



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119301142 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 10

(21) 申请号 202380044176.4

(22) 申请日 2023.06.02

(30) 优先权数据  
2022-090443 2022.06.02 JP  
2022-141780 2022.09.06 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2024.11.29

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2023/020712 2023.06.02

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02023/234416 JA 2023.12.07

(71) 申请人 味之素株式会社  
地址 日本东京都中央区京桥一丁目15-1

(72) 发明人 松田丰 藤井友博 伊藤健一郎  
高桥一敏 松田吉彦 山口浩辉  
津吉直子 长野隼人 高杉梨花

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001  
专利代理师 李志强 王伦伟

(51) Int. Cl.  
C07K 14/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 47/55 (2006.01)  
A61K 47/64 (2006.01)  
A61K 47/68 (2006.01)  
A61K 49/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 43/00 (2006.01)  
C07K 16/00 (2006.01)  
C07K 19/00 (2006.01)  
C12N 1/15 (2006.01)  
C12N 1/19 (2006.01)  
C12N 1/21 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)  
C12N 15/11 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01)  
C12N 15/63 (2006.01)

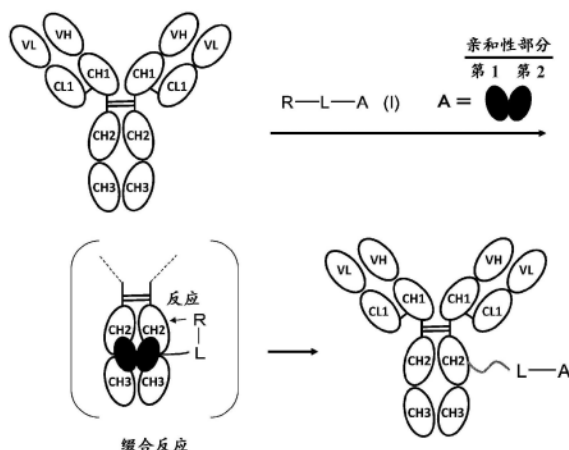
权利要求书22页 说明书150页  
序列表(电子公布) 附图40页

(54) 发明名称

亲和性物质、化合物、抗体和它们的盐

(57) 摘要

本发明涉及一种容易地仅对抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的一个重链进行化学修饰的技术。更具体而言,本发明涉及一种化合物或其盐,其包含:(A)包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、和(B)抗体反应性基团。



1. 化合物或其盐,其包含:(A) 包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、和(B) 抗体反应性基团。

2. 权利要求1所述的化合物或其盐,其中,恒定区为Fc区。

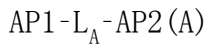
3. 权利要求1所述的化合物或其盐,其中,恒定区为CH2结构域。

4. 权利要求1所述的化合物或其盐,其中,恒定区为人恒定区。

5. 权利要求1所述的化合物或其盐,其中,抗体为IgG。

6. 权利要求1所述的化合物或其盐,其中,第1亲和性部分和第2亲和性部分为不同的亲和性部分。

7. 权利要求1所述的化合物或其盐,其中,亲和性物质由下述式(A)表示:



式中,

AP1表示对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性肽,

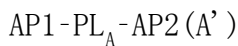
AP2表示对抗体重链的恒定区具有亲和性的第2亲和性肽,

$L_A$ 表示接头。

8. 权利要求7所述的化合物或其盐,其中,亲和性物质:(i) (i-1) 仅包含1个特定的反应性基团,并且(ii-2) 经由所述特定的反应性基团与抗体反应性基团连接。

9. 权利要求1所述的化合物或其盐,其中,亲和性物质为包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性肽和第2亲和性肽的亲和性多肽。

10. 权利要求9所述的化合物或其盐,其中,亲和性多肽由下述式(A')表示:



式中,

AP1表示对抗体重链的恒定区具有亲和性、且存在于亲和性多肽的N末端侧的第1亲和性肽,

AP2表示对抗体重链的恒定区具有亲和性、且存在于亲和性多肽的C末端侧的第2亲和性肽,

$PL_A$ 表示肽接头。

11. 权利要求10所述的化合物或其盐,其中,亲和性多肽:(i) (i-1) 仅包含1个在侧链具有氨基的氨基酸残基,并且(ii-2) 经由所述氨基与抗体反应性基团连接;或(ii) 经由第1亲和性肽中的N末端氨基与抗体反应性基团连接。

12. 权利要求11所述的化合物或其盐,其中,在侧链具有氨基的氨基酸残基为赖氨酸残基。

13. 权利要求10所述的化合物或其盐,其中,亲和性多肽在N末端进一步包含由Gln-Glu-Thr(QET)构成的三肽。

14. 权利要求10所述的化合物或其盐,其中,肽接头具有由20个以上的氨基酸残基构成的长度。

15. 权利要求1所述的化合物或其盐,其中,第1亲和性肽和第2亲和性肽的一者为对抗体重链的恒定区具有亲和性、且具有1个赖氨酸残基的亲和性肽,并且

第1亲和性肽和第2亲和性肽的另一者为对抗体重链的恒定区具有亲和性、且不具有赖氨酸残基的亲和性肽。

16. 权利要求15所述的化合物或其盐,其中,对抗体重链的恒定区具有亲和性、且具有1个赖氨酸残基的亲中性肽为下述(1)~(4)中的任一种:

(1) 包含RGNCAYHKGQIIWCTYH(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列(Fc3K)的亲中性肽;

(2) 包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲中性肽:在RGNCAYHKGQIIWCTYH(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列中,赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列;

(3) 包含FNKQCRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列(Z34CK)的亲中性肽;以及

(4) 包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲中性肽:在FNKQCRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列中,赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列,

在此,所述氨基酸序列中含有的2个半胱氨酸残基可通过二硫键交联;以及/或者

对抗体重链的恒定区具有亲和性、且不具有赖氨酸残基的亲中性肽为下述(5)~(10)中的任一种:

(5) 包含FNMQCRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC(SEQ ID NO:40)的氨基酸序列(Z34CM)的亲中性肽;

(6) 包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲中性肽:在FNMQCRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC(SEQ ID NO:40)的氨基酸序列中,半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列;

(7) 包含FNREQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPSQ SANLLAEA(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列(ProAR)的亲中性肽;

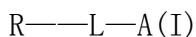
(8) 包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲中性肽:在FNREQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA(SEQ ID NO:41)的氨基酸序列中,半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列;

(9) 包含RGNCAYHRGQIIWCTYH(SEQ ID NO:78)的氨基酸序列的亲中性肽;以及

(10) 包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲中性肽:在RGNCAYHRGQIIWCTYH(SEQ ID NO:78)的氨基酸序列中,半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列,

在此,所述氨基酸序列中含有的2个半胱氨酸残基可通过二硫键交联。

17. 权利要求1所述的化合物或其盐,其中,化合物由下述式(I)表示:



式中,

R表示所述反应性基团,

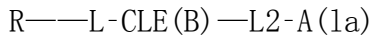
L表示接头,

A表示所述亲和性物质。

18. 权利要求1所述的化合物或其盐,其中,化合物或其盐在(i)所述亲和性物质与(ii)所述反应性基团之间进一步包含(iii)切割性部分。

19. 权利要求18所述的化合物或其盐,其中,切割性部分为可通过切割在所述反应性基团侧生成生物正交性官能团的切割性部分。

20. 权利要求19所述的化合物或其盐,其中,化合物由下述式(Ia)表示:



式中,

R表示所述反应性基团,

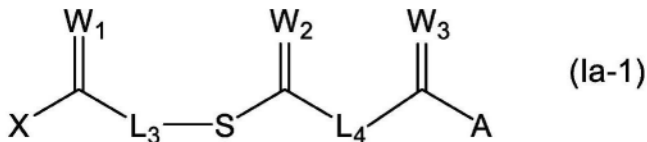
$L_1$ 表示第1接头,

$L_2$ 表示第2接头,

CLE(B)表示可通过切割在所述反应性基团侧生成生物正交性官能团的切割性部分,

A表示所述亲和性物质。

21. 权利要求19所述的化合物或其盐,其中,化合物由下述式(Ia-1)表示:



式中,

X表示离去基团,

$W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

$L_3$ 表示第3接头,

$L_4$ 表示第4接头,

S表示硫原子,

A表示所述亲和性物质。

22. 权利要求21所述的化合物或其盐,其中,离去基团选自下述基团:

(a)  $R_A-S$ ,在此, $R_A$ 表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基,S表示硫原子;

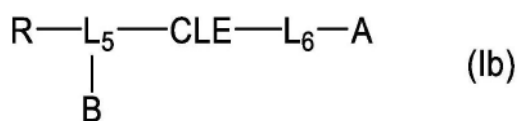
(b)  $R_A-O$ ,在此, $R_A$ 表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基,O表示氧原子;

(c)  $R_A-(R_B^-)N$ ,在此, $R_A$ 和 $R_B$ 分别独立地表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基,N表示氮原子;或

(d) 卤素原子。

23. 权利要求1所述的化合物或其盐,其中,化合物或其盐在(ii)所述反应性基团与(iii)切割性部分之间进一步包含(iv)生物正交性官能团。

24. 权利要求23所述的化合物或其盐,其中,化合物由下述式(Ib)表示:

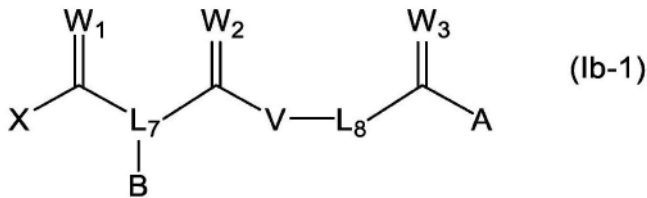


式中,

R表示所述反应性基团,

L<sub>5</sub>表示第5接头,  
 L<sub>6</sub>表示第6接头,  
 B表示包含生物正交性官能团的基团,  
 CLE表示切割性部分,  
 A表示所述亲和性物质。

25. 权利要求23所述的化合物或其盐,其中,化合物由下述式(Ib-1)表示:



式中,  
 X表示离去基团,  
 W<sub>1</sub>、W<sub>2</sub>和W<sub>3</sub>分别独立地表示氧原子或硫原子,  
 L<sub>7</sub>表示第7接头,  
 L<sub>8</sub>表示第8接头,  
 B表示包含生物正交性官能团的基团,  
 V表示氧原子或硫原子,  
 A表示所述亲和性物质。

26. 权利要求23所述的化合物或其盐,其中,生物正交性官能团为叠氮残基、炔烃残基、四嗪残基、烯炔残基、硫醇残基、马来酰亚胺残基、硫醇残基、呋喃残基或卤代羰基残基。

27. 抗体衍生用试剂,其包含权利要求1~26中任一项所述的化合物或其盐。

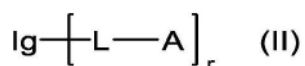
28. 亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,亲和性物质包含在抗体重链的恒定区中,所述亲和性物质包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分。

29. 权利要求28所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其包含:(a) 包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b) 所述亲和性物质,并且(c) 所述亲和性物质仅引入至所述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中。

30. 权利要求29所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述亲和性物质经由存在于所述一个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,仅引入至所述一个重链的恒定区中。

31. 权利要求30所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述一个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

32. 权利要求28所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,亲和性物质修饰的抗体包含下述式(II)所表示的结构单元:



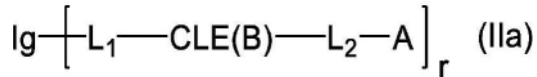
式中,  
 Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,  
 L表示接头,  
 A表示所述亲和性物质,

所述亲和性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

33. 权利要求28所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述抗体或其盐在(i')所述亲和性物质与(ii')所述抗体之间进一步包含(iii')切割性部分。

34. 权利要求33所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,切割性部分为可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成生物正交性官能团的切割性部分。

35. 权利要求34所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,亲和性物质修饰的抗体包含下述式(IIa)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

L<sub>1</sub>表示第1接头,

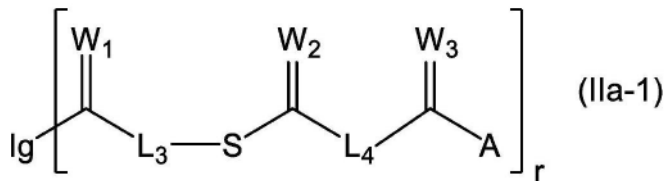
L<sub>2</sub>表示第2接头,

CLE(B)表示可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成生物正交性官能团的切割性部分,

A表示所述亲和性物质,

所述亲和性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

36. 权利要求34所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,亲和性物质修饰的抗体包含下述式(IIa-1)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

W<sub>1</sub>、W<sub>2</sub>和W<sub>3</sub>分别独立地表示氧原子或硫原子,

L<sub>3</sub>表示第3接头,

L<sub>4</sub>表示第4接头,

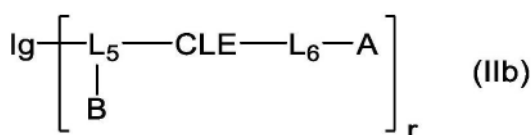
S表示硫原子,

A表示所述亲和性物质,

所述亲和性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

37. 权利要求33所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述抗体或其盐在(ii')所述抗体与(iii')切割性部分之间进一步包含(iv')生物正交性官能团。

38. 权利要求37所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,亲和性物质修饰的抗体包含下述式(IIb)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元，

L<sub>5</sub>表示第5接头，

L<sub>6</sub>表示第6接头，

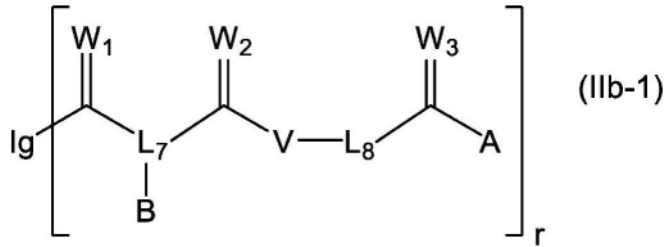
B表示包含生物正交性官能团的基团，

CLE表示切割性部分，

A表示所述亲和性物质，

所述亲和性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

39. 权利要求37所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，亲和性物质修饰的抗体包含下述式(IIb-1)所表示的结构单元：



式中，

Ig表示所述免疫球蛋白单元，

W<sub>1</sub>、W<sub>2</sub>和W<sub>3</sub>分别独立地表示氧原子或硫原子，

L<sub>7</sub>表示第7接头，

L<sub>8</sub>表示第8接头，

B表示包含生物正交性官能团的基团，

V表示氧原子或硫原子，

A表示所述亲和性物质，

所述亲和性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

40. 权利要求28所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，亲和性物质修饰的抗体进一步包含追加修饰部分。

41. 权利要求40所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，追加修饰部分为包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第3亲和性部分的追加亲和性物质，所述追加亲和性物质包含在抗体重链的恒定区中。

42. 权利要求41所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，所述追加亲和性物质经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰，引入至所述2个重链的恒定区中。

43. 权利要求42所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，所述2个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

44. 亲和性物质修饰的抗体或其盐的制造方法，其包括：使化合物或其盐与包含免疫球蛋白单元的抗体反应，生成在所述免疫球蛋白单元的重链的恒定区中包含所述亲和性物质的亲和性物质修饰的抗体或其盐，所述化合物或其盐包含：(A) 包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、和(B) 抗体反应性基团，所述免疫球蛋白单元包含2个重链和根据需要的2个轻链。

45. 权利要求44所述的方法,其中,化合物或其盐在(i)所述亲和性物质与(ii)所述反应性基团之间进一步包含(iii)切割性部分。

46. 权利要求45所述的方法,其中,切割性部分为可通过切割在所述反应性基团侧生成生物正交性官能团的切割性部分。

47. 权利要求44所述的方法,其中,化合物或其盐在(ii)所述反应性基团与(iii)切割性部分之间进一步包含(iv)生物正交性官能团。

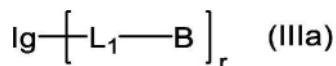
48. 权利要求44所述的方法,其中,亲和性物质修饰的抗体或其盐为权利要求29~43中任一项所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐。

49. 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐,其包含:(a)包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b)生物正交性官能团,并且(c)生物正交性官能团仅引入至所述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中。

50. 权利要求49所述的抗体衍生物或其盐,其中,生物正交性官能团经由存在于所述一个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,仅引入至所述一个重链的恒定区中。

51. 权利要求50所述的抗体衍生物或其盐,其中,所述一个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

52. 权利要求49所述的抗体衍生物或其盐,其中,包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐包含下述式(IIIa)所表示的结构单元:



式中,

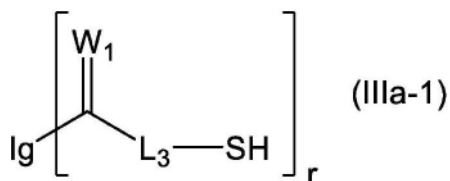
Ig表示所述免疫球蛋白单元,

$\text{L}_1$ 表示第1接头,

B表示包含生物正交性官能团的基团,

生物正交性官能团对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

53. 权利要求49所述的抗体衍生物或其盐,其中,包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐包含下述式(IIIa-1)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

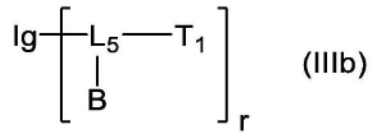
$\text{W}_1$ 表示氧原子或硫原子,

$\text{L}_3$ 表示第3接头,

SH表示硫醇基,

生物正交性官能团对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

54. 权利要求49所述的抗体衍生物或其盐,其中,包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐包含下述式(IIIb)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

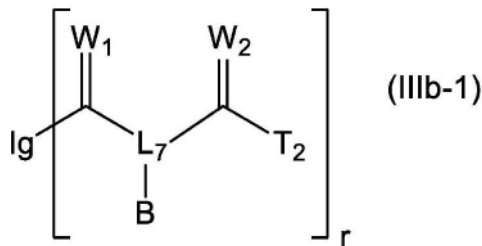
L<sub>5</sub>表示第5接头,

B表示包含生物正交性官能团的基团,

T<sub>1</sub>表示1价基团,

生物正交性官能团对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

55. 权利要求49所述的抗体衍生物或其盐,其中,包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐包含下述式(IIIb-1)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

W<sub>1</sub>和W<sub>2</sub>分别独立地表示氧原子或硫原子,

L<sub>7</sub>表示第7接头,

B表示包含生物正交性官能团的基团,

T<sub>2</sub>表示1价基团,

生物正交性官能团对所述免疫球蛋白单元的修饰百分率r为65~135%。

56. 权利要求49所述的抗体衍生物或其盐,其中,抗体衍生物进一步包含追加修饰部分。

57. 权利要求56所述的抗体衍生物或其盐,其中,追加修饰部分为包含生物正交性官能团的追加修饰部分,所述包含生物正交性官能团的追加亲和性物质包含在抗体重链的恒定区中。

58. 权利要求57所述的抗体衍生物或其盐,其中,所述包含生物正交性官能团的追加修饰部分经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。

59. 权利要求58所述的抗体衍生物或其盐,其中,所述2个重链的恒定区中的1个以上位点为根据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

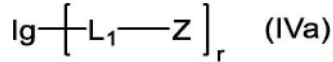
60. 抗体和功能性物质的缀合物或其盐,其包含:(a) 包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b) 功能性物质,并且(c) 功能性物质仅引入至所述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中。

61. 权利要求60所述的缀合物或其盐,其中,功能性物质经由存在于所述一个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,仅引入至所述一个重链的恒定

区中。

62. 权利要求61所述的缀合物或其盐,其中,所述一个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

63. 权利要求60所述的缀合物或其盐,其中,缀合物或其盐包含下述式(IVa)所表示的结构单元:



式中,

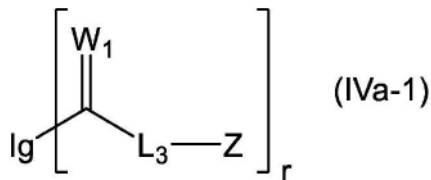
Ig表示所述免疫球蛋白单元,

L<sub>1</sub>表示第1接头,

Z表示功能性物质,

功能性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

64. 权利要求60所述的缀合物或其盐,其中,缀合物或其盐包含下述式(IVa-1)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

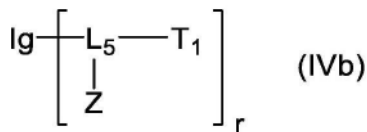
W<sub>1</sub>表示氧原子或硫原子,

L<sub>3</sub>表示第3接头,

Z表示功能性物质,

功能性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

65. 权利要求60所述的缀合物或其盐,其中,缀合物或其盐包含下述式(IVb)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

