



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118201966 A

(43) 申请公布日 2024.06.14

(21) 申请号 202280070280.6
 (22) 申请日 2022.08.24
 (30) 优先权数据
 2021-136682 2021.08.24 JP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2024.04.18
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2022/031933 2022.08.24
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02023/027125 JA 2023.03.02
 (71) 申请人 肽梦想株式会社
 地址 日本神奈川县川崎市川崎区殿町3丁目25番23号(邮编:2100821)
 申请人 JCR制药股份有限公司
 (72) 发明人 高桥健一 余田英士 桥本秀彦
 藤山纱希 大内政辉 泽井直己
 稻叶慎之介
 (74) 专利代理机构 北京同钧律师事务所 16037
 专利代理师 许怀远 吕东

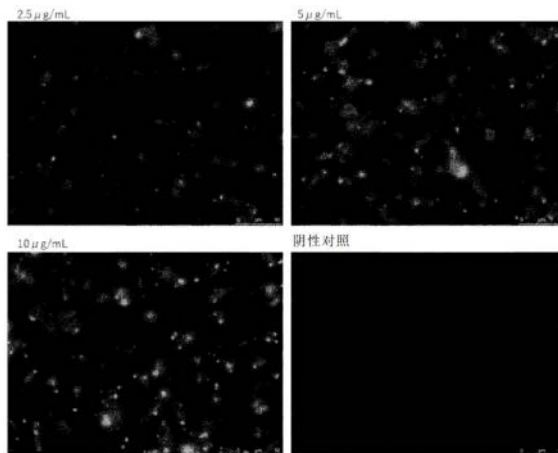
(51) Int.Cl.
 C07K 19/00 (2006.01)
 A61K 38/10 (2006.01)
 A61K 39/395 (2006.01)
 A61K 47/68 (2006.01)
 A61P 9/10 (2006.01)
 A61P 17/02 (2006.01)
 A61P 25/00 (2006.01)
 A61P 25/14 (2006.01)
 A61P 25/16 (2006.01)
 A61P 25/18 (2006.01)
 A61P 25/24 (2006.01)
 A61P 25/28 (2006.01)
 A61P 31/04 (2006.01)
 A61P 31/12 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
 C07K 7/08 (2006.01)
 C07K 16/00 (2006.01)
 C07K 16/18 (2006.01)
 C12N 15/62 (2006.01)

权利要求书2页 说明书81页
 序列表(电子公布) 附图9页

(54) 发明名称
 人转铁蛋白受体结合抗体-肽缀合物

(57) 摘要
 本发明的课题是提供一种穿过血脑屏障的技术。本发明的解决方案是一种缀合物,其包含以下成分:(1)与转铁蛋白受体结合的肽,且为(i)包含序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys)的肽;(ii)具有在序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列中具有1以上11以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽;(iii)具有序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第12个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)的肽;或(iv)具有在序列号14所记载的氨基酸序

列的第1个至第10个氨基酸序列中具有1以上8以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽;及(2)抗体或包含其抗原结合性片段的化合物。



1. 一种缀合物,其特征在于,包含以下成分:

(1) 与转铁蛋白受体结合的肽,且为

(i) 包含序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys)的肽;

(ii) 具有在序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列中具有1以上11以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽;

(iii) 具有序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第12个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)的肽;或

(iv) 具有在序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第10个氨基酸序列中具有1以上8以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽;

及

(2) 抗体或包含其抗原结合性片段的化合物。

2. 根据权利要求1所述的缀合物,其特征在于,所述抗体或其抗原结合性片段为IgG或来自IgG的抗原结合性片段。

3. 根据权利要求2所述的缀合物,其特征在于,所述抗体或其抗原结合性片段为选自由IgG1、IgG2及IgG4所组成的群组的抗体或其抗原结合性片段。

4. 根据权利要求1所述的缀合物,其特征在于,

所述肽为包含具有选自以下群组的1个以上的置换的氨基酸序列的肽:

(I) 序列号1的第1个丙氨酸残基被脂肪族氨基酸或甲基化脂肪族氨基酸置换;

(II) 对序列号1的第2个任意氨基酸残基或任意N-甲基氨基酸的置换;

(III) 对序列号1的第3个芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基的置换;

(IV) 对序列号1的第5个芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基的置换;

(V) 序列号1的第6个天冬酰胺残基被亲水性氨基酸或丙氨酸置换;

(VI) 序列号1的第8个酪氨酸残基被芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基置换;

(VII) 序列号1的第10个异亮氨酸残基被任意氨基酸置换;

(VIII) 序列号1的第11个精氨酸残基被任意氨基酸置换;

(IX) 序列号1的第12个精氨酸残基被任意氨基酸置换;及

(X) 序列号1的第13个酪氨酸残基被任意氨基酸置换;

(XI) 序列号1的第14个N-甲基酪氨酸残基被任意氨基酸置换;

或为包含具有选自以下群组的1个以上的置换的氨基酸序列的肽:

(I) 序列号14的第1个丙氨酸残基被脂肪族氨基酸或甲基化脂肪族氨基酸置换;

(II) 对序列号14的第2个任意氨基酸残基或任意N-甲基氨基酸的置换;

(III) 对序列号14的第3个芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基的置换;

(IV) 对序列号14的第5个芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基的置换;

- (V) 序列号14的第6个天冬酰胺残基被亲水性氨基酸或丙氨酸置换；
- (VI) 序列号14的第8个酪氨酸残基被芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基置换；
- (VII) 序列号14的第10个异亮氨酸残基被任意氨基酸置换；
- (X) 序列号14的第11个丝氨酸残基被亲水性氨基酸残基置换。
5. 根据权利要求1所述的缀合物,其特征在于,所述肽为由序列号1~13、15、18~86、90~110的第1个至第15个氨基酸序列及序列号14、16、17、87~89的第1个至第12个氨基酸序列的任一个氨基酸序列所组成的环状肽。
6. 根据权利要求1所述的缀合物,其特征在于,所述肽通过连接子与所述抗体结合。
7. 根据权利要求6所述的缀合物,其特征在于,所述连接子为肽连接子、化学连接子或其组合。
8. 根据权利要求6所述的缀合物,其特征在于,所述连接子为具有序列号111至161中任一者所记载的序列的连接子。
9. 根据权利要求6所述的缀合物,其特征在于,所述肽和所述抗体通过结合于所述连接子的末端的马来酰亚胺、酰肼或NHS部位而结合。
10. 根据权利要求1所述的缀合物,其特征在于,序列号1至110中任一者所记载的连接子加成肽和抗体或其抗原结合性片段结合。
11. 一种组成物,其特征在于,包含如权利要求1至10中任一项所述的缀合物,用于将该缀合物送达细胞内部或使其穿过血脑屏障。
12. 一种医药品组成物,其特征在于,包含如权利要求1至10中任一项所述的缀合物或其盐以作为有效成分。
13. 一种方法,其包含使肽和抗体或其抗原结合性片段结合的工序,并以可将所述抗体或其抗原结合性片段送达细胞内部或使其穿过血脑屏障的方式进行加工,其特征在于,所述肽是与转铁蛋白受体结合,且为
- (i) 具有序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys)的肽;
- (ii) 具有在序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列中具有1以上11以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽;
- (iii) 具有序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第12个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)的肽;或
- (iv) 具有在序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第10个氨基酸序列中具有1以上8以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽。
14. 一种方法,其是使如权利要求1所述的肽和抗体或包含其抗原结合性片段的化合物结合,其特征在于,包含:
- (i) 将抗体或包含其抗原结合性片段的化合物所具有的双硫键还原的工序;
- (ii) 制备经加成其末端具有马来酰亚胺的连接子的所述肽的工序;及
- (iii) 使(i)中双硫键经还原的抗体或包含其抗原结合性片段的化合物与(ii)中所制备的所述肽接触的工序。

人转铁蛋白受体结合抗体-肽缀合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种包含可与人转铁蛋白受体 (hTfR) 结合的肽和抗体或其抗原结合性片段的缀合物 (以下也称为复合体)。并且,本发明涉及一种具有细胞渗透性的肽和抗体或其抗原结合性片段的缀合物。再者,本发明涉及一种包含该缀合物的药物。

背景技术

[0002] 在世界各地,对阿尔茨海默病或脑肿瘤等脑部相关疾病的治疗药物的开发必要性提高,而进行研究开发。不仅传统型的低分子药物,最近高分子的抗体药物的重要性也越来越高。然而,研究开发中困难重重。其原因之一可列举存在血脑屏障。

[0003] 除了包含脑室周围器官 (松果体、脑下垂体、极后区等) 的几个区域以外,对脑部的大部分组织供给血液的毛细血管与存在于肌肉等其他组织的毛细血管不同,形成其内皮的内皮细胞彼此通过稳固的细胞间接合而相互附着。因此,会阻碍从血液往脑部被动运输物质,虽也有例外,但除了脂溶性高的物质或分子量小 (200 ~ 500 道尔顿以下) 且在生理 pH 附近呈电中性的物质以外,难以从毛细血管移行至脑部。这种经由脑内的毛细血管内皮而限制血液与脑的组织液之间的物质交换的机制,被称为血脑屏障 (Blood-Brain Barrier, BBB)。并且,血脑屏障不仅限制脑,也限制包含脑及脊髓的中枢神经系统的组织液与血液之间的物质交换。由于血脑屏障的存在,中枢神经系统的大部分细胞不会受到血中的激素、淋巴激素等物质的浓度变动影响,而保持其生化学的恒常性。

[0004] 作为穿过血脑屏障使高分子物质到达脑内的方法,已报导了各种将该高分子物质进行修饰以使其与存在于脑内毛细血管的内皮细胞上的膜蛋白质即转铁蛋白受体具有亲和性的方法 (专利文献 1 ~ 3)。例如,在专利文献 1 中记载了一种血脑屏障穿梭体,其与转铁蛋白受体具有亲和性,且可与该受体结合。

[0005] 然而,寻求一种使高分子物质、特别是抗体穿过血脑屏障的更佳方法。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献 1: 日本特表 2015-528452 号公报

[0009] 专利文献 2: 日本特开 H06-228199 号公报

[0010] 专利文献 3: W02016/208695

[0011] 专利文献 4: W02019/151539

发明内容

[0012] 发明所欲解决的课题

[0013] 本发明旨在提供一种与转铁蛋白受体结合的肽和抗体的缀合物。此缀合物具有转铁蛋白受体结合能力和对于构成该缀合物的抗体所结合的抗原的结合能力两者。

[0014] 并且,本发明旨在提供一种通过使与转铁蛋白受体结合且具有血脑屏障穿过能力的肽和抗体或其抗原结合性片段结合而使血脑屏障穿过的技术。更具体而言,本发明旨在

提供一种与转铁蛋白受体结合且具有血脑屏障穿过能力的肽和抗体的缀合物。

[0015] 再者,本发明旨在提供一种包含上述缀合物的药物。

[0016] 解决课题的技术方案

[0017] 发现通过使具有特定结构的肽和包含抗体的化合物直接或通过连接子结合,而制成具有抗原结合能力且具有转铁蛋白受体结合能力的缀合物,再者,通过使用此缀合物,可使所期望的抗体穿过血脑屏障,并导入至细胞内部,而完成本发明。

[0018] 此说明书所记载的一发明涉及一种包含与转铁蛋白受体结合的肽和抗体或其抗原结合性片段的缀合物。

[0019] 上述肽为与转铁蛋白受体结合的肽,且为

[0020] (i) 包含序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列 (Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys) 的肽;

[0021] (ii) 具有在序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列中具有1以上11以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽;

[0022] (iii) 具有序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第12个氨基酸序列 (Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys) 的肽;或

[0023] (iv) 具有在序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第10个氨基酸序列中具有1以上8以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽。

[0024] 而且,抗体或包含其抗原结合性片段的化合物可为IgG或来自IgG的抗原结合性片段,也可为选自由IgG1、IgG2及IgG4所组成的群组的抗体或其抗原结合性片段。

[0025] 上述肽的另一例为包含具有选自以下群组的1个以上的置换的氨基酸序列的肽:

[0026] (I) 序列号1的第1个丙氨酸残基被脂肪族氨基酸或甲基化脂肪族氨基酸置换;

[0027] (II) 对序列号1的第2个任意氨基酸残基或任意N-甲基氨基酸的置换;

[0028] (III) 对序列号1的第3个芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基的置换;

[0029] (IV) 对序列号1的第5个芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基的置换;

[0030] (V) 序列号1的第6个天冬酰胺残基被亲水性氨基酸或丙氨酸置换;

[0031] (VI) 序列号1的第8个酪氨酸残基被芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基置换;

[0032] (VII) 序列号1的第10个异亮氨酸残基被任意氨基酸置换;

[0033] (VIII) 序列号1的第11个精氨酸残基被任意氨基酸置换;

[0034] (IX) 序列号1的第12个精氨酸残基被任意氨基酸置换;及

[0035] (X) 序列号1的第13个酪氨酸残基被任意氨基酸置换;

[0036] (XI) 序列号1的第14个N-甲基酪氨酸残基被任意氨基酸置换;

[0037] 或为包含具有选自以下群组的1个以上的置换的氨基酸序列的肽:

[0038] (I) 序列号14的第1个丙氨酸残基被脂肪族氨基酸或甲基化脂肪族氨基酸置换;

[0039] (II) 对序列号14的第2个任意氨基酸残基或任意N-甲基氨基酸的置换;

[0040] (III) 对序列号14的第3个芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基的置换;

[0041] (IV) 对序列号14的第5个芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基的置换；

[0042] (V) 序列号14的第6个天冬酰胺残基被亲水性氨基酸或丙氨酸置换；

[0043] (VI) 序列号14的第8个酪氨酸残基被芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基置换；

[0044] (VII) 序列号14的第10个异亮氨酸残基被任意氨基酸置换；

[0045] (X) 序列号14的第11个丝氨酸残基被亲水性氨基酸残基置换。

[0046] 更具体的肽为由序列号1~13、15、18~86、90~110的第1个至第15个氨基酸序列及序列号14、16、17、87~89的第1个至第12个氨基酸序列的任一个氨基酸序列所组成的环状肽。

[0047] 在本发明的缀合物中,肽优选通过连接子与抗体结合。

[0048] 而且,上述连接子优选为肽连接子、化学连接子或其组合。

[0049] 具体的连接子为具有序列号111至161中任一者所记载的序列的连接子。

[0050] 缀合物优选为肽和抗体通过结合于连接子的末端的马来酰亚胺、酰肼或NHS部位而结合者。缀合物优选为序列号1至110中任一者所记载的连接子加成肽和抗体或其抗原结合性片段结合者。

[0051] 此说明书也提供一种组成物,其包含上述任一种缀合物,用于将该缀合物送达细胞内部或使其穿过血脑屏障。组成物除了缀合物以外,还可包含此说明书所记载的各种要素。

[0052] 此说明书也提供一种医药品组成物,其包含上述任一项所记载的缀合物或其盐以作为有效成分。组成物除了缀合物或其盐以外,还可包含此说明书所记载的各种要素。其盐意为缀合物在药学上可容许的盐。

[0053] 此说明书也公开一种加工方法(缀合物的制造方法),其以可将抗体或其抗原结合性片段送达细胞内部或使其穿过血脑屏障的方式进行。此方法包含使结合于上述转铁蛋白受体的肽和抗体或其抗原结合性片段结合的工序。

[0054] 此外,此说明书也提供一种各种疾病的治疗方法,其包含将上述缀合物或组成物送达细胞内部或使其穿过血脑屏障的工序。

[0055] 发明效果

[0056] 根据此说明书所记载的发明,如通过实施例所证实,可提供包含与人转铁蛋白受体(hTfR)结合的肽、具有细胞渗透性的肽等的肽和抗体或其抗原结合性片段的缀合物的缀合物等。

附图说明

[0057] [图1-1]图1-1是置换附图并表示处理曲妥珠单抗-肽缀合物而成的细胞中的荧光强度测量结果的照片；

[0058] [图1-2]图1-2是置换附图并表示处理曲妥珠单抗-肽缀合物而成的细胞中的荧光强度测量结果的照片；

[0059] [图1-3]图1-3是置换附图并表示处理曲妥珠单抗-肽缀合物而成的细胞中的荧光强度测量结果的照片；

- [0060] [图2-1]图2-1是表示曲妥珠单抗-肽缀合物的血浆中浓度的图；
- [0061] [图2-2]图2-2是表示曲妥珠单抗-肽缀合物的各组织中浓度的图；
- [0062] [图2-3]图2-3是表示纳武单抗-肽缀合物的血浆中浓度的图；
- [0063] [图2-4]图2-4是表示纳武单抗-肽缀合物的各组织中浓度的图；
- [0064] [图3-1]图3-1是置换附图并表示处理曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K (Maleimide)及曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K (Maleimide)而成的小鼠脑内定位确认试验(小脑,处理6小时)结果的照片；
- [0065] [图3-2]图3-2是置换附图并表示处理纳武单抗-894_3m_G4S2_K (Ma1)而成的小鼠脑内定位确认试验(小脑,处理6小时)结果的照片；
- [0066] [图3-3]图3-3是置换附图并表示处理纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K (Ma1)而成的小鼠脑内定位确认试验(小脑,处理6小时)结果的照片；
- [0067] [图3-4]图3-4是置换附图并表示处理纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K (Ma1)而成的小鼠脑内定位确认试验(小脑,处理24小时)结果的照片；
- [0068] [图3-5]图3-5是置换附图并表示处理纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K (Ma1)而成的小鼠脑内定位确认试验(海马体,处理6小时)结果的照片；
- [0069] [图3-6]图3-6是置换附图并表示处理纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K (Ma1)而成的小鼠脑内定位确认试验(海马体,处理24小时)结果的照片。

[0070] (发明的详细说明)

[0071] 以下说明本发明的实施方式。本发明并不限于以下说明的实施方式,也包含在本领域技术人员明显可知的范围内从以下实施方式进行适当修正而成者。

[0072] 在本说明书中,和本案为完全相同申请人的国际专利申请PCT/JP2021/006709(国际公开W02021-167107号小册;本案基础申请时未公开),其全文通过参考被纳入。

[0073] 缀合物(复合体)

[0074] 本发明的缀合物:

[0075] (1) 与转铁蛋白受体结合的肽,且为

[0076] (i) 具有序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys)所记载的氨基酸序列的肽;

[0077] (ii) 具有在序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列中具有1以上11以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽;

[0078] (iii) 具有序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第12个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)所记载的氨基酸序列的肽;或

[0079] (iv) 具有在序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第10个氨基酸序列中具有1以上8以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽;及

[0080] (2) 抗体或包含其抗原结合性片段的化合物。

[0081] 在此,该肽和抗体或包含其抗原结合性片段的化合物可直接结合,也可通过连接子结合,但优选为通过连接子结合。

[0082] 转铁蛋白受体

[0083] 所谓转铁蛋白受体,表示一种受体,其具有和包含于血浆中且与铁离子结合的蛋白质即转铁蛋白结合而被摄入细胞内的功能。转铁蛋白受体会在网织红细胞、胎盘的滋养

层细胞、淋巴球等各种细胞上表达,尤其被暗示会在肿瘤细胞中表达。并且,转铁蛋白受体因具有通过血浆中的铁离子的结合刺激而触发细胞的内吞作用这样的性质,故正进行将与转铁蛋白受体结合的抗体等用作药物输送系统而使所期望的物质穿过BBB的研究。并且,已知转铁蛋白受体有I型和II型,但本发明中的转铁蛋白受体优选为I型(Gene ID:7037)。在本案说明书中,若无特别记载,则将人型的转铁蛋白受体记载为人TfR、hTfR或仅记载为TfR。

[0084] 与转铁蛋白受体结合的肽

[0085] 所谓与转铁蛋白受体结合(也称为具有结合活性、具有亲和性),意为与转铁蛋白受体进行特异性结合。

[0086] 亲和性是通过针对转铁蛋白受体与结合肽的解离的平衡常数(KD)表示,其是表示转铁蛋白受体与结合肽的结合强度的标准:随着KD的值变小,转铁蛋白受体与结合肽之间的结合强度变强(取而代之,亲和性也能以 $1/KD$ 即亲和性常数(KA)表示)。如本领域技术人员明确可知(例如,基于本说明书中的进一步公开),亲和性可依据所结合物质的种类或性质而以其本身众所周知的方式确定。并且,结合活性是转铁蛋白受体与结合肽之间的结合强度的标准。结合活性是关于转铁蛋白受体与其在结合肽上的结合部位之间的亲和性,以及存在于结合分子上的相关结合部位的数量这两者。

[0087] 转铁蛋白受体与结合肽的特异性结合例如能以其本身众所周知的任意适当方式确定,包含本说明书所记载的表面等离子共振(SPR)分析、斯卡查德分析和/或放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)及三明治竞争分析等竞争结合分析,以及在所属技术领域其本身众所周知的其不同的变异体。优选为,本发明中的肽与转铁蛋白受体的亲和性为小于100nM,优选为小于50nM的KD,并无限定,但也可约为 $10^{-5}M \sim 10^{-9}M$,或另一实施方案中也可约为 $10^{-7}M$ 以下,例如 $10^{-7}M \sim 10^{-13}M$,例如 $10^{-9}M \sim 10^{-13}M$ 。

[0088] 所谓与转铁蛋白受体结合的肽,只要为如上述与转铁蛋白受体进行特异性结合的肽,且为:

[0089] (i) 具有序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys)所记载的氨基酸序列的肽;

[0090] (ii) 具有在序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列中具有1以上11以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽;

[0091] (iii) 具有序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第12个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)所记载的氨基酸序列的肽;或

[0092] (iv) 具有在序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第10个氨基酸序列中具有1以上8以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽,则并无特别限定。

[0093] 可穿过血脑屏障(BBB)

[0094] 所谓可穿过BBB,意为例如可使物质穿过BBB至脑内,在脑内的任意部位中在投予后的某时间可检测出该物质或其代谢物,或者获得可类推该物质在脑内造成影响的见解。

[0095] 脑部相关疾病

[0096] 所谓脑部相关疾病,表示由于脑中发生的某种异常所导致的疾病,例如中枢神经(CNS)疾病。脑部相关疾病的例子并无限定,可为阿尔茨海默病、帕金森病、朊病毒病、亨廷

顿病、溶酶体贮积病、中枢神经系统疾病、包含脑肿瘤在内的中枢神经系统的肿瘤、脑缺血、伴随脑损伤的疾病、外伤性的中枢神经系统疾病、病毒性及细菌性的中枢神经系统疾病、精神分裂症、抑郁症等造成精神性影响的疾病等。

[0097] 抗体或包含其抗原结合性片段的化合物

[0098] 所谓抗体,表示在免疫反应中发挥重要作用的分子即淋巴球的一种的B细胞所产生的糖蛋白。并且,也称为免疫球蛋白或 γ (gamma)-球蛋白、Ig。抗体是由被称为轻链与重链的多肽所组成的结构,可分为Fc区与Fab区。已知Fab区对抗原具有结合能力。

[0099] 所谓包含其抗原结合性片段的化合物,表示上述抗体中与抗原具有结合能力的区域即Fab区及包含该Fab区的化合物。

[0100] 抗体可进一步分为几个同型,例如哺乳类中已知IgG、IgA、IgM、IgD、IgE这5种。其中,IgG(免疫球蛋白G)是人体中最普遍存在于体内特别是血液或组织中的抗体,主要与二次免疫反应相关。此外,目前上市的抗体医药品几乎全为IgG。

[0101] 再者,IgG分为4个亚型:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4及IgG5。

[0102] 在本发明中优选的抗体为IgG,进一步优选的抗体为IgG1或IgG4。并且,所谓优选的包含抗原结合性片段的化合物为包含IgG的Fab区的化合物,进一步优选为包含IgG1或IgG4的Fab区的化合物。

[0103] 具有细胞渗透性的肽

[0104] 具有细胞渗透性的肽,例如,如日本专利第6478632号公报及日本专利第6708770号(具有细胞穿透性的肽)所记载,为众所周知。而且,如通过实施例所示,本发明中的肽是与转铁蛋白受体结合而被摄入细胞内。因此,若使用本发明的复合体,则可将目标的有效成分递送至细胞内,例如,可将核酸药物送至细胞内。

[0105] 肽

[0106] 意为多个氨基酸连续的结构,其含意中也包含多肽、蛋白质。此外,在本案中,所谓氨基酸,不仅包含在细胞内转译mRNA并被并入肽链的天然存在的氨基酸(天然氨基酸),也包含可通过肽结合而构成肽链的一部分的非天然存在的氨基酸(非天然氨基酸)。氨基酸可为人工合成者,也可为存在于自然界者。

[0107] 并且,在本案中,肽也包含通过合成后环状化而形成环状部的肽(也称为环状肽)、将该肽进一步进行化学修饰而得的肽。

[0108] 在本说明书中,所谓环状肽,意为在肽中,其氨基酸序列中间隔1个以上的氨基酸残基而分离的2个氨基酸彼此互相结合,由此其全部或一部分成为环状者。此外,在此,该2个氨基酸彼此的结合形式并无特别限定,但环状肽也包含以下:通过其中一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基之间的酰胺键、其中一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的硫醇基之间的硫醚键、其中一个氨基酸的硫醇基与另一个氨基酸的硫醇基之间的硫醇键、内酰胺环形成或巨环化反应而形成环状结构者;或具有套索肽状结构者等。但是,该2个氨基酸彼此通过酰胺键结合时,该酰胺键并不限于通过其中一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基结合而形成者,只要合成反应的结果是通过酰胺键进行结合即可。针对其他结合形式也相同。

[0109] 亦即,在本案中,环状肽只要其一部分为形成环状结构者即可,也可具有直链部。

[0110] 此外,在本说明书中,有时会为了肽的环状化而改变氨基酸的一部分。本案的氨基

酸也包含这种已被改变一部分的氨基酸。可举例如像是在位于N末端的氨基酸加成氯乙酰基且与肽中的半胱氨酸残基结合而进行环状化的情形,本案的氨基酸也包含经加成氯乙酰基的各种(天然/非天然)氨基酸。

[0111] 所谓非天然氨基酸,意为天然氨基酸以外的具有氨基酸特性的化合物。例如,虽不限于于此,但可列举 β -氨基酸、 γ -氨基酸、L-氨基酸、D-氨基酸(也称为D型氨基酸)、氨基酸变体、氨基酸衍生物等经化学修饰的氨基酸、正亮氨酸、 β -丙氨酸、鸟氨酸等在活体内无法成为蛋白质的构成材料的氨基酸等。可列举N-甲基氨基酸、N-乙基氨基酸、D-氨基酸、组氨酸样氨基酸、在侧链具有多余的亚甲基、芳香环等结构的氨基酸及具有侧链中的羧酸官能基被磺酸基置换的结构氨基酸衍生物等。

[0112] 以下示出非天然氨基酸的例子与本说明书中的简称。括弧内表示CAS参考编号或购入来源公司名,针对新合成者则是表示合成例编号。此外,特殊氨基酸并不限于于此等,例如,此等分子中的氢原子的1个或多个被置换成烷基而成的结构者也为特殊氨基酸。氢原子被置换成烷基时,烷基优选为甲基、乙基,更优选为甲基。此外,在本说明书中,在氨基酸名的前方记载有Me或N-Me的氨基酸,若无特别记载,则表示N-甲基氨基酸。例如,丙氨酸(Ala或A)的N-甲基化氨基酸表示为MeAla、N-MeAla、MeA或N-MeA。并且,针对单字母标记的氨基酸标记且其前方记载有d的氨基酸,表示D-氨基酸。例如,针对丙氨酸(Ala或A)的D-氨基酸,表示为da。未记载CAS编号、购入来源者,可作为一般的试剂而购入。此外,关于以下的氨基酸,在肽合成中,可通过以已知的方法将阿尔法氨基进行Fmoc保护而使用。

[0113] Yph(S) -2-氨基-3-(4-苯氧基苯基)丙酸(CAS编号:150351-64-7)

[0114] W70Me(S) -2-氨基-3-(7-甲氧基-1H-吡啶-3-基)丙酸(CAS编号:25198-03-2)

[0115] W7N(S) -2-氨基-3-(1H-吡咯并[2,3- β]吡啶-3-基)丙酸(CAS编号:49758-35-2)

[0116] W7F(S) -2-氨基-3-(7-氟-1H-吡啶-3-基)丙酸(CAS编号:138514-97-3)

[0117] W6N(S) -2-氨基-3-(1H-吡咯并[2,3-c]吡啶-3-基)丙酸(KISHIDA CHEMICAL Co., Ltd.) (CAS编号:149704-63-2)

[0118] W6F(S) -2-氨基-3-(6-氟-1H-吡啶-3-基)丙酸(CAS编号:19310-00-0)

[0119] W50Me 5-甲氧基-L-色氨酸(CAS编号:25197-96-0)

[0120] W5F(S) -2-氨基-3-(5-氟-1H-吡啶-3-基)丙酸(CAS编号:16626-02-1)

[0121] W40Me 4-甲氧基-L-色氨酸(CAS编号:406938-53-2)

[0122] W4N(S) -2-氨基-3-(1H-吡咯并[3,2- β]吡啶-3-基)丙酸(CAS编号:149818-23-5)

[0123] W4F(S) -2-氨基-3-(4-氟-1H-吡啶-3-基)丙酸(CAS编号:106034-22-4)

[0124] W4C(S) -2-氨基-3-(4-氯-1H-吡啶-3-基)丙酸(CAS编号:52448-14-3)

[0125] W2N(S) -2-氨基-3-(1H-吡啶-3-基)丙酸(CAS编号:53538-54-8)

[0126] W1iPr 1-异丙基-L-色氨酸(CAS编号:1219485-46-7)

[0127] W1Et7Cl(S) -2-氨基-3-(7-氯-1-乙基-1H-吡啶-3-基)丙酸

[0128] W1Et 1-乙基-L-色氨酸(CAS编号:168471-23-6)

[0129] Tbg(S) -2-氨基-3,3-二甲基丁酸(CAS编号:158059-28-0)

[0130] pHPeG N-(4-羟基苯乙基)甘氨酸(CAS编号:169836-45-7)

[0131] PeG N-(2-苯基乙基)-甘氨酸(CAS编号:7738-38-7)

[0132] Nva L-正缬氨酸(CAS编号:6600-40-4)

- [0133] Nle L-正亮氨酸(CAS编号:327-57-1)
- [0134] Na12 β - (2-萘基)L-丙氨酸(CAS编号:58438-03-2)
- [0135] Na11 β - (1-萘基)L-丙氨酸(CAS编号:55516-54-6)
- [0136] MeoBph N- α -甲基-2-苯基-L-苯丙氨酸
- [0137] MeNa12 N- α -甲基- β - (2-萘基) -L-丙氨酸(CAS编号:179385-30-9)
- [0138] MeNa11 N- α -甲基- β - (1-萘基) -L-丙氨酸(CAS编号:2137057-01-1)
- [0139] MemBph N- α -甲基-3-苯基-L-苯丙氨酸
- [0140] Hph L-高苯丙氨酸(CAS编号:943-73-7)
- [0141] H1y(S) -2,7-二氨基庚酸(CAS编号:498-56-6)
- [0142] F40Me(S) -2-氨基-3- (4-甲氧基苯基) 丙酸(CAS编号:7635-29-2)
- [0143] F4G(4-胍基) -L-苯丙氨酸(CAS编号:59574-11-7)
- [0144] F4F 4-氟-L-苯丙氨酸(CAS编号:1132-68-9)
- [0145] F4C 4-氯-L-苯丙氨酸(CAS编号:14173-39-8)
- [0146] F30Me(S) -2-氨基-3- (3-甲氧基苯基) 丙酸(CAS编号:98813-19-5)
- [0147] F3F 3-氟-L-苯丙氨酸(CAS编号:19883-77-3)
- [0148] F3C 3-氯-L-苯丙氨酸(CAS编号:80126-51-8)
- [0149] F20Me(S) -2-氨基-3- (2-甲氧基苯基) 丙酸(CAS编号:193546-31-5)
- [0150] F2C(S) -2-氨基-3- (2-氯苯基) 丙酸(CAS编号:103616-89-3)
- [0151] MeF40Me(S) -3- (4-甲氧基苯基) -2- (甲基氨基) 丙酸(CAS编号:52939-33-0)
- [0152] MeF4F N- α -甲基-4-氟-L-苯丙氨酸(CAS编号:347851-71-2)
- [0153] MeF:N-甲基苯丙氨酸
- [0154] MeF3F N- α -甲基-3-氟-L-苯丙氨酸(CAS编号:347851-71-2)
- [0155] MeF3C N- α -甲基-3-氯-L-苯丙氨酸(CAS编号:2255324-91-3)
- [0156] MeBph N- α -甲基-4-苯基-L-苯丙氨酸
- [0157] Me4Py N- α -甲基-4-吡啶基-L-丙氨酸
- [0158] Me3Py N- α -甲基-3-吡啶基-L-丙氨酸
- [0159] dr D-精氨酸
- [0160] dp D-脯氨酸
- [0161] dc D-半胱氨酸
- [0162] dk D-赖氨酸
- [0163] Dap L- α , β -二氨基丙酸(CAS编号:515-94-6)
- [0164] Dab(S) -2,4-二氨基丁酸(CAS编号:1758-80-1)
- [0165] Cit 2-氨基-5-脲基戊酸(CAS编号:627-77-0)
- [0166] Cha β -环己基-L-丙氨酸(CAS编号:4441-50-3)
- [0167] CeG N- (2-羧基乙基) -甘氨酸(CAS编号:505-72-6)
- [0168] Cbg(S) -2-氨基-2-环丁基乙酸(CAS编号:49607-08-1)
- [0169] Cba环丁基丙氨酸(CAS编号:1201593-65-8)
- [0170] aMeY α -甲基-L-酪氨酸(CAS编号:658-48-0)
- [0171] aMeW α -甲基-色氨酸(CAS编号:153-91-3)

