(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年4月21日(21.04.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/080385 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 7/08 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/037776

(22) 国際出願日： 2021年10月12日(12.10.2021)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2020-172768 2020年10月13日(13.10.2020) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (**KYOTO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ Kyoto (JP). 学校法人東京薬科大学 (**TOKYO UNIVERSITY OF PHARMACY AND LIFE SCIENCES**) [JP/JP]; 〒1920392 東京都八王子市堀之内１４３２－１ Tokyo (JP).

(72) 発明者: 浜地 格 (**HAMACHI, Itaru**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 田村 朋則 (**TAMURA, Tomonori**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 後藤 大輝 (**GOTO, Taiki**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 林 良雄 (**HAYASHI, Yoshio**); 〒1920392 東京都八王子市堀之内１４３２－１ 学校法人東京薬科大学内 Tokyo (JP). 六車 共平 (**MUGURUMA, Kyohei**); 〒1920392 東京都八王子市堀之内１４３２－１ 学校法人東京薬科大学内 Tokyo (JP). 福田 茜 (**FUKUDA, Akane**); 〒1920392 東京都八王子市堀之内１４３２－１ 学校法人東京薬科大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外 (**YAMAO, Norihito** et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町８番１号梅田阪急ビルオフィスタワー 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

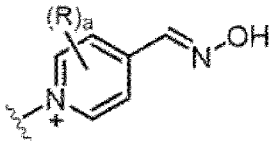
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

WO 2022/080385 A1

(54) **Title:** PEPTIDE, AND MODIFICATION OF ANTIBODY WITH PEPTIDE

(54) 発明の名称： ペプチド、およびペプチドを用いる抗体の修飾



(57) **Abstract:** The present disclosure relates to: a peptide with which at least one molecule of a group shown below is conjugated and which has a length of 13 to 19 amino acid residues; and a method for modifying an antibody with the peptide.

(57) 要約： 本開示は、少なくとも１個の下記基：がコンジュゲートし、１３～１９アミノ酸長であるペプチド、および該ペプチドを用いる抗体の修飾方法に関する。

明　細　書

発明の名称 ： ペプチド、およびペプチドを用いる抗体の修飾

技術分野

[0001] 本開示は、ペプチド、およびペプチドを用いる抗体の修飾方法等に関する。

背景技術

[0002] 近年、抗体薬物複合体（Antibody-drug conjugate, ＡＤＣ）と呼ばれるバイオ医薬品の開発研究が盛んに行われている。ＡＤＣは抗体と低分子薬をリンカーを介して連結した分子であり、抗体の抗原特異性を利用して薬剤送達を行う。ＡＤＣを作製するためには抗体に低分子薬を化学修飾しなければならず、抗体中のＬｙｓ残基またはＣｙｓ残基へのランダム修飾が抗体の化学修飾法として最も一般的な手法として知られる。しかしながら、ランダム修飾による抗体ラベル化では、導入する薬剤の修飾部位や個数の制御が困難であり、薬剤の結合部位によっては、例えば抗原認識部位への修飾によってＡＤＣの標的特異性が低下したり、溶媒接触度の低い部位への修飾によってリンカー切断と薬剤放出の効率が低下したりする可能性がある。加えて結合する薬剤の数の異なるＡＤＣが混在してしまうため、過少、あるいは過剰に薬剤修飾された抗体による影響が生じうる。このように薬剤のランダム修飾に基づいて作製された不均質なＡＤＣは本来の薬効を十分に発揮できない可能性があるため、抗体の修飾部位や個数を厳密に制御する手法が望まれている。遊離のＣｙｓ残基（Engineered cysteine）を導入する方法（非特許文献１、非特許文献２）や非天然アミノ酸を導入する方法（非特許文献３、非特許文献４、非特許文献５）等、抗体を部位特異的に修飾する手法の開発が盛んに行われているものの、高い部位特異性と修飾効率、結合の安定性や操作の簡便さといった、ＡＤＣの臨床開発を行う上で求められる要素を全て満たすような手法は未だ存在せず、新たな抗体の修飾法が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：ＷＯ２０１６／１８６２０６

特許文献2：ＷＯ２０１３／０２７７９６

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Junutula, J. R. and Mallet, W. et. al. Nat. Biotechnol., 2008, 26, 925.

非特許文献2：Shen, B. Q. and Junutula, J. R. et. al. Nat. Biotechnol., 2012, 30, 184.

非特許文献3：Tian, T. and Sapra, P. et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2014, 111, 1766.

非特許文献4：Zimmerman, E. S. et. al. Bioconjug. Chem., 2014, 25, 351.

非特許文献5：VanBrunt, M. P. et. al. Bioconjug. Chem., 2015, 26, 2249.

非特許文献6：Tamura, T. et. al. J. Am. Chem. Soc., 2017, 139, 14181.

非特許文献7：DeLano, W. L., Ultsch, M. H., de Vos, A. M. & Wells, J. A. Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. Science 287, 1279-1283 (2000).

[0005] 本明細書において引用する先行技術文献の開示は全て参照することにより、本明細書に援用される。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本開示の課題は、抗体の修飾法を提供することである。

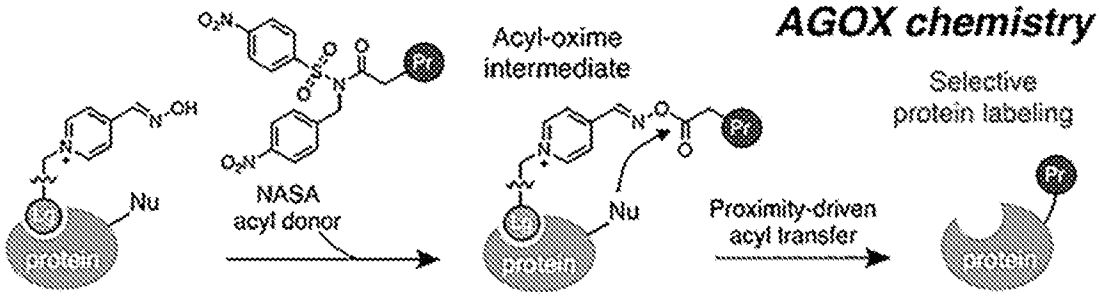
課題を解決するための手段

[0007] タンパク質標識のための新しい方法としてＡＧＯＸ（affinity-guided oxime）化学が知られる（非特許文献６）。この方法では、高求核性ピリジニウムオキシム（ＰｙＯｘ）が標的タンパク質特異的リガンドとコンジュゲート

していて、このＰｙＯｘ結合リガンドが標的タンパク質に選択的に結合し、タンパク質表面で求電子性Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドアシルドナー（NASA acyl donor）のアシル転移反応を促進することにより、タンパク質標識を可能とする方法である。当該非特許文献６には、炭酸脱水酵素IIのin vitro標識、ヒト口腔類表皮癌細胞の内在性膜タンパク質の標識、脳組織におけるα－アミノ－３－ヒドロキシ－５－メチル－４－イソオキサゾールプロピオン酸（ＡＭＰＡ）型グルタミン酸受容体（ＡＭＰＡＲ）の標識について具体的記載があるものの、いずれもリガンドとしてペプチドを用いるものではない。

以下にＡＧＯＸ化学によるタンパク質化学標識の例示として下記に概略図を示す。

[化1]



ＮＡＳＡ：Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミド

Ｐｒｏｔｅｉｎ：標的タンパク質

Ｐｒ：プローブ

Ｌｇ：リガンド

Ｎｕ：求核性アミノ酸

[0008] 非特許文献７、特許文献１、特許文献２等、ＩｇＧのＦｃ領域に結合するペプチドに関する報告がされている。

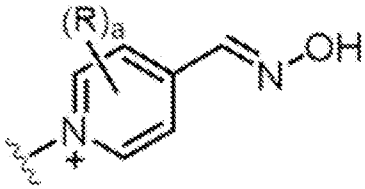
[0009] 本願発明者らは、ＩｇＧのＦｃ領域に結合することが知られるペプチドにリンカーを介してピリジニウムオキシム（ＰｙＯｘ）をコンジュゲートすることで、当該ＰｙＯｘ結合ＩｇＧ結合性ペプチドはＡＧＯＸ化学における触媒として機能し、ＩｇＧを部位特異的に化学修飾できることを見出し、本願

発明に至った。

以下に本開示の例示的な態様を詳説する。

[0010] 〔１〕　少なくとも１個（例えば１～４個、１～３個、１～２個、１個）の下記基：

[化2]



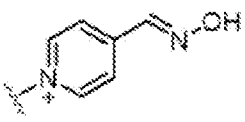
[式中、

Ｒは、C_{1-3}アルキル基（例えばメチル、エチル）、C_{1-3}アルコキシ基（例えばメトキシ）、ハロ、－Ｃ（＝Ｏ）－NH_2、エステル基（例えばメチルエステル、エチルエステル、１－プロピルエステル、２－プロピルエステル、ピバロイルオキシメチルエステル、アセチルオキシメチルエステル、シクロヘキシルアセチルオキシメチルエステル、１－メチルシクロヘキシルカルボニルオキシメチルエステル、エチルオキシカルボニルオキシ－１－エチルエステル、シクロヘキシルオキシカルボニルオキシ－１－エチルエステル）、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、－SO_3H、－ＣＮ、および－NO_2から独立して選択され；

ａは０～４から選択される整数である]

（好ましくは、

[化3]

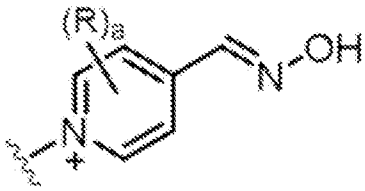


）

がコンジュゲートし、１３～１９（好ましくは１３～１７）アミノ酸長であって、好ましくはＩｇＧ（好ましくはヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧ）と結合可能である、ペプチド。

[0011] 〔２〕　該基：

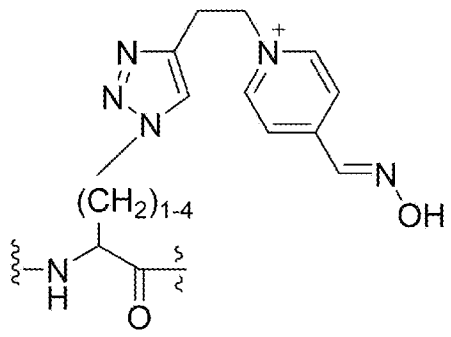
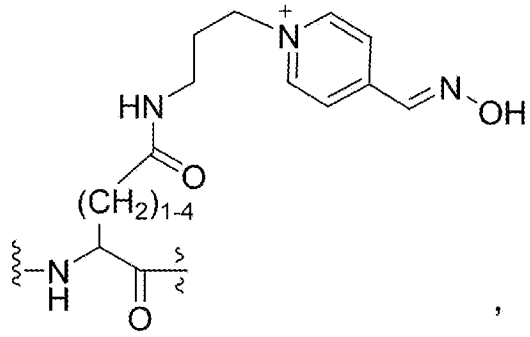
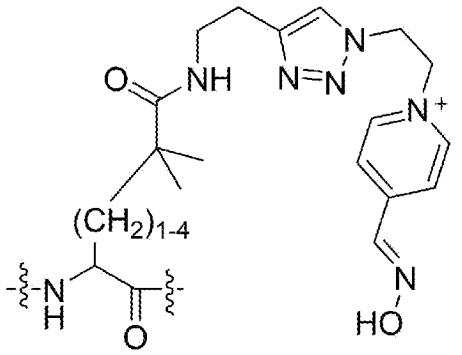
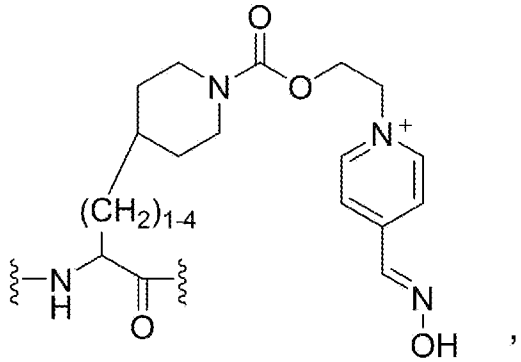
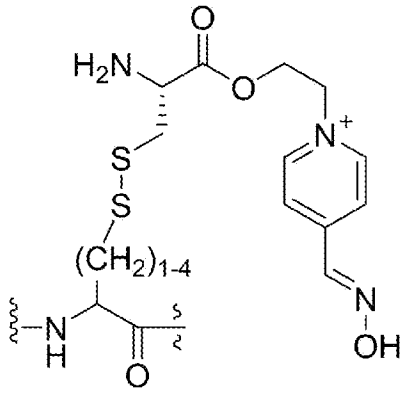
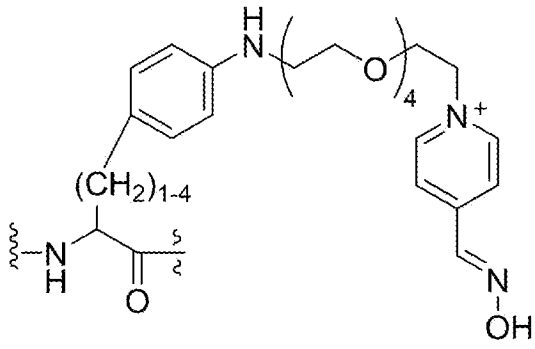
[化4]



[式中、Ｒおよびａは〔１〕と同義である]

がコンジュゲートしたアミノ酸残基が下記から選択される構造：

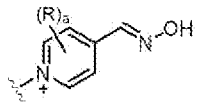
[化5]


,

,

,

,

および


）を有する、〔１〕に記載のペプチド。

[0012] 〔３〕 該基：

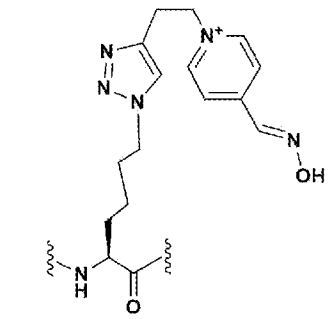
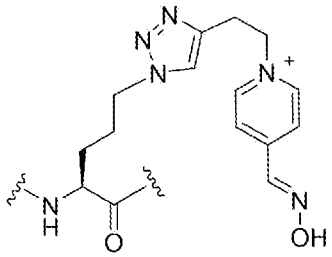
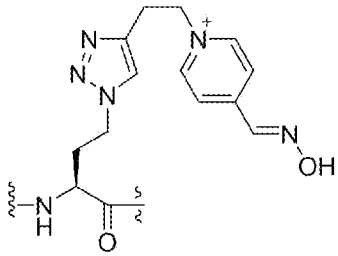
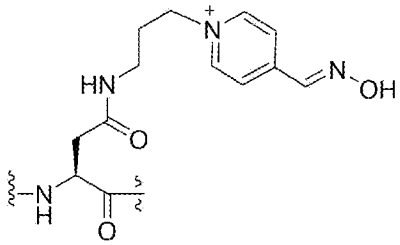
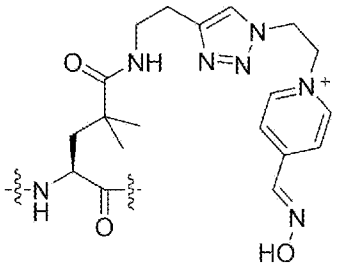
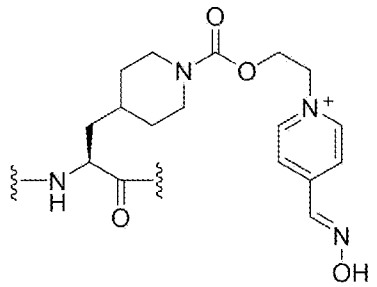
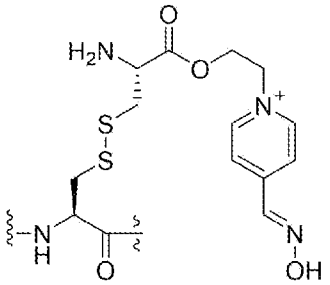
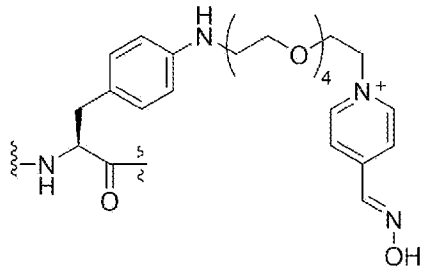
[化6]



[式中、Ｒおよびａは〔１〕と同義]

がコンジュゲートしたアミノ酸残基が下記から選択される構造：

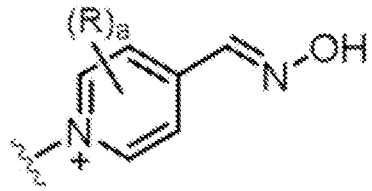
[化7]


,

,


,

,

,

および

)

を有する、〔１〕または〔２〕に記載のペプチド。

[0013] 〔４〕　該基：

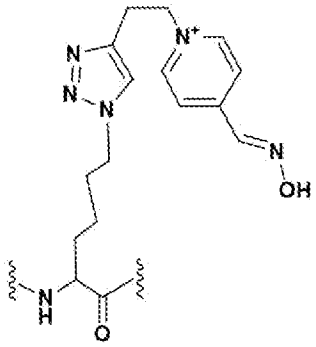
[化8]



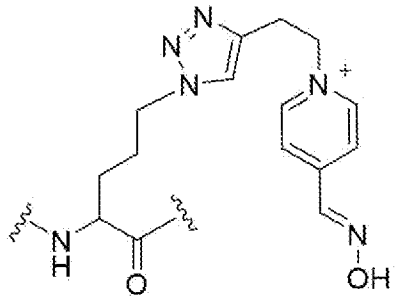
[式中、Ｒおよびａは〔１〕と同義]

がコンジュゲートしたアミノ酸残基が下記から選択される構造：

[化9]

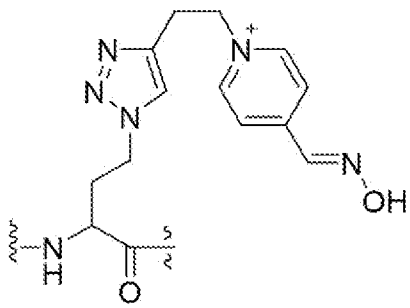


[化10]



および

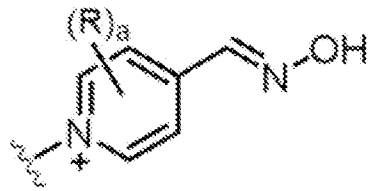
[化11]



を有する、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載のペプチド。

[0014] 〔５〕 該基：

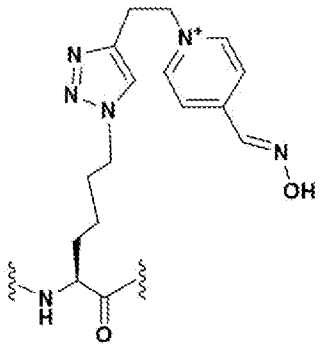
[化12]



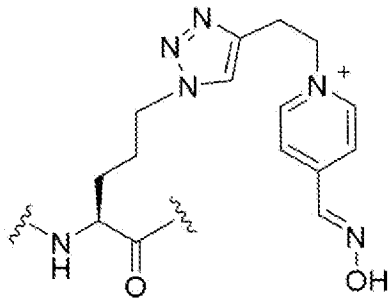
[式中、Ｒおよびａは〔１〕と同義]

がコンジュゲートしたアミノ酸残基が下記から選択される構造：

[化13]

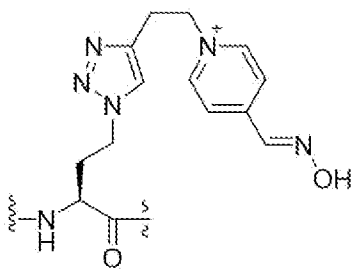


[化14]



および

[化15]



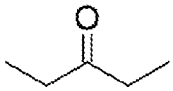
)

を有する、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載のペプチド。

[0015] 〔６〕　該ペプチドは２つのＣｙｓ残基を有し、該２つのＣｙｓ残基間でジスルフィド結合を形成している、または該２つのＣｙｓ残基中のスルフィド基が下記式（Ｉ）－３で表される２価の基により連結されている、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のペプチド。

[化16]

式（Ｉ）－３



[0016] 〔７〕　式（Ｉ）：

$X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}-X^{16}-X^{17}-X^{18}-X^{19}-X^{20}$　（Ｉ）（配列番号１）

[式中、

X^1は不存在であるか、あるいはX^2～X^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^2は不存在であるか、あるいはX^3～X^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^3は不存在であるか、あるいはX^4～X^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^4は不存在であるか、あるいはX^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^5は不存在であるか、あるいはＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^6はＣｙｓ、２－アミノブタン酸、およびＳ－メチルシステインからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^7はＡｌａおよびＴｈｒからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^8は任意の芳香族アミノ酸残基であり、

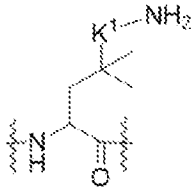
X^9はＨｉｓ残基であり、

X^{10}はＬｙｓ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ａｒｇ、オルニチン、２，４－ジアミノブタン酸（Ｄｂｕ）、Ｎ６－アセチルリジン、Ｎ５－アセチルオルニチン、２－アミノ－４－アセチルアミノブタン酸、２，３－ジアミノプロピオン酸（Ｄａｐ）、２－アミノ－３，３－ジメチルブタン酸、２－アミノ－４，４－ジメチルペンタン酸、３－シクロヘキシルアラニンおよび下記式（Ｉ）－１で表されるアミノ酸残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

式（Ｉ）－１：

[化17]

式(I)－1



（上記式（Ｉ）－１中、K^1は、炭素数１～４のアルキレン基、－（ＮＨ）－、－（Ｃ＝Ｏ）－、－Ｏ－、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される２価の基）、

X^{11}はＧｌｙ、およびＣｙｓを除く任意のＤ－アミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^{12}はＧｌｕ、ＧｌｎおよびＡｓｎからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^{13}はＬｅｕ残基であり、

X^{14}はＶａｌおよびＩｌｅからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^{15}はＴｒｐ残基であり、

X^{16}はＣｙｓ、２－アミノブタン酸およびＳ－メチルシステインからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、ただしX^6およびX^{16}の少なくとも一方は、Ｃｙｓ残基であり、

X^{17}は不存在であるか、あるいはＴｈｒ、Ｓｅｒ、ＶａｌおよびＤ－アミノブタン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

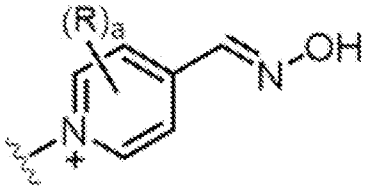
X^{18}は不存在であるか、あるいはX^{17}が存在するときＰｈｅ、Ｈｉｓ、Ｔｙｒ、ホモシステイン（Ｈｃｙ）、３－シクロヘキシルアラニンおよびホモフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^{19}は不存在であるか、あるいはX^{17}～X^{18}が存在するときＨｉｓ、Ｔｙｒ、Ａｌａ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、３－（２－ピリジル）アラニン、３－（３－ピリジル）アラニンおよび３－（４－ピリジル）アラニンからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^{20}は不存在であるか、あるいはX^{17}～X^{19}が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^{1}～X^{5}、X^{7}～X^{15}、およびX^{17}～X^{20}から選択される１つのアミノ酸残基において、少なくとも１個（例えば１～３個、１～２個、１個）の下記基：

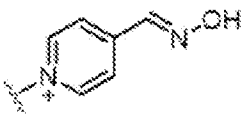
[化18]



[式中、ＲおよびａはＣ１Ｄと同義]

（好ましくは

[化19]



）

がコンジュゲートしている]

によって表されるアミノ酸配列を含み（またはからなり）；

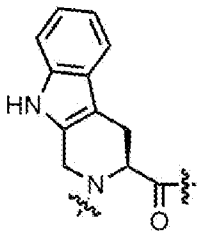
１３～１９（好ましくは１３～１７）アミノ酸長であり；かつ

好ましくは、ＩｇＧ（好ましくはヒトＩｇＧおよび／またはウサギＩｇＧ）と結合可能である、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載のペプチド。

[0017] 〔８〕　X^8がＴｙｒ、Ｔｒｐ、２－アミノ－３－（１－ナフチル）プロピオン酸、２－アミノ－３－（２－ナフチル）プロピオン酸、２－メチルアミノ－３－（１Ｈ－インドール－３－イル）プロピオン酸および下記式（Ｉ）－２で表されるアミノ酸残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であって、

式（Ｉ）－２：

[化20]



X^1～X^5、X^7～X^{15}、およびX^{17}～X^{20}から選択される１つのアミノ酸残基において、少なくとも１個（例えば１～３個、１～２個、１個）の下記基：

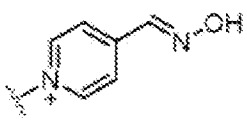
[化21]



[式中、Ｒおよびａは〔１〕と同義]

（好ましくは

[化22]



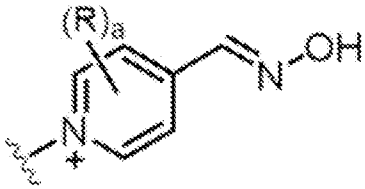
）

がコンジュゲートしている、〔７〕に記載のペプチド。

[0018] 〔９〕　X^{11}がＧｌｙ、Ｄ－Ｉｌｅ、Ｄ－Ｐｒｏ、Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｓｅｒおよびｄ－Ｌｙｓからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^{1}～X^{5}、X^{7}～X^{15}、およびX^{17}～X^{20}から選択される１つのアミノ酸残基において、少なくとも１個（例えば１～３個、１～２個、１個）の下記基：

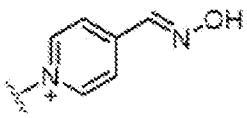
[化23]



[式中、Ｒおよびａは〔１〕と同義]

（好ましくは

[化24]



