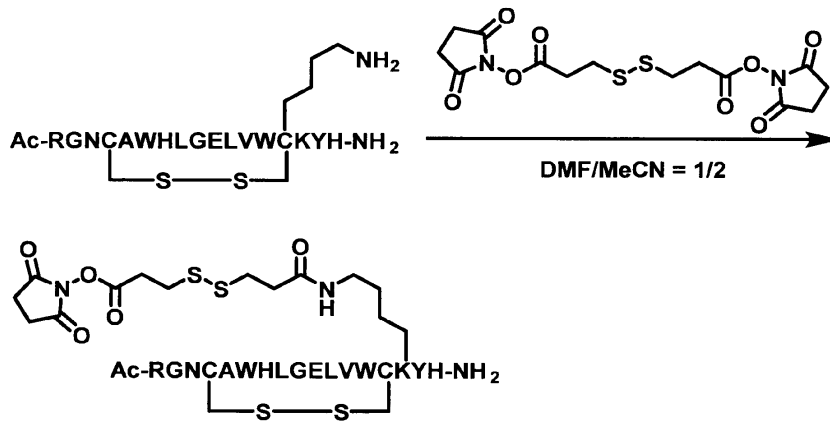
20

30

40

50

【化 1 2 1】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 57 である。

【0763】

(31-2) で合成した $\text{Ac-RGNC(AWHLGELVWCK)YH-NH}_2$ (配列番号 57) (13.6 mg, 6.40 μmol 、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N -ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N -スクシンイミジル) (104 mg, 256 μmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (1.5 mg, 0.63 μmol) を得た。

20

【0764】

MS (ESI) m/z : $z=3$ 801.45 [$M+3H$] $^{3+}$, $z=4$ 601.50 [$M+4H$] $^{4+}$

30

HPLC 純度: 77%

【0765】

(31-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS による解析

(31-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N' -ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148219 にピークが観測され、結合性ペプチドが導入された生成物由来のピークは観測されなかった。

40

【0766】

(31-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(31-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が

50

導入された50592、50762および、原料と同じ23338に軽鎖ピークが観測された。

【0767】

(31-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(31-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA50% B50%→A0% B100%, 12min (データ採取15min)、カラム温度は室温、サーモスタット温度は室温、検出器は280nmの波長で検出した。

10

【0768】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

【0769】

Retention Time 6.8590分はトラスツズマブ原料、8.0655分はペプチド由来のピークであると考えられる(図42)。

【0770】

[実施例32: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

20

(32-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHLGQLVWCTKH-NH₂ (配列番号58) の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物(36.7mg, 18.1 μmol)を得た。

【0771】

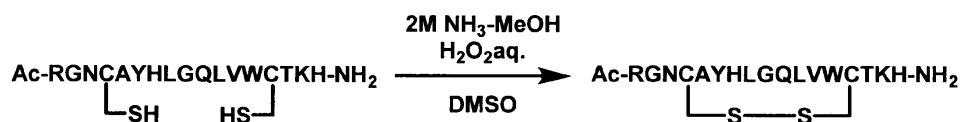
MS (ESI) m/z: z=3 676.75 [M+3H]³⁺, z=4 507.80 [M+4H]⁴⁺

【0772】

30

(32-2) Ac-RGNCA YHLGQLVWCTKH-NH₂ (配列番号58) の4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化122】



上記アミノ酸配列は、配列番号58である。

40

【0773】

(32-1) で合成したペプチド(36.7mg, 18.1 μmol)をDMSO(5.00mL)に溶解し、2M NH₃-MeOH(18.1 μL, 36.2 μmol)、過酸化水素水(37.0 μL, 362 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(18.2mg, 8.99 μmol)を得た。

50

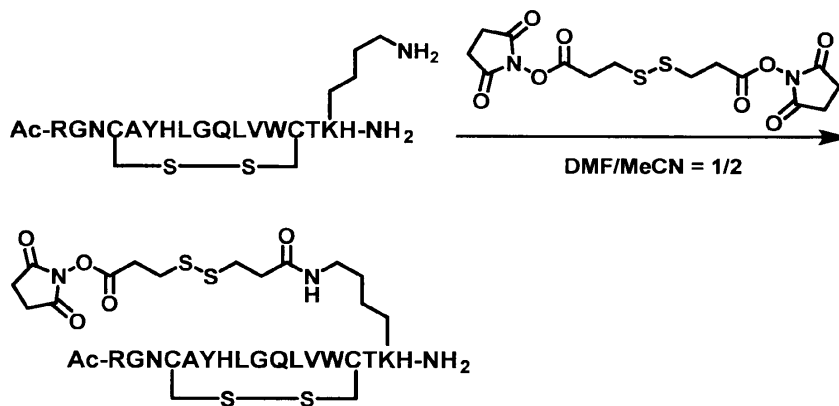
【0774】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 676.00 $[M + 3H]^+$, $z = 4$ 507.30 $[M + 4H]^+$

【0775】

(32-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化123】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号58である。

20

【0776】

(32-2) で合成した Ac-RGNCA YHLGQLVWCTKH-NH₂ (配列番号58) (18.2 mg, 8.99 μmol、ただし4番目と14番目の2つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (145 mg, 360 μmol) をアセトニトリル (1.50 mL) に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 (3.00 mg, 1.30 μmol) を得た。

30

【0777】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 772.45 $[M + 3H]^+$

HPLC 純度: 90%

【0778】

(32-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(32-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体は N,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を60 mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL (抗体に対して30等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148077にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が150281にピークが観測された。

40

【0779】

(32-5) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(32-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。

50

カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B_Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% → A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280 nmの波長で検出した。

【0780】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

10

【0781】

Retention Time 11.1800分はトラスツズマブ原料、11.8682分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物であると考えられる(図43)。

【0782】

[実施例33: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(33-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHLGQLVWCTYK-NH₂ (配列番号59)の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物(52.1 mg, 25.4 μmol)を得た。

20

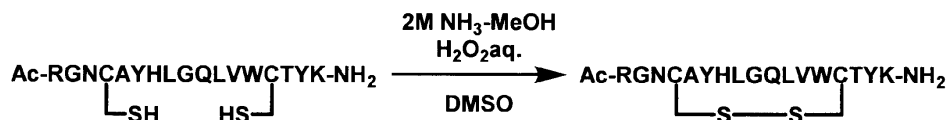
【0783】

MS (ESI) m/z: z = 2 1027.3 [M+2H]²⁺, z = 3 685.45 [M+3H]³⁺

【0784】

(33-2) Ac-RGNCA YHLGQLVWCTYK-NH₂ (配列番号59)の4位と14位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化124】



30

上記アミノ酸配列は、配列番号59である。

【0785】

(33-1)で合成したペプチド(52.1 mg, 25.4 μmol)をDMSO(5.00 mL)に溶解し、2M NH₃-MeOH(25.4 μL, 50.8 μmol)、過酸化水素水(51.9 μL, 508 μmol)を加え室温で20時間攪拌を行った。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド(4.70 mg, 2.29 μmol)を得た。

40

【0786】

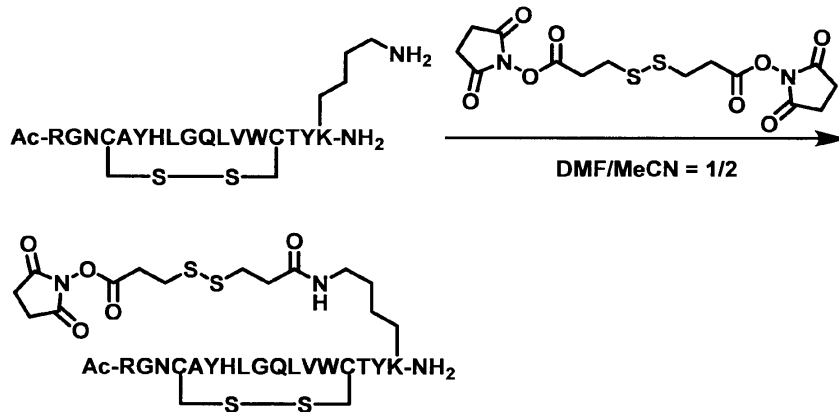
MS (ESI) m/z: z = 2 1026.5 [M+2H]²⁺, z = 3 684.75 [M+3H]³⁺

【0787】

(33-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

50

【化 1 2 5】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 59 である。

【0788】

(33-2) で合成した $\text{Ac-RGNCAYHLGQLVWCTYK-NH}_2$ (配列番号 59) (4.70 mg, 2.29 μmol 、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N -ジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N -スクシンイミジル) (37.0 mg, 91.6 μmol) をアセトニトリル (1.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (5.00 mg, 2.14 μmol) を得た。

20

【0789】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 781.20 [$M + 3H$] $^{3+}$

30

HPLC 純度: 79%

【0790】

(33-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS による解析

(33-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N' -ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148223 にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 150488 にピークが観測された。

40

【0791】

(33-5) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC 解析

(33-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μm を使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0、B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0 にて流速は 0.6 mL/min、グラジエントを A 60% B 40% $\rightarrow$ A 0% B 100%, 16 min (データ採取 20 min)、カラム温度は 40 $^\circ\text{C}$ 、サーモスタット温度

50

は 40℃、検出器は 280 nm の波長で検出した。

【0792】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a：トラスツズマブ原料

b：トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 30 等量；

【0793】

Retention Time 11.1867 分はトラスツズマブ原料、12.2550 分はペプチドがトラスツズマブに 1 個導入された化合物であると考えられる（図 44）。

【0794】

【実施例 34（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗 HER2 IgG 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析】

（34-1）IgG1 Fc 結合性ペプチドの合成

Ac-RGNCA YHRGQLVWCTKH-NH₂（配列番号 60）の配列を実施例 1 と同様に Fmoc 固相合成法により合成した。目的物（66.3 mg, 32.0 μmol）を得た。

【0795】

MS (ESI) m/z : z = 3 691.10 [M+3H]³⁺, z = 4 518.55 [M+4H]⁴⁺

【0796】

（34-2）Ac-RGNCA YHRGQLVWCTKH-NH₂（配列番号 60）の 4 位と 14 位の Cys での分子内ジスルフィド結合の形成

【化 126】



上記アミノ酸配列は、配列番号 60 である。

【0797】

（34-1）で合成したペプチド（66.3 mg, 32.0 μmol）を DMSO（5.00 mL）に溶解し、2 M NH₃-MeOH（32.0 μL, 64.0 μmol）、過酸化水素水（65.4 μL, 640 μmol）を加え室温で 20 時間攪拌を行った。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド（40.0 mg, 19.3 μmol）を得た。

【0798】

MS (ESI) m/z : z = 3 690.40 [M+3H]³⁺, z = 4 518.05 [M+4H]⁴⁺

【0799】

（34-3）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

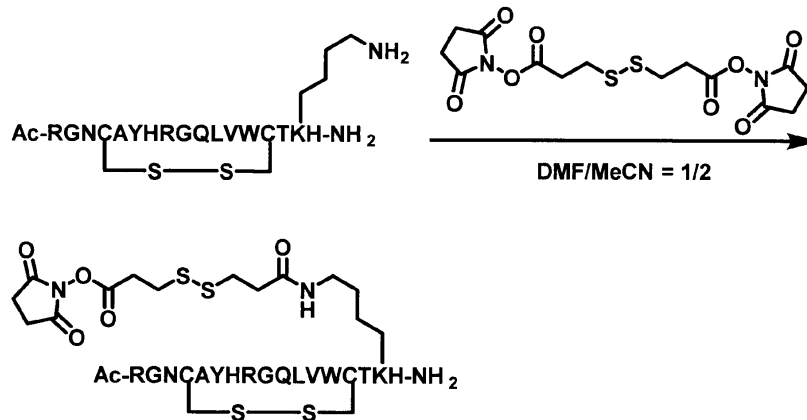
20

30

40

50

【化 1 2 7】



上記アミノ酸配列は、配列番号 60 である。

【0800】

(34-2) で合成した $\text{Ac-RGNCAYHRGQLVWCTKH-NH}_2$ (配列番号 60) (40.0 mg, 19.3 μmol 、ただし 4 番目と 14 番目の 2 つのシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N,N -ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N -スクシンイミジル) (312 mg, 772 μmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (4.50 mg, 1.91 μmol) を得た。

【0801】

MS (ESI) m/z : $z = 3$ 786.85 $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$, m/z : $z = 4$ 590.45 $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$

HPLC 純度: 78%

【0802】

(34-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS による解析

(34-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,N' -ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148081 にピークが観測された。

【0803】

(34-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(34-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 50682、50844 および、原料と同じ 23439 に軽鎖ピークが観測さ

れた。

【0804】

(34-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析
(34-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。
カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% → A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40°C、サーモスタット温度は40°C、検出器は280 nmの波長で検出した。

10

【0805】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

【0806】

Retention Time 10.0610分はトラスツズマブ原料由来の化合物であると考えられる。また、11.0666分にピークが確認された(図45)。

【0807】

[実施例35: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

20

(35-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-KNMQCQRRFYEA LHD PNLNEEQRNARIRSI RDDC-NH₂ (配列番号61)の配列をFmoc固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はCEM社製Liberty Blueを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ResinはFmoc-NH-SAL-PEG Resin HL、アルギニン(R)、システイン(C)ヒスチジン(H)はダブルカップリングを行った。Resinからの切り出しはトリフルオロ酢酸:水:トリイソプロピルシラン:エタンジチオール=94:2.5:1.0:2.5の溶液中3時間攪拌の条件で行った。切り出し後Resinをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈澱を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物(47.0 mg, 11.0 μmol)を得た。

30

【0808】

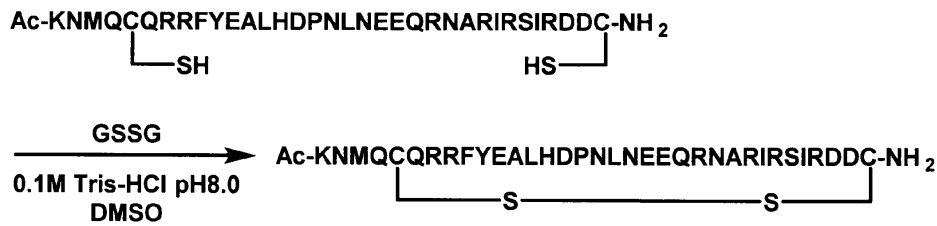
MS (ESI) m/z: z = 5 853.35 [M+5H]⁵⁺, z = 6 711.25 [M+6H]⁶⁺

40

【0809】

(35-2) Ac-KNMQCQRRFYEA LHD PNLNEEQRNARIRSI RDDC-NH₂ (配列番号61)の5位と34位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化 1 2 8】



上記アミノ酸配列は、配列番号 61 である。

【0 8 1 0】

(35-1) で合成したペプチド (47.0 mg, 11.0 μmol) を DMSO (1.10 mL) に溶解し、0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (11.0 mL) を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型 (34.0 mg, 55.0 μmol) を加えて室温で 20 時間攪拌した。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸 0.05 % を含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物 (18.1 mg, 4.25 μmol) を得た。

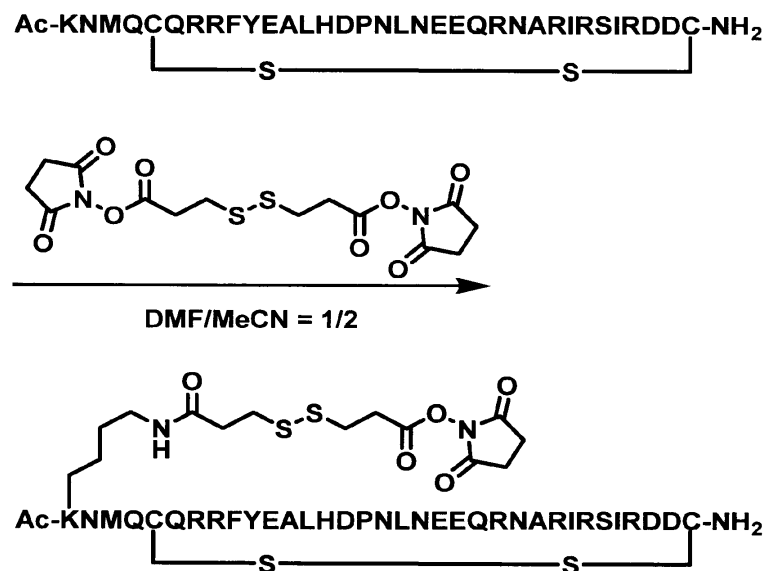
【0 8 1 1】

MS (ESI) m/z: z = 5 852.95 [M + 5H]⁵⁺, z = 6 710.95 [M + 6H]⁶⁺

【0 8 1 2】

(35-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化 1 2 9】



上記アミノ酸配列は、配列番号 61 である。

【0 8 1 3】

(35-2) で合成した Ac-KNMQCQRRFY EALHDPNLN EEQRNARIR SIRDDC-NH₂ (配列番号 61) (18.1 mg, 4.25 μmol、ただし 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N, N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3, 3'-ジチオジ

プロピオン酸ジ（N-スクシンイミジル）（69.0 mg, 0.170 mmol）をアセトニトリル（2.00 mL）に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体（4.00 mg, 0.80 μ mol）を得た。

【0814】

MS (ESI) m/z : $z=5$ 910.85 $[M+5H]^+$, $z=6$ 759.20 $[M+6H]^+$

HPLC純度: 60%

【0815】

（35-4）抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

（35-3）で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し4 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ（中外製薬）500 μ gを50 mM酢酸ナトリウムバッファー（pH 5.5）171 μ Lに溶解させ、4 mMのペプチド試薬を8.5 μ L（抗体に対して10等量）加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148234にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が152672にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が157107にピークが確認された。

【0816】

（35-5）トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

（35-4）で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mMトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩溶液5 μ L（抗体に対して等量）を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50684、50844にピークが観測された。

【0817】

（35-6）抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

（35-4）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μ mを使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 mL/min、グラジエントをA 60% B 40% → A 0% B 100%, 16 min（データ採取20 min）、カラム温度は40°C、サーモスタット温度は40°C、検出器は280 nmの波長で検出した。

【0818】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 10等量；

【0819】

Retention Time 10.0542分はトラスツズマブ原料、9.4481分はペプチドが1個導入された化合物、8.5522分はペプチドが2つ導入された化合物であると考えられる（図46）。

【0820】

10

20

30

40

50

〔実施例 36：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析〕

〔36-1〕 IgG1 Fc 結合性ペプチドの合成

Ac-FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH₂（配列番号 62）の配列を Fmoc 固相合成法により合成した。ペプチド合成装置は CEM 社製 Liberty Blue を使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。Resin は Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL、アルギニン（R）、システイン（C）ヒスチジン（H）はダブルカップリングを行った。Resin からの切り出しはトリフルオロ酢酸：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール＝94：2.5：1.0：2.5 の溶液中 3 時間攪拌の条件で行った。切り出し後 Resin をフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈澱を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物（76.3 mg, 18.0 μmol）を得た。

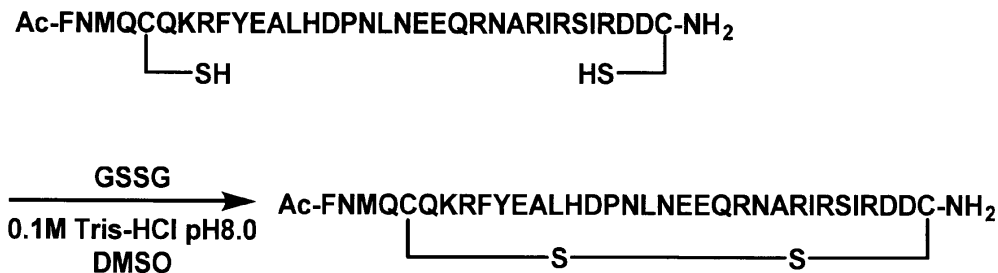
〔0821〕

MS (ESI) m/z : z = 5 851.45 [M+5H]⁵⁺, z = 6 709.75 [M+6H]⁶⁺

〔0822〕

〔36-2〕 Ac-FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH₂（配列番号 62）の 5 位と 34 位の Cys での分子内ジスルフィド結合の形成

〔化 130〕



上記アミノ酸配列は、配列番号 62 である。

〔0823〕

〔36-1〕で合成したペプチド（76.3 mg, 18.0 μmol）を DMSO（1.80 mL）に溶解し、0.1 M Tris-HCl pH 8.0（18.0 mL）を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型（55.0 mg, 89.5 μmol）を加えて室温で 20 時間攪拌した。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸 0.05% を含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物（28.5 mg, 6.71 μmol）を得た。