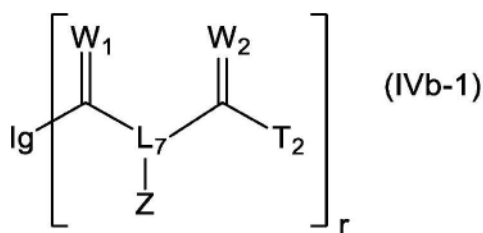
L<sub>5</sub>表示第5接头,

Z表示功能性物质,

T<sub>1</sub>表示1价基团,

功能性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

66. 权利要求60所述的缀合物或其盐,其中,缀合物或其盐包含下述式(IVb-1)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

$\text{W}_1$ 和 $\text{W}_2$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

$\text{L}_7$ 表示第7接头,

Z表示功能性物质,

$\text{T}_2$ 表示1价基团,

功能性物质对所述免疫球蛋白单元的修饰百分率r为65~135%。

67. 权利要求60所述的缀合物或其盐,其中,功能性物质为药物、标记物质、亲和性物质、转运用物质或稳定剂。

68. 权利要求67所述的缀合物或其盐,其中,亲和性物质为全长抗体或其片段。

69. 权利要求60所述的缀合物或其盐,其中,缀合物进一步包含追加修饰部分。

70. 权利要求69所述的缀合物或其盐,其中,追加修饰部分为包含功能性物质的追加修饰部分,所述包含功能性物质的追加修饰部分包含在抗体重链的恒定区中。

71. 权利要求70所述的缀合物或其盐,其中,所述包含功能性物质的追加修饰部分经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。

72. 权利要求71所述的缀合物或其盐,其中,所述2个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

73. 不含亲和性物质的抗体或其盐的制造方法,其包括:将亲和性物质修饰的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成不含亲和性物质的抗体或其盐,所述亲和性物质修饰的抗体或其盐包含:(A) 包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、以及(B) 抗体,并且(C) 在(A) 该亲和性物质与(B) 抗体之间进一步包含切割性部分。

74. 权利要求73所述的方法,其中,切割性部分为可通过切割在所述抗体侧生成生物正交性官能团的切割性部分,

不含亲和性物质的抗体或其盐为包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐。

75. 权利要求74所述的方法,其中,包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐为权利要求49~53、56~59中任一项所述的抗体衍生物或其盐。

76. 权利要求73所述的方法,其中,不含亲和性物质的抗体或其盐在所述抗体与切割性部分之间进一步包含生物正交性官能团,

不含亲和性物质的抗体或其盐为包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐。

77. 权利要求76所述的方法,其中,包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐为权利要求49~51、54~59中任一项所述的抗体衍生物或其盐。

78. 包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括下述(1)和(2):

(1) 通过权利要求74所述的方法制造包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐:以及

(2) 使包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐。

79. 权利要求78所述的方法,其中,缀合物或其盐为权利要求60~64中任一项所述的缀合物或其盐。

80. 包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括下述(1)和(2):

(1) 通过权利要求76所述的方法制造包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐:以及

(2) 使包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐。

81. 权利要求78所述的方法,其中,缀合物或其盐为权利要求60~62、65和66中任一项所述的缀合物或其盐。

82. 包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,该方法包括:使包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐,

包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐包含:(a) 包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b) 生物正交性官能团,并且(c) 生物正交性官能团仅引入至所述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中,

包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐包含:(a) 包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b) 功能性物质,并且(c) 功能性物质仅引入至所述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中。

83. 权利要求80所述的方法,其中,包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐为权利要求49~59中任一项所述的抗体衍生物或其盐。

84. 权利要求80所述的方法,其中,缀合物或其盐为权利要求60~72中任一项所述的缀合物或其盐。

85. 亲和性物质或其盐,其包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分。

86. 权利要求85所述的亲和性物质或其盐,其中,亲和性物质由下述式(A)表示:

$AP1-L_A-AP2(A)$

式中,

AP1表示对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性肽,

AP2表示对抗体重链的恒定区具有亲和性的第2亲和性肽,

$L_A$ 表示接头。

87. 权利要求85所述的亲和性物质或其盐,其中,亲和性物质仅包含1个特定的反应性基团。

88. 权利要求85所述的亲和性物质或其盐,其中,亲和性物质为包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性肽和第2亲和性肽的亲和性多肽。

89. 权利要求88所述的亲和性物质或其盐,其中,亲和性多肽由下述式(A')表示:

AP1-PL<sub>A</sub>-AP2(A')

式中,

AP1表示对抗体重链的恒定区具有亲和性、且存在于亲和性多肽的N末端侧的第1亲和性肽,

AP2表示对抗体重链的恒定区具有亲和性、且存在于亲和性多肽的C末端侧的第2亲和性肽,

PL<sub>A</sub>表示肽接头。

90. 权利要求88所述的亲和性物质或其盐,其中,亲和性多肽:(i)仅包含1个在侧链具有氨基的氨基酸残基,或(ii)包含未保护的N末端氨基。

91. 权利要求90所述的亲和性物质或其盐,其中,在侧链具有氨基的氨基酸残基为赖氨酸残基。

92. 权利要求88所述的亲和性物质或其盐,其中,亲和性多肽在N末端进一步包含由Gln-Glu-Thr(QET)构成的三肽。

93. 权利要求89所述的亲和性物质或其盐,其中,肽接头具有由20个以上的氨基酸残基构成的长度。

94. 权利要求85所述的亲和性物质或其盐,其中,第1亲和性肽和第2亲和性肽的一者为对抗体重链的恒定区具有亲和性、且具有1个赖氨酸残基的亲和性肽,并且

第1亲和性肽和第2亲和性肽的另一者为对抗体重链的恒定区具有亲和性、且不具有赖氨酸残基的亲和性肽。

95. 多核苷酸,其编码亲和性多肽,所述亲和性多肽包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性肽和第2亲和性肽。

96. 表达载体,其包含权利要求95所述的多核苷酸和与其可操作地连接的启动子。

97. 宿主细胞,其包含表达单元,所述表达单元包含权利要求95所述的多核苷酸和与其可操作地连接的启动子。

98. 包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,第1修饰部分以及第2修饰部分包含在抗体重链的恒定区中,所述第1修饰部分包含:包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的第1亲和性物质,所述第2修饰部分包含:包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第3亲和性部分和第4亲和性部分的第2亲和性物质。

99. 权利要求98所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其包含:(a)包含由第1重链和第2重链构成的2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b)所述第1修饰部分和第2修饰部分,

(c)所述第1修饰部分引入至所述免疫球蛋白单元中的第1重链的恒定区中,并且

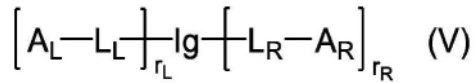
(d)所述第2修饰部分引入至所述免疫球蛋白单元中的第2重链的恒定区中。

100. 权利要求99所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述第1修饰部分经由存在于所述第1重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述第1重链的恒定区中,并且所述第2修饰部分经由存在于所述第2重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述第2重链的恒定区中。

101. 权利要求100所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述第1重链的恒定区

中的1个以上位点和所述第2重链的恒定区中的1个以上位点为选自下述的位点：依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位和317位，以及它们的组合。

102. 权利要求98所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(V)所表示的结构单元：



式中，

Ig表示包含由第1重链和第2重链构成的2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元，

$L_L$ 和 $L_R$ 分别独立地表示接头，

$A_L$ 表示所述第1亲和性物质，

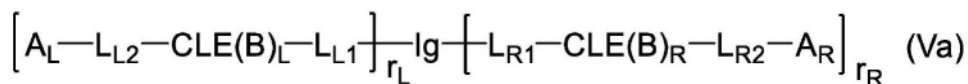
$A_R$ 表示所述第2亲和性物质，

所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

103. 权利要求98所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，所述抗体或其盐在(i')所述第1亲和性物质与(ii')所述免疫球蛋白单元之间进一步包含(iii')第1切割性部分；和/或在(i'')所述第2亲和性物质与(ii'')所述免疫球蛋白单元之间进一步包含(iii'')第2切割性部分。

104. 权利要求103所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，所述第1切割性部分和第2切割性部分为可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成生物正交性官能团的切割性部分。

105. 权利要求98所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(Va)所表示的结构单元：



式中，

Ig表示所述免疫球蛋白单元，

$L_{L1}$ 和 $L_{R1}$ 分别独立地表示第1接头，

$L_{L2}$ 和 $L_{R2}$ 分别独立地表示第2接头，

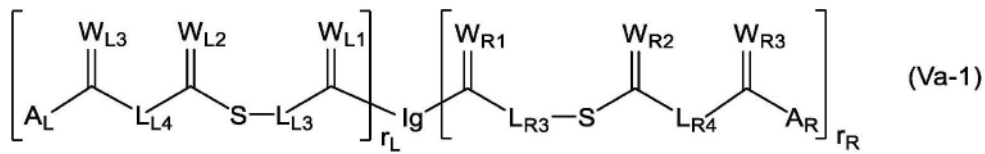
$\text{CLE}(B)_L$ 和 $\text{CLE}(B)_R$ 分别独立地表示可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成生物正交性官能团的切割性部分，

$A_L$ 表示所述第1亲和性物质，

$A_R$ 表示所述第2亲和性物质，

所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

106. 权利要求98所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(Va-1)所表示的结构单元：



式中,

I<sub>g</sub>表示所述免疫球蛋白单元,

W<sub>L1</sub>、W<sub>L2</sub>和W<sub>L3</sub>以及W<sub>R1</sub>、W<sub>R2</sub>和W<sub>R3</sub>分别独立地表示氧原子或硫原子,

L<sub>L3</sub>和L<sub>R3</sub>分别独立地表示第3接头,

L<sub>L4</sub>和L<sub>R4</sub>分别独立地表示第4接头,

S表示硫原子,

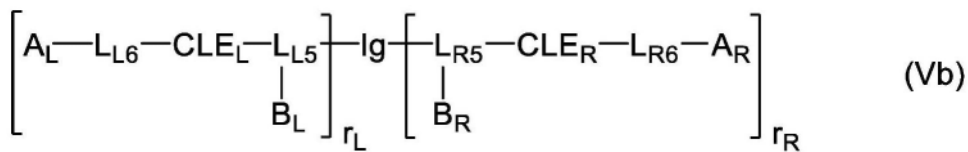
A<sub>L</sub>表示所述第1亲和性物质,

A<sub>R</sub>表示所述第2亲和性物质,

所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r<sub>L</sub>和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r<sub>R</sub>分别为65~135%。

107. 权利要求103所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述抗体或其盐在(ii')所述免疫球蛋白单元与(iii')所述第1切割性部分之间进一步包含(iv')第1生物正交性官能团;和/或在(ii'')所述免疫球蛋白单元与(iii'')所述第2切割性部分之间进一步包含(iv'')第2生物正交性官能团。

108. 权利要求107所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(Vb)所表示的结构单元:



式中,

I<sub>g</sub>表示所述免疫球蛋白单元,

L<sub>L5</sub>和L<sub>R5</sub>分别独立地表示第5接头,

L<sub>L6</sub>和L<sub>R6</sub>分别独立地表示第6接头,

B<sub>L</sub>表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

B<sub>R</sub>表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

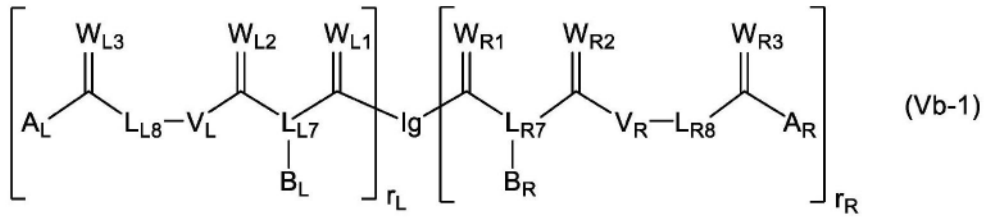
CLE<sub>L</sub>和CLE<sub>R</sub>分别独立地表示切割性部分,

A<sub>L</sub>表示所述第1亲和性物质,

A<sub>R</sub>表示所述第2亲和性物质,

所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r<sub>L</sub>和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r<sub>R</sub>分别为65~135%。

109. 权利要求108所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(Vb-1)所表示的结构单元:



式中，

I<sub>g</sub>表示所述免疫球蛋白单元，

W<sub>L1</sub>、W<sub>L2</sub>和W<sub>L3</sub>、以及W<sub>R1</sub>、W<sub>R2</sub>和W<sub>R3</sub>分别独立地表示氧原子或硫原子，

L<sub>L7</sub>和L<sub>R7</sub>分别独立地表示第7接头，

L<sub>L8</sub>和L<sub>R8</sub>分别独立地表示第8接头，

B<sub>L</sub>表示包含第1生物正交性官能团的第1基团，

B<sub>R</sub>表示包含第2生物正交性官能团的第2基团，

V<sub>L</sub>和V<sub>R</sub>分别独立地表示氧原子或硫原子，

A<sub>L</sub>表示所述第1亲和性物质，

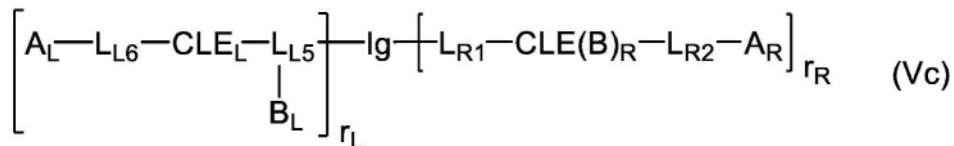
A<sub>R</sub>表示所述第2亲和性物质，

所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r<sub>L</sub>和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r<sub>R</sub>分别为65~135%。

110. 权利要求103所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，所述抗体或其盐在(i')所述第1亲和性物质与(ii')所述免疫球蛋白单元之间进一步包含(iii')第1切割性部分，并且在(ii'')所述免疫球蛋白单元与(iii'')第2切割性部分之间进一步包含(iv'')第1生物正交性官能团，

所述第1切割性部分为可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成第2生物正交性官能团的切割性部分。

111. 权利要求100所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(Vc)所表示的结构单元：



式中，

I<sub>g</sub>表示所述免疫球蛋白单元，

L<sub>R1</sub>表示第1接头，

L<sub>R2</sub>表示第2接头，

L<sub>L5</sub>表示第5接头，

L<sub>L6</sub>表示第6接头，

B<sub>L</sub>表示包含第1生物正交性官能团的基团，

CLE<sub>L</sub>表示第1切割性部分，

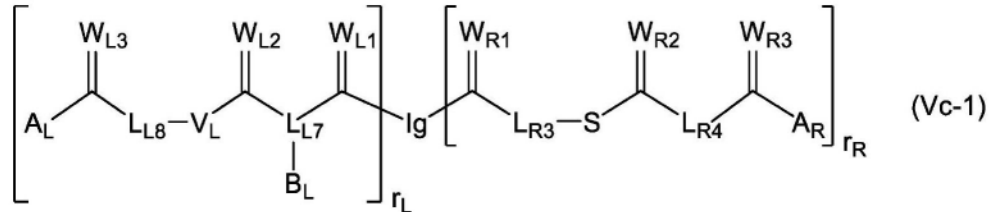
CLE(B)<sub>R</sub>表示可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成第2生物正交性官能团的第2切割性部分，

A<sub>L</sub>表示所述第1亲和性物质，

$A_R$ 表示所述第2亲和性物质,

所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

112. 权利要求111所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(Vc-1)所表示的结构单元:



式中,

$\text{Ig}$ 表示所述免疫球蛋白单元,

$\text{W}_{L1}$ 、 $\text{W}_{L2}$ 和 $\text{W}_{L3}$ 、以及 $\text{W}_{R1}$ 、 $\text{W}_{R2}$ 和 $\text{W}_{R3}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

$\text{L}_{R3}$ 分别独立地表示第3接头,

$\text{L}_{R4}$ 分别独立地表示第4接头,

$\text{L}_{L7}$ 分别独立地表示第7接头,

$\text{L}_{L8}$ 分别独立地表示第8接头,

$\text{B}_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的基团,

$\text{V}_L$ 表示氧原子或硫原子,

$\text{A}_L$ 表示所述第1亲和性物质,

$\text{A}_R$ 表示所述第2亲和性物质,

所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

113. 权利要求98所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,亲和性物质修饰的抗体进一步包含追加修饰部分。

114. 权利要求113所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,追加修饰部分为包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第5亲和性部分的追加亲和性物质,所述追加亲和性物质包含在对抗体重链的恒定区中。

115. 权利要求114所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述追加亲和性物质经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。

116. 权利要求115所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述2个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

117. 包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐的制造方法,其包括以下的(1)和(2):

(1) 使化合物或其盐与包含免疫球蛋白单元的抗体反应,生成在所述免疫球蛋白单元的重链的恒定区中包含第1修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐,所述化合物或其盐包含:(A) 包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的第1亲和性物质、和(B) 针对抗体的第1反应性基团,所述免疫球蛋白单元包含2个重链和根据需要

的2个轻链,所述第1修饰部分包含所述第1亲和性物质;以及

(2) 使在所述免疫球蛋白单元的重链的恒定区中包含所述第1亲和性物质的亲和性物质修饰的抗体或其盐与化合物或其盐反应,生成在所述免疫球蛋白单元的重链的恒定区中包含所述第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐,所述化合物或其盐包含:包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第3亲和性部分和第4亲和性部分的第2亲和性物质、和(B)针对抗体的第2反应性基团。

118. 权利要求117所述的方法,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐为权利要求86~100中任一项所述的亲和性物质修饰的抗体或其盐。

119. 包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐,其包含第1修饰部分和第2修饰部分,所述第1修饰部分包含:(a) 包含由第1重链和第2重链构成的2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b) 第1生物正交性官能团,所述第2修饰部分包含第2生物正交性官能团,

(c) 第1修饰部分引入至所述第1重链的恒定区中,

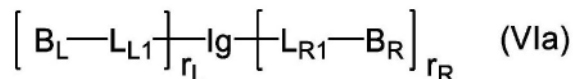
(d) 第2修饰部分引入至所述第2重链的恒定区中,并且

(e) 第1修饰部分和第2修饰部分彼此不同。

120. 权利要求119所述的抗体衍生物或其盐,其中,所述第1修饰部分经由存在于所述第1重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述第1重链的恒定区中,并且所述第2修饰部分经由存在于所述第2重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述第2重链的恒定区中。

121. 权利要求120所述的抗体衍生物或其盐,其中,所述第1重链的恒定区中的1个以上位点和所述第2重链的恒定区中的1个以上位点为选自下述的位点:依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位和317位,以及它们的组合。

122. 权利要求119所述的抗体衍生物或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐包含下述式(VIa)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

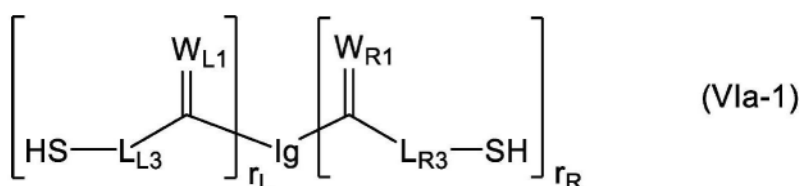
$\text{L}_{L1}$ 和 $\text{L}_{R1}$ 分别独立地表示第1接头,

$\text{B}_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

$\text{B}_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

123. 权利要求122所述的抗体衍生物或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐包含下述式(VIa-1)所表示的结构单元:



式中，

Ig表示所述免疫球蛋白单元，

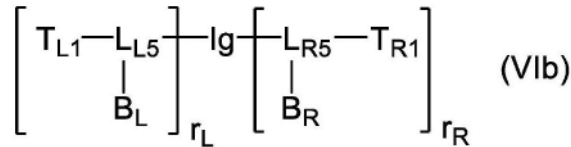
$W_{L1}$ 和 $W_{R1}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子，

$L_{L3}$ 和 $L_{R3}$ 分别独立地表示第3接头，

SH表示作为生物正交性官能团的硫醇基，

第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

124. 权利要求119所述的抗体衍生物或其盐，其中，包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐包含下述式(VIb)所表示的结构单元：