）

がコンジュゲートしている、

〔７〕または〔８〕に記載のペプチド。

[0019] 〔１０〕　下記から選択されるアミノ酸配列を含み（またはからなり）：

ＤＣＡＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号２）

ＤＣＡＹＨ（Ｄｂｕ）ＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号３）

ＫＧＰＤＣＡＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号４）

ＫＤＣＡＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号５）

ＤＣＡＹＨＫＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号６）

ＤＣＡＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴＦＨＫ（配列番号７）

Ｇ（Ｈｃｙ）ＤＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴ（Ｈｃｙ）Ｈ（配列番号８）

ＤＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号９）

ＤＣＡＹＨＫＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号１０）

ＧＰＤＣＡＹＨＫＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号１１）

ＲＧＮＣＡＹＨＫＧＱＬＶＷＣＴＹＨ（配列番号１２）

ＲＲＧＰＤＣＡＹＨＫＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号１３）

ＤＣＴＹＨＲＧＮＬＶＷＣＴ（配列番号１４）

ＤＣＡＹＨＲＧＮＬＶＷＣＴ（配列番号１５）

ＤＣＴＷＨＲＧＮＬＶＷＣＴ（配列番号１６）

ＤＣＴＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号１７）

ＤＣＴＹＨＲＧＮＬＩＷＣＴ（配列番号１８）

ＤＣＡＷＨＲＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号２０）

ＲＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＳ（配列番号２１）

ＧＰＤＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号２２）

ＧＰＲＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＳＦＨ（配列番号２４）

ＳＰＤＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号２５）

ＧＤＤＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号２６）

ＧＰＳＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号２７）

ＧＰＤＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＳＦＨ（配列番号２８）

ＧＰＤＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴＨＨ（配列番号２９）

ＧＰＤＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴＦＹ（配列番号３０）

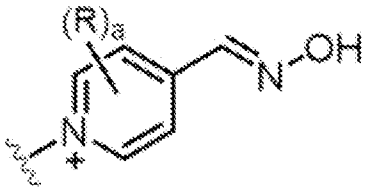
ＳＰＤＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴＦＹ（配列番号３１）

ＳＤＤＣＡＹＨＲＧＥＬＶＷＣＴＦＹ（配列番号３２）

ＤＣＡＷＨＬＧＥＬＶＷＣＴ（配列番号３３）；

Ｃｙｓ残基以外の１つのアミノ酸残基において、少なくとも１個（例えば１～４個、１～３個、１～２個、１個）の下記基：

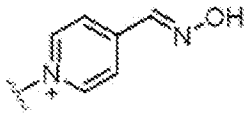
[化25]



[式中、ＲおよびａはＣ１Ｄと同義]

（好ましくは

[化26]



）

がコンジュゲートしている、Ｃ７Ｄ～Ｃ９Ｄのいずれかに記載のペプチド。

[0020] Ｃ１１Ｄ　Ｘ[2]、Ｘ[4]、Ｘ[8]～Ｘ[10]、およびＸ[20]から選択される１つのアミノ酸残基において、少なくとも１個（例えば１～４個、１～３個、１～２個、１個）の下記基：

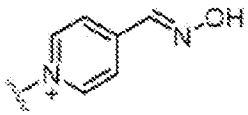
[化27]



[式中、ＲおよびａはＣ１Ｄと同義]

（好ましくは

[化28]

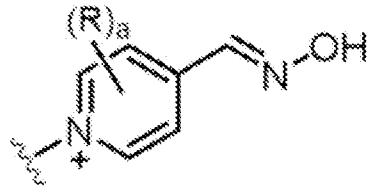


）

がコンジュゲートしている、Ｃ７Ｄ～Ｃ１０Ｄのいずれかに記載のペプチド。

[0021] Ｃ１２Ｄ　Ｘ[2]、Ｘ[4]、Ｘ[10]、およびＸ[20]から選択される１つのアミノ酸残基において、少なくとも１個（例えば１～４個、１～３個、１～２個、１個）の下記基：

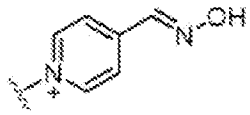
[化29]



[式中、Ｒおよびａは〔１〕と同義]

（好ましくは

[化30]

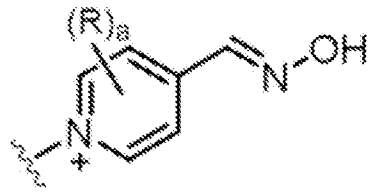


）

がコンジュゲートしている、〔７〕～〔１１〕のいずれかに記載のペプチド。

[0022] 〔１３〕　X^{8}～X^{10}（好ましくはX^{10}）のアミノ酸残基において、少なくとも１個（例えば１～４個、１～３個、１～２個、１個）の下記基：

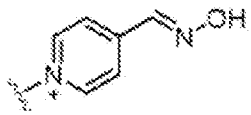
[化31]



[式中、Ｒおよびａは〔１〕と同義]

（好ましくは

[化32]

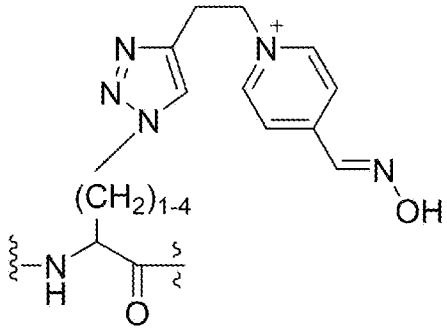
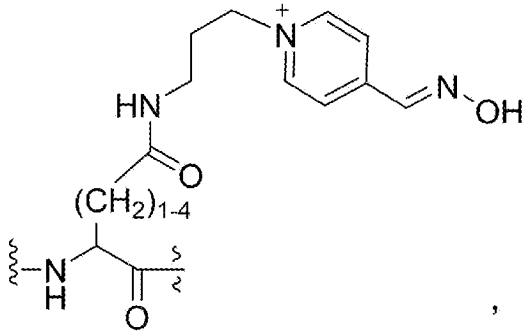
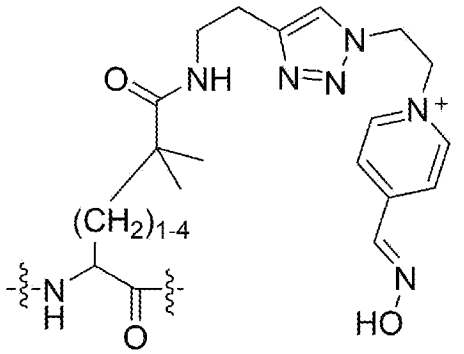
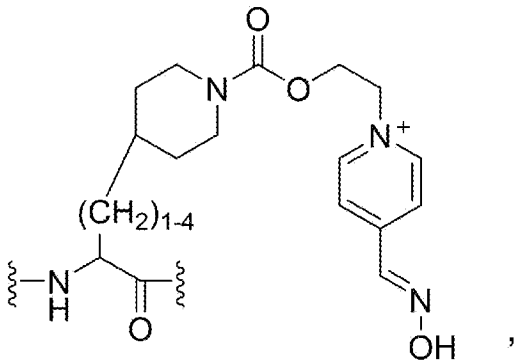
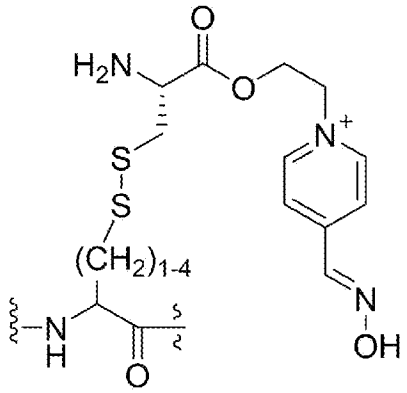
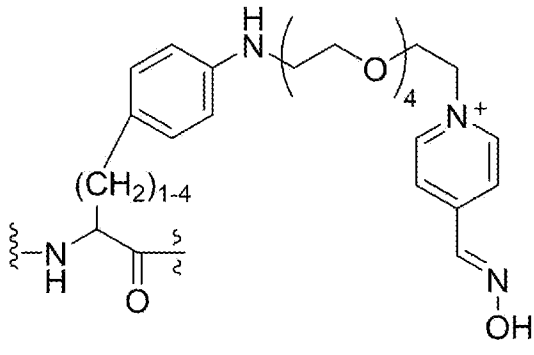


）

がコンジュゲートしている、〔７〕～〔１２〕のいずれかに記載のペプチド。

[0023] 〔１４〕　Ｘ[1]～Ｘ[5]、Ｘ[10]、およびＸ[20]から選択される１つのアミノ酸残基（好ましくはＸ[10]）が、下記から選択される構造：

[化33]


,

,

,

,

および


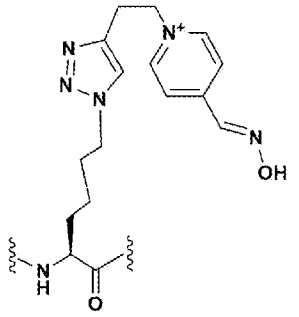
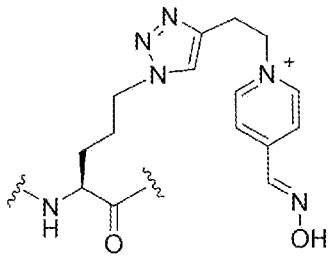
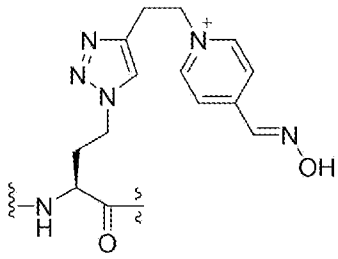
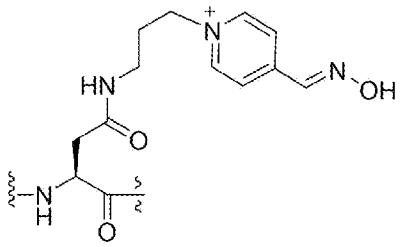
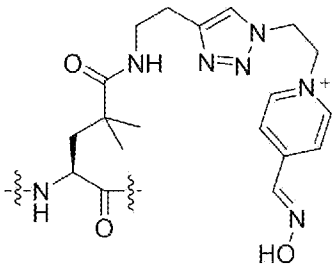
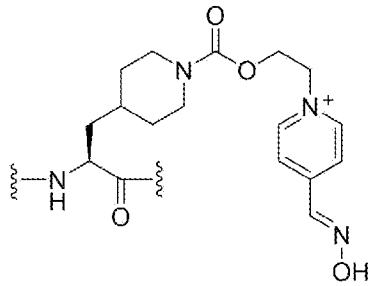
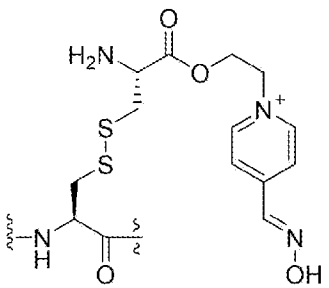
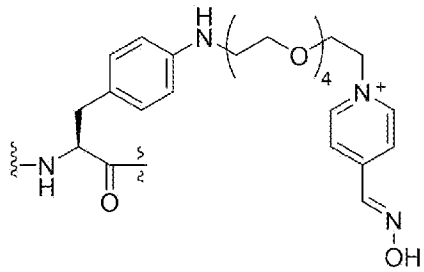
)

を有する、〔７〕～〔１３〕のいずれかに記載のペプチド。

[0024] 〔１５〕　Ｘ[1]～Ｘ[5]、Ｘ[10]、およびＸ[20]から選択される１つのアミノ酸残基

（好ましくはX10）が、下記から選択される構造：

[化34]








および


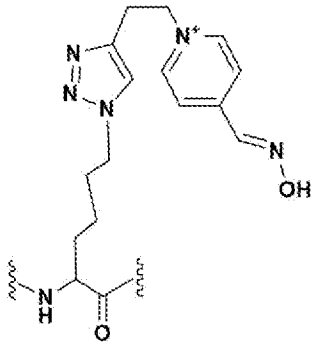
）

を有する、〔７〕～〔１４〕のいずれかに記載のペプチド。

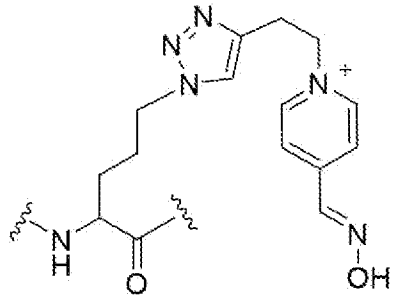
[0025] 〔１６〕 X1～X5、X10、およびX20から選択される１つのアミノ酸残基

（好ましくはＸ^{10}）が、下記構造：

[化35]

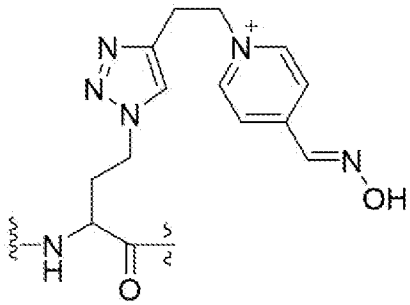


[化36]



または

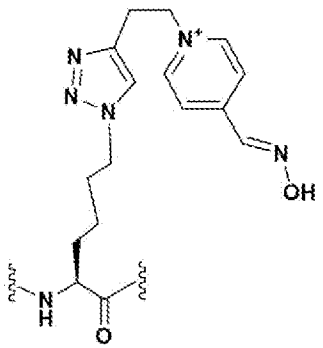
[化37]



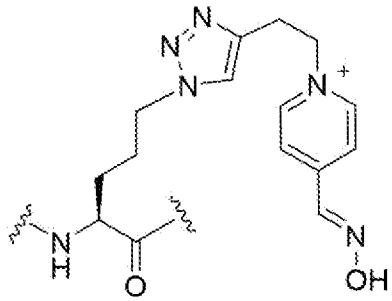
を有する、〔７〕～〔１５〕のいずれかに記載のペプチド。

[0026] 〔１７〕　Ｘ^{1}～Ｘ^{5}、Ｘ^{10}、およびＸ^{20}から選択される１つのアミノ酸残基（好ましくはＸ^{10}）が、下記構造：

[化38]

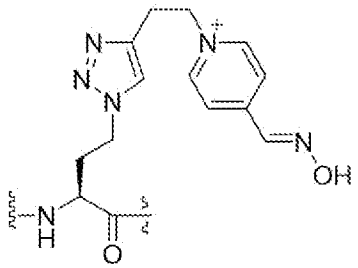


[化39]



または

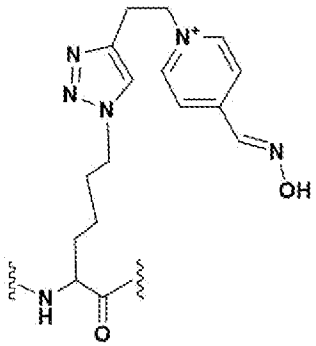
[化40]



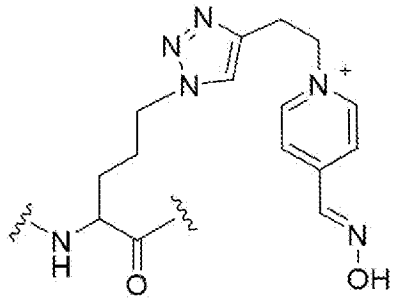
を有する、〔７〕～〔１６〕のいずれかに記載のペプチド。

[0027] 〔１８〕 X^2、X^4、X^{10}、およびX^{20}から選択される１つのアミノ酸残基（好ましくはX^{10}）が、下記構造：

[化41]

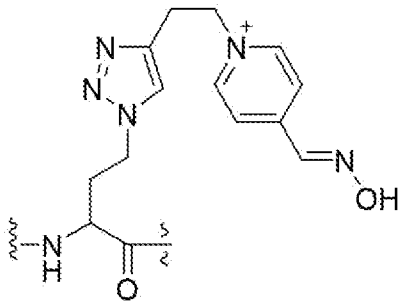


[化42]



または

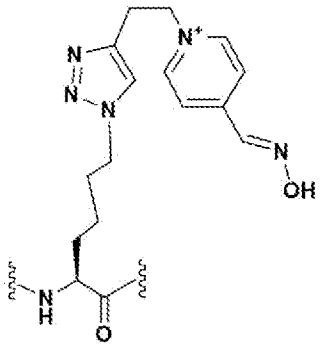
[化43]



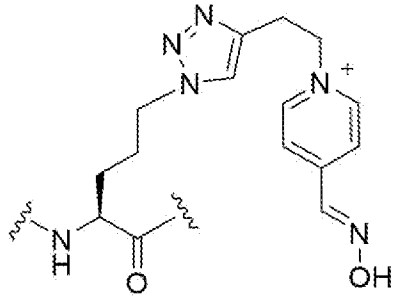
を有する、〔７〕～〔１７〕のいずれかに記載のペプチド。

[0028] 〔１９〕 X^2、X^4、X^{10}、およびX^{20}から選択される１つのアミノ酸残基が、下記構造：

[化44]

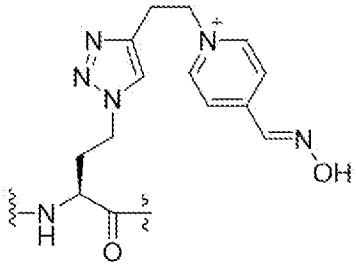


[化45]



または

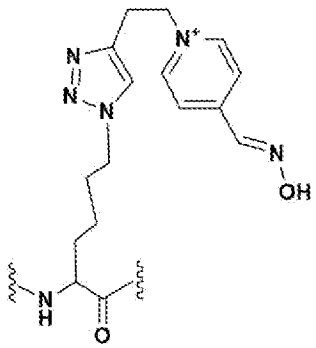
[化46]



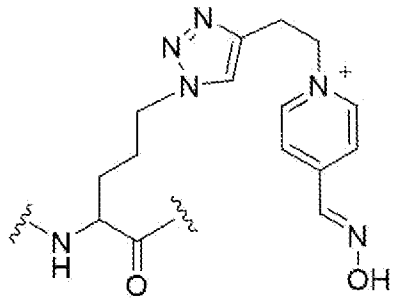
を有する、〔７〕～〔１８〕のいずれかに記載のペプチド。

[0029] 〔２０〕　Ｘ^{10}のアミノ酸残基が、下記構造：

[化47]

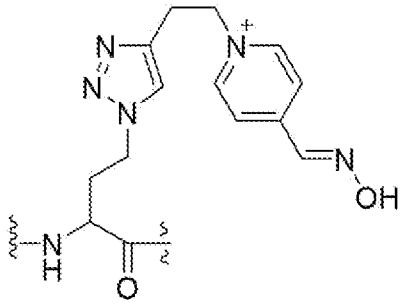


[化48]



または

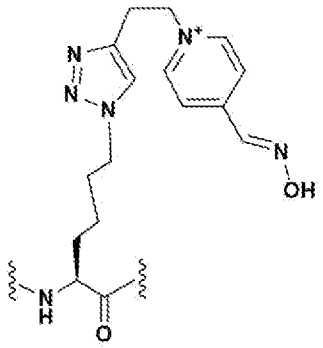
[化49]



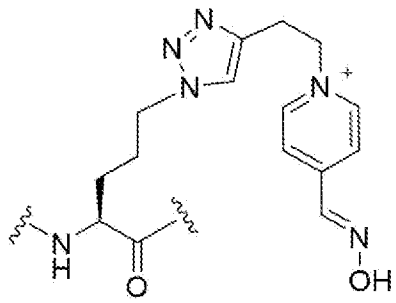
を有する、〔７〕～〔１９〕のいずれかに記載のペプチド。

[0030] 〔２１〕　X^{10}のアミノ酸残基が、下記構造：

[化50]

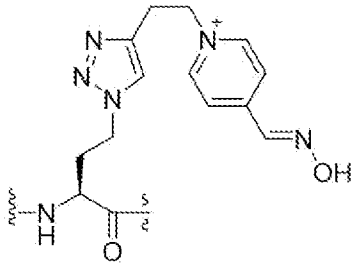


[化51]



または

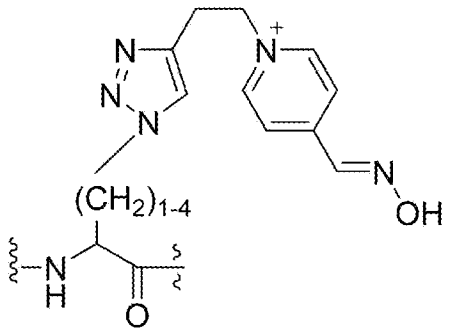
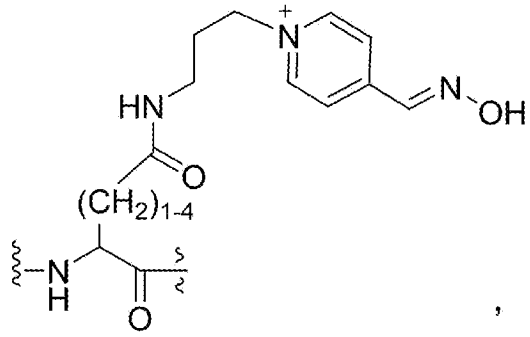
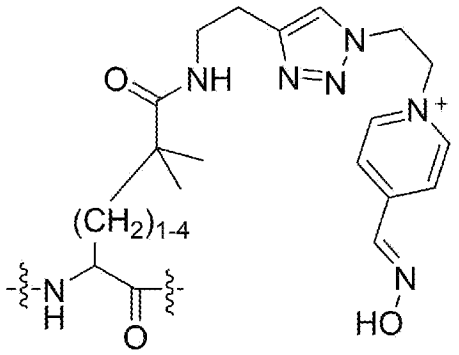
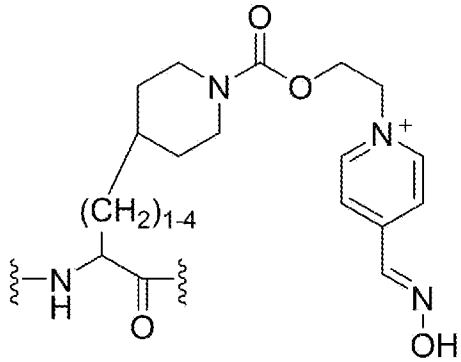
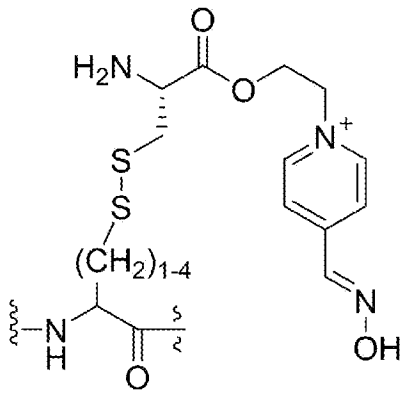
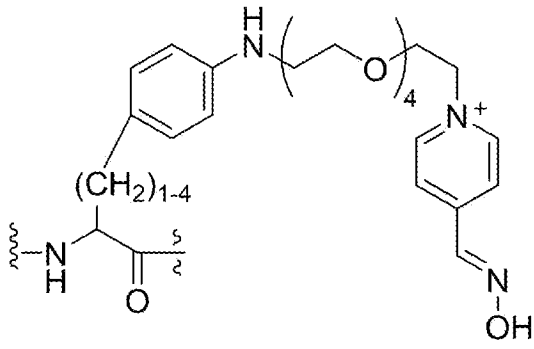
[化52]



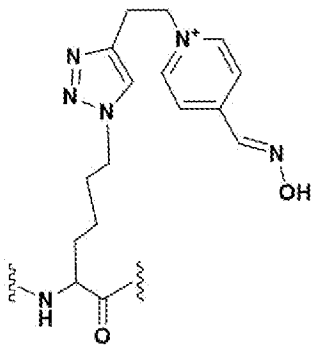
を有する、〔７〕～〔２０〕のいずれかに記載のペプチド。

[0031] 〔２２〕 $X^1X^2X^3X^4$ＤＣＡＹＨX^{10}ＧＥＬＶＷＣＴＦＨX^{20}（配列番号３４）のアミノ酸配列からなり、X^{10}のアミノ酸残基が下記から選択される構造：

[化53]


,

,

,

,

および

、さらに好ましくは

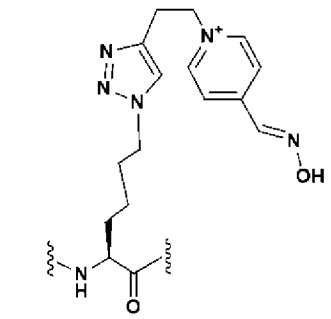
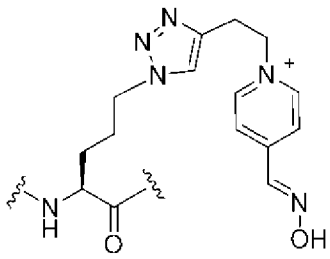
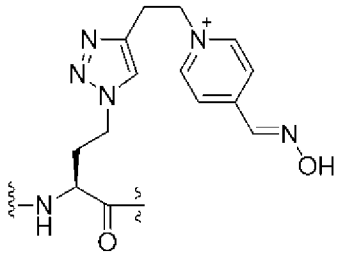
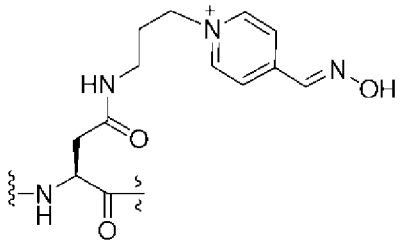
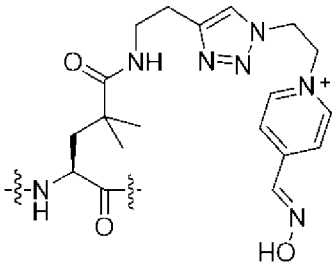
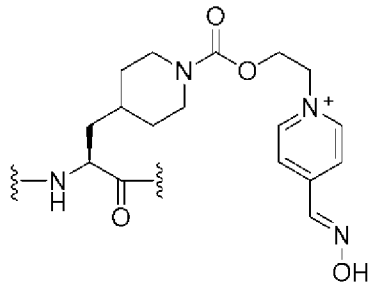
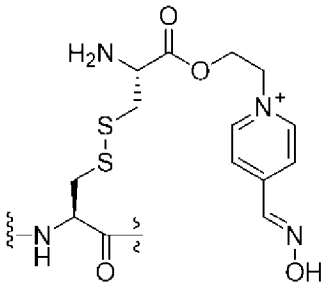
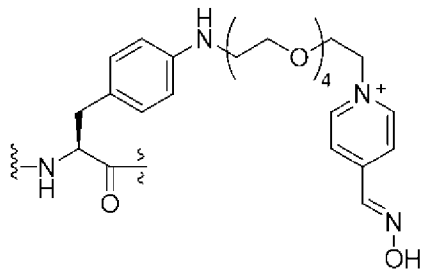
[化54]



）を有する、〔７〕～〔２１〕のいずれかに記載のペプチド。

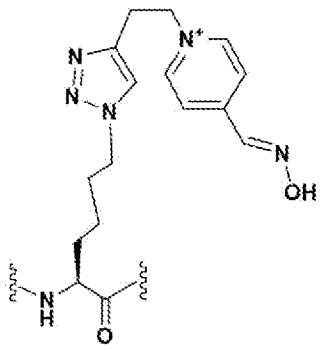
[0032] 〔２３〕 $X^1X^2X^3X^4$ＤＣＡＹＨX^{10}ＧＥＬＶＷＣＴＦＨX^{20}（配列番号３４）のアミノ酸配列からなり、X^{10}のアミノ酸残基が下記から選択される構造：

[化55]