〔0824〕

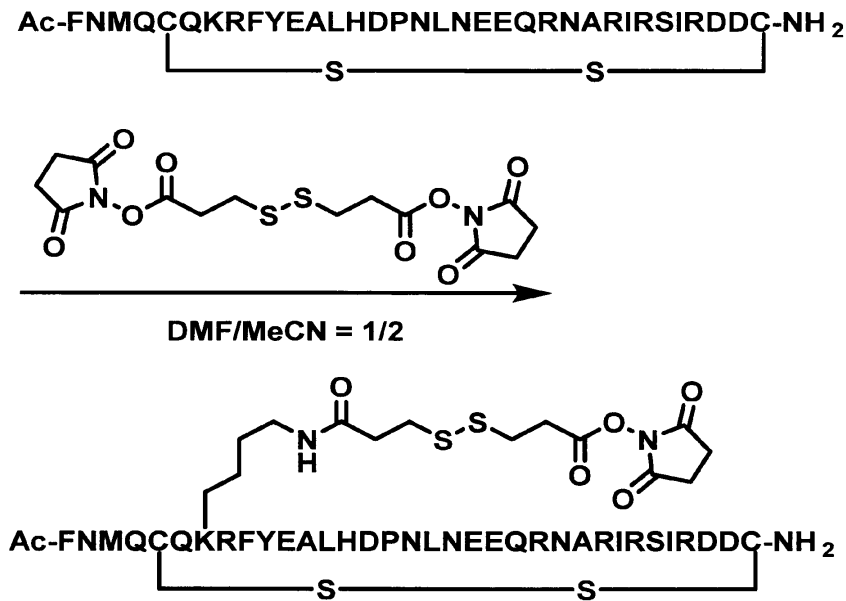
MS (ESI) m/z : z = 5 851.05 [M+5H]⁵⁺, z = 6 709

. 40 [M + 6 H]⁶⁺

【0825】

(36-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化131】



上記アミノ酸配列は、配列番号62である。

【0826】

(36-2) で合成した Ac-FNMQCQKRIFYEALHDPNLNEEQRNA R I R S I R D D C-NH₂ (配列番号62) (28.5 mg, 6.71 μmol、ただし5番目と34番目の2つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N, N'-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3, 3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (108 mg, 0.268 mmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で24時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 (7.10 mg, 1.56 μmol) を得た。

【0827】

MS (ESI) m/z: z = 5 909.05 [M + 5 H]⁵⁺, z = 6 757.70 [M + 6 H]⁶⁺

HPLC純度: 87%

【0828】

(36-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(36-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体は N, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し21.6 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を10 mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) 46.9 μL に溶解させ、21.6 mMのペプチド試薬を4.7 μL (抗体に対して30等量) 加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止さ

せ20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148232にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が152664にピークが観測された。

【0829】

(36-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(36-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50681にピークが観測された。

【0830】

(36-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析
(36-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6×100mm 2.5μmを使用した。A_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH7.0、B_Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40%→A0% B100%、16min(データ採取20min)、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280nmの波長で検出した。

【0831】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 30等量;

【0832】

Retention Time 9.6620分はトラスツズマブ原料、10.3237分はペプチドが1個導入された化合物であると考えられる(図47)。

【0833】

[実施例37: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

(37-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-FNMQCQRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSI RDDC-NH₂(配列番号63)の配列をFmoc固相合成法により合成した。ペプチド合成装置はCEM社製Liberty Blueを使用。試薬は全て渡辺化学工業製のものを使用。ResinはFmoc-NH-SAL-PEG Resin HL、アルギニン(R)、システイン(C)ヒスチジン(H)はダブルカップリングを行った。Resinからの切り出しはトリフルオロ酢酸:水:トリイソプロピルシラン:エタンジチオール=94:2.5:1.0:2.5の溶液中3時間攪拌の条件で行った。切り出し後Resinをフィルトレーションにより除去し、トリフルオロ酢酸を除去した。生成した結晶中にジエチルエーテルを加えエーテル沈澱を行い、生成した白色結晶をフィルトレーションにより回収した。これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05%含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物(67.4mg, 15.7μmol)を得た。

【0834】

MS (ESI) m/z: z=5 860.10 [M+5H]⁵⁺, z=6 716.95 [M+6H]⁶⁺

【0835】

10

20

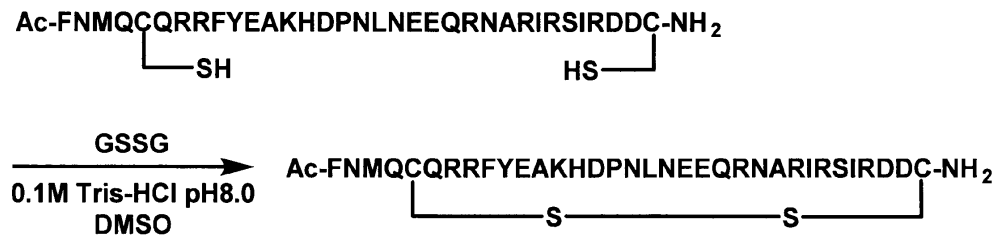
30

40

50

(37-2) Ac-FNMQCQRRFYEA KHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH₂ (配列番号63) の5位と34位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化132】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号63である。

【0836】

(37-1) で合成したペプチド (67.4 mg, 15.7 μmol) を DMSO (1.50 mL) に溶解し、0.1 M Tris-HCl pH 8.0 (15.0 mL) を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型 (48.0 mg, 78.5 μmol) を加えて室温で20時間攪拌した。反応溶液に2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物 (16.1 mg, 3.75 μmol) を得た。

20

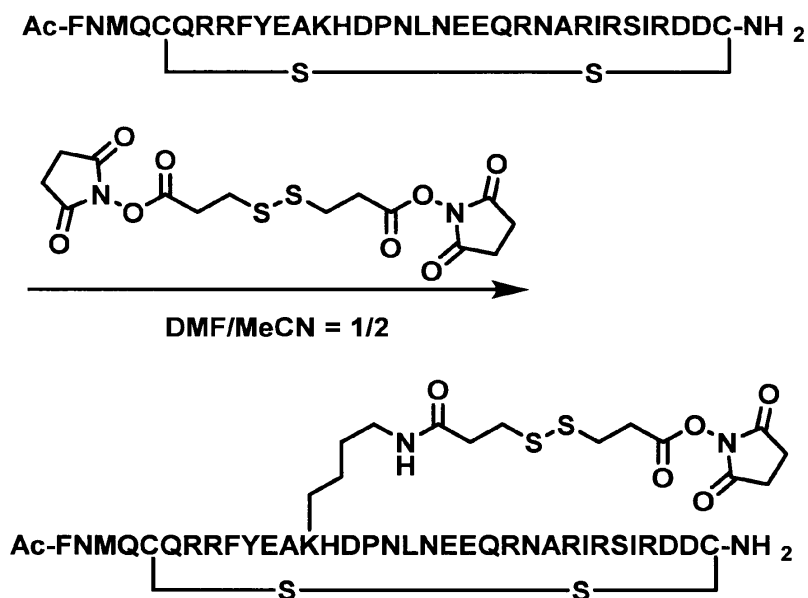
【0837】

MS (ESI) m/z: z = 5 859.75 [M+5H]⁵⁺, z = 6 716.60 [M+6H]⁶⁺

【0838】

(37-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化133】



40

上記アミノ酸配列は、配列番号63である。

【0839】

50

(37-2) で合成した Ac-FNMQCQRRFYEA KHDPNLNEEQRNA RIRSI RDDC-NH₂ (配列番号 63) (16.1mg, 3.75 μmol、ただし 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N, N'-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3, 3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (61.0mg, 0.150 mmol) をアセトニトリル (2.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (5.30mg, 1.16 μmol) を得た。

【0840】

MS (ESI) m/z: z = 5 917.60 [M+5H]⁵⁺, z = 6 764.85 [M+6H]⁶⁺

HPLC 純度: 54%

【0841】

(37-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

(34-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 21.6mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 10mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) 46.9 μL に溶解させ、21.6mM のペプチド試薬を 4.7 μL (抗体に対して 30 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148238 にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 152703 にピークが観測された。

【0842】

(37-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(37-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された 50682 にピークが観測された。

【0843】

(37-6) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾の HIC-UPLC 解析

(37-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体を HIC により解析した。カラムは Protein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μm を使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH 7.0 にて流速は 0.6 mL/min、グラジエントを A 60% B 40% → A 0% B 100%, 16min (データ採取 20min)、カラム温度は 40°C、サーモスタット温度は 40°C、検出器は 280nm の波長で検出した。

【0844】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 30 等量;

【0845】

Retention Time 9.5802 分はトラスツズマブ原料、9.1031 分

はペプチドが1個導入された化合物であると考えられる(図48)。

【0846】

[実施例38:可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

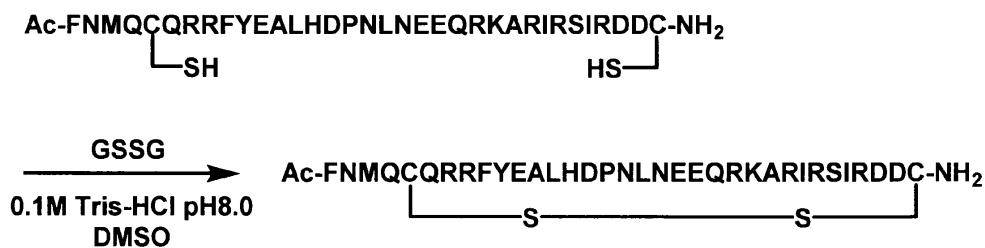
(38-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC-NH₂ (配列番号64)の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物を得た。

【0847】

(38-2) Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC-NH₂ (配列番号64)の5位と34位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化134】



上記アミノ酸配列は、配列番号64である。

【0848】

(38-1)で合成したペプチドをDMSOに溶解し、0.1M Tris-HCl pH 8.0を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で20時間攪拌した。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸0.05%を含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物(20.0mg, 4.66 μmol)を得た。

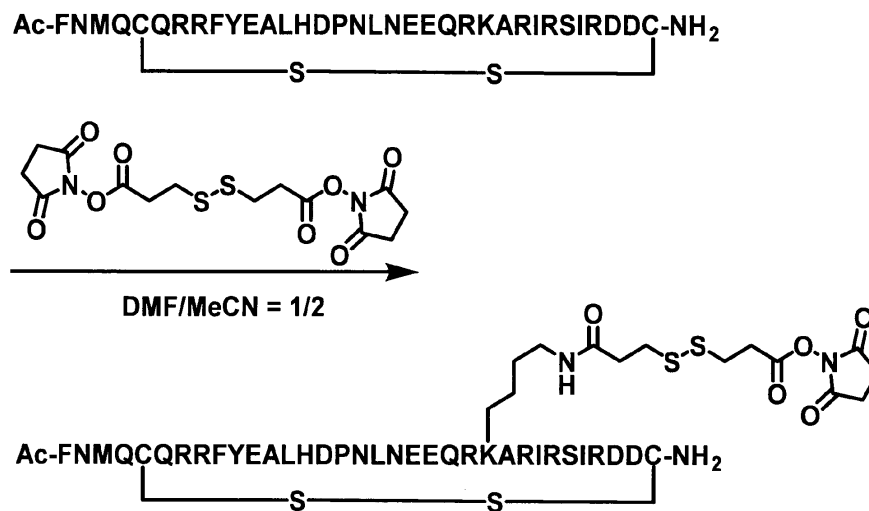
【0849】

MS (ESI) m/z: z = 4 1074.15 [M + 4H]⁴⁺, z = 5 859.65 [M + 5H]⁵⁺

【0850】

(38-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化 1 3 5】



上記アミノ酸配列は、配列番号 6 4 である。

【0 8 5 1】

(38-2) で合成した $\text{Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC-NH}_2$ (配列番号 6 4) (20.0 mg, 4.66 μmol 、ただし 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N 、 N ′-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3, 3′-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (75.4 mg, 186 μmol) をアセトニトリル (1.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (9.00 mg, 1.96 μmol) を得た。

【0 8 5 2】

MS (ESI) m/z : $z = 5$ 917.45 $[\text{M} + 5\text{H}]^{5+}$, $z = 6$ 764.65 $[\text{M} + 6\text{H}]^{6+}$

HPLC 純度: 100%

【0 8 5 3】

(38-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS による解析

(38-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N 、 N ′-ジメチルホルムアミドに溶解し 4 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 500 μg を 50 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) 171 μL に溶解させ、4 mM のペプチド試薬を 8.5 μL (抗体に対して 10 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148070 にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 152538 にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 157165 にピークが観測された。

【0 8 5 4】

(38-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析によ

る重鎖選択性の確認

(38-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 5 μ L (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニルが導入された 50685、50847 および、原料と同じ 23439 に軽鎖ピークが観測された。

【0855】

(38-6) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(38-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 μ m を使用した。A Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0 にて流速は 0.6 ml/min、グラジエントを A 60% B 40% → A 0% B 100%, 16 min (データ採取 20 min)、カラム温度は 40°C、サーモスタット温度は 40°C、検出器は 280 nm の波長で検出した。

【0856】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 10 等量;

【0857】

Retention Time 9.7820 分はトラスツズマブ原料、9.3370 分はペプチドが 1 個導入された化合物、8.7313 分はペプチドが 2 個導入された化合物であると考えられる (図 49)。

【0858】

[実施例 39: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物 (ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体) の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの修飾およびその解析]

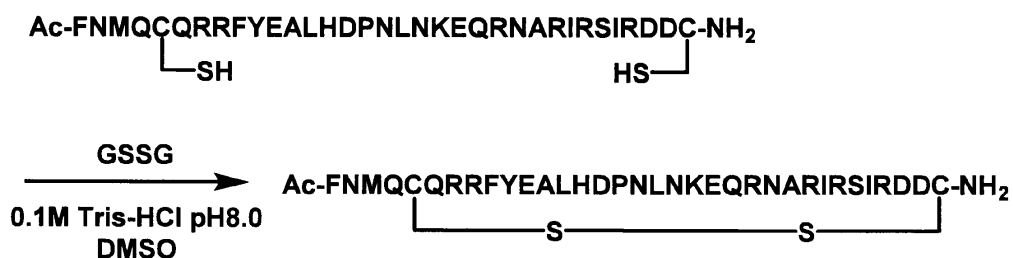
(39-1) IgG1 Fc 結合性ペプチドの合成

Ac-FNMQCQRRFYEA LHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC-NH₂ (配列番号 65) の配列を実施例 1 と同様に Fmoc 固相合成法により合成した。目的物を得た。

【0859】

(39-2) Ac-FNMQCQRRFYEA LHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC-NH₂ (配列番号 65) の 5 位と 34 位の Cys での分子内ジスルフィド結合の形成

【化 136】



上記アミノ酸配列は、配列番号 65 である。

【0860】

(39-1) で合成したペプチドを DMSO に溶解し、0.1 M Tris-HCl pH 8.0 を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で 20 時間攪拌した。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05% トリフル

オロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸 0.05% を含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物 (23.0 mg, 5.38 μmol) を得た。

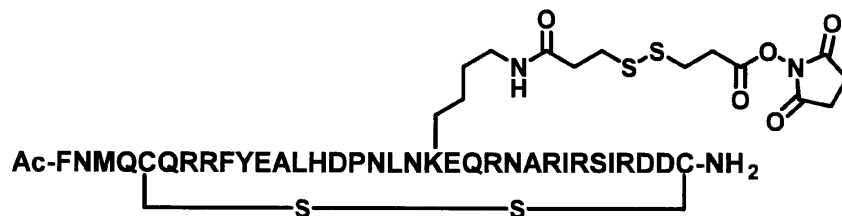
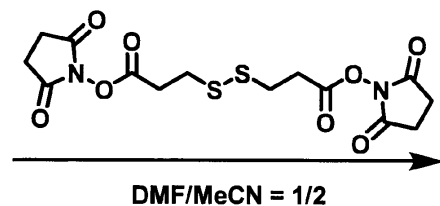
【0861】

MS (ESI) m/z : $z = 4$ 1070.55 $[M + 4H]^+$, $z = 5$ 856.55 $[M + 5H]^+$

【0862】

(39-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化137】



上記アミノ酸配列は、配列番号 65 である。

【0863】

(39-2) で合成した Ac-FNMQCQRRFYALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC-NH₂ (配列番号 65) (23.0 mg, 5.38 μmol 、ただし 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N, N-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3, 3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (87.0 mg, 215 μmol) をアセトニトリル (1.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (16.0 mg, 3.50 μmol) を得た。

【0864】

MS (ESI) m/z : $z = 5$ 914.45 $[M + 5H]^+$, $z = 6$ 762.15 $[M + 6H]^+$

HPLC 純度: 83%

【0865】

(39-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(39-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し4 mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ(中外製薬) 500 µgを50 mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 5.5) 171 µLに溶解させ、4 mMのペプチド試薬を4.2 µL(抗体に対して5等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液をNAP-5カラムに添加し、反応を停止させ20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148065にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が152525にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が156978にピークが観測された。

10

【0866】

(39-5) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(39-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100 mm 2.5 µmを使用した。A_Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B_Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% → A 0% B 100%, 16 min (データ採取20 min)、カラム温度は40°C、サーモスタット温度は40°C、検出器は280 nmの波長で検出した。

20

【0867】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 5等量;

【0868】

Retention Time 9.2124分はペプチドが1個導入された化合物、8.6157分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図50)。

【0869】

[実施例40: トラスツズマブのチオール導入体のペプチドマッピング]

(40-1) トラスツズマブのチオール導入体のトリプシン処理

1. 5 mL低吸着マイクロテストチューブにサンプル溶液を10 µL、50 mM炭酸水素アンモニウム緩衝液、40%トリフルオロエタノールに溶解した20 mMのジチオスレイトール水溶液10 µLを加えて65°Cで1時間加温後、50 mMのヨードアセトアミド水溶液10 µLを添加し、遮光下室温で30分間300 rpmで振盪し反応させた。反応後、50 mM炭酸水素アンモニウム緩衝液を40 µL加えて攪拌し、20 ng/µLのトリプシン水溶液(Proteomics Grade, Code No. T6567-5 x 20 µg (SIGMA))を10 µL添加して37°Cで18時間酵素消化した。消化後、20%トリフルオロ酢酸水溶液を2 µL添加し反応を止め、LC-MS/MS測定を実施した。

30

【0870】

(40-2) トラスツズマブのLC-MS/MS測定条件

(分析装置)

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

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

【0871】

(HPLC分析条件)

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

分析カラム: ESI-column (NTCC-360/75-3-125, 75 µm x

50

12.5 cm, 3 μ m (日京テクノス株式会社)

移動相 A : 0.1%ギ酸水溶液

移動相 B : 0.1%ギ酸、アセトニトリル溶液

ローディング溶液 : 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液

流速 : 300 nL/min

サンプル注入量 : 1 μ L

グラジエント条件 (B%) : 2% (0.0–0.5分)、2%→30% (0.5–23.5分)、30%→75% (23.5–25.5分)、75% (25.5–35.0分)
【0872】

(質量分析計分析条件)

イオン化法 : ESI, Positiveモード

スキャンタイプ : Data Dependent Acquisition

Activation Type : Collision Induced Dissociation (CID)

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

【0873】

(40–3) トラストズマブの修飾部位の解析条件

LC–MS/MS測定結果に対する修飾部位解析については、Proteome Discoverer version 1.4 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて行った。

【0874】

Proteome Discovererでの解析は、Sequest HTを検索エンジンとして使用し、プリカーサーイオンの範囲を350~5000 Da、Total Intensity Thresholdを50000とした。また、トリプシンを消化酵素として設定し、Maximum Missed Cleavage Sitesは3とした。また、プリカーサーおよびフラグメントイオンのMass Toleranceは、それぞれ5 ppmおよび0.5 Daとした。Static Modificationにはヨードアセトアミドによるシステイン残基の修飾として、Carbamidomethyl (+57.021 Da) を設定した。Dynamic Modificationsについては、メチオニンの酸化 (+15.995 Da) およびリジン残基への修飾体 (ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体 (+145.019 Da)) を設定した。さらに、Peptide ConfidenceがHighのもののみとなるようフィルターをかけた。

【0875】

また、修飾部位の検索対象のアミノ酸配列のデータとして、図8に示される(1)、(3)を用いた。

【0876】

(40–4) トラストズマブのLC–MS/MSによる修飾部位の解析結果

LC–MS/MSを用いた解析の結果、実施例39のバインダーペプチドを用いて修飾したトラストズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位 (ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体 (+145.019 Da)) を含むアミノ酸19残基からなるペプチド、VVSVLTVLHQDWLNGKEYK (配列番号66) のペプチドフラグメントのMSスペクトル (実測値 : m/z 791.74872、理論値791.74753、3価) が観測され (図51)、CIDスペクトルより重鎖のEUnumberingにおける317位のリジン残基の修飾を示す、2価のb18に相当するm/z 1114.35 (理論値 : 1114.06) のプロダクトイオンが確認された (図52)。また、トリプシン消化によるリジン残基への修飾

10

20

30

40

50

部位（ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体（+145.019Da））を含むアミノ酸28残基からなるペプチド、EEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK（配列番号67）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（実測値： m/z 886.93408、理論値：886.93215、4価）が観測され（図53）、CIDスペクトルより同じく重鎖の317位のリジン残基の修飾を示す、2価のy14に相当する m/z 938.70（理論値：938.46）のプロダクトイオンが確認された（図54）。