式中，

Ig表示所述免疫球蛋白单元，

$L_{L5}$ 和 $L_{R5}$ 分别独立地表示第5接头，

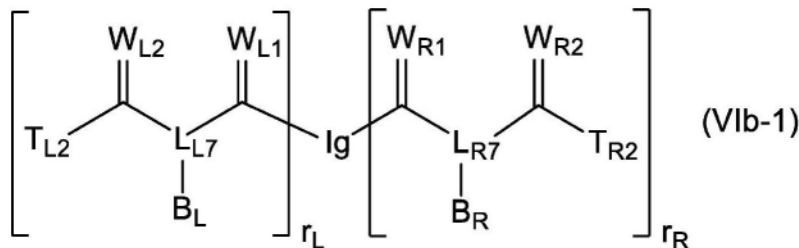
$B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团，

$B_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团，

$T_{L1}$ 和 $T_{R1}$ 分别独立地表示1价基团，

第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

125. 权利要求124所述的抗体衍生物或其盐，其中，包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐包含下述式(VIb-1)所表示的结构单元：



式中，

Ig表示所述免疫球蛋白单元，

$W_{L1}$ 和 $W_{L2}$ 、以及 $W_{R1}$ 和 $W_{R2}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子，

$L_{L7}$ 和 $L_{R7}$ 分别独立地表示第7接头，

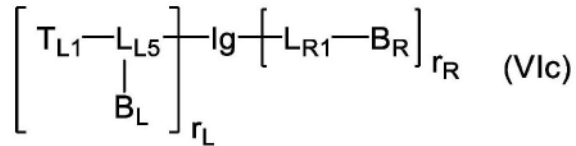
$B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团，

$B_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团，

$T_{L2}$ 和 $T_{R2}$ 分别独立地表示1价基团，

第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

126. 权利要求119所述的抗体衍生物或其盐，其中，包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐包含下述式(VIc)所表示的结构单元：



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

$L_{R1}$ 表示第1接头,

$L_{L5}$ 表示第5接头,

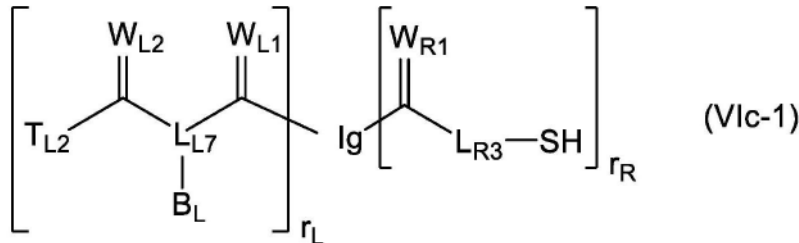
$B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

$B_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

$T_{L1}$ 表示1价基团,

第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

127. 权利要求126所述的抗体衍生物或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐包含下述式(VIc-1)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

$W_{L1}$ 和 $W_{L2}$ 、以及 $W_{R1}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

$L_{R3}$ 表示第3接头,

$L_{L7}$ 表示第7接头,

$B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

SH表示作为第2生物正交性官能团的硫醇基,

$T_{L2}$ 表示1价基团,

第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

128. 权利要求119所述的抗体衍生物或其盐,其中,抗体衍生物进一步包含追加修饰部分。

129. 权利要求128所述的抗体衍生物或其盐,其中,追加修饰部分为包含生物正交性官能团的追加修饰部分,所述包含生物正交性官能团的追加修饰部分包含在抗体重链的恒定区中。

130. 权利要求129所述的抗体衍生物或其盐,其中,所述包含生物正交性官能团的追加修饰部分经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。

131. 权利要求130所述的抗体衍生物或其盐,其中,所述2个重链的恒定区中的1个以上

位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

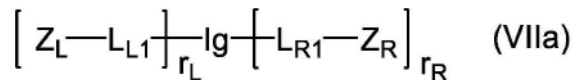
132. 抗体以及第1修饰部分和第2修饰部分的缀合物或其盐,其包含第1修饰部分和第2修饰部分,所述第1修饰部分包含:(a)包含由第1重链和第2重链构成的2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b)第1功能性物质,所述第2修饰部分包含第2功能性物质,

- (c) 第1修饰部分引入至所述第1重链的恒定区中,
- (d) 第2修饰部分引入至所述第2重链的恒定区中,并且
- (e) 第1修饰部分和第2修饰部分彼此不同。

133. 权利要求132所述的缀合物或其盐,其中,所述第1修饰部分经由存在于所述第1重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述第1重链的恒定区中,并且所述第2修饰部分经由存在于所述第2重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述第2重链的恒定区中。

134. 权利要求133所述的缀合物或其盐,其中,所述第1重链的恒定区中的1个以上位点和所述第2重链的恒定区中的1个以上位点为选自下述的位点:依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位和317位,以及它们的组合。

135. 权利要求132所述的缀合物或其盐,其中,所述缀合物或其盐包含下述式(VIIa)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

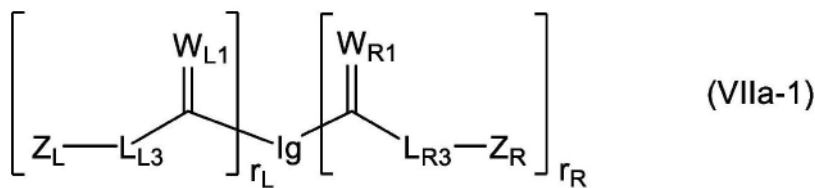
$L_{L1}$ 和 $L_{R1}$ 分别独立地表示第1接头,

$Z_L$ 表示第1功能性物质,

$Z_R$ 表示第2功能性物质,

第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

136. 权利要求135所述的缀合物或其盐,其中,所述缀合物或其盐包含下述式(VIIa-1)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

$W_{L1}$ 和 $W_{R1}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

$L_{L3}$ 和 $L_{R3}$ 分别独立地表示第3接头,

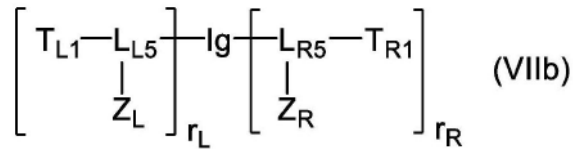
$Z_L$ 表示第1功能性物质,

$Z_R$ 表示第2功能性物质,

第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球

蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

137. 权利要求132所述的缀合物或其盐,其中,所述缀合物或其盐包含下述式(VIIb)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

$L_{L5}$ 和 $L_{R5}$ 分别独立地表示第5接头,

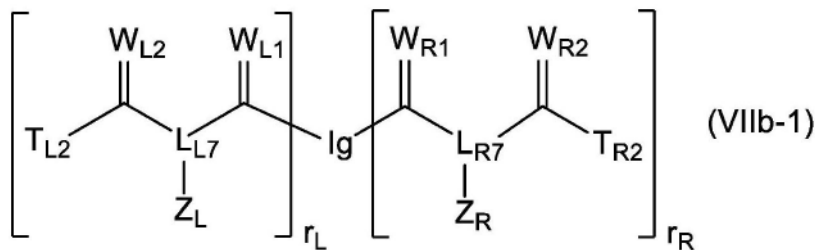
$Z_L$ 表示第1功能性物质,

$Z_R$ 表示第2功能性物质,

$T_{L1}$ 和 $T_{R1}$ 分别独立地表示1价基团,

第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

138. 权利要求137所述的缀合物或其盐,其中,所述缀合物或其盐包含下述式(VIIb-1)所表示的结构单元:



式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

$W_{L1}$ 和 $W_{L2}$ 、以及 $W_{R1}$ 和 $W_{R2}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

$L_{L7}$ 和 $L_{R7}$ 分别独立地表示第7接头,

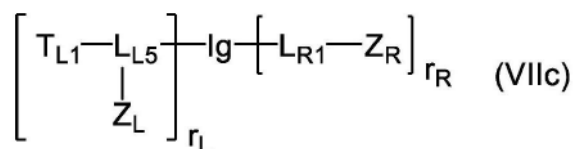
$Z_L$ 表示第1功能性物质,

$Z_R$ 表示第2功能性物质,

$T_{L2}$ 和 $T_{R2}$ 分别独立地表示1价基团,

第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

139. 权利要求132所述的缀合物或其盐,其中,所述缀合物或其盐包含下述式(VIIc)所表示的结构单元:



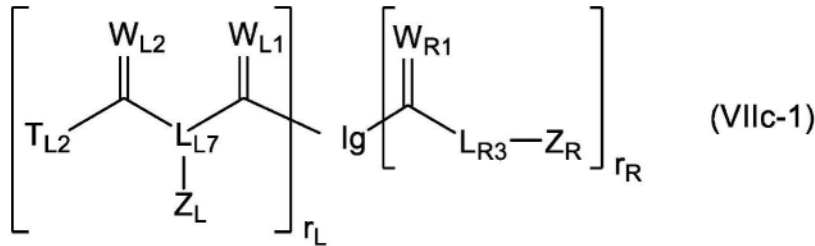
式中,

Ig表示所述免疫球蛋白单元,

$L_{R1}$ 表示第1接头,  
 $L_{L5}$ 表示第5接头,  
 $Z_L$ 表示第1功能性物质,  
 $Z_R$ 表示第2功能性物质,  
 $T_{L1}$ 表示1价基团,

第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

140. 权利要求139所述的缀合物或其盐,其中,所述缀合物或其盐包含下述式(VIIc-1)所表示的结构单元:



式中,

$\text{Ig}$ 表示所述免疫球蛋白单元,  
 $\text{W}_{L1}$ 和 $\text{W}_{L2}$ 、以及 $\text{W}_{R1}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,  
 $L_{R3}$ 表示第3接头,  
 $L_{L7}$ 表示第7接头,  
 $Z_L$ 表示第1功能性物质,  
 $Z_R$ 表示第2功能性物质,  
 $T_{L2}$ 表示1价基团,

第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

141. 权利要求132所述的缀合物或其盐,其中,第1功能性物质和第2功能性物质分别独立地为药物、标记物质、亲和性物质、转运用物质或稳定剂。

142. 权利要求141所述的缀合物或其盐,其中,第1功能性物质和第2功能性物质的一者为全长抗体或其片段,或者第1功能性物质和第2功能性物质的两者分别独立地为全长抗体或其片段。

143. 权利要求132所述的缀合物或其盐,其中,缀合物进一步包含追加修饰部分。

144. 权利要求143所述的缀合物或其盐,其中,追加修饰部分为包含功能性物质的追加修饰部分,所述包含功能性物质的追加修饰部分包含在抗体重链的恒定区中。

145. 权利要求144所述的缀合物或其盐,其中,所述包含功能性物质的追加修饰部分经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。

146. 权利要求145所述的缀合物或其盐,其中,所述2个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

## 亲和性物质、化合物、抗体和它们的盐

### 技术领域

[0001] 本发明涉及亲和性物质及其盐、以及包含亲和性物质的化合物、抗体和它们的盐。

### 背景技术

[0002] 近年来,抗体药物复合物(Antibody Drug Conjugate(抗体药物缀合物):ADC)的研究开发正在积极地进行。顾名思义,ADC是将药物(例如,抗癌药)与抗体缀合(偶联)而成的药剂,对癌细胞等具有直接的杀细胞活性。作为代表性的ADC,有Immunogene公司和Roche公司共同开发的T-DM1(商品名:Kadcyla(注册商标))。

[0003] 以T-DM1为代表的ADC从开发初期就存在其不均匀性的问题。例如,由于使小分子药物随机地与抗体中存在70~80个左右的赖氨酸残基反应,因此药物抗体比(Drug Antibody Ratio:DAR)或缀合位点不恒定。已知通常如果采用这样的随机缀合法,则DAR为0~8的范围,产生药物的结合数不同的多种抗体药剂。近年来,报道了如果改变ADC的药物的结合数和结合位点,则会改变体内动力学或药物的释放速度、效果。基于这些情况,对于下一代的ADC,要求控制待缀合的药物的个数和位点。据信,如果个数和位点恒定,则预期的功效(efficacy)、缀合药剂的多样性(variation)、批次差异即所谓的标准化(regulation)问题就迎刃而解了。

[0004] 全球都在研究抗体的位点选择性修饰法,但大多数方法是基因工程方法或使用酶的修饰法。关于基因工程修饰法,尽管可控制位点选择性、个数选择性,但已经指出会存在抗体本身的表达效率降低(调制ADC时的总收率降低)等问题。而且,还存在抗体表达体系的构建等需要很长时间的问题。

[0005] 最近,开发了一种可通过化学合成方法进行抗体的位点选择性修饰的C-CAP(Cheical conjugation by Affinity Peptide,基于亲和性肽的化学偶联)法(专利文献1)。该方法通过使NHS活化酯和药物与亲和性肽(Affinity Peptide)连接而成的肽试剂与抗体反应,成功地进行了抗体的位点选择性修饰。然而,就通过该方法制作的ADC而言,抗体和药物经由包含肽部分的接头(linker)而结合。肽部分具有潜在的免疫原性,而且在血液容易被水解。因此,通过该方法制作的ADC在接头中包含肽部分这方面存在改善的空间。

[0006] 作为上述C-CAP法的改良方法,报道了下述技术:通过使用包含亲和性肽的规定化合物的化学合成方法,可调制不含肽部分作为接头的、位点选择性地具有功能性物质(例如,药物)的抗体(专利文献2~5)。另外,专利文献6中公开了下述技术:在包含亲和性肽的化合物的制作中,通过利用在N末端包含谷氨酰胺-谷氨酸-苏氨酸(QET)的亲和性肽,大量且简便地制造亲和性肽。在临床应用中,期望避免使用包含肽部分的接头。这些技术中,已经提出了对应于CH2和CH3结构域中的各种氨基酸残基(例如,赖氨酸残基、酪氨酸残基、丝氨酸残基和苏氨酸残基)的多个位点作为可被药物位点选择性地修饰的抗体中的氨基酸残基的位点。然而,用功能性物质位点选择性地修饰抗体、且将抗体与功能性物质的结合比率控制在所需范围未必容易。特别是,不容易控制成仅特异性地修饰抗体的构成单元(包含2个重链的免疫球蛋白单元)中的一个重链。

[0007] 然而,专利文献6公开了:(i)包含针对各种受体(例如,成纤维细胞生长因子受体(FGFR)、肝细胞生长因子受体(HGFR/c-Met)、促红细胞生成素受体、血小板生成素受体)等蛋白的第1生理活性肽位点和第2生理活性肽位点以及肽接头的肽分子,通过其与蛋白非共价键合性地结合,可调节蛋白的活性;以及(ii)作为肽接头,可使用包含由脯氨酸(P)、丙氨酸(A)和丝氨酸(S)的氨基酸残基构成的氨基酸序列的规定长度的肽接头。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:国际公开第2016/186206号;

[0011] 专利文献2:国际公开第2018/199337号;

[0012] 专利文献3:国际公开第2019/240287号;

[0013] 专利文献4:国际公开第2019/240288号;

[0014] 专利文献5:国际公开第2020/090979号;

[0015] 专利文献6:国际公开第2021/112249号。

## 发明内容

[0016] 发明所要解决的课题

[0017] 本发明的目的在于,开发可容易地仅化学修饰抗体的构成单元(换言之,包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的一个重链的技术。

[0018] 本发明的另一个目的在于,开发容易地仅化学修饰抗体的构成单元中的一个重链,同时位点选择性地修饰的抗体。

[0019] 用于解决课题的手段

[0020] 本发明人进行了深入研究,结果发现了:通过使用化合物或其盐,可容易地仅对抗体的构成单元中的一个重链进行化学修饰,所述化合物或其盐包含:(A)包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、和(B)抗体反应性基团。

[0021] 本发明的化合物或其盐可经由包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质(A)与抗体的构成单元中的2个重链缔合,其次,可经由抗体反应性基团(R)与抗体的构成单元中的一个重链中的特定氨基酸残基的侧链特异性地反应,生成仅修饰了抗体的构成单元中的2个重链中的1个的亲和性物质修饰的抗体或其盐(图1)。虽然本发明不希望受理论约束,但本发明的化合物或其盐仅对抗体的构成单元中的一个重链修饰的机制如下。由于本发明的化合物或其盐中所含的亲和性物质(包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分)可稳定地与抗体的构成单元中的2个重链的恒定区缔合,因此本发明的化合物或其盐中所含的反应性基团可仅修饰一个重链(图1)。此时,由于另一个重链的恒定区(未修饰的重链的恒定区)是亲和性部分缔合并产生空间位阻,因此其它分子(本发明的化合物或其盐)无法经由其中所含的亲和性物质与另一个重链的恒定区缔合。本发明的化合物或其盐可经由亲和性物质中所含的2个亲和性部分与2个重链的恒定区缔合,因此可稳定地与抗体的构成单元缔合,因此可高度地抑制其它分子与抗体的构成单元的缔合。因此,本发明的化合物或其盐可高度地抑制另一个重链的恒定区的修饰,所以可仅修饰一个重链的恒定区(图1)。

[0022] 专利文献1~5公开了:通过使用包含亲和性物质和抗体反应性基团的化合物,可用功能性物质位点选择性地修饰抗体,但没有记载也没有暗示:(1)开发可容易地仅对抗体的构成单元中的一个重链进行化学修饰的技术的课题,以及(2)作为亲和性物质,利用包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的物质(特别是,通过使用包含该亲和性物质和抗体反应性基团的化合物或其盐,仅对抗体的构成单元中的一个重链进行化学修饰的技术思想)。

[0023] 专利文献6公开了:包含上述针对蛋白的第1生理活性肽位点和第2生理活性肽位点以及规定的肽接头的肽分子,通过其与蛋白非共价键合性地结合,可调节蛋白的活性,但没有公开也没有暗示:(1)开发可容易地仅对抗体的构成单元中的一个重链进行化学修饰的技术的课题,以及(2)作为亲和性物质,利用包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的物质(特别是,通过使用包含该亲和性物质和抗体反应性基团的化合物或其盐,仅对抗体的构成单元中的一个重链进行化学修饰的技术思想)。

[0024] 本发明人还成功地通过使用本发明的化合物或其盐,生成仅抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的一个重链被化学修饰的抗体。这样的抗体具有下述特征:其包含:(a)包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b)修饰单元(例如,上述亲和性物质、生物正交性官能团或功能性物质),并且(c)上述修饰单元仅引入至上述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中。

[0025] 即,本发明如下所述。

[0026] [1]化合物或其盐,其包含:(A)包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、和(B)抗体反应性基团。

[0027] [2][1]的化合物或其盐,其中,恒定区为Fc区。

[0028] [3][1]或[2]的化合物或其盐,其中,恒定区为CH2结构域。

[0029] [4][1]~[3]中任一项的化合物或其盐,其中,恒定区为人恒定区。

[0030] [5][1]~[4]中任一项的化合物或其盐,其中,抗体为IgG。

[0031] [6][1]~[5]中任一项的化合物或其盐,其中,第1亲和性部分和第2亲和性部分为不同的亲和性部分。

[0032] [7][1]~[6]中任一项的化合物或其盐,其中,亲和性物质由下述式(A)表示:

[0033]  $AP1-L_A-AP2(A)$

[0034] 式中,

[0035] AP1表示对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性肽,

[0036] AP2表示对抗体重链的恒定区具有亲和性的第2亲和性肽,

[0037]  $L_A$ 表示接头。

[0038] [8][1]~[7]中任一项的化合物或其盐,其中,亲和性物质:(i)(i-1)仅包含1个特定的反应性基团,并且(i-2)经由所述特定的反应性基团与抗体反应性基团连接。

[0039] [9][1]~[8]中任一项的化合物或其盐,其中,亲和性物质为包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性肽和第2亲和性肽的亲和性多肽。

[0040] [10][1]~[6]中任一项的化合物或其盐,其中,亲和性多肽由下述式(A')表示:

[0041]  $AP1-PL_A-AP2(A')$

[0042] 式中,

[0043] AP1表示对抗体重链的恒定区具有亲和性、且存在于亲和性多肽的N末端侧的第1亲和性肽，

[0044] AP2表示对抗体重链的恒定区具有亲和性、且存在于亲和性多肽的C末端侧的第2亲和性肽，

[0045] PL<sub>A</sub>表示肽接头。

[0046] [11][1] ~ [10]中任一项的化合物或其盐，其中，亲和性多肽：(i) (i-1)仅包含1个在侧链具有氨基的氨基酸残基，并且(ii-2)经由所述氨基与抗体反应性基团连接；或(ii)经由第1亲和性肽中的N末端氨基与抗体反应性基团连接。

[0047] [12][11]的化合物或其盐，其中，在侧链具有氨基的氨基酸残基为赖氨酸残基。

[0048] [13][1] ~ [12]中任一项的化合物或其盐，其中，亲和性多肽在N末端进一步包含由Gln-Glu-Thr(QET)构成的三肽。

[0049] [14][10]的化合物或其盐，其中，肽接头具有由20个以上的氨基酸残基构成的长度。

[0050] [15][1] ~ [14]中任一项的化合物或其盐，其中，第1亲和性肽和第2亲和性肽的一者为对抗体重链的恒定区具有亲和性、且具有1个赖氨酸残基的亲和性肽，并且