- [0172] aMeK α -甲基-赖氨酸(CAS编号:111717-28-3)
- [0173] aMeC α -甲基-L-半胱氨酸(CAS编号:441317-73-3)
- [0174] Aib α -甲基丙氨酸(CAS编号:62-57-7)
- [0175] Ahp/Alahp(S) -2-氨基庚酸(CAS编号:1115-90-8)
- [0176] Abu L- α -氨基丁酸(CAS编号:1492-24-6)
- [0177] A4paa (S) -2-氨基-3-(1-(羧甲基)哌嗪-4-基)丙酸(KISHIDA CHEMICAL Co., Ltd.)
- [0178] 5Ind(S) -2-氨基-3-(1H-吡啶-5-基)丙酸(CAS编号:460096-38-2)
- [0179] 4Py2NH2(S) -2-氨基-3-(2-氨基吡啶-4-基)丙酸(KISHIDA CHEMICAL Co.,Ltd.)
- [0180] 4Py 4-吡啶基-L-丙氨酸(CAS编号:1956-21-4)
- [0181] 3Py6NH2(S) -2-氨基-3-(6-氨基吡啶-3-基)丙酸
- [0182] 3Py 3-吡啶基-L-丙氨酸(CAS编号:17470-24-5)
- [0183] W1aa 1-(羧甲基)-L-色氨酸(CAS编号:773823-50-0)
- [0184] KCOpipzMe N6-(4-甲基哌嗪-1-羰基)-L-赖氨酸(KISHIDA CHEMICAL Co.,Ltd.)
- [0185] W1mCON 1-(2-氨基-2-氧代乙基)-L-色氨酸
- [0186] W1EtOH 1-(2-羟乙基)-L-色氨酸
- [0187] 3Py6OMe(S) -2-氨基-3-(6-甲氧基吡啶-3-基)丙酸(CAS编号:1270317-99-1)
- [0188] Epyr12RCOO 2-氨基-(5-((R)-2-(烯丙氧基)羰基)吡咯啶-1-基)-5-氧代戊酸(Glu(d-Pro-0-allyl)-OH)
- [0189] Dpyr12RCOO 2-氨基-(4-((R)-2-(烯丙氧基)羰基)吡咯啶-1-基)-4-氧代丁酸(Asp(d-Pro-0-allyl)-OH)
- [0190] MeF3COO 3-羧基-N-甲基-苯丙氨酸(CAS编号:1499826-56-0)
- [0191] 3Imp 2-氨基-3-(咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)丙酸(CAS编号:2276942-95-9)
- [0192] KaAc N6-甘氨酸基-L-赖氨酸(Lys(Gly-0-allyl)-OH)
- [0193] A1Me4pip 4-氨基-1-甲基哌嗪-4-羧酸(CAS编号:15580-66-2)
- [0194] Har N6-甲脒基-L-赖氨酸(CAS编号:156-86-5)
- [0195] Acpr(S) -2-氨基-3-环丙基丙酸(CAS编号:1492156-90-7)
- [0196] Atb(S) -2-氨基-4,4-二甲基戊酸(CAS编号:1934633-35-8)
- [0197] MeF35dC(S) -3-(3,5-二氯苯基)-2-(甲基氨基)丙酸(CAS编号:1542508-65-5)
- [0198] Adod 12-氨基十二酸(CAS编号:693-57-2)
- [0199] H1y L-高赖氨酸(CAS编号:37689-89-7)
- [0200] W5C 5-氯-L-色氨酸(CAS编号:52448-15-4)
- [0201] F3COO L-3-羧基苯丙氨酸(CAS编号:13861-02-4)
- [0202] F3CON L-3-氨甲酰苯丙氨酸(CAS编号:1217651-22-3)
- [0203] Hg1 L-2-氨基己二酸(CAS编号:1118-90-7)
- [0204] Ndm N,N-二甲基-L-天冬酰胺(CAS编号:62937-43-3)
- [0205] KN3或LysN3 6-叠氮基-L-正亮氨酸(CAS编号:159610-92-1)
- [0206] KAc N6-乙酰基-L-赖氨酸(CAS编号:692-04-6)
- [0207] dorn D-鸟氨酸(CAS编号:348-66-3)

- [0208] F3H 3-羟基-L-苯丙氨酸(CAS编号:587-33-7)
- [0209] Yae 0-(2-氨基甲基)-L-酪氨酸(CAS编号:1909283-20-0)
- [0210] F4aao 0-(2-羧甲基)-L-酪氨酸(CAS编号:24558-63-2)
- [0211] F40Et 0-乙基-L-酪氨酸(CAS编号:32795-52-1)
- [0212] F34d0Me 3,4-二甲氧基-L-苯丙氨酸(CAS编号:142995-28-6)
- [0213] a1T L-别苏氨酸(CAS编号:28954-12-3)
- [0214] a1I L-别异亮氨酸(CAS编号:1509-34-8)
- [0215] MeK N-甲基-L-赖氨酸(CAS编号:7431-89-2)
- [0216] Tbg(S) -2-氨基-3,3-二甲基丁酸(CAS编号:20859-02-3)
- [0217] Nva L-正缬氨酸(CAS编号:6600-40-4)
- [0218] Abu(S) - (+) -2-氨基丁酸(CAS编号:1492-24-6)
- [0219] da D-丙氨酸
- [0220] Bph 4-苯基-L-苯丙氨酸(CAS编号:155760-02-4)
- [0221] ds D-丝氨酸
- [0222] de D-谷氨酸
- [0223] MeA N-甲基-L-丙氨酸(CAS编号:3913-67-5)
- [0224] MeR N-甲基-L-精氨酸(CAS编号:2480-28-6)
- [0225] MeW N-甲基-L-色氨酸(CAS编号:526-31-8)
- [0226] MeY N-甲基-L-酪氨酸
- [0227] MeG N-甲基-甘氨酸
- [0228] K(Maleimide)N6-(4-((2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)甲基)环己烷-1-羰基)-L-赖氨酸
- [0229] dk(Maleimide)N6-(4-((2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)甲基)环己烷-1-羰基)-D-赖氨酸
- [0230] KTrzMal(S) -2-氨基-6-(4-((2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)己酸
- [0231] gAbu 4-氨基丁酸
- [0232] 此外,新颖合成氨基酸因在制造各种肽衍生物时有可在各种肽加成新功能的可能性,故为有用。
- [0233] 本发明中的肽为
- [0234] (i) 包含序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys)的肽;
- [0235] (ii) 具有在序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列中具有1以上11以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽;
- [0236] (iii) 包含序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第12个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)的肽;或
- [0237] (iv) 具有在序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第10个氨基酸序列中具有1以上8以下的氨基酸残基的置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸序列的肽。该肽是与转铁蛋白受体结合的肽。

[0238] 此外,上述(i)~(iv)各自的选项能以任意组合选择。

[0239] 此肽的优选例为可穿过血脑屏障的肽或具有细胞渗透性的肽。

[0240] 关于肽序列

[0241] 氨基酸的被置换、缺失、加成和/或插入的氨基酸的数量,在序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列中只要为1个以上10个以下即可,其下限为1个。其上限为15个、14个、13个、12个、11个、10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个,最少1个。

[0242] 在序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第12个氨基酸序列中只要为1个以上8个以下即可,其下限为1个。其上限为8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个,最少1个。所述氨基酸的置换,宜为保存性氨基酸置换。

[0243] 保存性氨基酸置换

[0244] 所谓“保存性氨基酸置换(conservative amino acid substitution)”,意为与功能性等效或类似的氨基酸的置换。一般而言,某一群组内的置换可认为对于结构及功能具保存性。然而,如本领域技术人员明确可知,特定的氨基酸残基所发挥的作用,可由包含该氨基酸的分子在三维结构中的含意所决定。例如,半胱氨酸残基可采取氧化型的(二硫化物)形式,其相较于还原型的(硫醇)形式极性更低。精氨酸侧链长的脂肪族的部分可构成结构上及功能上的重要特征。并且,包含芳香环的侧链(色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)可有助于离子-芳香族相互作用或阳离子- π 相互作用。在所述情形中,即使将具有此等侧链的氨基酸置换成属于酸性或非极性群组的氨基酸,结构上及功能上仍可为保存性。脯氨酸、甘氨酸、半胱氨酸(二硫化物形式)等的残基可能对主链的立体结构带来直接效果,无法屡次在结构上不变形的情形中进行置换。

[0245] 保存性氨基酸置换如以下所示,包含基于侧链的类似性的特异性置换(Lehninger,生化学,改订第2版,1975年刊登,第73至75页:L.Lehninger,Biochemistry,2nd edition,pp73-75,Worth Publisher,New York(1975))及典型性置换。

[0246] 此肽的优选例,包含以下的群组1及2:

[0247] 群组1具有选自以下群组的1个以上的置换的氨基酸序列:

[0248] (I) 序列号1的第1个丙氨酸残基被脂肪族氨基酸或甲基化脂肪族氨基酸置换;

[0249] (II) 对序列号1的第2个任意氨基酸残基或任意N-甲基氨基酸的置换;

[0250] (III) 对序列号1的第3个芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基的置换;

[0251] (IV) 对序列号1的第5个芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基的置换;

[0252] (V) 序列号1的第6个天冬酰胺残基被亲水性氨基酸或丙氨酸置换;

[0253] (VI) 序列号1的第8个酪氨酸残基被芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基置换;

[0254] (VII) 序列号1的第10个异亮氨酸残基被任意氨基酸置换;

[0255] (VIII) 序列号1的第11个精氨酸残基被任意氨基酸置换;

[0256] (IX) 序列号1的第12个精氨酸残基被任意氨基酸置换;及

[0257] (X) 序列号1的第13个酪氨酸残基被任意氨基酸置换;

[0258] (XI) 序列号1的第14个N-甲基酪氨酸残基被任意氨基酸置换;

[0259] 及

[0260] 群组2具有选自以下群组的1个以上的置换的氨基酸序列:

[0261] (I) 序列号14的第1个丙氨酸残基被脂肪族氨基酸或甲基化脂肪族氨基酸置换;

[0262] (II) 对序列号14的第2个任意氨基酸残基或任意N-甲基氨基酸的置换;

[0263] (III) 对序列号14的第3个芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基的置换;

[0264] (IV) 对序列号14的第5个芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基的置换;

[0265] (V) 序列号14的第6个天冬酰胺残基被亲水性氨基酸或丙氨酸置换;

[0266] (VI) 序列号14的第8个酪氨酸残基被芳香族氨基酸残基、甲基化芳香族氨基酸残基、侧链具有芳香环的氨基酸残基置换;

[0267] (VII) 序列号14的第10个异亮氨酸残基被任意氨基酸置换;

[0268] (X) 序列号14的第11个丝氨酸残基被亲水性氨基酸残基置换。

[0269] 所谓“甲基化”,意为N-甲基化,亦即对该氨基酸的氨基赋予甲基,例如若说经甲基化的丙氨酸,意为N-甲基丙氨酸(MeA)。

[0270] 所谓“侧链具有芳香环”,意为侧链具有可为稠环或杂环的芳香环的氨基酸。此外,该芳香环也可具有置换基。例如,F4C于其侧链具有将位置4的碳置换成与氯结合的碳的苜基,因此为侧链具有芳香环的氨基酸的一种。

[0271] 存在于自然界的氨基酸,可根据其共通的侧链的性质而分成如下群组。

[0272] (1) 疏水性(也称为非极性)氨基酸:呈疏水性(非极性)的氨基酸,包含:丙氨酸(也标记为“Ala”或仅标记为“A”)、甘氨酸(也标记为“Gly”或仅标记为“G”)、缬氨酸(也标记为“Val”或仅标记为“V”)、亮氨酸(也标记为“Leu”或仅标记为“L”)、异亮氨酸(也标记为“Ile”或仅标记为“I”)、脯氨酸(也标记为“Pro”或仅标记为“P”)、苯丙氨酸(也标记为“Phe”或仅标记为“F”)、色氨酸(也标记为“Trp”或仅标记为“W”)、酪氨酸(也标记为“Tyr”或仅标记为“Y”)、甲硫氨酸(也标记为“Met”或仅标记为“M”)。

[0273] 此外,疏水性氨基酸也可进一步分成以下的群组。

[0274] 脂肪族氨基酸:侧链具有脂肪酸或氢的氨基酸,包含Ala、Gly、Val、Ile、Leu。

[0275] 脂肪族/支链氨基酸:侧链具有分支型脂肪酸的氨基酸,包含Val、Ile、Leu。

[0276] 芳香族氨基酸:侧链具有芳香环的氨基酸,包含Trp、Tyr、Phe。

[0277] (2) 亲水性(也称为极性)氨基酸:呈亲水性(极性)的氨基酸,包含:丝氨酸(也标记为“Ser”或仅标记为“S”)、苏氨酸(也标记为“Thr”或仅标记为“T”)、半胱氨酸(也标记为“Cys”或仅标记为“C”)、天冬酰胺(也标记为“Asn”或仅标记为“N”)、谷氨酰胺(也标记为“Gln”或仅标记为“Q”)、天冬氨酸(也标记为“Asp”或仅标记为“D”)、谷氨酸(也标记为“Glu”或仅标记为“E”)、赖氨酸(也标记为Lysine;也标记为“Lys”或仅标记为“K”)、精氨酸(也标记为“Arg”或仅标记为“R”)、组氨酸(也标记为“His”或仅标记为“H”)。

[0278] 此外,亲水性氨基酸也可进一步分成以下群组。

[0279] 酸性氨基酸:侧链呈酸性的氨基酸,包含Asp、Glu。

[0280] 碱性氨基酸:侧链呈碱性的氨基酸,包含Lys、Arg、His。

[0281] 中性氨基酸:侧链呈中性的氨基酸,包含Ser、Thr、Asn、Gln、Cys。

[0282] 并且,关于Gly及Pro,也可分成“不影响主链方向的氨基酸”,侧链包含硫分子的氨基酸、Cys及Met也可分成“含硫氨基酸”。

[0283] 并且,侧链具有芳香族的群组包含Trp、Tyr、Phe。

[0284] 此说明书中的优选的肽的例子,与上述的肽相同,为可与人转铁蛋白受体(hTfR)结合的肽。并且,优选例为可穿过血脑屏障的肽或具有细胞渗透性的肽。

[0285] 此说明书中的优选的肽的例子,也可为在包含序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys)的肽中,具有序列号1的第1、2、3、5、6、8、10个至第14个中的任一个氨基酸残基被置换的氨基酸序列的肽。

[0286] 所谓“氨基酸残基被置换”,意为特定的氨基酸残基被置换成其他可被修饰的氨基酸残基。

[0287] 也可为以下的肽:

[0288] 在包含序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys)的肽中,

[0289] 序列号1的第1个丙氨酸残基为可被修饰的丙氨酸(Ala)或可被修饰的谷氨酸(Glu),

[0290] 序列号1的第2个缬氨酸残基为可被修饰的缬氨酸(Val)或可被修饰的谷氨酸(Glu),

[0291] 序列号1的第3个苯丙氨酸残基为可被修饰的苯丙氨酸(Phe),

[0292] 序列号1的第5个色氨酸残基为可被修饰的色氨酸(Trp),

[0293] 序列号1的第6个天冬酰胺残基为丙氨酸,

[0294] 序列号1的第8个酪氨酸残基为可被修饰的苯丙氨酸,

[0295] 序列号1的第10个异亮氨酸残基为可被修饰的异亮氨酸(Ile)、可被修饰的丙氨酸(Ala)或可被修饰的缬氨酸(Val)的肽;

[0296] 序列号1的第11个精氨酸残基为任意氨基酸残基,

[0297] 序列号1的第12个异亮氨酸残基为可被修饰的异亮氨酸(Ile)或可被修饰的缬氨酸(Val)的肽。

[0298] 所谓“可被修饰的”,意为可进行众所周知的氨基酸修饰或改变。修饰的例子为N-甲基化(也称为甲基化)、具有在本说明书中所公开的简称的氨基酸修饰、修饰(转换)成D型、转换成众所周知的该氨基酸的衍生物。

[0299] 并且,也可为以下的肽:

[0300] 在包含序列号1所记载的氨基酸序列的第1个至第15个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Arg-Arg-Tyr-MeY-Cys)的肽中,

[0301] 序列号1的第1个氨基酸残基为Ala、Aib、Abu、Glu、Gly、Ser、Phe、Pro或MeA,尤其优选为Ala或Abu,

[0302] 序列号1的第2个氨基酸残基为Val、Glu、Ala、Arg、Lys、Asp、Phe、Dap、Har、Abu、Nva、AcPr、Atb、Ahp或Hgl,尤其优选为Val、Glu或Hgl,

[0303] 序列号1的第3个氨基酸残基为Phe、F3C、F2C、F20Me、F4C、Cha、MeF、MeF35dC、MeF4F、MeF40me、MeNal1、Me3Py、Me4Py、Me30Me、MeF3C00、MeF3F、Glu、Epyr12RC00、

Dpyr12RC00或MeF3C,尤其优选为Phe、MeF或MeF3C,

[0304] 序列号1的第5个氨基酸残基为Trp、MeW、aMeW、dp、F3C、F3F、F30Me、F4C、F4F、Hph、MemBph、MeNa11、MeNa12、MeoBph、W40Me、W1Et、W1Et7C1、W1iPr、Yph、W1Pr、W5C、W5F、W1aa、W1EtOH、W40Me、W1mCON或W6F,尤其优选为Trp或MeTrp,

[0305] 序列号1的第6个氨基酸残基为Asn、Ala或Asp,尤其优选为Ala或Asn,

[0306] 序列号1的第8个氨基酸残基为Phe、Tyr、Typ、Ahp、MeY、F40Me、3Imp、4Py、3Py、3Py60Me、F3C、F3CON、F4C、F4aa0、F4F、F40Et、MeF34d0Me、Yae、Lys、Orn或Na11,尤其优选为Tyr、Ahp或F40Me,

[0307] 序列号1的第10个氨基酸残基为Ala、Abu、Acpr、Ahp、Aib、alI、alT、Atb、Dab、Dap、dorn、Gln、Hly、Ile、Lys、KC0pipzMe、Leu、Nle、Nva、Pro、Arg、Ser、Thr、Tbg、Val或Tyr,尤其优选为Ile或Ala,

[0308] 序列号1的第11个氨基酸残基为Arg、Ala、Asp、Gly、Glu、Lys、MeK、MeR、Dap、Dap、Abu、Aib、Hly、dorn、aMeK、A1Me4pip、KC0pipzMe、F4G、Nle、Nva或Orn,尤其优选为Ala、Glu、Lys、Arg或Hly,

[0309] 序列号1的第12个氨基酸残基为Lys、Glu、Arg、dr、Tyr、F4G、Orn、Hly、da、Cit、Dap或Dab,尤其优选为Glu、Arg或dr,

[0310] 序列号1的第13个氨基酸残基为Ala、Phe、Asn、Tyr或pHPeG,尤其优选为Phe或Tyr,

[0311] 序列号1的第14个氨基酸残基为MeY、Tyr、Phe、Ala、aMeY、Glu、Gly、Arg、Val、MeoBphMeBph、MeF、MemBph、MeNa11、MeNa12、MeoBph、MeW或pHPeG,尤其优选为Tyr或MeTyr的肽。

[0312] 此肽优选的另一例为,在包含序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第12个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)的肽中,具有1以上8以下的氨基酸残基的置换、缺失和/或插入的氨基酸序列的肽。

[0313] 也可为在包含序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第12个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)的肽中,具有序列号14的第1、2、3、5、6、8、10、11个中的任一个氨基酸残基被置换的氨基酸序列的肽。

[0314] 也可为以下的肽:

[0315] 在包含序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第12个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)的肽中,

[0316] 序列号14的第1个丙氨酸残基为可被修饰的丙氨酸(Ala)或可被修饰的谷氨酸(Glu),

[0317] 序列号14的第2个缬氨酸残基为可被修饰的缬氨酸(Val)或可被修饰的谷氨酸(Glu),

[0318] 序列号14的第3个苯丙氨酸残基为可被修饰的苯丙氨酸(Phe),

[0319] 序列号14的第5个色氨酸残基为可被修饰的色氨酸(Trp),

[0320] 序列号14的第6个天冬酰胺残基为丙氨酸,

[0321] 序列号14的第8个酪氨酸残基为可被修饰的苯丙氨酸,

[0322] 序列号14的第10个异亮氨酸残基为可被修饰的异亮氨酸(Ile)、可被修饰的丙氨酸(Ala)或可被修饰的缬氨酸(Val),

- [0323] 序列号14的第11个丝氨酸残基为组氨酸(His)或天冬酰胺(Asn)的肽。
- [0324] 此等肽优选肽长度为12以上15以下,优选为12以上14以下,进一步优选为12以上13以下,最优选为12。此外,此情形中,所谓肽长度,意为环状结构所包含的氨基酸序列的数量,不含氨基酸连接子的数量。
- [0325] 并且,也可为以下的肽:
- [0326] 在包含序列号14所记载的氨基酸序列的第1个至第12个氨基酸序列(Ala-Val-Phe-Val-Trp-Asn-Tyr-Tyr-Ile-Ile-Ser-Cys)的肽中,
- [0327] 序列号14的第1个氨基酸残基为Ala、Aib、Abu、Glu、Gly、Ser、Phe、Pro或MeA,尤其优选为Ala,
- [0328] 序列号14的第2个氨基酸残基为Val、Glu、Ala、Arg、Lys、Asp、Phe、Dap、Har、Abu、Nva、AcPr、Atb、Ahp或Hgl,尤其优选为Val,
- [0329] 序列号1的第3个氨基酸残基为Phe、F3C、F2C、F20Me、F4C、Cha、MeF、MeF35dC、MeF4F、MeF40me、MeNa11、Me3Py、Me4Py、Me30Me、MeF3C00、MeF3F、Glu、Epyr12RC00、Dpyr12RC00或MeF3C,尤其优选为Phe,
- [0330] 序列号1的第5个氨基酸残基为Trp、MeW、aMeW、dp、F3C、F3F、F30Me、F4C、F4F、Hph、MemBph、MeNa11、MeNa12、MeoBph、W40Me、W1Et、W1Et7Cl、W1iPr、Yph、W1Pr、W5C、W5F、W1aa、W1EtOH、W40Me、W1mCON或W6F,尤其优选为Trp,
- [0331] 序列号1的第6个氨基酸残基为Asn、Ala或Asp,尤其优选为Asn,
- [0332] 序列号1的第8个氨基酸残基为Phe、Tyr、Typ、Ahp、MeY、F40Me、3Imp、4Py、3Py、3Py60Me、F3C、F3CON、F4C、F4aa、F4F、F40Et、MeF34d0Me、Yae、Lys、Orn或Na11,尤其优选为Tyr,
- [0333] 序列号1的第10个氨基酸残基为Ala、Abu、Acpr、Ahp、Aib、alI、alT、Atb、Dab、Dap、dorn、Gln、Hly、Ile、Lys、KC0pipzMe、Leu、Nle、Nva、Pro、Arg、Ser、Thr、Tbg、Val或Tyr,尤其优选为Ile,
- [0334] 序列号1的第11个氨基酸残基为Ser、His或Asn,尤其优选为Ser的肽。
- [0335] 此肽的优选例为由序列号1~13、15、18~86、90~110的第1个至第15个氨基酸序列或序列号14、16、17、87~89的第1个至第12个氨基酸序列所组成的肽。
- [0336] 此肽的优选例为上述任一种肽,且为环状肽。优选为在序列号1~13、15、18~86、90~110的第1个至第15个氨基酸序列或序列号14、16、17、87~89的第1个至第12个氨基酸序列中第1个氨基酸被氯乙酰化,且以其乙酰基与所述氨基酸序列末端的半胱氨酸环状化的肽。
- [0337] 此肽的优选例为序列号1~110中任一者所记载的氨基酸序列或氨基酸序列与连接子的复合体(后述的连接子加成肽),且(1)包含序列号1~13、15、18~86、90~110的第1个至第15个氨基酸序列部分,该部分具有环状结构的肽;或(2)包含序列号14、16、17、87~89的第1个至第12个氨基酸序列部分,该部分具有环状结构的肽。
- [0338] 关于环状肽
- [0339] 意指肽中的2个氨基酸结合,其全部或一部分成为环状者。此外,在本案中,也包含肽中的氨基酸形成交联结构者、通过形成内酰胺环或巨环化反应而形成环状结构者、具有套索肽状结构者等。亦即,在本案中,环状肽只要其一部分为形成环状结构者即可,也可具

有直链部。并且,也可采取如形成1个环状结构的环状肽所包含的2个氨基酸进一步结合的双环结构等复合环状结构。

[0340] 一般而言,肽在活体内的代谢稳定性差,且因尺寸大而有难以渗透细胞膜的问题。对于这种课题,已有使肽进行环状化的方法。若将肽进行环状化,则蛋白酶耐性提升,代谢稳定性提升,且对构象变化也有所限制,因此暗示刚性增加且膜穿透性及与目标蛋白质的亲和性提升。

[0341] 环化法

[0342] 关于肽的环化,可遵循众所周知的方法进行。

[0343] 虽不限于此,但例如通过设计成在肽中包含2个以上的半胱氨酸残基,而在转译后,可通过双硫键而形成环状结构。并且,遵循Goto等人的方法(Y.Goto, et al. *Acss Chem. Biol.* 3 120-129 (2008)),通过遗传密码的重编程技术,合成在N末端具有氯乙酰基的肽,并预先在肽中配置半胱氨酸残基,由此也可环状化。由此,在转译后巯基自动地对氯乙酰基进行亲核攻击,肽通过硫醚键而环状化。也可通过遗传密码的重编程技术,将进行结合而形成环状的其他氨基酸的组合配置于肽内而进行环状化。并且,合成在N末端具有环酰胺的肽,并预先在肽中配置Hg1残基,由此也可进行环状化。如此,只要为众所周知的环状化方法则可进行,并无特别限制。

[0344] 所述肽具有N末端氨基酸(第1个氨基酸残基)与所述肽所包含的半胱氨酸残基结合的环状结构。在一实施方案中,所述肽具有N末端氨基酸(第1个氨基酸残基)与所述肽所包含的第15个或第12个半胱氨酸残基结合的环状结构。在一实施方案中,所述肽具有被氯乙酰化的N末端氨基酸(第1个氨基酸残基)与所述肽所包含的第15个或第12个半胱氨酸残基结合的环状结构。“氯乙酰化”也可为利用其他卤素所进行的“卤素乙酰化”。并且,“乙酰化”也可为利用乙酰基以外的酰基所进行的“酰基化”。

[0345] 在本说明书中,有时会为了肽的环状化而改变氨基酸的一部分。本案的氨基酸也包含这种已被改变一部分的氨基酸。例如,如上所述,像是在位于N末端的氨基酸加成氯乙酰基且与肽中的半胱氨酸残基结合而进行环状化的情形,本案的氨基酸也包含这种经加成氯乙酰基的各种(天然/非天然)氨基酸。

[0346] 本发明的肽的优选例为上述任一种肽,且为由15氨基酸残基或12氨基酸残基所组成的肽。

[0347] 肽长度

[0348] 肽、肽部位的酰胺键的数量(氨基酸的数量、长度)并无特别限定,但总氨基酸残基(与肽结合的物质或结合该物质与肽的连接子包含氨基酸时,不包含该等氨基酸)优选为20残基以内。氨基酸优选为6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上,氨基酸优选为19以下、18以下、17以下、16以下、15以下。

[0349] 连接子

[0350] 本发明的缀合物(复合体)优选包含肽和抗体或其抗原结合性片段,且肽和抗体或其抗原结合性片段通过连接子结合。该肽-抗体或其抗原结合性片段间的连接子,也可为包含连接子的肽(以下也称为连接子加成肽)的连接子和抗体或其抗原结合性片段通过包含前述反应性官能基的任意适当的反应基所进行的化学结合而形成者。

[0351] 以下对连接子加成肽进行说明。

[0352] 连接子加成肽中的连接子的例子是连接子的氨基酸长度为1以上15以下,且连接子包含选自甘氨酸(Gly)及丝氨酸(Ser)的1个以上。

[0353] 此连接子的优选例是N末端为可被修饰的半胱氨酸(Cys)或可被修饰的赖氨酸(Lys)。

[0354] 连接子加成肽中的连接子的另一例是氨基酸长度为1以上5以下,且包含选自D型的谷氨酸(de)及甲基化甘氨酸(MeG)的1个以上。

[0355] 此连接子的优选例是N末端为可被修饰的半胱氨酸(Cys)或可被修饰的赖氨酸(Lys)。

[0356] 连接子的另一例是包含聚乙二醇(PEG)或聚乙二醇的衍生物的PEG连接子。聚乙二醇的衍生物包含所有众所周知的PEG连接子。并且,一部分也可被置换成官能基或加成官能基。例如,并无限定,可列举甲基、氨基、叠氮基等。

[0357] PEG连接子优选为PEG4c、PEG12c、PEG8c、PEG36、PEG4c-PEG4c-PGE4c、PEG4c-PEG4c。

[0358] 并且,PEG连接子优选为进一步包含选自甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、精氨酸(Arg)、gAbu、KTrzMal及赖氨酸(Lys)的1个以上者。

[0359] 并且,连接子中也可进一步包含用于使所期望的物质结合的反应性官能基。作为反应性官能基的例子,可列举:马来酰亚胺、酰肼、NHS、用于点击反应的官能基等。

[0360] 连接子加成肽中的连接子的另一例是连接子为具有表1中显示为Linker SEQ的序列或由表5中显示的序列号111~161中任一者所示的序列的连接子。

[0361] 连接子加成肽中的连接子的优选例为

[0362] 聚乙二醇(PEG);

[0363] 由Gly或MeG所组成的肽连接子即G连接子、由Gly或MeG与Ser所组成的肽连接子即GS连接子;或具有表1中显示为Linker SEQ的序列或由表5中显示的序列号111~161中任一者所示的序列中任一者所示的氨基酸序列的连接子。

[0364] 本说明书中,连接子(也称为交联剂)表示与转铁蛋白受体结合的肽和抗体或其抗原结合性片段的分子间连结,可为众所周知或本说明书所记载的任意的连接子。在特定的实施方式中,所述连接子例如为化学连接子、脂肪酸连接子、肽连接子(多肽连接子)。并且,例如可为化学连接子与肽连接子等的复合体。例如,可为表1中显示为Linker SEQ的序列或由表5中显示的序列号111~161中任一者所示的皆具有PEG及氨基酸残基或肽部分的连接子结构。

[0365] 连接子例如可为通过环境、条件而分散、分离者,也可为保持稳定结构者。

[0366] 化学连接子:在几个实施方式中,连接子可为化学连接子。化学连接子并不限于此,但例如包含:置换或非置换亚烷基、置换或非置换亚杂烷基、置换或非置换亚环烷基、置换或非置换亚杂环烷基、置换或非置换亚芳基和/或置换或非置换亚杂芳基。并且,肽与连接子可通过硫氢基、氨基(胺)和/或碳水化合物或任意的适当反应基使其缀合。同质二官能性及异质二官能性交联剂(共轭剂)可来自许多商业来源。交联剂可包含可挠性臂,例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个碳原子。作为交联剂的例子,可列举BSS3(双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯)、NHSS/EDC(N-羟基琥珀酰亚胺与N-乙基-(二甲基氨基丙基)碳二亚胺)、磺酸基-EMCSS([N-e-马来酰亚胺己酸]酰肼)、酰肼以及SSATA(N-琥珀酰亚胺基-SS-

乙酰硫代乙酸)等。

[0367] 化学连接子的优选例为PEG (Polyethyleneglycol, 聚乙二醇) 连接子。例如, PEG连接子可为由1~24个乙二醇单元所组成的PEG连接子。

[0368] 脂肪酸连接子: 连接子可为由脂肪酸所衍生的包含二价化学部分的脂肪酸连接子。例如, 脂肪酸连接子可为具有12-氨基十二酸的连接子。

[0369] 肽连接子: 肽连接子包含至少1个氨基酸(例如, 至少2、3、4、5、6、7、10、15、20、25、40或50个氨基酸的肽)。在特定的实施方式中, 连接子为1个氨基酸(例如, Cys等任意的天然氨基酸)。在其他实施方式中, 使用如美国专利第7,271,149号所记载的包含序列[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n(式中, n为1、2、3、4、5或6)的肽等富含甘氨酸的肽。在其他实施方式中, 使用如美国专利第5525491号所记载的富含丝氨酸的肽连接子。作为富含丝氨酸的肽连接子, 可列举式[X-X-X-X-Gly]_y(式中, X中最多2个为Thr, 其他X为Ser, y为1~5)者(例如, Ser-Ser-Ser-Ser-Gly(式中, y为2以上))。在几个事例中, 连接子为1个氨基酸(例如, Gly或Ala等任意的氨基酸)。