【0877】

〔実施例41：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの修飾およびその解析〕

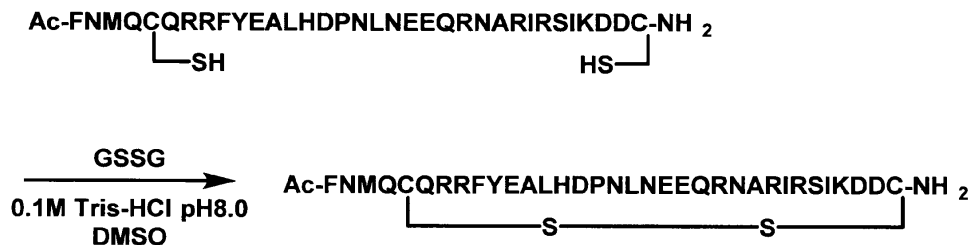
（41-1）IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂（配列番号68）の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物を得た。

【0878】

（41-2）Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH₂（配列番号68）の5位と34位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化138】



上記アミノ酸配列は、配列番号68である。

【0879】

（41-1）で合成したペプチドをDMSOに溶解し、0.1M Tris-HCl pH 8.0を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で20時間攪拌した。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸0.05%を含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物（20.0mg，4.70μmol）を得た。

【0880】

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

【0881】

（41-3）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

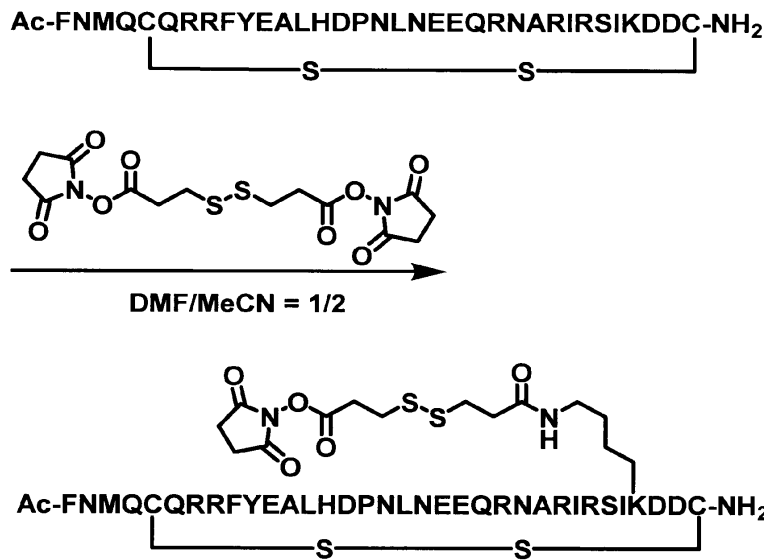
20

30

40

50

【化 1 3 9】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 68 である。

【0882】

20

(41-2) で合成した $\text{Ac-FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNAIRSIKDDC-NH}_2$ (配列番号 68) (20.0 mg , $4.70 \mu\text{mol}$ 、ただし 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N 、 N -ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3,3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N -スクシンイミジル) (76.0 mg , $188 \mu\text{mol}$) をアセトニトリル (1.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (12.0 mg , $2.63 \mu\text{mol}$) を得た。

30

【0883】

MS (ESI) m/z : $z = 5$ 908.95 $[\text{M} + 5\text{H}]^{5+}$, $z = 6$ 757.75 $[\text{M} + 6\text{H}]^{6+}$

HPLC 純度: 83%

【0884】

(41-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

40

(41-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N 、 N -ジメチルホルムアミドに溶解し 4 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) $500 \mu\text{g}$ を 50 mM 酢酸ナトリウムバッファー ($\text{pH } 5.5$) $171 \mu\text{L}$ に溶解させ、 4 mM のペプチド試薬を $8.5 \mu\text{L}$ (抗体に対して 10 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を NAP-5 カラムに添加し、反応を停止させ 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148234 にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 152648 にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 157083 にピークが観測された。

【0885】

50

(41-5) トラストズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(41-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50686、50847および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0886】

(41-6) 抗HER2 IgG抗体トラストズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(41-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5μmを使用した。A_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH7.0、B_Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40%→A0% B100%, 16min(データ採取20min)、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280nmの波長で検出した。

【0887】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラストズマブ原料

b: トラストズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 10等量;

【0888】

Retention Time 9.7202分はトラストズマブ原料、9.2689分はペプチドが1個導入された化合物、8.7994分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図55)。

【0889】

[実施例42: トラストズマブのチオール導入体のペプチドマッピング]

(42-1) トラストズマブのチオール導入体のトリプシン処理

(40-1) と同じ処理を行った。

【0890】

(42-2) トラストズマブのLC-MS/MS測定条件

(40-2) と同じ測定条件を用いた。

【0891】

(42-3) トラストズマブの修飾部位の解析条件

(40-3) と同じ解析条件を用いた。

【0892】

(42-4) トラストズマブのLC-MS/MSによる修飾部位の解析結果

LC-MS/MSを用いた解析の結果、実施例41のバインダーペプチドを用いて修飾したトラストズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethylationを受けたチオール導入体(+145.019Da))を含むアミノ酸18残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPR(配列番号69)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値: m/z 769.04688、理論値: 769.04457、3価)が観測され(図56)、CIDスペクトルより重鎖のEUnumberingにおける288位もしくは290位のリジン残基の修飾を示す、2価のy12に相当するm/z 741.15(理論値: 740.89)のプロダクトイオンが確認された(図57)。

【0893】

[実施例43: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラストズマブの修飾およびその解析]

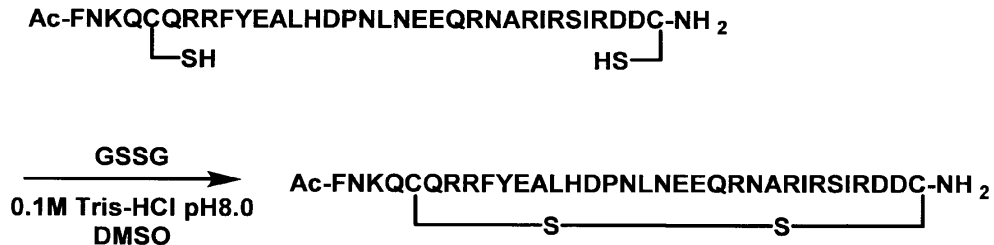
(43-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH₂ (配列番号 70) の配列を実施例 1 と同様に Fmoc 固相合成法により合成した。目的物を得た。

【0894】

(43-2) Ac-FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH₂ (配列番号 70) の 5 位と 34 位の Cys での分子内ジスルフィド結合の形成

【化 140】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 70 である。

【0895】

(43-1) で合成したペプチドを DMSO に溶解し、0.1 M Tris-HCl pH 8.0 を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で 20 時間攪拌した。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタドデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸 0.05 % を含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物 (20.0 mg, 4.67 μmol) を得た。

20

【0896】

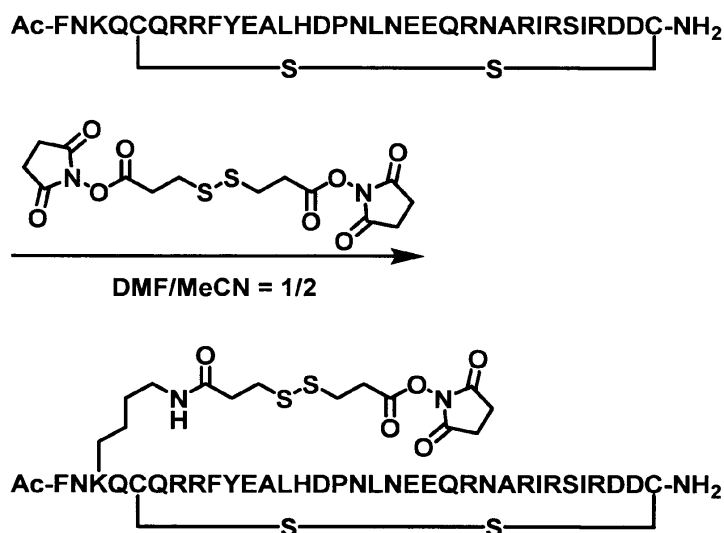
MS (ESI) m/z : z = 5 848.30 [M+5H]⁵⁺, z = 6 707.10 [M+6H]⁶⁺

30

【0897】

(43-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化 141】



40

50

上記アミノ酸配列は、配列番号 70 である。

【0898】

(43-2) で合成した Ac-FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNA
RIRSI RDDC-NH₂ (配列番号 70) (20.0mg, 4.67μmol、ただ
し 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成して
いる) を N, N-ジメチルホルムアミド (0.50mL) に溶解し、3, 3'-ジチオジブ
ロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (76.0mg, 188μmol) をアセトニト
リル (0.60mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮する
ことによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶
解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラ
フィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で
溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを
回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記
ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (9.00mg, 1.97μmol)
を得た。

10

【0899】

MS (ESI) m/z: z = 6 761.85 [M+6H]⁶⁺
HPLC 純度: 85%

【0900】

(43-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS に
よる解析

20

(43-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N,
N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 4mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ
1000μg を 50mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) 342μL に溶解さ
せ、4mM のペプチド試薬を 17.0μL (抗体に対して 10 等量) 加えて、室温で 1 時
間攪拌した。反応液を 100mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 2.9) に置換
して反応を停止させ、さらに 20mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS
により質量を測定したところ、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 156963 に
ピークが確認された。

【0901】

30

(43-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析によ
る重鎖選択性の確認

(43-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に 7mM トリス (2-カルボキシエチル)
ホスフィン塩酸塩溶液 5μL (抗体に対して等量) を加えて、室温で 20 分攪拌した。
ESI-TOFMS により質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が
導入された 50686、50847 および、原料と同じ 23439 に軽鎖ピークが観測さ
れた。

【0902】

(43-6) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾の HIC-UPLC 解析

(43-4) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体を HIC により解析した。
カラムは Protein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5μm を使用した。A Buffer: 0.1M PiNa, 2
.3M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B Buffer: 0.1M PiNa, pH 7
.0 にて流速は 0.6ml/min、グラジエントを A 60% B 40% → A 0% B 10
0%, 16min (データ採取 20min)、カラム温度は 40℃、サーモスタット温度
は 40℃、検出器は 280nm の波長で検出した。

40

【0903】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 10 等量;

50

【0904】

Retention Time 8.6251分はペプチドが2個導入された化合物であると考えられる(図58)。

【0905】

【実施例44：トラスツズマブのチオール導入体のペプチドマッピング】

(44-1) トラスツズマブのチオール導入体のトリプシン処理

1. 5mL低吸着マイクロテストチューブにサンプル溶液を10μL、50mM炭酸水素アンモニウム緩衝液、40%トリフルオロエタノールに溶解した20mMのジチオスレイトール水溶液10μLを加えて65℃で1時間加温後、50mMのヨードアセトアミド水溶液10μLを添加し、遮光下室温で30分間300rpmで振盪し反応させた。反応後、50mM炭酸水素アンモニウム緩衝液を40μL加えて攪拌し、20ng/μLのトリプシン水溶液を10μL添加して37℃で18時間酵素消化した。消化後、20%トリフルオロ酢酸水溶液2μL添加し反応を止めた。その後、50mM炭酸水素アンモニウム緩衝液、0.5%トリフルオロ酢酸を用いて10倍希釈し、LC-MS/MS測定に使用した。

10

【0906】

(44-2) トラスツズマブのLC-MS/MS測定条件

(分析装置)

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

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

20

【0907】

(HPLC分析条件)

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

分析カラム: ESI-column (NTCC-360/75-3-125, 75μm x 12.5cm, 3μm (日京テクノス株式会社))

移動相A: 0.1%ギ酸水溶液

移動相B: 0.1%ギ酸、アセトニトリル溶液

ローディング溶液: 0.1%トリフルオロ酢酸水溶液

30

流速: 300nL/min

サンプル注入量: 1μL

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

【0908】

(質量分析計分析条件)

イオン化法: ESI, Positiveモード

スキャンタイプ: Data Dependent Acquisition

Activation Type: Collision Induced Dissociation (CID)

40

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

【0909】

(44-3) トラスツズマブの修飾部位の解析条件

LC-MS/MS測定結果に対する修飾部位解析については、Proteome Discoverer version 1.4 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて行った。

【0910】

50

Proteome Discovererでの解析は、Sequest HTを検索エンジンとして使用し、プリカーサーイオンの範囲を350～5000Daとした。また、トリプシンを消化酵素として設定し、Maximum Missed Cleavage Sitesは3とした。また、プリカーサーおよびフラグメントイオンのMass Toleranceは、それぞれ5ppmおよび0.5Daとした。Static Modificationにはヨードアセトアミドによるシステイン残基の修飾として、Carbamidomethyl (+57.021Da)を設定した。Dynamic Modificationsについては、メチオニンの酸化(+15.995Da)およびリジン残基への修飾体(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019Da))を設定した。さらに、Peptide ConfidenceがHighのもののみとなるようフィルターをかけた。実施例43のみ、Total Intensity Thresholdを32000とした。

【0911】

また、修飾部位の検索対象のアミノ酸配列のデータとして、図8に示される(1)、(3)を用いた。

【0912】

(44-4) トラストズマブのLC-MS/MSによる修飾部位の解析結果

LC-MS/MSを用いた解析の結果、トラストズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019Da))を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(配列番号40)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値: m/z 952.23145、理論値:952.22900、4価)が観測され(図59)、CIDスペクトルより重鎖のEUnumberingにおける246位のリジン残基の修飾を示す、2価の y_{15} に相当する m/z 968.30(理論値:968.01)のプロダクトイオンが確認された(図60)。

【0913】

[実施例45:可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 IgG抗体トラストズマブの修飾およびその解析]

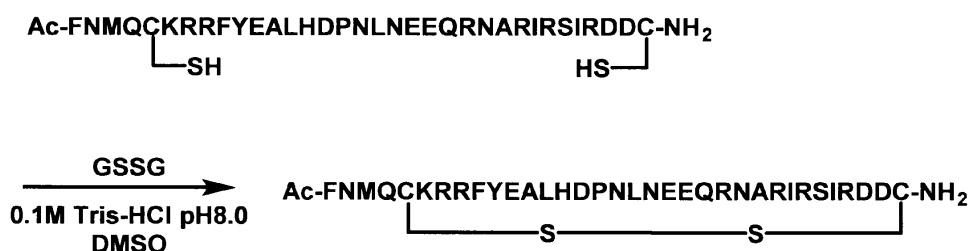
(45-1) IgG1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-FNMQCKRRFYEA LHDPNLN EEQRNARIRSI RDDC-NH₂(配列番号71)の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物を得た。

【0914】

(45-2) Ac-FNMQCKRRFYEA LHDPNLN EEQRNARIRSI RDDC-NH₂(配列番号71)の5位と34位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化142】



上記アミノ酸配列は、配列番号71である。

【0915】

(45-1) で合成したペプチドを DMSO に溶解し、0.1 M Tris-HCl pH 8.0 を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で 20 時間攪拌した。反応溶液に 2 M トリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを 0.05 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸 0.05 % を含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物 (20.0 mg, 4.67 μ mol) を得た。

【0916】

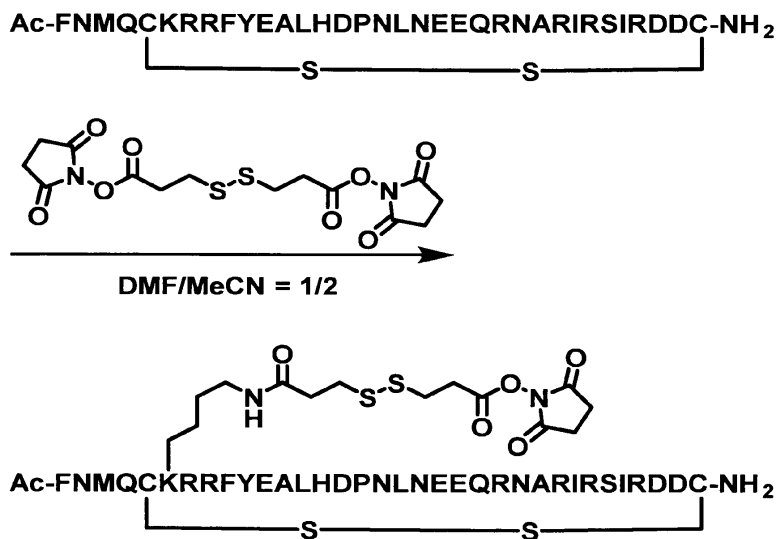
MS (ESI) m/z : $z=3$ 692.70 $[M+3H]^3+$, $z=4$ 519.80 $[M+4H]^4+$

10

【0917】

(45-3) ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

【化143】



20

30

上記アミノ酸配列は、配列番号 71 である。

【0918】

(45-2) で合成した Ac-FNMQCKRRFY EALHDPNLNEEQRNA RIRSIRDDC-NH₂ (配列番号 71) (20.0 mg, 4.67 μ mol、ただし 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N, N-ジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解し、3, 3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (76.0 mg, 188 μ mol) をアセトニトリル (0.60 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05 % トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05 % 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (5.50 mg, 1.20 μ mol) を得た。

40

【0919】

MS (ESI) m/z : $z=6$ 762.40 $[M+6H]^6+$

HPLC 純度: 100 %

【0920】

50

(45-4) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

(45-2) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し4mMとした。抗HER2 IgG抗体トラスツズマブ500μgを50mM酢酸ナトリウムバッファ(pH 5.5) 171μLに溶解させ、4mMのペプチド試薬を8.5μL(抗体に対して10等量)加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファ(pH 2.9)に置換して反応を停止させ、さらに20mMPBSバッファに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは148226にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が152662にピークが確認された。

10

【0921】

(45-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

(45-3) で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5μL(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50686、50847および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0922】

(45-6) 抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(45-3) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column(Waters) 4.6x100mm 2.5μmを使用した。A_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH7.0、B_Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40%→A0% B100%, 16min(データ採取20min)、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280nmの波長で検出した。

20

【0923】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: トラスツズマブ原料

b: トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 10等量;

30

【0924】

Retention Time 9.8954分はトラスツズマブ原料、9.4892分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物であると考えられる(図61)。

【0925】

[実施例46: トラスツズマブのチオール導入体のペプチドマッピング]

(46-1) トラスツズマブのチオール導入体のトリプシン処理

(44-1)と同じ処理を行った。

【0926】

(46-2) トラスツズマブのLC-MS/MS測定条件

(44-2)と同じ測定条件を用いた。

40

【0927】

(46-3) トラスツズマブの修飾部位の解析条件

(44-3)と同じ解析条件を用いた。

【0928】

(46-4) トラスツズマブのLC-MS/MSによる修飾部位の解析結果

LC-MS/MSを用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019Da))を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、THTCPCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(配列番号40

50

）のペプチドフラグメントのMSスペクトル（実測値： m/z 952.22968、理論値：952.22900、4価）が観測され（図62）、CIDスペクトルより重鎖のE U n u m b e r i n gにおける246位のリジン残基の修飾を示す、2価の y_{12} に相当する m/z 764.60（理論値：764.40）のプロダクトイオンが確認された（図63）。

【0929】

〔実施例47：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）の合成、ならびに当該化合物を用いた抗HER2 Ig G抗体トラスツマブの修飾およびその解析〕

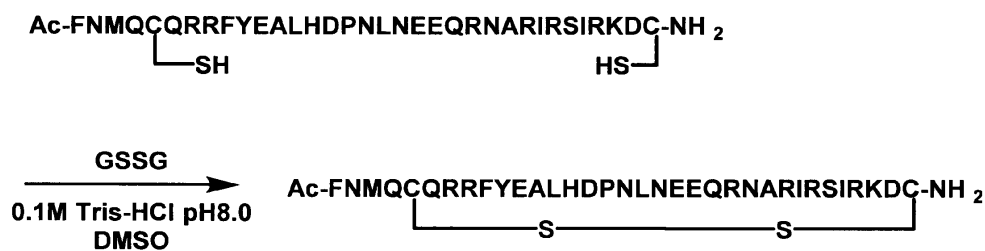
（47-1）Ig G1 Fc結合性ペプチドの合成

Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC-NH₂（配列番号72）の配列を実施例1と同様にFmoc固相合成法により合成した。目的物を得た。

【0930】

（47-2）Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC-NH₂（配列番号72）の5位と34位のCysでの分子内ジスルフィド結合の形成

【化144】



上記アミノ酸配列は、配列番号72である。

【0931】

（47-1）で合成したペプチドをDMSOに溶解し、0.1M Tris-HCl pH 8.0を加えた。この溶液にグルタチオン酸化型を加えて室温で20時間攪拌した。反応溶液に2Mトリフルオロ酢酸水溶液を加え反応を停止し、これを0.05%トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸0.05%を含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションをLC-MSにより確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、目的物（24.5mg, 5.71 μmol）を得た。