[0051] 第1亲和性肽和第2亲和性肽的另一者为对抗体重链的恒定区具有亲和性、且不具有赖氨酸残基的亲和性肽。

[0052] [16][15]的化合物或其盐，其中，对抗体重链的恒定区具有亲和性、且具有1个赖氨酸残基的亲和性肽为下述(1) ~ (4)中的任一种：

[0053] (1)包含RGNCAYHKGQIIWCTYH(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列(Fc3K)的亲和性肽；

[0054] (2)包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲和性肽：在RGNCAYHKGQIIWCTYH(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列中，赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列；

[0055] (3)包含FNKQCRRFYALHDPNLNNEQRNARIRSIREEC(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列(Z34CK)的亲和性肽；以及

[0056] (4)包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲和性肽：在FNKQCRRFYALHDPNLNNEQRNARIRSIREEC(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列中，赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列，

[0057] 在此，所述氨基酸序列中含有的2个半胱氨酸残基可通过二硫键交联；以及/或者

[0058] 对抗体重链的恒定区具有亲和性、不具有赖氨酸残基的亲和性肽为下述(5) ~ (10)中的任一种：

[0059] (5)包含FNMQCRRFYALHDPNLNNEQRNARIRSIREEC(SEQ ID NO:40)的氨基酸序列(Z34CM)的亲和性肽；

[0060] (6)包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲和性肽：在FNMQCRRFYALHDPNLNNEQRNARIRSIREEC(SEQ ID NO:40)的氨基酸序列中，半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列；

[0061] (7) 包含FNREQQNAFYIEILHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA (SEQ ID NO:41) 的氨基酸序列 (ProAR) 的亲亲和性肽;

[0062] (8) 包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲和性肽:在FNREQQNAFYIEILHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA (SEQ ID NO:41) 的氨基酸序列中,半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列;

[0063] (9) 包含RGNCAYHRGQIIWCTYH (SEQ ID NO:78) 的氨基酸序列的亲亲和性肽;以及

[0064] (10) 包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲和性肽:在RGNCAYHRGQIIWCTYH (SEQ ID NO:78) 的氨基酸序列中,半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列,

[0065] 在此,所述氨基酸序列中含有的2个半胱氨酸残基可通过二硫键交联。

[0066] [17][1] ~ [16]中任一项的化合物或其盐,其中,化合物由下述式(I)表示:

[0067] [化学式1]

[0068] R-L-A (I)

[0069] 式中,

[0070] R表示所述反应性基团,

[0071] L表示接头,

[0072] A表示所述亲和性物质。

[0073] [18][1] ~ [17]中任一项的化合物或其盐,其中,化合物或其盐在(i)所述亲和性物质与(ii)所述反应性基团之间进一步包含(iii)切割性部分。

[0074] [19][18]的化合物或其盐,其中,切割性部分为可通过切割在所述反应性基团侧生成生物正交性官能团的切割性部分。

[0075] [20][19]的化合物或其盐,其中,化合物由下述式(Ia)表示:

[0076] [化学式2]

[0077] R-L<sub>1</sub>-CLE(B)-L<sub>2</sub>-A (Ia)

[0078] 式中,

[0079] R表示所述反应性基团,

[0080] L<sub>1</sub>表示第1接头,

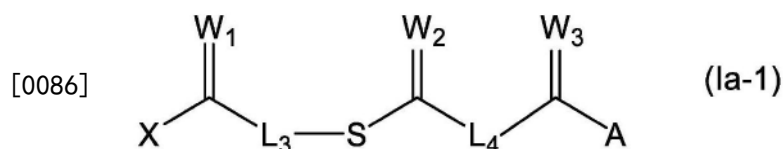
[0081] L<sub>2</sub>表示第2接头,

[0082] CLE(B)表示可通过切割在所述反应性基团侧生成生物正交性官能团的切割性部分,

[0083] A表示所述亲和性物质。

[0084] [21][19]的化合物或其盐,其中,化合物由下述式(Ia-1)表示:

[0085] [化学式3]



[0087] 式中,

[0088] X表示离去基团,

[0089]  $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 分别独立地表示氧原子或硫原子，

[0090]  $L_3$ 表示第3接头，

[0091]  $L_4$ 表示第4接头，

[0092] S表示硫原子，

[0093] A表示所述亲和性物质。

[0094] [22][21]的化合物或其盐，其中，离去基团选自下述基团：

[0095] (a)  $R_A-S$ ，在此， $R_A$ 表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基，S表示硫原子；

[0096] (b)  $R_A-O$ ，在此， $R_A$ 表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基，O表示氧原子；

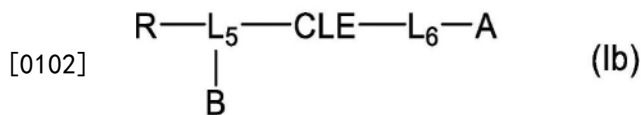
[0097] (c)  $R_A-(R_B^-)N$ ，在此， $R_A$ 和 $R_B$ 分别独立地表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基，N表示氮原子；或

[0098] (d) 卤原子。

[0099] [23][1] ~ [17]中任一项的化合物或其盐，其中，化合物或其盐在(ii)所述反应性基团与(iii)切割性部分之间进一步包含(iv)生物正交性官能团。

[0100] [24][23]的化合物或其盐，其中，化合物由下述式(Ib)表示：

[0101] [化学式4]



[0103] 式中，

[0104] R表示所述反应性基团，

[0105]  $L_5$ 表示第5接头，

[0106]  $L_6$ 表示第6接头，

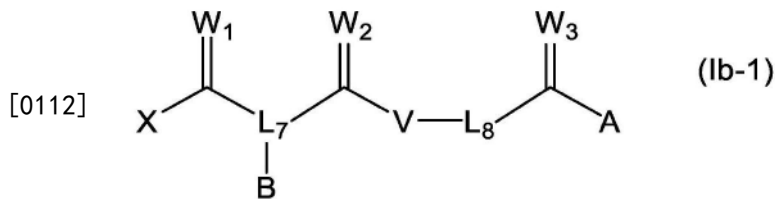
[0107] B表示包含生物正交性官能团的基团，

[0108] CLE表示切割性部分，

[0109] A表示所述亲和性物质。

[0110] [25][23]的化合物或其盐，其中，化合物由下述式(Ib-1)表示：

[0111] [化学式5]



[0113] 式中，

[0114] X表示离去基团，

[0115]  $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 分别独立地表示氧原子或硫原子，

[0116]  $L_7$ 表示第7接头，

[0117]  $L_8$ 表示第8接头，

[0118] B表示包含生物正交性官能团的基团，

[0119] V表示氧原子或硫原子，

[0120] A表示所述亲和性物质。

[0121] [26][23] ~ [25]中任一项的化合物或其盐，其中，生物正交性官能团为叠氮残基、炔烃残基、四嗪残基、烯炔残基、硫醇残基、马来酰亚胺残基、硫醇残基、呋喃残基或卤代羰基残基。

[0122] [27]抗体衍生用试剂，其包含[1] ~ [26]中任一项的化合物或其盐。

[0123] [28]亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，亲和性物质包含在抗体重链的恒定区中，所述亲和性物质包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分。

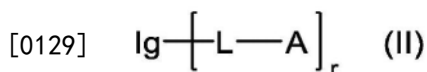
[0124] [29][28]的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其包含：(a) 包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及 (b) 所述亲和性物质，并且 (c) 所述亲和性物质仅引入至所述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中。

[0125] [30][29]的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，所述亲和性物质经由存在于所述一个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰，仅引入至所述一个重链的恒定区中。

[0126] [31][30]的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，所述1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

[0127] [32][28] ~ [31]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，亲和性物质修饰的抗体包含下述式(II)所表示的结构单元：

[0128] [化学式6]



[0130] 式中，

[0131] Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元，

[0132] L表示接头，

[0133] A表示所述亲和性物质，

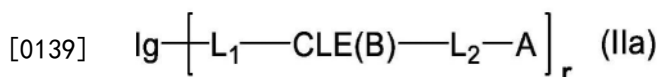
[0134] 所述亲和性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65 ~ 135%。

[0135] [33][28] ~ [32]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，所述抗体或其盐在(i')所述亲和性物质与(ii')所述抗体之间进一步包含(iii')切割性部分。

[0136] [34][33]的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，切割性部分为可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成生物正交性官能团的切割性部分。

[0137] [35][34]的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，亲和性物质修饰的抗体包含下述式(IIa)所表示的结构单元：

[0138] [化学式7]



[0140] 式中，

[0141] Ig表示所述免疫球蛋白单元，

[0142] L<sub>1</sub>表示第1接头，

[0143]  $L_2$ 表示第2接头,

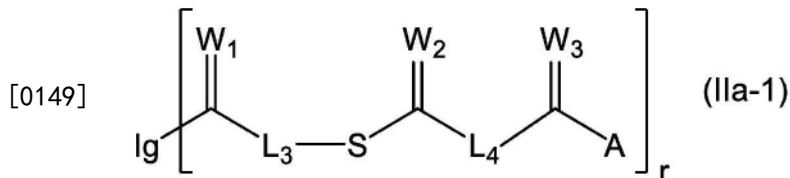
[0144] CLE (B) 表示可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成生物正交性官能团的切割性部分,

[0145] A表示所述亲和性物质,

[0146] 所述亲和性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r$ 为65~135%。

[0147] [36][34]的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,亲和性物质修饰的抗体包含下述式(IIa-1)所表示的结构单元:

[0148] [化学式8]



[0150] 式中,

[0151] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0152]  $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[0153]  $L_3$ 表示第3接头,

[0154]  $L_4$ 表示第4接头,

[0155] S表示硫原子,

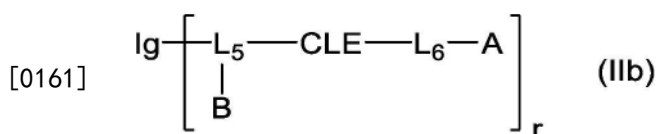
[0156] A表示所述亲和性物质,

[0157] 所述亲和性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r$ 为65~135%。

[0158] [37][33]的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述抗体或其盐在(ii')所述抗体与(iii')切割性部分之间进一步包含(iv')生物正交性官能团。

[0159] [38][37]的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,亲和性物质修饰的抗体包含下述式(IIb)所表示的结构单元:

[0160] [化学式9]



[0162] 式中,

[0163] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0164]  $L_5$ 表示第5接头,

[0165]  $L_6$ 表示第6接头,

[0166] B表示包含生物正交性官能团的基团,

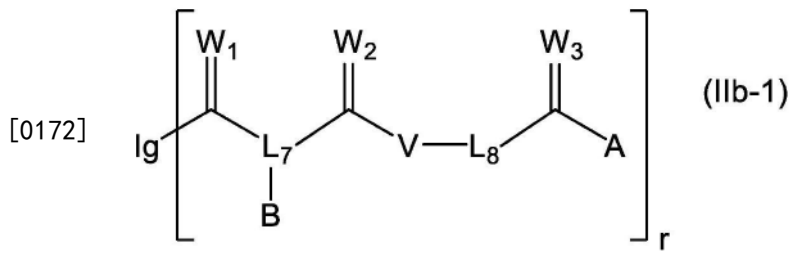
[0167] CLE表示切割性部分,

[0168] A表示所述亲和性物质,

[0169] 所述亲和性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r$ 为65~135%。

[0170] [39][37]的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,亲和性物质修饰的抗体包含下述式(IIb-1)所表示的结构单元:

[0171] [化学式10]



[0173] 式中，

[0174] Ig表示所述免疫球蛋白单元，

[0175]  $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 分别独立地表示氧原子或硫原子，

[0176]  $L_7$ 表示第7接头，

[0177]  $L_8$ 表示第8接头，

[0178] B表示包含生物正交性官能团的基团，

[0179] V表示氧原子或硫原子，

[0180] A表示所述亲和性物质，

[0181] 所述亲和性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65 ~ 135%。

[0182] [40][28] ~ [39]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，亲和性物质修饰的抗体进一步包含追加修饰部分。

[0183] [41][40]的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，追加修饰部分为包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第3亲和性部分的追加亲和性物质，所述追加亲和性物质包含在抗体重链的恒定区中。

[0184] [42][41]的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，所述追加亲和性物质经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰，引入至所述2个重链的恒定区中。

[0185] [43][42]的亲和性物质修饰的抗体或其盐，其中，所述2个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

[0186] [44]亲和性物质修饰的抗体或其盐的制造方法，其包括：使化合物或其盐与包含免疫球蛋白单元的抗体反应，生成在所述免疫球蛋白单元的重链的恒定区中包含所述亲和性物质的亲和性物质修饰的抗体或其盐，所述化合物或其盐包含：(A)包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、和(B)抗体反应性基团，所述免疫球蛋白单元包含2个重链和根据需要的2个轻链。

[0187] [45][44]的方法，其中，化合物或其盐在(i)所述亲和性物质与(ii)所述反应性基团之间进一步包含(iii)切割性部分。

[0188] [46][45]的方法，其中，切割性部分为可通过切割在所述反应性基团侧生成生物正交性官能团的切割性部分。

[0189] [47][44]的方法，其中，化合物或其盐在(ii)所述反应性基团与(iii)切割性部分之间进一步包含(iv)生物正交性官能团。

[0190] [48][44]的方法，其中，亲和性物质修饰的抗体或其盐为[29] ~ [43]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐。

[0191] [49]包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐，其包含：(a)包含2个重链和根

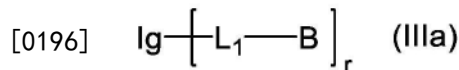
据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及 (b) 生物正交性官能团, 并且 (c) 生物正交性官能团仅引入至所述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中。

[0192] [50] [49] 的抗体衍生物或其盐, 其中, 生物正交性官能团经由存在于所述一个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰, 仅引入至所述一个重链的恒定区中。

[0193] [51] [49] 或 [50] 的抗体衍生物或其盐, 其中, 所述一个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

[0194] [52] [49] ~ [51] 中任一项的抗体衍生物或其盐, 其中, 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐包含下述式 (IIIa) 所表示的结构单元:

[0195] [化学式11]



[0197] 式中,

[0198] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

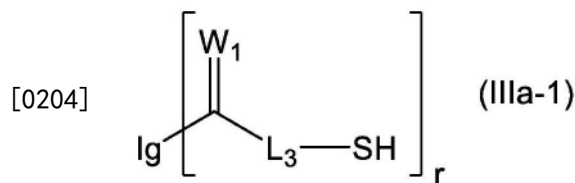
[0199] L<sub>1</sub>表示第1接头,

[0200] B表示包含生物正交性官能团的基团,

[0201] 生物正交性官能团对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

[0202] [53] [49] ~ [51] 中任一项的抗体衍生物或其盐, 其中, 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐包含下述式 (IIIa-1) 所表示的结构单元:

[0203] [化学式12]



[0205] 式中,

[0206] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0207] W<sub>1</sub>表示氧原子或硫原子,

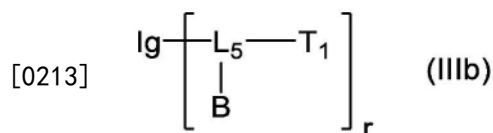
[0208] L<sub>3</sub>表示第3接头,

[0209] SH表示硫醇基,

[0210] 生物正交性官能团对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

[0211] [54] [49] ~ [51] 中任一项的抗体衍生物或其盐, 其中, 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐包含下述式 (IIIb) 所表示的结构单元:

[0212] [化学式13]



[0214] 式中,

[0215] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0216] L<sub>5</sub>表示第5接头,

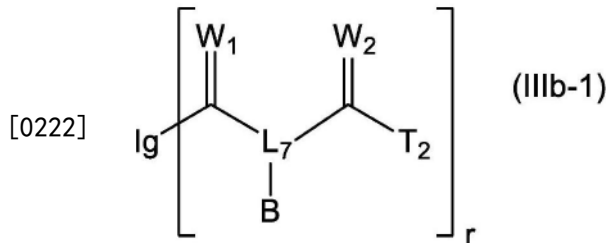
[0217] B表示包含生物正交性官能团的基团，

[0218]  $T_1$ 表示1价基团，

[0219] 生物正交性官能团对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r$ 为65~135%。

[0220] [55][49]~[51]中任一项的抗体衍生物或其盐，其中，包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐包含下述式(IIIb-1)所表示的结构单元：

[0221] [化学式14]



[0223] 式中，

[0224] Ig表示所述免疫球蛋白单元，

[0225]  $W_1$ 和 $W_2$ 分别独立地表示氧原子或硫原子，

[0226]  $L_7$ 表示第7接头，

[0227] B表示包含生物正交性官能团的基团，

[0228]  $T_2$ 表示1价基团，

[0229] 生物正交性官能团对所述免疫球蛋白单元的修饰百分率 $r$ 为65~135%。

[0230] [56][49]~[55]中任一项的抗体衍生物或其盐，其中，抗体衍生物进一步包含追加修饰部分。

[0231] [57][56]的抗体衍生物或其盐，其中，追加修饰部分为包含生物正交性官能团的追加修饰部分，所述包含生物正交性官能团的追加亲和性物质包含在抗体重链的恒定区中。

[0232] [58][57]的抗体衍生物或其盐，其中，所述包含生物正交性官能团的追加修饰部分经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰，引入至所述2个重链的恒定区中。

[0233] [59][58]的抗体衍生物或其盐，其中，所述2个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

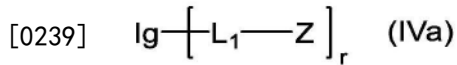
[0234] [60]抗体和功能性物质的缀合物或其盐，其包含：(a) 包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b) 功能性物质，并且(c) 功能性物质仅引入至所述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中。

[0235] [61][60]的缀合物或其盐，其中，功能性物质经由存在于所述一个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰，仅引入至所述一个重链的恒定区中。

[0236] [62][60]或[61]的缀合物或其盐，其中，所述一个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

[0237] [63][60]~[62]中任一项的缀合物或其盐，其中，缀合物或其盐包含下述式(IVa)所表示的结构单元：

[0238] [化学式15]



[0240] 式中,

[0241] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

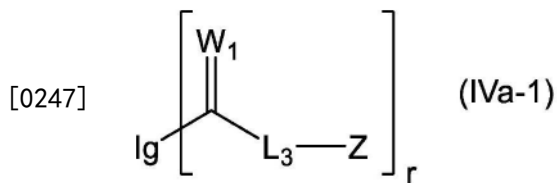
[0242]  $\text{L}_1$ 表示第1接头,

[0243] Z表示功能性物质,

[0244] 功能性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

[0245] [64][60]~[62]中任一项的缀合物或其盐,其中,缀合物或其盐包含下述式(IVa-1)所表示的结构单元:

[0246] [化学式16]



[0248] 式中,

[0249] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0250]  $\text{W}_1$ 表示氧原子或硫原子,

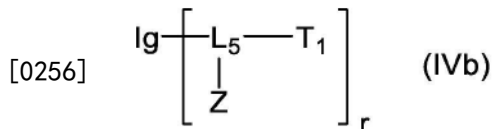
[0251]  $\text{L}_3$ 表示第3接头,

[0252] Z表示功能性物质,

[0253] 功能性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

[0254] [65][60]~[62]中任一项的缀合物或其盐,其中,缀合物或其盐包含下述式(IVb)所表示的结构单元:

[0255] [化学式17]



[0257] 式中,

[0258] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0259]  $\text{L}_5$ 表示第5接头,

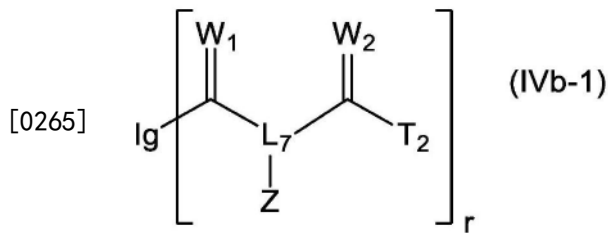
[0260] Z表示功能性物质,

[0261]  $\text{T}_1$ 表示1价基团,

[0262] 功能性物质对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。

[0263] [66][60]~[62]中任一项的缀合物或其盐,其中,缀合物或其盐包含下述式(IVb-1)所表示的结构单元:

[0264] [化学式18]