,

,

,

,

,

,

および


好ましくは

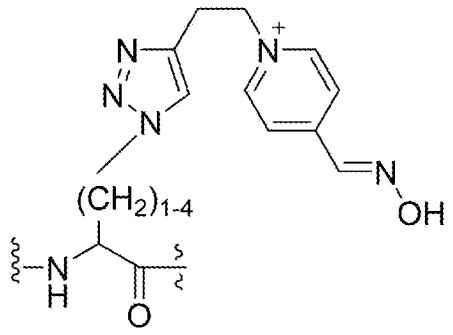
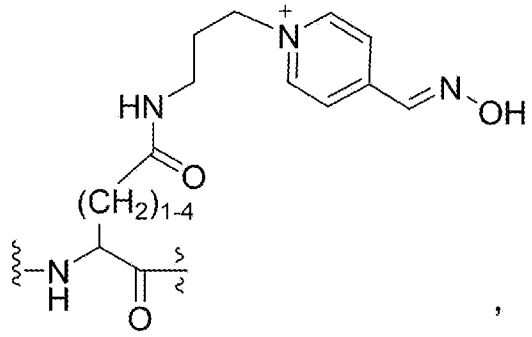
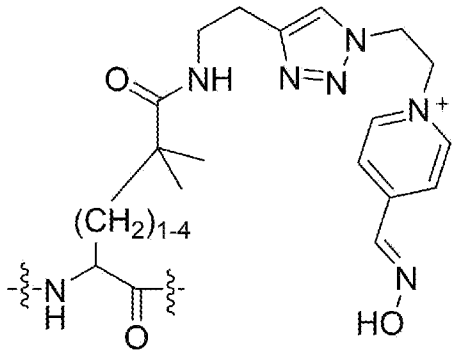
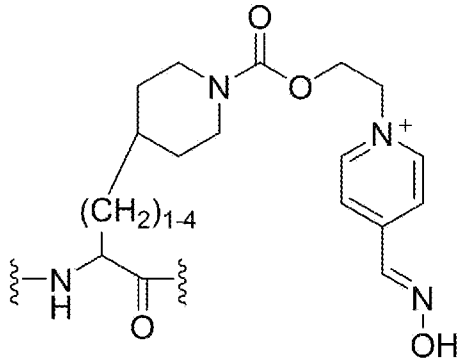
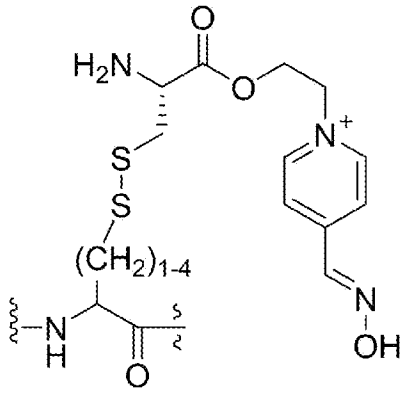
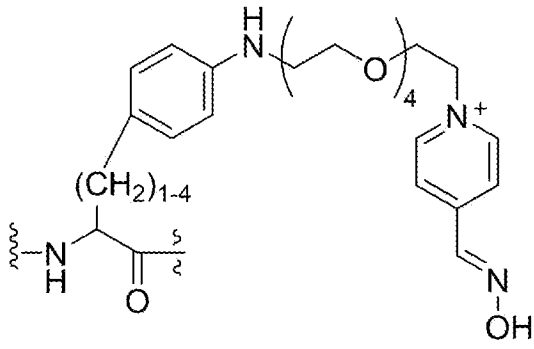
[化56]



）を有する、〔７〕～〔２２〕のいずれかに記載のペプチド。

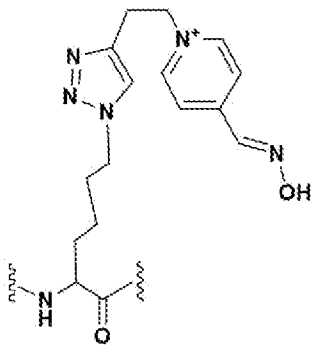
[0033] 〔２４〕　ＤＣＡＹＨＸ^{10}ＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号３５）、配列番号１９、配列番号２３、および配列番号６８～９０から選択されるのアミノ酸配列を含み（またはからなり）、Ｘ^{10}のアミノ酸残基が下記から選択される構造：

[化57]


,

,

,

,

および


好ましくは

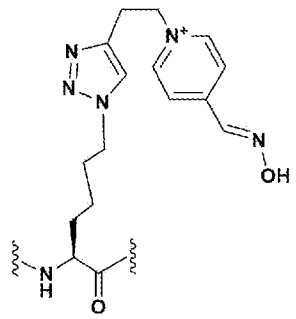
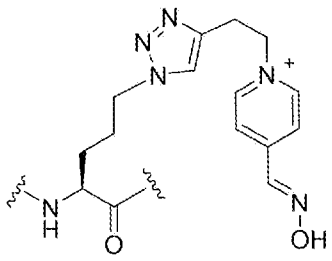
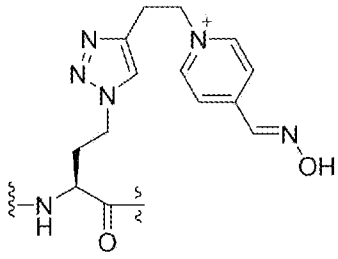
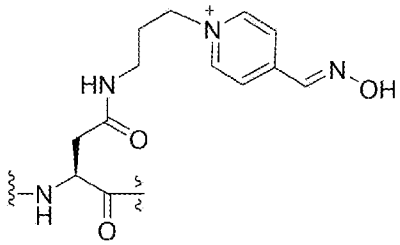
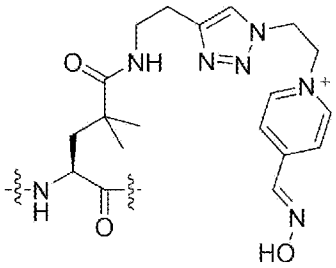
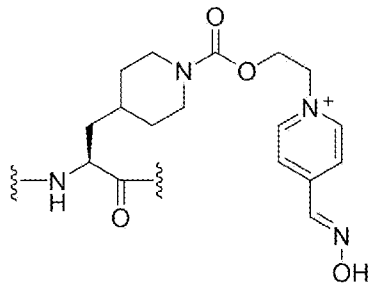
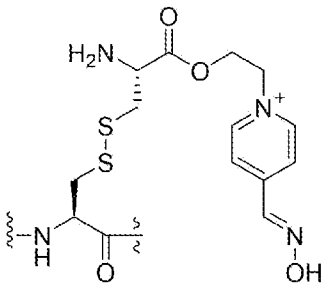
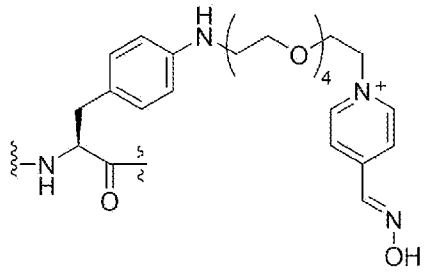
[化58]



）を有する、〔７〕～〔２３〕のいずれかに記載のペプチド。

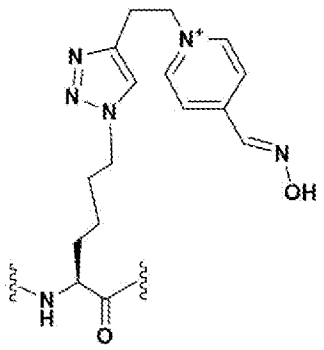
[0034] 〔２５〕　ＤＣＡＹＨＸ[10]ＧＥＬＶＷＣＴＦＨ（配列番号３５）、配列番号１９、配列番号２３、および配列番号６８～９０から選択されるアミノ酸配列を含み（またはからなり）、Ｘ[10]のアミノ酸残基が下記から選択される構造：

[化59]


,

,

,

,

,

,

および


好ましくは

[化60]



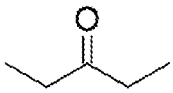
）を有する、〔７〕～〔２４〕のいずれかに記載のペプチド。

[0035] 〔２６〕 X^6とX^{16}がＣｙｓ残基である、〔７〕～〔２５〕のいずれかに記載のペプチド。

[0036] 〔２７〕 X^6とX^{16}がＣｙｓ残基であり、X^6のＣｙｓ残基およびX^{16}のＣｙｓ残基間でジスルフィド結合を形成している、またはX^6およびX^{16}のＣｙｓ残基中のスルフィド基が下記式（Ｉ）－３で表される２価の基により連結されている、〔７〕～〔２６〕のいずれかに記載のペプチド。

[化61]

式（Ｉ）－３

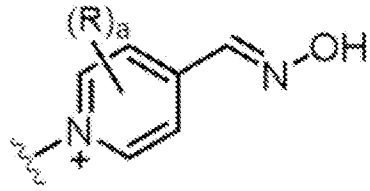


[0037] 〔２８〕 X^6とX^{16}がＣｙｓ残基であり、X^6のＣｙｓ残基およびX^{16}のＣｙｓ残基間でジスルフィド結合を形成している、〔７〕～〔２７〕のいずれかに記載のペプチド。

[0038] 〔２９〕Ｎ末端でアセチル化されているか、Ｃ末端でアミド化されているか、またはＮ末端でアセチル化されていてかつＣ末端でアミド化されている、〔１〕～〔２８〕のいずれかに記載のペプチド。

[0039] 〔３０〕 溶媒中、少なくとも１個（例えば１～４個、１～３個、１～２個、１個）の下記基：

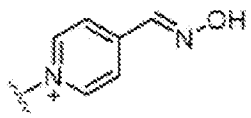
[化62]



[式中、Ｒおよびａは〔１〕と同義]

（好ましくは

[化63]



）

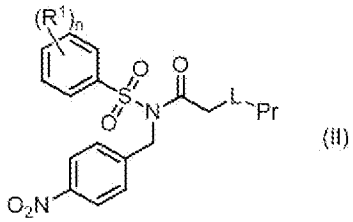
がコンジュゲートした、（好ましくは抗体と結合可能な）ペプチドの存在下、抗体および／またはそれらのフラグメントを、ペイロードを保持する（tethering）Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドで処理する工程を含む、抗体の修飾方法。

[0040] 〔３１〕　該ペプチドが〔１〕～〔２９〕のいずれかに記載のペプチドである、〔３０〕に記載の方法。

[0041] 〔３２〕　〔３０〕または〔３１〕に記載の方法を含む、抗体とペイロードとの複合体（conjugate）の製造方法。

[0042] 〔３３〕　該ペイロードを保持する（tethering）Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドが式（ＩＩ）：

[化64]



(II)

[式中、

Ｌはリンカーを示し；

Ｐｒはペイロードを示し；

Ｒ[1]は独立して、１～３個のハロで適宜置換されていてもよいＣ$_{1-3}$アルキル、１～３個のハロで適宜置換されていてもよいＣ$_{1-3}$アルコキシ、ハロ、および－ＮＯ$_2$（好ましくは－ＮＯ$_2$）から選択され；

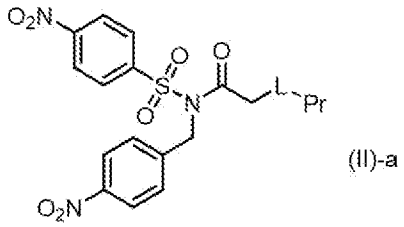
ｎは０～５（好ましくは１～３）から選択される整数である]

を有する、〔３０〕～〔３２〕のいずれかに記載の方法。

[0043] 〔３４〕　該ペプチドが〔１〕～〔２９〕のいずれかに記載のペプチドであり；

該ペイロードを保持する（tethering）Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドが下式（ＩＩ）－ａ：

[化65]



(II)-a

[式中、

Ｌはリンカーを示し；

Ｐｒはペイロードを示す]

を有する；

〔３０〕～〔３３〕のいずれかに記載の方法に記載の方法。

[0044] 〔３５〕　該溶媒のｐＨが６～８．５（好ましくは６．５～８．２）である、〔３０〕～〔３４〕のいずれかに記載の方法に記載の方法。

[0045] 前記〔１〕から〔３５〕の各構成は、任意に２以上を選択して組み合わせることができる。

発明の効果

[0046] 本発明によれば、抗体の修飾に有用なペプチド、および抗体の修飾方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0047] [図1]試験１－２　ＰｙＯｘ－ＩｇＧ結合性ペプチドを用いた標識ＩｇＧのゲル蛍光標識

[図2]Ｎａｎｏｄｒｏｐ（商標）によるゲル濾過クロマトグラフィーのフラクションのＵＶ－Ｖｉｓスペクトル解析

[図3]標識ハーセプチンのＵＶ－Ｖｉｓスペクトル解析

[図4]試験例１－３　トリプシン／Ｌｙｓ－Ｃ消化ＦＬ標識ハーセプチンのＨＰＬＣ分析結果

[図5]ピーク５およびピーク６のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ　（ｕｌｔｒａｆｌｅｘ）分析

[図6]１５Ｌ－ＩｇＢＰ－ハーセプチン複合体の結晶構造

[図7]試験２－２　ＰｙＯｘ－ＩｇＧ結合性ペプチドを用いた標識ＩｇＧのゲル蛍光標識Ｃ４：ＰｙＯｘ－Ｃ４－ＩｇＢＰＣ２：ＰｙＯｘ－Ｃ２－ＩｇＢＰ

[図8]試験例２－３　トリプシン／Ｌｙｓ－Ｃ消化ＦＬ標識ハーセプチンのＨＰＬＣ分析結果

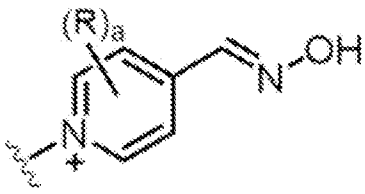
発明を実施するための形態

[0048] 以下、本発明の実施形態についてさらに詳細に説明する。

[0049] 本発明は、１つの態様として、下記のペプチドを提供する。

少なくとも１個（例えば１～４個、１～３個、１～２個、１個）の下記基：

[化66]



[式中、

Ｒは、C_{1-3}アルキル基（例えばメチル、エチル）、C_{1-3}アルコキシ基（例えばメトキシ）、ハロ、－Ｃ（＝Ｏ）－NH_2、エステル基（例えばメチル

エステル、エチルエステル、１－プロピルエステル、２－プロピルエステル、ピバロイルオキシメチルエステル、アセチルオキシメチルエステル、シクロヘキシルアセチルオキシメチルエステル、１－メチルシクロヘキシルカルボニルオキシメチルエステル、エチルオキシカルボニルオキシ－１－エチルエステル、シクロヘキシルオキシカルボニルオキシ－１－エチルエステル）、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、－SO_3H、－ＣＮ、および－NO_2から独立して選択され；

ａは０～４から選択される整数である］

（以下、「ＰｙＯｘ基」と称することがある）

がコンジュゲートし、１３～１９（好ましくは１３～１７）アミノ酸長である、ペプチド（以下、「本開示のペプチド」と称することがある）。

[0050] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドは、

式（Ｉ）：

$X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}-X^{16}-X^{17}-X^{18}-X^{19}-X^{20}$　（Ｉ）（配列番号１）

[式中、

X^1は不存在であるか、あるいはX^2～X^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^2は不存在であるか、あるいはX^3～X^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^3は不存在であるか、あるいはX^4～X^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^4は不存在であるか、あるいはX^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^5は不存在であるか、あるいはＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^6はＣｙｓ、２－アミノブタン酸、およびＳ－メチルシステインからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^7はＡｌａおよびＴｈｒからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^8は任意の芳香族アミノ酸残基であり、

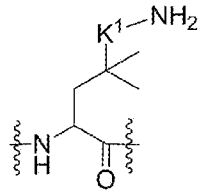
X^9はＨｉｓ残基であり、

X^{10}はＬｙｓ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ａｒｇ、オルニチン、２，４－ジアミノブタン酸（Ｄｂｕ）、Ｎ６－アセチルリジン、Ｎ５－アセチルオルニチン、２－アミノ－４－アセチルアミノブタン酸、２，３－ジアミノプロピオン酸（Ｄａｐ）、２－アミノ－３，３－ジメチルブタン酸、２－アミノ－４，４－ジメチルペンタン酸、３－シクロヘキシルアラニンおよび下記式（Ｉ）－１で表されるアミノ酸残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

式（Ｉ）－１：

[化67]

式(I)－1



（上記式（Ｉ）－１中、K^1は、炭素数１～４のアルキレン基、－（ＮＨ）－、－（Ｃ＝Ｏ）－、－Ｏ－、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される２価の基）、

X^{11}はＧｌｙ、およびＣｙｓを除く任意のＤ－アミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^{12}はＧｌｕ、ＧｌｎおよびＡｓｎからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^{13}はＬｅｕ残基であり、

X^{14}はＶａｌおよびＩｌｅからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^{15}はＴｒｐ残基であり、

X^{16}はＣｙｓ、２－アミノブタン酸およびＳ－メチルシステインからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、ただしX^6およびX^{16}の少なくとも一

方は、Ｃｙｓ残基であり、

Ｘ[17]は不存在であるか、あるいはＴｈｒ、Ｓｅｒ、ＶａｌおよびＤ－アミノブタン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

Ｘ[18]は不存在であるか、あるいはＸ[17]が存在するときＰｈｅ、Ｈｉｓ、Ｔｙｒ、ホモシステイン（Ｈｃｙ）、３－シクロヘキシルアラニンおよびホモフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

Ｘ[19]は不存在であるか、あるいはＸ[17]～Ｘ[18]が存在するときＨｉｓ、Ｔｙｒ、Ａｌａ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、３－（２－ピリジル）アラニン、３－（３－ピリジル）アラニンおよび３－（４－ピリジル）アラニンからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

Ｘ[20]は不存在であるか、あるいはＸ[17]～Ｘ[19]が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

Ｘ[1]～Ｘ[5]、Ｘ[7]～Ｘ[15]、およびＸ[17]～Ｘ[20]から選択される１つのアミノ酸残基において、少なくとも１個（例えば１～３個、１～２個、１個）の下記基：

[化68]



[式中、

Ｒは、C_{1-3}アルキル基（例えばメチル、エチル）、C_{1-3}アルコキシ基（例えばメトキシ）、ハロ、－Ｃ（＝Ｏ）－NH_2、エステル基（例えばメチルエステル、エチルエステル、１－プロピルエステル、２－プロピルエステル、ピバロイルオキシメチルエステル、アセチルオキシメチルエステル、シクロヘキシルアセチルオキシメチルエステル、１－メチルシクロヘキシルカルボニルオキシメチルエステル、エチルオキシカルボニルオキシ－１－エチルエステル、シクロヘキシルオキシカルボニルオキシ－１－エチルエステル）

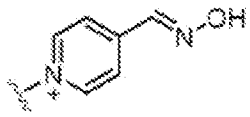
、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、－ＳＯ$_3$Ｈ、－ＣＮ、および－ＮＯ$_2$から独立して選択され；

ａは０～４から選択される整数である］

（以下、「ＰｙＯｘ基」と称することがある）

（好ましくは

［化69］



）

がコンジュゲートしている］

によって表されるアミノ酸配列を含み（またはからなり）；

１３～１９（好ましくは１３～１７）アミノ酸長である、ペプチド（以下、「本開示のペプチド」と称することがある）。

［0051］　本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドは、ＩｇＧ（例えばヒトＩｇＧ、ウサギＩｇＧ）と結合可能である。本開示のペプチドのＩｇＧへの結合親和性は特に限定されないが、ＡＧＯＸ化学におけるＮ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドアシルドナーのアシル転移反応を促進する触媒として機能しうる親和性を有することが好ましい。本開示のペプチドとＩｇＧとの結合に関する解離定数（Ｋ$_d$）は、表面プラズモン共鳴スペクトル解析（例えばＢＩＡＣＯＲＥシステム使用）により決定可能であり、例えば１×１０$^{-10}$Ｍ～１×１０$^{-4}$Ｍ、より好ましくは１×１０$^{-9}$Ｍ～１×１０$^{-5}$Ｍ、さらに好ましくは１×１０$^{-9}$Ｍ～１０$^{-7}$Ｍが挙げられる。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドは、ＩｇＧとの結合親和性が、他の免疫グロブリン（ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭ）と比較して約１０倍以上、好ましくは約５０倍以上、より好ましくは約２００倍以上高い。

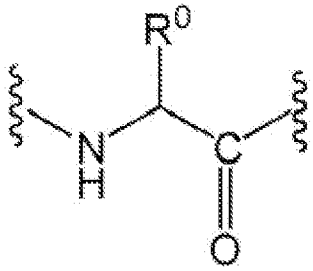
本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドは、ＩｇＧのＦｃ領域に結合可能である。Ｆｃ領域に結合可能かどうかの試験は公知の方法により行うことができ、例えば、表面プラズモン共鳴法によるＦｃフラグメント

との親和性測定、Ｘ線結晶構造解析、プロテインＡなど既存のＦｃ結合分子との競合の測定などが挙げられる。

[0052] 本明細書に記載のアミノ酸配列は、特に言及がない限り、慣例に従ってＮ末端（アミノ末端）側からＣ末端（カルボキシル末端）側への方向に表記される。

[0053] 本開示において、「アミノ酸残基」とは、ペプチドまたはタンパク質分子上で、ペプチドまたはタンパク質を構成しているアミノ酸の一単位に当たる部分を意味する。より具体的には、以下の式のように表される、α－アミノ酸から誘導される２価の基を意味する：

[化70]



。

上記式中、Ｒ⁰はアミノ酸の側鎖であり、例えばＧｌｙであれば水素原子、Ａｌａであればメチル基である。

[0054] 本開示において、「アミノ酸残基」は、天然もしくは非天然のα－アミノ酸に由来し、例えば、Ａｒｇ（Ｒ）、Ｌｙｓ（Ｋ）、Ａｓｐ（Ｄ）、Ａｓｎ（Ｎ）、Ｇｌｕ（Ｅ）、Ｇｌｎ（Ｑ）、Ｈｉｓ（Ｈ）、Ｐｒｏ（Ｐ）、Ｔｙｒ（Ｙ）、Ｔｒｐ（Ｗ）、Ｓｅｒ（Ｓ）、Ｔｈｒ（Ｔ）、Ｇｌｙ（Ｇ）、Ａｌａ（Ａ）、Ｍｅｔ（Ｍ）、Ｃｙｓ（Ｃ）、Ｐｈｅ（Ｆ）、Ｌｅｕ（Ｌ）、Ｖａｌ（Ｖ）、およびＩｌｅ（Ｉ）、ならびにこれらの類縁体由来するアミノ酸残基が挙げられる。光学活性体があり得る場合、Ｌ体、Ｄ体の何れであってもよいが、Ｌ体が好ましい。

上記の類縁体としては、例えば上記２０種のアミノ酸残基の側鎖が任意の置換基で置換された誘導体等であってもよく、例えば、上記２０種のアミノ

酸残基のハロゲン化誘導体（例えば、３－クロロアラニン）、２－アミノ酪酸、ノルロイシン、ノルバリン、イソバリン、２－アミノイソ酪酸、ホモフェニルアラニン、２，３－ジアミノプロピオン酸、２，４－ジアミノブタン酸（Ｄｂｕ）、オルニチン、２－ヒドロキシグリシン、ホモセリン、ヒドロキシリジン、ヒドロキシプロリン、３，４－ジデヒドロプロリン、ホモプロリン、ホモシステイン、ホモメチオニン、アスパラギン酸エステル（例えば、アスパラギン酸－メチルエステル、アスパラギン酸－エチルエステル、アスパラギン酸－プロピルエステル、アスパラギン酸－シクロヘキシルエステル、アスパラギン酸－ベンジルエステルなど）、グルタミン酸エステル（グルタミン酸－シクロヘキシルエステル、グルタミン酸－エチルエステル、グルタミン酸－プロピルエステル、グルタミン酸－メチルエステル、グルタミン酸－ベンジルエステルなど）、ホルミルトリプトファン、２－シクロペンチルグリシン、２－シクロヘキシルグリシン、２－フェニルグリシン、２－ピリジルアラニン、３－シクロペンチルアラニン、３－シクロヘキシルアラニン、３－ピリジルアラニン、３－ピラゾリルアラニン、３－フラニルアラニン、３－チエニルアラニン、メトキシフェニルアラニン、３－ナフチルアラニン、４－ピリジルアラニン、２－アミノブタン酸、Ｓ－メチルシステイン、Ｎ６－アセチルリジン、Ｎ５－アセチルオルニチン、２－アミノ－４－アセチルアミノブタン酸、２－アミノ－３，３－ジメチルブタン酸、２－アミノ－４，４－ジメチルペンタン酸、２－アミノ－３－（１－ナフチル）プロピオン酸、２－アミノ－３－（２－ナフチル）プロピオン酸、２－メチルアミノ－３－（１Ｈ－インドール－３－イル）プロピオン酸等のアミノ酸に由来するアミノ酸残基が例示できるが、これらに制限されない。また、ＩＩｅやＴｈｒのように、側鎖に不斉炭素を有するジアステレオマーが存在するものについては、天然型（例えば、（２Ｒ*，３Ｒ*）－２－アミノ－３－メチルペンタン酸、および（２Ｒ*，３Ｓ*）－２－アミノ－３－ヒドロキシブタン酸）および非天然型（例えば、（２Ｒ*，３Ｓ*）－２－アミノ－３－メチルペンタン酸、および（２Ｒ*，３Ｒ*）－２－アミノ－３－ヒドロキシブ

タン酸）が特に区別なく使用され得る。すなわち、「ＩＩｅ」は（２Ｒ*，３Ｒ*）－２－アミノ－３－メチルペンタン酸および（２Ｒ*，３Ｓ*）－２－アミノ－３－メチルペンタン酸の両方を含む意味として使用され、「Ｔｈｒ」は（２Ｒ*，３Ｓ*）－２－アミノ－３－ヒドロキシブタン酸および（２Ｒ*，３Ｒ*）－２－アミノ－３－ヒドロキシブタン酸の両方を含む意味として使用される。好ましくは、天然型ジアステレオマー（すなわち、ＩＩｅであれば（２Ｒ*，３Ｒ*）－２－アミノ－３－メチルペンタン酸、Ｔｈｒであれば（２Ｒ*，３Ｓ*）－２－アミノ－３－ヒドロキシブタン酸）が使用される。

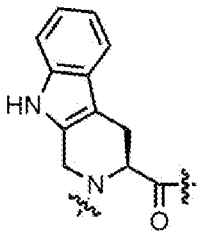
[0055] 本開示において、「任意の置換基」としては、例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素などのハロゲン原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アシル基、アルキルスルファニル基、アリールスルファニル基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アリールアミノ基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、ホルミル基、メルカプト基、スルホ基、スルフィン酸基、グアニジノ基、カルバモイル基、チオール基、チオエーテル基、メシル基、ｐ－トルエンスルホニル基、アミノ基、ニトロ基、シアノ基、トリフルオロメチル基、トリクロロメチル基、トリメチルシリル基、ホスフィニコ基、ホスホノ基などが挙げられる。これらの置換基もまた、ハロゲン原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、ニトロ基、シアノ基などによってさらに置換されていてもよい。ただし、置換された後の基が置換される前の基と同じ定義に含まれるような置換は考えないものとする。