[0370] 或者, 此外, 可列举众所周知的连接子, 例如W02021/054370、W02020/209285、W02020/028832、W02017/221883、W02015/194520、W02012/150960、W02012/029986等所记载的连接子。

[0371] 制造方法

[0372] 本发明中的肽可通过液相法、固相法、组合液相法与固相法的混合法等化学合成法, 基因重组法等众所周知的肽的制造方法而进行制造。

[0373] 固相法例如是使具有羟基的树脂的羟基与 α -氨基被保护基保护的第一氨基酸(通常是作为目标的肽的C末端氨基酸)的羧基进行酯化反应。作为酯化触媒, 可使用1-均三甲苯磺酰基-3-硝基-1,2,4-三唑(MSNT)、二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIPCDI)等众所周知的脱水缩合剂。

[0374] 接着, 使第一氨基酸的 α -氨基的保护基脱离, 并且添加主链的羧基以外的全部官能基被保护的氨基酸, 使该羧基活化, 而使第一及第二氨基酸结合。再者, 将第二氨基酸的 α -氨基去保护, 添加主链的羧基以外的全部官能基被保护的第三氨基酸, 使该羧基活化, 而使第二及第三氨基酸结合。重复此操作, 若合成目标长度的肽, 则将全部官能基去保护。

[0375] 作为固相合成的树脂, 可列举Merrifield resin、MBHA resin、Cl-Trt resin、SASRIN resin、Wang resin、Rink amide resin、HMFS resin、Amino-PEGA resin(默克公司)、HMPA-PEGA resin(默克公司)等。此等树脂可在以溶剂(二甲基甲酰胺(DMF)、2-丙醇、二氯甲烷等)清洗后使用。

[0376] 作为 α -氨基的保护基, 可列举苯甲氧羰基(Cbz或Z)、叔丁氧羰基(Boc)、苄甲氧羰基(Fmoc)、苄基、烯丙基、烯丙氧基羰基(Alloc)等。Cbz基可通过氢氟酸、氢化等而去保护, Boc基可通过三氟乙酸(TFA)而去保护, Fmoc基可利用由哌啶所进行的处理而去保护。

[0377] α -羧基的保护可使用甲酯、乙酯、苄酯、叔丁酯、环己酯等。

[0378] 作为氨基酸的其他官能基, 丝氨酸或苏氨酸的羟基可被苄基或叔丁基保护, 酪氨酸的羟基可被2-溴苄甲氧羰基或叔丁基保护。赖氨酸侧链的氨基、谷氨酸或天冬氨酸的羧基可与 α -氨基、 α -羧基同样地进行保护。

[0379] 羧基的活化可使用缩合剂而进行。作为缩合剂,可举例如二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIPCDI)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC或WSC)、(1H-苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐(BOP)、1-[双(二甲基氨基)甲基]-1H-苯并三唑鎓-3-氧化物六氟磷酸盐(HBTU)等。

[0380] 来自树脂的肽链的剪切可通过以TFA、氟化氢(HF)等酸进行处理而进行。

[0381] 利用基因重组法(转译合成系统)制造肽,可使用将本发明中的肽进行编码的核酸而进行。将本发明中的肽进行编码的核酸可为DNA,也可为RNA。

[0382] 将本发明中的肽进行编码的核酸,可利用众所周知的方法或依据其的方法而制备。例如,可通过自动合成装置进行合成。为了将所得的DNA插入载体,可添加限制酶识别部位,也可并入将用于以酶等剪切所得的肽链的氨基酸序列进行编码的碱基序列。

[0383] 如上所述,在使本发明中的肽与膜穿透性肽等进行融合时,上述核酸也包含编码膜穿透性肽的核酸。

[0384] 为了抑制由源自宿主的蛋白酶所进行的分解,也可使用以与其他肽的嵌合肽的形式表达目标肽的嵌合蛋白质表达法。此情形中,作为上述核酸,可使用将作为目标的肽及与其结合的肽进行编码的核酸。

[0385] 接着,使用将本发明中的肽进行编码的核酸制备表达载体。核酸可直接、或以限制酶进行消化、或加成连接子等,而插入表达载体的启动子的下游。作为载体,可列举源自大肠杆菌的质体(pBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pBluescript II等)、源自枯草芽孢杆菌的质体(pUB110、pTP5、pC1912、pTP4、pE194、pC194等)、源自酵母的质体(pSH19、pSH15、YEp、YRp、YIp、YAC等)、噬菌体(e噬菌体、M13噬菌体等)、病毒(逆转录病毒、牛痘病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、花椰菜花叶病毒、烟草花叶病毒、杆状病毒等)、黏粒等。

[0386] 启动子可依据宿主的种类而适当选择。宿主为动物细胞时,例如可使用源自SV40(simian virus 40,猿猴病毒40)的启动子、源自CMV(cytomegalovirus,巨细胞病毒)的启动子。宿主为大肠杆菌时,可使用trp启动子、T7启动子、lac启动子等。

[0387] 也可在表达载体中并入将DNA复制起始点(ori)、选择标记(抗生素抗性、营养要求性等)、增强子、剪接信号、聚A加成信号、标签(FLAG、HA、GST、GFP等)进行编码的核酸等。

[0388] 接着,以上述表达载体将适当的宿主细胞进行转化。宿主可依据与载体的关系而适当选择,例如可使用大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、芽孢杆菌属菌、酵母、昆虫或昆虫细胞、动物细胞等。作为动物细胞,例如可使用HEK293T细胞、CHO细胞、COS细胞、骨髓瘤细胞、HeLa细胞、Vero细胞。转化可根据宿主的种类,遵循脂质转染法、磷酸钙法、电穿孔法、显微注射法、粒子枪法等众所周知的方法而进行。通过遵循常规方法培养转化体,而表达目标肽。

[0389] 来自转化体的培养物的肽的精制是回收培养细胞,将其悬浮于适当的缓冲液后,通过超音波处理、冷冻融解等方法而破坏细胞,并通过进行离心分离及过滤而获得粗提取液。培养液中分泌肽时,回收上清液。

[0390] 从粗提取液或培养上清液的精制也可利用众所周知的方法或依据其的方法(例如,盐析、透析法、超过滤法、凝胶过滤法、SDS-PAGE法、离子交换层析法、亲和力层析法、反相高效液相层析法等)而进行。

[0391] 所得的肽也可利用众所周知的方法或依据其的方法而从游离体转换成盐或从盐

转换成游离体。

[0392] 转译合成系统可设为无细胞转译系统。无细胞转译系统例如包含核糖体蛋白质、氨基酰基tRNA合成酶(ARS)、核糖体RNA、氨基酸、rRNA、GTP、ATP、转译起始因子(IF)、伸长因子(EF)、释放因子(RF)及核糖体再循环因子(RRF),以及转译所需的其他因子。为了提高表达效率,也可添加大肠杆菌提取液或小麦胚芽提取液。另外,也可添加兔红血球提取液或昆虫细胞提取液。

[0393] 在包含此等的系统中,通过使用透析连续地供给能量,而可生产数100 μ g至数mg/mL的蛋白质。为了一并进行来自基因DNA的转录,也可设为包含RNA聚合酶的系统。作为市售的无细胞转译系统,作为源自大肠杆菌的系统可使用Roche Diagnostics公司的RTS-100(注册商标)、GeneFrontier公司的PURESYSTEM、NEW ENGLAND Biolabs公司的PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit等,作为使用小麦胚芽提取液的系统可使用ZOEGENE公司、CellFree Sciences公司的产品等。

[0394] 根据无细胞转译系统,能以不需精制的高纯度形式获得表达产物。

[0395] 在无细胞转译系统中,也可使用将所期望的氨基酸或羧基酸与tRNA连结(酰基化)而成的人工的氨基酰基tRNA,代替天然的氨基酰基tRNA合成酶所合成的氨基酰基tRNA。所述氨基酰基tRNA可使用人工的核糖酶进行合成。

[0396] 作为所述核糖酶,可列举弹性酶(flexizyme)(H.Murakami,H.Saito,and H.Suga,(2003),Chemistry&Biology,Vol.10,655-662;H.Murakami,D.Kourouklis,and H.Suga,(2003),Chemistry&Biology,Vol.10,1077-1084;H.Murakami,A.Ohta,H.Ashigai,H.Suga(2006)Nature Methods 3,357-359“The flexizyme system:a highly flexible tRNA aminoacylation tool for the synthesis of nonnatural peptides”;N.Niwa,Y.Yamagishi,H.Murakami,H.Suga(2009)Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters 19,3892-3894“A flexizyme that selectively charges amino acids activated by a water-friendly leaving group”;及W02007/066627等)。弹性酶也被称为原型的弹性酶(Fx)及由此改变的二硝基苄基弹性酶(dFx)、增强弹性酶(eFx)、氨基弹性酶(aFx)等。

[0397] 通过使用由弹性酶所生成的连结有所期望的氨基酸或羧基酸的tRNA,而可使所期望的密码子与所期望的氨基酸或羧基酸相关联并进行转译。作为所期望的氨基酸,也可使用特殊氨基酸。例如,上述的环状化所需的非天然氨基酸也可通过此方法而导入至结合肽。

[0398] 本发明中的环状肽与其类似物的化学合成,可使用包含阶段性固相合成、经过构象性所支援的再连接的肽片段的半合成、化学连接的各种在该技术领域中所泛用的方法进行合成。本说明书所记载的肽与其类似物的合成,例如为使用如K.J.Jensen,P.T.Shelton,S.L.Pedersen,Peptide Synthesis and Applications,2nd Edition,Springer,2013等所记载的各种固相技术的化学合成。优选的策略是根据暂时地保护 α -氨基及能利用碱而选择性去除的Fmoc基、与暂时地保护侧链官能基且在去Fmoc条件下稳定的保护基的组合。这种一般的肽侧链的选择,在上述Peptide Synthesis and Applications,2nd edition、G.B.Fields,R.L.Noble,Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids,Int.J.Peptide Protein Res.35,1990,161-214等已为人所知,但作为优选的肽侧链保护基,有对于以赖氨酸为代表的氨基的Boc基或Mtt基、对于谷氨酸或天冬氨酸的羧基的tert-butyl基,以及对于半胱氨酸的硫醇基的Trt

及Mmt基。

[0399] 本发明所记载的肽与其类似物,可在上述固相树脂上且在阶段性方法中合成。所使用的C末端氨基酸及合成所使用的所有氨基酸及肽,在合成过程中必须选择性地去除 α -氨基保护基。优选为使用上述固相树脂,通过适当的试剂将N末端被Fmoc等适当保护的肽的C末端羧基或被Fmoc保护的氨基酸的C末端羧基制成活化酯后,通过加成至固相树脂上的氨基而开始。连续的肽链的伸长,可遵循作为目标的肽的氨基酸序列,通过依序重复N末端保护基(Fmoc基)的去除、接着保护氨基酸衍生物的缩合而达成。此外,此等可在最终阶段使目标的肽游离。例如,作为使其游离的条件,可列举Teixeira, W.E. Benckhuijsen, P.E. de Koning, A.R.P.M. Valentijn, J.W. Drijfhout, *Protein Pept. Lett.*, 2002, 9, 379-385等,在TFA中,作为捕捉剂,可利用包含水/氢化硅烷/硫醇的TFA溶液使其游离。作为典型的例子,可列举TFA/Water/TIS/DODT(体积比92.5:2.5:2.5:2.5)。

[0400] 本说明书所记载的肽类似物的合成,可通过使用单或多通道肽合成仪,例如CEM公司的Liberty Blue合成仪或Biotage公司的Syro I合成仪而实施。

[0401] 羧基的活化可使用缩合剂而进行。作为缩合剂,可举例如二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIPCDI)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC或WSC)、(1H-苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐(BOP)、1-[双(二甲基氨基)甲基]-1H-苯并三唑鎓-3-氧化物六氟磷酸盐(HBTU)等。

[0402] 缀合物(复合体)

[0403] 本发明的缀合物优选包含上述肽和抗体或其抗原结合性片段,且肽和抗体或其抗原结合性片段通过连接子结合。该肽-抗体或其抗原结合性片段间的连接子,也可为包含连接子的肽(以下也称为连接子加成肽)的连接子和抗体或其抗原结合性片段通过包含反应性官能基的任意适当的反应基所进行的化学结合而形成者。

[0404] 本发明的缀合物包含对hTfR具有结合性且可穿过血脑屏障的肽,因此本发明的缀合物如实施例所示,对hTfR具有结合性,且可将抗体或包含其抗原结合性片段的化合物搬运至血脑屏障的内部。

[0405] 并且,本发明的缀合物包含具有细胞渗透性的肽,因此本发明的缀合物如实施例所示,具有细胞渗透性,且可将抗体或包含其抗原结合性片段的化合物搬运至细胞内。

[0406] 因此,本发明的缀合物尤其能够对脑部相关疾病的预防或治疗有用。

[0407] 药物组成物

[0408] 此说明书所公开的另一实施方案是关于药物组成物。此药物包含上述TfR结合肽-抗体缀合物、其药学上所容许的盐或溶剂合物(为了简化,以下也将此等仅标记为抗体或包含其抗原结合性片段的化合物)。此药物组成物优选为包含有效量的上述缀合物作为有效成分。

[0409] 在本说明书中,药物组成物的投予形态并无特别限定,可经口投予也可非经口投予。作为非经口投予,可举例如肌肉内注射、静脉内注射、皮下注射等注射投予、经皮投予、经粘膜投予(经鼻、经口腔、经眼、经肺、经阴道、经直肠)投予等。

[0410] 上述药物组成物可鉴于多肽容易被代谢及排泄的性质而进行各种修饰。例如,可在多肽加成聚乙二醇(PEG)或糖链而增长血中滞留时间、使抗原性降低。并且,也可将聚乳酸-乙二酯(PLGA)等活体内分解性的高分子化合、多孔性羟基磷灰石、脂质体、表面修饰脂

质体、不饱和脂肪酸所制备的乳剂、纳米粒子、纳米球等用作缓释化基剂,并于此中包含多肽。在进行经皮投予时,也可将弱电流流经皮肤表面而使其穿透角质层(离子电渗法)。

[0411] 上述药物组成物,可直接使用有效成分,也可添加药学上可容许的载体、赋形剂、添加剂等而进行制剂化。作为剂形,可举例如液剂(例如注射剂)、分散剂、悬浊剂、锭剂、丸剂、粉末剂、栓剂、散剂、细颗粒剂、颗粒剂、胶囊剂、糖浆剂、片剂、吸入剂、软膏剂、眼药水、滴鼻剂、滴耳剂、膏药等。

[0412] 制剂化可适当使用例如赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、增溶剂、溶解辅助剂、着色剂、调味剂、稳定剂、乳化剂、吸收促进剂、表面活性剂、pH调节剂、防腐剂、抗氧化剂等并根据常规方法而进行。作为能使用于制剂化的成分的例子,可列举纯化水、盐水、磷酸缓冲液、葡萄糖、甘油、乙醇等药学上可容许的有机溶剂、动植物油、乳糖、甘露醇、葡萄糖、山梨糖醇、结晶纤维素、羟丙基纤维素、淀粉、玉米淀粉、硅酸酐、硅酸铝镁、胶原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、羧乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯胶、黄芪胶、酪蛋白、琼脂、聚乙二醇、双甘油、甘油、丙二醇、凡士林、石蜡、肉豆蔻酸辛基十二烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、高级醇、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白等,但不限定于此等。

[0413] 有鉴于肽难以经粘膜吸收,上述药物组成物可包含改善难吸收性药物的吸收的吸收促进剂。作为所述吸收促进剂,可使用聚氧乙烯月桂基醚类、月桂基硫酸钠、皂苷等表面活性剂;甘胆酸、脱氧胆酸、牛磺胆酸等胆汁酸盐;EDTA、水杨酸类等螯合剂;己酸、癸酸、月桂酸、油酸、亚麻油酸、混合胶束等脂肪酸类;烯胺衍生物、N-酰基胶原蛋白肽、N-酰基氨基酸、环糊精类、壳聚糖类、一氧化氮供体等。

[0414] 丸剂或锭剂也能以糖衣、胃溶性、肠溶性物质被覆。

[0415] 注射剂可包含注射用蒸馏水、生理食盐水、丙二醇、聚乙二醇、植物油、醇类等。再者,可添加湿润剂、乳化剂、分散剂、稳定剂、增溶剂、溶解辅助剂、防腐剂等。

[0416] 将本发明的药物组成物投予至哺乳类(例如,人体、小鼠、大鼠、天竺鼠、兔、狗、马、猴、猪等),尤其投予至人体时的投予量,是根据症状、患者的年龄、性别、体重、感受性差异、投予方法、投予间隔、有效成分的种类、制剂的种类而异,虽无特别限定,但例如可将 $30\mu\text{g} \sim 100\text{g}$ 、 $100\mu\text{g} \sim 500\text{mg}$ 、 $100\mu\text{g} \sim 100\text{mg}$ 以1次或分成数次进行投予。注射投予时,可根据患者的体重,将 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 3000\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3\mu\text{g}/\text{kg} \sim 1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 以1次或分成数次进行投予。

[0417] 此说明书也提供用于制造脑部相关疾病的预防或治疗的药物的缀合物的使用。此情形中的缀合物只要为上述任一者即可。

[0418] 此说明书所公开的另一实施方案是使本发明的上述肽和抗体或包含其抗原结合性片段的化合物结合的方法,其包含:

[0419] (i) 将抗体或包含其抗原结合性片段的化合物所具有的双硫键还原的工序;

[0420] (ii) 制备经加成其末端具有马来酰亚胺的连接子的所述肽的工序;

[0421] (iii) 使(i)中双硫键经还原的抗体或包含其抗原结合性片段的化合物与(ii)中所制备的所述肽接触的工序。

[0422] 关于(i)的工序,抗体中构成其的各链是通过双硫键而结合,因此可通过将其还原而使硫醇基露出。双硫键的还原可使用众所周知的还原剂,并无限定,但优选可使用DTT(二硫苏糖醇)、2-MEA(乙胺)、BME(β -巯基乙醇)、TCEP(三(2-羧基乙基)膦)等。

[0423] 关于(ii)的工序,该连接子可为上述连接子。马来酰亚胺可利用众所周知的方法使其结合至此等连接子的末端。

[0424] 关于(iii)的工序,马来酰亚胺基可在pH6.5~7.5的溶液中与硫醇基反应而形成稳定的硫醚基,由此可使所述的抗体或包含其抗原结合性片段的化合物和所述肽结合。通常,抗体具有多个双硫键,因此可通过上述方法使多个肽结合至作为对象的抗体或包含其抗原结合性片段的化合物。

[0425] 并且,此说明书所公开的另一实施方案是使本发明的上述肽和抗体或包含其抗原结合性片段的化合物结合的方法,其包含:

[0426] (i) 将抗体或包含其抗原结合性片段的化合物所具有的糖链进行氧化的工序;

[0427] (ii) 制备经加成其末端具有酰肼的连接子的所述肽的工序;

[0428] (iii) 使(i)中糖链经氧化的抗体或包含其抗原结合性片段的化合物与(ii)中所制备的所述肽接触的工序。

[0429] 关于(i)的工序,已知抗体具有糖链,通过将其氧化,可生成羰基。氧化可使用众所周知的氧化剂,并无限定,但优选可使用高碘酸钠。

[0430] 关于(ii)的工序,该连接子可为上述连接子。酰肼可利用众所周知的方法使其结合至此等连接子的末端。

[0431] 关于(iii)的工序,酰肼基在pH5~7的溶液中会与羰基反应而形成稳定的肼键,由此,可使抗体或包含其抗原结合性片段的化合物和所述肽结合。

[0432] 再者,此说明书所公开的另一实施方案是使本发明的上述肽和抗体或包含其抗原结合性片段的化合物结合的方法,其包含:

[0433] (i) 制备经加成其末端具有N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的连接子的所述肽的工序;

[0434] (ii) 使抗体或包含其抗原结合性片段的化合物与(ii)中所制备的所述肽接触的工序。

[0435] 关于(i)的工序,该连接子可为上述连接子。NHS可利用众所周知的方法使其结合至此等连接子的末端。

[0436] 关于(ii)的工序,NHS与胺在中性以上的pH中会高效率地反应而形成酰胺键,因此通过使肽-连接子的NHS和抗体所具有的胺结合,可使肽结合至作为对象的抗体或包含其抗原结合性片段的化合物。

[0437] 并且,本说明书也提供使用上述结合方法的肽-抗体缀合物的制造方法。

[0438] 简称

[0439] Fmoc为9-芴甲氧羰基;

[0440] HOAt为1-羟基苯并三唑;

[0441] HATU为O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐;

[0442] MeCN为乙腈;

[0443] Ac为乙酰基;

[0444] BSA为牛血清白蛋白;

[0445] ClAc为氯乙酰基;

[0446] CO₂为二氧化碳;

[0447] DBU为1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯;

- [0448] DIPEA或DIEA为N,N-二异丙基乙胺;
- [0449] DODT为3,6-二恶烷-1,8-辛烷-二硫醇;
- [0450] DMSO为二甲亚砜;
- [0451] DMF为N,N-二甲基甲酰胺;
- [0452] EDC为二氯乙烷;
- [0453] EDTA为乙二胺四乙酸;
- [0454] FBS为胎牛血清;
- [0455] HEPES为羟乙基哌嗪乙磺酸;
- [0456] IC50为50%抑制浓度;
- [0457] Mtt为单甲基三苯甲基;
- [0458] Mmt为单甲氧基三苯甲基;
- [0459] o-Ns为2-硝基苯磺酰基;
- [0460] TFA为三氟乙酸;
- [0461] TIS为三异丙基硅烷;
- [0462] Trt为三苯甲基;
- [0463] TCEP为三(2-羧基乙基)膦;
- [0464] mL为毫升(单位);
- [0465] M为摩尔浓度(单位);
- [0466] v/v为volume/volume(体积/体积);
- [0467] DIPCI为N,N'-二异丙基碳二亚胺;
- [0468] Oxyma pure为氰基(肟基)乙酸乙酯;
- [0469] PBS为磷酸缓冲生理食盐水;
- [0470] PBST为磷酸缓冲生理食盐水-Tween20;
- [0471] AA为氨基酸;
- [0472] HOSu为N-羟基琥珀酰亚胺;
- [0473] DCM为二氯甲烷;
- [0474] ClAcOSu为N-(氯乙酰氧基)琥珀酰亚胺;
- [0475] SMCC为琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯;
- [0476] mM为毫摩尔(单位);
- [0477] μm 为微米(单位);
- [0478] mm为毫米(单位);
- [0479] nm为纳米(单位);
- [0480] \AA 为埃(单位);
- [0481] min为分钟(单位);
- [0482] MS为质谱法;
- [0483] conc为浓度;
- [0484] mmol为毫摩尔(单位);
- [0485] mg为毫克(单位);
- [0486] rpm为每分钟旋转数(单位);

- [0487] h为小时(单位);
- [0488] G为重力加速度(单位);
- [0489] HPLC为高效液相层析仪;
- [0490] LC-MS或LC/MS为液相层析-质谱仪;
- [0491] DMAP为4-二甲氨基吡啶;
- [0492] EDCI·HCl为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐
- [0493] hydrazide酰肼
- [0494] NHS ester或NHS N-羟基琥珀酰亚胺
- [0495] PEG4c或PEG3或PEG4 1-氨基-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-羧酸
- [0496] PEG8c 1-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十七烷-27-羧酸
- [0497] PEG12c或PEG11或PEG12 1-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-十二氧杂三十九烷-39-羧酸
- [0498] PEG36 1-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81,84,87,90,93,96,99,102,105,108-三十六氧杂一百一十一烷-111-羧酸

实施例

[0499] 本发明进一步通过以下的参考例及实施例详细地进行说明,但此等并非限定本发明,且在不脱离本发明范围的范围内可进行变化。

[0500] 在本说明书中,引用和本案为完全相同申请人的国际专利申请编号PCT/JP2021/006709(国际公开W02021-167107号小册;本案基础申请时未公开)。

[0501] 化学合成

[0502] 在以下的实施例中的化学合成中所使用的全部原料、结构单元、试剂、酸、碱、固相树脂、溶剂是直接使用市售品,或者为本领域技术人员可使用有机化学的方法合成者。此外,若无特别记载,包含保护基的氨基酸是直接使用市售品。

[0503] 以下示出一般的肽的合成、环化、精制及分析方法,但可根据序列等而适当改变条件。此外,实施例有记载时采用其方法。

[0504] 固相树脂中的肽链的伸长是将各实施例所记载的树脂作为起始原料,利用通常所使用的肽偶合反应条件与Fmoc去除反应条件而进行。反应是使用肽自动合成仪即CEM公司Liberty Blue并遵循制造商的手册而进行。下述列举所使用的一般的氨基酸,侧链保护基表示于括号内。

[0505] Fmoc-Trp(Boc)-OH;Fmoc-Thr(tBu)-OH;Fmoc-N-Me-Gly-OH;Fmoc-Asp(OtBu)-OH;Fmoc-N-Me-Phe-OH;Fmoc-Ala-OH;Fmoc-N-Me-Ala-OH;Fmoc-His(Trt)-OH;Fmoc-Tyr(tBu)-OH;Fmoc-Val-OH;Fmoc-HydPro(tBu)-OH;Fmoc-Cys(Trt)-OH;Fmoc-Lys(Mtt)-OH;Fmoc-Ser(tBu)-OH;Fmoc-N-Me-Ser(tBu)-OH。

[0506] 氯乙酰基的导入是通过下述方式进行:对于保持有前工序所得的被Fmoc保护的肽的固相树脂,利用上述方法去除 α -氨基的Fmoc基后,将氯乙酸(3等量)添加至3等量的N,N'-二异丙基碳二亚胺的DMF溶液(0.5M)、3等量的HOAt的DMF溶液(0.5M),在室温下振荡40分钟。

[0507] 侧链的去保护及从固相树脂的剪切,首先,将氯乙酰基导入工序后所得的树脂以DMF与二氯甲烷分别各清洗5次,并在减压下进行干燥。接着,在装有固相树脂的反应容器中,添加反应剂混合液-A(TFA/H₂O/TIS/DODT的体积比92.5:2.5:2.5:2.5的混合物),在室温下振荡150分钟。由玻璃料过滤回收反应液。残留于反应容器的固相树脂是与剪切用混合液再次进行振荡后,由玻璃料回收溶液成分,并与上述滤液混合。若将此滤液添加至已冷却至0℃的过剩的二乙醚,则产生白浊沉淀。将此混合物进行离心分离(9000rpm,3min),并将溶液进行倾析。将所得的个体再次以已冷却至0℃的少量二乙醚清洗后,将所得的固体用于后续的环化反应。

[0508] 肽的环化反应是通过以将固相树脂的摩尔数作为基准而肽的最终浓度成为5mM的方式溶解于DMSO后,添加6等量或7等量的三乙胺,在室温下搅拌约16小时而进行。将所得的反应溶液以乙酸调制酸性,使用Biotage(注册商标)V-10(Biotage Japan公司)进行减压浓缩。

[0509] 作为所得的粗精制肽的精制方法,利用Waters公司AutoPurification System-SQD2 single quadruple mass spectrometer,使用反相制备型HPLC,一边监测源自目标物的m/z离子一边将其溶出。确认在由ESI-positive的扫描模式所得的质谱与由目标物的分子式所计算的包含多价离子的质谱在所使用的质谱仪的误差范围中为一致。此外,包含所使用的管柱的精制条件是表示于各实施例。

[0510] 化学合成的肽的结构决定,是将考虑遵循目标序列所使用的氨基酸与根据需求所使用的结构单元所计算的分子量,通过质谱分析法中的ESI-MS(+)进行确认。此外,所谓“ESI-MS(+)”,表示在正离子模式下所实施的电喷雾电离质谱分析法。所检测的质量是以“m/z”单位标记表示。此外,分子量约大于1000的化合物是作为二价离子或三价离子而以高频率检测。分析方法记载于各实施例。

[0511] [实施例1]

[0512] 本实施例中,合成与hTfR结合的肽。将所合成的肽表示于表1。并且,将从表1仅取出连接子序列所记载者表示于表5。合成是与上述及实施例2所记载的方法相同地进行。此外,关于序列号23的894_Bicycle_002_GGRGRS_K(Ma1),除了第1个Ala残基与第15个Cys所进行的环状化以外,还具有第2个Hg1残基与第11个Hly残基所结合的双环结构。所合成的肽是在各实施例中记载的分析条件下进行分析,并通过质谱分析法中的ESI-MS(+)确认结构。将以所得的ESI-MS(+)观测值与此情形中的质子加成数(M+XH)^{X+}表示时的X的值表示于表1。

[0513] 并且,以国际申请编号PCT/JP2021/006709(国际公开W02021-167107号小册)的实施例7所记载的方法合成由表1记载的肽的第1~15个氨基酸序列(亦即具有序列号1~110的氨基酸序列的肽)所组成的裸肽(不含连接子部分的肽),并利用SPR确认与hTfR的结合能力。关于由该等SPR测量所求出的KD值,KD值小于1nM时标记为A,1nM以上且小于100nM时标记为B,100nM以上且小于1mM时标记为C,1mM以上时标记为D,且将其结果表示于表1。此结果记载于表1的具有对应的裸肽的肽一栏。在此,ND表示No Data(在此,意为未取得数据)。此外,关于序列号104~107,对连接子所连接者进行SPR测量,皆确认到与hTfR的结合能力。结果,表1所记载的肽的裸肽皆被确认具有hTfR结合能力。再者,针对表1所记载的肽894_3m_PEG12_dk(Maleimide)(在序列号36的肽中进一步结合序列号114的连接子序列而成者),以与上述相同的方法利用SPR确认与hTfR的结合能力,结果符合上述分类的B。由此表示,即使在对hTfR结合肽(裸)赋予连接子的情形中,也可维持与hTfR的结合能力。

[0514] [表1]

[0515] [表1-1-1]

[0516]

肽名称	序列识别号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
hTTR_000894_PEG11_K(Maleimide)	1	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
hTTR_000894_PEG36_K(Maleimide)	2	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
hTTR_894_A11PEG11K(Maleimide)	3	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
JCR_hTTR_000894_PEG36_(NHS)	4	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
hTTR_894_A11PEG11(NHS)	5	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
hTTR_000894_PEG11_(Hydrazine)	6	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
hTTR_000894_PEG36_(Hydrazine)	7	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
hTTR_894_A11PEG11(Hydrazine)	8	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
hTTR_894_E12_PEG12_(Hydrazide)	9	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
hTTR_894_E11E12_PEG12_Hydrazide	10	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
hTTR_894_(GE)PEG12_Hydrazide	11	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
hTTR_894_(GEGE)PEG12_Hydrazide	12	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
hTTR_000894_PEG4_(Hydrazide)	13	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
36_G4S2_gAbu(NHS)	14	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
894_3m_G4S2_gAbu(NHS)	15	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I
36_GG_gAbu(NHS)	16	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
36_G4S2_gAbu(NHS)	17	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
894_3m_GG_gAbu(NHS)	18	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I
894_PEG12_(NHS)	19	A	V	F	V	W	N	Y	Y	I
894_3m_10A_GGRGRS_K(Mal)	20	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I
894_3m_6A_GGRGRS_K(Mal)	21	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I
894_variant_03_GGRGRS_K(Mal)	22	A	V	MeF3C	V	MeW	N	Y	F4OMe	I
894_Bicycle_002_GGRGRS_K(Mal)	23	A	Hgl	MeF3C	V	MeW	N	Y	Y	I
894_3m_G_PEG12_gAbu(NHS)	24	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I
894_3m_G_PEG4_gAbu(NHS)	25	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I
894_3m_G_PEG4x3_gAbu(NHS)	26	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I
894_3m_GGRGRS_gAbu(NHS)	27	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I
894_3m_G_PEG4_R_PEG4_gAbu(NHS)	28	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I
894_3m_GGGGQS_gAbu(NHS)	29	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I
894_3m_G4S2x2_gAbu(NHS)	30	A	V	MeF	V	W	N	Y	Y	I

[0517] [表1-1-2]

[0520]

m/z	[M+XH] ⁺	连接子的反应性官能基	裸肽的表面等离子共振
1010.68	3	Maleimide	A
1363.01	3	Maleimide	A
982.33	3	Maleimide	B
1279.87	3	NHS	A
1348.37	2	NHS	B
899.92	3	Hydrazide	A
1252.15	3	Hydrazide	A
1306.86	2	Hydrazide	B
1293.37	2	Hydrazide	B
1322.37	2	Hydrazide	ND
962.01	3	Hydrazide	A
1024	3	Hydrazide	A
782.47	3	Hydrazide	A
1051.98	2	NHS	B
1341.69	2	NHS	B
907.83	2	NHS	B
1051.98	2	NHS	B
1197.63	2	NHS	B
1390.89	2	NHS	B
991.78	3	Maleimide	A
991.5	3	Maleimide	B
1021.17	3	Maleimide	C
1025.81	3	Maleimide	B
979.76	3	Maleimide	B
1292.86	2	NHS	B
1027.18	3	NHS	B
951.01	3	NHS	B
1131.22	3	NHS	B
1397.8	2	NHS	B
1028.95	3	NHS	B