【0932】

MS (ESI) m/z : $z=3$ 692.70 [M+3H]³⁺, $z=4$ 519.80 [M+4H]⁴⁺

【0933】

（47-3）ジスルフィドリンカーとペプチドの連結

10

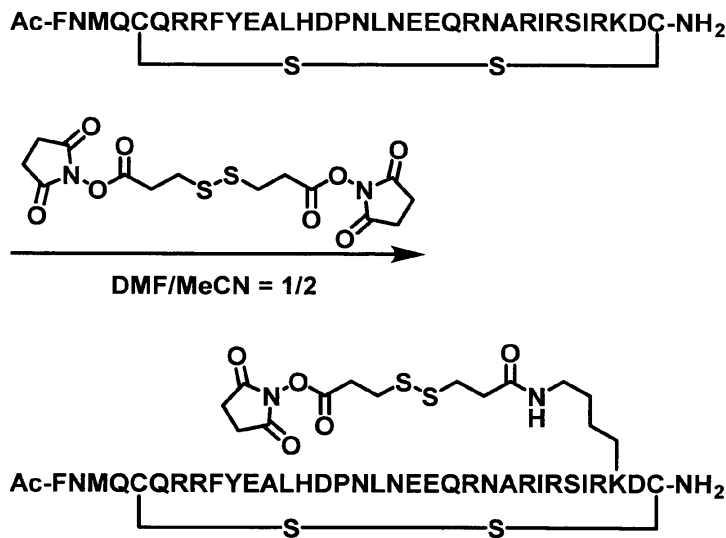
20

30

40

50

【化 1 4 5】



上記アミノ酸配列は、配列番号 72 である。

【0934】

(47-2) で合成した $\text{Ac-FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNA R I R S I R K D C-NH}_2$ (配列番号 72) (24.5 mg, 5.71 μmol 、ただし 5 番目と 34 番目の 2 つのシステインはそれぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している) を N, N'-ジメチルホルムアミド (1.00 mL) に溶解し、3, 3'-ジチオジプロピオン酸ジ (N-スクシンイミジル) (92.2 mg, 228 μmol) をアセトニトリル (1.00 mL) に溶解した溶液を加え、室温で 24 時間攪拌した。減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、これを 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液に溶解し、オクタデシル基化学結合型シリカゲルを充填剤とする逆相高速液体クロマトグラフィーに付し、トリフルオロ酢酸を 0.05% 含有する水とアセトニトリルの混合溶液で溶出し、各フラクションを LC-MS により確認した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体 (7.50 mg, 1.64 μmol) を得た。

【0935】

MS (ESI) m/z : $z = 6$ 762.40 $[M + 6H]^6+$

HPLC 純度: 84%

【0936】

(47-4) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾とESI-TOFMS による解析

(47-3) で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS 活性化体は N, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 4 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ 500 μg を 50 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.5) 171 μL に溶解させ、4 mM のペプチド試薬を 8.5 μL (抗体に対して 10 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌した。反応液を 100 mM クエン酸ナトリウムバッファー (pH 2.9) に置換して反応を停止させ、さらに 20 mM PBS バッファーに置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148087 にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が 152694 にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が 157160 にピークが確認された。

【0937】

(47-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS 解析によ

る重鎖選択性の確認

(47-4)で生成した抗体・ペプチド複合体に7mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩溶液5 μ L(抗体に対して等量)を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物は重鎖にチオプロピオニル基が導入された50686、50847および、原料と同じ23439に軽鎖ピークが観測された。

【0938】

(47-6)抗HER2 IgG抗体トラスツズマブの特異的修飾のHIC-UPLC解析

(47-4)で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 $\times$ 100mm 2.5 μ mを使用した。A_Buffer:0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH7.0、B_Buffer:0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40%→A0% B100%, 16min(データ採取20min)、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280nmの波長で検出した。

【0939】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a:トラスツズマブ原料

b:トラスツズマブ+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 10等量;

【0940】

Retention Time 9.5796分はトラスツズマブ原料、9.1199分はペプチドがトラスツズマブに1個導入された化合物であると考えられる(図64)。

【0941】

[実施例48:トラスツズマブのチオール導入体のペプチドマッピング]

(48-1)トラスツズマブのチオール導入体のトリプシン処理

(44-1)と同じ処理を行った。

【0942】

(48-2)トラスツズマブのLC-MS/MS測定条件

(44-2)と同じ測定条件を用いた。

【0943】

(48-3)トラスツズマブの修飾部位の解析条件

(44-3)と同じ解析条件を用いた。

【0944】

(48-4)トラスツズマブのLC-MS/MSによる修飾部位の解析結果

LC-MS/MSを用いた解析の結果、トラスツズマブのトリプシン消化によるリジン残基への修飾部位(ヨードアセトアミドによるCarbamidomethyl化を受けたチオール導入体(+145.019Da))を含むアミノ酸33残基からなるペプチド、FNWYVDGVEVHNAKTKPR(配列番号69)のペプチドフラグメントのMSスペクトル(実測値:m/z 769.04529、理論値:769.04457、3価)が観測され(図65)、CIDスペクトルより重鎖のEUnumberingにおける290位のリジン残基の修飾を示す、2価のy8に相当するm/z 549.11(理論値:548.79)のプロダクトイオンが確認された(図66)。

【0945】

[実施例49:可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体)を用いたヒトIgG2抗体の修飾およびその解析]

(49-1)ヒトIgG2抗体の特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

実施例(2-2)で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解し4mMとした。ヒトIgG2抗体(RayBio tech社製)500 μ gを50mM酢酸ナトリウムバッファー(pH 5.5)171

10

20

30

40

50

μLに溶解させ、4 mMのペプチド試薬を8.5 μL（抗体に対して10等量）加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファー（pH 2.9）に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のIgG2抗体は153047にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が155129にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が157699にピークが確認された。

【0946】

（49-2）ヒトIgG2抗体の特異的修飾のHIC-UPLC解析

（49-1）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column（Waters）4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A__Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B__Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% → A 0% B 100%, 16 min（データ採取20 min）、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280 nmの波長で検出した。

【0947】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: ヒトIgG2抗体原料

b: ヒトIgG2抗体+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 10等量；

【0948】

Retention Time 9.0209分はヒトIgG2抗体原料、10.2043分はペプチドがヒトIgG2抗体に1個導入された化合物であると考えられる（図67）。

【0949】

[実施例50: 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体）を用いたヒトIgG2抗体の修飾およびその解析]

（50-1）ヒトIgG2抗体の特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

実施例（43-3）で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体はN, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し4 mMとした。ヒトIgG2抗体（RayBio tech社製）500 μgを50 mM酢酸ナトリウムバッファー（pH 5.5）171 μLに溶解させ、4 mMのペプチド試薬を8.5 μL（抗体に対して10等量）加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100 mMクエン酸ナトリウムバッファー（pH 2.9）に置換して反応を停止させ、さらに20 mM PBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のIgG2抗体は153047にピークが観測され、結合性ペプチドが一つ導入された生成物が157652にピークが確認され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が165043にピークが確認された。

【0950】

（50-2）ヒトIgG2抗体の特異的修飾のHIC-UPLC解析

（50-1）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column（Waters）4.6 x 100 mm 2.5 μmを使用した。A__Buffer: 0.1 M PiNa, 2.3 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0、B__Buffer: 0.1 M PiNa, pH 7.0にて流速は0.6 ml/min、グラジエントをA 60% B 40% → A 0% B 100%, 16 min（データ採取20 min）、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280 nmの波長で検出した。

【0951】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: ヒトIgG2抗体原料

b：ヒトIgG2抗体＋ペプチドジスルフィドリンカー連結物－NH S 活性化体 10等量；

【0952】

Retention Time 9.0209分はヒトIgG2抗体原料、8.3882分はペプチドがヒトIgG2抗体に1個導入された化合物であると考えられる（図68）。

【0953】

〔実施例51：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物－NH S 活性化体）を用いたヒトIgG4抗体の修飾およびその解析〕

（51-1）ヒトIgG4抗体の特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

実施例（2-2）で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物－NH S 活性化体はN，N'-ジメチルホルムアミドに溶解し4mMとした。ヒトIgG4抗体（Ray Bio tech社製）500μgを50mM酢酸ナトリウムバッファー（pH 5.5）171μLに溶解させ、4mMのペプチド試薬を8.5μL（抗体に対して10等量）加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファー（pH 2.9）に置換して反応を停止させ、さらに20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のIgG2抗体は154618にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が159130にピークが確認された。

【0954】

（51-2）ヒトIgG4抗体の特異的修飾のHIC-UPLC解析

（51-1）で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column（Waters）4.6×100mm 2.5μmを使用した。A__Buffer：0.1M PiNa，2.3M（NH₄）₂SO₄，pH7.0、B__Buffer：0.1M PiNa，pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40%→A0% B100%，16min（データ採取20min）、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280nmの波長で検出した。

【0955】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a：ヒトIgG4抗体原料

b：ヒトIgG4抗体＋ペプチドジスルフィドリンカー連結物－NH S 活性化体 10等量；

【0956】

Retention Time 10.3154分はヒトIgG4抗体原料、11.2450分はペプチドがヒトIgG4抗体に1個導入された化合物であると考えられる（図69）。

【0957】

〔実施例52：可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物（ペプチドジスルフィドリンカー連結物－NH S 活性化体）を用いたヒトIgG4抗体の修飾およびその解析〕

（52-1）ヒトIgG4抗体の特異的修飾とESI-TOFMSによる解析

実施例（43-3）で合成したペプチドジスルフィドリンカー連結物－NH S 活性化体はN，N'-ジメチルホルムアミドに溶解し4mMとした。ヒトIgG2抗体（Ray Bio tech社製）500μgを50mM酢酸ナトリウムバッファー（pH 5.5）171μLに溶解させ、4mMのペプチド試薬を8.5μL（抗体に対して10等量）加えて、室温で1時間攪拌した。反応液を100mMクエン酸ナトリウムバッファー（pH 2.9）に置換して反応を停止させ、さらに20mMPBSバッファーに置換した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のIgG2抗体は154618にピークが観測され、結合性ペプチドが二つ導入された生成物が163530にピークが確認された。

10

20

30

40

50

【0958】

(52-2) ヒトIgG4抗体の特異的修飾のHIC-UPLC解析

(52-1) で生成した抗体・ペプチド複合体と原料の抗体をHICにより解析した。カラムはProtein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6 x 100mm 2.5 μmを使用した。A_Buffer: 0.1M PiNa, 2.3M (NH₄)₂SO₄, pH7.0、B_Buffer: 0.1M PiNa, pH7.0にて流速は0.6ml/min、グラジエントをA60% B40%→A0% B100%, 16min (データ採取20min)、カラム温度は40℃、サーモスタット温度は40℃、検出器は280nmの波長で検出した。

【0959】

サンプルについては以下の条件で反応させた。

a: ヒトIgG4抗体原料

b: ヒトIgG4抗体+ペプチドジスルフィドリンカー連結物-NHS活性化体 10等量;

【0960】

Retention Time 10.3154分はヒトIgG4抗体原料、8.8645分はペプチドがヒトIgG4抗体に1個導入された化合物であると考えられる(図70)。

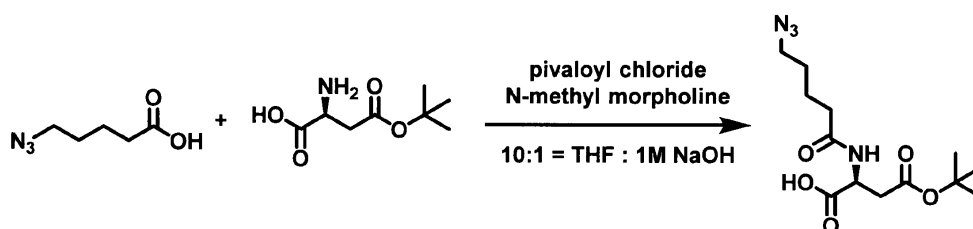
【0961】

[実施例53: (1) 切断性リンカーの合成、ならびに(2) 合成したリンカーとIgG1Fc結合性ペプチドとの連結による、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物(ペプチド-アジド修飾チオエステルリンカー連結物-NHS活性化体)の合成]

(53-1) チオエステルリンカーの合成とペプチドとの連結

(53-1-1) チオエステルリンカーの合成

【化146】

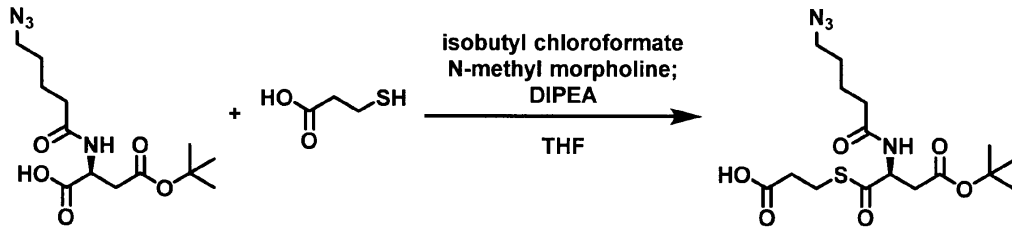


【0962】

5-アジドペンタン酸(200mg, 1.40mmol)をTHF溶媒(12mL)に溶解させ、0℃にてピバロイルクロリド(206 μL, 1.68mmol)、N-メチルモルホリン(230 μL, 2.10mmol)を加え30分攪拌し、5-アジドペンタン酸の混合酸無水物を調整した。室温にて4-(tert-ブトキシオキソ)-2-アミノブタン酸(344mg, 1.82mmol)を1M水酸化ナトリウム水溶液(1.82mL)に溶解させたのち、前述の5-アジドペンタン酸の混合酸無水物のTHF溶液を室温にて滴下した。室温にて16時間攪拌した後、6M塩酸水溶液を加え、系内のpHを3.0に調整した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水、食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え5分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより粗生成物を得たのち、カラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン:メタノール=10:1)にて精製した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することにより、4-(tert-ブトキシオキソ)-2-(5-アジドペンター1-オキソ)アミノブタン酸(320mg, 1.02mmol)を得た。

【0963】

MS (ESI) m/z : 337 $[M+Na]^+$
 [0964]
 [化147]



10

[0965]

4-(tert-ブトキシ-オキソ)-2-(5-アジドペンター-1-オキソ)アミノ-ブタン酸 (154 mg, 0.490 mmol) を THF (4.9 mL) に溶解させ、0 °C にてクロロ炭酸イソブチル (83.6 μ L, 0.637 mmol)、N-メチルモルホリン (108 μ L, 0.980 mmol) を加え 30 分攪拌し、対応する混合酸無水物を調整した。室温にてメルカプトプロピオン酸 (128 μ L, 1.47 mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (253 μ L, 1.47 mmol) を、前述の混合酸無水物の THF 溶液を室温にて滴下した。室温にて 16 時間攪拌した後、1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加え、系内の pH を 9.0 に調整した。反応液を水と酢酸エチルで洗浄し、水相を回収した。水相に 6 M 塩酸水溶液を加え、系内の pH を 3.0 に調整した後、酢酸エチルによる分液抽出を行った後、有機相を食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え 5 分静置した。フィルトレーションにより硫酸マグネシウムを取り除き、減圧下濃縮することにより、3-[4-(tert-ブトキシ-オキソ)-2-(5-アジドペンター-1-オキソ)アミノ-1-オキソ]スルファニルプロパン酸 (108 mg, 0.268 mmol) を得た。

20

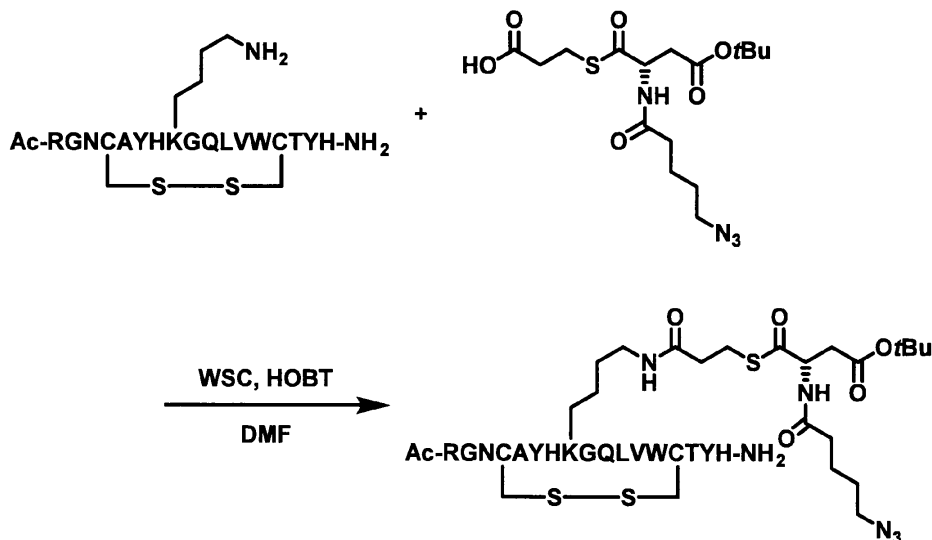
[0966]

MS (ESI) m/z : 403 $[M+H]^+$

[0967]

(53-1-2) チオエステルリンカーとペプチドの連結

[化148]



40

上記アミノ酸配列は、配列番号 39 である。

50

【0968】

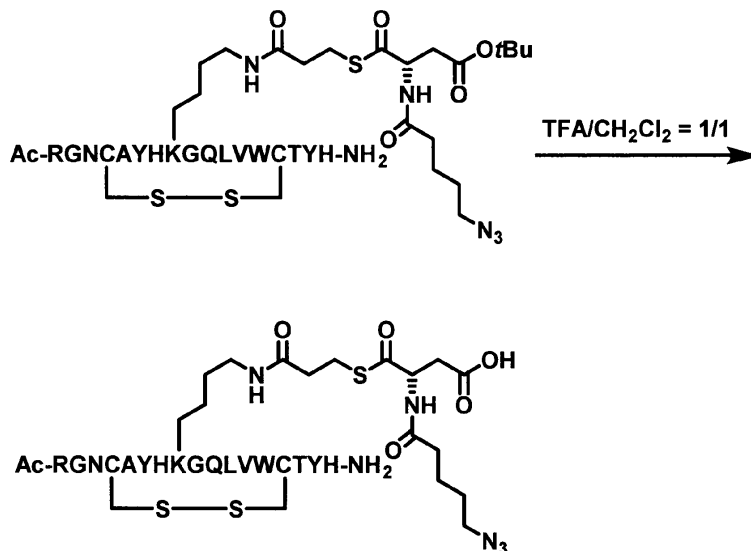
実施例1-2で合成したAc-RGNCA YHKGQLVWCT YH-NH₂（配列番号39）のペプチド（31.8mg, 15.3μmol、ただし、4番目と14番目の2つのホモシステインは、それぞれ分子内でジスルフィド結合を形成している。）をN,N'-ジメチルホルムアミド1mLに溶解し、3-[4-(tert-ブトキシーオキシ)-2-(5-アジドペンター-1-オキシ)アミノ-1-オキシ]-スルファニルプロパン酸（61.7mg, 0.153mmol）、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（29.4mg, 0.153mmol）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（10.4mg, 0.0766mmol）をDMF 1mLに溶解させ、系中に加えた。室温で2時間攪拌した後、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドリinker-結合-tBu体（2.5mg, 1.02μmol）を得た。

【0969】

MS (ESI) m/z : z = 2 1230 [M+2H]²⁺, z = 3 820 [M+3H]³⁺

【0970】

【化149】



上記アミノ酸配列は、配列番号39である。

【0971】

上記ペプチドリinker-結合物（2.5mg, 1.02μmol）をジクロロメタン0.250mL中に溶解し、トリフルオロ酢酸を0.250mL加え室温中で1時間攪拌した。減圧濃縮を行った後、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチドリinker-結合物-カルボン酸体を得た。