[0266] 式中,

[0267] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0268] W<sub>1</sub>和W<sub>2</sub>分别独立地表示氧原子或硫原子,

[0269] L<sub>7</sub>表示第7接头,

[0270] Z表示功能性物质,

[0271] T<sub>2</sub>表示1价基团,

[0272] 功能性物质对所述免疫球蛋白单元的修饰百分率r为65~135%。

[0273] [67][60]~[66]中任一项的缀合物或其盐,其中,功能性物质为药物、标记物质、亲和性物质、转运用物质或稳定剂。

[0274] [68][67]的缀合物或其盐,其中,亲和性物质为全长抗体或其片段。

[0275] [69][60]~[68]中任一项的缀合物或其盐,其中,缀合物进一步包含追加修饰部分。

[0276] [70][69]的缀合物或其盐,其中,追加修饰部分为包含功能性物质的追加修饰部分,所述包含功能性物质的追加修饰部分包含在抗体重链的恒定区中。

[0277] [71][70]的缀合物或其盐,其中,所述包含功能性物质的追加修饰部分经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。

[0278] [72][71]的缀合物或其盐,其中,所述2个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

[0279] [73]不含亲和性物质的抗体或其盐的制造方法,其包括:将亲和性物质修饰的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成不含亲和性物质的抗体或其盐,所述亲和性物质修饰的抗体或其盐包含:(A)包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、以及(B)抗体,并且(C)在(A)该亲和性物质与(B)抗体之间进一步包含切割性部分。

[0280] [74][73]的方法,其中,切割性部分为可通过切割在所述抗体侧生成生物正交性官能团的切割性部分,

[0281] 不含亲和性物质的抗体或其盐为包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐。

[0282] [75][74]的方法,其中,包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐为上述任一项的抗体衍生物或其盐。

[0283] [76][73]的方法,其中,不含亲和性物质的抗体或其盐在所述抗体与切割性部分之间进一步包含生物正交性官能团,

[0284] 不含亲和性物质的抗体或其盐为包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐。

[0285] [77][76]的方法,其中,包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐为上述任一项的抗体衍生物或其盐。

- [0286] [78]包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括下述(1)和(2):
- [0287] (1)通过[74]的方法制造包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐:以及
- [0288] (2)使包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐。
- [0289] [79][78]的方法,其中,缀合物或其盐为上述任一项的缀合物或其盐。
- [0290] [80]包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括下述(1)和(2):
- [0291] (1)通过[76]的方法制造包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐:以及
- [0292] (2)使包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐。
- [0293] [81][78]的方法,其中,缀合物或其盐为上述任一项的缀合物或其盐。
- [0294] [82]包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,该方法包括:使包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐,
- [0295] 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐包含:(a)包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b)生物正交性官能团,并且(c)生物正交性官能团仅引入至所述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中,
- [0296] 包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐包含:(a)包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b)功能性物质,并且(c)功能性物质仅引入至所述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中。
- [0297] [83][80]的方法,其中,包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐为上述任一项的抗体衍生物或其盐。
- [0298] [84][80]的方法,其中,缀合物或其盐为上述任一项的缀合物或其盐。
- [0299] [85]亲和性物质或其盐,其包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分。
- [0300] [86][85]的亲和性物质或其盐,其中,亲和性物质由下述式(A)表示:
- [0301]  $AP1-L_A-AP2(A)$
- [0302] 式中,
- [0303] AP1表示对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性肽,
- [0304] AP2表示对抗体重链的恒定区具有亲和性的第2亲和性肽,
- [0305]  $L_A$ 表示接头。
- [0306] [87][85]或[86]的亲和性物质或其盐,其中,亲和性物质仅包含1个特定的反应性基团。
- [0307] [88][85]~[87]中任一项的亲和性物质或其盐,其中,亲和性物质为包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性肽和第2亲和性肽的亲和性多肽。
- [0308] [89][85]~[88]中任一项的亲和性物质或其盐,其中,亲和性多肽由下述式(A')表示:
- [0309]  $AP1-PL_A-AP2(A')$
- [0310] 式中,
- [0311] AP1表示对抗体重链的恒定区具有亲和性、且存在于亲和性多肽的N末端侧的第1

亲和性肽,

[0312] AP2表示对抗体重链的恒定区具有亲和性、且存在于亲和性多肽的C末端侧的第2亲和性肽,

[0313] PL<sub>A</sub>表示肽接头。

[0314] [90][85]~[89]中任一项的亲和性物质或其盐,其中,亲和性多肽:(i)仅包含1个在侧链具有氨基的氨基酸残基,或(ii)包含未保护的N末端氨基。

[0315] [91][90]的亲和性物质或其盐,其中,在侧链具有氨基的氨基酸残基为赖氨酸残基。

[0316] [92][85]~[89]中任一项的亲和性物质或其盐,其中,亲和性多肽在N末端进一步包含由Gln-Glu-Thr(QET)构成的三肽。

[0317] [93][89]~[92]中任一项的亲和性物质或其盐,其中,肽接头具有由20个以上的氨基酸残基构成的长度。

[0318] [94][85]~[93]中任一项的亲和性物质或其盐,其中,第1亲和性肽和第2亲和性肽的一者为对抗体重链的恒定区具有亲和性、且具有1个赖氨酸残基的亲和性肽,并且

[0319] 第1亲和性肽和第2亲和性肽的另一者为对抗体重链的恒定区具有亲和性、且不具有赖氨酸残基的亲和性肽。

[0320] [95]多核苷酸,其编码亲和性多肽,所述亲和性多肽包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性肽和第2亲和性肽。

[0321] [96]表达载体,其包含[95]的多核苷酸和与其可操作地连接的启动子。

[0322] [97]宿主细胞,其包含表达单元,所述表达单元包含[95]的多核苷酸和与其可操作地连接的启动子。

[0323] [98]包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,第1修饰部分以及第2修饰部分包含在抗体重链的恒定区中,所述第1修饰部分包含:包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的第1亲和性物质,所述第2修饰部分包含:包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第3亲和性部分和第4亲和性部分的第2亲和性物质。

[0324] [99][98]的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其包含:(a)包含由第1重链和第2重链构成的2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b)所述第1修饰部分和第2修饰部分,

[0325] (c)所述第1修饰部分引入至所述免疫球蛋白单元中的第1重链的恒定区中,并且

[0326] (d)所述第2修饰部分引入至所述免疫球蛋白单元中的第2重链的恒定区中。

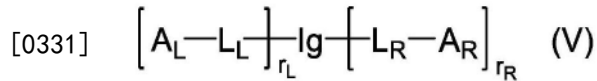
[0327] [100][98]或[99]的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述第1修饰部分经由存在于所述第1重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述第1重链的恒定区中,并且所述第2修饰部分经由存在于所述第2重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述第2重链的恒定区中。

[0328] [101][100]的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述第1重链的恒定区中的1个以上位点和所述第2重链的恒定区中的1个以上位点为选自下述的位点:依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位和317位,以及它们的组合。

[0329] [102][98]~[101]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,包含第1修饰

部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(V)所表示的结构单元:

[0330] [化学式19]



[0332] 式中,

[0333]  $I_g$ 表示包含由第1重链和第2重链构成的2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[0334]  $L_L$ 和 $L_R$ 分别独立地表示接头,

[0335]  $A_L$ 表示所述第1亲和性物质,

[0336]  $A_R$ 表示所述第2亲和性物质,

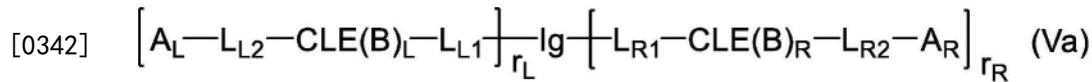
[0337] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0338] [103][98]~[102]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述抗体或其盐在(i')所述第1亲和性物质与(ii')所述免疫球蛋白单元之间进一步包含(iii')第1切割性部分;和/或在(ii'')所述第2亲和性物质与(ii'')所述免疫球蛋白单元之间进一步包含(iii'')第2切割性部分。

[0339] [104][103]的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述第1切割性部分和第2切割性部分为可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成生物正交性官能团的切割性部分。

[0340] [105][98]~[104]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(Va)所表示的结构单元:

[0341] [化学式20]



[0343] 式中,

[0344]  $I_g$ 表示所述免疫球蛋白单元,

[0345]  $L_{L1}$ 和 $L_{R1}$ 分别独立地表示第1接头,

[0346]  $L_{L2}$ 和 $L_{R2}$ 分别独立地表示第2接头,

[0347]  $CLE(B)_L$ 和 $CLE(B)_R$ 分别独立地表示可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成生物正交性官能团的切割性部分,

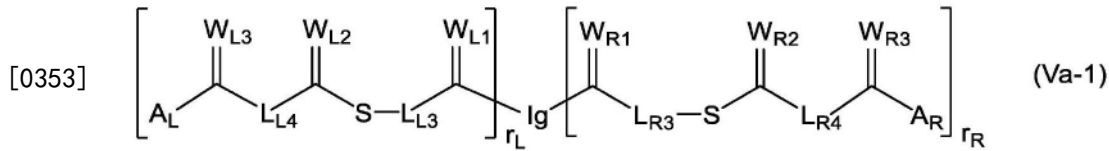
[0348]  $A_L$ 表示所述第1亲和性物质,

[0349]  $A_R$ 表示所述第2亲和性物质,

[0350] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0351] [106][98]~[104]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(Va-1)所表示的结构单元:

[0352] [化学式21]



[0354] 式中,

[0355] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0356]  $\text{W}_{L1}$ 、 $\text{W}_{L2}$ 和 $\text{W}_{L3}$ 、以及 $\text{W}_{R1}$ 、 $\text{W}_{R2}$ 和 $\text{W}_{R3}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[0357]  $\text{L}_{L3}$ 和 $\text{L}_{R3}$ 分别独立地表示第3接头,

[0358]  $\text{L}_{L4}$ 和 $\text{L}_{R4}$ 分别独立地表示第4接头,

[0359] S表示硫原子,

[0360]  $\text{A}_L$ 表示所述第1亲和性物质,

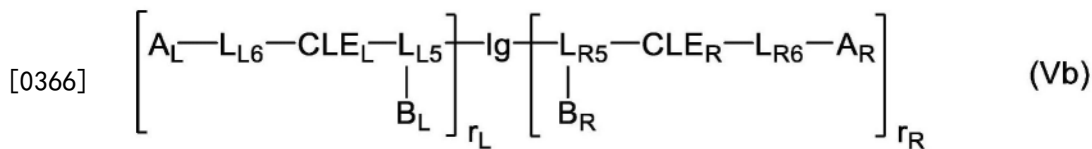
[0361]  $\text{A}_R$ 表示所述第2亲和性物质,

[0362] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0363] [107][98]~[106]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述抗体或其盐在(ii')所述免疫球蛋白单元与(iii')所述第1切割性部分之间进一步包含(iv')第1生物正交性官能团;和/或在(ii'')所述免疫球蛋白单元与(iii'')所述第2切割性部分之间进一步包含(iv'')第2生物正交性官能团。

[0364] [108][98]~[107]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(Vb)所表示的结构单元:

[0365] [化学式22]



[0367] 式中,

[0368] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0369]  $\text{L}_{L5}$ 和 $\text{L}_{R5}$ 分别独立地表示第5接头,

[0370]  $\text{L}_{L6}$ 和 $\text{L}_{R6}$ 分别独立地表示第6接头,

[0371]  $\text{B}_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

[0372]  $\text{B}_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

[0373]  $\text{CLE}_L$ 和 $\text{CLE}_R$ 分别独立地表示切割性部分,

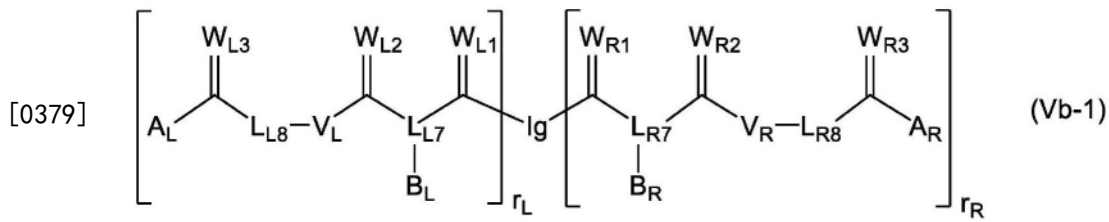
[0374]  $\text{A}_L$ 表示所述第1亲和性物质,

[0375]  $\text{A}_R$ 表示所述第2亲和性物质,

[0376] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0377] [109][98]~[108]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(Vb-1)所表示的结构单元:

[0378] [化学式23]



[0380] 式中,

[0381] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0382]  $\text{W}_{L1}$ 、 $\text{W}_{L2}$ 和 $\text{W}_{L3}$ 、以及 $\text{W}_{R1}$ 、 $\text{W}_{R2}$ 和 $\text{W}_{R3}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[0383]  $\text{L}_{L7}$ 和 $\text{L}_{R7}$ 分别独立地表示第7接头,

[0384]  $\text{L}_{L8}$ 和 $\text{L}_{R8}$ 分别独立地表示第8接头,

[0385]  $\text{B}_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

[0386]  $\text{B}_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

[0387]  $\text{V}_L$ 和 $\text{V}_R$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[0388]  $\text{A}_L$ 表示所述第1亲和性物质,

[0389]  $\text{A}_R$ 表示所述第2亲和性物质,

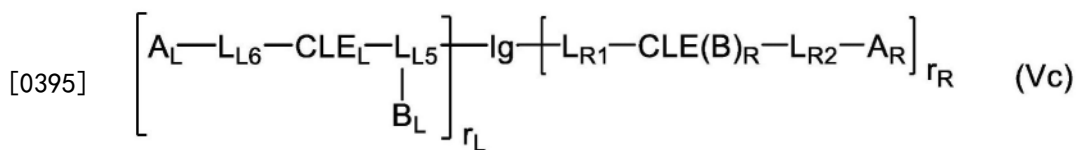
[0390] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0391] [110][98]~[109]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述抗体或其盐在(i')所述第1亲和性物质与(ii')所述免疫球蛋白单元之间进一步包含(iii')第1切割性部分,并且在(ii'')所述免疫球蛋白单元与(iii'')第2切割性部分之间进一步包含(iv'')第1生物正交性官能团,

[0392] 所述第1切割性部分为可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成第2生物正交性官能团的切割性部分。

[0393] [111][98]~[110]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(Vc)所表示的结构单元:

[0394] [化学式24]



[0396] 式中,

[0397] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0398]  $\text{L}_{R1}$ 表示第1接头,

[0399]  $\text{L}_{R2}$ 表示第2接头,

[0400]  $\text{L}_{L5}$ 表示第5接头,

[0401]  $\text{L}_{L6}$ 表示第6接头,

[0402]  $\text{B}_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的基团,

[0403]  $\text{CLE}_L$ 表示第1切割性部分,

[0404]  $\text{CLE}(\text{B})_R$ 表示可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成第2生物正交性官能团的第2切割性部分,

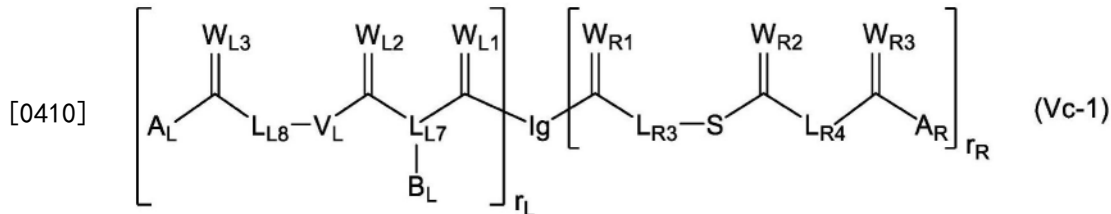
[0405]  $A_L$ 表示所述第1亲和性物质,

[0406]  $A_R$ 表示所述第2亲和性物质,

[0407] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0408] [112][98]~[111]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体包含下述式(Vc-1)所表示的结构单元:

[0409] [化学式25]



[0411] 式中,

[0412] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0413]  $W_{L1}$ 、 $W_{L2}$ 和 $W_{L3}$ 、以及 $W_{R1}$ 、 $W_{R2}$ 和 $W_{R3}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[0414]  $L_{R3}$ 分别独立地表示第3接头,

[0415]  $L_{R4}$ 分别独立地表示第4接头,

[0416]  $L_{L7}$ 分别独立地表示第7接头,

[0417]  $L_{L8}$ 分别独立地表示第8接头,

[0418]  $B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的基团,

[0419]  $V_L$ 表示氧原子或硫原子,

[0420]  $A_L$ 表示所述第1亲和性物质,

[0421]  $A_R$ 表示所述第2亲和性物质,

[0422] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0423] [113][98]~[112]中任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,亲和性物质修饰的抗体进一步包含追加修饰部分。

[0424] [114][113]的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,追加修饰部分为包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第5亲和性部分的追加亲和性物质,所述追加亲和性物质包含在抗体重链的恒定区中。

[0425] [115][114]的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述追加亲和性物质经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。

[0426] [116][115]的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,所述2个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

[0427] [117]包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐的制造方法,其包括以下的(1)和(2):

[0428] (1)使化合物或其盐与包含免疫球蛋白单元的抗体反应,生成在所述免疫球蛋白单元的重链的恒定区中包含第1修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐,所述化合物或

其盐包含：(A) 包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分第1亲和性物质、和(B) 针对抗体的第1反应性基团,所述免疫球蛋白单元包含2个重链和根据需要的2个轻链,所述第1修饰部分包含所述第1亲和性物质;以及

[0429] (2) 使在所述免疫球蛋白单元的重链的恒定区中包含所述第1亲和性物质的亲和性物质修饰的抗体或其盐与化合物或其盐反应,生成在所述免疫球蛋白单元的重链的恒定区中包含所述第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐,所述化合物或其盐包含:包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第3亲和性部分和第4亲和性部分第2亲和性物质、和(B) 针对抗体的第2反应性基团。

[0430] [118] [117]的方法,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐为上述任一项的亲和性物质修饰的抗体或其盐。

[0431] [119]包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐,其包含第1修饰部分和第2修饰部分,所述第1修饰部分包含:(a) 包含由第1重链和第2重链构成的2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b) 第1生物正交性官能团,所述第2修饰部分包含第2生物正交性官能团,

[0432] (c) 第1修饰部分引入至所述第1重链的恒定区中,

[0433] (d) 第2修饰部分引入至所述第2重链的恒定区中,并且

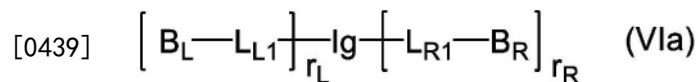
[0434] (e) 第1修饰部分和第2修饰部分彼此不同。

[0435] [120] [119]的抗体衍生物或其盐,其中,所述第1修饰部分经由存在于所述第1重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述第1重链的恒定区中,并且所述第2修饰部分经由存在于所述第2重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述第2重链的恒定区中。

[0436] [121] [119]或[120]的抗体衍生物或其盐,其中,所述第1重链的恒定区中的1个以上位点和所述第2重链的恒定区中的1个以上位点为选自下述的位点:依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位和317位,以及它们的组合。

[0437] [122] [119] ~ [121]中任一项的抗体衍生物或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐包含下述式(VIa)所表示的结构单元:

[0438] [化学式26]



[0440] 式中,

[0441] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0442]  $\text{L}_{L1}$ 和 $\text{L}_{R1}$ 分别独立地表示第1接头,

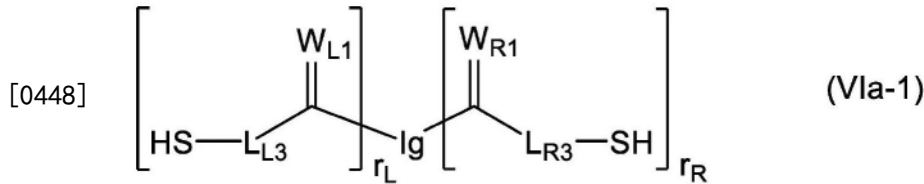
[0443]  $\text{B}_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

[0444]  $\text{B}_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

[0445] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65 ~ 135%。

[0446] [123] [119] ~ [122]中任一项的抗体衍生物或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐包含下述式(VIa-1)所表示的结构单元:

[0447] [化学式27]



[0449] 式中,

[0450] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0451]  $\text{W}_{\text{L}1}$ 和 $\text{W}_{\text{R}1}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