[0521]

[表1-2-1]

[0526]

856.11	NHS									4	NHS	B
1103.65	NHS									3	NHS	B
1416.95										2	Maleimide	A
898.07										3	Maleimide	B
956.79										3	Maleimide	B
1015.47										3	Maleimide	B
1423.95										2	Maleimide	B
1346.4										2	Maleimide	A
956.76										3	Maleimide	A
1015.71										3	Maleimide	A
949.78										3	Maleimide	A
1353.42										2	Maleimide	B
961.42										3	Maleimide	B
1020.36										3	Maleimide	B
1430.8										2	Maleimide	B
1296.29										2	Maleimide	A
1384.4										2	Maleimide	A
982.05										3	Maleimide	A
1373.74										2	Maleimide	A
1303.33										2	Maleimide	A
928										3	Maleimide	B
986.71										3	Maleimide	B
1380.72										2	Maleimide	B
873.96										3	Maleimide	B
932.71										3	Maleimide	B
991.38										3	Maleimide	B
1387.75										2	Maleimide	B
1103.76										3	Maleimide	B
1036.67										3	Maleimide	B
1438.78										2	Maleimide	B

[0527]

[表1-3-1]

[0534]

894_3m_1Abu_GGRGRS_K(Mal)	91	Abu	V	MeF	V	W	N	Y	Y
894_3m_1Abu_G4S2_K(Mal)	92	Abu	V	MeF	W	W	N	Y	Y
894_3m_8Ahp_GG_K(Mal)	93	A	V	MeF	W	W	N	Y	Ahp
894_3m_8Ahp_GGRGRS_K(Mal)	94	A	V	MeF	W	W	N	Y	Ahp
894_3m_8Ahp_G4S2_K(Mal)	95	A	V	MeF	W	W	N	Y	Ahp
894_3m_Linked01_dk(Mal)	96	A	V	MeF	W	W	N	Y	Y
894_3m_Linked02_dk(Mal)	97	A	V	MeF	W	W	N	Y	Y
894_3m_Linked03_dk(Mal)	98	A	V	MeF	W	W	N	Y	Y
894_3m_Linked04_dk(Mal)	99	A	V	MeF	W	W	N	Y	Y
894_v03_Linked01_dk(Mal)	100	A	V	MeF3C	MeW	MeW	N	Y	F4OMe
894_v03_Linked02_dk(Mal)	101	A	V	MeF3C	MeW	MeW	N	Y	F4OMe
894_v03_Linked03_dk(Mal)	102	A	V	MeF3C	MeW	MeW	N	Y	F4OMe
894_v03_Linked04_dk(Mal)	103	A	V	MeF3C	MeW	MeW	N	Y	F4OMe
894_v157_K(Mal)	104	A	V	F	W	W	N	Y	Y
894_v158_K(Mal)	105	A	V	MeF3C	W	W	N	Y	F4OMe
894_v159_K(Mal)	106	A	V	MeF3C	W	W	N	Y	F4OMe
894_v164_K(Mal)	107	A	E	MeF3C	W	W	N	Y	F4OMe
894_G4S2_K(Mal)	108	A	V	F	W	W	N	Y	Y
894_PEG8_K(Mal)	109	A	V	F	W	W	N	Y	Y
894_PEG4_K(Mal)	110	A	V	F	W	W	N	Y	Y

[0535] [表1-4-2]

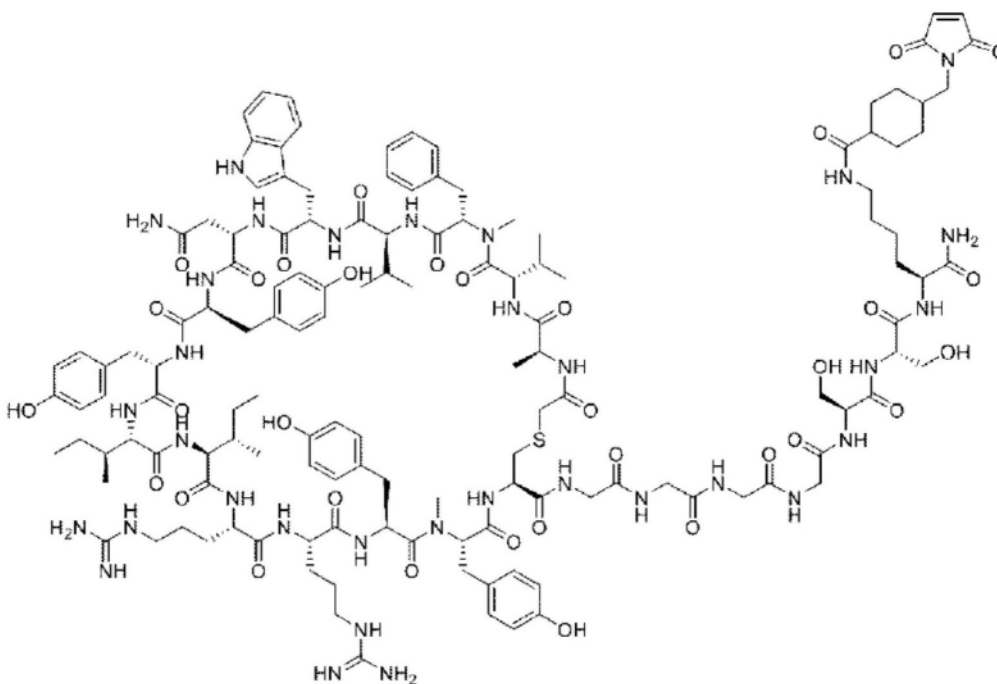
[0538]

-NH2				1010.33	3	Maleimide	B
-NH2				1430.85	2	Maleimide	B
-NH2				1261.67	2	Maleimide	B
-NH2				993.69	3	Maleimide	B
-NH2				1405.88	2	Maleimide	B
-NH2				949.61	3	Maleimide	B
S	S	G	G	1064.85	3	Maleimide	B
-NH2			-NH2	977.67	3	Maleimide	B
G	de	G	G	1096.74	3	Maleimide	B
-NH2			-NH2	965.12	3	Maleimide	B
S	S	G	G	1080.24	3	Maleimide	B
-NH2			-NH2	993.16	3	Maleimide	B
G	de	G	G	1112.35	3	Maleimide	B
-NH2			-NH2	934.92	3	Maleimide	ND
-NH2				1440.31	2	Maleimide	ND
-NH2				1440.22	2	Maleimide	ND
-NH2				1455.27	2	Maleimide	ND
NHS				1416.95	2	Maleimide	A
				952.12	3	Maleimide	A
				893.39	3	Maleimide	A

[0539] [表5]

[0540] [表5-1]

[0548]



[0549] 使用Sieber amide resin(渡边化学,0.52mmol/g,2.4g X 3),遵循一般方法,从Fmoc的去除开始,合成目标的肽。此时,使用CEM公司的Liberty Blue作为固相合成仪,遵循制造商的手册而进行。各残基的导入的基本条件是设为:相对于树脂1当量,使用Fmoc-AA/DIPCI/Oxyma pure (5.3当量/10当量/5当量),在DMF中以75℃使其进行10分钟的反应1次。但是,第15个残基是以50℃进行反应20分钟。第3个残基、第4个残基、第8个残基、第10个残基、第13个残基、第14个残基是以75℃进行10分钟的反应2次。第11个残基、第12个残基是以50℃进行20分钟的反应2次。第2个残基是以75℃进行60分钟的反应3次。第1个残基是以75℃进行20分钟的反应2次。并且,Fmoc去除的基本条件是设为与20% piperidine的DMF溶液以75℃使其反应3分钟。但是,关于第15个残基、第16个残基、第17个残基的Fmoc去除,是通过在室温下使其反应5分钟后,以75℃使其反应3分钟而进行。关于第2个残基、第13个残基的Fmoc去除,是通过以25℃使其反应5分钟后,使其反应10分钟而进行。氯乙酰基的导入是首先对于保持有前工序所得的被Fmoc保护的肽的固相树脂,利用上述方法去除 α -氨基的Fmoc基。之后,通过将氯乙酸(5当量)、DIPCI(5当量)、HOSu(5当量)在DCM中进行搅拌,添加与DCM等量的DMF,制备ClAcOSu的DCM/DMF溶液(0.015M),添加至固相树脂,在室温下振荡180分钟而进行。侧链的去保护及从固相树脂的剪切,首先,将氯乙酰基导入工序后所得的树脂以DMF清洗5次,以二氯甲烷清洗3次,并在减压下进行干燥。接着,在装有固相树脂的反应容器中,添加反应剂混合液-A(200mL,TFA/H₂O/TIS/DODT的体积比92.5:2.5:2.5:2.5的混合物),在室温下振荡90分钟。由玻璃料过滤回收反应液。残留于反应容器的固相树脂是与剪切用混合液再次进行振荡,由玻璃料回收溶液成分,并与上述滤液混合。若将此滤液添加至已冷却至0℃的过剩的二异丙醚,则产生白浊沉淀。滤取此混合物,以已冷却至0℃的二乙醚进行清洗后,将所得的固体用于后续的环化反应。肽的环化反应是以将固相树脂的摩尔数作为基准而肽的最终浓度成为4.9mM的方式溶解于DMSO(5%含水)后,添加7当量的三乙胺,在室温下振荡约1小时。在所得的反应溶液中添加1.05当量的SMCC,在室温下振荡1.5小时。将所得的反应溶液使用GenevaC EZ-2Elite进行减压浓缩。

[0550] 所得的粗生成物是使用以下的条件进行精制(管柱:Waters Xbridge(注册商标) C18 5 μ m(注册商标)50x250mm;流动相:A=0.1%TFA in H₂O、B=0.1%TFA in MeCN;温度:60 $^{\circ}$ C;梯度(%B conc):花费5.1分钟0-0%,之后花费1.9分钟0-5%,之后花费5分钟5-29%,之后花费13.5分钟29-34%,之后花费1.5分钟34-60%;流量:花费5.1分钟1-1mL/min,之后花费1.9分钟1-119mL/min,之后119mL/min)。

[0551] 目标物的纯度是由分析条件的LC/MS(UV波长225nm)色谱图的面积比进行计算,其为94.1%。

[0552] 分析条件:保持时间=11.33分钟;管柱:Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1x150mm, 100 \AA ;流动相:A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN;温度:40 $^{\circ}$ C;梯度(%B conc):花费20分钟20-60%,之后花费1分钟60-95%,之后花费5分钟95%;流量:0.25mL/min

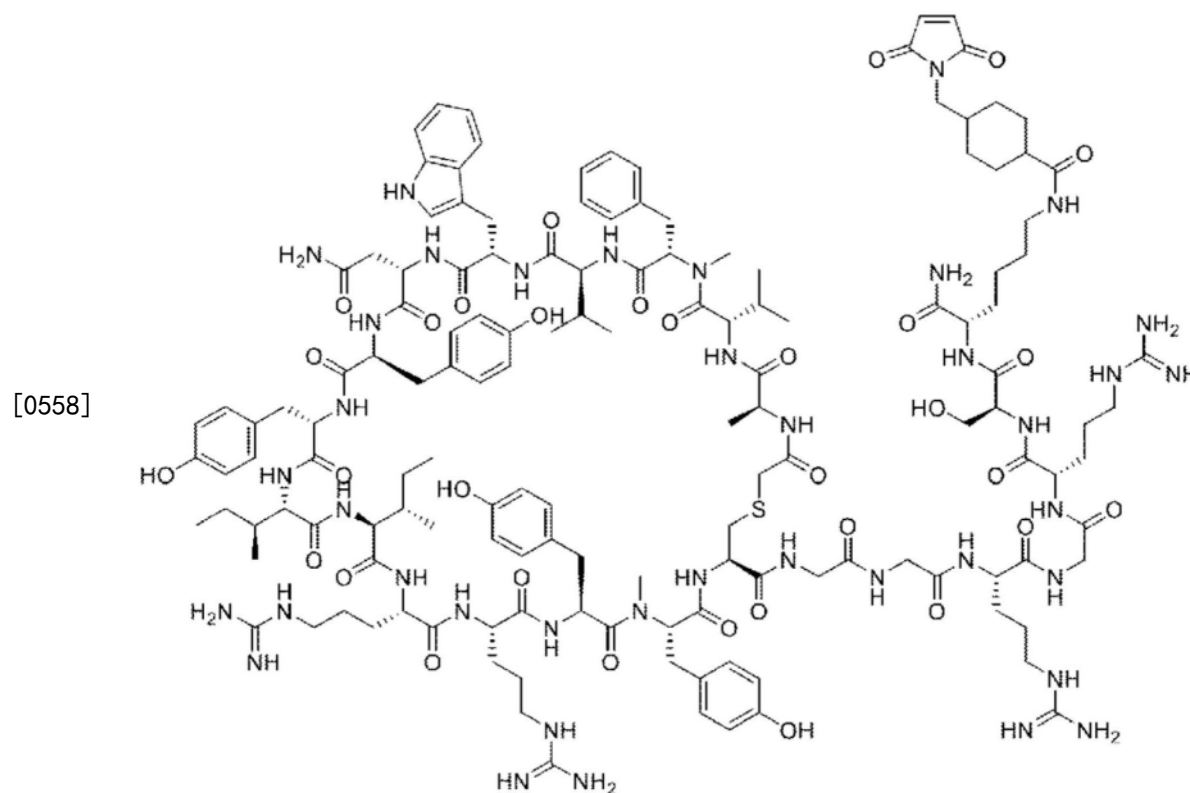
[0553] ESI-MS(+) 观测值m/z=1423.95 (M+2H)²⁺

[0554] [实施例2-2]

[0555] 894_3m_GGRGRS_K(Ma1)(序列号82)的合成

[0556] 本实施例中,记载894_3m_GGRGRS_K(Ma1)(将表1所记载的对应的连接子结合至序列号82的肽而成者)的合成例。

[0557] [化2]



[0559] 使用Sieber amide resin(渡边化学,0.47mmol/g,0.53g),遵循一般方法,从Fmoc的去除开始,合成目标的肽。此时,使用CEM公司的Liberty Blue HT作为固相合成仪,遵循制造商的手册而进行。各残基的导入的基本条件是设为:相对于树脂1当量,使用Fmoc-AA/HATU/DIEA(4.2当量/4当量/8当量),在DMF中以75 $^{\circ}$ C使其进行10分钟的反应2次。但是,第2个残基是以75 $^{\circ}$ C进行30分钟的反应2次。第5个残基、第6个残基、第7个残基、第16个残基、第

17个残基、第19个残基、第21个残基、第22个残基是以75℃进行10分钟的反应1次。第11个残基是以50℃进行15分钟的反应2次。第12个残基、第15个残基、第18个残基、第20个残基是以50℃进行15分钟的反应1次。并且,Fmoc去除的基本条件是设为与20% piperidine的DMF溶液以75℃使其反应3分钟。但是,关于第2个残基、第13个残基的Fmoc去除,是在室温下使其进行5分钟的反应2次。氯乙酰基的导入是通过下述方式进行:将氯乙酸(5当量)、DIPCI(5当量)、HOSu(5当量)在DCM中进行搅拌,添加与DCM等量的DMF,制备ClAcOSu的DCM/DMF溶液(0.25M),添加至由前工序所得的固相树脂,在室温下振荡60分钟。侧链的去保护及从固相树脂的剪切,首先,将氯乙酰基导入工序后所得的树脂以DMF清洗5次,以二氯甲烷清洗3次,并在减压下进行干燥。接着,在装有固相树脂的反应容器中,添加反应剂混合液-A(10mL, TFA/H₂O/TIS/DODT的体积比92.5:2.5:2.5:2.5的混合物),在室温下振荡150分钟。由玻璃料过滤回收反应液。残留于反应容器的固相树脂是与剪切用混合液再次进行振荡,由玻璃料回收溶液成分,并与上述滤液混合。若将此滤液添加至已冷却至0℃的过剩的二乙醚与己烷的混溶剂,则产生白浊沉淀。将此混合物进行离心分离(9500rpm, 1min),并将上清液进行倾析后,以已冷却至0℃的二乙醚进行清洗,将所得的固体用于后续的环化反应。肽的环化反应是以将固相树脂的摩尔数作为基准而肽的最终浓度成为5mM的方式溶解于DMSO(5%含水)后,添加7当量的三乙胺,在室温下振荡约3小时。在所得的反应溶液中添加1.1当量的SMCC,在室温下振荡3小时。将所得的反应溶液使用GenevaC EZ-2Elite进行减压浓缩。

[0560] 所得的粗生成物是使用以下的条件进行精制(管柱:Waters Xbridge(注册商标) C18 5 μ m50x150mm;流动相:A=0.1% TFA in H₂O、B=0.1% TFA in MeCN;温度:40℃;梯度(%B conc):花费3分钟5-29%,之后花费8分钟29-34%,之后花费1分34-60%;流量:120mL/min)。

[0561] 目标物的纯度是由分析条件的LC/MS(UV波长225nm)色谱图的面积比进行计算,其为95.4%。

[0562] 分析条件:保持时间=9.53分钟;管柱:Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1x150mm, 100Å;流动相:A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN;温度:40℃;梯度(%B conc):花费20分钟20-60%,之后花费1分钟60-95%,之后花费5分钟95%;流量:0.25mL/min

[0563] ESI-MS(+) 观测值m/z=1005.73(M+3H)³⁺

[0564] [实施例2-3]

[0565] hTfR_000894_PEG11_(Hydrazine)(序列号6)的合成

[0566] 本实施例中,记载hTfR_000894_PEG11_(Hydrazine)(将表1所记载的对应的连接子结合至序列号6的肽而成者)的合成例。

[0567] [化3]

为76.5%。

[0572] 分析条件:保持时间=10.28分钟;管柱:Kinetex EVO C18 2.6 μ m、2.1x150mm、100Å;流动相:A=0.025%TFA in H₂O、B=0.025%TFA in MeCN;温度:40℃;梯度(%B conc)花费20分钟20-60%,之后花费1分钟60-95%,之后花费5分钟95-95%;流量:0.25mL/min。

[0573] ESI-MS(+) 观测值m/z=899.92 (M+3H)³⁺

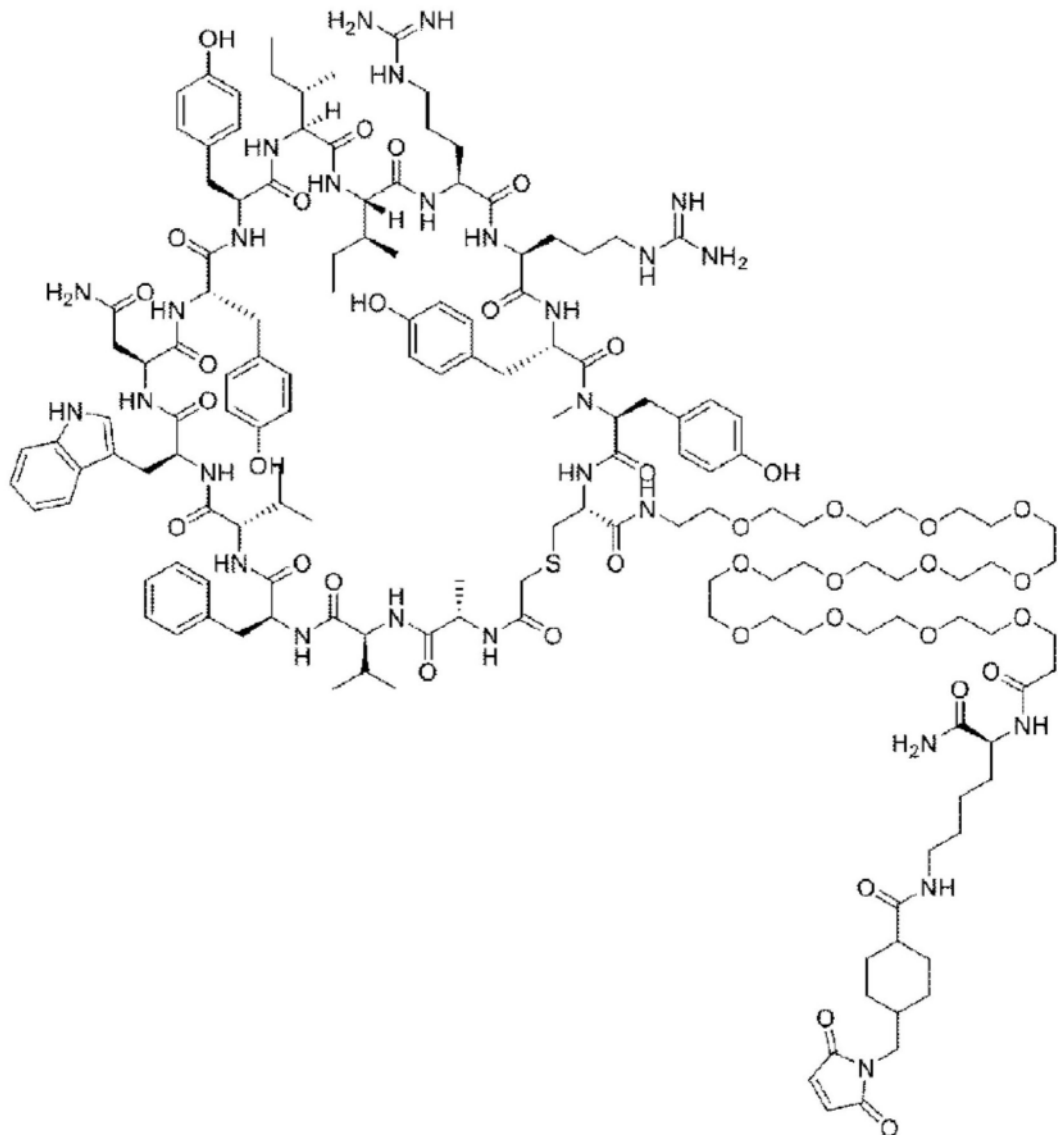
[0574] [实施例2-4]

[0575] hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide) (序列号1)的合成

[0576] 本实施例中,记载hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide) (将表1所记载的对应的连接器结合至序列号1的肽而成者)的合成。

[0577] [化4]

[0578]



[0579] 使用Fmoc-NH-SAL-PEG resin (渡边化学, 0.38mmol/g, 0.66g), 遵循一般方法, 从Fmoc的去除开始, 合成目标的肽。此时, 使用CEM公司的Liberty Blue HT作为固相合成仪, 遵循制造商的手册而进行。各残基的导入的基本条件是设为: 相对于树脂1当量, 使用Fmoc-AA/HATU/DIEA (4.2当量/4当量/8当量), 以75℃使其进行10分钟的反应1次。但是, 第11个残

基、第12个残基是以25℃进行20分钟的反应2次。第13个残基、第14个残基是以75℃进行10分钟的反应2次。第15个残基是以25℃进行30分钟的反应1次。第16个残基是以25℃进行60分钟的反应1次。并且,Fmoc去除的基本条件是设为与20%哌啶的DMF溶液以75℃进行3分钟的反应1次。但是,关于第13个残基、第15个残基,Fmoc去除是通过以5℃使其反应5分钟后,使其反应10分钟而进行。氯乙酰基的导入是首先对于保持有前工序所得的被Fmoc保护的肽的固相树脂,利用上述方法去除 α -氨基的Fmoc基。之后,通过将0.2M氯乙酸的DMF溶液(5当量)、0.5M HATU的DMF溶液(5当量)、1M DIEA的DMF溶液(10当量)添加至固相树脂,在室温下振荡30分钟而进行。侧链的去保护及从固相树脂的剪切,首先,将氯乙酰基导入工序后所得的树脂以DMF清洗5次,以二氯甲烷清洗3次,并在减压下进行干燥。接着,在装有固相树脂的反应容器中,添加反应剂混合液-A(10mL,TFA/H₂O/TIS/DODT的体积比92.5:2.5:2.5:2.5的混合物),在室温下振荡90分钟。由玻璃料过滤回收反应液。残留于反应容器的固相树脂是与剪切用混合液再次进行振荡,由玻璃料回收溶液成分,并与上述滤液混合。若将此滤液添加至已冷却至0℃的过剩的二乙醚/己烷,则产生白浊沉淀。将此混合物进行离心分离(10000rpm,1分钟),并将溶液进行倾析。以已冷却至0℃的二乙醚进行清洗后,将所得的固体用于后续的环化反应。肽的环化反应是以将固相树脂的摩尔数作为基准而肽的最终浓度成为5mM的方式溶解于DMSO后,添加10当量的三乙胺,在室温下振荡约15小时。在所得的反应溶液中将固相树脂的摩尔数作为基准而添加1.2当量的SMCC,在室温下振荡3.5小时。添加乙酸,将所得的反应溶液使用GenevaC EZ-2Elite进行减压浓缩。

[0580] 将所得的粗生成物使用以下的条件进行精制(管柱:Waters Xbridge(注册商标) C18 5 μ m 50x150mm;流动相:A=0.1%TFA in H₂O、B=0.1%TFA in MeCN;温度:40℃;梯度(%B):花费3分钟8-33%,之后花费8分钟33-38%,之后花费1分钟38-60%;流量:120mL/min)。

[0581] 由分析条件的LC/MS(UV波长225nm)色谱图的面积比计算目标物的纯度,其为92.2%。

[0582] 分析条件:保持时间=12.03分钟;管柱:Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1x150mm, 100Å;流动相:A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN;温度:40℃;梯度(%B conc):花费20分钟20-60%,之后花费1分钟60-95%,之后花费5分钟95-95%;流量:0.25mL/min

[0583] ESI-MS(+) 观测值m/z=1010.68(M+3H)³⁺

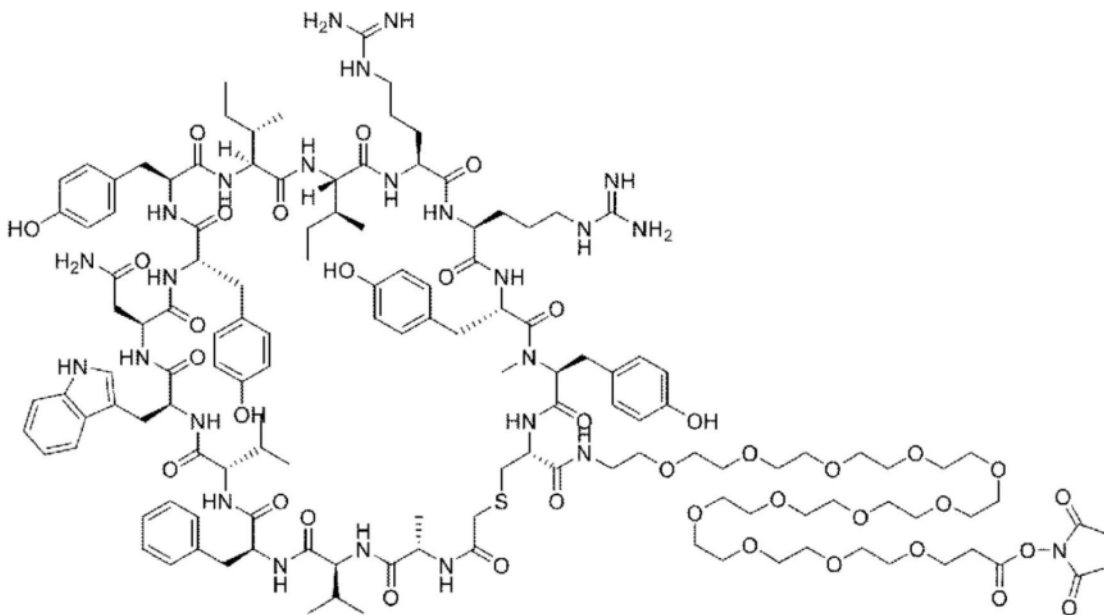
[0584] [实施例2-5]

[0585] 894_PEG12_(NHS)(序列号19)的合成

[0586] 本实施例中,记载894_PEG12_(NHS)(将表1所记载的对应的连接子结合至序列号19的肽而成者)的合成。

[0587] [化5]

[0588]



[0589] 使用Fmoc-Wang Resin(1.2mmol/g,0.21g),遵循一般方法,从Fmoc的去除开始,合成目标的肽。此时,使用CEM公司的Liberty Blue作为固相合成仪,遵循制造商的手册而进行。各残基的导入的基本条件是设为:相对于树脂1当量,使用Fmoc-AA/HATU/DIPEA(4.2当量/4当量/8当量),以75℃使其进行10分钟的反应1次。但是,第11个残基、第12个残基是在25℃下进行20分钟的反应2次。第13个残基、第14个残基是在75℃下进行10分钟的反应2次。第15个残基是在25℃下进行30分钟的反应1次。第16个残基是使用Fmoc-AA/DIPCI/DMAP(3当量/3当量/0.75当量),在25℃下进行60分钟的反应1次。并且,Fmoc去除是通过与20% piperadine的DMF溶液以75℃使其进行3分钟的反应1次而进行。但是,第13个残基、第15个残基是在25℃下使其反应5分钟后,使其反应10分钟。氯乙酰基的导入是首先对于保持有前工序所得的被Fmoc保护的肽的固相树脂,利用上述方法去除 α -氨基的Fmoc基。之后,通过将0.2M氯乙酸的DMF溶液(5当量)、0.5M HATU的DMF溶液(5当量)、1M DIEA的DMF溶液(10当量)添加至固相树脂,以25℃振荡30分钟而进行。侧链的去保护及从固相树脂的剪切,首先,将氯乙酰基导入工序后所得的树脂以DMF清洗5次,以二氯甲烷清洗3次,并在减压下进行干燥。接着,在装有固相树脂的反应容器中,添加反应剂混合液-A(10mL,TFA/H₂O/TIS/DODT的体积比92.5:2.5:2.5:2.5的混合物),以25℃振荡90分钟。由玻璃料过滤回收反应液。残留于反应容器的固相树脂是与剪切用混合液再次进行振荡,由玻璃料回收溶液成分,并与上述滤液混合。若将此滤液添加至已冷却至0℃的过剩的二乙醚/己烷=1/1,则产生白浊沉淀。将此混合物进行离心分离(10000rpm,1分钟),并将溶液进行倾析。以已冷却至0℃的二乙醚进行清洗后,将所得的固体用于后续的环化反应。肽的环化反应是以将固相树脂的摩尔数作为基准而肽的最终浓度成为5mM的方式溶解于DMSO后,添加6当量的三乙胺,以25℃振荡约16小时。将所得的反应溶液使用Savant Explorer SpeedVac进行减压浓缩。

[0590] 所得的粗生成物是使用以下的条件进行精制(管柱:Waters Xbridge(注册商标)C18 5 μ m50x150mm;流动相:A=0.1%TFA in H₂O、B=0.1%TFA in MeCN;温度:40℃;梯度(%B conc):花费3分钟7-32%,之后花费8分钟32-37%,之后花费1分钟37-60%;流量:120mL/min)。

[0591] 冷冻干燥后,将所得的环状肽(51.9mg,19.3 μ mol)溶解于DMSO/水(0.7mL,9/1)后,

添加N-羟基琥珀酰亚胺(11mg, 96.5 μ mol)及EDCI(18.5mg, 96.5 μ mol),以25 $^{\circ}$ C搅拌3小时,以乙酸进行骤冷。

[0592] 所得的反应混合物是使用以下的条件进行精制(管柱:Waters Xbridge(注册商标)C18 5 μ m 30x150mm;流动相:A=0.1%TFA in H₂O、B=0.1%TFA in MeCN;温度:40 $^{\circ}$ C;梯度(%B conc):花费3分钟9-35%,之后花费8分钟35-40%,之后花费1分钟40-60%;流量:45mL/min)。

[0593] 目标物的纯度是由分析条件的LC/MS(UV波长225nm)色谱图的面积比进行计算,其为88.0%。

[0594] 分析条件:保持时间=12.74分钟;管柱:Kinetex EVO C18 2.6 μ m 2.1x150mm, 100 \AA ;流动相:A=0.025% TFA in H₂O、B=0.025% TFA in MeCN;温度:40 $^{\circ}$ C;梯度(%B conc):花费20分钟20-60%,之后花费1分钟60-95%,之后花费5分钟95%;流量:0.25mL/min

[0595] ESI-MS(+) 观测值m/z=1390.89(M+2H)²⁺

[0596] [实施例3]

[0597] 实施例1所得的肽和抗体的缀合物是利用以下的方法进行合成、精制、分析。

[0598] 一般方法

[0599] [RP-UPLC-MS层析法]

[0600] 反相层析法(RP-UPLC)

[0601] [分析条件A]

[0602] 使抗体及抗体-肽缀合物在尺寸为2.1mm \times 50mm且具有300 \AA 孔的平均粒径1.7 μ m的ACQUITY UPLC(注册商标)Protein BEH C4(Cat.No.186004495,Waters)管柱中进行分离。在流动相:A=水/0.1%三氟乙酸、B=乙腈/0.1%三氟乙酸、管柱温度80 $^{\circ}$ C、流速0.4mL/min、表2-1所记载的梯度(%B conc.)、吸收波长220nm的条件下进行分析。

[0603] [表2-1]

保留时间 (min)	梯度 (%B conc.)
I n i t i a l	3 2 %
1. 0 0	3 2 %
1. 0 1	3 2 %
[0604] 9. 0 0	5 0 %
9. 3 0	9 5 %
9. 3 1	9 5 %
9. 4 0	5. 0 %
9. 4 1	5. 0 %
9. 4 9	3 2 %
1 0. 5 0	3 2 %

[0605] [分析条件B]

[0606] 使抗体及抗体-肽缀合物在尺寸为2.1mm×50mm且具有300Å孔的平均粒径1.7μm的ACQUITY UPLC(注册商标)Protein BEH C4(Cat.No.186004495,Waters)管柱中进行分离。在流动相:A=水/0.1%三氟乙酸、B=乙腈/0.1%三氟乙酸、管柱温度80℃、流速0.4mL/min、表2-2所记载的梯度(%B conc.)、吸收波长280nm的条件下进行分析。

[0607] [表2-2]

保留时间(分)	梯度(%B conc.)
初始	20%
1.00	20%
1.01	20%
9.00	65%
9.50	95%
9.80	95%
9.90	25%
10.50	25%

[0609] [分析条件C]

[0610] 使抗体及抗体-肽缀合物在尺寸为2.1mm×50mm且具有300Å孔的平均粒径1.7μm的ACQUITY UPLC(注册商标)Protein BEH C4(Cat.No.186004495,Waters)管柱中进行分离。在流动相:A=水/0.1%三氟乙酸、B=乙腈/0.1%三氟乙酸、管柱温度80℃、流速0.4mL/min、表2-3所记载的梯度(%B conc.)、吸收波长280nm的条件下进行分析。

[0611] [表2-3]

保留时间(分)	梯度(%B conc.)