【0972】

MS (ESI) m/z : z = 2 1202 [M+2H]²⁺, z = 3 802 [M+3H]³⁺

【0973】

10

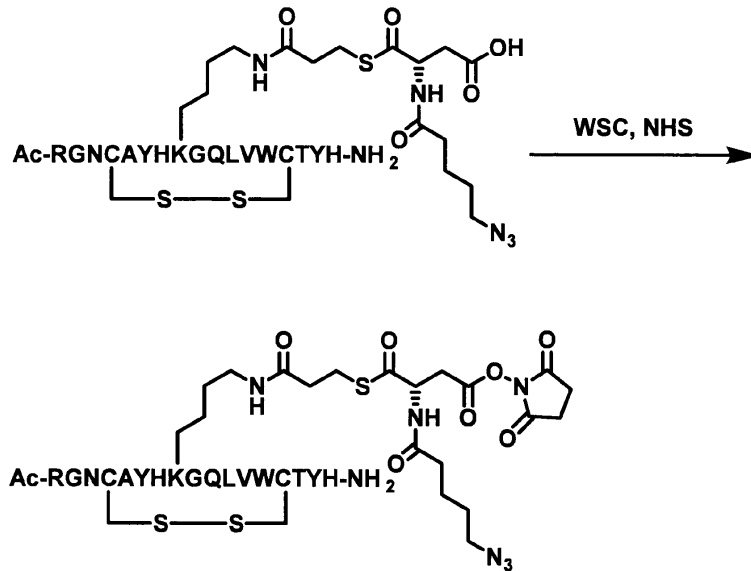
20

30

40

50

【化 1 5 0】



10

上記アミノ酸配列は、配列番号 39 である。

【0974】

20

上記ペプチドリinker連結物-カルボン酸体を N, N'-ジメチルホルムアミド 0.5 mL に溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (2.0 mg, 10.2 μmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド (1.2 mg, 10.2 μmol) をを加え 16 時間攪拌した。反応液に 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液を加え逆相分取クロマトグラフィーにより溶出した。生成物が含まれるフラクションを回収し、減圧下濃縮することによりアセトニトリルのみ除去した後、凍結乾燥を行い、上記ペプチド-アジド修飾チオエステルリンカー連結物-NHS 活性化体 (0.5 mg, 0.2 μmol) を得た。

【0975】

MS (ESI) m/z : z = 2 1251 [M + 2H]²⁺, z = 3 834 [M + 3H]³⁺

30

【0976】

[実施例 54 : 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾、ならびに ESI-TOFMS による解析]

(54-1) アジド修飾チオエステルリンカー結合性ペプチド試薬による IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾と ESI-TOFMS による解析

実施例 53 の (53-1-2) で合成したペプチド-アジド修飾チオエステルリンカー連結物-NHS 活性化体は N, N'-ジメチルホルムアミドに溶解し 4 mM とした。抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブ (中外製薬) 1.48 mg を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 4.7) 555 μL に溶解させ、4 mM のペプチド試薬を 50 μL (抗体に対して 20 等量) 加えて、室温で 1 時間攪拌し、100 mM クエン酸により反応を停止した。反応液を Amicon 10K により 9.57 mM PBS バッファー (pH 7.4) へと溶媒置換した。ESI-TOFMS により質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは 148225 にピークが観測され、生成物は結合性ペプチドが二つ導入された 153143 にピークが観測された。

40

【0977】

(54-2) 抗HER2 IgG 抗体トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件での ESI-TOFMS 解析による重鎖選択性の確認

(54-1) で生成した抗体・ペプチド複合体の PBS 溶液に 7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液 2.0 μL (抗体に対して 100 等量) を加えて、

50

室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料のトラスツズマブは50595, 50757に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖に結合性ペプチドが導入された52981および53143にピークが観測され、原料と同じ23440に軽鎖ピークが観測された。

【0978】

(54-3) チオエステルリンカーの切断とESI-TOFMSによる解析

任意のバッファー (pH 4.5 ~ pH 9.0) に、(54-1) で合成した抗体・ペプチドチオエステルリンカー複合体を溶解し、ヒドロキシルアミン水溶液を加え室温で攪拌することで、チオエステル構造が加水分解し、アジド基が抗体上に残る。これをESI-TOFMSにより質量を測定することができる。

10

【0979】

(54-4) トラスツズマブ・ペプチド複合体のリンカー切断、および生成物のESI-TOFMSによる解析

まず、(54-1) で合成したトラスツズマブ・ペプチド複合体120 μ gを0.5 M ヒドロキシルアミン水溶液 (0.5 M ヒドロキシルアミン、9.56 mM のPBS、4.8 g/mL のEDTAを純水に溶解させた水溶液 (pH 7.2)) に溶解し、室温で攪拌して、リンカー中のチオエステル結合を切断した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、生成物はアジドが二つ導入された148469にピークが観測された。

【0980】

(54-5) トラスツズマブの特異的修飾体の還元条件でのESI-TOFMS解析による重鎖選択性の確認

20

(54-4) で生成した抗体・ペプチド複合体に7 mM トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩溶液2.0 μ L (抗体に対して100等量) を加えて、室温で20分攪拌した。ESI-TOFMSにより質量を測定したところ、原料の抗体・ペプチド複合体は52981, および53143に重鎖ピーク、23440に軽鎖ピークが観測され、生成物は重鎖にアジドが導入された50836および50999にピークが観測され、原料と同じ23440に軽鎖ピークが観測された。

【0981】

(まとめ)

以上の結果をまとめると、以下のとおりである。

30

【0982】

40

50

【表 2】

表 2. 親和性ペプチドのまとめ

アミノ酸配列	配列番号	実施例
RGNCAYHKGQLVWCTYH	5 1	1 ~ 1 5
RGNCKYHRGQLVWCTYH	5 4	1 6
RGNCAWHRGKLVWCTYH	5 5	1 7
RGNCKWHRGELVWCTYH	5 6	1 8
RGNCKWHRGQLVWCTYH	5 7	1 9
RGNCKYHLGELVWCTYH	5 8	2 0
RGNCKYHLGQLVWCTYH	5 9	2 1
DCKWHLGELVWCT	6 0	2 2
DCKYHLGELVWCT	6 1	2 3
DCKWHRGELVWCT	6 2	2 4
DCKWHLGQLVWCT	6 3	2 5
DCKYHRGELVWCT	6 4	2 6
DCKYHLGQLVWCT	6 5	2 7
DCKWHRGQLVWCT	6 6	2 8
DCKYHRGQLVWCT	6 7	2 9
RGNCAWHLGQLVWCKYH	6 8	3 0
RGNCAWHLGELVWCKYH	6 9	3 1
RGNCAYHLGQLVWCTKH	7 0	3 2
RGNCAYHLGQLVWCTYK	7 1	3 3
RGNCAYHRGQLVWCTKH	7 2	3 4
KNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	7 3	3 5
FNMQCQKRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	7 4	3 6
FNMQCQRRFYEAHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	7 5	3 7
FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQKARIRSIRDDC	7 6	3 8
FNMQCQRRFYALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC	7 7	3 9
FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC	8 0	4 1
FNKQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	8 2	4 3
FNMQCRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	8 3	4 5
FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC	8 4	4 7

【0983】

また、抗体について、246位及び／又は248位のリジン残基（例、実施例8、15、44、46）、288位及び／又は290位のリジン残基（例、実施例42、実施例48）、317位のリジン残基（例、実施例40）を始めとする特定のアミノ酸残基の位置選択的な修飾が可能であることが示された。

【0984】

さらに、下記式（I）で表される、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する下記の化合物について、実施例の一部を例に挙げて説明すると以下の表3のとおりである。

A - L - B - R (I)

〔式中、

Aは、可溶性タンパク質に対する親和性物質であり、

Lは、切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーであり、

Bは、(a)生体直交性官能基を含む2価の基、または(b)生体直交性官能基を含まない2価の基であり、

Rは、前記可溶性タンパク質に対する反応性基である。〕

Lは、(i)切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有する切断性部分を含む2価の基である切断性リンカー、または(ii)切断により生体直交性官能基を反応性基側に生成する能力を有しない切断性部分を含む2価の基である切断性リンカーである。

【0985】

10

20

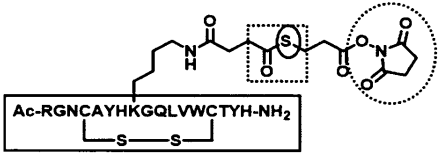
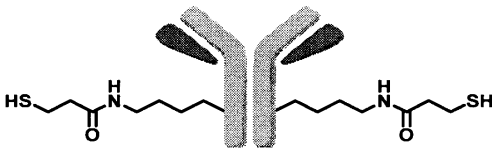
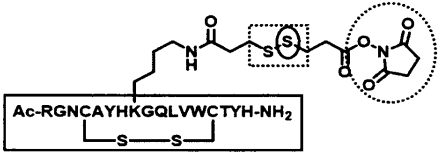
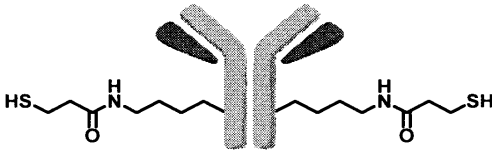
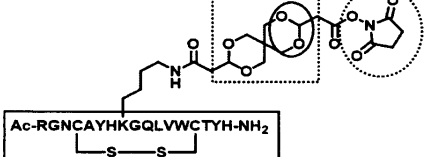
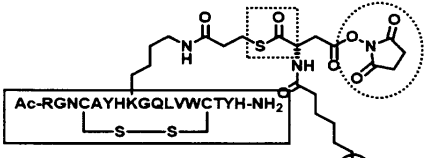
30

40

50

【表 3】

表 3. 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）との関係（その 1）

実施例	化合物の具体的構造	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）*
2-1	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	
2-2	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	
2-3	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	
11-1	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	

*抗体から伸びているNH-C 4 アルキル部分は、抗体のリジン残基側鎖に由来する（以下同様）

【0 9 8 6】

10

20

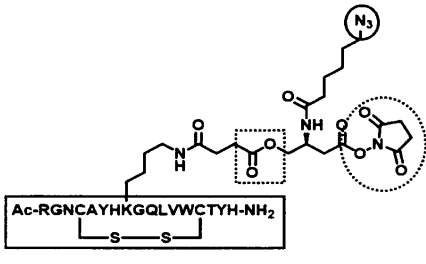
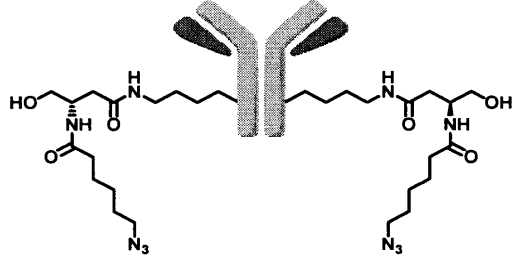
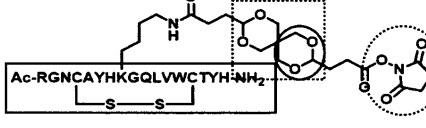
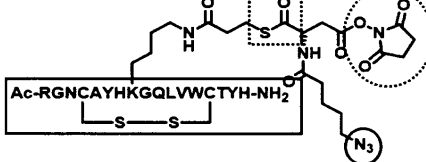
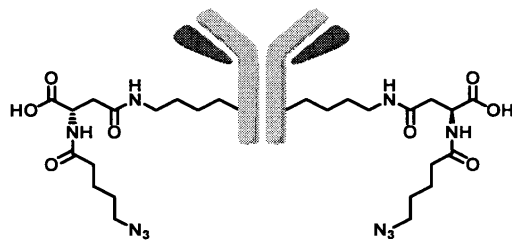
30

40

50

【表 4】

表 4. 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）との関係（その 2）

実施例	化合物の具体的構造	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）*
11-2	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	
11-3	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	
53	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	

【0987】

可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する種々の化合物は、上述のように、可溶性タンパク質に対する親和性物質（A）、切断性部分を含む 2 価の基である切断性リンカー（L）、（a）生体直交性官能基を含む 2 価の基、または（b）生体直交性官能基を含まない 2 価の基（B）、可溶性タンパク質に対する反応性基（R）の種類を適宜変更することにより、周知の有機合成方法にしたがって調製することができる。本発明において調製することができる、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物のさらなる例と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）との関係は、以下のとおりである。

【0988】

10

20

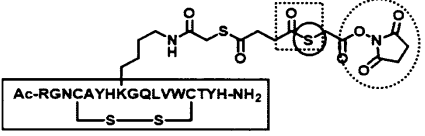
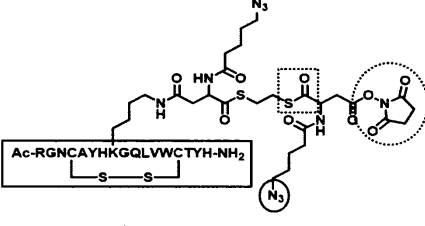
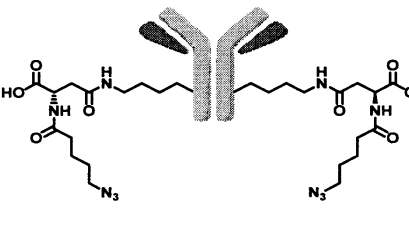
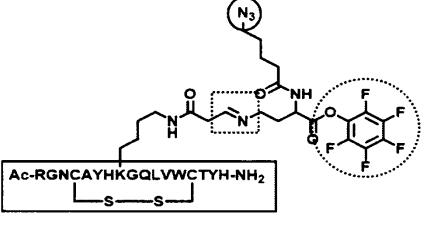
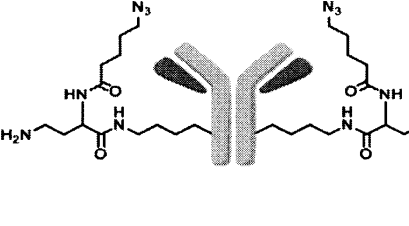
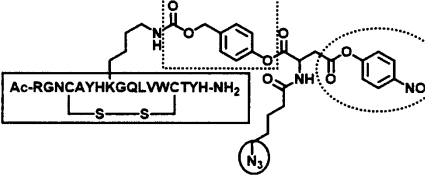
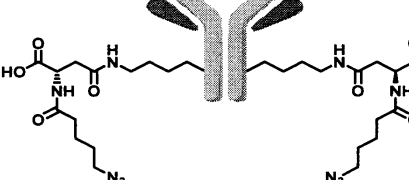
30

40

50

【表 5】

表 5. 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物のさらなる例と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）との関係（その 1）

実施例	化合物の具体的構造 : 親和性物質(A) : 切断性部分(L中) : 生体直交性官能基 B(a)またはL(ii) : 反応性基(R)	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）*
55	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	
56	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	
57	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	
58	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	

【 0 9 8 9 】

10

20

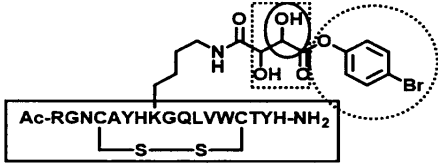
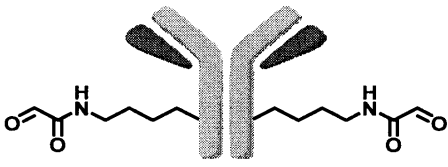
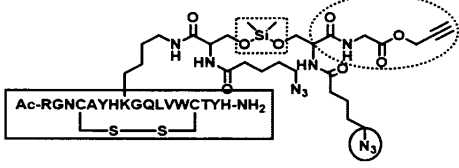
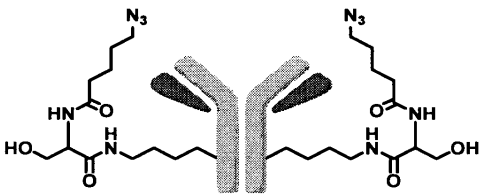
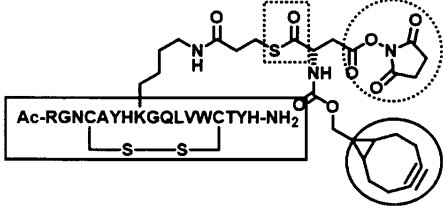
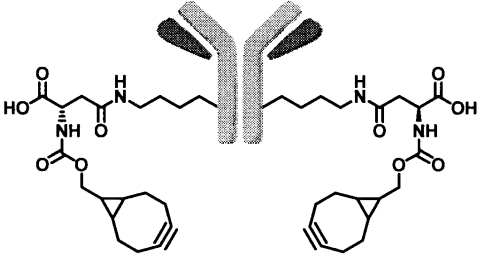
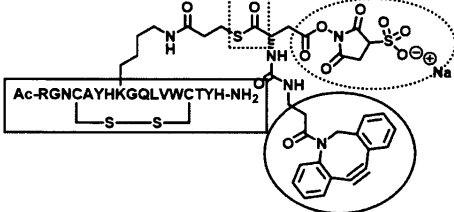
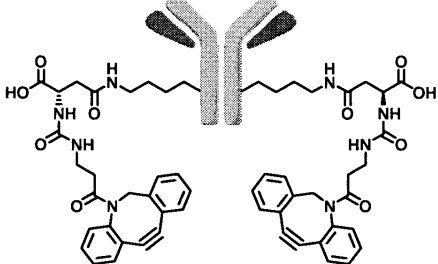
30

40

50

【表 6】

表 6. 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物のさらなる例と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）との関係（その 2）

実施例	化合物の具体的構造	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）*
59	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	
60	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	
61	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	
62	 上記アミノ酸配列：配列番号 5 1	

【0990】

10

20

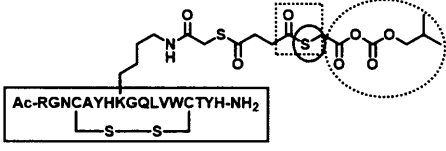
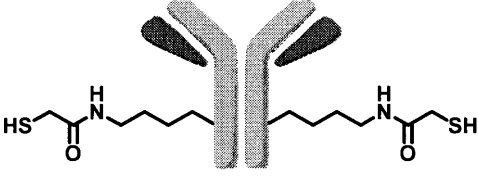
30

40

50

【表 7】

表 7. 可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物のさらなる例と、それにより製造することができる生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）との関係（その 3）

実施例	化合物の具体的構造 □ : 親和性物質 (A) □ : 切断性部分 (L 中) ○ : 生体直交性官能基 B (a) または L (ii) ○ : 反応性基 (R)	左化合物を用いて製造することができる、生体直交性官能基を有する可溶性タンパク質（抗体）*
63	 記アミノ酸配列：配列番号 5 1	

【0991】

以上より、可溶性タンパク質に対する親和性物質、切断性部分および反応性基を有する化合物において、親和性物質の種類、親和性物質と反応性基との間のリンカーの長さ、およびリンカーが導入される親和性物質中の位置等の因子を適宜調節することにより、抗体を位置選択的に修飾できることが示された。