[0056] 各アミノ酸残基は、その側鎖の相違に基づいて、類似の性質を有するアミノ酸残基と置換し得ることが本技術分野において知られている（保存的置換）。例えば、脂肪族疎水性アミノ酸であるＶａｌ、Ｌｅｕ、ＩＩｅ、２－アミノ酪酸（Ａｂｕ）、ノルロイシン（ＮＩｅ）、ノルバリン（Ｎｖａ）、およびイソバリン（Ｉｖａ）は相互に置換し得る。側鎖が水素原子またはメチル基であるＧｌｙ、ＡｌａおよびＤ－アミノイソ酪酸（Ａｉｂ）は相互に置換し得る。中性極性アミノ酸であるＡｓｎおよびＧＩｎは相互に置換し得る

。２，４－ジアミノブタン酸（Ｄｂｕ）、およびオルニチン（Ｏｒｎ）は相互に置換し得る。Ｐｒｏと、ホモプロリン（ｈｏｍｏＰｒｏ）とは、相互に置換し得る。

[0057] 本開示において、芳香族アミノ酸残基の例として、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、２－アミノ－３－（１－ナフチル）プロピオン酸、２－アミノ－３－（２－ナフチル）プロピオン酸、２－メチルアミノ－３－（１Ｈ－インドール－３－イル）プロピオン酸のアミノ酸に由来するアミノ酸残基、および下式：

[化71]



で表されるアミノ酸残基が挙げられる。

[0058] 本開示において、K^1の定義における「炭素数１～４のアルキレン基」は、炭素数１～４個を有する直鎖状の二価の飽和炭化水素基を意味する。該アルキレンの例として、メチレン、ジメチレン、トリメチレン、テトラメチレンが挙げられる。

[0059] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのX^1は不存在であるか、あるいはX^2～X^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基（例えばＡｒｇ残基）である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのX^1は不存在である。

[0060] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのX^2は不存在であるか、あるいはX^3～X^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基（例えば、Ｌｙｓ残基、Ａｒｇ残基）である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのX^2は不存在である

。

[0061] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[3]は不存在であるか、あるいはＸ[4]～Ｘ[5]が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基（例えば、Ｇｌｙ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ａｌａおよび２－アミノイソ酪酸からなる群から選択されるアミノ酸残基）である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[4]～Ｘ[5]が存在し、Ｘ[3]はＧｌｙ、Ａｒｇ、およびＳｅｒからなる群から選択されるアミノ酸残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[3]は不存在である。

[0062] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[4]は不存在であるか、あるいはＸ[5]が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基（例えば、Ｐｒｏ、Ｌｙｓ、ホモシステイン、Ｇｌｙ、Ａｓｐ、およびホモプロリン残基からなる群から選択されるアミノ酸残基、好ましくはＰｒｏ残基）である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[5]が存在し、本開示のペプチドのＸ[4]はＰｒｏ、Ｌｙｓ、ホモシステイン、Ｇｌｙ、およびＡｓｐからなる群から選択されるアミノ酸残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[4]は不存在である。

[0063] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[5]は不存在であるか、あるいはＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基（例えばＡｓｐ、Ａｓｎ、Ａｒｇ、Ｇｌｕ、Ｓｅｒ、２－アミノブタン酸および２－アミノ－３－スルホプロピオン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基、好ましくはＡｓｐ、Ｇｌｕおよび２－アミノ－３－スルホプロピオン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基）であり、

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[5]はＡｓｐ残基である。

[0064] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのX^6はＣｙｓ、２－アミノブタン酸、およびＳ－メチルシステインからなる群から選択されるアミノ酸残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのX^6はＣｙｓ残基である。

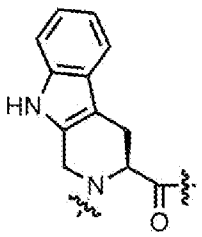
[0065] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのX^7はＡｌａおよびＴｈｒからなる群から選択されるアミノ酸残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのX^7はＡｌａ残基である。

[0066] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのX^8は任意の芳香族アミノ酸残基（例えば、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、２－アミノ－３－（１－ナフチル）プロピオン酸、２－アミノ－３－（２－ナフチル）プロピオン酸、２－メチルアミノ－３－（１Ｈ－インドール－３－イル）プロピオン酸および下記式（Ｉ）－２で表されるアミノ酸残基からなる群から選択されるアミノ酸残基

式（Ｉ）－２：

[化72]



）である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのX^8はＴｙｒ残基またはＴｒｐ残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのX^8はＴｙｒ残基である。

[0067] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのX^9はＨｉｓ残基で

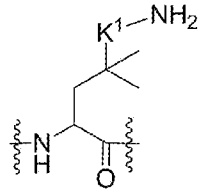
ある。

[0068] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{10}はＬｙｓ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ａｒｇ、オルニチン、２，４－ジアミノブタン酸（Ｄｂｕ）、Ｎ６－アセチルリジン、Ｎ５－アセチルオルニチン、２－アミノ－４－アセチルアミノブタン酸、２，３－ジアミノプロピオン酸（Ｄａｐ）、２－アミノ－３，３－ジメチルブタン酸、２－アミノ－４，４－ジメチルペンタン酸、３－シクロヘキシルアラニンおよび下記式（Ｉ）－１で表されるアミノ酸残基からなる群から選択されるアミノ酸残基である

式（Ｉ）－１：

[化73]

式(I)－1



（上記式（Ｉ）－１中、Ｋ^{1}は、炭素数１～４のアルキレン基、－（ＮＨ）－、－（Ｃ＝Ｏ）－、－Ｏ－およびこれらの組み合わせからなる２価の基から選択される）。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{10}はＬｙｓ、Ｌｅｕ、Ａｒｇ、２，４－ジアミノブタン酸（Ｄｂｕ）、２，３－ジアミノプロピオン酸（Ｄａｐ）からなる群から選択されるアミノ酸残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{10}はＬｙｓ残基、２，４－ジアミノブタン酸（Ｄｂｕ）、または２，３－ジアミノプロピオン酸（Ｄａｐ）残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{10}はＬｙｓ残基である。

[0069] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{11}はＧｌｙ、およびＣｙｓを除く任意のＤ－アミノ酸（例えばＤ－Ｉｌｅ、Ｄ－Ｐｒｏ、Ｄ

－Ａｒｇ、Ｄ－ＳｅｒおよびＤ－Ｌｙｓ）からなる群から選択されるアミノ酸残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[11]はＧｌｙ残基である。

[0070] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[12]はＧｌｕ、ＧｌｎおよびＡｓｎからなる群から選択されるアミノ酸残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[12]はＧｌｕ残基である。

[0071] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[13]はＬｅｕ残基である。

[0072] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[14]はＶａｌおよびＩｌｅからなる群から選択されるアミノ酸残基である。

本発明の１つの実施形態において、Ｘ[14]はＶａｌ残基である。

[0073] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[15]はＴｒｐ残基である。

[0074] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[16]はＣｙｓ、２－アミノブタン酸およびＳ－メチルシステインからなる群から選択されるアミノ酸残基である。

[0075] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[16]はＣｙｓ残基である。

[0076] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[17]は不存在であるか、あるいはＴｈｒ、Ｓｅｒ、Ｖａｌおよび２－アミノブタン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[17]はＴｈｒ残基である。

[0077] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ[18]は不存在であるか、あるいはＸ[17]が存在するときＰｈｅ、Ｈｉｓ、Ｔｙｒ、ホモシステイン（Ｈｃｙ）、３－シクロヘキシルアラニンおよびホモフェニルアラニンか

らなる群から選択されるアミノ酸残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{18}は不存在である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{17}が存在し、Ｘ^{18}はＰｈｅ、Ｈｉｓ、ホモシステイン（Ｈｃｙ）およびホモフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{17}が存在し、Ｘ^{18}はＰｈｅ残基である。

[0078] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{19}は不存在であるか、あるいはＸ^{17}～Ｘ^{18}が存在するときＨｉｓ、Ｔｙｒ、Ａｌａ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、３－（２－ピリジル）アラニン、３－（３－ピリジル）アラニンおよび３－（４－ピリジル）アラニンからなる群から選択されるアミノ酸残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{17}～Ｘ^{18}が存在し、Ｘ^{19}はＨｉｓ残基またはＴｙｒ残基である。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{17}～Ｘ^{18}が存在し、Ｘ^{19}はＨｉｓ残基である。

[0079] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{20}は不存在であるか、あるいはＸ^{17}～Ｘ^{19}が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基（例えばＬｙｓ残基）である。

本発明の１つの実施形態において、Ｘ^{20}は不存在である。

[0080] 上記のＸ^{1}～Ｘ^{20}のアミノ酸残基についての各実施形態において、Ｘ^{1}～Ｘ^{5}、Ｘ^{7}～Ｘ^{15}、およびＸ^{17}～Ｘ^{20}のアミノ酸残基は該ＰｙＯｘ基がコンジュゲートしている構造を有しうる。

[0081] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドは、下記から選択されるアミノ酸配列を含み（またはからなり）：

表A

X																				配列番号
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
				D	C	A	Y	H	L	G	E	L	V	W	C	T	F	H		2
				D	C	A	Y	H	Dbu	G	E	L	V	W	C	T	F	H		3
	K	G	P	D	C	A	Y	H	L	G	E	L	V	W	C	T	F	H		4
			K	D	C	A	Y	H	L	G	E	L	V	W	C	T	F	H		5
				D	C	A	Y	H	K	G	E	L	V	W	C	T	F	H		6
				D	C	A	Y	H	L	G	E	L	V	W	C	T	F	H	K	7
		G	Hcy	D	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	T	Hcy	H		8
				D	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	T				9
				D	C	A	Y	H	K	G	E	L	V	W	C	T				10
		G	P	D	C	A	Y	H	K	G	E	L	V	W	C	T	F	H		11
		R	G	N	C	A	Y	H	K	G	Q	L	V	W	C	T	Y	H		12
R	R	G	P	D	C	A	Y	H	K	G	E	L	V	W	C	T	F	H		13
				D	C	T	Y	H	R	G	N	L	V	W	C	T				14
				D	C	A	Y	H	R	G	N	L	V	W	C	T				15
				D	C	T	W	H	R	G	N	L	V	W	C	T				16
				D	C	T	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	T				17
				D	C	T	Y	H	R	G	N	L	I	W	C	T				18
				D	C	A	W	H	R	G	E	L	V	W	C	T				20
				R	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	S				21
		G	P	D	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	T	F	H		22
		G	P	R	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	S	F	H		24
		S	P	D	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	T	F	H		25
		G	D	D	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	T	F	H		26
		G	P	S	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	T	F	H		27
		G	P	D	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	S	F	H		28
		G	P	D	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	T	H	H		29
		G	P	D	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	T	F	Y		30
		S	P	D	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	T	F	Y		31
		S	D	D	C	A	Y	H	R	G	E	L	V	W	C	T	F	Y		32
				D	C	A	W	H	L	G	E	L	V	W	C	T				33

Ｃｙｓ残基以外の１つのアミノ酸残基（好ましくはＸ[10]）において、少なくとも１個（例えば１～４個、１～３個、１～２個、１個）の該ＰｙＯｘ基がコンジュゲートしているペプチドである。上記表中、配列番号１のアミノ酸残基（Ｘ[1]～Ｘ[20]）との対応を示し、空欄はアミノ酸残基の不存在を示しうる。

[0082] 本開示のペプチドにおいて、「コンジュゲートしている」とは、少なくとも１個（例えば１～４個、１～３個、１～２個、１個）の該ＰｙＯｘ基が直接またはリンカーを介して、アミノ酸残基に結合していることを意味する。

[0083] １つの実施形態において、該ＰｙＯｘ基は、Ｎ末端もしくはＣ末端、またはアミノ酸残基の側鎖にコンジュゲートしている。

１つの実施形態において、該ＰｙＯｘ基は、アミノ酸残基の側鎖にコンジュゲートしている。

[0084] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドは、少なくとも１個の該ＰｙＯｘ基が、X^{2}、X^{4}、X^{8}～X^{10}、およびX^{20}から選択される１つのアミノ酸残基においてコンジュゲートしている。

[0085] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドは、少なくとも１個の該ＰｙＯｘ基が、X^{2}、X^{4}、X^{10}、およびX^{20}から選択される１つのアミノ酸残基においてコンジュゲートしている。

[0086] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドは、少なくとも１個の該ＰｙＯｘ基が、X^{8}～X^{10}（好ましくはX^{10}）から選択される１つのアミノ酸残基においてコンジュゲートしている。

本願実施例の結果によれば、本開示のペプチドを用いる抗体の修飾により、ハーセプチンの重鎖（配列番号３６）の２４９番目と２５１番目のリジンが特異的に修飾されていることが示唆された。本願図６の抗体結合性ペプチド１５Ｌ－ＩｇＢＰとハーセプチンとの複合体の結晶構造によれば、本開示のペプチドのX^{8}～X^{10}に相当する位置のアミノ酸残基が、３次構造において当該２４９番目と２５１番目のリジンの近傍に存在する。X^{8}～X^{10}のいずれかに該ＰｙＯｘ基が存在することは、当該リジンの効率的な修飾に好ましいと推測されるが、当該推測は本願発明を何ら制限するものではない。

[0087] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドは、下記から選択されるアミノ酸配列を含み（またはからなり）：

表B

X																			配列番号
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
				D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	H		35
	K	G	P	D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	H		19
			K	D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	H		23
				D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	H		68
				D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	H	K	69
		G	Hcy	D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	Hcy	H		70
				D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T				71
		G	P	D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	H		72
		R	G	N	C	A	Y	H	X^{10}	G	Q	L	V	W	C	T	Y	H		73
R	R	G	P	D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	H		74
				D	C	T	Y	H	X^{10}	G	N	L	V	W	C	T				75
				D	C	A	Y	H	X^{10}	G	N	L	V	W	C	T				76
				D	C	T	W	H	X^{10}	G	N	L	V	W	C	T				77
				D	C	T	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T				78
				D	C	T	Y	H	X^{10}	G	N	L	I	W	C	T				79
				D	C	A	W	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T				80
				R	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	S				81
		G	P	R	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	S	F	H		82
		S	P	D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	H		83
		G	D	D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	H		84
		G	P	S	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	H		85
		G	P	D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	S	F	H		86
		G	P	D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	H	H		87
		G	P	D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	Y		88
		S	P	D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	Y		89
		S	D	D	C	A	Y	H	X^{10}	G	E	L	V	W	C	T	F	Y		90

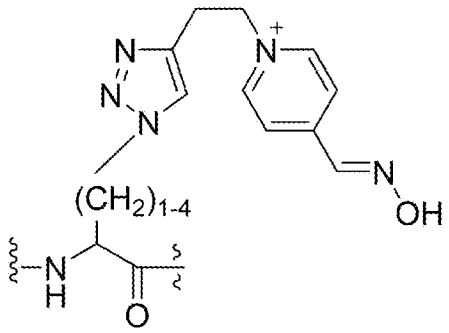
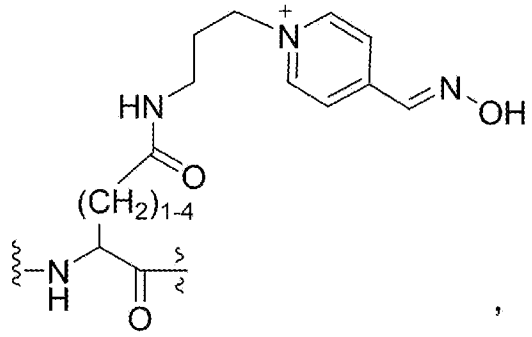
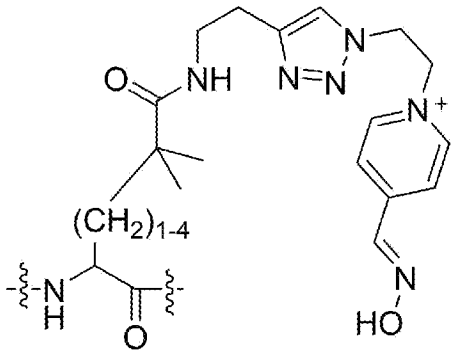
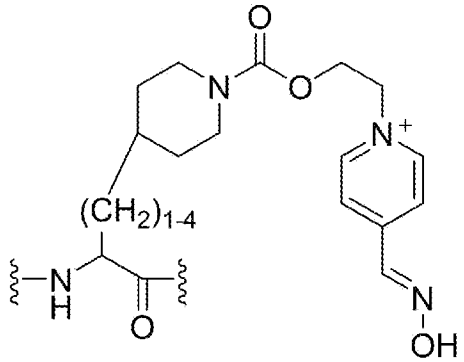
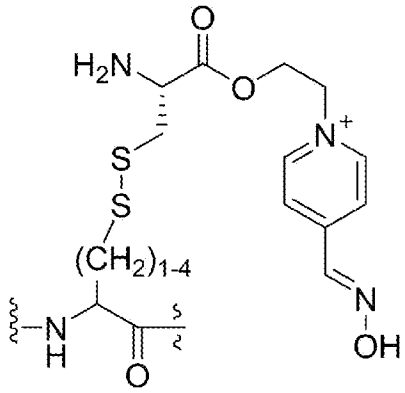
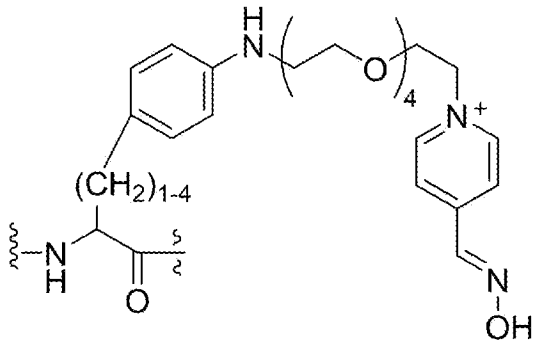
X^{10}は、少なくとも１個（例えば１～４個、１～３個、１～２個、１個）の該ＰｙＯｘ基がコンジュゲートしたアミノ酸残基である。上記表中、配列番号１のアミノ酸残基（X^{1}～X^{20}）との対応を示し、空欄はアミノ酸残基の不存在を示しうる。

[0088] 本開示のペプチドにおいて、「リンカー」の構造は特に限定されないが、例えば、通常用いられるペプチドの化学コンジュゲーション法に由来する基を含有するリンカーが挙げられる。化学コンジュゲーション法の例としては、カルボジイミド化学、還元アミノ化（reductive amination）、シアニル化化学（例えばＣＤＡＰ化学）、マレイミド化学、ヒドラジド化学、エステル化学、およびＮ－ヒドロキシコハク酸イミド化学、クリック化学などが挙げられるが、これらに限られない。本開示のペプチドにおいて、「リンカー」

は、置換または非置換の炭素数１～２０のアルキレン基、置換または非置換の炭素数２～２０のアルケニレン基、置換または非置換の炭素数２～２０のアルキニレン基、置換または非置換の炭素数３～１０のシクロアルキレン基、置換または非置換の炭素数３～１０のシクロアルケニレン基、置換または非置換の炭素数６～１４のアリーレン基、置換または非置換の５員～１０員のヘテロアリーレン基、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）－、ポリオキシアルキレン基、アミノ酸残基、ペプチド鎖、ポリエチレングリコール鎖およびこれらの組み合わせからなる群から選択される２価基を含んでいてもよい。

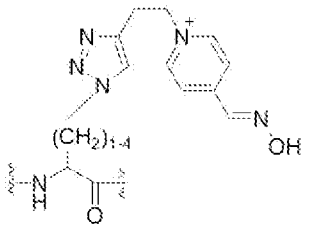
[0089] 本開示のペプチドの１つの実施形態において、該ＰｙＯｘ基がコンジュゲートしたアミノ酸残基（例えば、X^1～X^5、X^{10}、およびX^{20}から選択される１つのアミノ酸残基（好ましくはX^{10}））の構造として下記から選択される構造が挙げられる。

[化74]


,

,

,

,

および

)

[0090] 本開示のペプチドの１つの実施形態において、該ＰｙＯｘ基がコンジュゲートしたアミノ酸残基（例えば、Ｘ^{1}～Ｘ^{5}、Ｘ^{10}、およびＸ^{20}から選択される１つのアミノ酸残基（好ましくはＸ^{10}））の構造が下記構造である。

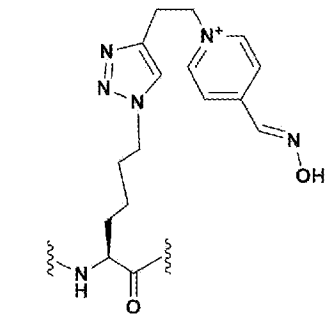
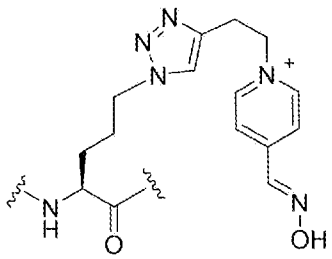
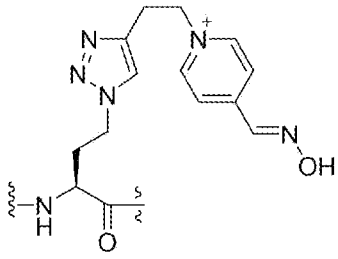
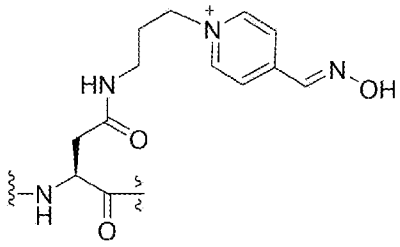
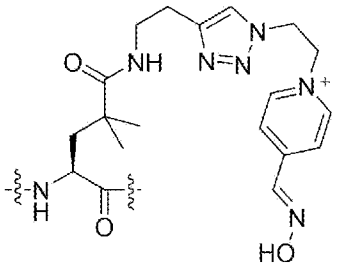
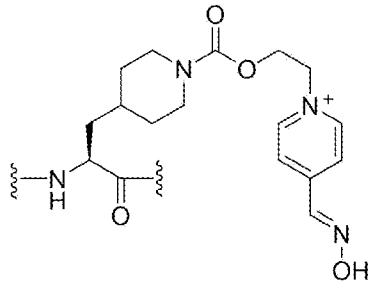
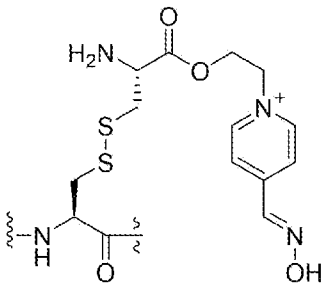
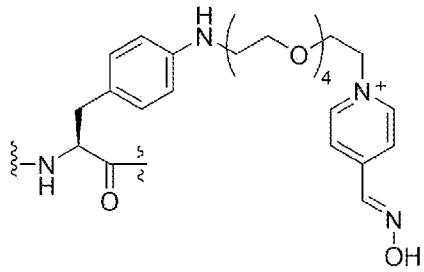
[化75]



）。

[0091] 本開示のペプチドの１つの実施形態において、該ＰｙＯｘ基がコンジュゲートしたアミノ酸残基（例えば、X^{1}～X^{5}、X^{10}、およびX^{20}から選択される１つのアミノ酸残基（好ましくはX^{10}））の構造として下記から選択される構造が挙げられる。

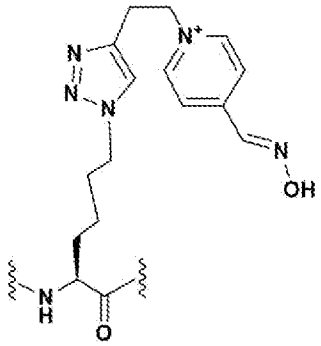
[化76]


,

,

,

,

,

,

および

)。

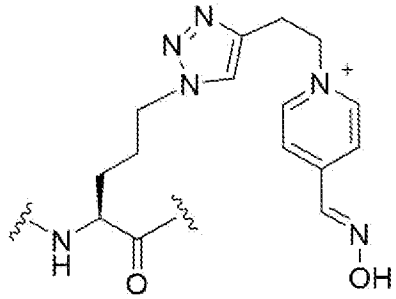
[0092] 本開示のペプチドの１つの実施形態において、該ＰｙＯｘ基がコンジュゲートしたアミノ酸残基（例えば、X^1～X^5、X^{10}、およびX^{20}から選択される１つのアミノ酸残基（好ましくはX^{10}））の構造として下記から選択され

る構造が挙げられる：

[化77]

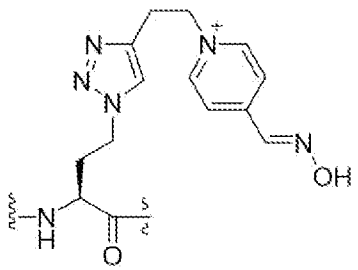


[化78]



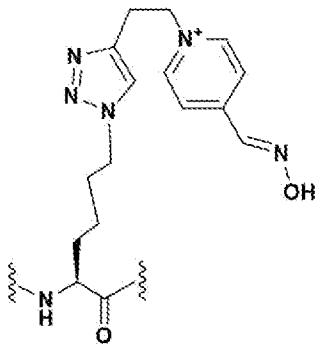
および

[化79]



、（好ましくは

[化80]



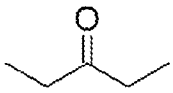
）。

[0093] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{6}とＸ^{16}がＣｙｓ残基である。

[0094] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{6}とＸ^{16}がＣｙｓ残基であり、Ｘ^{6}のＣｙｓ残基およびＸ^{16}のＣｙｓ残基間でジスルフィド結合を形成している、またはＸ^{6}およびＸ^{16}のＣｙｓ残基中のスルフィド基が下記式（Ｉ）－３で表される２価の基により連結されている。

[化81]

式（Ｉ）－３



[0095] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドのＸ^{6}とＸ^{16}がＣｙｓ残基であり、Ｘ^{6}のＣｙｓ残基およびＸ^{16}のＣｙｓ残基間でジスルフィド結合を形成している。

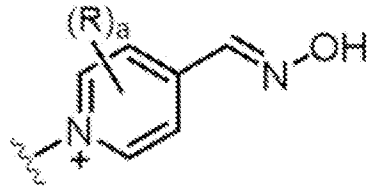
[0096] 本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドはＮ末端でアセチル化されているか、Ｃ末端でアミド化されているか、またはＮ末端でアセチル化されていてかつＣ末端でアミド化されている。

本発明の１つの実施形態において、本開示のペプチドはＮ末端でアセチル化されていてかつＣ末端でアミド化されている。

[0097] 本発明のペプチドの製造方法は特に限定されず、公知の方法に従って製造することができる。例えば、本願実施例の方法に従って、公知の方法により製造することができる。

[0098] 本発明は、１つの態様として、溶媒中、少なくとも１個（例えば１～４個、１～３個、１～２個、１個）の下記基：

[化82]