初始	25%
1.00	25%
1.01	25%
9.00	55%
9.30	95%
9.31	95%
9.40	5.0%
9.41	5.0%
9.49	25%
10.50	25%

[0613] [分析条件D]

[0614] 使抗体及抗体-肽缀合物在尺寸为2.1mm×50mm且具有300Å孔的平均粒径1.7μm的ACQUITY UPLC(注册商标)Protein BEH C4(Cat.No.186004495,Waters)管柱中进行分离。在流动相:A=水/0.1%三氟乙酸、B=乙腈/0.1%三氟乙酸、管柱温度80℃、流速0.4mL/min、表2-4所记载的梯度(%B conc.)、吸收波长220nm的条件下进行分析。

[0615] [表2-4]

[0616]

保留时间(分)	梯度(%B conc.)
初始	32%
1.00	32%
1.01	32%
9.00	42%
9.30	95%
9.31	95%
9.40	5.0%
9.41	5.0%
9.49	32%
10.50	32%

[0617] [分析条件E]

[0618] 使抗体及抗体-肽缀合物在尺寸为2.1mm×50mm且具有300Å孔的平均粒径1.7μm的ACQUITY UPLC(注册商标)Protein BEH C4(Cat.No.186004495,Waters)管柱中进行分离。在流动相:A=水/0.1%三氟乙酸、B=乙腈/0.1%三氟乙酸、管柱温度80℃、流速0.4mL/min、表2-4所记载的梯度(%B conc.)、吸收波长220nm的条件下进行分析。

[0619] [表2-5]

[0620]

保留时间(分)	梯度(%B conc.)
初始	30%
1	30%
1.01	30%
7	45%
7.3	95%

7.31	95%
7.4	5.0%
7.41	5.0%
7.49	30%
8.5	30%

[0621] 质谱法 (MS)

[0622] 抗体及抗体-肽缀合物的质谱数据是使用Xevo (注册商标) G2-XSQToF (Waters), 在阳性ESI模式下于500 ~ 4000m/z的范围获得。源温度、脱溶剂气温度分别为150°C、500°C, 脱溶剂气与雾化气的流速分别为800L/小时、50L/小时。毛细管电压设定为3.00kV。利用MassLynx™软件, 使用MaxEnt™1反褶积算法, 遵循制造商规定的方法转换成质谱。

[0623] 抗体及抗体-肽缀合物的浓度测量

[0624] 使用UV测量仪 (DeNovix DS-11), 遵循制造商规定的方法进行抗体浓度的测量。此时, 使用因抗体的种类而异的280nm摩尔吸光系数。

[0625] 抗体-肽缀合物的精制

[0626] [精制方法A]

[0627] 在Amicon Ultra-4 (30,000MWC0, Merck Millipore Ltd) 的容器内, 于每一支管柱中添加70uL的抗体-肽缀合物与4mL的100mM HEPES缓冲液pH7.8, 实施使用离心机 (TOMY SEIKO) 的离心操作 (5000G × 15分钟)。通过重复将该缓冲液添加至抗体-肽缀合物与离心分离共3次, 而实施抗体-肽缀合物的精制。

[0628] [精制方法B]

[0629] 在Amicon Ultra-4 (30,000MWC0, Merck Millipore Ltd) 的容器内, 于每一支管柱中添加125uL的抗体-肽缀合物与4mL的20%乙酸水溶液pH2.0, 实施使用离心机 (TOMY SEIKO) 的离心操作 (5000G × 15分钟)。重复将该溶液添加至抗体-肽缀合物与离心分离共3次。之后, 将4mL的100mM HEPES缓冲液pH8.5添加至管柱, 实施使用离心机 (TOMY SEIKO) 的离心操作 (5000G × 15分钟) 1次, 将抗体-肽缀合物进行精制。

[0630] [精制方法C]

[0631] 在Amicon Ultra-4 (50,000MWC0, Merck Millipore Ltd) 的容器内, 于每一支管柱中添加60uL的抗体-肽缀合物与4mL的10%乙酸水溶液pH2.0, 实施使用离心机 (TOMY SEIKO) 的离心操作 (5000G × 15分钟)。重复将该溶液添加至抗体-肽缀合物与离心分离共3次。之后, 将4mL的100mM HEPES缓冲液pH8.5添加至管柱, 实施使用离心机 (TOMY SEIKO) 的离心操作 (5000G × 15分钟) 1次, 将抗体-肽缀合物进行精制。

[0632] [精制方法D]

[0633] 在Amicon Ultra-4 (30,000MWC0, Merck Millipore Ltd) 的容器内, 于每一支管柱中添加150uL的抗体-肽缀合物与4mL的50mM HEPES缓冲液pH7.8, 实施使用离心机 (TOMY SEIKO) 的离心操作 (5,000G × 15分钟)。通过重复将该缓冲液添加至抗体-肽缀合物与离心分离共3次, 而实施抗体-肽缀合物的精制。

[0634] [实施例3-1]

[0635] 纳武单抗的缓冲液交换及浓缩

[0636] 针对抗体的纳武单抗, 在与肽的共轭前进行以下的操作。

[0637] [缓冲液交换方法A]

[0638] 纳武单抗(Selleckchem,Cat.No.A2002)的缓冲液交换是使用平均粒径8.6 μ m、管柱的尺寸为10mm \times 300mm的Superdex 200Increase 10/300GL (Cat.No.28-9909-44,GE Helthcare)实施。使用所述的管柱与AKTA pure25 M2(GE Helthcare),将制备50mM、pH7.8的HEPES (Cat.No 02443-05,NACALAI TESQUE股份有限公司)而成者作为流动相,回收以检测波长220nm、流速0.5mL/分钟且在11.5分钟~13.5分钟溶出的组分。所回收的组分是使用Amicon Ultra (30,000MWC0,Merck Millipore Ltd)进行浓缩,最终获得13.0g/L的纳武单抗溶液。

[0639] [缓冲液交换方法B]

[0640] 纳武单抗(Selleckchem,Cat.No.A2002)的缓冲液交换是使用Bio-Gel P-30(Bio-Rad,Cat.No.1504150)实施。在填充有以100mM HEPES pH7.8(Cat.No 02443-05,NACALAI TESQUE股份有限公司)膨润而成的Bio-Gel P-30 1mL的管柱中,于每一支管柱中添加以100 μ L的1xPBS溶解成5g/L的纳武单抗,回收在1000G、4分钟的条件以下以板式离心分离机(Plate Spin,Kubota)进行缓冲液置换而成的4.78g/L的纳武单抗。

[0641] [缓冲液交换方法C]

[0642] 纳武单抗(Selleck Biotech股份有限公司,Cat.No.A2002)的缓冲液交换是使用Centricon Plus-70,Ultracel-PL membrane,30kDa(默克公司,Cat.No.UFC703008)实施。对于制备50mM、pH7.8的HEPES (NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.02443-05)而成的缓冲液60mL,添加5mg/mL的纳武单抗1mL,实施使用离心机(TOMY SEIKO)的离心操作(2,300g x 15分钟)。离心分离后,添加60mL的该溶液,再次进行远分离。重复此操作共3次,最终获得11.1g/L的纳武单抗溶液。

[0643] [实施例3-2]

[0644] 曲妥珠单抗的缓冲液交换及浓缩

[0645] 针对抗体的曲妥珠单抗,在与肽的共轭前进行以下的操作。

[0646] [缓冲液交换方法A]

[0647] 曲妥珠单抗(中外制药股份有限公司,Cat.No.002224228)的缓冲液交换是使用平均粒径8.6 μ m、管柱的尺寸为10mm \times 300mm的Superdex 200Increase 10/300GL (Cat.No.28-9909-44,GE Helthcare)实施。使用所述的管柱与AKTA pure25 M2(GE Helthcare),将制备50mM、pH7.8的HEPES (Cat.No 02443-05,NACALAI TESQUE股份有限公司)而成者作为流动相,回收以流速0.5mL/分钟且在20分钟~35分钟溶出的组分。所回收的组分是使用Amicon Ultra (30,000MWC0,Merck Millipore Ltd)进行浓缩。最终获得17.0g/L的曲妥珠单抗溶液与19.9g/L的曲妥珠单抗溶液。

[0648] [缓冲液交换方法B]

[0649] 曲妥珠单抗(中外制药股份有限公司,Cat.No.002224231)的缓冲液交换是使用Centricon Plus-70,Ultracel-PL membrane,30kDa(默克公司,Cat.No.UFC703008)实施。对于制备50mM、pH7.8的HEPES (NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.02443-05)而成的缓冲液60mL,添加5mg/mL的曲妥珠单抗1mL,实施使用离心机(TOMY SEIKO)的离心操作(2,300g x 15分钟)。离心分离后,添加60mL的该溶液,再次进行远分离。重复此操作共3次,最终获得10.0g/L的曲妥珠单抗溶液。

[0650] [实施例3-3]

[0651] 帕妥珠单抗的缓冲液交换及浓缩

[0652] 针对抗体的帕妥珠单抗,在与肽的共轭前进行以下的操作。

[0653] 帕妥珠单抗(Selleck Biotech股份有限公司,Cat.No.A2008)的缓冲液交换是使用Centricon Plus-70,Ultracel-PL membrane,30kDa(默克公司,Cat.No.UFC703008)实施。对于制备50mM、pH7.8的HEPES(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.02443-05)而成的缓冲液60mL,添加5mg/mL的帕妥珠单抗1mL,实施使用离心机(TOMY SEIKO)的离心操作(2,300g x 15分钟)。离心分离后,添加60mL的该溶液,再次进行远分离。重复此操作共3次,最终获得8.2g/L的帕妥珠单抗溶液。

[0654] [实施例3-4]

[0655] 西妥昔单抗的缓冲液交换及浓缩

[0656] 针对抗体的西妥昔单抗,在与肽的共轭前进行以下的操作。

[0657] 西妥昔单抗(Selleck Biotech股份有限公司,Cat.No.A2000)的缓冲液交换是使用Centricon Plus-70,Ultracel-PL membrane,30kDa(默克公司,Cat.No.UFC703008)实施。对于制备50mM、pH7.8的HEPES(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.02443-05)而成的缓冲液60mL,添加5mg/mL的西妥昔单抗1mL,实施使用离心机(TOMY SEIKO)的离心操作(2,300g x 15分钟)。离心分离后,添加60mL的该溶液,再次进行远分离。重复此操作共3次,最终获得6.7g/L的西妥昔单抗溶液。

[0658] [实施例3-5]

[0659] 伊匹单抗的缓冲液交换及浓缩

[0660] 针对抗体的伊匹单抗,在与肽的共轭前进行以下的操作。

[0661] 伊匹单抗(Selleck Biotech股份有限公司,Cat.No.A2001)的缓冲液交换是使用Centricon Plus-70,Ultracel-PL membrane,30kDa(默克公司,Cat.No.UFC703008)实施。对于制备50mM、pH7.8的HEPES(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.02443-05)而成的缓冲液60mL,添加5mg/mL的伊匹单抗1mL,实施使用离心机(TOMY SEIKO)的离心操作(2,300g x 15分钟)。离心分离后,添加60mL的该溶液,再次进行远分离。重复此操作共3次,最终获得6.4g/L的伊匹单抗溶液。

[0662] [实施例3-6]

[0663] 阿特朱单抗的缓冲液交换及浓缩

[0664] 针对抗体的阿特朱单抗,在与肽的共轭前进行以下的操作。

[0665] 阿特朱单抗(Selleck Biotech股份有限公司,Cat.No.A2004)的缓冲液交换是使用Centricon Plus-70,Ultracel-PL membrane,30kDa(默克公司,Cat.No.UFC703008)实施。对于制备50mM、pH7.8的HEPES(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.02443-05)而成的缓冲液60mL,添加5mg/mL的西妥昔单抗1mL,实施使用离心机(TOMY SEIKO)的离心操作(2,300g x 15分钟)。离心分离后,添加60mL的该溶液,再次进行远分离。重复此操作共3次,最终获得6.4g/L的阿特朱单抗溶液。

[0666] [实施例3-7]

[0667] 派姆单抗的缓冲液交换及浓缩

[0668] 针对抗体的派姆单抗,在与肽的共轭前进行以下的操作。

[0669] 派姆单抗(Selleck Biotech股份有限公司,Cat.No.A2005)的缓冲液交换是使用

Centricon Plus-70, Ultracel-PL membrane, 30kDa (默克公司, Cat.No.UFC703008) 实施。对于制备50mM、pH7.8的HEPES (NACALAI TESQUE股份有限公司, Cat.No.02443-05) 而成的缓冲液60mL, 添加5mg/mL的西妥昔单抗1mL, 实施使用离心机 (TOMY SEIKO) 的离心操作 (2, 300g x 15分钟)。离心分离后, 添加60mL的该溶液, 再次进行远分离。重复此操作共3次, 最终获得9.5g/L的派姆单抗溶液。

[0670] [实施例3-8]

[0671] 使用马来酰亚胺的纳武单抗-894_3m_G4S2_K (Mal) 缀合物 (缀合物编号11) 的制成方法

[0672] 将使用实施例3-1所记载的[缓冲液交换方法A]进行缓冲液交换而成的13g/L的纳武单抗以100mM HEPES pH7.8 (Cat.No 02443-05, NACALAI TESQUE股份有限公司) 稀释成5.2g/L。通过在经稀释的纳武单抗中添加12.5mM的三(2-羧基乙基)膦 (TCEP, 相对于抗体一分子为24当量), 并以30°C温育60小时而将抗体内的双硫键还原。

[0673] 在填充有经膨润的1mL的Bio-Gel P-30 (Bio-Rad, Cat.No.1504150) 的管柱中, 于每一支管柱中添加70uL的上述溶液进行脱盐。进一步再重复一次此操作后, 添加将实施例2-1所得的化合物使用二甲亚砷溶解成10mM的溶液 (相对于抗体一分子为8.7当量), 并以30°C温育30分钟而使抗体内的双硫键与化合物的连接子进行反应。纳武单抗与肽的反应的确认是以[RP-UPLC-MS层析法]所记载的[分析条件A]实施, 结果表示于后述的表3-1。

[0674] 上述反应所得的纳武单抗-肽缀合物是使用[抗体-肽缀合物的精制]的项目所记载的[精制方法A]进行精制, 以浓度4.37g/L、抗体产量1.75mg获得纳武单抗-肽缀合物。

[0675] 此外, 表1的清单所记载的连接子部的反应性官能基为马来酰亚胺的肽, 使用上述方法同样地使其与纳武单抗反应而制成表3-1的清单所记载的纳武单抗-肽缀合物。

[0676] [实施例3-9]

[0677] 使用马来酰亚胺的纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K (Mal) 缀合物 (缀合物编号43) 的制成方法

[0678] 将使用实施例3-1所记载的[缓冲液交换方法A]进行缓冲液交换而成的13g/L的纳武单抗以100mM HEPES pH7.8 (Cat.No 02443-05, NACALAI TESQUE股份有限公司) 稀释成5.2g/L。通过在经稀释的纳武单抗中添加12.5mM的三(2-羧基乙基)膦 (TCEP, 相对于抗体一分子为24当量), 并以30°C温育60小时而将抗体内的双硫键还原。

[0679] 在填充有经膨润的1mL的Bio-Gel P-30 (Bio-Rad, Cat.No.1504150) 的管柱中, 于每一支管柱中添加70uL的上述溶液进行脱盐。进一步再重复一次此操作后, 添加将实施例2-2所得的化合物使用二甲亚砷溶解成10mM的溶液 (相对于抗体一分子为8.7当量), 并以30°C温育30分钟而使抗体内的双硫键与化合物的连接子进行反应。纳武单抗与肽的反应的确认是以[RP-UPLC-MS层析法]所记载的[分析条件A]实施, 结果表示于后述的表3-1。

[0680] 上述反应所得的纳武单抗-肽缀合物是使用[抗体-肽缀合物的精制]的项目所记载的[精制方法A]进行精制, 以浓度4.85g/L、抗体产量2.42mg获得纳武单抗-肽缀合物。

[0681] [实施例3-10]

[0682] 使用马来酰亚胺的曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K (Maleimide) 缀合物 (缀合物编号1) 的制成方法

[0683] 将使用实施例3-2所记载的[缓冲液交换方法A]进行缓冲液交换而成的19.9g/L的

曲妥珠单抗以100mM HEPES pH7.8 (Cat.No 02443-05, NACALAI TESQUE股份有限公司) 稀释成5.2g/L。通过在经稀释的曲妥珠单抗中添加12.5mM的三(2-羧基乙基)膦(TCEP, 相对于抗体一分子为3.6当量), 并以25℃温育30分钟而将抗体内的双硫键还原。

[0684] 在填充有经膨润的1mL的Bio-Gel P-30 (Cat.1504150) 的管柱中, 于每一支管柱中添加70uL的上述溶液进行脱盐。添加将实施例2-4所得的化合物使用二甲亚砷溶解成10mM的溶液(相对于抗体一分子为8.7当量), 并以30℃温育30分钟而使抗体内的双硫键与化合物的连接子进行反应。曲妥珠单抗与肽的反应是以[RP-UPLC-MS层析法]所记载的[分析条件D]实施, 结果表示于后述的表3-1。

[0685] 上述反应所得的曲妥珠单抗-肽缀合物是通过[抗体-肽缀合物的精制]所记载的方法进行精制, 以浓度5.87g/L、抗体产量0.88mg获得曲妥珠单抗-肽缀合物。

[0686] 表1的清单所记载的连接子部的反应性官能基为马来酰亚胺的肽, 使用上述方法(分析条件记载于表3-1) 同样地使其与曲妥珠单抗反应而制成表3-1的清单所记载的曲妥珠单抗-肽缀合物。

[0687] [实施例3-11]

[0688] 使用酰肼的曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_(Hydradine) 缀合物(缀合物编号60)的制成方法

[0689] 将使用实施例3-2所记载的[缓冲液交换方法A]进行缓冲液交换而成的19.9g/L的曲妥珠单抗以100mM柠檬酸缓冲液(pH3.5) 稀释成10.4g/L。将以100mM柠檬酸缓冲液稀释成20mM的高碘酸钠(Thermo Fisher Scientific) 与抗体稀释液等量地混合至经稀释的曲妥珠单抗200uL, 在室温下使其反应30分钟, 而将抗体上的糖链进行氧化。

[0690] 氧化反应后, 在填充有经膨润的1mL的Bio-Gel P-30 (Cat.1504150) 的管柱中, 于每一支管柱中添加100uL的上述反应溶液进行脱盐。针对脱盐后的样本液每100uL, 添加将实施例2-3所得的化合物(将表1所记载的连接子结合至在序列号6的肽而成者) 使用二甲亚砷溶解成10mM的溶液(相对于抗体一分子为10当量) 与经DMSO稀释的50%稀释苯胺(和光纯药工业) 7.2uL, 并以25℃温育3~4小时而使其与抗体的糖链上经精制的羰基进行反应。曲妥珠单抗与肽的反应是以[RP-UPLC-MS层析法]所记载的[分析方法C]实施, 结果表示于后述的表3-2。

[0691] 上述反应所得的曲妥珠单抗-肽缀合物是通过[抗体-肽缀合物的精制]所记载的方法进行精制, 以浓度4.6g/L、抗体产量0.23mg获得曲妥珠单抗-肽缀合物。

[0692] 此外, 表1的清单所记载的连接子部的反应性官能基为酰肼的肽(将表1所记载的连接子结合至序列号7、11的肽而成者), 使用上述方法同样地使其与曲妥珠单抗反应而制成表3-2的清单所记载的曲妥珠单抗-肽缀合物。

[0693] [实施例3-12]

[0694] 使用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的纳武单抗-894_PEG12(NHS) 缀合物(缀合物编号64)的制成方法

[0695] 在将使用实施例3-1所记载的[缓冲液交换方法B]进行缓冲液交换而成的4.9g/L的纳武单抗中, 添加将实施例2-5所得的化合物(将表1所记载的连接子结合至序列号19的肽而成者) 使用二甲亚砷溶解成10mM的溶液(相对于抗体一分子为15.0当量), 并以25℃温育60分钟而使抗体的胺基与化合物的连接子进行反应。纳武单抗与肽的反应是以[RP-

UPLC-MS层析法]所记载的[分析条件D]实施,结果表示于后述的表3-3。

[0696] 上述反应所得的纳武单抗-肽缀合物是通过[抗体-肽缀合物的精制]的[精制方法B]所记载的方法进行精制,以浓度2.2g/L、抗体产量0.11mg获得纳武单抗-肽缀合物。

[0697] 此外,表1的清单所记载的连接子部的反应性官能基为N-羟基琥珀酰亚胺的肽(将表1所记载的连接子结合至序列号4的肽而成者),使用上述方法(分析条件记载于表3-3)使其与纳武单抗反应而制成表3-3的清单所记载的纳武单抗-肽缀合物。

[0698] [实施例3-13]

[0699] 使用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的曲妥珠单抗-894_PEG12(NHS)缀合物(缀合物编号63)的制成方法

[0700] 在将使用实施例3-2的[缓冲液交换方法A]进行缓冲液交换而成的17g/L的曲妥珠单抗中,添加将实施例2-5所得的化合物(将表1所记载的连接子结合至序列号19的肽而成者)使用二甲亚砷溶解成10mM的溶液(相对于抗体一分子为4.0等量),并以25℃温育60分钟而使抗体的胺基与化合物的连接子进行反应。纳武单抗与肽的反应是以[RP-UPLC-MS层析法]实施,结果表示于后述的表3-3。

[0701] 上述反应所得的曲妥珠单抗-肽缀合物是通过[抗体-肽缀合物的精制]的[精制方法C]所记载的方法进行精制,以浓度1.2g/L、抗体产量0.12mg获得曲妥珠单抗-肽缀合物。

[0702] [实施例3-14]

[0703] 使用马来酰亚胺的帕妥珠单抗-894_3m_PEG12_dk(Maleimide)缀合物(缀合物编号66)的制成方法

[0704] 将使用实施例3-3所记载的[帕妥珠单抗的缓冲液交换及浓缩]进行缓冲液交换而成的8.2g/L的帕妥珠单抗以50mM HEPES pH7.8(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No 02443-05)稀释成5.2g/L。通过在经稀释的帕妥珠单抗中添加12.5mM的三(2-羧基乙基)膦(TCEP,相对于抗体一分子为12当量),并在室温下温育1小时而使抗体内的双硫键裂解。

[0705] 在填充有经膨润的1mL的Bio-Gel P-30(Bio-Rad,Cat.No.1504150)的管柱中,于每一支管柱中添加70uL的上述溶液进行脱盐。添加将实施例1所得的化合物使用二甲亚砷溶解成10mM的溶液(相对于抗体一分子为10当量),并以30℃温育30分钟而使抗体内的双硫键与化合物的连接子进行反应。帕妥珠单抗与肽的反应的确认是以[RP-UPLC-MS层析法]所记载的[分析条件E]实施,结果表示于后述的表3-1。

[0706] [实施例3-15]

[0707] 使用马来酰亚胺的西妥昔单抗-894_3m_PEG12_dk(Maleimide)缀合物(缀合物编号67)的制成方法

[0708] 将使用实施例3-4所记载的[西妥昔单抗的缓冲液交换及浓缩]进行缓冲液交换而成的8.2g/L的西妥昔单抗以50mM HEPES pH7.8(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No 02443-05)稀释成5.2g/L。通过在经稀释的西妥昔单抗中添加12.5mM的三(2-羧基乙基)膦(TCEP,相对于抗体一分子为12当量),并在室温下温育1小时而使抗体内的双硫键裂解。

[0709] 在填充有经膨润的1mL的Bio-Gel P-30(Bio-Rad,Cat.No.1504150)的管柱中,于每一支管柱中添加70uL的上述溶液进行脱盐。添加将实施例1所得的化合物使用二甲亚砷溶解成10mM的溶液(相对于抗体一分子为10当量),并以30℃温育30分钟而使抗体内的双硫键与化合物的连接子进行反应。西妥昔单抗与肽的反应的确认是以[RP-UPLC-MS层析法]所

记载的[分析条件E]实施,结果表示于后述的表3-1。

[0710] [实施例3-16]

[0711] 使用马来酰亚胺的伊匹单抗-894_3m_PEG12_dk (Maleimide) 缀合物(缀合物编号68)的制成方法

[0712] 将使用实施例3-5所记载的[伊匹单抗的缓冲液交换及浓缩]进行缓冲液交换而成的6.4g/L的伊匹单抗以50mM HEPES pH7.8(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.02443-05)稀释成5.2g/L。通过在经稀释的伊匹单抗中添加12.5mM的三(2-羧基乙基)膦(TCEP,相对于抗体一分子为12当量),并在室温下温育1小时而使抗体内的双硫键裂解。

[0713] 在填充有经膨润的1mL的Bio-Gel P-30(Bio-Rad,Cat.No.1504150)的管柱中,于每一支管柱中添加70uL的上述溶液进行脱盐。添加将实施例1所得的化合物使用二甲亚砷溶解成10mM的溶液(相对于抗体一分子为10当量),并以30℃温育30分钟而使抗体内的双硫键与化合物的连接子进行反应。伊匹单抗与肽的反应的确认是以[RP-UPLC-MS层析法]所记载的[分析条件E]实施,结果表示于后述的表3-1。

[0714] [实施例3-17]

[0715] 使用马来酰亚胺的阿特朱单抗-894_3m_PEG12_dk (Maleimide) 缀合物(缀合物编号69)的制成方法

[0716] 将使用实施例3-6所记载的[阿特朱单抗的缓冲液交换及浓缩]进行缓冲液交换而成的6.4g/L的阿特朱单抗以50mM HEPES pH7.8(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.02443-05)稀释成5.2g/L。通过在经稀释的阿特朱单抗中添加12.5mM的三(2-羧基乙基)膦(TCEP,相对于抗体一分子为12当量),并在室温下温育1小时而使抗体内的双硫键裂解。

[0717] 在填充有经膨润的1mL的Bio-Gel P-30(Bio-Rad,Cat.No.1504150)的管柱中,于每一支管柱中添加70uL的上述溶液进行脱盐。添加将实施例1所得的化合物使用二甲亚砷溶解成10mM的溶液(相对于抗体一分子为10当量),并以30℃温育30分钟而使抗体内的双硫键与化合物的连接子进行反应。阿特朱单抗与肽的反应的确认是以[RP-UPLC-MS层析法]所记载的[分析条件E]实施,结果表示于后述的表3-1。

[0718] [实施例3-18]

[0719] 使用马来酰亚胺的派姆单抗-894_3m_PEG12_dk (Maleimide) 缀合物(缀合物编号70)的制成方法

[0720] 将使用实施例3-7所记载的[派姆单抗的缓冲液交换及浓缩]进行缓冲液交换而成的6.4g/L的派姆单抗以50mM HEPES pH7.8(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.02443-05)稀释成5.2g/L。通过在经稀释的西妥昔单抗中添加125mM的三(2-羧基乙基)膦(TCEP,相对于抗体一分子为120当量),并以37度温育1小时而使抗体内的双硫键裂解。

[0721] 在填充有经膨润的1mL的Bio-Gel P-30(Bio-Rad,Cat.No.1504150)的管柱中,于每一支管柱中添加70uL的上述溶液进行脱盐。进行此脱盐处理共2次。添加将实施例1所得的化合物使用二甲亚砷溶解成10mM的溶液(相对于抗体一分子为10当量),并以30℃温育30分钟而使抗体内的双硫键与化合物的连接子进行反应。派姆单抗与肽的反应的确认是以[RP-UPLC-MS层析法]所记载的[分析条件E]实施,结果表示于后述的表3-1。

[0722] [实施例3-19]

[0723] 使用马来酰亚胺的曲妥珠单抗-894_3m_PEG12_dk (Maleimide) 缀合物(缀合物编

号71)的制成方法

[0724] 将使用实施例3-2所记载的[缓冲液交换方法B]进行缓冲液交换而成的10.0g/L的曲妥珠单抗以50mM HEPES pH7.8 (NACALAI TESQUE股份有限公司, Cat.No.02443-05) 稀释成5.2g/L。通过在经稀释的西妥昔单抗中添加12.5mM的三(2-羧基乙基)膦(TCEP, 相对于抗体一分子为12当量), 并以37度温育1小时而使抗体内的双硫键裂解。

[0725] 在填充有经膨润的1mL的Bio-Gel P-30 (Bio-Rad, Cat.No.1504150) 的管柱中, 于每一支管柱中添加70uL的上述溶液进行脱盐。添加将实施例1所得的化合物使用二甲亚砜溶解成10mM的溶液(相对于抗体一分子为10当量), 并以30℃温育30分钟而使抗体内的双硫键与化合物的连接子进行反应。曲妥珠单抗与肽的反应的确认是以[RP-UPLC-MS层析法]所记载的[分析条件E]实施, 结果表示于后述的表3-1。

[0726] [实施例3-20]

[0727] 使用马来酰亚胺的纳武单抗-894_3m_PEG12_dk (Maleimide) 缀合物(缀合物编号72)的制成方法

[0728] 将使用实施例3-1所记载的[缓冲液交换方法C]进行缓冲液交换而成的11.1g/L的纳武单抗以50mM HEPES pH7.8 (NACALAI TESQUE股份有限公司, Cat.No.02443-05) 稀释成5.2g/L。通过在经稀释的西妥昔单抗中添加125mM的三(2-羧基乙基)膦(TCEP, 相对于抗体一分子为120当量), 并以37度温育1小时而使抗体内的双硫键裂解。

[0729] 在填充有经膨润的1mL的Bio-Gel P-30 (Bio-Rad, Cat.No.1504150) 的管柱中, 于每一支管柱中添加70uL的上述溶液进行脱盐。进行此脱盐处理共2次。添加将实施例1所得的化合物使用二甲亚砜溶解成10mM的溶液(相对于抗体一分子为10当量), 并以30℃温育30分钟而使抗体内的双硫键与化合物的连接子进行反应。纳武单抗与肽的反应的确认是以[RP-UPLC-MS层析法]所记载的[分析条件E]实施, 结果表示于后述的表3-1。

[0730] [实施例3-21]

[0731] 使用马来酰亚胺所制成的抗体-肽缀合物的质谱分析

[0732] 按实施例3-8~10、14~20所记载的共轭的工序使用表3-1的清单所记载的肽制成抗体-肽缀合物。所制成的抗体-肽缀合物是以[RP-UPLC-MS层析法]的项目所记载的方法进行分析, 将分析结果表示于表3-1。各抗体-肽缀合物的分析所使用的条件表示于表中的“分析条件”一栏。使用硫醇-马来酰亚胺反应所制成的抗体-肽缀合物的双硫键中与肽结合的部分裂解, 表中的抗体-肽缀合物的分析所使用的条件中, 以“重链-肽片段”、“轻链-肽片段”或“轻链与重链的复合体-肽片段”进行分析。表中的“L”表示抗体的轻链, “H”表示重链, “nP”的“P”表示所加成的肽, “n” (n的值为整数) 表示所加成的肽的数量。表中的“LP”表示在轻链加成有1个肽的片段, “H3P”表示在重链加成有3个肽的片段, “H4P”表示在重链加成有4个肽的片段, “LH2P”表示在轻链与重链的复合体加成有2个肽的片段, “LH3P”表示在轻链与重链的复合体加成有3个肽的片段。表中的“ND”表示未检测出。各抗体-肽缀合物的各片段的分子量(计算值)是从将实施按实施例3-3、4、5所记载的共轭的工序所记载的还原处理后的曲妥珠单抗或纳武单抗使用表中所记载的分析法进行分析所得的重链与轻链的分子量、与表3-1中的SEQ ID No.所示的肽的分子量进行计算。