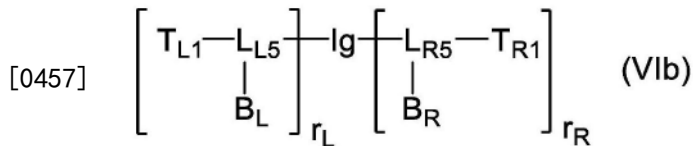
[0452]  $\text{L}_{\text{L}3}$ 和 $\text{L}_{\text{R}3}$ 分别独立地表示第3接头,

[0453] SH表示作为生物正交性官能团的硫醇基,

[0454] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_{\text{L}}$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_{\text{R}}$ 分别为65~135%。

[0455] [124][119]~[123]中任一项的抗体衍生物或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐包含下述式(VIb)所表示的结构单元:

[0456] [化学式28]



[0458] 式中,

[0459] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0460]  $\text{L}_{\text{L}5}$ 和 $\text{L}_{\text{R}5}$ 分别独立地表示第5接头,

[0461]  $\text{B}_{\text{L}}$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

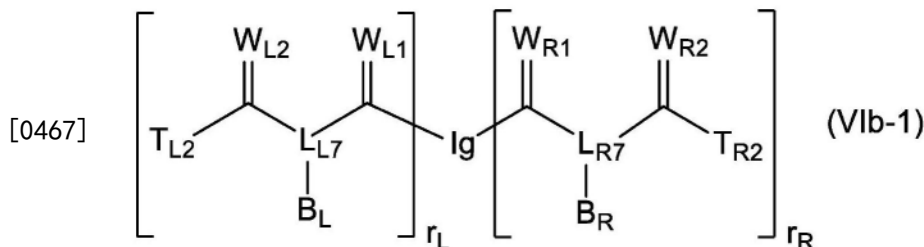
[0462]  $\text{B}_{\text{R}}$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

[0463]  $\text{T}_{\text{L}1}$ 和 $\text{T}_{\text{R}1}$ 分别独立地表示1价基团,

[0464] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_{\text{L}}$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_{\text{R}}$ 分别为65~135%。

[0465] [125][119]~[124]中任一项的抗体衍生物或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐包含下述式(VIb-1)所表示的结构单元:

[0466] [化学式29]



[0468] 式中,

[0469] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0470]  $\text{W}_{\text{L}1}$ 和 $\text{W}_{\text{L}2}$ 、以及 $\text{W}_{\text{R}1}$ 和 $\text{W}_{\text{R}2}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[0471]  $\text{L}_{\text{L}7}$ 和 $\text{L}_{\text{R}7}$ 分别独立地表示第7接头,

[0472]  $\text{B}_{\text{L}}$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

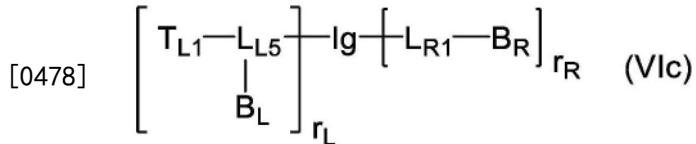
[0473]  $B_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

[0474]  $T_{L2}$ 和 $T_{R2}$ 分别独立地表示1价基团,

[0475] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0476] [126][119]~[125]中任一项的抗体衍生物或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐包含下述式(VIc)所表示的结构单元:

[0477] [化学式30]



[0479] 式中,

[0480] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0481]  $L_{R1}$ 表示第1接头,

[0482]  $L_{L5}$ 表示第5接头,

[0483]  $B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

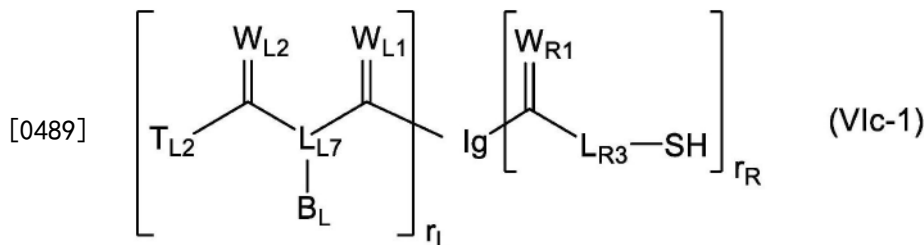
[0484]  $B_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

[0485]  $T_{L1}$ 表示1价基团,

[0486] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0487] [127][119]~[126]中任一项的抗体衍生物或其盐,其中,包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐包含下述式(VIc-1)所表示的结构单元:

[0488] [化学式31]



[0490] 式中,

[0491] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0492]  $W_{L1}$ 和 $W_{L2}$ 、以及 $W_{R1}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[0493]  $L_{R3}$ 表示第3接头,

[0494]  $L_{L7}$ 表示第7接头,

[0495]  $B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

[0496] SH表示作为第2生物正交性官能团的硫醇基,

[0497]  $T_{L2}$ 表示1价基团,

[0498] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0499] [128][119]~[127]中任一项的抗体衍生物或其盐,其中,抗体衍生物进一步包含

追加修饰部分。

[0500] [129][128]的抗体衍生物或其盐,其中,追加修饰部分为包含生物正交性官能团的追加修饰部分,所述包含生物正交性官能团的追加修饰部分包含在抗体重链的恒定区中。

[0501] [130][129]的抗体衍生物或其盐,其中,所述包含生物正交性官能团的追加修饰部分经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。

[0502] [131][130]的抗体衍生物或其盐,其中,所述2个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

[0503] [132]抗体以及第1修饰部分和第2修饰部分的缀合物或其盐,其包含第1修饰部分和第2修饰部分,所述第1修饰部分包含:(a)包含由第1重链和第2重链构成的2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b)第1功能性物质,所述第2修饰部分包含第2功能性物质,

[0504] (c)第1修饰部分引入至所述第1重链的恒定区中,

[0505] (d)第2修饰部分引入至所述第2重链的恒定区中,并且

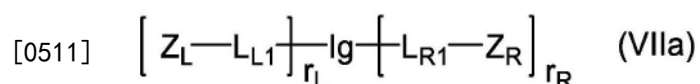
[0506] (e)第1修饰部分和第2修饰部分彼此不同。

[0507] [133][132]的缀合物或其盐,其中,所述第1修饰部分经由存在于所述第1重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述第1重链的恒定区中,并且所述第2修饰部分经由存在于所述第2重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述第2重链的恒定区中。

[0508] [134][132]或[133]的缀合物或其盐,其中,所述第1重链的恒定区中的1个以上位点和所述第2重链的恒定区中的1个以上位点为选自下述的位点:依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位和317位,以及它们的组合。

[0509] [135][132]~[134]中任一项的缀合物或其盐,其中,所述缀合物或其盐包含下述式(VIIa)所表示的结构单元:

[0510] [化学式32]



[0512] 式中,

[0513] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0514]  $L_{L1}$ 和 $L_{R1}$ 分别独立地表示第1接头,

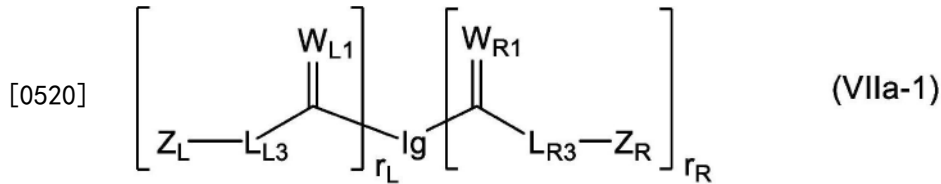
[0515]  $Z_L$ 表示第1功能性物质,

[0516]  $Z_R$ 表示第2功能性物质,

[0517] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0518] [136][132]~[135]的缀合物或其盐,其中,所述缀合物或其盐包含下述式(VIIa-1)所表示的结构单元:

[0519] [化学式33]



[0521] 式中,

[0522]  $\text{I}_g$ 表示所述免疫球蛋白单元,

[0523]  $\text{W}_{L1}$ 和 $\text{W}_{R1}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[0524]  $\text{L}_{L3}$ 和 $\text{L}_{R3}$ 分别独立地表示第3接头,

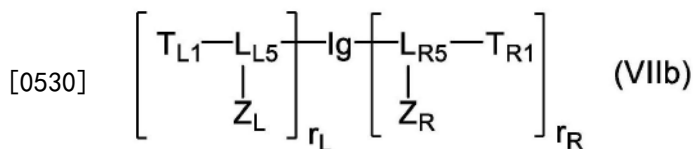
[0525]  $\text{Z}_L$ 表示第1功能性物质,

[0526]  $\text{Z}_R$ 表示第2功能性物质,

[0527] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0528] [137][132]~[136]的缀合物或其盐,其中,所述缀合物或其盐包含下述式(VIIb)所表示的结构单元:

[0529] [化学式34]



[0531] 式中,

[0532]  $\text{I}_g$ 表示所述免疫球蛋白单元,

[0533]  $\text{L}_{L5}$ 和 $\text{L}_{R5}$ 分别独立地表示第5接头,

[0534]  $\text{Z}_L$ 表示第1功能性物质,

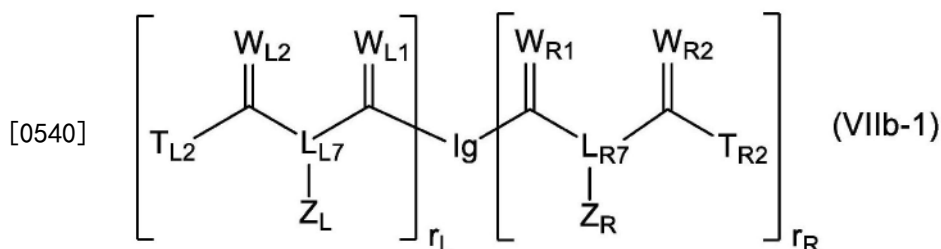
[0535]  $\text{Z}_R$ 表示第2功能性物质,

[0536]  $\text{T}_{L1}$ 和 $\text{T}_{R1}$ 分别独立地表示1价基团,

[0537] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0538] [138][132]~[137]的缀合物或其盐,其中,所述缀合物或其盐包含下述式(VIIb-1)所表示的结构单元:

[0539] [化学式35]



[0541] 式中,

[0542]  $\text{I}_g$ 表示所述免疫球蛋白单元,

[0543]  $\text{W}_{L1}$ 和 $\text{W}_{L2}$ 、以及 $\text{W}_{R1}$ 和 $\text{W}_{R2}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[0544]  $\text{L}_{L7}$ 和 $\text{L}_{R7}$ 分别独立地表示第7接头,

[0545]  $Z_L$ 表示第1功能性物质,

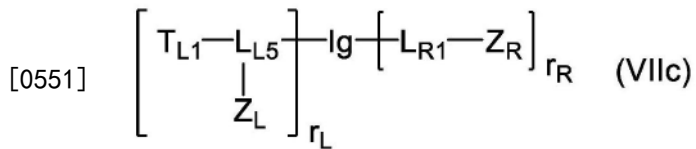
[0546]  $Z_R$ 表示第2功能性物质,

[0547]  $T_{L2}$ 和 $T_{R2}$ 分别独立地表示1价基团,

[0548] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0549] [139][132]~[138]的缀合物或其盐,其中,所述缀合物或其盐包含下述式(VIIc)所表示的结构单元:

[0550] [化学式36]



[0552] 式中,

[0553] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0554]  $L_{R1}$ 表示第1接头,

[0555]  $L_{L5}$ 表示第5接头,

[0556]  $Z_L$ 表示第1功能性物质,

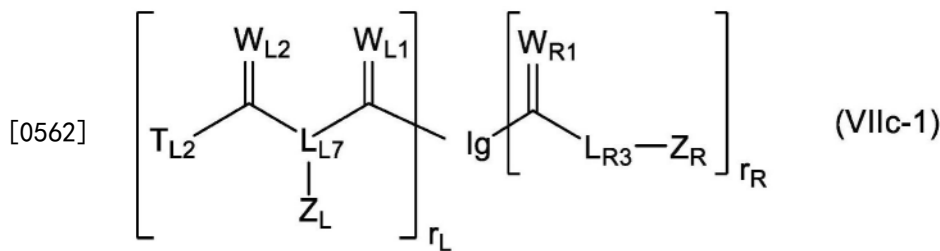
[0557]  $Z_R$ 表示第2功能性物质,

[0558]  $T_{L1}$ 表示1价基团,

[0559] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0560] [140][132]~[139]的缀合物或其盐,其中,所述缀合物或其盐包含下述式(VIIc-1)所表示的结构单元:

[0561] [化学式37]



[0563] 式中,

[0564] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[0565]  $W_{L1}$ 和 $W_{L2}$ 、以及 $W_{R1}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[0566]  $L_{R3}$ 表示第3接头,

[0567]  $L_{L7}$ 表示第7接头,

[0568]  $Z_L$ 表示第1功能性物质,

[0569]  $Z_R$ 表示第2功能性物质,

[0570]  $T_{L2}$ 表示1价基团,

[0571] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[0572] [141][132] ~ [140]的缀合物或其盐,其中,第1功能性物质和第2功能性物质分别独立地为药物、标记物质、亲和性物质、转运用物质或稳定剂。

[0573] [142][132] ~ [141]的缀合物或其盐,其中,第1功能性物质和第2功能性物质的一者为全长抗体或其片段,或者第1功能性物质和第2功能性物质的两者分别独立地为全长抗体或其片段。

[0574] [143][132] ~ [142]的缀合物或其盐,其中,缀合物进一步包含追加修饰部分。

[0575] [144][143]的缀合物或其盐,其中,追加修饰部分为包含功能性物质的追加修饰部分,所述包含功能性物质的追加修饰部分包含在抗体重链的恒定区中。

[0576] [145][144]的缀合物或其盐,其中,所述包含功能性物质的追加修饰部分经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。

[0577] [146][145]的缀合物或其盐,其中,所述2个重链的恒定区中的1个以上位点为依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。

[0578] 发明效果

[0579] 根据本发明,可容易地仅修饰抗体的构成单元(包含2个重链的免疫球蛋白单元)中的一个重链。

[0580] 另外,根据本发明,可提供容易地仅修饰抗体的构成单元中的一个重链,同时位点选择性地修饰的抗体。

## 附图说明

[0581] [图1]图1是表示式(I)所表示的本发明的化合物或其盐对抗体的构成单元的修饰的示意图。

[0582] [图2]图2是表示本发明的一个实施方式的概要的图。

[0583] [图3]图3是表示本发明的另一个实施方式的概要的图。

[0584] [图4]图4是表示本发明的又一个实施方式的概要的图。

[0585] [图5]图5是表示本发明的又一个实施方式的概要的图。

[0586] [图6]图6是表示本发明的又一个实施方式的概要的图。

[0587] [图7]图7是表示本发明的一个实施方式的概要的图。

[0588] [图8]图8是表示本发明的另一个实施方式的概要的图。

[0589] [图9]图9是表示本发明的又一个实施方式的概要的图。

[0590] [图10]图10是表示本发明的又一个实施方式的概要的图。

[0591] [图11]图11是表示本发明的又一个实施方式的概要的图。

[0592] [图12]图12是表示本发明的又一个实施方式的概要的图。

[0593] [图13]图13是表示本发明的又一个实施方式的概要的图。

[0594] [图14]图14是表示本发明的又一个实施方式的概要的图。

[0595] [图15]图15是表示本发明的又一个实施方式的概要的图。

[0596] [图16]图16是表示各转化体中各多肽的表达的图。

[0597] [图17-1]图17-1是表示多肽QET-Z34CM-PA32-Fc3K(SEQ ID NO:1)与IgG1抗体Fc区的亲和性的传感图(Sensorgram)的图。

[0598] [图17-2]图17-2是表示多肽QET-Z34CM-PA48-Fc3K(SEQ ID NO:2)与IgG1抗体Fc区的亲和性的传感图的图。

[0599] [图17-3]图17-3是表示多肽QET-Fc3-PA32-Z34CM(SEQ ID NO:3)与IgG1抗体Fc区的亲和性的传感图的图。

[0600] [图17-4]图17-4是表示多肽QET-Fc3K-PA48-Z34CM(SEQ ID NO:4)与IgG1抗体Fc区的亲和性的传感图的图。

[0601] [图17-5]图17-5是表示多肽QET-Fc3K-PA32-ProAR(SEQ ID NO:5)与IgG1抗体Fc区的亲和性的传感图的图。

[0602] [图17-6]图17-6是表示多肽QET-Fc3K-PA48-ProAR(SEQ ID NO:6)与IgG1抗体Fc区的亲和性的传感图的图。

[0603] [图17-7]图17-7是表示多肽QET-ProAR-PA32-Z34CK(SEQ ID NO:7)与IgG1抗体Fc区的亲和性的传感图的图。

[0604] [图17-8]图17-8是表示多肽QET-ProAR-PA48-Z34CK(SEQ ID NO:8)与IgG1抗体Fc区的亲和性的传感图的图。

[0605] [图18]图18是表示肽/抗体结合比的确认结果的图。

[0606] [图19-1]图19-1是表示基于LC-MS/MS的抗体重链的恒定区内的赖氨酸残基的修饰位点的图。

[0607] [图19-2]图19-2是表示基于CID谱的依据EU编号的重链的246位或248位的赖氨酸残基修饰的图。

[0608] [图19-3]图19-3是表示基于BioPharma Finder的对248位的赖氨酸残基的修饰选择性的图。

[0609] [图20-1]图20-1是表示EGFR与西妥昔单抗的亲和性的传感图。

[0610] [图20-2]图20-2是表示新生儿Fc受体(FcRn)与西妥昔单抗的亲和性的传感图。

[0611] [图20-3]图20-3是表示FcRn与西妥昔单抗的pH依赖性亲和性的传感图。

[0612] [图21-1]图21-1是表示EGFR与双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-3)的亲和性的传感图。

[0613] [图21-2]图21-2是表示HER2与双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-3)的亲和性的传感图。

[0614] [图21-3]图21-3是表示FcRn与双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-3)的亲和性的传感图。

[0615] [图21-4]图21-4是表示FcRn与双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-3)的pH依赖性亲和性的传感图。

[0616] [图22-1]图22-1是表示EGFR与双特异性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab)(M-4)的亲和性的传感图。

[0617] [图22-2]图22-2是表示HER2与双特异性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab)(M-4)的亲和性的传感图。

[0618] [图22-3]图22-3是表示FcRn与双特异性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab)(M-4)的亲和性的传感图。

[0619] [图22-4]图22-4是表示FcRn与双特异性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab)(M-4)

的pH依赖性亲和性的传感图。

- [0620] [图23-1]图23-1是表示EGFR与三特异性抗体(M-2)的亲和性的传感图。
- [0621] [图23-2]图23-2是表示HER2与三特异性抗体(M-2)的亲和性的传感图。
- [0622] [图23-3]图23-3是表示PD-1与三特异性抗体(M-2)的亲和性的传感图。
- [0623] [图23-4]图23-4是表示FcRn与三特异性抗体(M-2)的亲和性的传感图。
- [0624] [图23-5]图23-5是表示FcRn与三特异性抗体(M-2)的pH依赖性亲和性的传感图。
- [0625] [图24-1]图24-1是表示通过流式细胞术计算出的西妥昔单抗(Cmab)、曲妥珠单抗(Tmab)、双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-3)、(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab)(M-4)、三特异性抗体(帕博利珠单抗Fab-西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-2)结合的SKBR-3细胞(HER2阳性)、A-431细胞(EGFR阳性)的阳性率的图。
- [0626] [图24-2]图24-2是表示通过流式细胞术评价西妥昔单抗(Cmab)与SKBR-3细胞(HER2阳性)、A-431细胞(EGFR阳性)和T细胞(PD-1阳性)结合的图。
- [0627] [图24-3]图24-3是表示通过流式细胞术评价曲妥珠单抗(Tmab)与SKBR-3细胞(HER2阳性)和A-431细胞(EGFR阳性)结合的图。
- [0628] [图24-4]图24-4是表示通过流式细胞术评价双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-3)与SKBR-3细胞(HER2阳性)和A-431细胞(EGFR阳性)结合的图。
- [0629] [图24-5]图24-5是表示通过流式细胞术评价双特异性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab)(M-4)与SKBR-3细胞(HER2阳性)和A-431细胞(EGFR阳性)结合的图。
- [0630] [图24-6]图24-6是表示通过流式细胞术评价帕博利珠单抗(Pb1)与T细胞(PD-1阳性)结合的图。
- [0631] [图24-7]图24-7是表示通过流式细胞术评价三特异性抗体(帕博利珠单抗Fab-西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-2)与SKBR-3细胞(HER2阳性)、A-431细胞(EGFR阳性)和T细胞(PD-1阳性)结合的图。
- [0632] [图24-8]图24-8是表示通过流式细胞术计算出的西妥昔单抗(Cmab)、帕博利珠单抗(Pb1)、三特异性抗体(帕博利珠单抗Fab-西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-2)结合的T细胞(PD-1阳性)的阳性率的图。
- [0633] [图25]图25是表示CD3-VHH-PA24H6-AzF(V-1)表达的SDS-PAGE的图。
- [0634] [图26]图26是表示CD3-VHH(V-1)的亲和性的评价结果的图。
- [0635] [图27]图27是表示CD3-VHH(V-1)的亲和性的评价结果的图。
- [0636] [图28]图28是表示6种亲和性肽的SDS-PAGE的图。