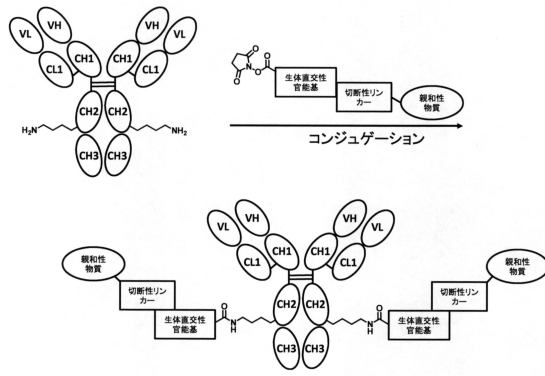
【産業上の利用可能性】

【0992】

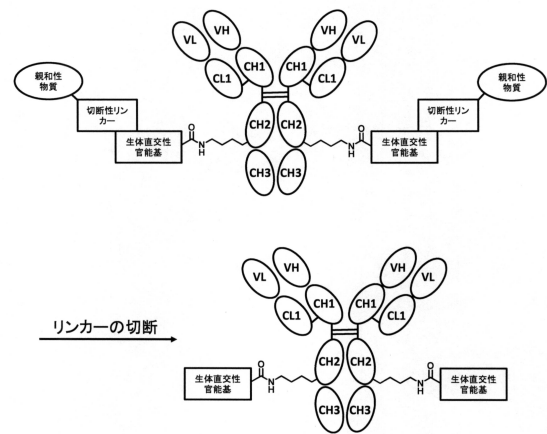
本発明は、例えば、位置選択的に修飾された可溶性タンパク質の製造に有用である。

【図面】

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】



10

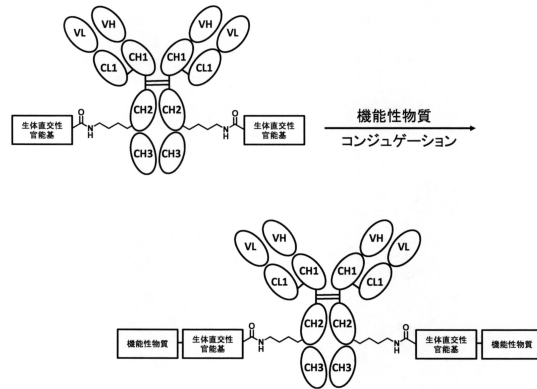
20

30

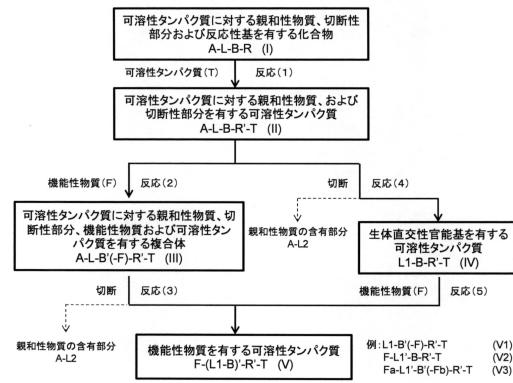
40

50

【図 1 - 3】



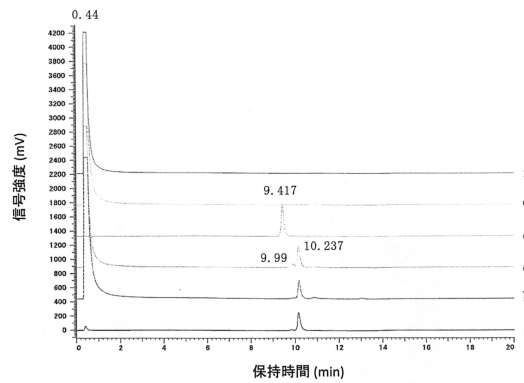
【図 2】



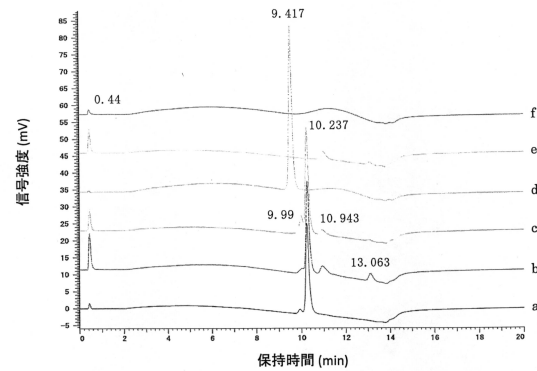
10

20

【図 3】



【図 4】

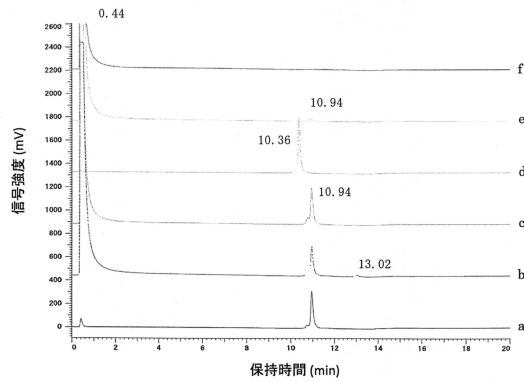


30

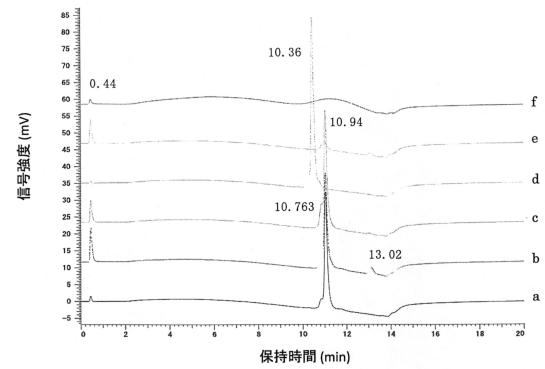
40

50

【図 5】



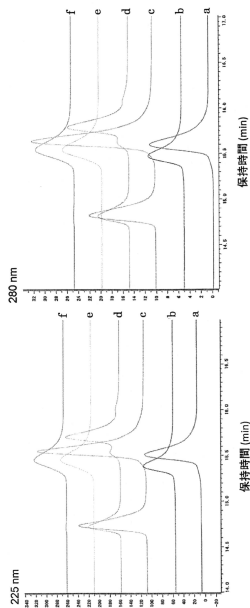
【図 6】



10

20

【図 7】



【図 8】

(1) 糖鎖をPNGaseで切断したトラスツズマブの重鎖のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
PGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY
LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVTS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LSDSGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVMSHEALHNHYT
QKSLSLSPG (配列番号2)

30

(2) 糖鎖をPNGaseで切断したIgG1 Fc領域のアミノ酸配列

IEGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPPKDIT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVSCFVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列
番号3)

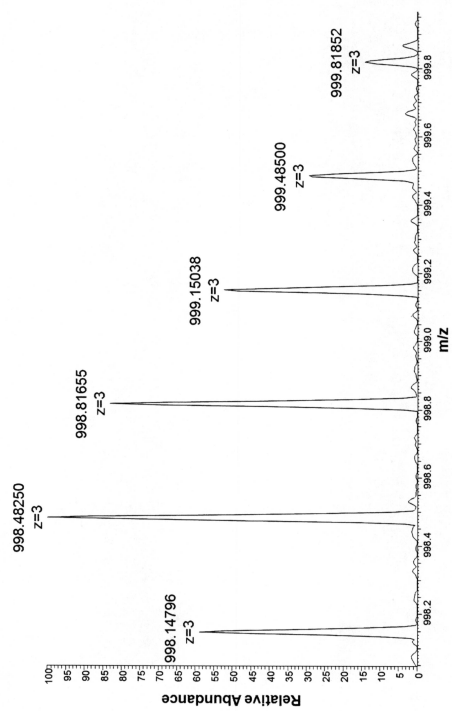
40

(3) トラスツズマブの軽鎖のアミノ酸配列

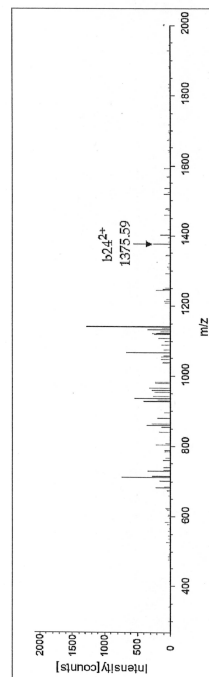
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPK
GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTITSSLPQ
EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (配列番号4)

50

【図 9】



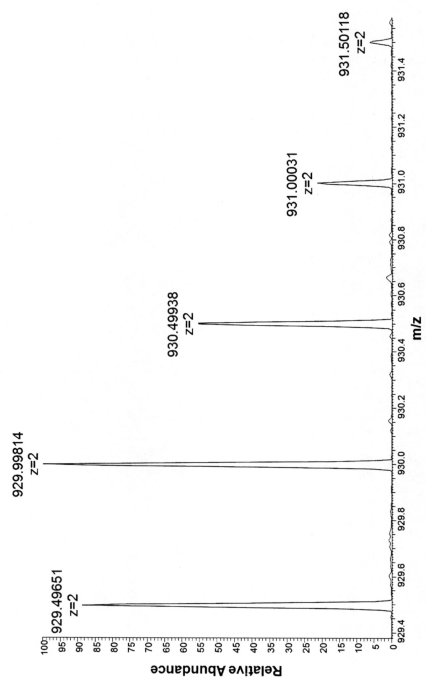
【図 10】



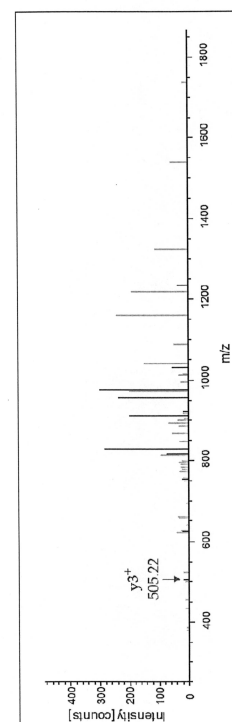
10

20

【図 11】



【図 12】

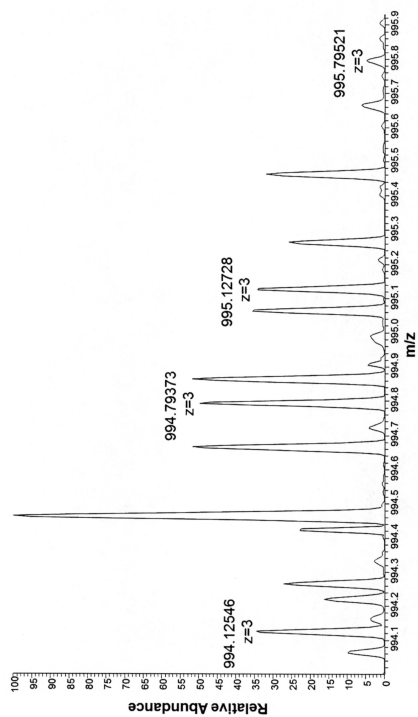


30

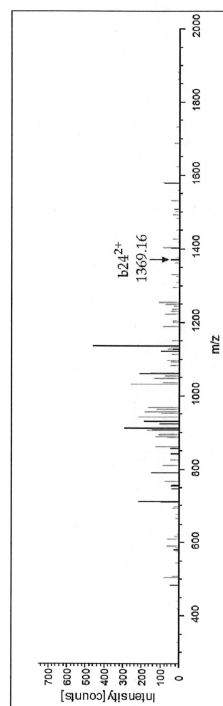
40

50

【図 1 3】



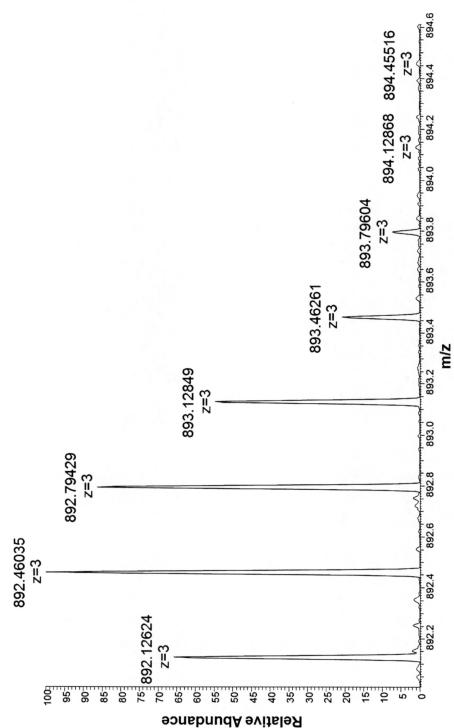
【図 1 4】



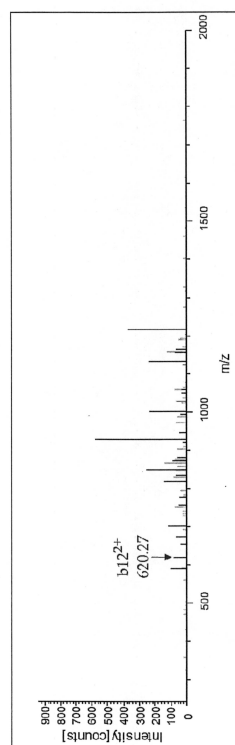
10

20

【図 1 5】



【図 1 6】



30

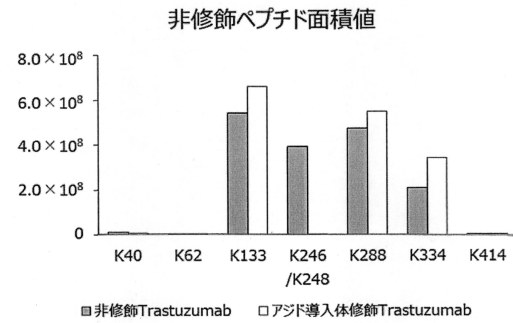
40

50

【圖 2 1】

#	b^*	$b^{\dagger}$	b°	Seq.	y^*	$y^{\dagger}$	y°
1	102.05486	51.53112	34.68884	26.26320	1907.46796	1271.90059	954.27956
2	238.11307	120.06657	88.37614	60.53392	1828.33839	1252.29465	959.87263
3	400.81595	170.58441	116.02920	95.79594	1768.11455	1152.61213	984.71091
4	500.32240	209.55974	141.00570	125.80051	1708.39523	1048.70285	1014.20028
5	537.44407	238.12612	159.57317	150.00670	1651.79118	958.30598	1047.00285
6	562.23774	261.42621	174.32689	174.32689	1603.62284	868.74406	1084.40008
7	578.44040	280.10410	187.50000	198.75000	1568.39523	785.30598	1124.20028
8	591.30115	295.19422	201.79667	223.19333	1534.11455	702.21021	1164.71091
9	602.11028	311.72726	216.30003	247.30003	1501.19333	619.11455	1204.71091
10	611.47105	329.23817	231.82674	271.82674	1468.20400	536.02080	1244.71091
11	618.51365	348.02947	247.84624	301.88387	1436.23810	453.02080	1284.71091
12	623.18572	367.30250	264.45243	331.15468	1406.26862	370.02080	1324.71091
13	625.68179	387.64554	282.42592	361.42592	1378.29595	287.02080	1364.71091
14	626.37036	408.73527	301.23643	391.68127	1352.31938	204.02080	1404.71091
15	625.74637	430.98501	321.26657	421.93664	1328.33839	121.02080	1444.71091
16	618.77590	454.30229	342.30239	452.19383	1306.35791	48.02080	1484.71091
17	617.28953	478.50044	363.30003	482.35784	1286.37743	25.02080	1524.71091
18	610.16795	504.42632	384.30000	512.42000	1268.39523	2.02080	1564.71091
19	602.00000	531.00000	405.30000	542.30000	1252.41021	0.02080	1604.71091
20	592.02044	558.00000	426.30000	572.30000	1238.42521	0.02080	1644.71091
21	579.08885	586.00000	447.30000	602.30000	1225.44021	0.02080	1684.71091
22	573.61519	618.57946	468.30000	632.30000	1213.45521	0.02080	1724.71091
23	574.20440	652.12710	489.30000	662.30000	1202.47021	0.02080	1764.71091
24	582.40147	684.20433	509.30000	692.30000	1192.48521	0.02080	1804.71091
25	592.45414	717.73071	530.30000	722.30000	1183.50021	0.02080	1844.71091
26	580.54541	750.70287	550.30000	752.30000	1175.51521	0.02080	1884.71091
27	559.57066	784.21617	569.30000	782.30000	1168.53021	0.02080	1924.71091
28	538.62324	818.25195	588.30000	812.30000	1162.54521	0.02080	1964.71091
29	528.67681	852.30000	607.30000	842.30000	1157.56021	0.02080	2004.71091
30	540.70781	886.34785	626.30000	872.30000	1153.57521	0.02080	2044.71091
31	563.83238	920.39570	645.30000	902.30000	1150.59021	0.02080	2084.71091
32	602.00000	954.44355	664.30000	932.30000	1148.60521	0.02080	2124.71091
33	654.27956	988.49140	683.30000	962.30000	1147.62021	0.02080	2164.71091

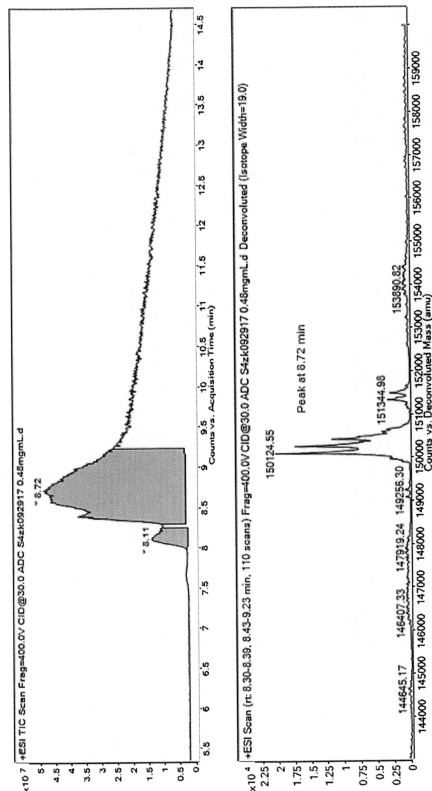
【圖 22】



10

20

【圖 23】



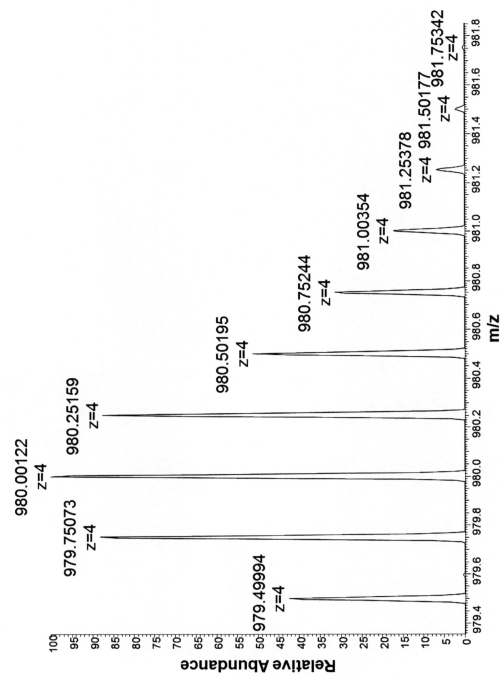
【圖 24】

- (1) > Trastuzumab Light chain
- ```
DIQMTGPSSS LSAISGVDRVT ITCRASQDWN TAVAWYQKPK GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
RFGSRSRGTD FLTILTSILNP EDFATYVQKQ HYTLPTPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
PDEALKSGTA SVVCLLANP PRAEYKVVQW DNTALGSNGS ESVTBQKSTV SYTSLSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHG LSSPVTIKSN RGEK
```
- (配列番号 4)
- (2) > Trastuzumab Heavy chain
- ```
EVQLVGGSGG LVPGQGSRLR SCAASGSPNIK DTYIHWVRQA PGKLEWAVR IYPTNGYTRY
ADSVKGRGFTI SADSNTKRAY LQMNLSRAED TAVVYCSRWG GDGFYAMVWR GGGTLVTYSS
ASTKGSPVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLGSS
GLYLSYSSVPT VPSSSLGTQT YICNVNHPKS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
PSVFLPFPPK KDTLMSIRTP EYTCVVDVDS HEDPEKVFNM YVDGVEVHNA KCPFREEQYD
STRYRVSVLT VLHQDWLWNG EYKCYKVSNA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRRE
MTKNQVSLTCL LVKGFYPSDI AVEWESNGPG ENNYKTPFPV LDSGGSFPLY SKLTVDSKRW
QQGNVFCSPV MHEALNHHYT QKSLSLSPG
```
- (配列番号 5)
- (3) > Trastuzumab Heavy chain (N300D)
- ```
EVQLVGGSGG LVPGQGSRLR SCAASGSPNIK DTYIHWVRQA PGKLEWAVR IYPTNGYTRY
ADSVKGRGFTI SADSNTKRAY LQMNLSRAED TAVVYCSRWG GDGFYAMVWR GGGTLVTYSS
ASTKGSPVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLGSS
GLYLSYSSVPT VPSSSLGTQT YICNVNHPKS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
PSVFLPFPPK KDTLMSIRTP EYTCVVDVDS HEDPEKVFNM YVDGVEVHNA KCPFREEQYD
STRYRVSVLT VLHQDWLWNG EYKCYKVSNA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRRE
MTKNQVSLTCL LVKGFYPSDI AVEWESNGPG ENNYKTPFPV LDSGGSFPLY SKLTVDSKRW
QQGNVFCSPV MHEALNHHYT QKSLSLSPG
```
- (配列番号 2)

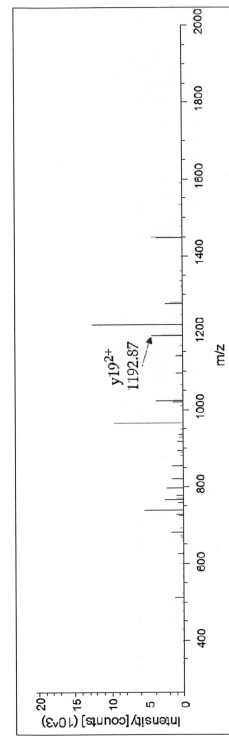
30

40

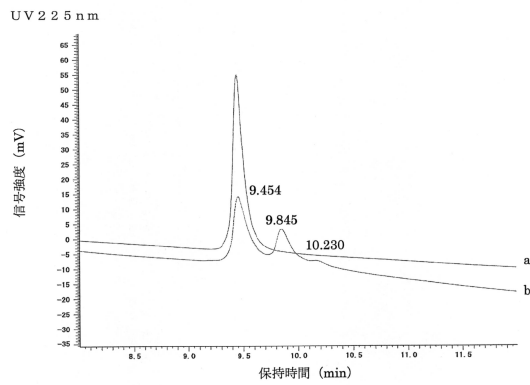
【図 2 5】



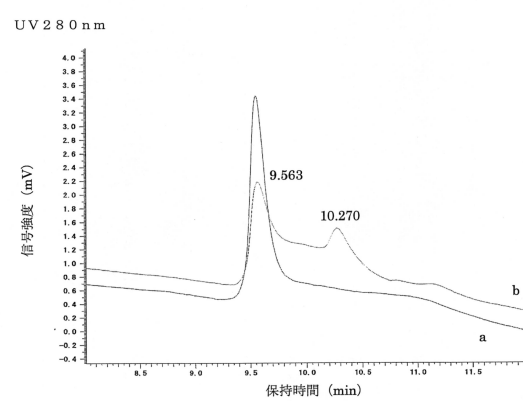
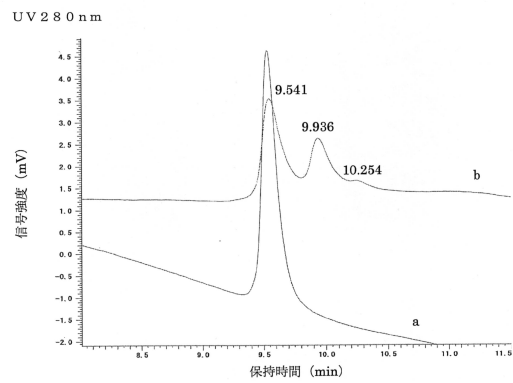
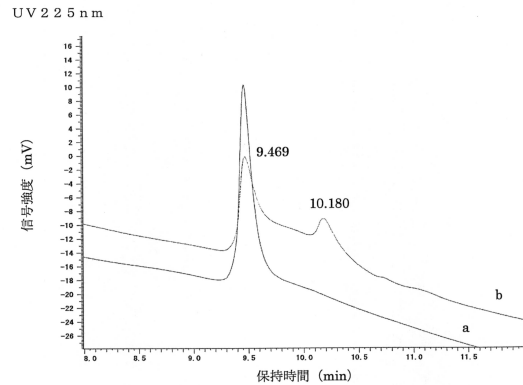
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