[0733] 表中的“测量值”一栏中记载有数值的抗体-肽缀合物的各片段, 其液相层析法的色谱图中的面积比率为10%以上, 低于10%的片段则为“ND”或未记载。并且, 表中所记载的

缀合物中的未反应抗体的比率,在色谱图中的面积比率皆为5%以下。

[0734] [实施例3-22]

[0735] 使用酰肼所制成的抗体-肽缀合物的质谱分析

[0736] 按实施例3-11所记载的共轭的工序使用表3-2的清单所记载的肽制成抗体-肽缀合物。所制成的抗体-肽缀合物是以[RP-UPLC-MS层析法]的项目所记载的方法进行分析,将分析结果表示于表3-2。各抗体-肽缀合物的分析所使用的条件表示于表中的“分析条件”一栏。表中的“nP”的“P”表示所加成的肽,“n”(n的值为整数)表示所加成的肽的数量。表中的“抗体”一栏中在共轭中所使用的抗体的种类为“1P”~“9P”表示各自相对于抗体一分子所加成的肽的个数。亦即“1P”表示在抗体加成有1分子的肽的结构,“2P”表示在抗体加成有2分子的肽的结构,其他也相同。表中的“ND”表示未检测出。

[0737] 此外,表中,对于1个缀合物而言,值分为上段、下段,上段为各抗体-肽缀合物的分子量(计算值),其是从将曲妥珠单抗或纳武单抗使用表中所记载的分析法进行分析所得的分子量与表3-2中的SEQ ID No.所示的肽的分子量进行计算。曲妥珠单抗中存在多个不同种类的糖链,在求取曲妥珠单抗-肽缀合物的分子量(计算值)时使用G0F/G1F的分子量。

[0738] 下段为“测量值”,测量值一栏中记载有数值的抗体-肽缀合物是记载液相层析法的色谱图中的面积比率为10%以上者。表中所记载的缀合物中的未反应抗体的比率,在色谱图中的面积比率皆为5%以下。

[0739] 亦即,缀合物编号60(曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_(Hydradine)缀合物)的情形,相对于在曲妥珠单抗加成有1分子的肽的结构即1P的上段150914为计算值,获得下段测量值151031,因此表示获得确实加成有1分子的肽的曲妥珠单抗。

[0740] [实施例3-23]

[0741] 使用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)所制成的抗体-肽缀合物的质谱分析

[0742] 按实施例3-12、13所记载的共轭的工序使用表3-3的清单所记载的肽制成抗体-肽缀合物。所制成的抗体-肽缀合物是以[RP-UPLC-MS层析法]的项目所记载的方法进行分析,将分析结果表示于表3-3。各抗体-肽缀合物的分析所使用的条件表示于表中的“分析条件”一栏。表中的“nP”的“P”表示所加成的肽,“n”(n的值为整数)表示所加成的肽的数量。表中的“抗体”一栏中在共轭中所使用的抗体的种类为“1P”~“9P”表示各自相对于抗体一分子所加成的肽的个数。亦即“1P”表示在抗体加成有1分子的肽的成分,“2P”表示在抗体加成有2分子的肽的成分,其他也相同。表中的“ND”表示未检测出。

[0743] 此外,表中,对于1个缀合物而言,值分为上段、下段,上段为各抗体-肽缀合物的分子量(计算值),其是从将曲妥珠单抗或纳武单抗使用表中所记载的分析法进行分析所得的分子量与表3-3中的SEQ ID No.所示的肽的分子量进行计算。曲妥珠单抗中存在多个不同种类的糖链,在求取曲妥珠单抗-肽缀合物的分子量(计算值)时使用G0F/G1F(作为糖链的简称,不含半乳糖的糖链表示为G0,包含1个表示为G1,包含2个表示为G2,再者,存在岩藻糖时,表示为G0F、G1F、G2F;G0F/G1F意指附有G0F与G1F的糖链各一个的抗体)的分子量。

[0744] 下段为“测量值”,测量值一栏中记载有数值的抗体-肽缀合物是记载液相层析法的色谱图中的面积比率为10%以上者。表中所记载的缀合物中的未反应抗体的比率,在色谱图中的面积比率皆为5%以下。

[0745] 亦即,缀合物编号63(曲妥珠单抗-894_PEG12_(NHS)缀合物)的情形,相对于在曲

妥珠单抗加成有1分子的肽的结构即1P的上段150887为计算值,未获得下段测量值,因此未获得加成有1分子的肽的曲妥珠单抗,在加成有2分子的肽的结构即2P中,相对于计算值为153551,获得153506的测量值,因此表示获得确实加成有2分子的肽的曲妥珠单抗。

[0746] [表3-1]

[0747] [表3-1-1]

[0748]

混合物编号	序列识别号	肽名称	抗体	Calculated Value	Measured Value	LP	LH2P	LH3P	H3P	H4P	分析条件
1	1	hTR_000894_PEG11_K(Maleimide)	Trastuzumab	Calculated Value 26472	Measured Value 26472	26472	60100	83130	59698	62717	D
2	2	hTR_000894_PEG36_K(Maleimide)	Trastuzumab	Calculated Value 27525	Measured Value 27525	27525	82215	86302	62860	66946	C
3	3	hTR_884_A11PEG11K(Maleimide)	Trastuzumab	Calculated Value 26385	Measured Value 26385	26385	79924	82374	59432	62377	D
4	20	884_3m_10A_GORGRS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26342	Measured Value 26343	26342	78985	81967	58587	61560	A
5	21	884_3m_6A_GORGRS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26342	Measured Value 26342	26341	78983	81964	58584	61556	A
6	22	884_variant_03_GORGRS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26432	Measured Value 26432	26431	79182	82223	58553	61914	A
7	23	884_Bicycle_002_GORGRS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26445	Measured Value 26446	26445	79190	82265	58596	61970	A
8	34	884_3m_PEG04_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26059	Measured Value 26059	26059	78491	81183	57815	60506	A
9	35	884_3m_PEG08_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26235	Measured Value 26235	26235	78843	81710	58342	61210	A
10	36	884_3m_PEG12_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26412	Measured Value 26411	26412	79195	82239	58671	61914	A
11	37	884_3m_G4S2_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26215	Measured Value 26214	26215	78733	81580	58212	61059	A
12	38	884_5m_PEG04_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26056	Measured Value 26056	26056	78491	81183	57816	60506	A
13	39	884_5m_PEG08_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26235	Measured Value 26235	26235	78844	81711	58343	61211	A
14	40	884_5m_PEG12_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26412	Measured Value 26411	26412	79195	82239	58671	61914	A
15	41	884_5m_G4S2_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26214	Measured Value 26214	26215	78804	81661	58283	61130	A
16	42	884_3_5m_PEG04_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26072	Measured Value 26072	26073	78519	81225	57857	60562	A
17	43	884_3_5m_PEG08_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26249	Measured Value 26249	26249	78872	81763	58386	61267	A
18	44	884_3_5m_PEG12_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26426	Measured Value 26426	26426	79223	82281	58613	61971	A
19	45	884_3_5m_G4S2_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value 26228	Measured Value 26228	26225	78832	81693	58326	61186	A
20	46	884_K11_PEG4c_KTrzMal	Nivolumab	Calculated Value 26659	Measured Value 26659	26659	78281	80882	57514	60105	A

[0749] [表3-1-2]

21	47	894_K11_PEG8c_KTrzMal	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	28135 26135	78643 78643	81411 ND	58043 58045	60810 ND	A
22	48	894_K11_PEG12c_KTrzMal	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26311 26311	78996 78964	81939 ND	58571 58576	61515 ND	A
23	49	894_K11_G4S2_KTrzMal	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26114 26114	78601 78602	81347 ND	57979 57981	60725 ND	A
24	52	894_11K_3MeF_PEG12c_KTrzMal	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26325 26325	79024 79024	81981 ND	58613 58617	61571 ND	A
25	53	894_11K_3MeF_G4S2_KTrzMal	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26128 26128	78629 78629	81389 ND	58024 58024	60782 ND	A
26	58	894_3m_G2SGSG2SGS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26677 26676	79667 79668	82966 ND	59598 59697	62907 ND	A
27	59	894_3m_G2SGSGS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26478 26475	79255 79252	82363 ND	58993 58993	62100 ND	A
28	60	894_3m_GSGSGS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26244 26244	78791 78789	81667 81665	58299 58299	61175 ND	A
29	62	894_3m_GSGGES_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26286 26286	78875 78874	81793 81792	58425 58426	61343 ND	A
30	63	894_3m_GGEGES_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26360 26358	79021 79018	82011 ND	58641 58642	61632 ND	A
31	64	894_3m_GGGSS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	28157 28157	78616 78616	81406 ND	58038 58039	60827 ND	A
32	65	894_3m_GGSS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26100 26100	78502 78501	81234 81234	57866 57866	60599 ND	A
33	66	894_3m_GGS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26013 26013	78328 78327	80873 80873	57605 57606	60250 ND	A
34	67	894_3m_GG_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	25926 25926	78154 78153	80712 80711	57344 57345	58902 58904	A
35	68	894_3m_G_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	25969 25969	78040 78039	80541 80540	57173 57173	58674 58674	A
36	69	894_3m_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	25812 25812	77926 77925	80370 ND	57002 57002	58446 ND	A
37	70	894_3m_PEG4_PEG4_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26306 26306	78917 78915	81855 81852	58487 58486	61426 ND	A
38	71	894_3m_PEG4_PEG4_PEG4_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26554 26553	79412 79409	82597 ND	59229 59228	62415 ND	A
39	72	894_5m_GSSGS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26274 26274	78853 78851	81759 ND	58391 58390	61297 ND	A
40	73	894_5m_GGRGRS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26383 26382	79069 79067	82084 ND	58716 58714	61730 ND	A
41	74	894_5m_GSGGES_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26286 26286	78877 78877	81795 ND	58427 58425	61345 ND	A

[0750]

[0751] [表3-1-3]

[0752]

42	75	894_5m_GGRSES_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26386 26385	79075 79075	82092 ND	58724 58724	61742 ND	A
43	82	894_3m_GGRGRS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26384 26384	79071 79069	82086 ND	58717 58716	61731 ND	A
44	83	894_5m_GG_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	25928 25927	78156 78155	80714 ND	57344 57346	59902 ND	A
45	84	894_5m_GGRGRS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26386 26383	79069 79068	82084 ND	58714 58716	61728 ND	A
46	85	894_3m_5m_GG_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	25842 25841	78184 78184	80756 ND	57386 57388	59958 ND	A
47	86	894_3m_5m_GGRGRS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26396 26397	79097 79096	82126 ND	58756 58758	61794 ND	A
48	88	36_GGRGRS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26806 25803	77910 77910	80344 ND	56874 56879	59409 ND	A
49	89	36_G4S2_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	25637 25635	77573 77573	79840 ND	58470 56472	58736 ND	A
50	90	894_3m_1Abu_GG_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	25842 25841	78184 78184	80756 ND	57386 57389	59958 ND	A
51	91	894_3m_1Abu_GGRGRS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26399 26397	79097 79097	82126 ND	58756 58758	61794 ND	A
52	92	894_3m_1Abu_G4S2_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26230 26228	78761 78760	81621 ND	58251 58254	61111 ND	A
53	93	894_3m_8Ahp_GG_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	25892 25891	78084 78084	80606 ND	57236 57239	59758 ND	A
54	94	894_3m_8Ah_GGRGRS_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26349 26347	78997 78999	81976 ND	58606 58610	61594 ND	A
55	95	894_3m_8Ah_G4S2_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26180 26179	78661 78660	81471 ND	58101 58103	60911 ND	A
56	108	894_G4S2_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26201.22 26199	78774.44 78771	81607.66 ND	58238.66 58237	61072.88 ND	A
57	109	894_PEG8_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26221.38 26221	78814.76 78813	81668.14 81667	58300.14 58300	61163.52 ND	A
58	1	894_PEG12_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26387.59 26387	79167.18 79165	82196.77 ND	58828.77 58828	61868.36 ND	A
59	110	894_PEG4_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value Measured Value	26045.17 26044	78463.34 78462	81140.51 81139	57772.51 57773	60449.68 60450	A

[0753]

[表3-1-4]

[0754]

66	36	894_3m_PEG12_K(Mal)	Pertuzumab	Calculated Value	26564	80129	83173	59653	62696	E
				Measured Value	26563	ND	ND	59651	ND	
67	36	894_3m_PEG12_K(Mal)	Cetuximab	Calculated Value	26464	81612	84656	61236	64279	E
				Measured Value	26463	ND	ND	61234	ND	
68	36	894_3m_PEG12_K(Mal)	Ipilimumab	Calculated Value	26492	80025	83069	59621	62664	E
				Measured Value	26492	ND	ND	59618	ND	
69	36	894_3m_PEG12_K(Mal)	Atezolizumab	Calculated Value	26403	78263	81307	57948	60991	E
				Measured Value	26402	ND	ND	57947	60992	
70	36	894_3m_PEG12_K(Mal)	Pembrolizumab	Calculated Value	26783	80533	83577	56794	59838	E
				Measured Value	26782	80530	ND	ND	59836	
71	36	894_3m_PEG13_K(Mal)	Trastuzumab	Calculated Value	26481	80114	83158	59721	62764	E
				Measured Value	26480	ND	ND	59720	ND	
72	36	894_3m_PEG14_K(Mal)	Nivolumab	Calculated Value	26411	82240	82240	58873	61916	E
				Measured Value	26411	ND	ND	58871	ND	

[0755] [表3-2]

[0756] [表3-2]

[0757]

混合物编号	序列识别号	肽名称	抗体	1 P	2 P	3 P	4 P
60	6	hTfR_000894_PEG11_(Hydrazine)	Trastuzumab	150914	153605	156297	158988
				151031	153756	156479	ND
61	7	hTfR_000894_PEG36_(Hydrazine)	Trastuzumab	151971	155720	159468	163217
				152115	155859	159608	ND
62	11	hTfR_894_(GE)PEG12_Hydrazide	Trastuzumab	151100	153978	156855	159732
				151192	154096	156988	ND
			5P	6P	7P	8P	9P
			161679	164370	167061	169753	172444
			ND	ND	ND	ND	ND
			166965	170714	174462	178211	181959
			ND	ND	ND	ND	ND
			162610	165487	168365	171242	174119
			ND	ND	ND	ND	ND

分析条件

[0758] [表3-3]

[0759] [表3-3]

[0760]

缀合物编号	序列识别号	肽名称	抗体	1P	2P	3P	4P	5P
63	19	894_PEG12_(NHS)	Trastuzumab	150887	153551	156217	158882	161547
				ND	153506	156188	158859	161525
64	19	894_PEG12_(NHS)	Nivolumab	148882	151547	154213	156878	159543
				ND	ND	ND	156890	159655
65	4	JCR_hTfR_000894_PEG36_(NHS)	Nivolumab	149966	153606	157245	160885	164524
				ND	ND	ND	161150	164885
				6P	7P	8P	9P	10P
				164212	166878	169543	172208	174873
				164194	166872	169543	172224	174886
				162208	164874	167539	170204	172869
				162295	164935	167630	170300	172960
				168164	171803	175443	179082	182722
				168610	172320	176045	179780	183510
				11P	12P	13P	14P	15P
				177539	180204	182869	185534	188199
				ND	ND	ND	ND	ND
				175535	178200	180865	183530	186195
				175650	178325	180995	183655	186320
				186361	190001	193840	197279	200919
				187270	191010	ND	ND	ND

分析条件

C

D

C

[0761]

[实施例4-1]

[0762]

利用AlphaLISA所进行的PD-1与纳武单抗-肽缀合物的结合性评价试验

[0763]

针对各种曲妥珠单抗-肽缀合物,以AlphaLISA测量抗PD-1抗体(纳武单抗)-肽缀

合物相对于抗原的PD-1的结合性。测量是遵循AlphaLISA Human PD-1 and PD-L1 binding kit (PerkinElmer, AL356F) 所附属的手册实施。具体而言,对于384Alpha Plate中以试剂盒所附属的缓冲液稀释成 $5.31E-02g/L$ 、 $1.77E-02g/L$ 、 $5.90E-03g/L$ 、 $1.97E-03g/L$ 、 $6.56E-04g/L$ 、 $2.19E-04g/L$ 、 $7.29E-05g/L$ 、 $2.43E-05g/L$ 、 $8.10E-06g/L$ 、 $2.70E-06g/L$ 的纳武单抗-肽缀合物 $2.5\mu L$ 中,添加试剂盒所附属的 $20nM$ $4\times His$ Tagged PD-L1 $2.5\mu L$ 与 $20nM$ $4\times Biotinylated$ PD-1 $2.5\mu L$,并添加将试剂盒所附属的 $5mg/mL$ Anti- $6\times His$ Acceptor beads与 $5mg/mL$ Streptavidin Donar beads与 $1\times Immunoassay$ buffer以 $1:2:122$ 的比率混合而成的溶液 $2.5\mu L$ 后,在室温暗处温育90分。温育后,以读板仪 (EnspirTM, Perkin Elmer公司) 测量荧光。将由所得的测量值所算出各纳武单抗-肽缀合物的 IC_{50} 的结果记载于表4。

[0764] [表4]

[0765] [表4]

缀合物编号	PD1-PDL1 IC50 (ng/mL)
纳武单抗 (控制)	57.5~195.0
56	489.0
59	126.0
57	437.0
58	91.2
11	347.0
8	148.0
9	389.0
10	355.0
15	97.7
12	128.0
13	112.0
14	417.0
19	123.0
16	191.0
17	407.0
23	162.0
26	74.1
27	135.0
28	20.4
29	23.4
30	61.7
31	20.9
32	43.7
33	63.1
34	70.8
35	81.2
37	81.2
38	79.4
39	148.0
40	93.3
41	91.2
42	91.2
54	89.1
43	177.8
48	120.2
51	190.5
45	239.9
47	128.8
52	229.1
55	177.8
50	144.5

[0766]

[0767] 由此结果表示,即使将肽制成缀合物,也不会失去抗体对抗原的结合能力。

[0768] [实施例4-2]

[0769] 利用表面等离子共振 (SPR) 所进行的HER-2与曲妥珠单抗-肽缀合物的分子间相互作用评价试验

[0770] 针对各种曲妥珠单抗-肽缀合物,将利用表面等离子共振 (SPR) 所进行的抗HER-2抗体(曲妥珠单抗)-肽缀合物对于抗原的HER-2的分子间相互作用通过以下所示的方法实施试验。具体的试验方法表示于以下。

[0771] 将NTA感测晶片(Global Life Sciences Technologies Japan股份有限公司)插入BiacoreT200(Global Life Sciences Technologies Japan股份有限公司),以电泳缓冲液:10mM HEPES pH8.0(NACALAI TESQUE股份有限公司)、150mM NaCl(NACALAI TESQUE股份有限公司)、0.05% Tween 20(NACALAI TESQUE股份有限公司)、0.1% BSA(SIGMA-ALDRICH)实施3次初始操作,以流速30 μ L/min进行平衡化。使350mM EDTA溶液以流速10 μ L/min反应60秒钟,并使0.5mM NiCl₂溶液(KISHIDA CHEMICAL)以流速10 μ L/min反应60秒钟后,将3mM EDTA溶液(NACALAI TESQUE股份有限公司)以流速10 μ L/min清洗NTA感测晶片60秒钟。使60mM EDC溶液(Global Life Sciences Technologies Japan股份有限公司)、650mM NHS溶液(Global Life Sciences Technologies Japan股份有限公司)各50 μ L进行混合后,以流速10 μ L/min使其反应420秒钟。以电泳缓冲液进行稀释,制备0.1 μ M HER-2(R&D SYSTEMS)溶液150 μ L,以流速10 μ L/min使其反应60秒钟,将HER-2在NTA感测晶片上固定化。固定化后,使1.0M乙醇胺水溶液(Global Life Sciences Technologies Japan股份有限公司)以流速10 μ L/min反应420秒钟,进行加帽。将在DMSO溶液中制备成10mM的实施例3-5所制成的曲妥珠单抗-肽缀合物(缀合物编号1;曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide))溶解液以最终浓度成为10 μ M的方式,以电泳缓冲液进行稀释后,制作100nM、50nM、25nM、10nM、5nM的稀释溶液。使用上述样本,通过SPR测量而取得对于HER-2的肽的动力学。动力学评价模型设为Single Cycle Kinetics,使用Biacore T200 Evaluation Software Version 3.0(Global Life Sciences Technologies Japan股份有限公司),从由最小平方方法所进行的曲线拟合,通过求取KD值而评价缀合物编号1的曲妥珠单抗-肽缀合物对于HER-2的结合亲和性的结果,Kd为1.00E-10M(0.1nM)。

[0772] 由此结果表示,即使将肽制成缀合物,也不会失去抗体对抗原的结合能力。

[0773] [实施例5-1]

[0774] 利用ELISA所进行的HER-2与帕妥珠单抗-肽缀合物的分子间相互作用试验

[0775] 针对帕妥珠单抗-肽缀合物,通过ELISA测量对于抗原的HER-2的结合性。

[0776] 使50 μ g的HER-2(R&D SYSTEMS,Cat.No.10126-ER)以PBS(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.27575-31)溶解而成为最终浓度1g/L。通过在所溶解的HER-2中添加1mM的NHS-PEG4-Biotin(Thermo Scientific,Cat.No.A39259)5当量,并以4 $^{\circ}$ C温育一晚而使HER-2生物素化(biotinylation)。在填充有通过在PBS(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.27575-31)中添加聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.28353-85)以成为最终浓度0.1%的溶液(PBST)膨润而成的1mL的Bio-Gel P-30(Bio-Rad,Cat.No.1504150)的管柱中,于每一支管柱中添加100 μ L的上述溶液,将未反应的NHS-PEG4-Biotin去除。

[0777] 通过在IMMOBILIZER STREPTAVIDIN F96 clear(NUNC公司,Cat.No.436014)中每1孔添加1pmol的经随机生物素化的HER-2,并以4℃温育一晚而将HER-2固相化。在平板洗涤器(TECAN公司,HydroSpeed)中以900μL的PBST进行清洗。通过添加每1孔300μL的1%Block ACE(KAC股份有限公司,Cat.No.UK-B80),并在室温下温育90分钟而进行封闭处理。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的利用50mM HEPES pH7.8-0.1%Block ACE稀释成最终浓度100nM的帕妥珠单抗-肽缀合物与帕妥珠单抗,并在室温下温育60分钟。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的将Goat Anti-Human IgG H&L(HRP)(Abcam公司,Cat No.ab97165)以PBST-0.1%Block ACE溶液稀释50,000倍的溶液,并在室温下温育45分钟。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的恢复至常温的TMB Solution(Sara care,Cat.No.5150-0077),在室温下于暗处使其发色10分钟后,添加50μL的TMB Stop Solution(Sara care,Cat.No.5150-0021)而停止发色。以读板仪(EnspirTM,Perkin Elmer公司)测量450nm的吸光度。重复此测量2次,将吸光度的平均值记载于表6。

[0778] 由此结果表示,即使将肽制成缀合物,也不会失去抗体对抗原的结合能力。

[0779] [实施例5-2]

[0780] 利用ELISA所进行的EGFR与西妥昔单抗-肽缀合物的分子间相互作用试验

[0781] 针对西妥昔单抗-肽缀合物,通过ELISA测量对于抗原的EGFR的结合性。

[0782] 使50μg的EGFR(R&D SYSTEMS,Cat.No.AVI10493-50)以PBS溶解而成为最终浓度0.1g/L。

[0783] 通过在IMMOBILIZER STREPTAVIDIN F96 clear(NUNC公司,Cat.No.436014)中每1孔添加1pmol的EGFR,并以4℃温育一晚而使其固相化。在平板洗涤器(TECAN公司,HydroSpeed)中以900μL的PBST进行清洗。通过添加每1孔300μL的1%Block ACE(KAC股份有限公司,Cat.No.UK-B80),并在室温下温育90分钟而进行封闭处理。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的利用50mM HEPES pH7.8-0.1%Block ACE稀释成最终浓度100nM的西妥昔单抗-肽缀合物与西妥昔单抗,并在室温下温育60分钟。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的将Goat Anti-Human IgG H&L(HRP)(Abcam公司,Cat No.ab97165)以PBST-0.1%Block ACE溶液稀释50,000倍的溶液,并在室温下温育45分钟。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的恢复至常温的TMB Solution(Sara care,Cat.No.5150-0077),在室温下于暗处使其发色10分钟后,添加50μL的TMB Stop Solution(Sara care,Cat.No.5150-0021)而停止发色。以读板仪(EnspirTM,Perkin Elmer公司)测量450nm的吸光度。重复此测量2次,将吸光度的平均值记载于表6。

[0784] 由此结果表示,即使将肽制成缀合物,也不会失去抗体对抗原的结合能力。

[0785] [实施例5-3]

[0786] 利用ELISA所进行的CTLA-4与伊匹单抗-肽缀合物的分子间相互作用试验

[0787] 针对伊匹单抗-肽缀合物,通过ELISA测量对于抗原的CTLA-4的结合性。

[0788] 使100μg的CTLA-4(Abcam公司,Cat.No.ab167727)以PBS(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.27575-31)溶解而成为最终浓度1g/L。通过在所溶解的CTLA-4中添加10mM的NHS-PEG4-Biotin(Thermo Scientific,Cat.No.A39259)5当量,并以4℃温育一晚而使CTLA-4生物素化。在填充有通过在PBS中添加聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.28353-85)以成为最终浓度0.1%的溶液(PBST)膨润而成的

1mL的Bio-Gel P-6(Bio-Rad,Cat.No.1504130)的管柱中,于每一支管柱中添加100uL的上述溶液,将未反应的NHS-PEG4-Biotin去除。

[0789] 通过在IMMOBILIZER STREPTAVIDIN F96 clear(NUNC公司,Cat.No.436014)中每1孔添加1pmol的经随机生物素化的CTLA-4,并以4℃温育温育一晚而使其固相化。在平板洗涤器(TECAN公司,HydroSpeed)中以900μL的PBST进行清洗。通过添加每1孔300μL的1%Block ACE(KAC股份有限公司,Cat.No.UK-B80),并在室温下温育90分钟而进行封闭处理。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的利用50mM HEPES pH7.8-0.1%Block ACE稀释成最终浓度100nM的伊匹单抗-肽缀合物与伊匹单抗,并在室温下温育60分钟。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的将Goat Anti-Human IgG H&L(HRP)(Abcam公司,Cat No.ab97165)以PBST-0.1%Block ACE溶液稀释50,000倍的溶液,并在室温下温育45分钟。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的恢复至常温的TMB Solution(Sara care,Cat.No.5150-0077),在室温下于暗处使其发色10分钟后,添加50μL的TMB Stop Solution(Sara care,Cat.No.5150-0021)而停止发色。以读板仪(EnspirTM,Perkin Elmer公司)测量450nm的吸光度。重复此测量2次,将吸光度的平均值记载于表6。

[0790] 由此结果表示,即使将肽制成缀合物,也不会失去抗体对抗原的结合能力。

[0791] [实施例5-4]

[0792] 利用ELISA所进行的PD-L1与阿特朱单抗-肽缀合物的分子间相互作用试验

[0793] 针对阿特朱单抗-肽缀合物,通过ELISA测量对于抗原的PD-L1的结合性。

[0794] 使100μg的PD-L1(R&D SYSTEMS,Cat.No.9049-B7)以PBS(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.27575-31)溶解而成为最终浓度1g/L。通过在所溶解的PD-L1中添加10mM的NHS-PEG4-Biotin(Thermo Scientific,Cat.No.A39259)5当量,并以4℃温育一晚而使PD-L1生物素化。在填充有通过在PBS中添加聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.28353-85)以成为最终浓度0.1%的溶液(PBST)膨润而成的1mL的Bio-Gel P-6(Bio-Rad,Cat.No.1504130)的管柱中,于每一支管柱中添加100uL的上述溶液,将未反应的NHS-PEG4-Biotin去除。

[0795] 通过在IMMOBILIZER STREPTAVIDIN F96 clear(NUNC公司,Cat.No.436014)中每1孔添加1pmol的经随机生物素化的PD-L1,并以4℃温育温育一晚而使其固相化。在平板洗涤器(TECAN公司,HydroSpeed)中以900μL的PBST进行清洗。通过添加每1孔300μL的1%Block ACE(KAC股份有限公司,Cat.No.UK-B80),并在室温下温育90分钟而进行封闭处理。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的利用50mM HEPES pH7.8-0.1%Block ACE稀释成最终浓度100nM的阿特朱单抗-肽缀合物与阿特朱单抗,并在室温下温育60分钟。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的将Goat Anti-Human IgG H&L(HRP)(Abcam公司,Cat No.ab97165)以PBST-0.1%Block ACE溶液稀释50,000倍的溶液,并在室温下温育45分钟。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的恢复至常温的TMB Solution(Sara care,Cat.No.5150-0077),在室温下于暗处使其发色10分钟后,添加50μL的TMB Stop Solution(Sara care,Cat.No.5150-0021)而停止发色。以读板仪(EnspirTM,Perkin Elmer公司)测量450nm的吸光度。重复此测量2次,将吸光度的平均值记载于表6。

[0796] 由此结果表示,即使将肽制成缀合物,也不会失去抗体对抗原的结合能力。

[0797] [实施例5-5]

[0798] 利用ELISA所进行的PD-1与派姆单抗-肽缀合物的分子间相互作用试验

[0799] 针对派姆单抗-肽缀合物,通过ELISA测量对于抗原的PD-1的结合性。

[0800] 使100 μ g的PD-1(R&D SYSTEMS,Cat.No.8986-PD-100)以PBS(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.27575-31)溶解而成为最终浓度1g/L。通过在所溶解的PD-1中添加10mM的NHS-PEG4-Biotin(Thermo Scientific,Cat.No.A39259)5当量,并以4 $^{\circ}$ C温育一晚而使PD-1生物素化。在填充有通过在PBS中添加聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.28353-85)以成为最终浓度0.1%的溶液(PBST)膨润而成的1mL的Bio-Gel P-6(Bio-Rad,Cat.No.1504130)的管柱中,于每一支管柱中添加100 μ L的上述溶液,将未反应的NHS-PEG4-Biotin去除。

[0801] 通过在IMMOBILIZER STREPTAVIDIN F96 clear(NUNC公司,Cat.No.436014)中每1孔添加1pmol的经随机生物素化的PD-1,并以4 $^{\circ}$ C温育一晚而使其固相化。在平板洗涤器(TECAN公司,HydroSpeed)中以900 μ L的PBST进行清洗。通过添加每1孔300 μ L的1%Block ACE(KAC股份有限公司,Cat.No.UK-B80),并在室温下温育90分钟而进行封闭处理。在平板洗涤器中以900 μ L的PBST进行清洗。添加50 μ L的利用50mM HEPES pH7.8-0.1%Block ACE稀释成最终浓度100nM的派姆单抗-肽缀合物与派姆单抗,并在室温下温育60分钟。在平板洗涤器中以900 μ L的PBST进行清洗。添加50 μ L的将Goat Anti-Human IgG H&L(HRP)(Abcam公司,Cat.No.ab97165)以PBST-0.1%Block ACE溶液稀释50,000倍的溶液,并在室温下温育45分钟。在平板洗涤器中以900 μ L的PBST进行清洗。添加50 μ L的恢复至常温的TMB Solution(Saracare,Cat.No.5150-0077),在室温下于暗处使其发色10分钟后,添加50 μ L的TMB Stop Solution(Saracare,Cat.No.5150-0021)而停止发色。以读板仪(EnspirTM,Perkin Elmer公司)测量450nm的吸光度。重复此测量2次,将吸光度的平均值记载于表6。

[0802] 由此结果表示,即使将肽制成缀合物,也不会失去抗体对抗原的结合能力。

[0803] [实施例5-6]

[0804] 利用ELISA所进行的HER-2与曲妥珠单抗-肽缀合物的分子间相互作用试验

[0805] 针对曲妥珠单抗-肽缀合物,通过ELISA测量对于抗原的HER-2的结合性。

[0806] 使50 μ g的HER-2(R&D SYSTEMS,Cat.No.10126-ER)以PBS(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.27575-31)溶解而成为最终浓度1g/L。通过在所溶解的HER-2中添加1mM的NHS-PEG4-Biotin(Thermo Scientific,Cat.No.A39259)5当量,并以4 $^{\circ}$ C温育一晚而使HER-2生物素化。在填充有通过在PBS(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.27575-31)中添加聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.28353-85)以成为最终浓度0.1%的溶液(PBST)膨润而成的1mL的Bio-Gel P-30(Bio-Rad,Cat.No.1504150)的管柱中,于每一支管柱中添加100 μ L的上述溶液,将未反应的NHS-PEG4-Biotin去除。