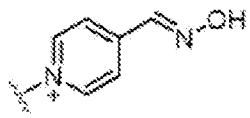
[式中、

Ｒは、Ｃ$_{1-3}$アルキル基（例えばメチル、エチル）、Ｃ$_{1-3}$アルコキシ基（例えばメトキシ）、ハロ、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ$_2$、エステル基（例えばメチルエステル、エチルエステル、１－プロピルエステル、２－プロピルエステル、ピバロイルオキシメチルエステル、アセチルオキシメチルエステル、シクロヘキシルアセチルオキシメチルエステル、１－メチルシクロヘキシルカルボニルオキシメチルエステル、エチルオキシカルボニルオキシ－１－エチルエステル、シクロヘキシルオキシカルボニルオキシ－１－エチルエステル）、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、－ＳＯ$_3$Ｈ、－ＣＮ、および－ＮＯ$_2$から独立して選択され；

ａは０～４から選択される整数である]

（好ましくは

[化83]



）

がコンジュゲートした、（好ましくは抗体と結合可能な）ペプチドの存在下、抗体を、ペイロードを保持する（tethering）Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドで処理する工程を含む、抗体の修飾方法（以下、「本開示の修飾方法」と称することがある）を提供する。

本開示の修飾方法は、例えば、溶媒中、該ペプチドの存在下、抗体と該Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドを混合することにより行うことができる。

本開示の修飾方法において、該ペプチドは、抗体に結合して、該Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドから該抗体の求核性アミノ酸へのアシル転移反応を促進し、ＡＧＯＸ化学における触媒として機能しうる。

[0099] 本開示の修飾方法において、「抗体」の例にはＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭが挙げられ、該ペプチドの結合部位（例えばＦｃ領域）を含むこれらのフラグメントであってもよい。これらの抗体に特異的に結合するペプチドを用いることで、抗体は修飾部位と修飾分子数を制御可能に修飾されうる。本開示の修飾方法において、「抗体」はポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれでもよく、好ましくはモノクローナル抗体である。

本開示の修飾方法の１つの実施形態において「抗体」は、ウサギ、ヒト、またはヒト化免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２またはＩｇＧ４）である。

本明細書において「ＩｇＧ」は、哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジーなどの霊長類、ラット、マウス、及びウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、及びヤギ等の家畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物のＩｇＧ、好ましくはヒトのＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４）を含みうる。本明細書におけるＩｇＧは、さらに好ましくは、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、若しくはＩｇＧ４、又はウサギＩｇＧであり、特に好ましくはヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、又はＩｇＧ４である。

[0100] 抗体は、公知の手段によって取得することができる。例えば、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原の由来はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来する抗原を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種抗原に結合する抗体とヒト抗原との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

抗ＨＥＲ２抗体は、例えば米国特許第５８２１３３７号明細書、米国特許

第５７２５８５６号明細書などの記載を適宜参照して得ることができる。

[0101] 本発明の１つの実施形態において、本開示の修飾方法は、本開示のペプチドを用いる、抗体の修飾方法である。本開示のペプチドはＩｇＧ（例えばＦｃ領域）に結合しうるため、本開示のペプチドを用いることで、抗体は修飾部位と修飾分子数を制御可能に修飾されうる。本願実施例の結果によれば、本開示のペプチドを用いる抗体の修飾方法により、ハーセプチンの重鎖（配列番号３６）の２４９番目と２５１番目のリジンが特異的に修飾されていることが示唆された。当該修飾部位の結果は本願発明を何ら制限するものではないが、本開示の修飾方法は、本開示のペプチドを用いることで、修飾部位と修飾分子数が制御可能でありうる。

[0102] 本開示の修飾方法において、「ペイロード」は特に限定されず、本開示の修飾方法により抗体にコンジュゲートされるべき物質部分を意味する。例えば抗癌剤、抗炎症剤、抗真菌剤、抗菌剤、抗寄生虫剤、抗ウイルス剤、麻酔剤、生物物理学的プローブ、フルオロフォア、スピン標識、赤外プローブ、親和性プローブ、キレート剤、分光プローブ、放射性プローブ、脂質分子、ポリエチレングリコール、ポリマー、スピン標識、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、ペプチド、表面、抗体、抗体断片、ナノ粒子、量子ドット、リポソーム、ＰＬＧＡ粒子、糖類もしくは多糖類などが挙げられる。

ペイロードはリンカーを介してＮ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドに保持されうるが、その方法は特に限定されず、当技術分野において公知の方法を用いて行うことができ、例えば、Tamura, T.; Song, Z.; Amaike, K.; Lee, S.; Yin, S.; Kiyonaka, S.; Hamachi, I. Affinity-Guided Oxime Chemistry for Selective Protein Acylation in Live Tissue Systems. J. Am. Chem. Soc. 2017, 139 (40), 14181-14191.、Tamura, T.; Ueda, T.; Goto, T.; Tsukidate, T.; Shapira, Y.; Nishikawa, Y.; Fujisawa, A.; Hamachi, I. Rapid Labelling and Covalent Inhibition of Intracellular Native Proteins Using Ligand-Directed N-Acyl-N-Alkyl Sulfonamide. Nat. Commun. 2018, 9 (1), 1-12等に記載の方法に基づいて行うことができる。

[0103] 本開示の修飾方法において、「溶媒」は水性溶媒であり、抗体とペイロードの結合が形成するものであれば、特に限定されない。例えば、緩衝液（例えば、ＨＥＰＥＳバッファー、Ｔｒｉｓバッファー）が挙げられる。

溶媒のｐＨは、抗体とペイロードの結合が形成する範囲であれば、特に限定されないが、良好な反応速度および非特異的な抗体修飾防止の観点から、ｐＨは６～８．５が好ましく、６．５～８．２がさらに好ましい。

[0104] 本開示の修飾方法の反応温度は、抗体とペイロードの結合が形成するものであれば、特に限定されないが、例えば、１℃～４５℃、好ましくは４℃～４０℃、さらに好ましくは２０℃～４０℃、さらにより好ましくは２５℃～３７℃である。

[0105] 本開示の修飾方法において、該ペプチド、該抗体、該Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドの混合比率は特に限定されない。

本開示の修飾方法の１つの実施形態において、モル比率で、該抗体：該ペプチド＝１：０．０１～１：１００である。

本開示の修飾方法の１つの実施形態において、モル比率で、該抗体：該ペプチド＝１：０．１～１：１０である。

本開示の修飾方法の１つの実施形態において、モル比率で、該抗体：該Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミド＝１：０．０１～１：１０００である。

本開示の修飾方法の１つの実施形態において、モル比率で、該抗体：該Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミド＝１：０．１～１：１００である。

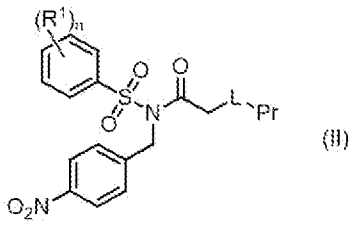
[0106] 本開示の修飾方法において、反応時間は抗体とペイロードの結合が形成する限り限定されないが、１分～２４時間、好ましくは１０分～１０時間、さらに好ましくは３０分～５時間とすることができる。

[0107] 本発明の１つの実施形態において、本開示の修飾方法は抗体とペイロードとの複合体（conjugate）の製造方法のために用いられる。該製造方法は、抗体を、ペイロードを保持する（tethering）Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドで処理する工程の後、必要に応じて、生じた複合体を精製する工程

をさらに含んでよい。該精製工程は、本分野で公知の方法、例えば、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、及びＨＰＬＣ等のクロマトグラフィー等により行うことができる。

[0108] 本発明の１つの実施形態において、該ペイロードを保持する（tethering）Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドは式（ＩＩ）：

[化84]



(II)

[式中、

Ｌはリンカーを示し；

Ｐｒはペイロードを示し；

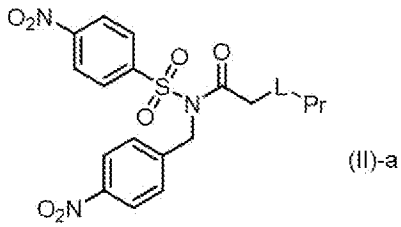
Ｒ[1]は独立して、１～３個のハロで適宜置換されていてもよいＣ$_{1-3}$アルキル、１～３個のハロで適宜置換されていてもよいＣ$_{1-3}$アルコキシ、ハロ、および－ＮＯ$_2$（好ましくは－ＮＯ$_2$）から選択され；

ｎは０～５（好ましくは１～３）から選択される整数である]

を有する。

[0109] 本発明の１つの実施形態において、該ペイロードを保持する（tethering）Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドは式（ＩＩ）－ａ：

[化85]



(II)-a

[式中、

Ｌはリンカーを示し；

Ｐｒはペイロードを示す]

を有する。

[0110] Ｌのリンカーは、抗体とＰｒ（ペイロード）の結合が形成するものであれば、特に限定されず、ペイロードの種類や、本開示の修飾方法により得られる抗体とペイロードとの複合体（conjugate）と使用目的等により、選択されうる。

例えば、Ｌのリンカーは、置換または非置換の炭素数１～２０のアルキレン基、置換または非置換の炭素数２～２０のアルケニレン基、置換または非置換の炭素数２～２０のアルキニレン基、置換または非置換の炭素数３～１０のシクロアルキレン基、置換または非置換の炭素数３～１０のシクロアルケニレン基、置換または非置換の炭素数６～１４のアリーレン基、置換または非置換の５員～１０員のヘテロアリーレン基、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－、－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）－、ポリオキシアルキレン基、アミノ酸残基、ペプチド鎖、ポリエチレングリコールおよびこれらの組み合わせからなる群から選択される２価基が挙げられる。

[0111] 該ペイロードを保持する（tethering）Ｎ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドの製造方法は特に限定されず、公知の方法に従って製造することができる。例えば、本願実施例の方法に従って、公知の方法により製造することができる。

[0112] 本開示において、アルキル基の例としては、メチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、イソブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基、ｎ－ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、１，２－ジメチルプロピル基、ｎ－ヘキシル基、１，３－ジメチルブチル基、１－イソプロピルプロピル基、１，２－ジメチルブチル基、ｎ－ヘプチル基、１，４－ジメチルペンチル基、２－メチル－１－イソプロピルプロピル基、１－エチル－３－メチルブチル基、ｎ－オクチル基、２－エチルヘキシル基、３－メチル－１－イソプロピルブチル基、２－メチル－１－イソ

プロピル基、１－ｔｅｒｔ－ブチル－２－メチルプロピル基などが挙げられる。

アルキレン基の例としては上記アルキル基の例を２価とした基が挙げられる。

「置換または非置換の炭素数１～２０のアルキレン基」において、アルキレン基の置換基の例として－ＯＨ、ハロ、およびC_{1-3}アルコキシが挙げられ、アルキレン基は１または数個（例えば１～３個）の置換基で置換されうる。

[0113] 本開示において、アルケニル基の例としては、ビニル基、アリル基、イソプロペニル基、１－ブテニル基、２－ブテニル基、２－メチル－２－プロペニル基、１－メチル－２－プロペニル基、２－メチル－１－プロペニル基、ペンテニル基、１－ヘキセニル基、３，３－ジメチル－１－ブテニル基などが挙げられる。

アルケニレン基の例としては上記アルケニル基の例を２価とした基が挙げられる。

「置換または非置換の炭素数２～２０のアルケニレン基」において、アルケニレン基の置換基の例として－ＯＨ、ハロ、およびC_{1-3}アルコキシが挙げられ、アルケニレン基は１または数個（例えば１～３個）の置換基で置換されうる。

[0114] 本開示において、アルキニル基の例としては、エチニル基、１－プロピニル基、２－プロピニル基、１－ブチニル基、２－ブチニル基、３－ブチニル基、３－メチル－１－プロピニル基、２－メチル－３－プロピニル基、ペンチニル基、１－ヘキシニル基、３－メチル－１－ブチニル基、３，３－ジメチル－１－ブチニル基などが挙げられる。

アルキニレン基の例としては上記アルキニル基の例を２価とした基が挙げられる。

「置換または非置換の炭素数２～２０のアルキニレン基」において、アルキニレン基の置換基の例として－ＯＨ、ハロ、およびC_{1-3}アルコキシが挙げ

られ、アルキニレン基は１または数個（例えば１～３個）の置換基で置換されうる。

[0115] 本開示において、シクロアルキル基の例としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基などが挙げられる。

シクロアルキレン基の例としては上記シクロアルキル基の例を２価とした基が挙げられる。

「置換または非置換の炭素数３～１０のシクロアルキレン基」において、シクロアルキレン基の置換基の例として－ＯＨ、ハロ、$Ｃ_{1-3}$アルキル、および$Ｃ_{1-3}$アルコキシが挙げられ、シクロアルキレン基は１または数個（例えば１～３個）の置換基で置換されうる。

[0116] 本開示において、シクロアルケニル基の例としては、シクロプロペニル基、シクロブテニル基、シクロペンテニル基、シクロペンタジエニル基、シクロヘキセニル基、シクロヘキサジエニル基、シクロヘプテニル基、シクロオクテニル基などが挙げられる。

シクロアルケニレン基の例としては上記シクロアルケニル基の例を２価とした基が挙げられる。

「置換または非置換の炭素数３～１０のシクロアルケニレン基」において、シクロアルケニレン基の置換基の例として－ＯＨ、ハロ、$Ｃ_{1-3}$アルキル、および$Ｃ_{1-3}$アルコキシが挙げられ、シクロアルケニレン基は１または数個（例えば１～３個）の置換基で置換されうる。

[0117] 本明細書において、アリール基の例としては、フェニル基、１－ナフチル基、２－ナフチル基、１－アントラセニル基、２－アントラセニル基、９－アントラセニル基などが挙げられる。

アリーレン基の例としては上記アリール基の例を２価とした基が挙げられる。

「置換または非置換の炭素数６～１４のアリーレン基」において、アリーレン基の置換基の例として－ＯＨ、ハロ、$Ｃ_{1-3}$アルキル、および$Ｃ_{1-3}$アル

コキシが挙げられ、アリーレン基は１または数個（例えば１～３個）の置換基で置換されうる。

[0118] 本開示において、ヘテロアリール基は、環を構成する原子として、炭素原子の他に、窒素原子、酸素原子及び硫黄原子から選ばれる１乃至６個のヘテロ原子を有し、環を構成する原子の数が３乃至１４である芳香族複素環であり、単環及び縮合環を含む。ヘテロアリール基の例としては、２－チエニル基、４－ピリジル基、３－ピリジル基、２－ピリジル基、１－ピリジル基、２－フリル基、２－ピリミジニル基、２－ベンゾチアゾリル基、１－イミダゾリル基、１－ピラゾリル基、ベンゾトリアゾール－１－イル基、７－アザベンゾトリアゾール－１－イル基などが挙げられる。

ヘテロアリーレン基の例としては上記ヘテロアリール基の例を２価とした基が挙げられる。

「置換または非置換の５員～１０員のヘテロアリーレン基」において、ヘテロアリーレン基の置換基の例として－ＯＨ、ハロ、C_{1-3}アルキル、およびC_{1-3}アルコキシが挙げられ、ヘテロアリーレン基は１または数個（例えば１～３個）の置換基で置換されうる。

[0119] 本開示において、「ハロ」とはフルオロ、クロロ、ブロモまたはヨードを意味する。

[0120] 本開示において、「C_{1-3}アルキル」とは、炭素数１～３個の直鎖又は分枝鎖状の飽和炭化水素基を意味する。「C_{1-3}アルキル」の例として、メチル、エチル、プロピル、イソプロピルが挙げられる

[0121] 本開示において、「C_{1-3}アルコキシ」とは、炭素数１～３個の直鎖又は分枝鎖アルコキシを意味する。「C_{1-3}アルコキシ」の例として、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシが挙げられる。

[0122] 本開示において、「エステル基」の例として、メチルエステル、エチルエステル、１－プロピルエステル、２－プロピルエステル、ピバロイルオキシメチルエステル、アセチルオキシメチルエステル、シクロヘキシルアセチルオキシメチルエステル、１－メチルシクロヘキシルカルボニルオキシメチル

エステル、エチルオキシカルボニルオキシ－１－エチルエステル、シクロヘキシルオキシカルボニルオキシ－１－エチルエステルが挙げられる。

[0123] 本明細書において、範囲を示す「Ａ～Ｂ」は、特記しない限り、「Ａ以上Ｂ以下」を意味する。

実施例

[0124] 以下、試験例を挙げて、本願発明を説明するが、本願発明はこれらの試験例に限定されるものではない。

試験例におけるグリシン以外のアミノ酸は特段の記載がない限りＬ体を示す。

[0125] 試験例１

試験例１－１　ＩｇＧ結合性ペプチド／ＰｙＯｘ－ＩｇＧ結合性ペプチドの合成

ＩｇＧ結合性ペプチドとして１５Ｌ－ＩｇＢＰ（配列番号９１）を合成した。また、ＰｙＯｘ－ＩｇＧ結合性ペプチドとして以下４種類（１５Ｌ－ＸＧＰ（配列番号９２）、１５Ｌ－ＮｔＸ（配列番号９３）、１５Ｌ－ＣｔＸ（配列番号９４）、及び１５Ｌ－Ｌ６Ｘ（配列番号９５））を合成した。

15L-IgBP
(lead peptide, K_d = 8.1 nM)　**Ac-DCAYHLGELVWCTFH-NH_2**

15L-XGP　Ac-**XGP**DCAYHLGELVWCTFH-NH_2

15L-NtX　Ac-**X**DCAYHLGELVWCTFH-NH_2

15L-CtX　Ac-DCAYHLGELVWCTFH**X**-NH_2

15L-L6X　Ac-DCAYH**X**GELVWCTFH-NH_2

合成した各ペプチドの配列を以下に示す。

１５Ｌ－ＩｇＢＰ：Ａｃ－ＤＣＡＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴＦＨ－NH_2（配列番号９１）

１５Ｌ－ＸＧＰ：Ａｃ－ＸＧＰＤＣＡＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴＦＨ－NH_2（配列番号９２）

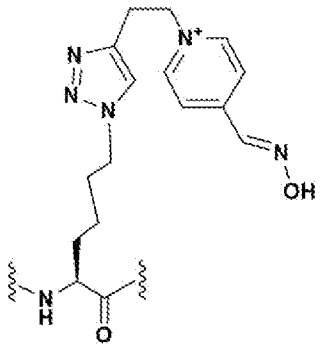
１５Ｌ－ＮｔＸ：Ａｃ－ＸＤＣＡＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴＦＨ－NH_2（配列番号９３）

１５Ｌ－ＣｔＸ：Ａｃ－ＤＣＡＹＨＬＧＥＬＶＷＣＴＦＨＸ－NH_2（配列番号９４）

１５Ｌ－Ｌ６Ｘ（またはＰｙＯｘ－Ｃ４－ＩｇＢＰ）：Ａｃ－ＤＣＡＹＨＸＧＥＬＶＷＣＴＦＨ－NH_2（配列番号９５）

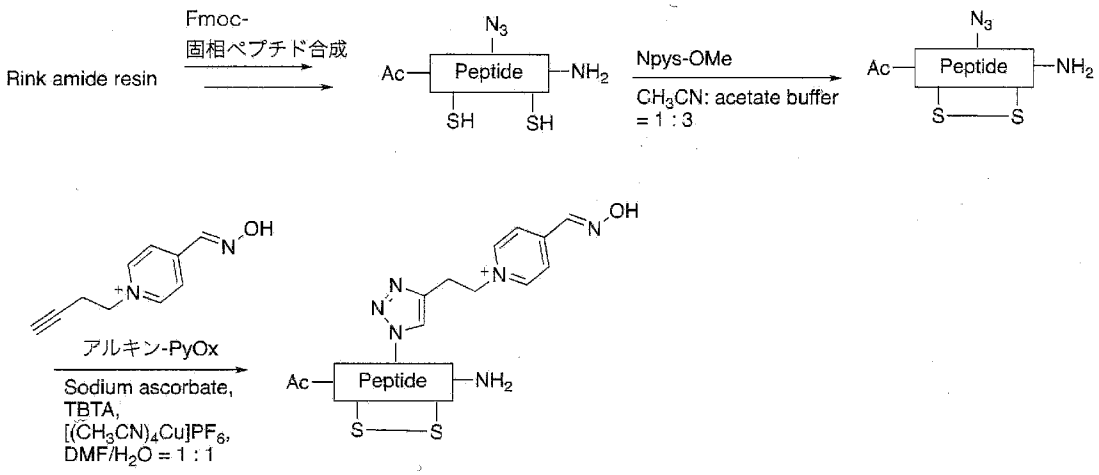
Ｘ＝

[化86]



[0126] 自動ペプチド合成機Ｐｒｅｌｕｄｅ（商標）を用いて、Ｆｍｏｃ固相合成法により上記配列番号９１～配列番号９５の各ペプチドを合成した。配列番号９２～配列番号９５のＰｙＯｘ－ＩｇＧ結合性ペプチドについては具体的には下記の方法に従った。

[化87]



Ｒｉｎｋ　ａｍｉｄｅ　ｒｅｓｉｎ（４０μｍｏｌ）をＤＭＦで膨潤させたのち、２０％ピペリジン／ＤＭＦにより、１０分間２回処理することでＦｍｏｃ基を脱保護した。ＤＭＦで樹脂を洗浄し、ＨＡＴＵ（５ｅｑ．）、ＨＯＡｔ（５ｅｑ．）、ＤＩＰＥＡ（１０ｅｑ．）を用い、Ｆｍｏｃ－アミノ酸（５ｅｑ．）を縮合した。脱保護と縮合のサイクルを繰り返し、目的のペプチド鎖長まで伸長した。Ｎ末端は、ＤＭＦ溶媒中、無水酢酸（３ｅｑ．）とＤＩＥＡ（３ｅｑ．）にて１５分間処理することで、アセチルキャッピングを行った。得られた樹脂を乾燥後、トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：１，３－ジメトキシベンゼン＝１００：１：２の溶液で３時間処理し、脱樹脂を行った。窒素気流によりトリフルオロ酢酸を揮発させ、氷冷下、ジエチルエーテルを加えることで、粗ペプチドを析出させた。エーテルで２回洗浄後、クルードを減圧乾燥し、逆相ＨＰＬＣにて精製することでチオールフリーのアジドペプチドを得た。このペプチドをアセトニトリル：酢酸緩衝液（１００ｍＭ，ｐＨ４．５）＝１：３に溶解し、Ｎｐｙｓ－ＯＭｅ（Methyl 3-nitro-2-pyridinesulfenate）（５ｅｑ．）を加え、一時間室温で撹拌することで、分子内ジスルフィド結合を形成した。この反応液を濃縮・凍結乾燥したのち、エーテルで洗浄し、得られた粗ペプチドを精製せずにクリック反応に用いた。クリック反応では、ペプチドをＤＭＦ／水＝１：１（１ｍＭ）に溶解し、アルキン－ＰｙＯｘ（１．１ｅｑ）、アスコルビン酸ナト

リウム（６ｅｑ．）、ＴＢＴＡ（２ｅｑ）、テトラキス（アセトニトリル）銅（Ｉ）ヘキサフルオロホスフェイト（２ｅｑ．）を加え、室温で一時間撹拌した後、逆相ＨＰＬＣで精製することでＰｙＯｘ－ＩｇＧ結合性ペプチドを得た。

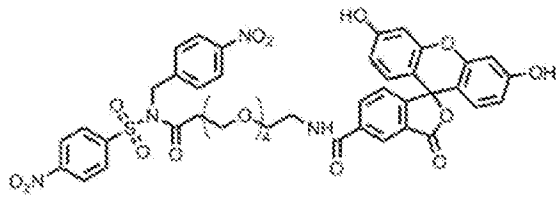
[0127] 試験例１-２　ハーセプチンのＩｎ　ｖｉｔｒｏラベル化

試験例１－１の４種類のＰｙＯｘ－ＩｇＧ結合性ペプチドを用いて、乳癌治療薬である抗Ｈｅｒ２ヒト化モノクローナル抗体（ハーセプチン）の試験管内ラベル化実験を行なった。

[0128] ＜ＮＡＳＡアシルドナーの合成＞

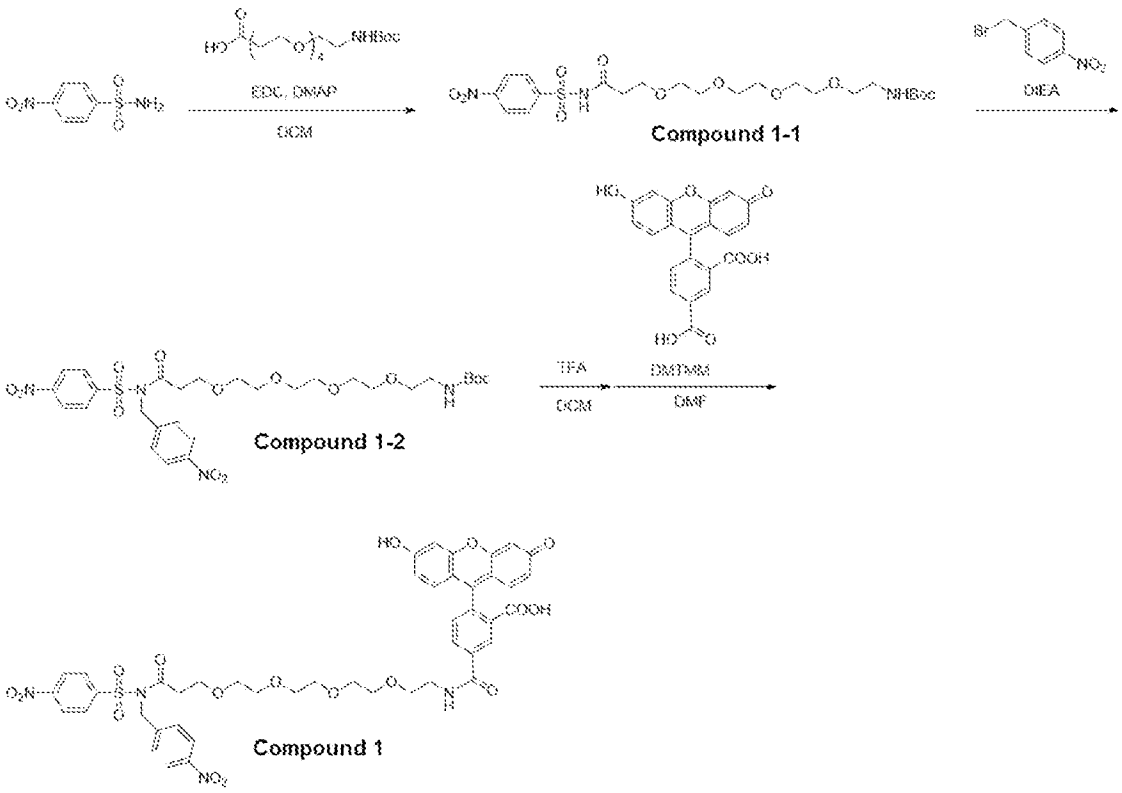
下記構造のＮＡＳＡアシルドナー（ＮＡＳＡ－ＦＬ）を化合物１（Compound 1）とする。この化合物１は、下記反応式に示すように、４－ニトロベンゼンスルホンアミドから化合物１－１（Compound 1-1）、化合物１－２（Compound 1-2）を経て合成される。