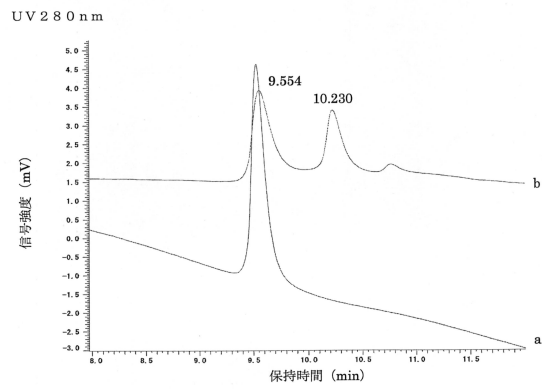
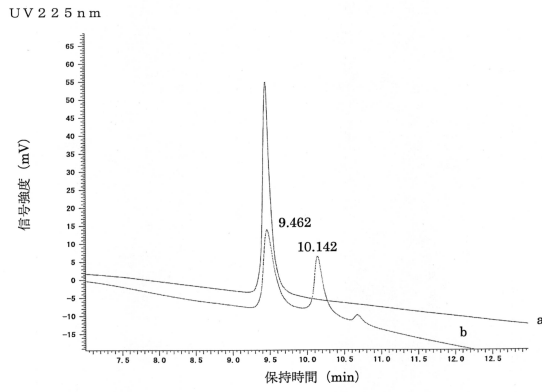
20

30

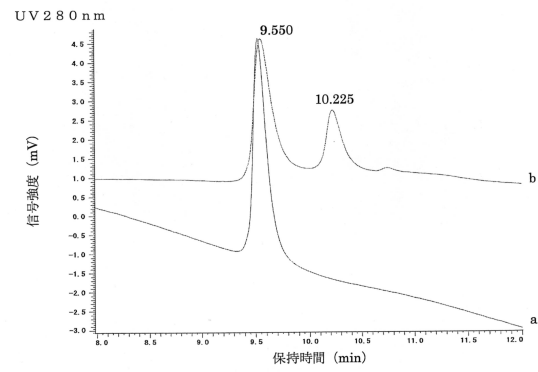
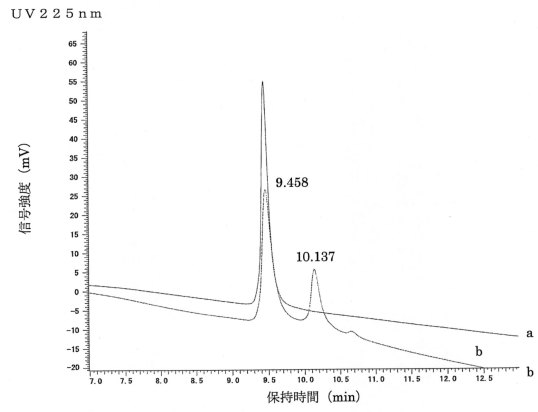
40

50

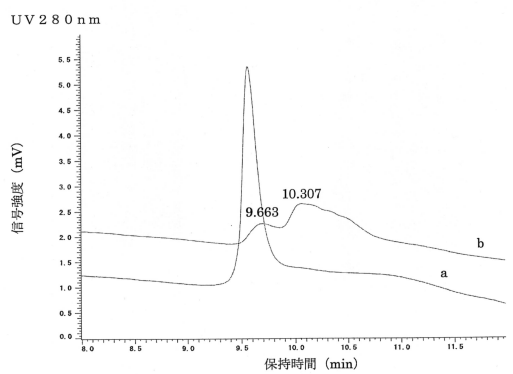
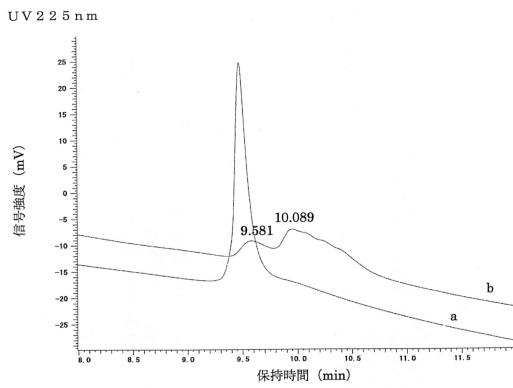
【図 29】



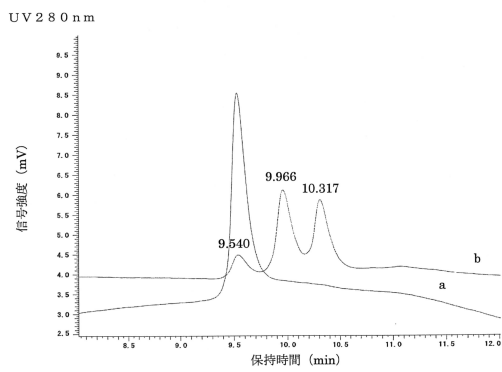
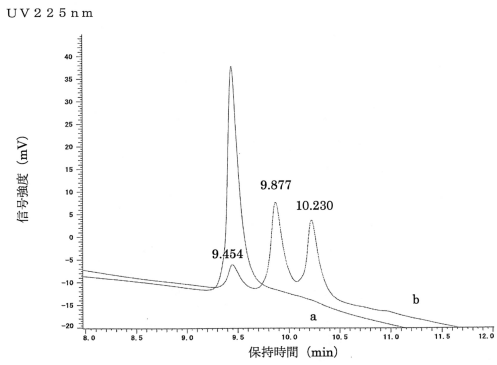
【図 30】



【図 31】



【図 32】



10

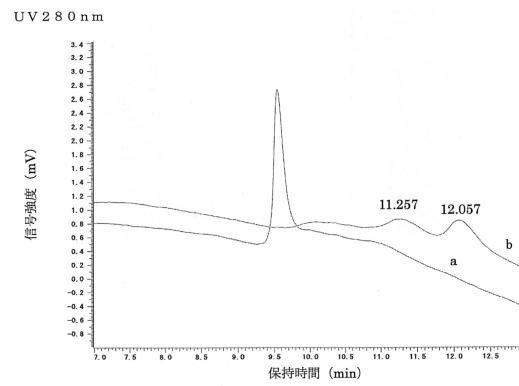
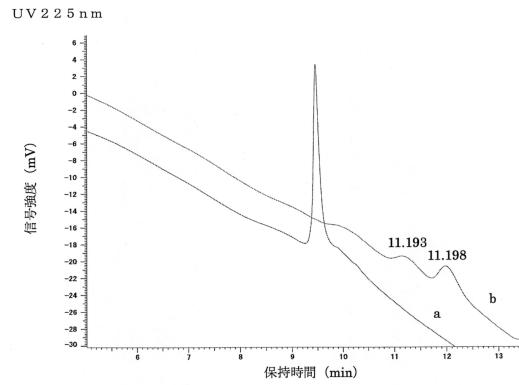
20

30

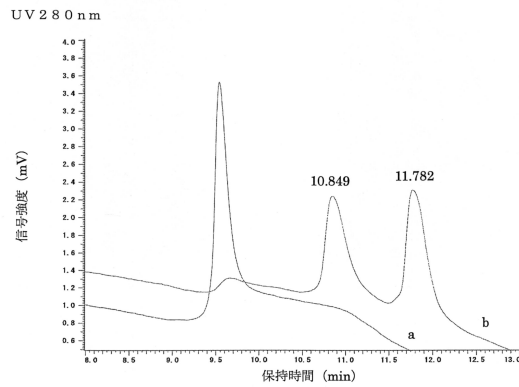
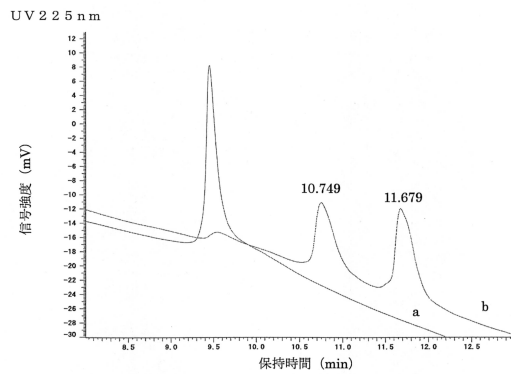
40

50

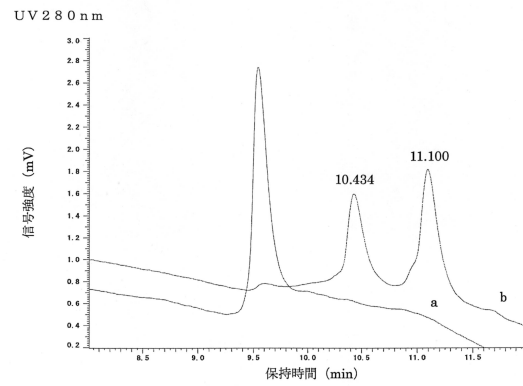
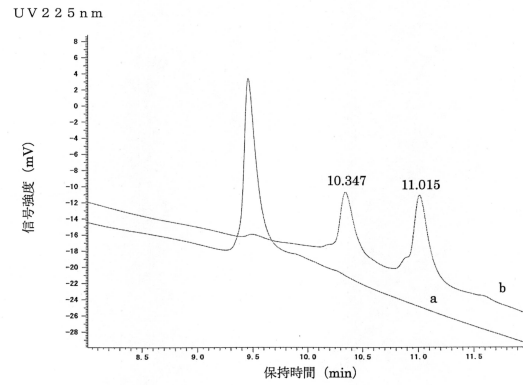
【図 3 3】



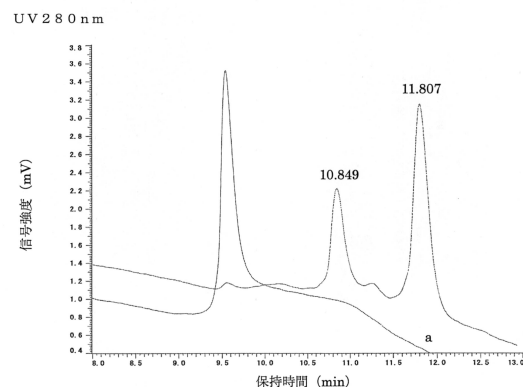
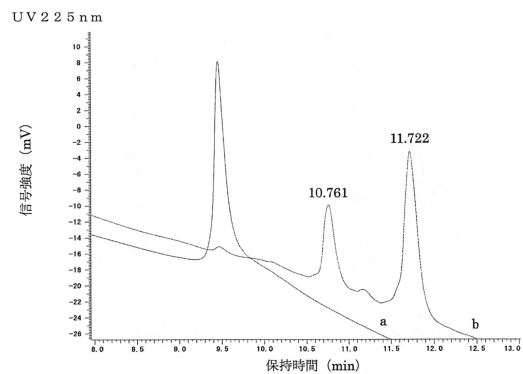
【図 3 5】



【図 3 4】



【図 3 6】



10

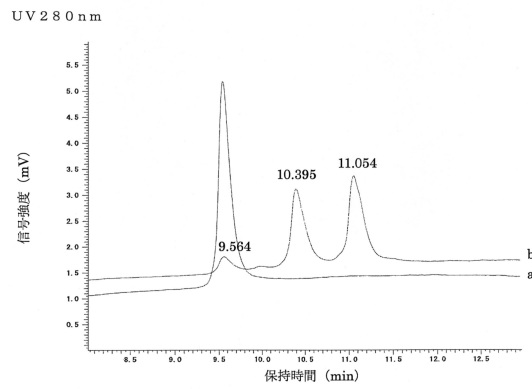
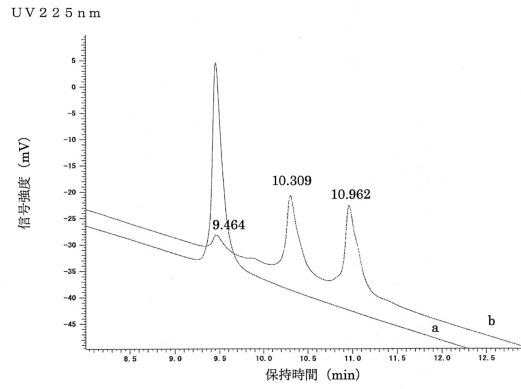
20

30

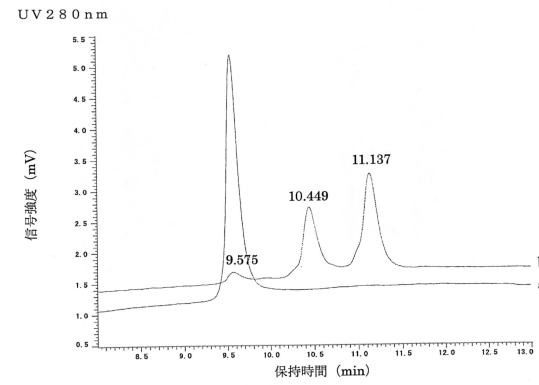
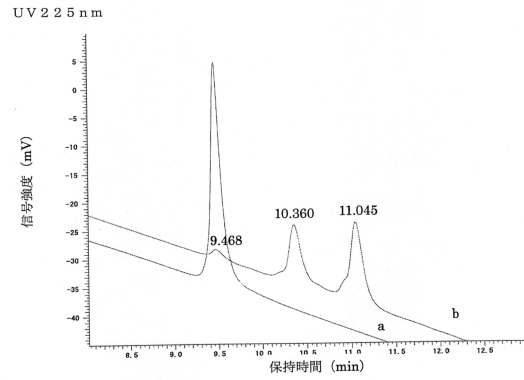
40

50

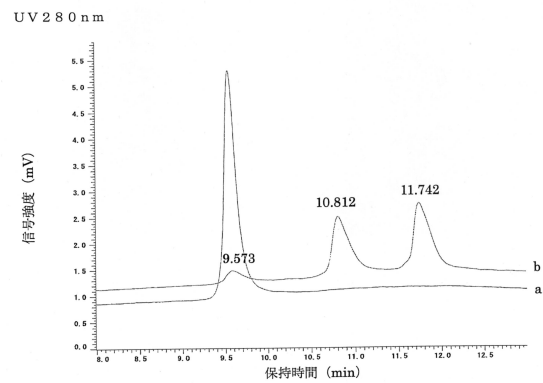
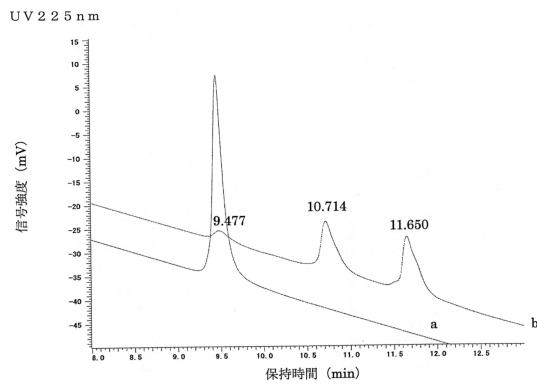
【図 3 7】



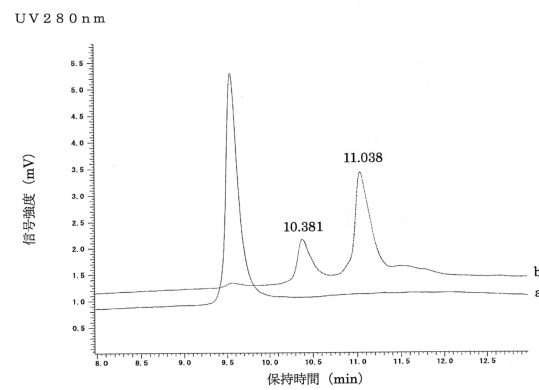
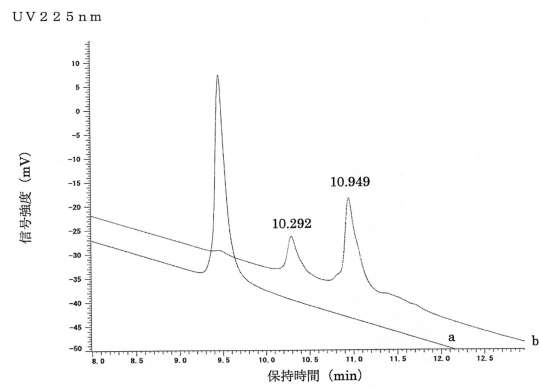
【図 3 8】



【図 3 9】



【図 4 0】



10

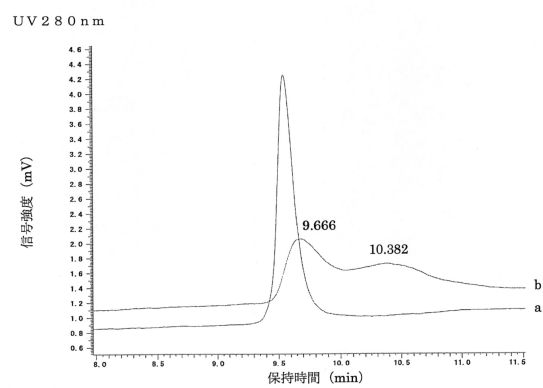
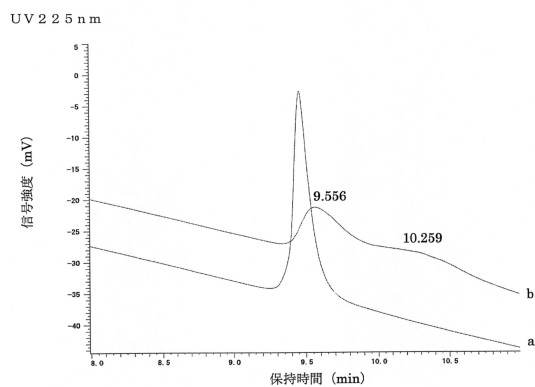
20