[0807] 通过在IMMOBILIZER STREPTAVIDIN F96 clear(NUNC公司,Cat.No.436014)中每1孔添加1pmol的经随机生物素化的HER-2,并以4 $^{\circ}$ C温育一晚而将HER-2固相化。在平板洗涤器(TECAN公司,HydroSpeed)中以900 μ L的PBST进行清洗。通过添加每1孔300 μ L的1%Block ACE(KAC股份有限公司,Cat.No.UK-B80),并在室温下温育90分钟而进行封闭处理。在平板洗涤器中以900 μ L的PBST进行清洗。添加50 μ L的利用50mM HEPES pH7.8-0.1%Block ACE稀释成最终浓度100nM的曲妥珠单抗-肽缀合物与曲妥珠单抗,并在室温下温育60分钟。在平板洗涤器中以900 μ L的PBST进行清洗。添加50 μ L的将Goat Anti-Human IgG H&L(HRP)

(Abcam公司,Cat No.ab97165)以PBST-0.1%Block ACE溶液稀释50,000倍的溶液,并在室温下温育45分钟。在平板洗涤器中以900 μ L的PBST进行清洗。添加50 μ L的恢复至常温的TMB Solution(Sara care,Cat.No.5150-0077),在室温下于暗处使其发色10分钟后,添加50 μ L的TMB Stop Solution(Sara care,Cat.No.5150-0021)而停止发色。以读板仪(EnspirTM,Perkin Elmer公司)测量450nm的吸光度。重复此测量2次,将吸光度的平均值记载于表6。

[0808] 由此结果表示,即使将肽制成缀合物,也不会失去抗体对抗原的结合能力。

[0809] [实施例5-7]

[0810] 利用ELISA所进行的PD-1与纳武单抗-肽缀合物的分子间相互作用试验

[0811] 针对纳武单抗-肽缀合物,通过ELISA测量对于抗原的PD-1的结合性。

[0812] 使100 μ g的PD-1(R&D SYSTEMS,Cat.No.8986-PD-100)以PBS(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.27575-31)溶解而成为最终浓度1g/L。通过在所溶解的PD-1中添加10mM的NHS-PEG4-Biotin(Thermo Scientific,Cat.No.A39259)5当量,并以4 $^{\circ}$ C温育一晚而使PD-1生物素化。在填充有通过在PBS中添加聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.28353-85)以成为最终浓度0.1%的溶液(PBST)膨润而成的1mL的Bio-Gel P-6(Bio-Rad,Cat.No.1504130)的管柱中,于每一支管柱中添加100 μ L的上述溶液,将未反应的NHS-PEG4-Biotin去除。

[0813] 通过在IMMOBILIZER STREPTAVIDIN F96 clear(NUNC公司,Cat.No.436014)中每1孔添加1pmol的经随机生物素化的PD-1,并以4 $^{\circ}$ C温育一晚而使其固相化。在平板洗涤器(TECAN公司,HydroSpeed)中以900 μ L的PBST进行清洗。通过添加每1孔300 μ L的1%Block ACE(KAC股份有限公司,Cat.No.UK-B80),并在室温下温育90分钟而进行封闭处理。在平板洗涤器中以900 μ L的PBST进行清洗。添加50 μ L的利用50mM HEPES pH7.8-0.1%Block ACE稀释成最终浓度100nM的纳武单抗-肽缀合物与纳武单抗,并在室温下温育60分钟。在平板洗涤器中以900 μ L的PBST进行清洗。添加50 μ L的将Goat Anti-Human IgG H&L(HRP)(Abcam公司,Cat No.ab97165)以PBST-0.1%Block ACE溶液稀释50,000倍的溶液,并在室温下温育45分钟。在平板洗涤器中以900 μ L的PBST进行清洗。添加50 μ L的恢复至常温的TMB Solution(Sara care,Cat.No.5150-0077),在室温下于暗处使其发色10分钟后,添加50 μ L的TMB Stop Solution(Sara care,Cat.No.5150-0021)而停止发色。以读板仪(EnspirTM,Perkin Elmer公司)测量450nm的吸光度。重复此测量2次,将吸光度的平均值记载于表6。

[0814] 由此结果表示,即使将肽制成缀合物,也不会失去抗体对抗原的结合能力。

[0815] [实施例5-8]

[0816] 利用ELISA所进行的TfR与各种抗体-肽缀合物与的分子间相互作用试验

[0817] 针对各种抗体-肽缀合物,通过ELISA测量对于TfR的结合性。

[0818] 通过在100 μ g的人TfR中添加1mM的NHS-PEG4-Biotin(Thermo Scientific,Cat.No.A39259)10当量,并以4 $^{\circ}$ C温育一晚而使其生物素化。关于人TfR,使用W02018/124121的实施例2所记载的重组hTfR。在填充有通过在PBS中添加聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯(NACALAI TESQUE股份有限公司,Cat.No.28353-85)以成为最终浓度0.1%的溶液(PBST)膨润而成的1mL的Bio-Gel P-6(Bio-Rad,Cat.No.1504130)的管柱中,于每一支管柱中添加100 μ L的上述溶液,将未反应的NHS-PEG4-Biotin去除。

[0819] 通过在IMMOBILIZER STREPTAVIDIN F96 clear(NUNC公司,Cat.No.436014)中每1

孔添加1pmol的经随机生物素化的TfR,并以4℃温育温育一晚而使其固相化。在平板洗涤器(TECAN公司,HydroSpeed)中以900μL的PBST进行清洗。通过添加每1孔300μL的1%Block ACE(KAC股份有限公司,Cat.No.UK-B80),并在室温下温育90分钟而进行封闭处理。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的利用50mM HEPES pH7.8-0.1%Block ACE稀释成最终浓度100nM的各种抗体-肽缀合物与肽未修饰的抗体,并在室温下温育60分钟。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的将Goat Anti-Human IgG H&L(HRP)(Abcam公司,Cat No.ab97165)以PBST-0.1%Block ACE溶液稀释50,000倍的溶液,并在室温下温育45分钟。在平板洗涤器中以900μL的PBST进行清洗。添加50μL的恢复至常温的TMB Solution(Sara care,Cat.No.5150-0077),在室温下于暗处使其发色10分钟后,添加50μL的TMB Stop Solution(Sara care,Cat.No.5150-0021)而停止发色。以读板仪(Enspir™,Perkin Elmer公司)测量450nm的吸光度。重复此测量2次,将吸光度的平均值记载于表6。

[0820] 由此结果表示,即使将抗体制成缀合物,也不会失去TfR结合肽对于TfR的结合能力。

[0821] [表6]

[0822] [表6-1]

[0823]

检体		目标	Abs450nm at 100nM
Pertuzumab	未修饰	HER2	2.0965
		hTfR	0.046
		No-taragt	0.0455
	894_3m_PEG12_K(Mal)	HER2	0.831
		hTfR	0.863
		No-taragt	0.168
Cetuximab	未修饰	EGFR	2.1625
		hTfR	0.0445
		No-taragt	0.0465
	894_3m_PEG12_K(Mal)	EGFR	1.419
		hTfR	0.59
		No-taragt	0.282
Ipilimumab	未修饰	CTLA4	1.306
		hTfR	0.0435
		No-taragt	0.044
	894_3m_PEG12_K(Mal)	CTLA4	0.711
		hTfR	0.6055
		No-taragt	0.161
Atezolizumab	未修饰	PD-L1	2.237
		hTfR	0.0465
		No-taragt	0.043
	894_3m_PEG12_K(Mal)	PD-L1	1.083
		hTfR	0.4715
		No-taragt	0.3855

[0824] [表6-2]

检体		目标	Abs450nm at 100nM
Pembrolizumab	未修饰	PD-1	1.6405
		hTfR	0.041
		No-taragt	0.0415
	894_3m_PEG12_K(Mal)	PD-1	0.916
		hTfR	0.6765
		No-taragt	0.231
Nivolumab	未修饰	PD-1	1.599
		hTfR	0.049
		No-taragt	0.049
	894_3m_PEG12_K(Mal)	PD-1	0.8975
		hTfR	0.6465
		No-taragt	0.1365
Trastuzumab	未修饰	HER2	2.0715
		hTfR	0.0445
		No-taragt	0.0425
	894_3m_PEG12_K(Mal)	HER2	0.611
		hTfR	0.711
		No-taragt	0.132

[0825] [实施例6]

[0826] 细胞渗透性试验

[0827] 确认实施例1至实施例3所得的抗体-肽缀合物的细胞渗透性。

[0828] [细胞培养]

[0829] 在人乳癌细胞BT-549的培养中,使用包含10% FBS及2mmol/L L-Glutamine的RPMI-1640培养基。培养是在37℃、5% CO₂条件下进行。

[0830] [细胞的播种]

[0831] 以20mmol/L乙酸将Collagen Type I(康宁公司)进行稀释,而使其成为50μg/mL。在24孔板的各孔中各放置1片已灭菌的盖玻片,添加经稀释的Collagen Type I溶液后,以37℃保温1小时。去除Collagen Type I溶液,以PBS清洗3次。每1孔播种1×10⁵个人乳癌细胞BT-549,在37℃、5% CO₂条件下培养一晚。

[0832] [抗体-肽缀合物溶液的制备及往细胞的添加]

[0833] 在抗体-肽缀合物的稀释中,使用稀释用培养基(包含0.5%牛血清白蛋白及20μg/mL人转铁蛋白全型的RPMI 1640培养基)。将抗体-肽缀合物以稀释用培养基进行稀释,而使其成为2.5、5、10μg/mL或1、3、9μg/mL。

[0834] 确认在24孔板中培养一晚的细胞BT-549与盖玻片接着后,以RPMI 1640培养基清洗2次。以500μL/well添加包含0.5%牛血清白蛋白的RPMI 1640培养基,在冰上静置15分钟后去除,以500μL/well添加经稀释的抗体-肽缀合物溶液,在37℃、5% CO₂条件下静置3小时。作为阴性对照组,仅添加抗体(纳武单抗或曲妥珠单抗)代替抗体-肽缀合物。

[0836] [细胞的固定、穿透处理]

[0837] 从24孔板去除抗体-肽缀合物溶液,以PBS将细胞BT-549清洗3次。以500 μ L/well添加4%多聚甲醛磷酸缓冲液(富士胶片和光纯药公司),在室温下静置15分钟后,以PBS清洗3次。

[0838] 以500 μ L/well添加0.1% Triton X-100溶液,在室温下静置10分钟后,以PBS清洗3次。

[0839] [免疫染色]

[0840] 以250 μ L/well添加包含10%驴血清及1%牛血清白蛋白的PBS,在室温下静置1小时后,以PBS清洗3次。

[0841] 以包含0.5%牛血清白蛋白的PBS-T将Goat anti-human IgG h+1(Bethyl Laboratories公司)稀释成5 μ g/mL,将所形成溶液作为一次抗体溶液。以200 μ L/well添加一次抗体溶液,在室温下静置1小时后,以PBS清洗3次。

[0842] 以包含0.5%牛血清白蛋白的PBS-T将Donkey anti-goat IgG h+1,DyLight488 conjugated(Bethyl Laboratories公司)稀释300倍,将所形成溶液作为二次抗体溶液。以200 μ L/well添加二次抗体溶液,在室温、遮光下静置1小时后,以PBS清洗3次。

[0843] [核染色、封片]

[0844] 以500 μ L/well添加经以PBS稀释成2 μ g/mL的赫斯特33342(Hoechst 33342)(Thermo Fisher Scientific公司),在室温、遮光下静置10分钟后,以PBS清洗3次。从24孔板取出盖玻片,使用Fluorescent Mounting Medium(Agilent公司),在载玻片上进行封片,在室温、遮光下静置一晚。观察是使用倒立型荧光显微镜DMI6000B(Leica Microsystems公司),以DyLight488及DAPI检测用波长进行观察。将结果表示于图1。

[0845] 图1-1表示添加图中记载量的曲妥珠单抗-894_PEG12_(NHS)缀合物(缀合物编号63)的结果。由图1-1所示,曲妥珠单抗-894_PEG12_(NHS)缀合物具有移行至细胞的能力。

[0846] 图1-2表示添加图中记载量的曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_(Hydradine)(缀合物编号60)的结果。由图1-2所示,hTfR_000894_PEG11_(Hydradine)与曲妥珠单抗的缀合物具有移行至细胞的能力。

[0847] 图1-3表示添加5 μ g/mL的曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide)(缀合物编号1);a及曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide)(缀合物编号2);b的结果。由图1-3所示,hTfR_000894_PEG(11/36)_(Hydradine)与曲妥珠单抗的缀合物具有移行至细胞的能力。

[0848] [实施例7]

[0849] 脑内移行性评价试验

[0850] 确认实施例1至实施例3所得的抗体-肽缀合物在基因敲入小鼠(KI小鼠)中的脑移行性。

[0851] [实施例7-1]

[0852] 曲妥珠单抗-肽缀合物的使用hTfR-KI小鼠的脑移行性评价试验

[0853] [投予液的制备]

[0854] 曲妥珠单抗投予液:将曲妥珠单抗以生理食盐水稀释成1mg/mL。

[0855] 曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide)投予液:将实施例3-5所合成的曲

妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide) (缀合物编号1)以生理食盐水稀释成1mg/mL。

[0856] 曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide) 授予液:将与实施例3-5同样所合成的曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide) (缀合物编号2)以生理食盐水稀释成1mg/mL。

[0857] [对hTfR-KI小鼠的授予、组织采集]

[0858] 接着,实施使用hTfR-KI小鼠的脑移行性评价试验。对于表达人TfR的hTfR-KI小鼠(雄,13~15周龄),将曲妥珠单抗授予液、曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide)授予液或曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide)授予液以5mg/kg的用量急速授予至尾静脉内(6只/群)。在授予起1、3小时后,从尾静脉进行取血(2只/时间点)。在授予起6、24小时后,以异氟醚麻醉小鼠,从右心室取血后,由左心室灌流生理食盐水4~5分钟,进行放血处理。取血是使用经EDTA·2K处理的注射针及注射筒而进行,所采集的血液在冰上保管,直到分离成血浆。放血处理后,采集脑并分割成左右,左脑为了用于免疫染色而包埋于冷冻包埋剂(OCT化合物,Sakura Finetek),制作冷冻块。为了测量组织中试验物质浓度而采集右脑、心脏、肺、肝、脾、肾、股四头肌,称量后,以液氮急速冷冻,在-70℃以下进行保存。

[0859] [组织提取液的制作]

[0860] 将Protease Inhibitor Cocktail(P8340,Sigma-Aldrich Co.,LLC.)添加混合至RIPA Buffer(富士胶片和光纯药股份有限公司)以成为最终浓度1%,制成Lysis Buffer。在管材中添加金属制珠粒、组织及组织重量的20倍量的Lysis Buffer,使用珠粒破碎机(TIETECH股份有限公司)将组织进行破碎,制成组织破碎液。将组织破碎液进行离心分离(11,000×g,4℃,5分钟),回收上清液作为组织提取液。

[0861] [试液的制备]

[0862] Capture抗体溶液:使用Blocker Casein in PBS将Anti-Human Kappa Light Chain Goat IgG Biotin(100μg/mL,免疫生物研究所股份有限公司)稀释成1μg/mL。

[0863] SULFO标识抗体溶液:使用Blocker Casein in PBS将SULFO-TAG Anti-Human Antibody(Goat)(500μg/mL,Meso Scale Diagnostics,LLC)稀释成1μg/mL。

[0864] 2×Read Buffer T:将适量的MSD Read Buffer T(4×)(Meso Scale Diagnostics,LLC)以等量的注射用水进行稀释。

[0865] [校正曲线试样的制备]

[0866] 将曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide)或曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide)使用空白血浆或组织提取液(未授予个体的血浆或组织提取液)进行稀释,制备浓度0.195~200ng/mL的校正曲线试样。

[0867] [测量试样的制备]

[0868] 以空白组织提取液将各组织提取液适当稀释,制成测量试样。

[0869] [血浆、组织中试验物质浓度测量]

[0870] 在Strept Avidin plate(Meso Scale Diagnostics,LLC)中以150μL/孔添加Blocker Casein in PBS(Thermo Fisher Scientific,Inc.),并以板振荡器(Biosan)振动60分钟(26℃,500rpm),进行封闭处理。将Strept Avidin plate的Blocker Casein in PBS去除,以200μL/各孔添加PBST,进行清洗。在Strept Avidin plate中以25μL/各孔添加Capture抗体溶液,并以板振荡器振动60分钟(26℃,500rpm)。将Capture抗体溶液去除,以

200 μ L/各孔添加PBST,进行清洗。将此清洗操作进行3次。在Strept Avidin plate中以25 μ L/各孔添加校正曲线试样及测量试样,并以板振荡器振动60分钟(26 $^{\circ}$ C,500rpm)。将校正曲线试样及测量试样去除,以200 μ L/各孔添加PBST,进行清洗。将此清洗操作进行3次。在Strept Avidin plate中以25 μ L/各孔添加SULFO标识抗体溶液,并以板振荡器振动60分钟(26 $^{\circ}$ C,500rpm)。将SULFO标识抗体溶液去除,以200 μ L/各孔添加PBST,进行清洗。将此清洗操作进行3次。在Strept Avidin plate中以150 μ L/各孔添加2 \times Read Buffer T,使用读板仪(Sector S600,Meso Scale Diagnostics,LLC)进行测量,算出试样中的各试验物质浓度。

[0871] [血浆中试验物质浓度测量的结果]

[0872] 将血浆中的曲妥珠单抗-肽缀合物浓度测量结果表示于图2-1。在所评价的全部时间点于血浆中检测出曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide)及曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide),呈现直至投予6小时后的较快衰减、投予6小时以后的缓慢衰减这种双相性的血中浓度变化。相较于曲妥珠单抗,曲妥珠单抗-肽缀合物的曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide)及曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide)在全部时间点呈现低值。

[0873] 图2-1是置换附图并表示曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide)(缀合物编号1)及曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide)缀合物(缀合物编号2)的血浆中浓度的图表。

[0874] [组织中试验物质浓度测量的结果]

[0875] 将组织中的曲妥珠单抗-肽缀合物浓度测量结果表示于图2-2。

[0876] 在全部组织中检测出曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide)及曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide)。相较于脑组织中的曲妥珠单抗浓度,曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide)及曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide)浓度呈现较高值。由此表示,曲妥珠单抗-肽缀合物具有脑移行性。

[0877] 图2-2是置换附图并表示曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide)(缀合物编号1)及曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide)缀合物(缀合物编号2)的组织中浓度的图表。

[0878] [实施例7-2]

[0879] 纳武单抗-肽缀合物的使用hTfR-KI小鼠的脑移行性评价试验

[0880] [投予液的制备]

[0881] 纳武单抗投予液:将纳武单抗以生理食盐水稀释成1mg/mL。

[0882] 纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1)投予液:将实施例3-3所合成的纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1)(缀合物编号11)以生理食盐水稀释成1mg/mL。

[0883] [对hTfR-KI小鼠的投予、组织采集]

[0884] 接着,实施使用hTfR-KI小鼠的脑移行性评价试验。对于表达人TfR的hTfR-KI小鼠(雄,15周龄),将纳武单抗投予液或纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1)投予液以5mg/kg的用量急速投予至尾静脉内(6只/群)。在投予起1、3小时后,从尾静脉进行取血(2只/时间点)。在投予起6、24小时后,以异氟醚麻醉小鼠,从右心室取血后,由左心室灌流生理食盐水4~5分钟,进行放血处理。取血是使用经EDTA \cdot 2K处理的注射针及注射筒而进行,所采集的血液在

冰上保管,直到分离成血浆。放血处理后,采集脑并分割成左右,左脑为了用于免疫染色而包埋于冷冻包埋剂(OCT化合物,Sakura Finetek),制作冷冻块。为了测量组织中试验物质浓度而采集右脑、心脏、肺、肝、脾、肾、股四头肌,称量后,以液氮急速冷冻,在-70℃以下进行保存。

[0885] [组织提取液的制作]

[0886] 将Protease Inhibitor Cocktail (P8340,Sigma-Aldrich Co.,LLC.)添加混合至RIPA Buffer(富士胶片和光纯药股份有限公司)以成为最终浓度1%,制成Lysis Buffer。在管材中添加金属制珠粒、组织及组织重量的20倍量的Lysis Buffer,使用珠粒破碎机(TIETECH股份有限公司)将组织进行破碎,制成组织破碎液。将组织破碎液进行离心分离(11,000×g,4℃,5分钟),回收上清液作为组织提取液。

[0887] [试液的制备]

[0888] Capture抗体溶液:使用Blocker Casein in PBS将Anti-Human Kappa Light Chain Goat IgG Biotin(100μg/mL,免疫生物研究所股份有限公司)稀释成1μg/mL。

[0889] SULFO标识抗体溶液:使用Blocker Casein in PBS将SULFO-TAG Anti-Human Antibody(Goat)(500μg/mL,Meso Scale Diagnostics,LLC)稀释成1μg/mL。

[0890] 2×Read Buffer T:将适量的MSD Read Buffer T(4×)(Meso Scale Diagnostics,LLC)以等量的注射用水进行稀释。

[0891] [校正曲线试样的制备]

[0892] 作为对照组,将纳武单抗或纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Mal)(缀合物编号11)使用空白血浆或组织提取液(未投予个体的血浆或组织提取液)进行稀释,制备浓度0.195~200ng/mL的校正曲线试样。

[0893] [测量试样的制备]

[0894] 以空白组织提取液将各组织提取液适当稀释,制成测量试样。

[0895] [血浆、组织中试验物质浓度测量]

[0896] 在Strept Avidin plate(Meso Scale Diagnostics,LLC)中以150μL/孔添加Blocker Casein in PBS(Thermo Fisher Scientific,Inc.),并以板振荡器(Biosan)振动60分钟(26℃,500rpm),进行封闭处理。将Strept Avidin plate的Blocker Casein in PBS去除,以200μL/各孔添加PBST,进行清洗。在Strept Avidin plate中以25μL/各孔添加Capture抗体溶液,并以板振荡器振动60分钟(26℃,500rpm)。将Capture抗体溶液去除,以200μL/各孔添加PBST,进行清洗。将此清洗操作进行3次。在Strept Avidin plate中以25μL/各孔添加校正曲线试样及测量试样,并以板振荡器振动60分钟(26℃,500rpm)。将校正曲线试样及测量试样去除,以200μL/各孔添加PBST,进行清洗。将此清洗操作进行3次。在Strept Avidin plate中以25μL/各孔添加SULFO标识抗体溶液,并以板振荡器振动60分钟(26℃,500rpm)。将SULFO标识抗体溶液去除,以200μL/各孔添加PBST,进行清洗。将此清洗操作进行3次。在Strept Avidin plate中以150μL/各孔添加2×Read Buffer T,使用读板仪(Sector S600,Meso Scale Diagnostics,LLC)进行测量,算出试样中的各试验物质浓度。

[0897] [血浆中试验物质浓度测量的结果]

[0898] 将血浆中的纳武单抗-肽缀合物浓度测量结果表示于图2-3。在所评价的全部时间

点于血浆中检测出纳武单抗及纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1),呈现直至投予6小时后的较快衰减、投予6小时以后的缓慢衰减这种双相性的血中浓度变化。相较于纳武单抗,纳武单抗-肽缀合物的纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1)在全部时间点呈现低值。

[0899] 图2-3是置换附图并表示纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1)缀合物(缀合物编号11)的血浆中浓度的图表。

[0900] [组织中试验物质浓度测量的结果]

[0901] 将组织中的纳武单抗-肽缀合物浓度测量结果表示于图2-4。在全部组织中检测出纳武单抗、纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1)缀合物。相较于脑组织中的纳武单抗浓度,纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1)缀合物的浓度呈现较高值。由此表示,纳武单抗-肽缀合物具有脑移行性。

[0902] 图2-4是置换附图并表示纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1)缀合物(缀合物编号11)的组织中浓度的图表。

[0903] [实施例7-3]

[0904] [组织中曲妥珠单抗的免疫染色]

[0905] 使用低温恒温器(Leica Microsystems股份有限公司),由实施例7-1所制成的各个体的脑冷冻块制作厚度7 μ m的切片,贴附于已完成抗剥离处理的载玻片(松浪硝子工业股份有限公司)。风干后,浸渍于4%Paraformaldehyde(富士胶片和光纯药股份有限公司)5分钟,将组织切片固定。以PBST清洗后(3分钟,3次),将切片浸渍于0.3%H₂O₂/MeOH 20分钟,将已进行内源性过氧化酶的封闭的切片以PBST清洗后(3分钟,3次),将SuperBlock Blocking Buffer in PBS滴至切片,在室温下进行100分钟的封闭处理。将切片以PBST清洗后(3分钟,3次),滴下以CanGet Signal Immunostain solution A(东洋纺股份有限公司)适当稀释的HRP标识抗人IgG抗体(A80-219P,Bethyl Laboratories,Inc.),在室温下处理120分钟。将切片以PBST清洗后(3分钟,3次),遵循随附文件,利用TSA-Plus Fluorescein System(PerkinElmer,Inc.)实施增感处理。将切片以PBST清洗后(3分钟,3次),将Anti-Fluorescein-HRP(Dako)滴至切片,在室温下处理15分钟。将切片以PBST清洗后(3分钟,3次),将遵循随附文件所制备的DAB基质溶液(Dako)滴至切片,进行处理直到适当发色。将切片以流水清洗,并以Mayer's Hematoxylin染色液(富士胶片和光纯药股份有限公司)进行对比染色。将切片以流水清洗,并通过乙醇上升系列及二甲苯进行脱水、净化,将Eukitt(ORSAtec GmbH aka Kindler GmbH)作为封片剂滴至切片,以盖玻片覆盖而制成组织标本。

[0906] [组织中纳武单抗的免疫染色]

[0907] 使用低温恒温器(Leica Microsystems股份有限公司),由实施例7-2所制成的各个体的脑冷冻块制作厚度7 μ m的切片,贴附于已完成抗剥离处理的载玻片(松浪硝子工业股份有限公司)。风干后,浸渍于4%Paraformaldehyde(富士胶片和光纯药股份有限公司)5分钟,将组织切片固定。以PBST清洗后(3分钟,3次),将切片浸渍于0.3%H₂O₂/MeOH 20分钟,将已进行内源性过氧化酶的封闭的切片以PBST清洗后(3分钟,3次),将SuperBlock Blocking Buffer in PBS滴至切片,在室温下进行100分钟的封闭处理。将切片以PBST清洗后(3分钟,3次),894_3m_G4S2_K(Ma1)-纳武单抗缀合物(缀合物编号11)的情形滴下以CanGet Signal Immunostain solution A(东洋纺股份有限公司)适当稀释的抗人IgG抗体,894_3m_GGRGRS_K(Ma1)-纳武单抗(缀合物编号43)的情形滴下以CanGet Signal

Immunostain solution A(东洋纺股份有限公司)适当稀释的抗纳武单抗抗体(A01931-40、Genscript Biotech Corporation),以4℃静置一晚。将切片以PBST进行清洗(3分钟,3次),将以CanGet Signal Immunostain solution A稀释20倍的CSAII Rabbit Link(Dako)滴至切片,在室温下处理30分钟。将切片以PBST清洗后(3分钟,3次),遵循随附文件,利用TSA-Plus Fluorescein System(PerkinElmer, Inc.)实施增感处理。将切片以PBST清洗后(3分钟,3次),将Anti-Fluorescein-HRP(Dako)滴至切片,在室温下处理15分钟。将切片以PBST清洗后(3分钟,3次),将遵循随附文件所制备的DAB基质溶液(Dako)滴至切片,进行处理直到适当发色。将切片以流水清洗,并以Mayer's Hematoxylin染色液(富士胶片和光纯药股份有限公司)进行对比染色。将切片以流水清洗,并通过乙醇上升系列及二甲苯进行脱水、净化,将Eukitt(ORSatec GmbH aka Kindler GmbH)作为封片剂滴至切片,以盖玻片覆盖而制成组织标本。

[0908] [免疫染色的结果]

[0909] 结果1将曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide)(缀合物编号1)及曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide)(缀合物编号2)的处理6小时后的小脑中的免疫染色结果表示于图3-1。此外,下图是将上图的方框部分放大的图。由此结果表示,hTfR_000894_PEG11/36_K(Maleimide)-曲妥珠单抗缀合物具有脑内移行性。

[0910] 图3-1是置换附图并表示曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11/36_K(Maleimide)(缀合物编号1/2)小脑6小时的照片。图3-1中,

[0911] a-1仅为曲妥珠单抗,

[0912] b-1为曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG11_K(Maleimide),

[0913] c-1表示曲妥珠单抗-hTfR_000894_PEG36_K(Maleimide)。下图是上图的局部放大图。

[0914] 结果2将纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1)(缀合物编号11)的处理6小时后的小脑中的免疫染色结果表示于图3-2。此外,下图是将上图的方框部分放大的图。由此结果表示,纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1)缀合物具有脑内移行性。

[0915] 图3-2是置换附图并表示纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1)(缀合物编号11)小脑6小时的照片。图3-2中,

[0916] a-2仅为纳武单抗,

[0917] b-2为纳武单抗-894_3m_G4S2_K(Ma1)。下图是上图的局部放大图。

[0918] 结果3将纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K(Ma1)(缀合物编号43)的处理6小时后的小脑中的免疫染色结果表示于图3-3,将24小时后的结果表示于图3-4。此外,下图是将上图的方框部分放大的图。由此结果表示,纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K(Ma1)缀合物具有脑内移行性。

[0919] 图3-3是置换附图并表示纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K(Ma1)(缀合物编号43)小脑6小时的照片。图3-3中,

[0920] a-3仅为纳武单抗,

[0921] b-3为纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K(Ma1)。下图是上图的局部放大图。

[0922] 图3-4是置换附图并表示纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K(Ma1)(缀合物编号43)小脑24小时的照片。图3-4中,

[0923] a-4仅为纳武单抗,

[0924] b-4为纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K (Ma1)。下图是上图的局部放大图。

[0925] 结果4将纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K (Ma1) (缀合物编号43) 的处理6小时后的海马体中的免疫染色结果表示于图3-5, 将24小时后的结果表示于图3-6。此外, 下图是将上图的方框部分放大的图。由此结果表示, 纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K (Ma1) 缀合物对海马体也具有移行能力。

[0926] 图3-5是置换附图并表示纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K (Ma1) (缀合物编号43) 海马体6小时的照片。图3-5中,