[化88]



NASA-FL

[化89]



[0129] 化合物１－１の合成

４－ニトロベンゼンスルホンアミド（９９．６ｍｇ，０．４９０ｍｍｏｌ）を１ｍＬの塩化メチレンに溶解し、そこにＢｏｃ－ＮＨ－ＰＥＧ４－ＣＯＯＨ（１５０ｍｇ，０．４１０ｍｍｏｌ）、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（ＥＤＣ）（１５７ｍｇ，０．８２０ｍｍｏｌ）と４－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）（２５．０ｍｇ，０．２１０ｍｍｏｌ）を加えた。この混合物を室温で５時間撹拌した。反応生成物に５ｍＬの塩化メチレンを加え、１Ｍ　ＨＣｌで洗浄した。有機層をNa_2SO_4で脱水し、濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（$CHCl_3$／ＭｅＯＨ＝１０：１）によって精製することで化合物１－１（１４３ｍｇ，０．２６０ｍｍｏｌ，５３％）を得た。

[0130] 化合物１－２の合成

化合物１－１（７９．５ｍｇ，０．１４５ｍｍｏｌ）を０．５ｍＬのＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）に溶解し、そこに４－ニトロベンジル

ブロミド（３７．５ｍｇ，０．１７４ｍｍｏｌ）とＤＩＥＡ（５０μＬ，０．２８９ｍｍｏｌ）を加えた。この混合物を室温で４８時間撹拌した。溶媒留去後、得られた残渣に４ｍＬの酢酸エチルを加え、飽和食塩水で洗浄した。有機層をNa_2SO_4で脱水し、濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：ＥｔＯＡｃ＝１：２）によって精製することで化合物１－２（５６．７ｍｇ，０．０８２０ｍｍｏｌ，５７％）を得た。

[0131] 化合物１の合成

化合物１－２（６．９ｍｇ，１０μｍｏｌ）を０．５ｍＬの塩化メチレンに溶解し、そこに３０μＬのトリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）を加えた。この混合物を室温で１時間撹拌した。溶媒留去後、得られた残渣を０．５ｍＬのＤＭＦに溶解し、そこに５－カルボキシフルオレセイン（４．５ｍｇ，１２μｍｏｌ）、４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロリド（ＤＭＴ－ＭＭ）（３．３ｍｇ，１２μｍｏｌ）およびＮ－メチルモルホリン（ＮＭＭ）（３．３μＬ，３０μｍｏｌ）を加えた。この混合物を室温で３０分撹拌した。溶媒留去後、得られた残渣を逆相ＨＰＬＣ（０．１％ＴＦＡ含有アセトニトリル：０．１％ＴＦＡ含有水＝４０：６０-７０：３０のグラジエント溶出）にて精製し、化合物１（７．１ｍｇ，７．５μｍｏｌ，７５％）を得た。

[0132] ＜方法＞

ハーセプチン（１μＭ）を（阻害条件の場合は１５Ｌ－ＩｇＢＰ（１０μＭ）と共に）１．５ｍＬ容エッペンドルフ管に加え、ＨＥＰＥＳバッファー（５０ｍＭ、ｐＨ７．４）中で１０分間プレインキュベーションした。ＰｙＯｘ－ＩｇＧ結合性ペプチド（１μＭ）を加え、ついでアシルドナー（ＮＡＳＡ－ＦＬ）（１０μＭ）を加え、３７℃で３時間インキュベーションした。ＳＤＳサンプルバッファー（２５０ｍＭ　ＤＴＴ含有）を５回加え、９５℃で５分間煮沸した。４℃で２．５時間静置し、次いでＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（検出１２．５％　ＡＡ、１０μＬ　ｌｏａｄ、Ｌ

ＡＳ４０００）を行った。

結果を図１に示す。

[0133] ＜考察＞

レーン２、４、６、および８から、ＰｙＯｘ－ＩｇＧ結合性ペプチドの添加条件で抗体重鎖へ選択的なラベル化バンドが観測された。このラベル化をレーン１、３、５、７、９と比較するとＰｙＯｘ－ＩｇＧ結合性ペプチド非添加条件や競合阻害剤（１５Ｌ－ＩｇＢＰ）添加条件ではほとんど進行しないことから、抗体-ペプチド相互作用に基づくラベル化であることが確認された。

[0134] 試験例１-３　ＦＬ修飾ハーセプチンの修飾部位解析

ＰｙＯｘ－ＩｇＧ結合性ペプチドによるラベル化が部位特異的に進行しているか確かめるために、ＦＬ（Fluorescein）ラベル化抗体の修飾部位解析をペプチドマッピング法によって行なった。

[0135] ＜条件およびプロトコル＞

[0136] １．１５Ｌ－Ｌ６Ｘを用いるＩｇＧ標識

ハーセプチン（１μＭ）（５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳバッファー（ｐＨ７．４））１０ｍＬとアシルドナー（ＮＡＳＡ－ＦＬ）（１０μＭ）、１５Ｌ－Ｌ６Ｘ（２μＭ（２ｅｑ））混合して、３７℃で６時間インキュベーションした。

[0137] ２．ゲル濾過クロマトグラフィー（分子ふるいクロマトグラフィー）

（１）溶液をＡｍｉｃｏｎ（商標）　Ｕｌｔｒａ－１５　１０Ｋフィルター装置で１．５ｍＬに濃縮し、４５００ｒｐｍで計１０分間遠心分離した。クロマトグラフィーカラムにＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（商標）ＨＷ－Ｆ４０（１５ｍＬ）加え、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓバッファー（ｐＨ　８．０）（４５ｍＬ）で洗浄し、反応溶液を加え、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓバッファー（ｐＨ８．０）で精製した。１ｍＬずつサンプルチューブに回収（ｘ９サンプル）した。

Ｎａｎｏｄｒｏｐ（商標）を用いて各フラクション（Ｎｏ．１－９）のＵＶ－Ｖｉｓスペクトル解析を行った。ＵＶ－Ｖｉｓスペクトル解析結果を図２に

示す。

（２）濃度及びラベル化率決定

フラクションＮｏ．３、４および５は２８０ｎｍおよび４９０ｎｍに吸収スペクトルを有した。フラクションＮｏ．３－５を混合し、Ａｍｉｃｏｎ（商標）Ｕｌｔｒａ－４　１０Ｋフィルター装置で６５０～７００μＬにまで濃縮した。

（２）－ｉ　総ＩｇＧ濃度をＢＣＡアッセイで検出した。ＩｇＧは１０．８μＭ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓバッファー（ｐＨ８．０））であった。

（２）－ii　ＦＬ濃度をＵＶ－Ｖｉｓ　スペクトル解析で決定した。ＵＶ－Ｖｉｓ　スペクトル解析結果を図３に示す。

４９８ｎｍのＡｂｓ＝１．３４３１を用い、ＦＬの４９８ｎｍのモル吸光係数ε_{498}（ｐＨ８．０）＝７５０００ｃｍ$^{-1}$Ｍ$^{-1}$として算出すると、［ＦＬ］＝１７．７μＭであった。

（２）－ｉおよびｉｉよりラベル化率は１６４％と算出された。

[0138] ３．透析

透析膜Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ（商標）６　Ｐｒｅ－ｗｅｔｔｅｄ　Ｄｉａｌｙｓｉｓ　Ｔｕｂｉｎｇ（ＭＷＣＯ：１０ｋＤ）を用いてＦＬラベル化抗体の溶解バッファーを５０ｍＭ　NH_4HCO_3（ｐＨ７．８）に置換した。

[0139] ４．トリプシン／Ｌｙｓ－Ｃによるペプチド消化

１．５ｍＬ容ＬｏＢｉｎｄ管中、上記３で得られた４００μＬのＦＬ標識ハーセプチン溶液（９．０１μＭ，１４８ｋＤａ，５３３．４μｇ）に２０μＬの１％　ＰｒｏｔｅａｓｅＭＡＸ（商標）Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ）／５０ｍＭ　NH_4HCO_3　ａｑ．を加え、４．２μＬの０．５Ｍジチオトレイトール（ＤＴＴ）／５０ｍＭ　NH_4HCO_3　ａｑ．を最終濃度５ｍＭまで加え、５６℃で、２０分インキュベーションし、１４．６μＬの０．４５Ｍヨードアセトアミド（ＩＡＡ）／５０ｍＭ　NH_4HCO_3　ａｑ．を最終濃度１５ｍＭまで加え、室温で１５分間暗所で保存し、６００μＬの５０ｍＭ　NH_4HCO_3溶液を加えて、沈殿物を溶解した。１０μＬの

１％ＰｒｏｔｅａｓｅＭＡＸ（商標）および２０μＬの１μｇ／μＬ　トリプシン／Ｌｙｓ－Ｃ　Ｍｉｘ　Ｍａｓｓ　Ｓｐｅｃ　Ｇｒａｄｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を加え、３７℃で１６時間静置した。１６，０００　ｘ　ｇで２０秒間遠心分離して、粒子性の物質を除去した。１ｍＬの上清を別のサンプル管に移し、ＴＦＡを最終濃度０．５％まで加え、酵素を不活性化し、ＨＰＬＣ分析を行った。

[0140] ５．　ＨＰＬＣ分析およびＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ分析

９００μＬの酵素消化物をＨＰＬＣで分析し、続いてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（ｕｌｔｒａｆｌｅｘ）で分析した。

ＨＰＬＣ条件：０．１％ＴＦＡ含有アセトニトリル：０．１％ＴＦＡ含有水＝０：１００→６０：４０（１２０分，リニアグラジェント），流速０．５％／ｍｉｎ，吸収検出波長２２０ｎｍ、蛍光励起波長４９０ｎｍ，蛍光検出波長５２０ｎｍ

結果を図４に示す。

[0141] ピーク１～６それぞれのピーク面積比（％）は順に７．７８、４．１９、１０．７、１１．６、２２．１、４３．７（％）であった。

割合は１～６のピーク面積の和を１００％として算出した.

表１に蛍光ＨＰＬＣの主要ピークとその帰属を示す。

[表1]

表１

	observed mass (m/z)	calculated mass (m/z)	assign	FL ratio (%)
ピーク１	2545	–	–	7.78
ピーク２	1800, 2038 2013, 2151	–	–	4.19
ピーク３	1947	–	–	10.7
ピーク４	1679, 4220	–	–	11.6
ピーク５	3451	3450	226-251 fragment +FL	22.1
ピーク６	4267	4266	226-258 fragment +FL	43.7

[0142] ハーセプチンのアミノ酸配列を下記に示す。

（重鎖）（配列番号３６） EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYI HWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRF TI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG G DGFYAMDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSS KSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSG V HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YI CNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPE LLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STY RVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEK TIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSD GSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNH YT QKSLSLSPG （ジスルフィド架橋：２２－９６；１４７－２０３；２６４－３２４；３７０－４２８，ダイマー：２２９；２３２）
（軽鎖）（配列番号３７） DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVA WYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSRSG TD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ G TKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCL LNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSK D STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LS SPVTKSFN RGEC （ジスルフィド架橋：２３－８８；１３４－１９４；H２２３－L２１４，ダイマー）

[0143] ハーセプチンのトリプシン切断によって生じるペプチド配列：Ｔ１～Ｔ３０を下記に示す。

T１：　ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧ　ＬＶＱＰＧＧＳＬＲ（配列番号３８）
T２：　ＬＳＣＡＡＳＧＦＮＩＫ（配列番号３９）
T３：　ＤＴＹＩＨＷＶＲ（配列番号４０）
T４：　ＱＡＰＧＫ（配列番号４１）
T５：　ＧＬＥＷＶＡＲ（配列番号４２）
T６：　ＩＹＰＴＮＧＹＴＲ（配列番号４３）
T７：　ＹＡＤＳＶＫ（配列番号４４）
T８：　ＦＴＩＳＡＤＴＳＫ（配列番号４５）
T９：　ＮＴＡＹＬＱＭＮＳＬＲ（配列番号４６）
T１０：　ＡＥＤＴＡＶＹＹＣＳＲ（配列番号４７）
T１１：　ＷＧＧＤＧＦＹＡＭＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫ（配列番号４８）
T１２：　ＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫ（配列番号４９）
T１３：　ＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫ（配列番号５０）
T１４：　ＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳ　ＮＴＫ（配列番号５１）
T１５：　**ＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫ**（配列番号５２）
T１６：　ＤＴＬＭＩＳＲ（配列番号５３）
T１７：　ＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫ（配列番号５４）
T１８：　ＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫ（配列番号５５）
T１９：　ＴＫＰＲ（配列番号５６）
T２０：　ＥＥＱＹＮＳＴＹＲ（配列番号５７）
T２１：　ＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫ（配列番号５８）
T２２：　ＡＬＰＡＰＩＥＫ（配列番号５９）
T２３：　ＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲ（配列番号６０）
T２４：　ＥＥＭＴＫ（配列番号６１）
T２５：　ＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫ（配列番号６２）
T２６：　ＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫ（配列番号６３）
T２７：　ＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫ（配列番号６４）
T２８：　ＬＴＶＤＫ（配列番号６５）
T２９：　ＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫ（配列番号６６）
T３０：　ＳＬＳＬＳＰＧ（配列番号６７）

[0144]　下表はトリプシン消化後の理論上のペプチド断片を示す。

[Theoretical pI: 8.36 / Mw (average mass): 49156.47 / Mw (monoisotopic mass): 49125.44]

mass	position	#MC	artif.modification(s)		peptide sequence
6656.2929	151-213	0	Cys_CAM: 203	6713.3144	T14: DYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTK
2784.261	99-124	0			T11: WGGDGFYAMDYWGQGTLVTV SSASTK
2744.2456	420-442	0	Cys_CAM: 428	2801.2671	T29: WQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQK
2730.4145	226-251	0	Cys_CAM: 229, 232	2844.4575	T15: THTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPK
2544.1313	374-395	0			T26: GFYPSDIAVEWESNGQPENN YK
2082.0059	259-277	0	Cys_CAM: 264	2139.0274	T17: TPEVTCVVVDVSHEDPEVK
1882.0028	1-9	0			T1: EVQLVESGGGLVQPGGSLR
1873.9218	396-412	0			T27: TTPPVLDSDGSFFLYSK
1808.0064	305-320	0			T21: VVSVLTVLHQDWLNGK
1677.8019	278-291	0			T18: FNWYVDGVEVHNAK
1310.6521	77-87	0			T9: NTAYLQMNSLR
1286.6739	348-358	0			T23: EPQVYTLPPSR
1277.5467	88-98	0	Cys_CAM: 96	1334.5681	T10: AEDTAVYYCSR
1264.6565	137-150	0	Cys_CAM: 147	1321.678	T13: STSGGTAALGCLVK
1189.512	296-304	0			T20: EEQYNSTYR
1186.6466	125-136	0			T12: GPSVFPLAPSSK
1110.5612	20-30	0	Cys_CAM: 22	1167.5826	T2: LSCAASGFNIK
1104.6081	364-373	0	Cys_CAM: 370	1161.6296	T25: NQVSLTCLVK
1089.5476	31-38	0			T3: DTYIHWVR
1084.5422	51-59	0			T6: IYPTNGYTR
969.4887	68-76	0			T8: FTISADTSK
838.5032	330-337	0			T22: ALPAPIEK
835.4342	252-258	0			T16: DTLMISR
830.4519	44-50	0			T5: GLEWVAR
682.3406	60-65	0			T7: YADSVK
660.3563	443-449	0			T30: SLSLSPG
637.2861	359-363	0			T24: EEMTK
575.3399	413-417	0			T28: LTVDK
501.3143	292-295	0			T19: TKPR
500.2827	39-43	0			T4: QAPGK

[0145] ピーク５からは最小同位体ピーク＝３４５０．５ｍ／ｚのＭＳが得られたが、これはＬｙｓ２４９ラベル化ペプチド（すなわち、Ｔ１５＋ラベル（フルオレセイン））の分子量とよく一致する（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$のＥｘａｃｔ　ｍａｓｓ＝３４４９．６が最小同位体ピークの理論値）。

ピーク６からは最小同位体ピーク＝４２６６．９ｍ／ｚのＭＳが得られたが、これはＬｙｓ２５１ラベル化ペプチド（すなわち、Ｔ１５＋Ｔ１６＋ラベル（フルオレセイン））の分子量とよく位置する（［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$のＥｘａｃｔ　ｍａｓｓ＝４２６６．０５が最小同位体ピークの理論値）。

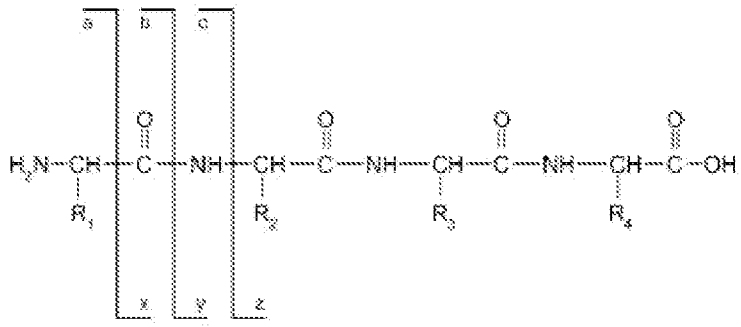
このように、Ｌｙｓ２４９、Ｌｙｓ２５１へラベル化が進行したことが示唆された。

ラベル価部位がＬｙｓ２４９およびＬｙｓ２５１であるかを厳密に示すにはＭＳ／ＭＳ解析を行わなければならないが、そもそも２２６－２５８のペプチドはＬｙｓ２５１へラベル価が進行しなければ観測されないため、こちらのラベル価部位はＬｙｓ２５１であると帰属できる。

[0146] 続いてＭＳ／ＭＳ解析を行い修飾部位を同定した。

ＭＳ／ＭＳ解析におけるフラグメントペプチドの分類は下記のとおりである。

[化90]



[0147] ピーク５について、ＭＳ／ＭＳ解析によりＬｙｓ２４９へのＦＬ修飾が進行したペプチドフラグメント［２２６－２５１］であることが同定された。ｙフラグメントはｙ１を除いてすべてのＭＳ／ＭＳピークが検出され、ｂフラグメントについてもｂ１，ｂ１０を除いてすべて同定された。

一方でピーク６に関してはＭＳ／ＭＳ解析によって修飾部位を明確に決定するデータは得られなかった。これは、ＭＳ解析の原理上、分子量が４０００を超える分子のフラグメント解析は困難であるためである。ただし、ｙ９＝ＲＳＩＭＬＴＤＫ＊Ｐ(m/z = 1685.743)が検出された結果は、Ｌｙｓ２５１への修飾体であることを直接的に支持している。ｙ９に帰属したピークは強度もあるため信頼性は高い。

１）修飾部位がＬｙｓ２５１であることを直接的に示すｙ９フラグメントが検出

２）そもそも４２６７ｍ／ｚのＭＳは「Ｌｙｓ２５１が化学修飾を受けたことでトリプシン消化を受けなくなった」場合にのみ観測されるＭＳピークである、という２つの根拠から、ピーク６のペプチドフラグメントはＬｙｓ２５１への修飾体であると同定した。

[0148] 試験例１-４

図６に１５Ｌ－ｌｇＢＰ－ハーセプチン複合体の結晶構造を示す。

該結晶構造より、この２つのＬｙｓ２４９、Ｌｙｓ２５１はリガンドとして使用したペプチドの抗体結合部位近傍（それぞれ誘導化部位から１８．８、６．８Å）に存在していることがわかった。

ハーセプチンにはＬｙｓ残基が４４個存在するため、部位特異性は極めて高いことが示唆された。

さらに、該結晶構造は、１５Ｌ－ｌｇＢＰの配列

$Ac-DCA\underline{YHL}GELVWCTFH-NH_2$

の下線部分のアミノ酸残基が３次構造において当該２４９番目と２５１番目のリジンの近傍に存在することを示す。

[0149] 修飾したハーセプチンをペプチド断片化し、ＨＰＬＣ分析を行なったところ、数多くのハーセプチン由来ペプチドフラグメントの中から、強いフルオレセイン蛍光を示す２本のピークが検出された。

この２つのフラクションについてＭＳ／ＭＳ解析により修飾部位の同定を

行ったところ、２４９番目と２５１番目のリジンが特異的に修飾されていることが明らかになった。結晶構造を見てみると、この２つのリジンはリガンドとして使用したペプチドの抗体結合部位近傍に存在していることがわかった。以上の結果から、本手法によるラベル化では、ハーセプチンに４４個も存在するリジン残基のうち、ペプチド結合部位近傍のリジンだけを部位特異的に修飾可能であることが示された。

[0150] 試験例２

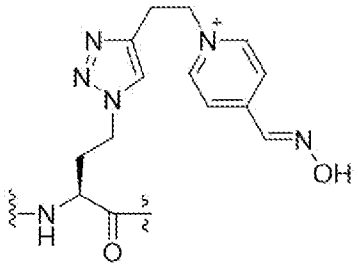
試験例２－１　ＰｙＯｘ－ＩｇＧ結合性ペプチドの合成

下記ペプチドを試験例１と同様の方法で合成した。

ＰｙＯｘ－Ｃ２－ＩｇＢＰ：Ａｃ－ＤＣＡＹＨＸＧＥＬＶＷＣＴＦＨ－ＮＨ$_2$（配列番号９６）

Ｘ＝

[化91]



[0151] 試験例２-２　ハーセプチンのＩｎ　ｖｉｔｒｏラベル化

＜方法＞

ハーセプチン（１μＭ）のＨＥＰＥＳバッファー（５０ｍＭ、ｐＨ７．４）溶液（８０μL）を（阻害条件の場合は１５Ｌ－ＩｇＢＰ（２０μＭ）と共に）１．５ｍＬ容エッペンドルフ管に加えた。そこにＰｙＯｘ－Ｃ４－ＩｇＢＰ（２μＭ）またはＰｙＯｘ－Ｃ２－ＩｇＢＰ（２μＭ）を加え、ついでアシルドナー（ＮＡＳＡ－ＦＬ）（１０μＭ）を加え、３７℃で３時間インキュベーションした。５倍濃縮ＳＤＳサンプルバッファー（２５０ｍＭ　ＤＴＴ含有）を２０μL加え、９５℃で５分間煮沸した。これを室温に戻した後、次いでＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（検出１２．５％　ア

クリルアミドゲル、１０μＬ　ｌｏａｄ、ＬＡＳ４０００）を行った。

結果を図７に示す。

[0152] ＜考察＞

図７に示す通り、ＰｙＯｘ－Ｃ２－ｌｇＢＰを用いた場合においても、ハーセプチンのラベル化が確認された。

ＰｙＯｘ－Ｃ４－ｌｇＢＰによるｌｇＧラベル化のラベル化率を１５６％とすると、バンド強度比からＰｙＯｘ－Ｃ２－ｌｇＢＰによるｌｇＧラベル化のラベル化率は８３．９％と算出された。

[0153] 試験例２-３　ＦＬ修飾ハーセプチンの修飾部位解析

[0154] ＜条件およびプロトコル＞

[0155] １．ＰｙＯｘ－Ｃ２－ｌｇＢＰを用いるｌｇＧ標識

ハーセプチン（１μＭ）（５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳバッファー（ｐＨ７．４））１０ｍＬとアシルドナー（ＮＡＳＡ－ＦＬ）（１０μＭ）、ＰｙＯｘ－Ｃ２－ｌｇＢＰ（２μＭ（２ｅｑ））混合して、３７℃で６時間インキュベーションした。

[0156] ２．ゲル濾過クロマトグラフィー（分子ふるいクロマトグラフィー）

溶液をＡｍｉｃｏｎ（商標）　Ｕｌｔｒａ－１５　１０Ｋフィルター装置で１．５ｍＬに濃縮し、４５００ｒｐｍで計１０分間遠心分離した。クロマトグラフィーカラムにＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（商標）ＨＷ－Ｆ４０（１５ｍＬ）を加え、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓバッファー（ｐＨ　８．０）（４５ｍＬ）で洗浄し、反応溶液を加え、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓバッファー（ｐＨ８．０）で精製した。１ｍＬずつサンプルチューブに回収（ｘ９サンプル）した。

Ｎａｎｏｄｒｏｐ（商標）を用いて各フラクション（Ｎｏ．１－９）の吸収スペクトルを測定し、２８０ｎｍおよび４９０ｎｍに吸収スペクトルを有したフラクションＮｏ．３－５を混合し、Ａｍｉｃｏｎ（商標）Ｕｌｔｒａ－４　１０Ｋフィルター装置で６５０～７００μＬにまで濃縮した。

[0157] ３．透析

透析膜（Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ（登録商標）　６　Ｐｒｅ－ｗｅｔｔｅｄ　Ｄ

ｉａｌｙｓｉｓ　Ｔｕｂｉｎｇ　（MWCO：１０ｋＤａ））にサンプル溶液を入れ、これを透析液（５０ｍＭ　NH_4HCO_3（ｐＨ７．８））に浸した。

[0158] ４．濃度及びラベル化率決定

（２）－ｉ　透析後の総ＩｇＧ濃度をＢＣＡアッセイで検出した。ＩｇＧは８．０μＭ（５０ｍＭ　NH_4HCO_3（ｐＨ７．８））であった。

（２）－ｉｉ　ＦＬ濃度をＵＶ－Ｖｉｓスペクトル解析で決定した。４９８ｎｍのＡｂｓ＝０．５７３０を用い、ＦＬの４９８ｎｍのモル吸光係数ε_{498}（ｐＨ７．８）＝７５０００$cm^{-1}M^{-1}$として算出すると、［ＦＬ］＝７．６４μＭであった。

（２）－ｉおよびｉｉよりラベル化率は９５．５％と算出された。

[0159] ４．トリプシン／Ｌｙｓ－Ｃによるペプチド消化

１．５ｍＬ容ＬｏＢｉｎｄ管中、上記３で得られた１０００μＬのＦＬ標識ハーセプチン溶液（４．０μＭ，１４８ｋＤａ，５９２μｇ）に２０μＬの１％ＰｒｏｔｅａｓｅＭＡＸ（商標）Ｓｕｒｆａｃｔａｎｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ）／５０ｍＭ　NH_4HCO_3　ａｑ．を加え、０．５Ｍジチオトレイトール（ＤＴＴ）／５０ｍＭ　NH_4HCO_3　ａｑ．を最終濃度５ｍＭまで加え、５６℃で、２０分インキュベーションし、０．４５Ｍヨードアセトアミド（ＩＡＡ）／５０ｍＭ　NH_4HCO_3　ａｑ．を最終濃度１５ｍＭまで加え、室温で１５分間暗所で保存した。１０μＬの１％ＰｒｏｔｅａｓｅＭＡＸ（商標）および２０μＬの１μｇ／μＬ　トリプシン／Ｌｙｓ－Ｃ　Ｍｉｘ　Ｍａｓｓ　Ｓｐｅｃ　Ｇｒａｄｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を加え、３７℃で終夜静置した。１６，０００　ｘ　ｇで２０秒間遠心分離して、粒子性の物質を除去した。１ｍＬの上清を別のサンプル管に移し、ＴＦＡを最終濃度０．５％まで加え、酵素を不活性化し、ＨＰＬＣ分析を行った。