30

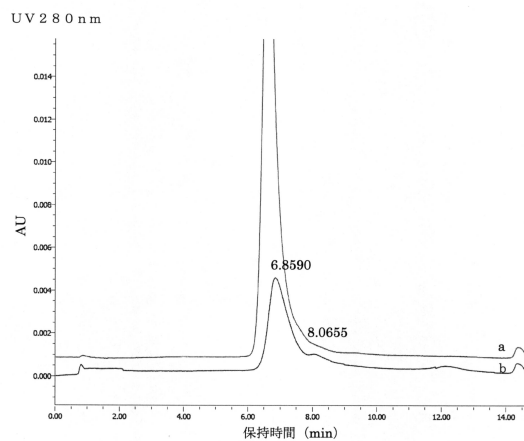
40

50

【図 4 1】



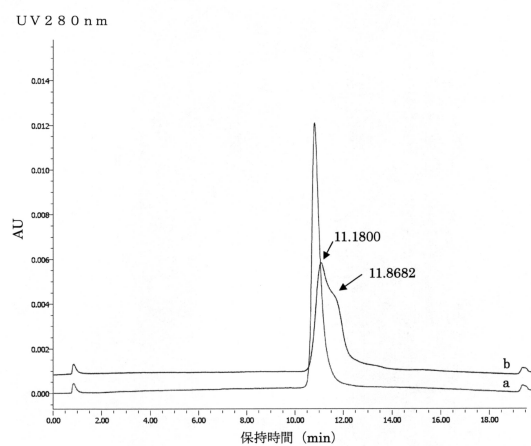
【図 4 2】



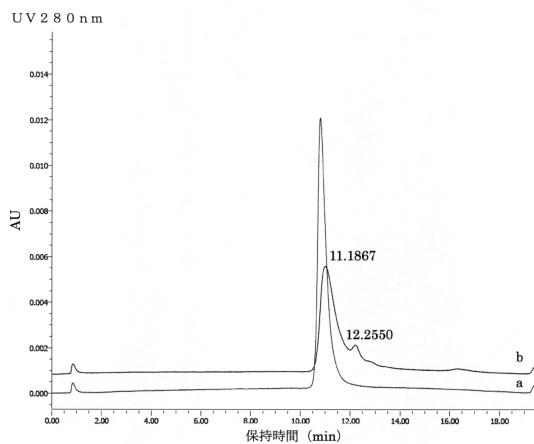
10

20

【図 4 3】



【図 4 4】

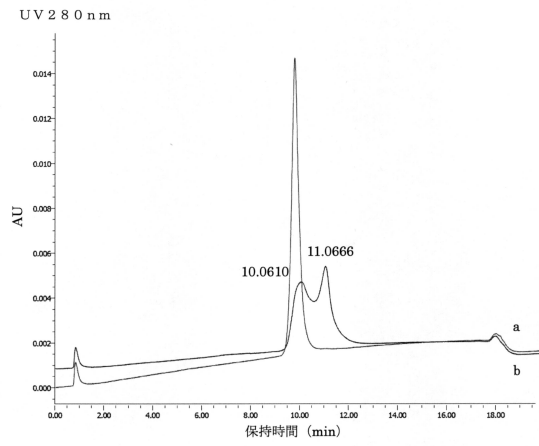


30

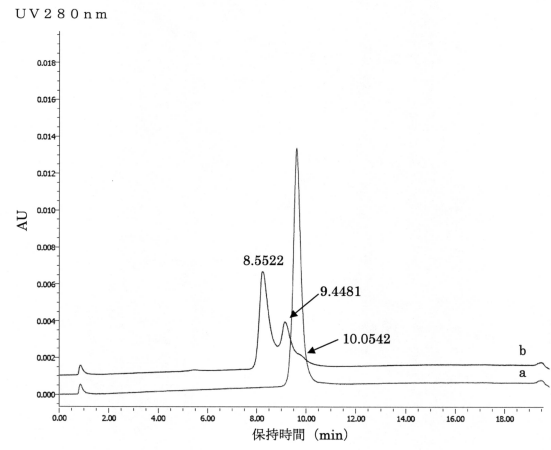
40

50

【図 4 5】



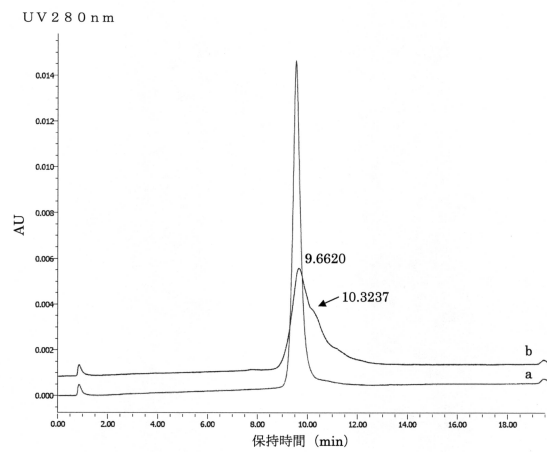
【図 4 6】



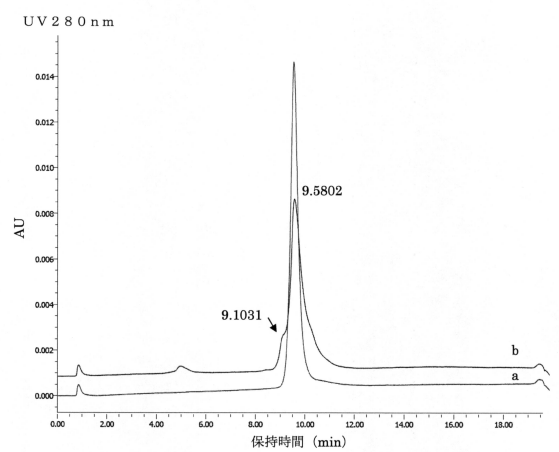
10

20

【図 4 7】



【図 4 8】

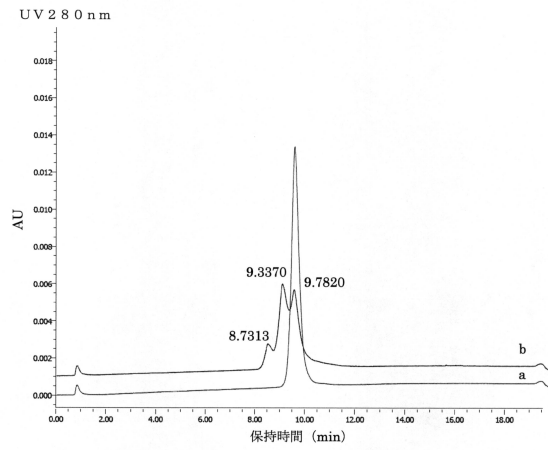


30

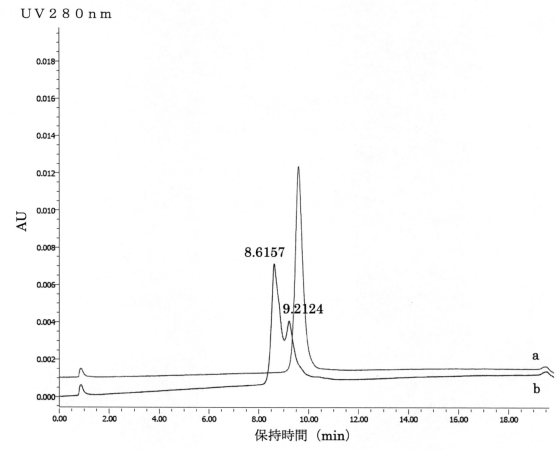
40

50

【図 4 9】



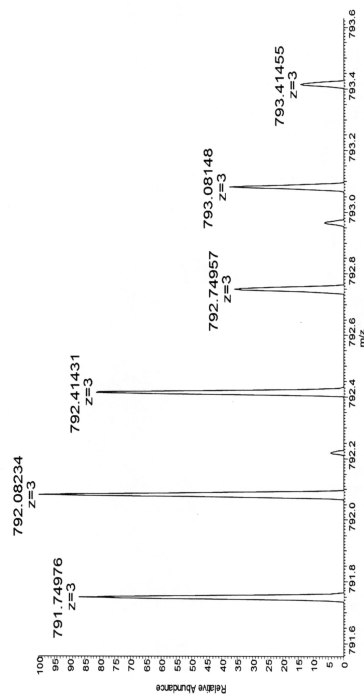
【図 5 0】



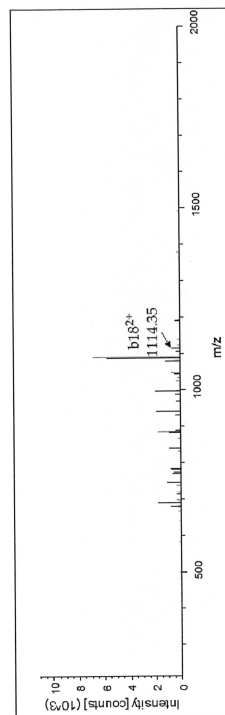
10

20

【図 5 1】



【図 5 2】

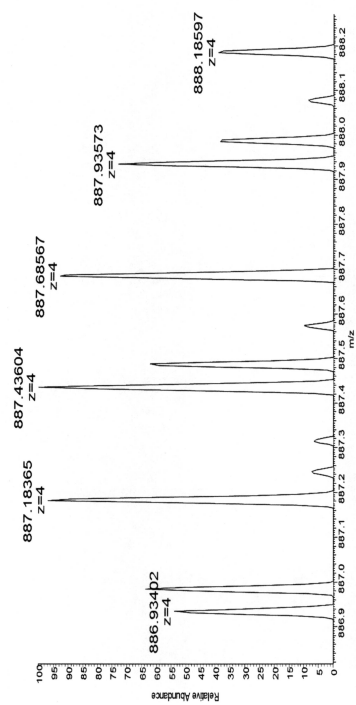


30

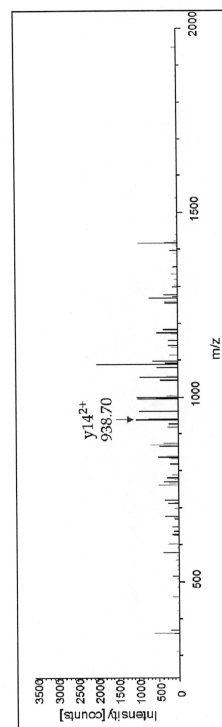
40

50

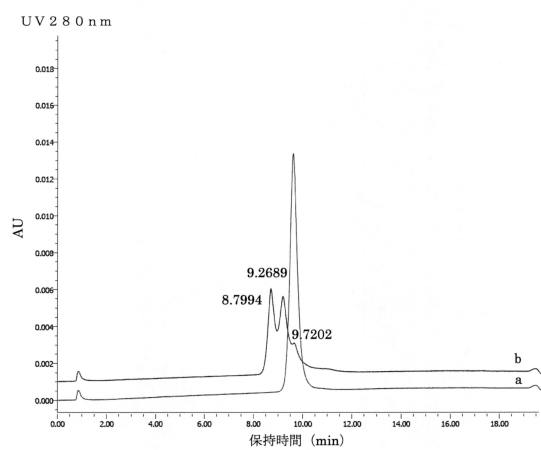
【図 5 3】



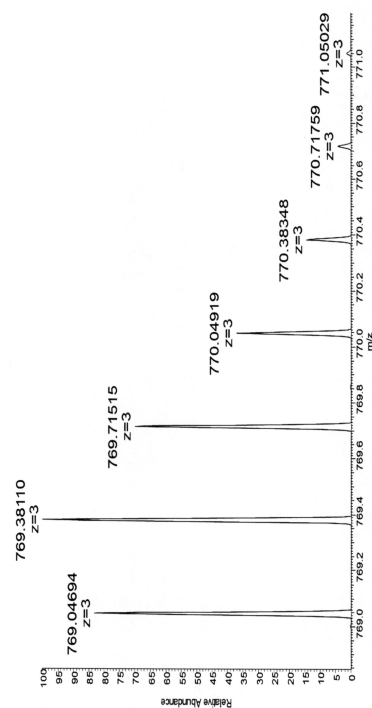
【図 5 4】



【図 5 5】



【図 5 6】



10

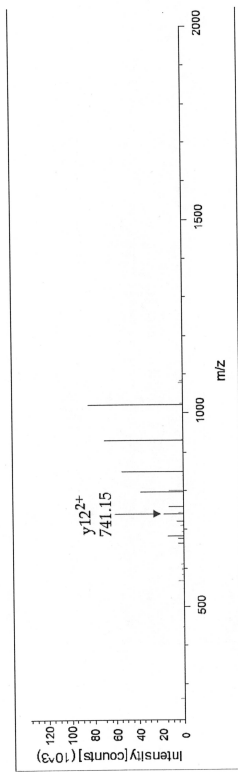
20

30

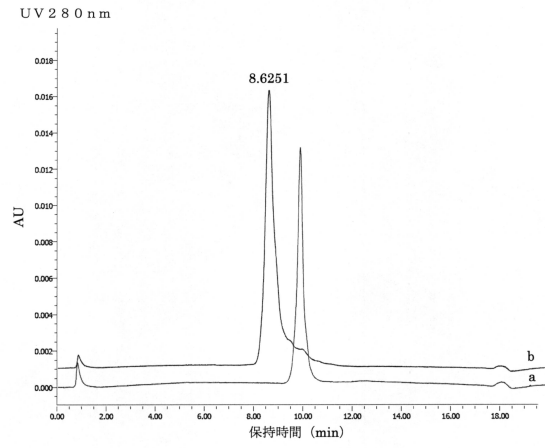
40

50

【図 5 7】



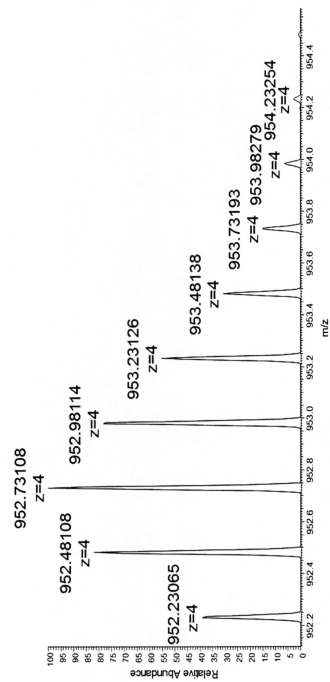
【図 5 8】



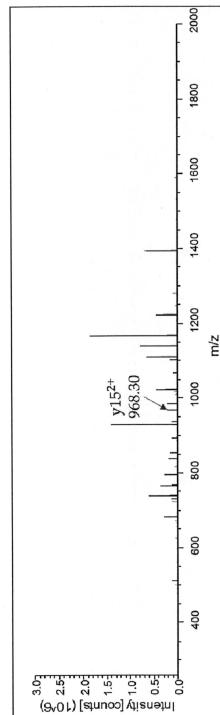
10

20

【図 5 9】



【図 6 0】

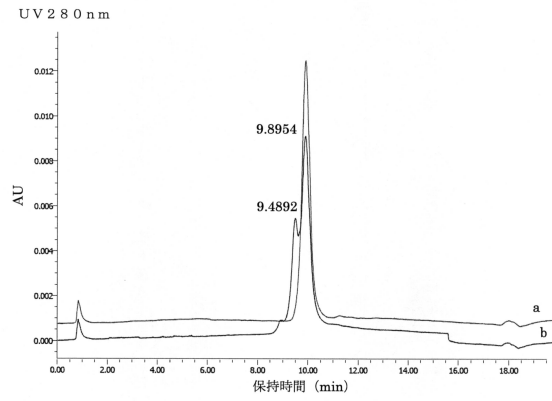


30

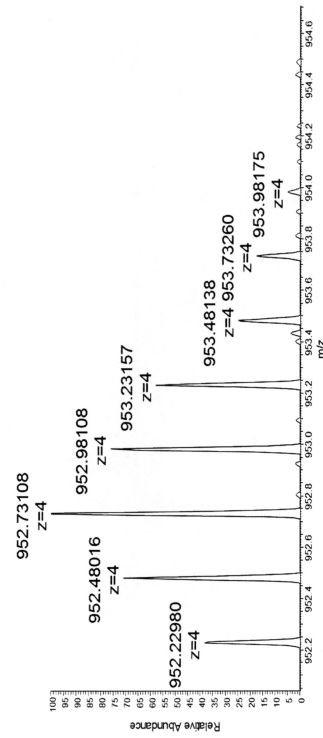
40

50

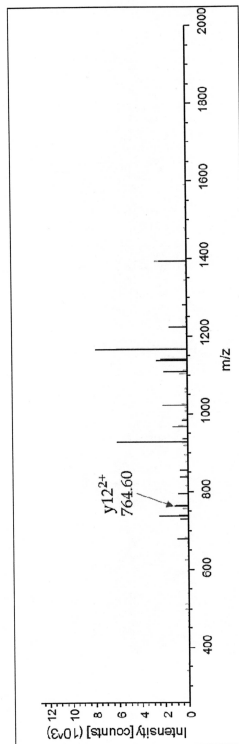
【図 6 1】



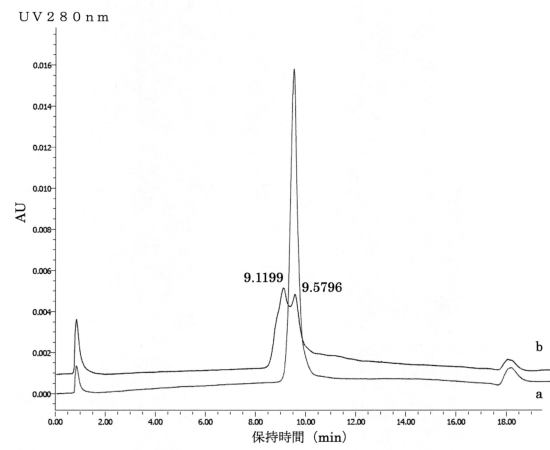
【図 6 2】



【図 6 3】



【図 6 4】



10

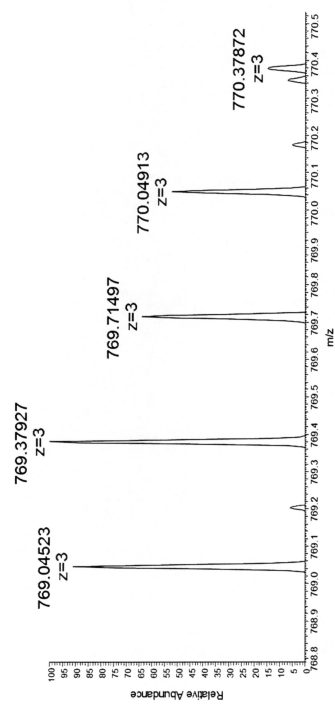
20

30

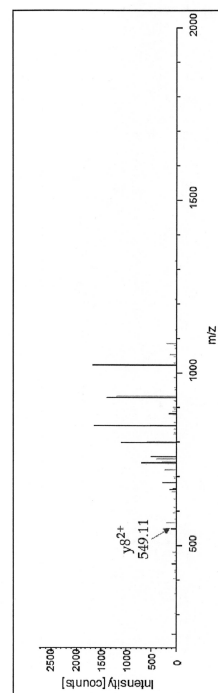
40

50

【図 6 5】



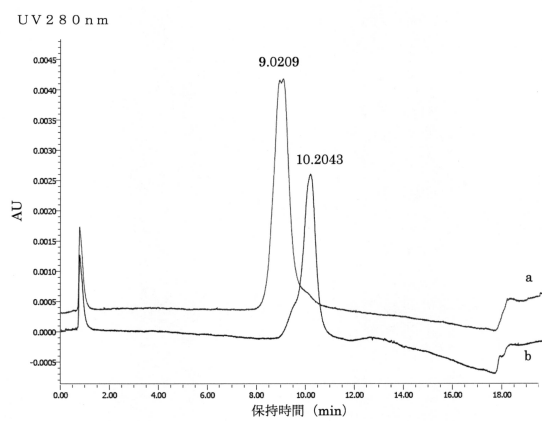
【図 6 6】



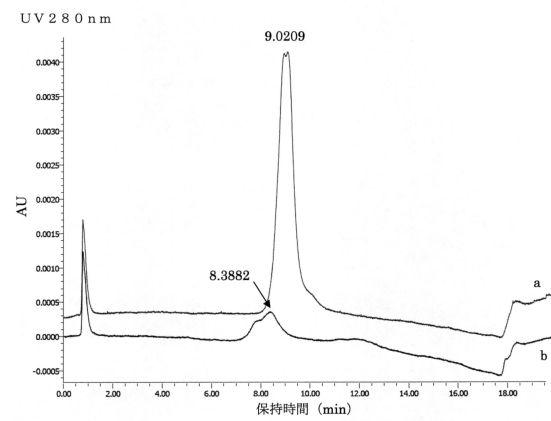
10

20

【図 6 7】



【図 6 8】

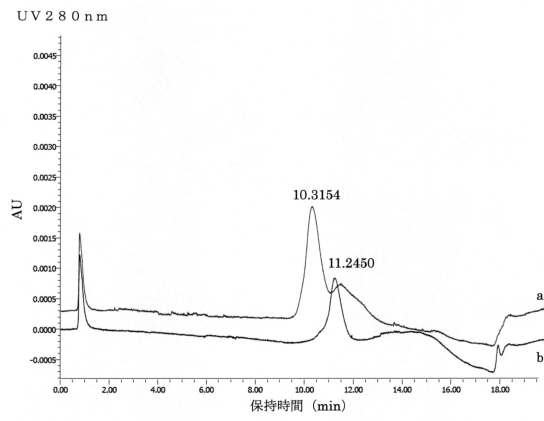


30

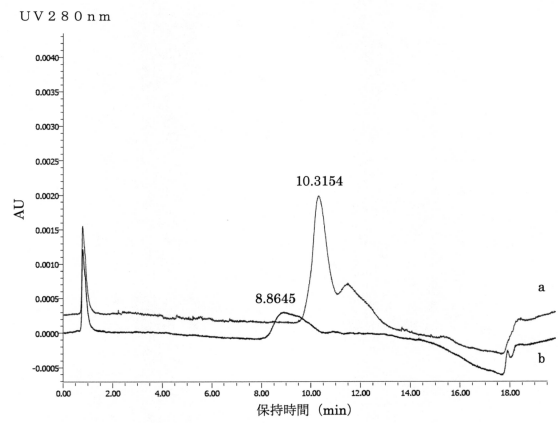
40

50

【図 69】



【図 70】



10

20

【配列表】

0007222347000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

- 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内  
(72)発明者 湯地 玲子  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内  
(72)発明者 新保 和高  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内  
(72)発明者 伊東 祐二  
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人鹿児島大学内  
審査官 松田 芳子  
(56)参考文献 特表2016-523900 (JP, A)  
国際公開第2015/191883 (WO, A1)  
Int. J. Mol. Sci., 2016年, vol.17, no.2, 194  
Protein Cell, 2016年10月, vol.9, no.1, p.33-46  
Bioconjugate Chemistry, 2017年01月, vol.25, no.2, p.351-361  
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
C12N 15/09  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)  
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)