[0927] a-5仅为纳武单抗,

[0928] b-5为纳武单抗-894_3m_GGRGRS_K (Ma1)。下图是上图的局部放大图。

[0929] 图3-6是置换附图并表示894_3m_GGRGRS_K (Ma1) - 纳武单抗 (缀合物编号43) 海马体24小时的照片。图3-6中,

[0930] a-6仅为纳武单抗,

[0931] b-6为894_3m_GGRGRS_K (Ma1) - 纳武单抗。

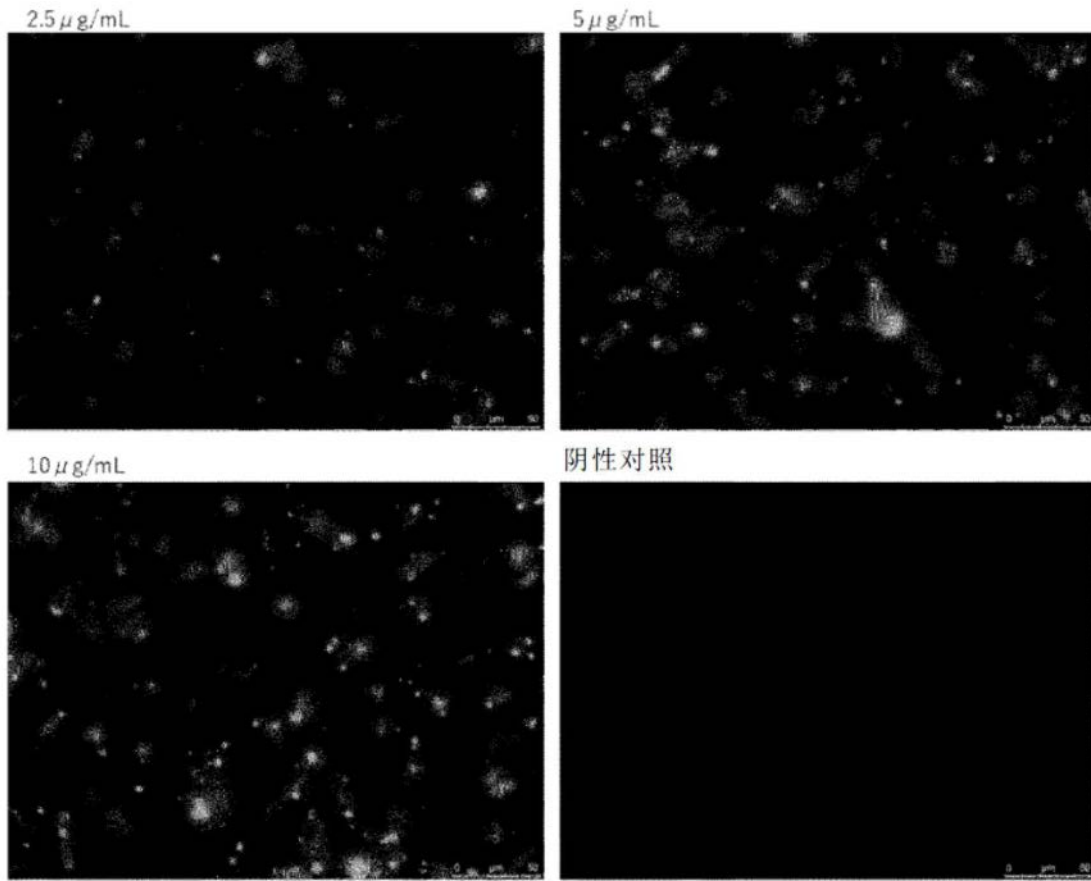


图1-1

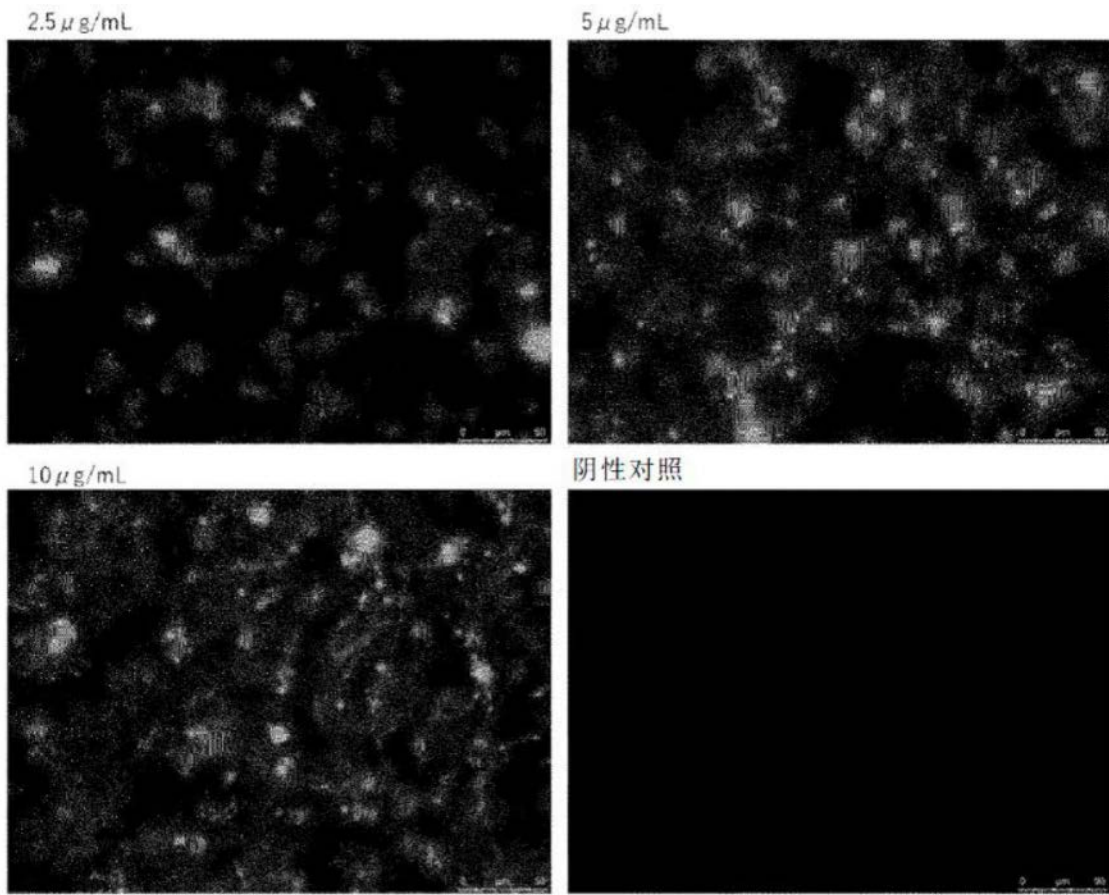


图1-2

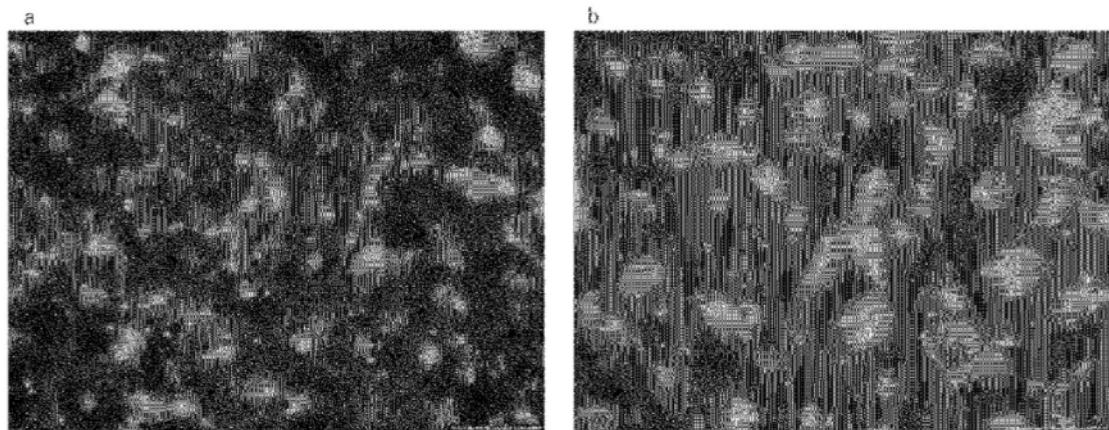


图1-3

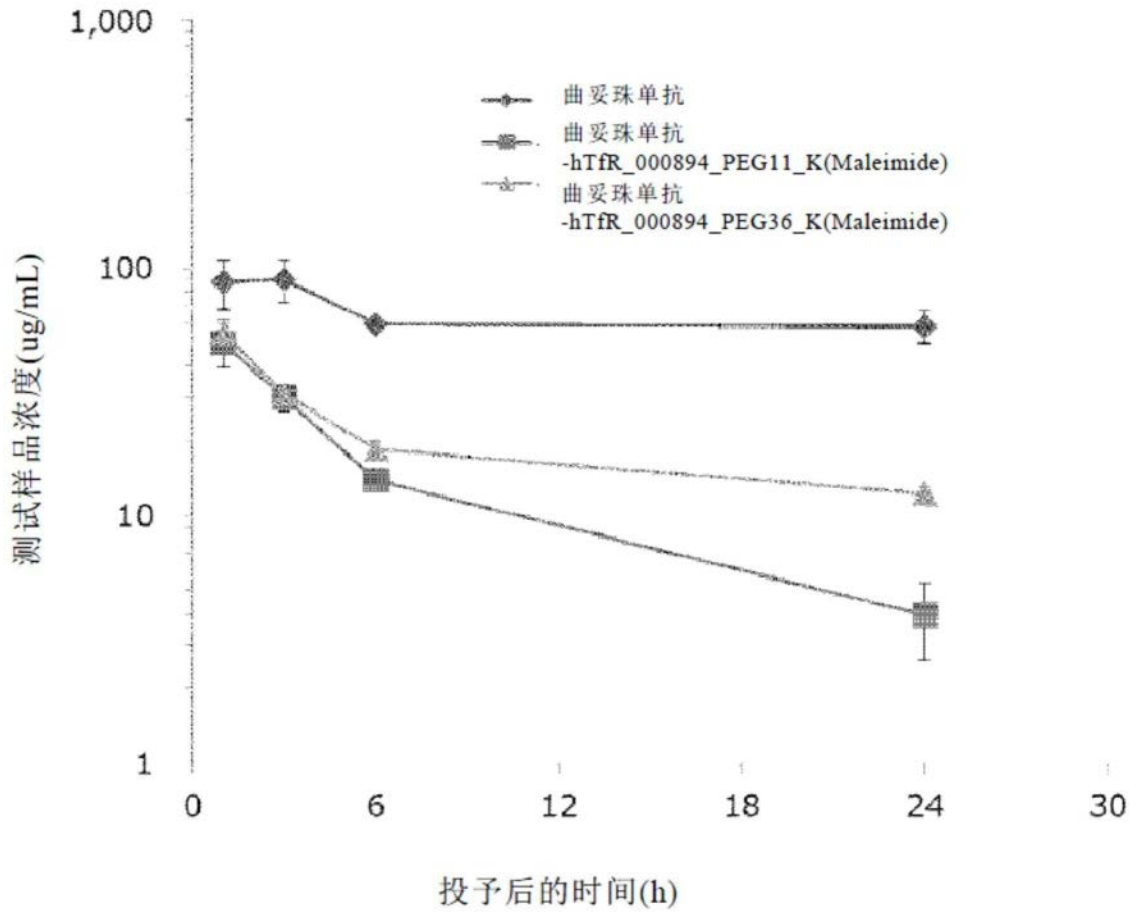


图2-1

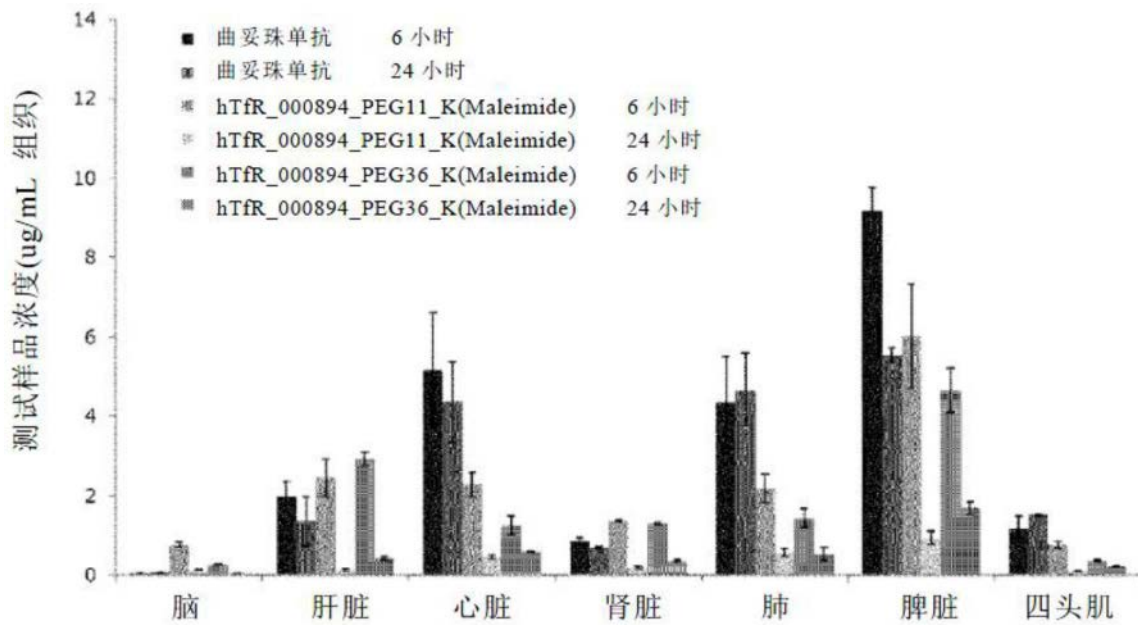


图2-2

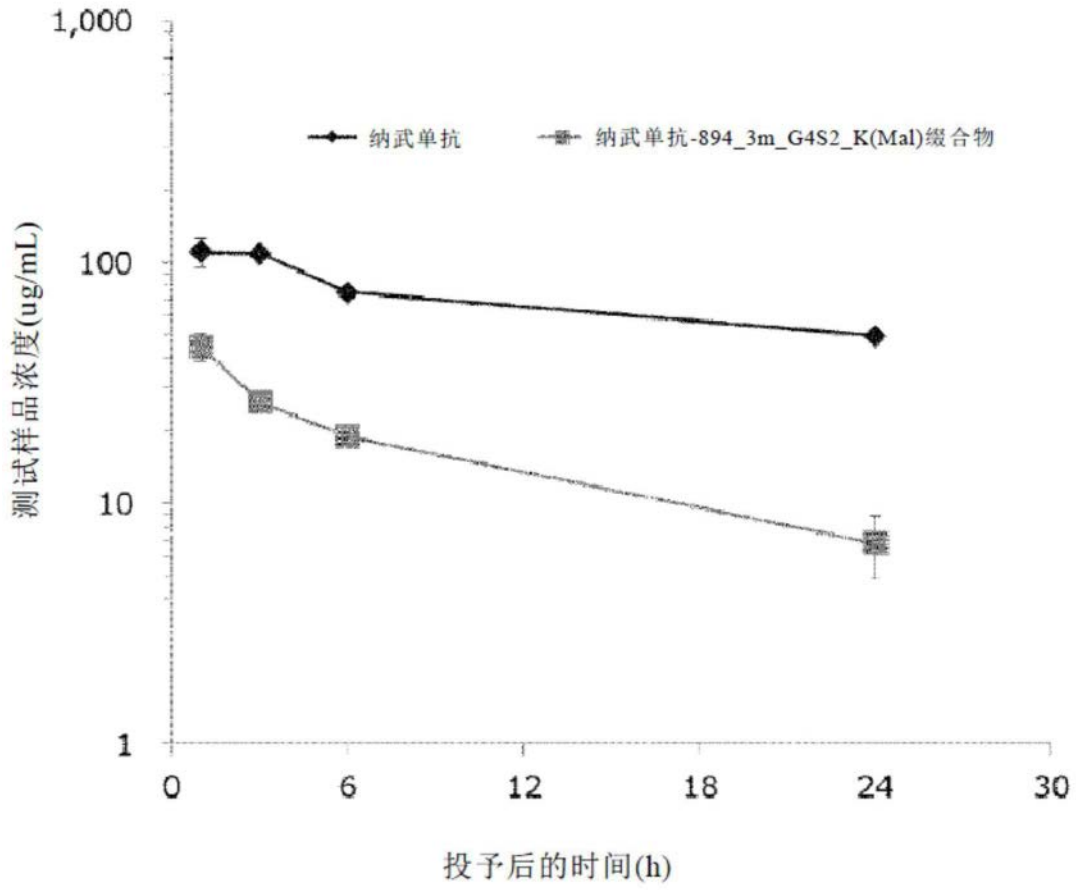


图2-3

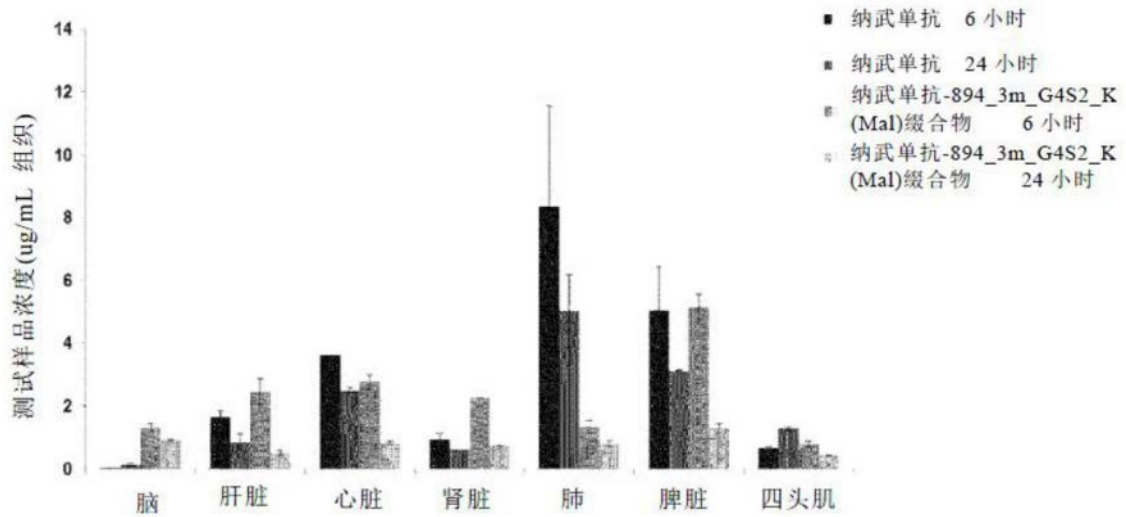


图2-4

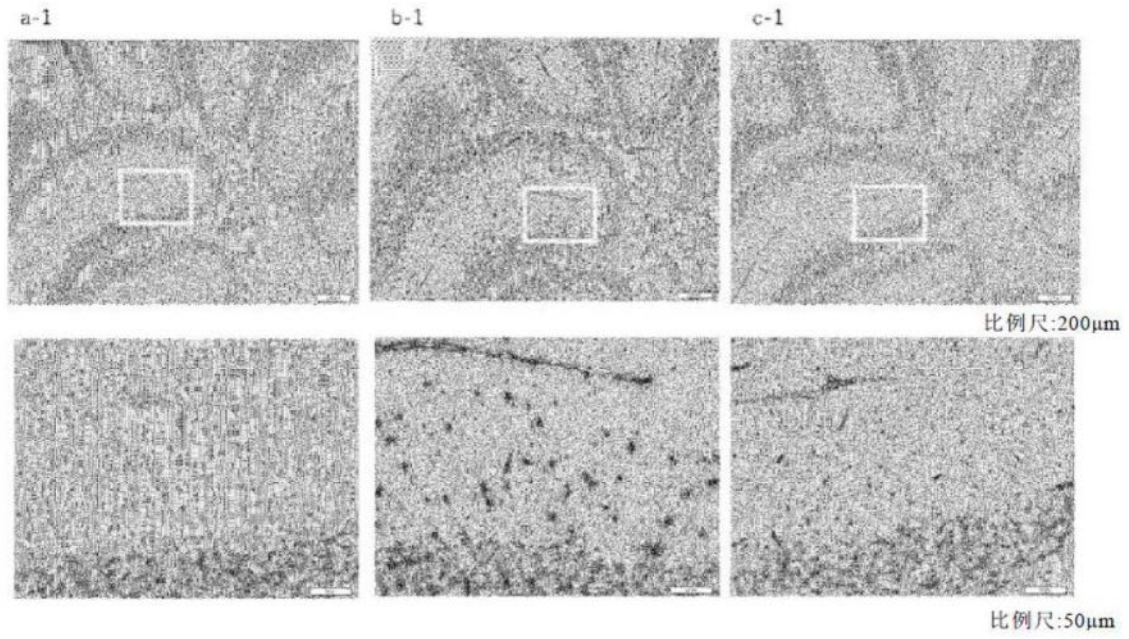


图3-1

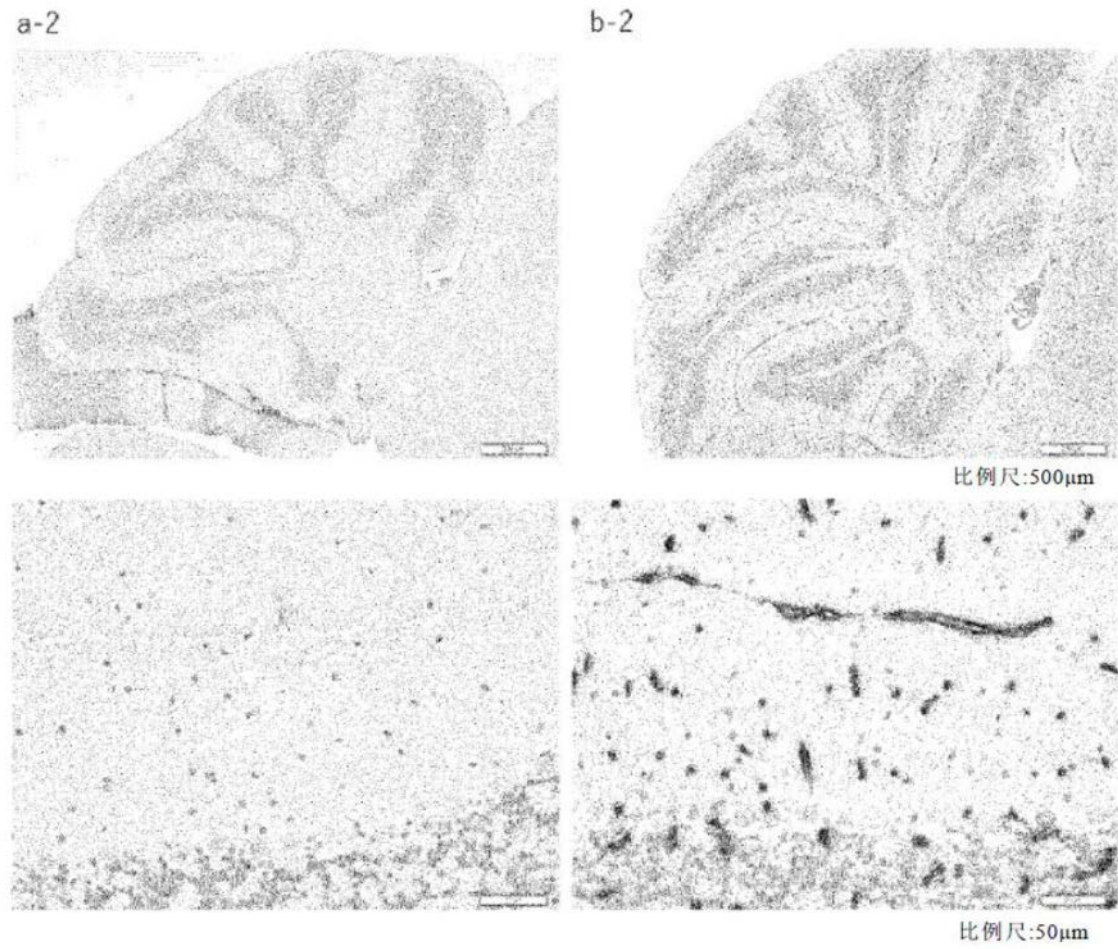


图3-2

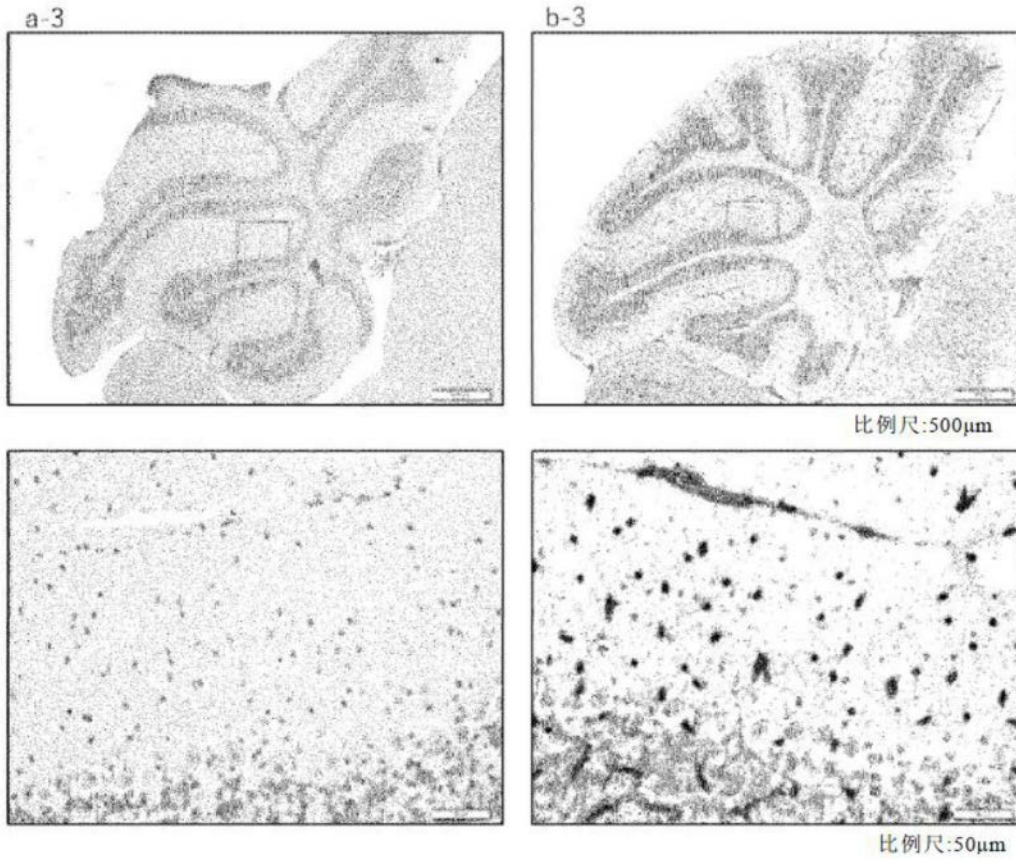


图3-3

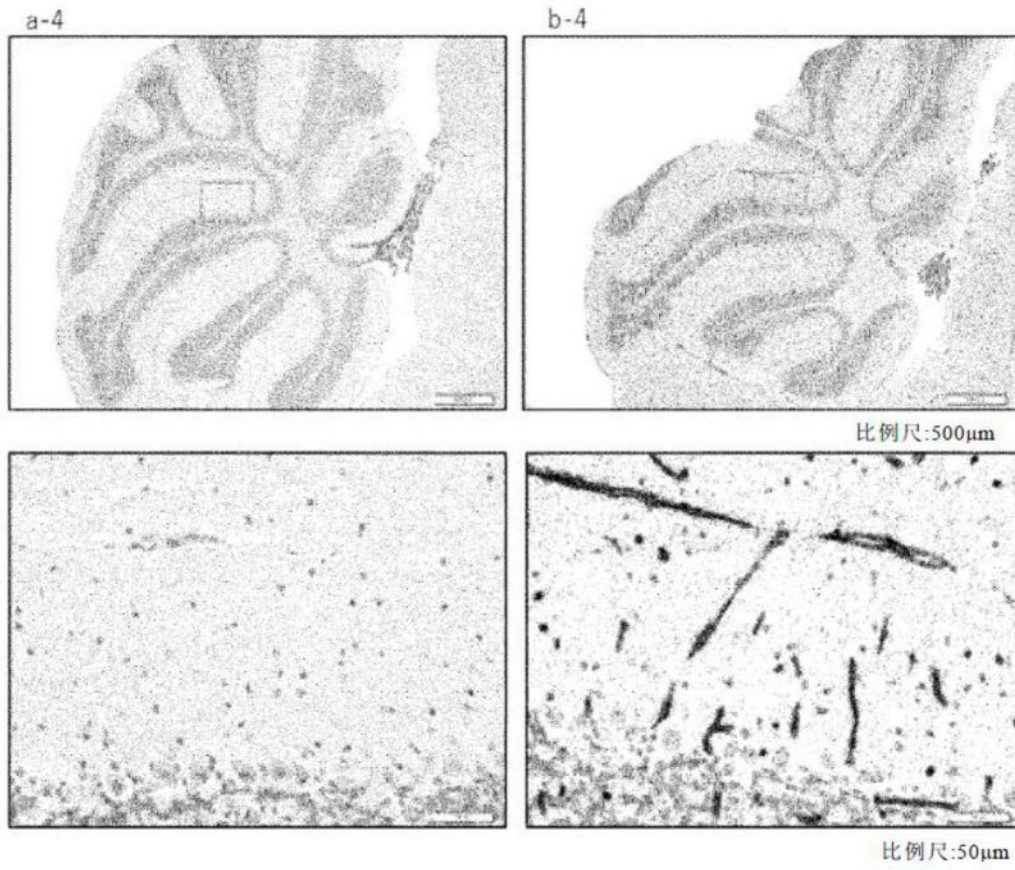


图3-4

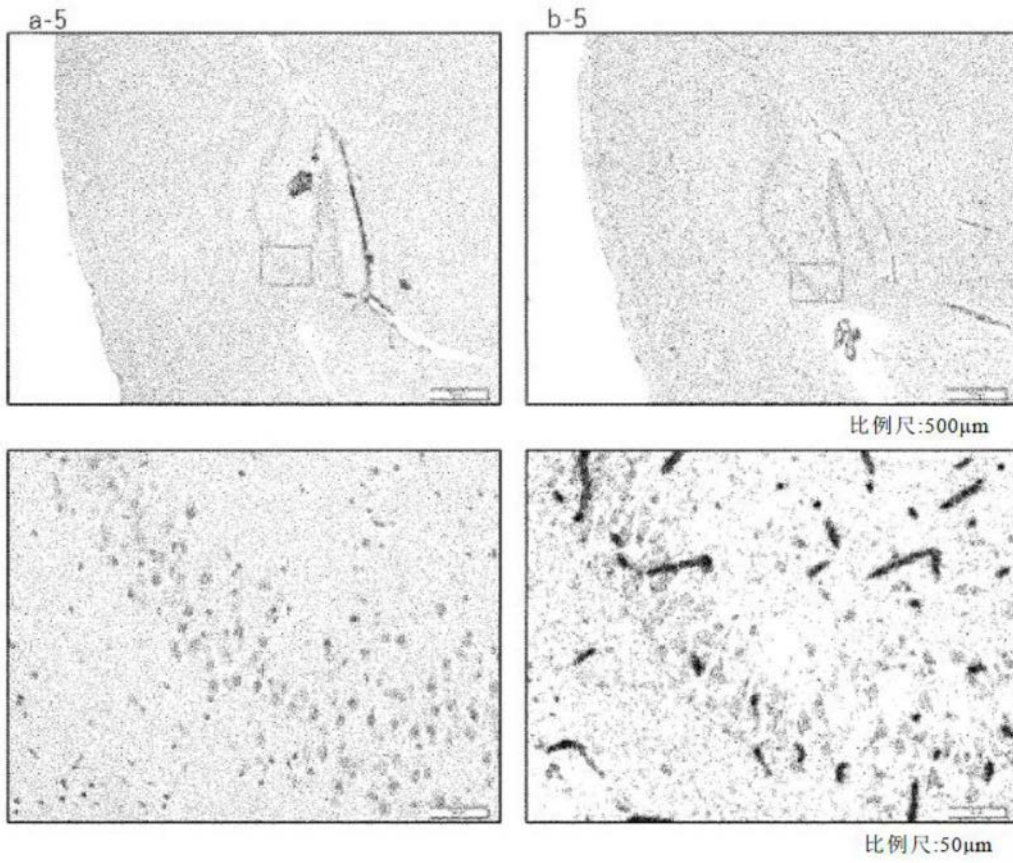


图3-5

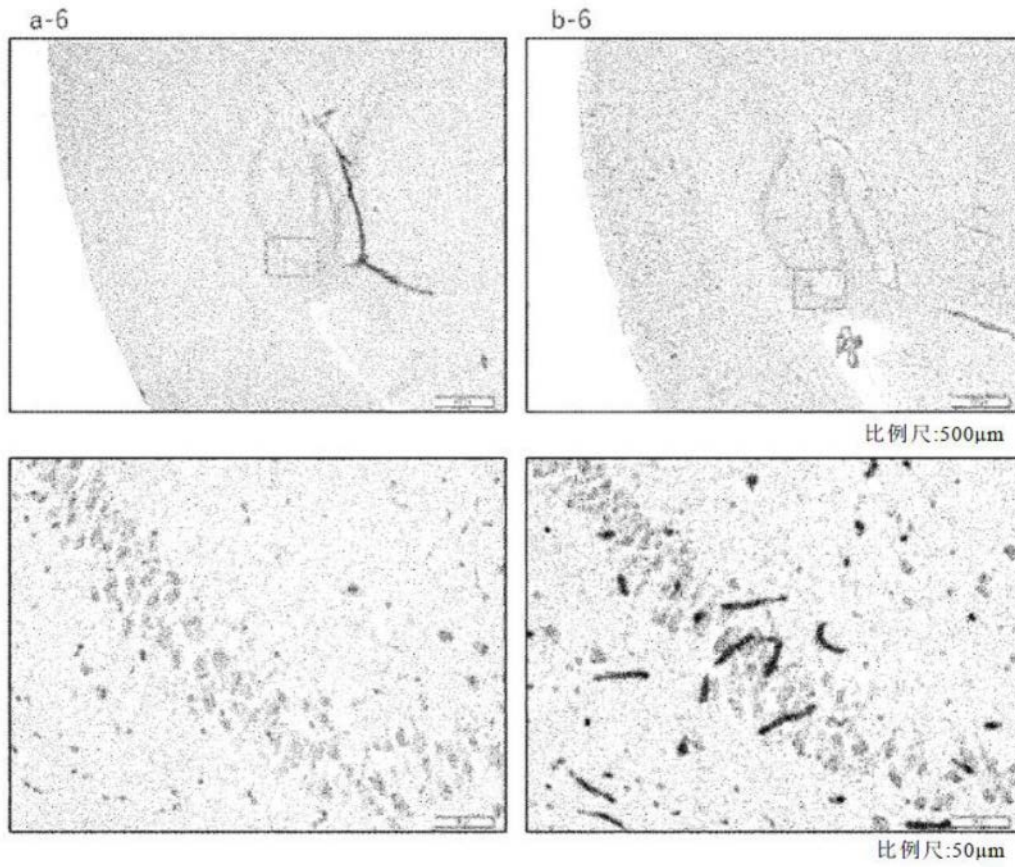


图3-6