[0160] ５．　ＨＰＬＣ分析

９００μＬの酵素消化物をＨＰＬＣで分析した。

ＨＰＬＣ条件：０．１％ＴＦＡ含有アセトニトリル：０．１％ＴＦＡ含有

水＝０：１００→６０：４０（１２０分，リニアグラジェント），流速０．５％／ｍｉｎ，蛍光励起波長４９０ｎｍ，蛍光検出波長５２０ｎｍ

結果を図８に示す。

[0161] 図８においてｐｅａｋ１はＬｙｓ２４９へのラベル化ペプチド、ｐｅａｋ２はＬｙｓ２５１へのラベル化ペプチドに相当することがＭＳ／ＭＳ解析により示された。

ただし、図４における同様のペプチドピーク（ｐｅａｋ５およびｐｅａｋ６）と比較するとピーク面積比がおよそ逆転した。すなわち、ＰｙＯｘ－Ｃ２－ｌｇＢＰを使用した場合、Ｌｙｓ２４９への反応がより効率的に進行した。

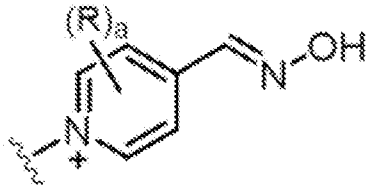
産業上の利用可能性

[0162] 本発明のペプチドはＡＧＯＸ化学における触媒としてｌｇＧの修飾のために使用されうる。

請求の範囲

[請求項1] 少なくとも１個の下記基：

[化1]



[式中、

Ｒは、Ｃ$_{1-3}$アルキル基、Ｃ$_{1-3}$アルコキシ基、ハロ、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ$_2$、エステル基、－Ｃ（＝Ｏ）ＯＨ、－ＳＯ$_3$Ｈ、－ＣＮ、および－ＮＯ$_2$から独立して選択され；

ａは０～４から選択される整数である]

がコンジュゲートし、１３～１９アミノ酸長である、ペプチド。

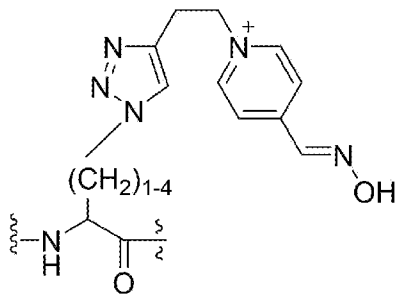
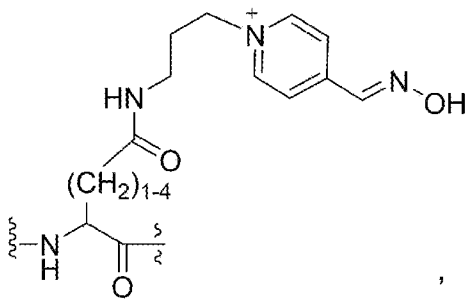
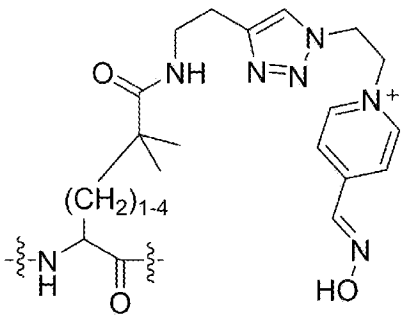
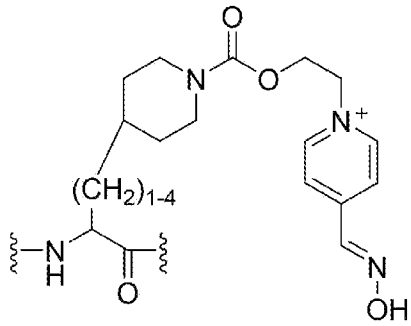
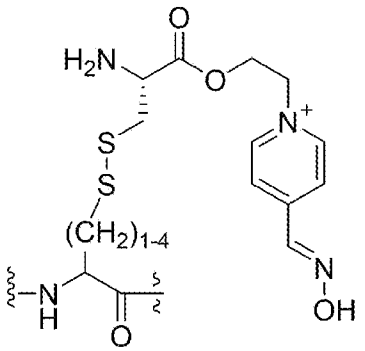
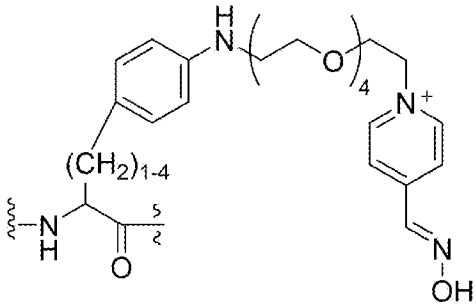
[請求項2] 該基：

[化2]



[式中、Ｒおよびａは請求項１と同義である]がコンジュゲートしたアミノ酸残基が下記から選択される構造：

[化3]


,

,

,

,

および


を有する、請求項１に記載のペプチド。

[請求項3] 該基：

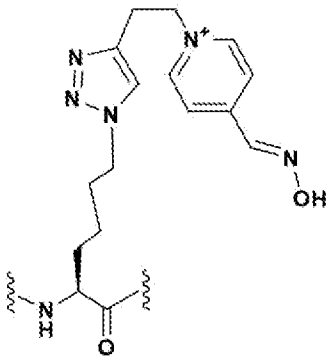
[化4]



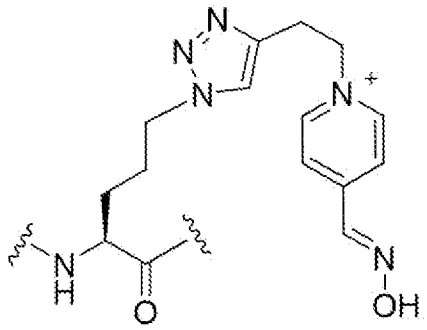
[式中、Ｒおよびａは請求項１と同義である]

がコンジュゲートしたアミノ酸残基が下記から選択される構造：

[化5]

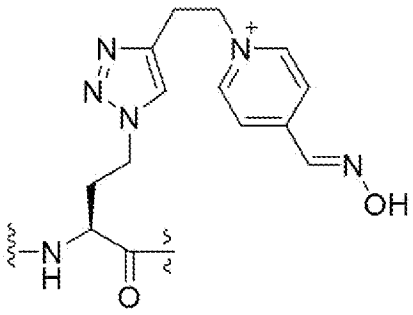


[化6]



および

[化7]



を有する、請求項１または２に記載のペプチド。

[請求項4] 式（Ｉ）：

$X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-X^{15}-X^{16}-X^{17}-X^{18}-X^{19}-X^{20}$ （Ｉ）（配列番号１）

[式中、

X^1は不存在であるか、あるいはX^2～X^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^2は不存在であるか、あるいはX^3～X^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^3は不存在であるか、あるいはX^4～X^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^4は不存在であるか、あるいはX^5が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^5は不存在であるか、あるいはＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^6はＣｙｓ、２－アミノブタン酸、およびＳ－メチルシステインからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^7はＡｌａおよびＴｈｒからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^8は任意の芳香族アミノ酸残基であり、

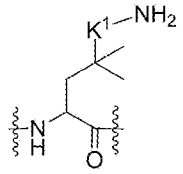
X^9はＨｉｓ残基であり、

X^{10}はＬｙｓ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ａｒｇ、オルニチン、２，４－ジアミノブタン酸、Ｎ６－アセチルリジン、Ｎ５－アセチルオルニチン、２－アミノ－４－アセチルアミノブタン酸、２，３－ジアミノプロピオン酸、２－アミノ－３，３－ジメチルブタン酸、２－アミノ－４，４－ジメチルペンタン酸、３－シクロヘキシルアラニンおよび下記式（Ｉ）－１で表されるアミノ酸残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

式（Ｉ）－１：

[化8]

式(I)－1



（上記式（Ｉ）－１中、Ｋ[1]は、炭素数１～４のアルキレン基、－（ＮＨ）－、－（Ｃ＝Ｏ）－、－Ｏ－、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される２価の基）、

Ｘ[11]はＧｌｙ、およびＣｙｓを除く任意のＤ－アミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

Ｘ[12]はＧｌｕ、ＧｌｎおよびＡｓｎからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

Ｘ[13]はＬｅｕ残基であり、

Ｘ[14]はＶａｌおよびＩｌｅからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

Ｘ[15]はＴｒｐ残基であり、

Ｘ[16]はＣｙｓ、２－アミノブタン酸およびＳ－メチルシステインからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、ただしＸ[6]およびＸ[16]の少なくとも一方は、Ｃｙｓ残基であり、

Ｘ[17]は不存在であるか、あるいはＴｈｒ、Ｓｅｒ、Ｖａｌおよび２－アミノブタン酸からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

Ｘ[18]は不存在であるか、あるいはＸ[17]が存在するときＰｈｅ、Ｈｉｓ、Ｔｙｒ、ホモシステイン、３－シクロヘキシルアラニンおよびホモフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

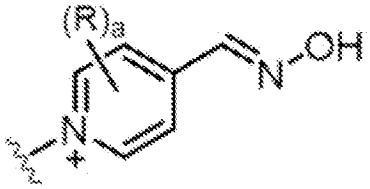
Ｘ[19]は不存在であるか、あるいはＸ[17]～Ｘ[18]が存在するときＨｉｓ、Ｔｙｒ、Ａｌａ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、３－（２－ピリジル）アラニン、３－（３－ピリジル）アラニンおよび３－（４－ピリジル）アラ

ニンからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

X^{20}は不存在であるか、あるいはX^{17}～X^{19}が存在するときＣｙｓ以外の任意のアミノ酸残基であり、

X^{1}～X^{5}、X^{7}～X^{15}、およびX^{17}～X^{20}から選択される１つのアミノ酸残基において、少なくとも１個の下記基：

[化9]



[式中、Ｒおよびａは請求項１と同義である]

がコンジュゲートしている]

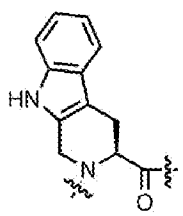
によって表されるアミノ酸配列を含み；

１３～１９アミノ酸長である、請求項１～３のいずれか一項に記載のペプチド。

[請求項5] X^{8}がＴｙｒ、Ｔｒｐ、２－アミノ－３－（１－ナフチル）プロピオン酸、２－アミノ－３－（２－ナフチル）プロピオン酸、２－メチルアミノ－３－（１Ｈ－インドール－３－イル）プロピオン酸および下記式（Ｉ）－２で表されるアミノ酸残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であって、

式（Ｉ）－２：

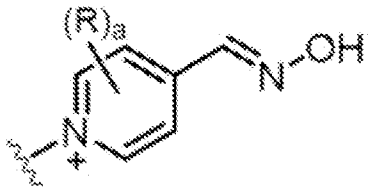
[化10]



X^{1}～X^{5}、X^{7}～X^{15}、およびX^{17}～X^{20}から選択される１つの

アミノ酸残基において、少なくとも１個の下記基：

[化11]



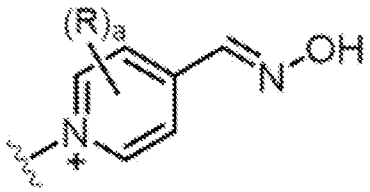
[式中、Ｒおよびａは請求項１と同義である]

がコンジュゲートしている、請求項４に記載のペプチド。

[請求項6] Ｘ[11]がＧｌｙ、Ｄ－Ｉｌｅ、Ｄ－Ｐｒｏ、Ｄ－Ａｒｇ、Ｄ－Ｓｅｒおよび Ｄ－Ｌｙｓからなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

Ｘ[1]～Ｘ[5]、Ｘ[7]～Ｘ[15]、およびＸ[17]～Ｘ[20]から選択される１つのアミノ酸残基において、少なくとも１個の下記基：

[化12]



[式中、Ｒおよびａは請求項１と同義である]

がコンジュゲートしている、

請求項４または５に記載のペプチド。

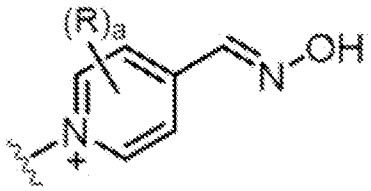
[請求項7] 下記から選択されるアミノ酸配列を含み：

配列番号２、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、および配列番号３３；

Ｃｙｓ残基以外の１つのアミノ酸残基において、少なくとも１個の

下記基：

[化13]

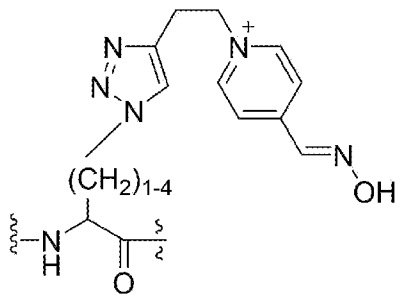
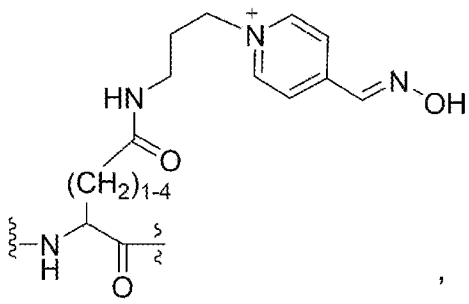
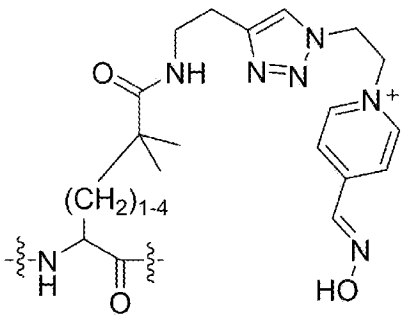
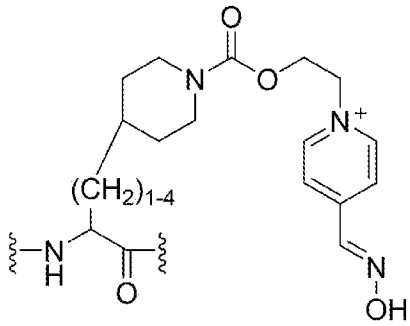
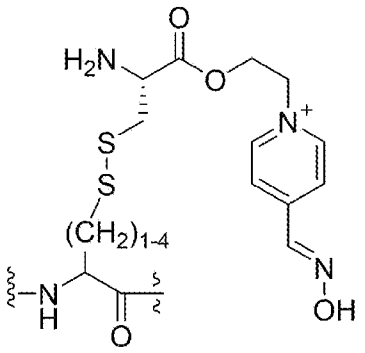
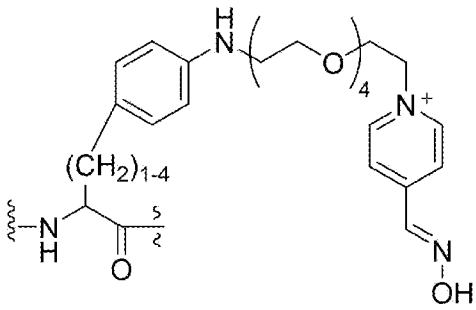


[式中、Ｒおよびａは請求項１と同義である]

がコンジュゲートしている、請求項４～６のいずれか一項に記載のペプチド。

[請求項8] Ｘ[1]～Ｘ[5]、Ｘ[10]、およびＸ[20]から選択される１つのアミノ酸残基が、下記から選択される構造：

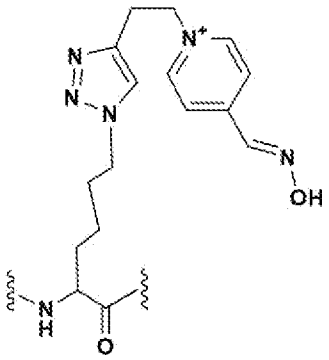
[化14]


,

,

,

,

および


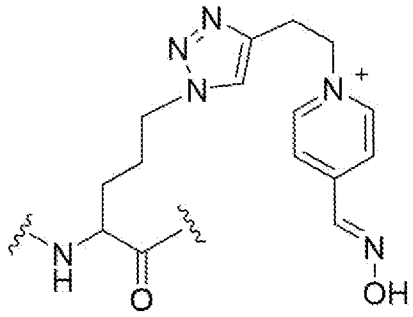
を有する、請求項４～７のいずれか一項に記載のペプチド。

[請求項9] X^2、X^4、X^{10}、およびX^{20}から選択される１つのアミノ酸残基が、下記構造：

[化15]

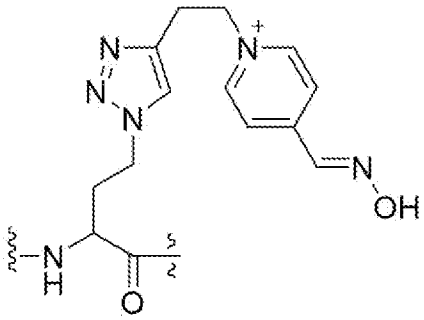


[化16]



または

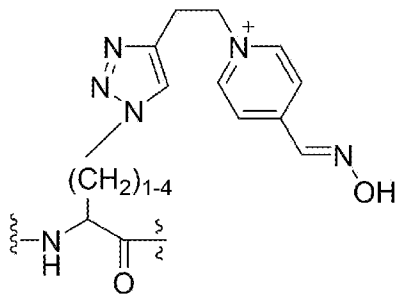
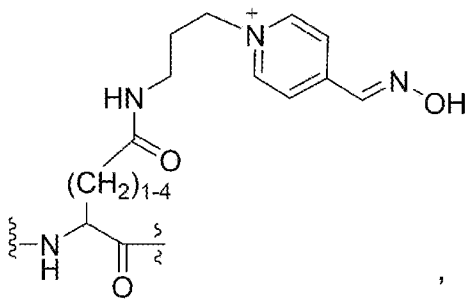
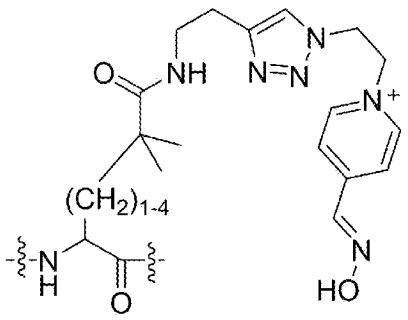
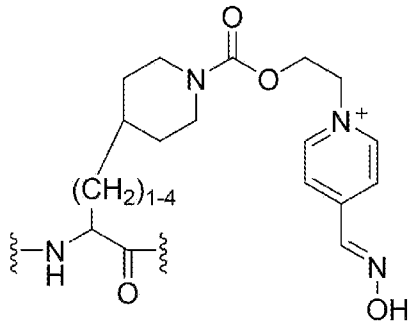
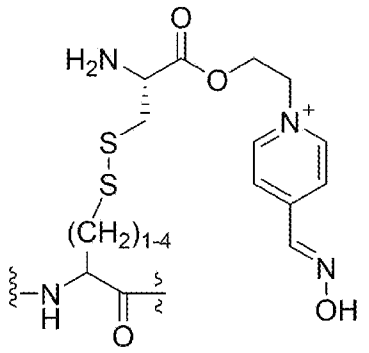
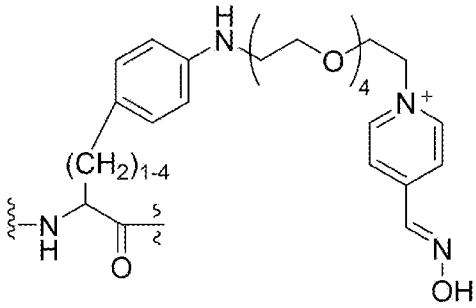
[化17]



を有する、請求項４～８のいずれか一項に記載のペプチド。

[請求項10] $X^1X^2X^3X^4$ＤＣＡＹＨX^{10}ＧＥＬＶＷＣＴＦＨX^{20}（配列番号３４）のアミノ酸配列からなり、X^{10}のアミノ酸残基が下記から選択される構造：

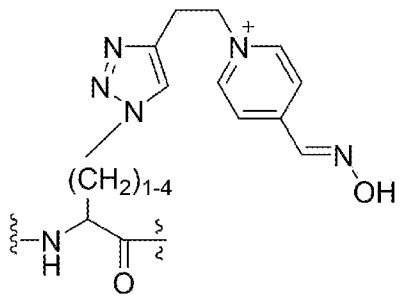
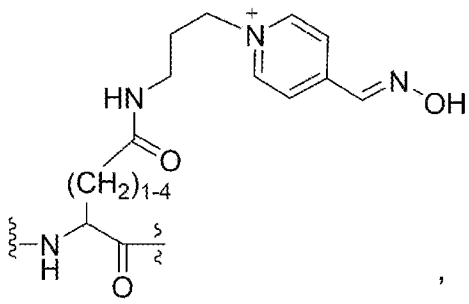
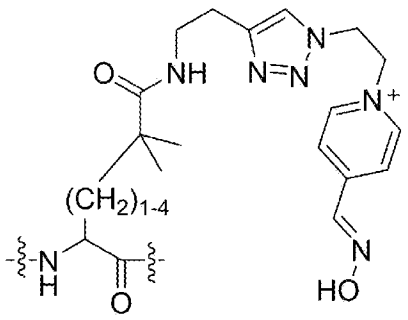
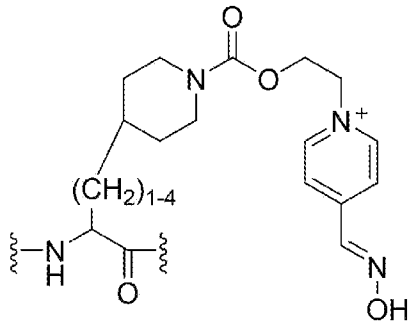
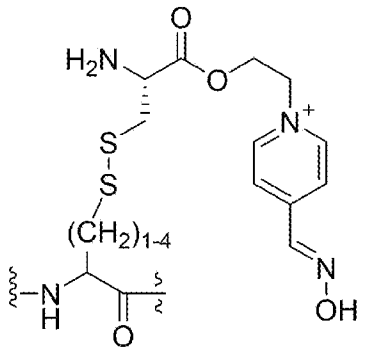
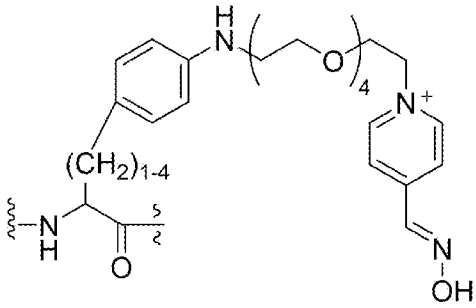
[化18]


,

,

,

,

および


を有する、請求項４～９のいずれか一項に記載のペプチド。

[請求項11] 配列番号３５、配列番号１９、配列番号２３、および配列番号６８～９０から選択されるのアミノ酸配列を含み、X^{10}のアミノ酸残基が下記から選択される構造：

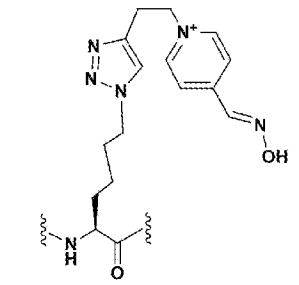
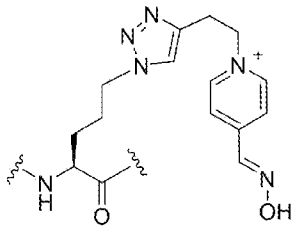
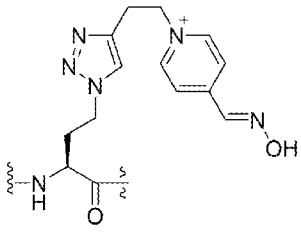
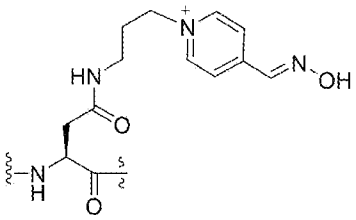
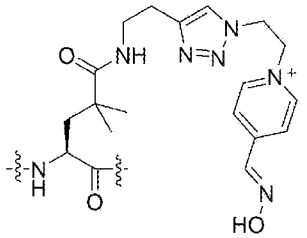
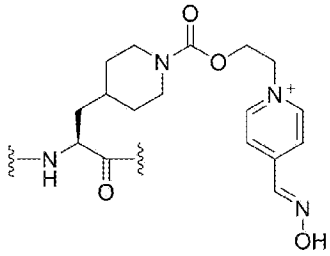
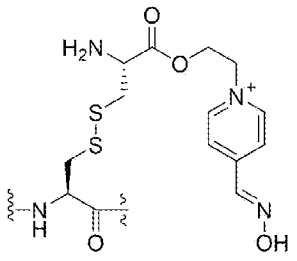
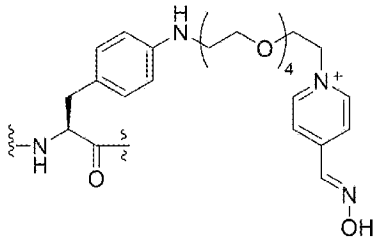
[化19]


,

,

,

,

および


を有する、請求項４～１０のいずれか一項に記載のペプチド。

[請求項12] 配列番号３５、配列番号１９、配列番号２３、および配列番号６８～９０から選択されるアミノ酸配列を含み、X^{10}のアミノ酸残基が下記から選択される構造：

[化20]

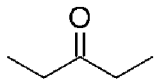

,

,

,

,

,

,

および


を有する、請求項４～１１のいずれか一項に記載のペプチド。

[請求項13] X^6とX^{16}がＣｙｓ残基であり、X^6のＣｙｓ残基およびX^{16}のＣｙｓ残基間でジスルフィド結合を形成している、またはX^6およびX^{16}のＣｙｓ残基中のスルフィド基が下記式（Ｉ）－３で表される２価の基により連結されている、請求項４～１２のいずれか一項に記載のペプチド。

[化21]

式（Ｉ）－３

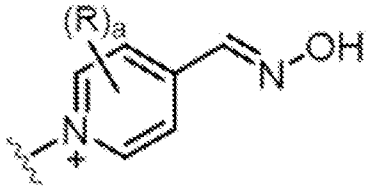


[請求項14] Ｎ末端でアセチル化されているか、Ｃ末端でアミド化されているか、またはＮ末端でアセチル化されていてかつＣ末端でアミド化されている、請求項１～１３のいずれか一項に記載のペプチド。