## 具体实施方式

[0637] 1.一般术语的定义

[0638] 在本说明书中,用于说明特定的发明或事项的术语和表述也可被引用到另一发明或事项的说明中。因此,用于说明特定的发明或事项的术语和表述的定义、示例和优选示例也可与此类术语和表达中说明的另一发明或事项同样。

[0639] 在本发明中,术语“抗体”如下所示。另外,术语“免疫球蛋白单元”与作为这样的抗体的构成单元的2价单体单元对应,是包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元。因此,关于免疫球蛋白单元,其来源、种类(多克隆或单克隆、同种型和全长抗体或抗体

片段)、抗原、氨基酸残基(例如,赖氨酸残基)的位点和位点选择性等的术语和表述的定义、示例和优选示例与以下说明的抗体同样,且可与表述“抗体”互换使用。

[0640] 对抗体的来源没有特别限定,例如可以是来自哺乳动物、鸟类(例如,鸡)等动物的抗体。优选地,免疫球蛋白单元来自哺乳动物。作为这样的哺乳动物,例如可举出:灵长类(例如,人、猴、黑猩猩)、啮齿类(例如,小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔)、宠物(例如,狗、猫)、家畜(例如,牛、猪、山羊)、役用动物(例如,马、绵羊),优选为灵长类或啮齿类,更优选为人。

[0641] 抗体的种类可以是多克隆抗体或单克隆抗体。抗体也可以是2价抗体(例如,IgG、IgD、IgE)或4价以上的抗体(例如,IgA抗体、IgM抗体)。优选抗体为单克隆抗体。作为单克隆抗体,例如可举出:嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、添加了规定糖链的抗体(例如,修饰成具有N型糖链结合共有序列等的糖链结合共有序列的抗体)、双特异性抗体、Fc区蛋白、Fc融合蛋白和二硫键还原抗体。作为单克隆抗体的同种型,例如可举出:IgG(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA、IgD、IgE和IgY。在本发明中,作为单克隆抗体,可利用全长抗体、或包含可变区以及CH1结构域和CH2结构域的抗体片段,但优选全长抗体。抗体优选为人IgG单克隆抗体,更优选为人IgG全长单克隆抗体。

[0642] 作为抗体的抗原,可使用任意的抗原。例如,作为这样的抗原,可举出:蛋白[包括寡肽、多肽。可以用糖等生物分子修饰的蛋白(例如,糖蛋白)]、糖链、核酸、小分子化合物。优选抗体可以是以蛋白为抗原的抗体。作为蛋白,例如可举出:细胞膜受体、除细胞膜受体以外的细胞膜蛋白(例如,细胞外基质蛋白)、配体、可溶性受体。

[0643] 更具体而言,作为抗体的抗原的蛋白可以是疾病靶蛋白。作为疾病靶蛋白,例如可举出如下。

[0644] (1) 癌症领域

[0645] PD-L1、GD2、PDGFR $\alpha$ (血小板衍生生长因子受体)、CD22、HER2、磷脂酰丝氨酸(PS)、EpCAM、纤连蛋白、PD-1、VEGFR-2、CD33、HGF、gpNMB、CD27、DEC-205、叶酸受体、CD37、CD19、Trop2、CEACAM5、S1P、HER3、IGF-1R、DLL4、TNT-1/B、CPAAs、PSMA、CD20、CD105(内皮糖蛋白)、ICAM-1、CD30、CD16A、CD38、MUC1、EGFR、KIR2DL1,2、NKG2A、腱生蛋白-C、IGF(胰岛素样生长因子)、CTLA-4、间皮素、CD138、c-Met、Ang2、VEGF-A、CD79b、ENPD3、叶酸受体 $\alpha$ 、TEM-1、GM2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3、巨噬细胞抑制因子、CD74、Notch1、Notch2、Notch3、CD37、TLR-2、CD3、CSF-1R、FGFR2b、HLA-DR、GM-CSF、EphA3、B7-H3、CD123、gpA33、Frizzled7受体、DLL4、VEGF、RSP0、LIV-1、SLITRK6、Nectin-4、CD70、CD40、CD19、SEMA4D(CD100)、CD25、MET、组织因子、IL-8、EGFR、cMet、KIR3DL2、Bst1(CD157)、P-钙粘着蛋白、CEA、GITR、TAM(肿瘤相关巨噬细胞)、CEA、DLL4、Ang2、CD73、FGFR2、CXCR4、LAG-3、GITR、岩藻糖基GM1、IGF-1、血管生成素2、CSF-1R、FGFR3、OX40、BCMA、ErbB3、CD137(4-1BB)、PTK7、EFNA4、FAP、DR5、CEA、Ly6E、CA6、CEACAM5、LAMP1、组织因子、EPhA2、DR5、B7-H3、FGFR4、FGFR2、 $\alpha$ 2-PI、A33、GDF15、CAIX、CD166、ROR1、GITR、BCMA、TBA、LAG-3、EphA2、TIM-3、CD-200、EGFRvIII、CD16A、CD32B、PIGF、Axl、MICA/B、Thomsen-Friedenreich、CD39、CD37、CD73、CLEC12A、Lgr3、转铁蛋白受体、TGF $\beta$ 、IL-17、5T4、RTK、免疫抑制蛋白、NaPi2b、Lewis血型B抗原、A34、赖氨酰氧化酶、DLK-1、TROP-2、 $\alpha$ 9整联蛋白、TAG-72(CA72-4)、CD70。

[0646] (2) 自身免疫疾病/炎症性疾病

[0647] IL-17、IL-6R、IL-17R、INF- $\alpha$ 、IL-5R、IL-13、IL-23、IL-6、ActRIIB、 $\beta$ 7-整联蛋白、

IL-4 $\alpha$ R、HAS、嗜酸性粒细胞趋化因子-1、CD3、CD19、TNF- $\alpha$ 、IL-15、CD3 $\epsilon$ 、纤连蛋白、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-17、TSLP(胸腺基质淋巴细胞生成素)、LAMP( $\alpha$ 4 $\beta$ 7整联蛋白)、IL-23、GM-CSFR、TSLP、CD28、CD40、TLR-3、BAFF-R、MAdCAM、IL-31R、IL-33、CD74、CD32B、CD79B、IgE(免疫球蛋白E)、IL-17A、IL-17F、C5、FcRn、CD28、TLR4、MCAM、B7RP1、CXCR1、2配体、IL-21、钙粘着蛋白-11、CX3CL1、CCL20、IL-36R、IL-10R、CD86、TNF- $\alpha$ 、IL-7R、Kv1.3、 $\alpha$ 9整联蛋白、LIFHT。

[0648] (3) 脑神经疾病

[0649] CGRP、CD20、 $\beta$ 淀粉样蛋白、 $\beta$ 淀粉样蛋白原纤维、降钙素基因相关肽受体、LINGO(包括Ig结构域的1)、 $\alpha$ 突触核蛋白、细胞外tau、CD52、胰岛素受体、tau蛋白、TDP-43、SOD1、TauC3、JC病毒。

[0650] (4) 感染症

[0651] 艰难梭菌(*Clostridium Difficile*)毒素B、巨细胞病毒、RS病毒、LPS、金黄色葡萄球菌(*S. Aureus*) $\alpha$ -毒素、M2e蛋白、Psl、PcrV、金黄色葡萄球菌毒素、甲型流感、海藻酸盐、金黄色葡萄球菌、PD-L1、乙型流感、不动杆菌(*Acinetobacter*)、F-蛋白、Env、CD3、病原性大肠杆菌(*Escherichia coli*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、肺炎球菌(*Pneumococcus*)。

[0652] (5) 遗传病/罕见疾病

[0653] 淀粉样蛋白AL、SEMA4D(CD100)、胰岛素受体、ANGPTL3、IL4、IL13、FGF23、促肾上腺皮质激素、转甲状腺素蛋白(Transthyretin)、亨廷顿蛋白。

[0654] (6) 眼病

[0655] 因子D、IGF-1R、PGDFR、Ang2、VEGF-A、CD-105(内皮糖蛋白)、IGF-1R、 $\beta$ 淀粉样蛋白。

[0656] (7) 骨/整形外科领域

[0657] 骨硬化蛋白(Sclerostin)、肌肉生长抑制素(Myostatin)、Dickkopf-1、GDF8、RNAKL、HAS、Siglec-15。

[0658] (8) 血液疾病

[0659] vWF、因子IXa、因子X、IFN  $\gamma$ 、C5、BMP-6、膜铁转运蛋白(Ferroportin)、TFPI。

[0660] (9) 其它疾病

[0661] BAFF(B细胞活化因子)、IL-1 $\beta$ 、PCSK9、NGF、CD45、TLR-2、GLP-1、TNFR1、C5、CD40、LPA、催乳素受体、VEGFR-1、CB1、内皮糖蛋白、PTH1R、CXCL1、CXCL8、IL-1 $\beta$ 、AT2-R、IAPP。

[0662] 作为单克隆抗体的具体例,可举出:特定的嵌合抗体(例如,利妥昔单抗、巴利昔单抗、英夫利昔单抗、西妥昔单抗、司妥昔单抗、达妥昔单抗、奥他妥沙西单抗(オルタトキサシマブ))、特定的人源化抗体(例如,达利珠单抗、帕利珠单抗、曲妥珠单抗、阿仑单抗、奥马珠单抗、依法利珠单抗、贝伐珠单抗、那他珠单抗(IgG4)、托珠单抗、依库珠单抗(IgG2)、莫格利珠单抗、帕妥珠单抗、奥妥珠单抗、维得利珠单抗、帕博利珠单抗(IgG4)、美泊利珠单抗、埃罗妥珠单抗、达雷木单抗、依奇珠单抗(IgG4)、瑞替珠单抗(IgG4)、阿替利珠单抗)、特定的人抗体(例如,阿达木单抗(IgG1)、帕尼单抗、戈利木单抗、乌司奴单抗、卡那单抗、奥法妥木单抗、地舒单抗(IgG2)、伊匹单抗、贝利木单抗、雷昔库单抗、雷莫芦单抗、纳武单抗、杜匹鲁单抗(IgG4)、司库奇尤单抗、依洛尤单抗(IgG2)、阿利西尤单抗、耐昔妥珠单抗、柏达鲁单抗(IgG2)、奥拉单抗)(在未提及IgG亚型的情况下,显示为IgG1)。

[0663] 在本发明中,可位点选择性地修饰抗体中的重链恒定区中的特定氨基酸残基。作为这样的特定的氨基酸残基,例如可举出:赖氨酸残基、酪氨酸残基、丝氨酸残基和苏氨酸

残基。例如,在人IgG1等的人IgG中,由于存在于重链恒定区的下述氨基酸残基可暴露于抗体表面,因此这些氨基酸残基可用于引入特定的切割性位点(氨基酸残基的位点依据EU编号;参照[http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu\\_IGHGnber.html](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html))。

[0664] (1) 暴露赖氨酸残基

[0665] CH2结构域(例如,246位、248位、274位、288位、290位、317位、320位、322位)

[0666] CH3结构域(例如,360位、414位、439位)

[0667] (2) 暴露酪氨酸残基

[0668] CH2结构域(例如,278位、296位、300位)

[0669] CH3结构域(例如,436位)

[0670] (3) 暴露丝氨酸残基

[0671] CH2结构域(例如,254位、267位、298位)

[0672] CH3结构域(例如,400位、415位、440位)

[0673] (4) 暴露苏氨酸残基

[0674] CH2结构域(例如,256位、289位)

[0675] CH3结构域(例如,335位、359位)

[0676] 关于抗体中的氨基酸残基的位点和重链的恒定区的位点(例如,CH2结构域),依据EU编号(参照[http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu\\_IGHGnber.html](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html))。例如,在以人IgG为对象的情况下,246位的赖氨酸残基相当于人IgG CH2区的第16位的氨基酸残基,248位的赖氨酸残基相当于人IgG CH2区的第18位的氨基酸残基,288位的赖氨酸残基相当于人IgG CH2区的第58位的氨基酸残基,290位的赖氨酸残基相当于人IgG CH2区的第60位的氨基酸残基,317位的赖氨酸残基相当于人IgG CH2区的第87位的氨基酸残基。246/248位的表述表示246位或248位的赖氨酸残基是对象。288/290位的表述表示288位或290位的赖氨酸残基是对象。

[0677] 优选地,关于位点选择性地修饰的重链恒定区中的特定氨基酸残基,可位点选择性地修饰赖氨酸残基(例如,246/248位或288/290位的赖氨酸残基)。本说明书中,“位点选择性的”或“位点选择性”是指,尽管在抗体中特定的氨基酸残基没有偏向于特定的区域,但可与抗体中的特定氨基酸残基结合的规定的结构单元偏向于抗体中的特定区。因此,“位点选择性地具有”、“位点选择性的结合”、“以位点选择性的结合”等与位点选择性有关的表述是指,包含1个以上的特定氨基酸残基的靶区域中的规定的结构单元的持有率或结合率以显著水平高于包含与靶区域中的该特定氨基酸残基同种的多个氨基酸残基的非靶区域中的该结构单元的持有率或结合率。这样的位点选择性可以是50%以上,优选为60%以上,更优选为70%以上,更进一步优选为80%以上,特别优选为90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.5%以上或100%。根据本发明,可以不利用含有肽的接头,而位点选择性地修饰抗体的重链中的特定的赖氨酸残基。肽部分具有潜在的免疫原性,而且容易在血液中水解。因此,避免使用包含肽部分的接头在临床应用中是理想的。

[0678] 在本发明中,其它位点的特定氨基酸残基也可进一步被位点选择性地修饰,只要重链恒定区中的特定氨基酸残基(例如,特定位点的赖氨酸残基)被位点选择性地修饰即可。例如,关于抗体中的规定位点的特定氨基酸残基被位点选择性地修饰的方法,记载于国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2019/240287号和国际公

开第2020/090979号中。作为这样的特定氨基酸残基,可利用具有容易修饰的侧链(例如,氨基、羧基、酰胺基、羟基、硫醇基)的氨基酸残基(例如,赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基、谷氨酰胺残基、苏氨酸残基、丝氨酸残基、酪氨酸残基、半胱氨酸残基),但优选为具有包含氨基的侧链的赖氨酸残基、具有包含羟基的侧链的酪氨酸残基、丝氨酸残基和苏氨酸残基、或具有包含硫醇基的侧链的半胱氨酸残基,可更优选为赖氨酸残基(即,246/248位的赖氨酸残基、288/290位的赖氨酸残基和317位的赖氨酸残基中的2个赖氨酸残基可被位点选择性地双重修饰,3个赖氨酸残基可被位点选择性地三重修饰)。

[0679] (卤原子)

[0680] 作为卤原子,例如可举出:氟原子、氯原子、溴原子、碘原子。

[0681] (1价基团)

[0682] 作为1价基团,例如可举出:1价烃基和1价杂环基。

[0683] 1价基团可被1个以上(例如1~10个,优选为1~8个,更优选为1~6个,更进一步优选为1~5个,特别优选为1~3个)后述的取代基取代。

[0684] (1价烃基及其相关术语)

[0685] 作为1价烃基,例如可举出:1价链状烃基、1价脂环式烃基和1价芳族烃基。

[0686] 1价链状烃基是指仅由链状结构构成的烃基,主链不含环状结构。然而,链状结构可以是直链状也可以是支链状。作为1价链状烃基,例如可举出:烷基、烯基、炔基。烷基、烯基和炔基可以是直链状或支链状中的任一种。

[0687] 作为烷基,优选碳原子数1~12的烷基,更优选碳原子数1~6的烷基,进一步优选碳原子数1~4的烷基。在烷基具有取代基的情况下,上述碳原子数中不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数1~12的烷基,例如可举出:甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十二烷基。

[0688] 作为烯基,优选碳原子数2~12的烯基,更优选碳原子数2~6的烯基,进一步优选碳原子数2~4的烯基。在烯基具有取代基的情况下,上述碳原子数中不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数2~12的烯基,例如可举出:乙烯基、丙烯基、正丁烯基。

[0689] 作为炔基,优选碳原子数2~12的炔基,更优选碳原子数2~6的炔基,进一步优选碳原子数2~4的炔基。在炔基具有取代基的情况下,上述碳原子数中不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数2~12的炔基,例如可举出:乙炔基、丙炔基、正丁炔基。

[0690] 作为1价链状烃基,优选烷基。

[0691] 1价脂环式烃基是指仅包含脂环式烃作为环结构、而不含芳族环的烃基,脂环式烃可以是单环、多环中的任一种。然而,无需仅由脂环式烃构成,其一部分中可包含链状结构。作为1价脂环式烃基,例如可举出:环烷基、环烯基、环炔基,它们可以是单环、多环中的任一种。

[0692] 作为环烷基,优选碳原子数3~12的环烷基,更优选碳原子数3~6的环烷基,进一步优选碳原子数5~6的环烷基。在环烷基具有取代基的情况下,上述碳原子数中不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数3~12的环烷基,例如可举出:环丙基、环丁基、环戊基、环己基。

[0693] 作为环烯基,优选碳原子数3~12的环烯基,更优选碳原子数3~6的环烯基,进一步优选碳原子数5~6的环烯基。在环烯基具有取代基的情况下,上述碳原子数中不包括取

代基的碳原子数。作为碳原子数3~12的环烯基,例如可举出:环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基。

[0694] 作为环炔基,优选碳原子数3~12的环炔基,更优选碳原子数3~6的环炔基,进一步优选碳原子数5~6的环炔基。在环炔基具有取代基的情况下,上述碳原子数中不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数3~12的环炔基,例如可举出:环丙炔基、环丁炔基、环戊炔基、环己炔基。

[0695] 作为1价脂环式烃基,优选环烷基。

[0696] 1价芳族烃基是指包含芳族环结构的烃基。然而,无需仅由芳族环构成,其一部分中可包含链状结构或脂环式烃,芳族环可以是单环、多环中的任一种。作为1价芳族烃基,优选碳原子数为6~12的芳基,更优选碳原子数为6~10的芳基,进一步优选碳原子数为6的芳基。在1价芳族烃基具有取代基的情况下,上述碳原子数中不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数为6~12的芳基,例如可举出:苯基、萘基。

[0697] 作为1价芳族烃基,优选苯基。

[0698] 这些之中,作为1价烃基,优选烷基、环烷基、芳基。

[0699] (1价杂环基及其相关术语)

[0700] 1价杂环基是指从杂环式化合物的杂环中去除1个氢原子后的基团。1价杂环基为1价芳族杂环基或1价非芳族杂环基。作为构成杂环基的杂原子,优选包含选自氧原子、硫原子、氮原子、磷原子、硼原子和硅原子中的1种以上,更优选包含选自氧原子、硫原子和氮原子中的1种以上。

[0701] 作为1价芳族杂环基,优选碳原子数1~15的芳族杂环基,更优选碳原子数1~9的芳族杂环基,进一步优选碳原子数1~6的芳族杂环基。在1价芳族杂环基具有取代基的情况下,上述碳原子数中不包括取代基的碳原子数。作为1价芳族杂环基,例如可举出:吡咯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、吡唑基、咪唑基、噻唑基、异噻唑基、噁唑基、异噁唑基、三唑基、四唑基、吡啶基、嘌呤基、嘧啶基、咪唑基、喹啉基、异喹啉基、喹唑啉基和酞嗪基。

[0702] 作为1价非芳族杂环基,优选碳原子数2~15的非芳族杂环基,更优选碳原子数2~9的非芳族杂环基,进一步优选碳原子数2~6的非芳族杂环基。在1价非芳族杂环基具有取代基的情况下,上述碳原子数中不包括取代基的碳原子数。作为1价非芳族杂环基,例如可举出:环氧乙烷基、氮丙啶基、氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基、硫杂环丁烷基、吡咯烷基、二氢呋喃基、四氢呋喃基、二氧戊环基、四氢噻吩基、吡咯啉基、咪唑烷基、噁唑烷基、哌啶基、二氢吡喃基、四氢吡喃基、四氢噻喃基、吗啉基、硫代吗啉基、哌嗪基、二氢噁嗪基、四氢噁嗪基、二氢嘧啶基和四氢嘧啶基。