[請求項15] ＩｇＧと結合可能である、請求項１～１４のいずれか一項に記載のペプチド。

[請求項16] 溶媒中、少なくとも１個の下記基：

[化22]



[式中、Ｒおよびａは請求項１と同義である]

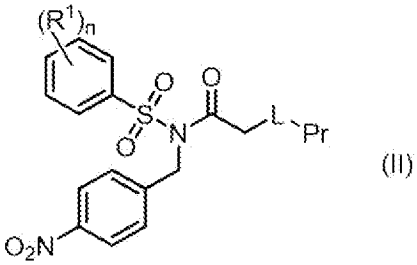
がコンジュゲートしたペプチドの存在下、抗体および／またはそれらのフラグメントを、ペイロードを保持するＮ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドで処理する工程を含む、抗体の修飾方法。

[請求項17] 該ペプチドが請求項１～１５のいずれかに記載のペプチドである、請求項１６に記載の方法。

[請求項18] 請求項１６または１７に記載の方法を含む、抗体とペイロードとの複合体（conjugate）の製造方法。

[請求項19] 該ペイロードを保持するＮ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドが式（ＩＩ）：

[化23]



(II)

[式中、

Ｌはリンカーを示し；

Ｐｒはペイロードを示し；

Ｒ^{1}は独立して、１～３個のハロで適宜置換されていてもよいＣ$_{1-3}$アルキル、１～３個のハロで適宜置換されていてもよいＣ$_{1-3}$アルコキシ、ハロ、および－ＮＯ$_{2}$から選択され；

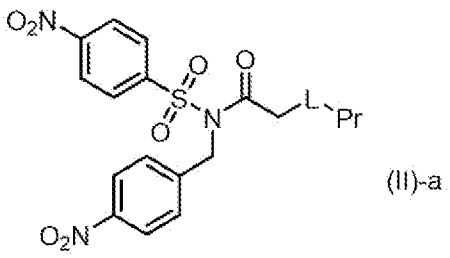
ｎは０～５から選択される整数である]

を有する、請求項１６～１８のいずれか一項に記載の方法。

[請求項20] 該ペプチドが請求項１～１５のいずれか一項に記載のペプチドであり；

該ペイロードを保持するＮ－アシル－Ｎ－アルキルスルホンアミドが下式（ＩＩ）－ａ：

[化24]



(II)-a

[式中、

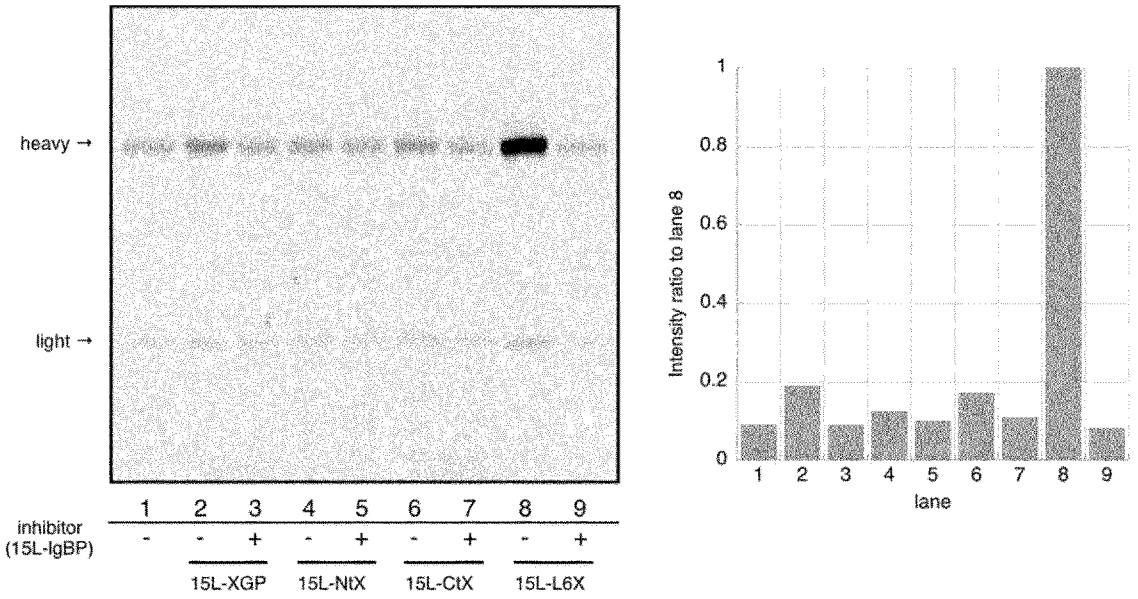
Ｌはリンカーを示し；

Ｐｒはペイロードを示す]

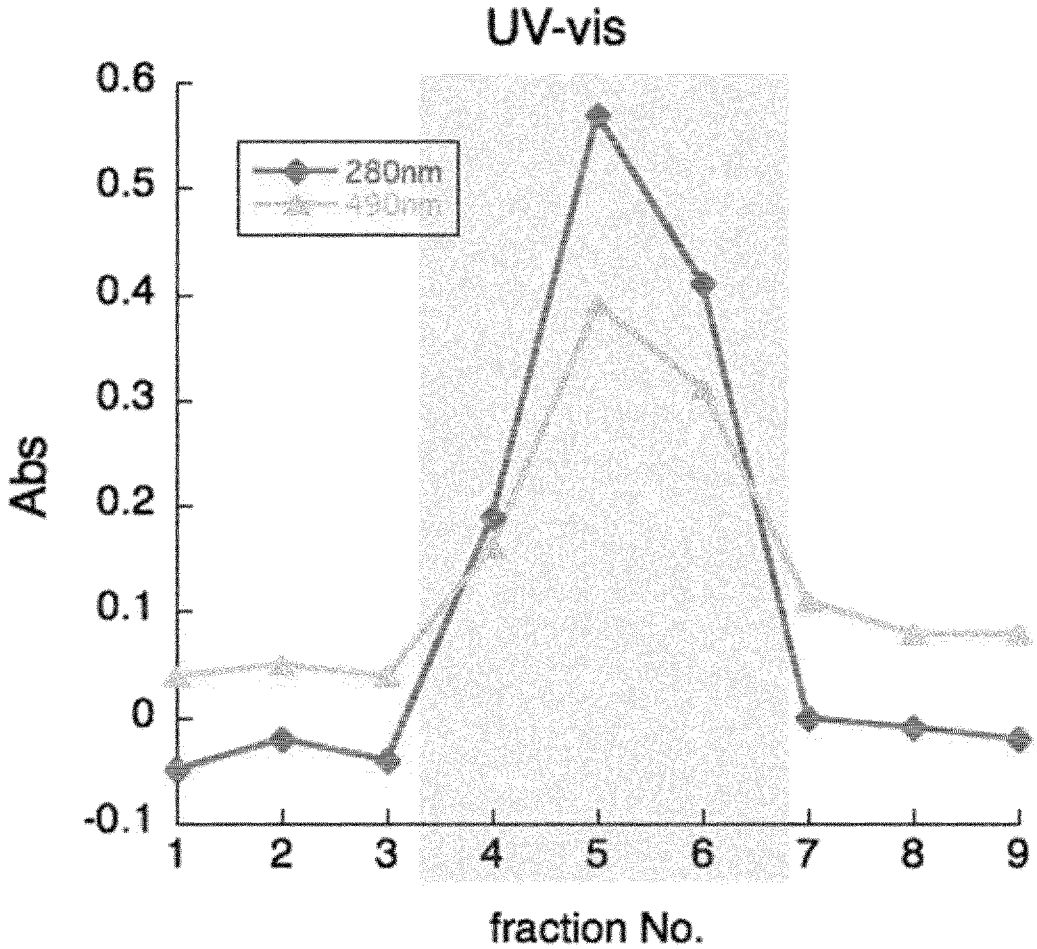
を有する；

請求項１６～１９のいずれか一項に記載の方法に記載の方法。

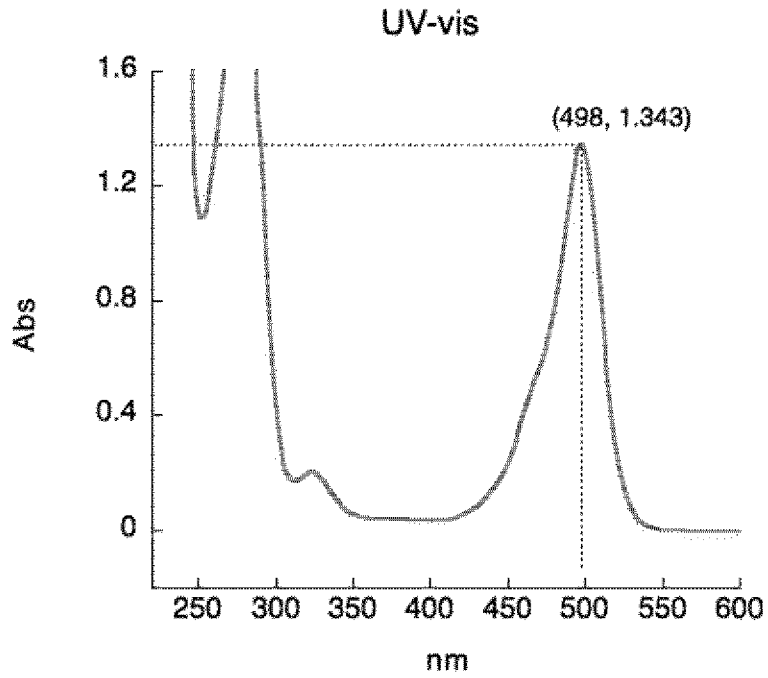
[図1]


heavy →
light →
1 2 3 4 5 6 7 8 9
inhibitor (15L-IgBP)
- - + - + - + - +
15L-XGP
15L-NtX
15L-CtX
15L-L6X
Intensity ratio to lane 8
lane

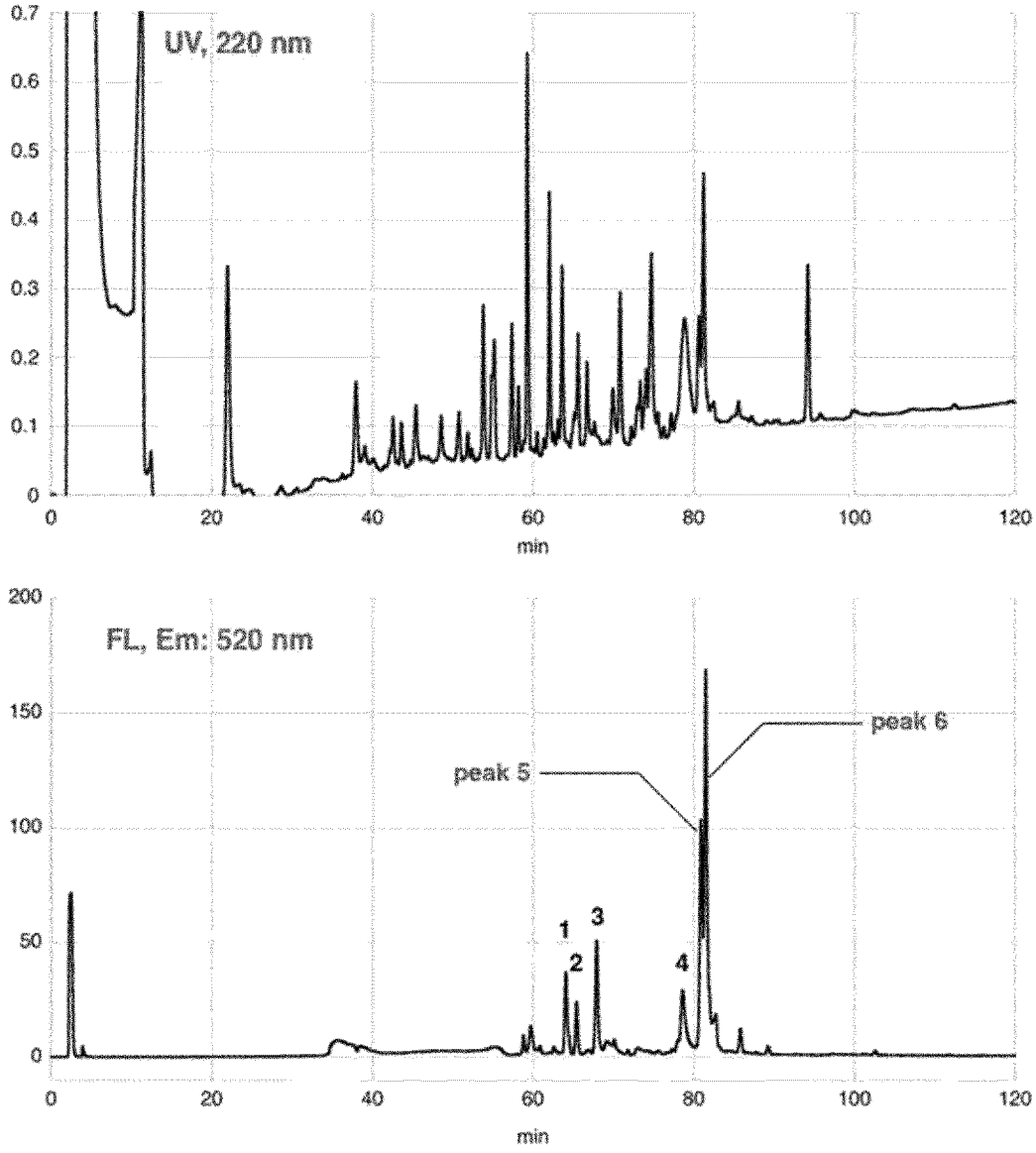
[図2]


UV-vis
280nm
490nm
Abs
fraction No.

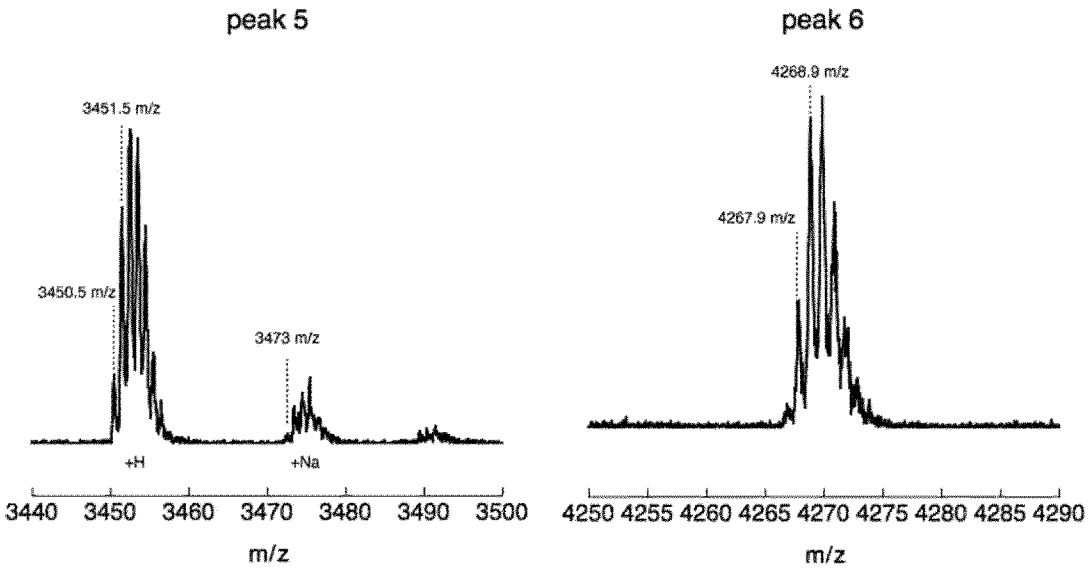
[図3]


UV-vis
(498, 1.343)
Abs
1.6
1.2
0.8
0.4
0
250
300
350
400
450
500
550
600
nm

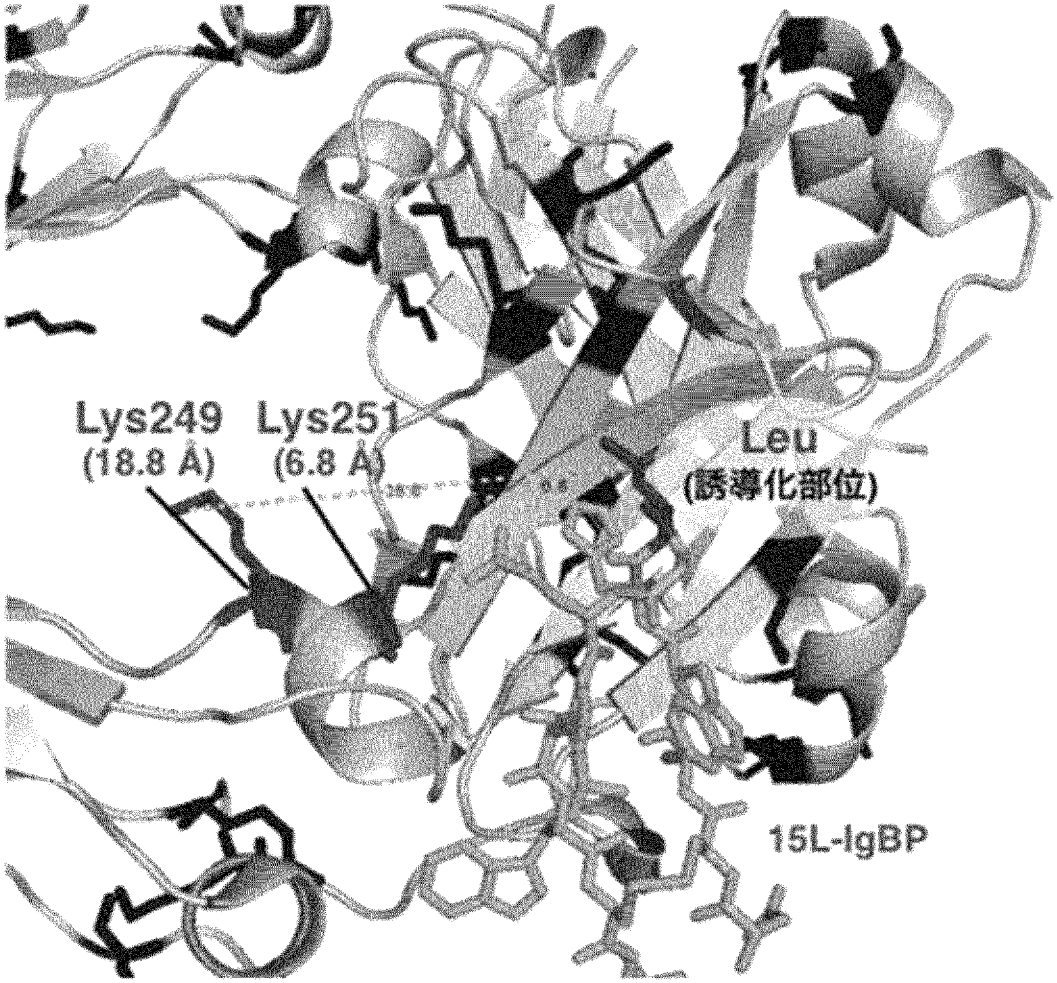
[図4]


UV, 220 nm
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
20
40
60
80
100
120
min
FL, Em: 520 nm
200
150
100
50
0
peak 5
peak 6
1
2
3
4
0
20
40
60
80
100
120
min

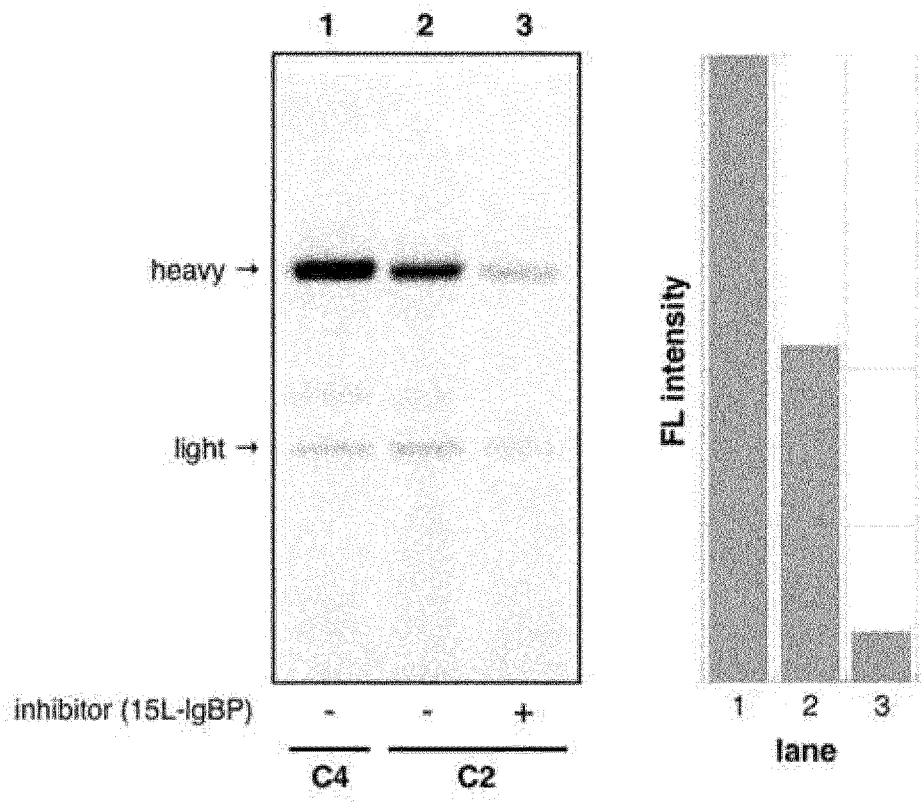
[図5]


peak 5
3451.5 m/z
3450.5 m/z
3473 m/z
+H
+Na
3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500
m/z
peak 6
4268.9 m/z
4267.9 m/z
4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290
m/z

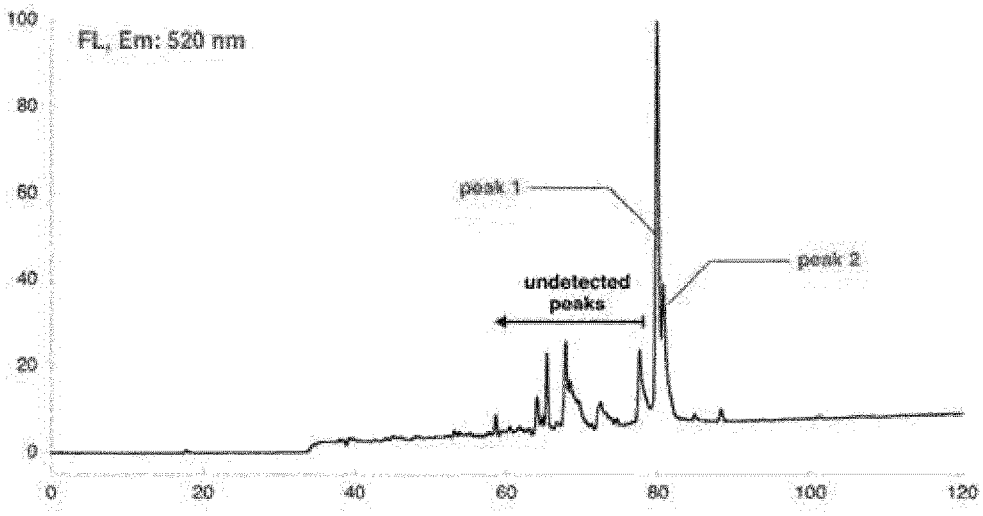
[図6]


Lys249
(18.8 Å)
Lys251
(6.8 Å)
Leu
(誘導化部位)
15L-IgBP

[図7]


1
2
3
heavy →
light →
inhibitor (15L-IgBP)
-
-
+
C4
C2
FL intensity
1
2
3
lane

[図8]


FL, Em: 520 nm
peak 1
peak 2
undetected peaks
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/037776

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/08(2006.01)i; ***C07K 1/00***(2006.01)i; ***C07K 16/00***(2006.01)i
FI: C07K7/08 ZNA; C07K1/00; C07K16/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K7/08; C07K1/00; C07K16/00

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/240288 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 19 December 2019 (2019-12-19) whole document particularly, claims, examples, fig. 1	1-20
Y	TAMURA, T. et al. Affinity-guided oxime chemistry for selective protein acylation in live tissue systems. Journal of the American Chemical Society. 2017, vol. 139, pages 14181-14191 whole document particularly, abstract, page 14182, fig. 1, page 14184, fig. 3, page 14187, fig. 6	1-20
Y	WO 2016/186206 A1 (UNIV. KAGOSHIMA) 24 November 2016 (2016-11-24) claims, examples	4-13
A	林良雄, 六車共平, 抗体結合ペプチドを利用した抗体依存型薬物送達技術の基礎的研究, Drug Delivery System, 25 July 2020, vol. 35, no. 3, pages 191-199, (HAYASHI, Yoshio, MUGURUMA, Kyohei. Basic Research in Antibody-dependent Drug Delivery Technology Based on IgG-binding Peptide.) abstract, page 195, fig. 4	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 December 2021	**28 December 2021**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/037776

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/037776

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2019/240288 A1	19 December 2019	US 2021/0139541 A1 whole document particularly, claims, examples, fig. 1 EP 3811978 A1 CN 112261954 A	
WO 2016/186206 A1	24 November 2016	US 2018/0141976 A1 claims, examples EP 3299383 A1 KR 10-2018-0002734 A CN 107614514 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/037776

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 7/08(2006.01)i; C07K 1/00(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i
FI: C07K7/08 ZNA; C07K1/00; C07K16/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K7/08; C07K1/00; C07K16/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2019/240288 A1 (味の素株式会社) 19.12.2019 (2019-12-19) 全体。特に、特許請求の範囲、実施例、図１	1-20
Y	TAMURA, T. et al., Affinity-guided oxime chemistry for selective protein acylation in live tissue systems, Journal of the American Chemical Society, 2017, Vol.139, pp.14181-14191 全体。特に、要約、第14182頁Figure 1、第14184頁Figure 3、第14187頁Figure 6	1-20
Y	WO 2016/186206 A1 (国立大学法人鹿児島大学) 24.11.2016 (2016-11-24) 特許請求の範囲、実施例	4-13
A	林　良雄、六車共平, 抗体結合ペプチドを利用した抗体依存型薬物送達技術の基礎的研究, Drug Delivery System, 2020.07.25, Vol.35, No.3, pp.191-199 要約、第195頁 図４	1-20

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
14.12.2021	28.12.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
上村　直子 4B 4508
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/037776

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/037776

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2019/240288 A1	19.12.2019	US 2021/0139541 A1 全体。特に、特許請求の範囲、実施例、図１ EP 3811978 A1 CN 112261954 A	
WO 2016/186206 A1	24.11.2016	US 2018/0141976 A1 特許請求の範囲、実施例 EP 3299383 A1 KR 10-2018-0002734 A CN 107614514 A	