[0703] 这些之中,作为1价杂环基,优选5元或6元的杂环基。

[0704] (2价基团)

[0705] 2价基团是选自2价直链烃基、2价环状烃基、2价杂环基、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-NR_1-$ 、 $-C(=O)-NR_1-$ 、 $-NR_1-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-NR_1-$ 、 $-NR_1-C(=S)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-(O-R_2)_n-$ 和 $-(S-R_2)_m-$ 中的1个基团,或者是具有包含它们的2个以上(例如为2~10个,优选为2~8个,更优选为2~6个,更进一步优选为2~5个,特别优选为2或3个)基团的主链结构的基团。 $R_1$ 表



[0720] 是具有包含选自亚烷基、亚芳基、 $-C(=O)-$ 、 $-NR_1-$ 、 $-C(=O)-NR_1-$ 、 $-NR_1-C(=O)-$ 、 $-O-$ 和 $-(O-R_2)_n-$ 中的2个以上基团的主链结构的2价基团，

[0721]  $R_1$ 为氢原子或烷基，

[0722]  $R_2$ 为亚烷基或亚芳基，

[0723]  $n$ 可以是1~5的整数(即,1、2、3、4或5)。

[0724] 亚烷基、亚芳基、烷基与上述相同。

[0725] 2价基团中的主链结构可被1个以上(例如为1~10个,优选为1~8个,更优选为1~6个,更进一步优选为1~5个,特别优选为1~3个)后述的取代基取代。

[0726] (取代基)

[0727] 作为取代基,可举出如下:

[0728] (i) 卤原子;

[0729] (ii) 1价烃基;

[0730] (iii) 1价杂环基;

[0731] (iv) 芳烷基;

[0732] (v)  $R_a-O-$ 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 或 $R_a-C(=O)-O-$  ( $R_a$ 表示氢原子或1价烃基); 或者

[0733] (vi)  $NR_bR_c-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-O-$ 或 $R_b-C(=O)-NR_c-$  ( $R_b$ 和 $R_c$ 相同或不同地表示氢原子或1价烃基);

[0734] (vii) 硝基、硫酸基、磺酸基、氰基和羧基。

[0735] 上述取代基中的卤原子、1价烃基和1价杂环基的定义、示例和优选示例分别与上述相同。

[0736] 芳烷基是指芳基烷基。芳基烷基中的芳基和烷基的定义、示例和优选示例如上所述。作为芳烷基,优选碳原子数3~15的芳烷基。作为这样的芳烷基,例如可举出:苯甲酰基、苯乙基、萘基甲基、萘基乙基。

[0737] 优选地,取代基可如下:

[0738] (i) 卤原子;

[0739] (ii) 碳原子数1~12的烷基、苯基或萘基;

[0740] (iii) 碳原子数3~15的芳烷基;

[0741] (iv) 5元或6元的杂环;

[0742] (v)  $R_a-O-$ 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 或 $R_a-C(=O)-O-$  ( $R_a$ 表示氢原子或碳原子数1~12的烷基);

[0743] (vi)  $NR_bR_c-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-$ 、 $NR_bR_c-C(=O)-O-$ 或 $R_b-C(=O)-NR_c-$  ( $R_b$ 和 $R_c$ 相同或不同地表示氢原子或碳原子数1~12的烷基); 或者

[0744] (vii) 与上述(vii)中列举的基团相同的基团。

[0745] 更优选地,取代基可如下:

[0746] (i) 卤原子;

[0747] (ii) 碳原子数1~12的烷基;

[0748] (iii)  $R_a-O-$ 、 $R_a-C(=O)-$ 、 $R_a-O-C(=O)-$ 或 $R_a-C(=O)-O-$  ( $R_a$ 表示氢原子或碳原子数1~12的烷基);

[0749] (iv)  $\text{NR}_b\text{R}_c-$ 、 $\text{NR}_b\text{R}_c-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $\text{NR}_b\text{R}_c-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$  或  $\text{R}_b-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_c-$  ( $\text{R}_b$  和  $\text{R}_c$  相同或不同地表示氢原子或碳原子数 1~12 的烷基); 或者

[0750] (v) 与上述 (vii) 中列举的基团相同的基团。

[0751] 更进一步优选地, 取代基可如下:

[0752] (i) 卤原子;

[0753] (ii) 碳原子数 1~6 的烷基;

[0754] (iii)  $\text{R}_a-\text{O}-$ 、 $\text{R}_a-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $\text{R}_a-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$  或  $\text{R}_a-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$  ( $\text{R}_a$  表示氢原子或碳原子数 1~6 的烷基);

[0755] (iv)  $\text{NR}_b\text{R}_c-$ 、 $\text{NR}_b\text{R}_c-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $\text{NR}_b\text{R}_c-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$  或  $\text{R}_b-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_c-$  ( $\text{R}_b$  和  $\text{R}_c$  相同或不同地表示氢原子或碳原子数 1~6 的烷基); 或者

[0756] (v) 与上述 (vii) 中列举的基团相同的基团。

[0757] 特别优选地, 取代基可如下:

[0758] (i) 卤原子;

[0759] (ii) 碳原子数 1~4 的烷基;

[0760] (iii)  $\text{R}_a-\text{O}-$ 、 $\text{R}_a-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $\text{R}_a-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$  或  $\text{R}_a-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$  ( $\text{R}_a$  表示氢原子或碳原子数 1~4 的烷基);

[0761] (iv)  $\text{NR}_b\text{R}_c-$ 、 $\text{NR}_b\text{R}_c-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $\text{NR}_b\text{R}_c-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$  或  $\text{R}_b-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_c-$  ( $\text{R}_b$  和  $\text{R}_c$  相同或不同地表示氢原子或碳原子数 1~4 的烷基); 或者

[0762] (v) 与上述 (vii) 中列举的基团相同的基团。

[0763] (生物正交性官能团)

[0764] 生物正交性官能团是指, 不与生物构成成分 (例如, 氨基酸、蛋白、核酸、脂质、糖、磷酸) 反应或与生物构成成分的反应速度慢、但选择性地与生物构成成分以外的成分反应的基团。生物正交性官能团在该技术领域是已知的 (例如, 参照 Sharpless K.B. 等人, *Angew. Chem. Int.* 第 40 版, 2004 (2015); Bertozzi C.R. 等人, *Science* 291, 2357 (2001); Bertozzi C.R. 等人, *Nature Chemical Biology* 1, 13 (2005))。

[0765] 在本发明中, 作为生物正交性官能团, 使用针对蛋白的生物正交性官能团。这是由于适合用本发明的试剂衍生的抗体为蛋白。针对蛋白的生物正交性官能团是不与构成蛋白的 20 种天然氨基酸残基的侧链反应或与该侧链的反应速度慢、但与目标官能团反应的基团。构成蛋白的 20 种天然氨基酸为丙氨酸 (A)、天冬酰胺 (N)、半胱氨酸 (C)、谷氨酰胺 (Q)、甘氨酸 (G)、异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、蛋氨酸 (M)、苯丙氨酸 (F)、脯氨酸 (P)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、色氨酸 (W)、酪氨酸 (Y)、缬氨酸 (V)、天冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E)、精氨酸 (R)、组氨酸 (H) 和赖氨酸 (K)。在这些 20 种天然氨基酸中, 不具侧链 (即, 为氢原子) 的甘氨酸、以及侧链为烷基 (即, 在侧链不含选自硫原子、氮原子和氧原子的杂原子) 的丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和缬氨酸对通常的反应呈惰性。因此, 针对蛋白的生物正交性官能团是如下的基团: 其除了不与具有对通常的反应呈惰性的侧链的这些氨基酸的侧链反应之外, 也不与天冬酰胺、谷氨酰胺、蛋氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、组氨酸和赖氨酸的侧链反应, 或者反应速度慢, 但与目标官能团反应。

[0766] 作为这样的生物正交性官能团, 例如可举出: 叠氮残基、醛残基、硫醇残基、烯烃残基 (换言之, 只要具有作为具有碳碳双键的最小单元的亚乙烯基 (ethenylene) 部分即可。下

同)、炔烃残基(换言之,只要具有作为具有碳碳三键的最小单元的亚乙炔基部分即可。下同)、卤素残基、四嗪残基、硝酮残基、羟胺残基、腈残基、肼残基、酮残基、硼酸残基、氰基苯并噻唑残基、烯丙基残基、膦残基、马来酰亚胺残基、二硫化物残基、硫酸酯残基、 $\alpha$ -卤代羰基残基(例如,在 $\alpha$ 位上具有氟原子、氯原子、溴原子或碘原子的羰基残基。下同)、异腈残基、悉尼酮残基、硒残基。

[0767] 生物正交性官能团可受保护也可不受保护。生物正交性官能团是指,未保护的生物正交性官能团或受保护的生物正交性官能团。未保护的生物正交性官能团相当于上述的生物正交性官能团。受保护的生物正交性官能团是通过保护基的切割而生成生物正交性官能团的基团。保护基的切割可在不会引起蛋白的变性/降解(例如,酰胺键的切割)的条件下通过特定处理来进行。作为这样的特定处理,例如可举出:(a)通过选自酸性物质、碱性物质、还原剂、氧化剂、酶中的1种以上物质进行的处理;(b)通过选自光的物理化学刺激进行的处理;或(c)在使用了包含自分解性的切割性部分的切割性接头的情况下的放置。这样的保护基及其切割条件是该领域中的技术常识(例如,G.Leriche,L.Chisholm,A.Wagner,Bioorganic&Medicinal Chemistry.20,571(2012);Feng P.等人,Journal of American Chemical Society.132,1500(2010);Bessodes M.等人,Journal of Controlled Release,99,423(2004);DeSimone,J.M.,Journal of American Chemical Society.132,17928(2010);Thompson,D.H.,Journal of Controlled Release,91,187(2003);Schoenmarks,R.G.,Journal of Controlled Release,95,291(2004))。关于温和条件的反应条件(例如,反应温度、反应时间、反应溶液),如后所述。

[0768] 作为受保护的生物正交性官能团,例如可举出:二硫化物残基、酯残基、缩醛残基、缩酮残基、亚胺残基、邻二醇(vicinal diol)残基。

[0769] 优选地,生物正交性官能团是未保护的生物正交性官能团。

[0770] 更优选地,生物正交性官能团可以是与其它生物正交性官能团的反应性(例如,反应水平和/或反应特异性)优异的特定的生物正交性官能团。作为这样的生物正交性官能团,可举出:叠氮残基、炔烃残基(优选可被上述的取代基取代的具有碳碳三键的环基)、四嗪残基、烯炔残基、硫醇残基、马来酰亚胺残基、硫醇残基、呋喃残基和卤代羰基残基。关于可相互反应的2个生物正交性官能团的组合,例如可举出:叠氮残基与炔烃残基的组合、四嗪残基与烯炔残基的组合、四嗪残基与炔烃残基的组合、硫醇残基与马来酰亚胺残基的组合、呋喃残基与马来酰亚胺残基的组合、硫醇残基与卤代羰基残基的组合(通过取代反应,卤素被硫醇取代)、硫醇残基与其它硫醇残基的组合(生成二硫键)。

[0771] (功能性物质)

[0772] 对功能性物质没有特别限定,只要是对抗体赋予任意功能的物质即可,例如可举出:药物、标记物质、亲和性物质、转运用物质、稳定剂,优选可以是药物、标记物质、亲和性物质或转运用物质。另外,功能性物质可以是单一的功能性物质,或者可以是连接有2种以上功能性物质的物质。

[0773] 作为药物,可以是针对任意疾病的药物。作为这样的疾病,例如可举出:癌症(例如,肺癌、胃癌、大肠癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、甲状腺癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫癌、骨癌、皮肤癌、脑瘤、黑色素瘤)、自身免疫疾病/炎症性疾病(例如,过敏性疾病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮)、脑神经疾病(例如,脑梗塞、阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧

索硬化症)、感染症(例如,细菌感染症、病毒感染症)、遗传病/罕见疾病(例如,遗传性球形红细胞增多症、非营养不良性肌强直病)、眼病(例如,老年性黄斑变性、糖尿病视网膜膜病变、视网膜色素变性)、骨/整形外科领域的疾病(例如,变形性关节炎)、血液疾病(例如,白血病、紫癜)、其它疾病(例如,糖尿病、高脂血症等代谢异常症、肝脏疾病、肾病、肺病、循环系统疾病、消化系统疾病)。药物可以是疾病的预防或治疗药、副作用的缓解药。

[0774] 更具体而言,药物可以是抗癌药。作为抗癌药,例如可举出:化疗药、毒素、放射性同位素或包含其的物质。作为化疗药,例如可举出:DNA损伤剂、代谢拮抗剂、酶抑制剂、DNA嵌入剂、DNA切割剂、拓扑异构酶抑制剂、DNA结合抑制剂、微管蛋白结合抑制剂、细胞毒性核苷、铂化合物。作为毒素,例如可举出:细菌毒素(例如,白喉毒素)、植物毒素(例如,蓖麻毒蛋白)。作为放射性同位素,例如可举出:氢原子的放射性同位素(例如, $^3\text{H}$ )、碳原子的放射性同位素(例如, $^{14}\text{C}$ )、磷原子的放射性同位素(例如, $^{32}\text{P}$ )、硫原子的放射性同位素(例如, $^{35}\text{S}$ )、钇的放射性同位素(例如, $^{90}\text{Y}$ )、锝的放射性同位素(例如, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、铟的放射性同位素(例如, $^{111}\text{In}$ )、碘原子的放射性同位素(例如, $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{129}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ )、钐的放射性同位素(例如, $^{153}\text{Sm}$ )、铼的放射性同位素(例如, $^{186}\text{Re}$ )、砷的放射性同位素(例如, $^{211}\text{At}$ )、铋的放射性同位素(例如, $^{212}\text{Bi}$ )。进一步具体而言,作为药物,可举出:澳瑞他汀(MMAE、MMAF)、美登素(DM1、DM4)、PBD(吡咯并苯并二氮杂萘)、IGN、喜树碱类似物、卡奇霉素(Calicheamicin)、倍癌霉素(Duocarmycin)、艾日布林(Eribulin)、蒽环类抗生素、dmDNA31、Tubulysin。

[0775] 标记物质是可检测靶标(例如,组织、细胞、物质)的物质。作为标记物质,例如可举出:酶(例如,过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶)、亲和性物质(例如,链霉亲和素、生物素、地高辛、适配体)、荧光物质(例如,荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白)、发光物质(例如,萤光素、水母素、吖啶酯、三(2,2'-联吡啶)钐、鲁米诺)、放射性同位素(例如,上述的同位素)或包含其的物质。

[0776] 亲和性物质是对靶标具有亲和性的物质。作为亲和性物质,例如可举出:抗体等亲和性蛋白或肽、适配体、凝集素、靶核酸的互补链。亲和性物质优选为亲和性蛋白或亲和性肽,可更优选为抗体。用作功能性物质的抗体来源的动物种类与上述相同。

[0777] 用作功能性物质的抗体的种类可以是多克隆抗体或单克隆抗体。抗体也可以是2价抗体(例如,IgG、IgD、IgE)或4价以上的抗体(例如,IgA抗体、IgM抗体)。优选抗体为单克隆抗体。作为单克隆抗体,例如可举出:嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、添加了规定糖链的抗体(例如,修饰成具有N型糖链结合共有序列等的糖链结合共有序列的抗体)、双特异性抗体、Fc区蛋白、Fc融合蛋白和二硫键还原抗体。作为单克隆抗体的同种型,例如可举出:IgG(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA、IgD、IgE和IgY。作为用作功能性物质的抗体,例如可举出:全长抗体及其片段(片段抗体)。片段抗体只要维持与所需抗原的结合性即可,例如可举出:Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、VHH抗体。

[0778] 用作功能性物质的抗体的抗原性可与本发明的抗体、抗体衍生物和缀合物中的免疫球蛋白单元的抗原性相同或不同,优选不同。另外,用作功能性物质的抗体的来源可与该免疫球蛋白单元的来源相同或不同,优选不同。因此,用作功能性物质的抗体可以是在上述单克隆抗体的具体例中提及的特定嵌合抗体、特定人源化抗体或特定人抗体或来自它们的抗体。用作功能性物质的抗体还可以是在上述单克隆抗体的具体例中提及的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或来自其的抗体。

[0779] 转运用物质是具有化合物的转运能力的物质。作为转运用物质,优选可在蛋白外壳(例如,多聚体)中包封化合物的物质(例如,铁蛋白、病毒颗粒、病毒样颗粒)。

[0780] 稳定剂是可使抗体稳定的物质。作为稳定剂,例如可举出:二元醇类、甘油、非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、天然系表面活性剂、糖类和多元醇类。

[0781] 另外,功能性物质可以是肽、蛋白、核酸、有机化合物、无机化合物、糖链、脂质、高分子聚合物、金属(例如,金)、螯合剂。作为肽,例如可举出:细胞穿透肽、血脑屏障穿透肽、肽药物。作为蛋白,例如可举出:酶、细胞因子、片段抗体、凝集素、干扰素、血清白蛋白、抗体、铁蛋白。作为核酸,例如可举出:DNA、RNA、人工核酸。另外,作为核酸,例如可举出:RNA干扰诱导性核酸(例如,siRNA)、适配体、反义核酸。作为有机化合物,例如可举出:诱导蛋白降解的嵌合分子、色素、光分解性化合物等小分子有机化合物。作为无机化合物,例如可举出:二氧化硅、滑石、氧化铝。

[0782] (盐)

[0783] 在本发明中,作为术语“盐”,例如可举出:与无机酸的盐、与有机酸的盐、与无机碱的盐、与有机碱的盐以及与氨基酸的盐。作为与无机酸的盐,例如可举出:与氯化氢、溴化氢、磷酸、硫酸、硝酸的盐。作为与有机酸的盐,例如可举出:与甲酸、乙酸、三氟乙酸、乳酸、酒石酸、富马酸、草酸、马来酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸、苯磺酸、对甲苯磺酸的盐。作为与无机碱的盐,例如可举出:与碱金属(例如,钠、钾)、碱土金属(例如,钙、镁)和锌、铝等其它金属、以及铵的盐。作为与有机碱的盐,例如可举出:与三甲胺、三乙胺、丙二胺、乙二胺、吡啶、乙醇胺、单烷基乙醇胺、二烷基乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺的盐。作为与氨基酸的盐,例如可举出:与碱性氨基酸(例如,精氨酸、组氨酸、赖氨酸、鸟氨酸)和酸性氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)的盐。盐优选为与无机酸(例如,氯化氢)的盐、或与有机酸(例如,三氟乙酸)的盐。

[0784] 2. 亲和性物质或其盐、以及它们的相关发明

[0785] 2-1. 亲和性物质或其盐

[0786] 本发明提供包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质或其盐。

[0787] 本发明中使用的亲和性物质包含对抗体的构成单元中的重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分。抗体的构成单元是包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元。因此,抗体的构成单元是包含2个重链和2个轻链的免疫球蛋白单元,或者是包含2个重链、且不含2个轻链的免疫球蛋白单元。作为包含含有2个重链和2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体,例如可举出:2价抗体(例如,IgG、IgD、IgE)或4价以上的抗体(例如,IgA抗体、IgM抗体)、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、双特异性抗体和二硫键还原抗体。作为包含含有2个重链、且不含2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体,例如可举出:Fc区蛋白、Fc融合蛋白和二硫键还原抗体。这是由于Fc区包含CH2结构域和CH3结构域作为重链,但不含轻链。

[0788] 第1亲和性部分和第2亲和性部分可相同也可不同。在第1亲和性部分和第2亲和性部分不同的情况下,第1亲和性部分和第2亲和性部分可以是对抗体重链的恒定区中的不同区域具有亲和性的亲和性物质(例如,第1亲和性部分和第2亲和性部分的一方对CH2结构域具有亲和性,另一方对CH3结构域具有亲和性的亲和性物质),另外,可以是对抗体重链的恒

定区中的相同区域具有亲和性的不同亲和性部分(例如,第1亲和性部分和第2亲和性部分的两方对CH2结构域或CH3结构域具有亲和性的亲和性物质),优选为对抗体重链的恒定区中的相同区域具有亲和性的不同亲和性部分。另外,作为第1亲和性部分和第2亲和性部分,优选第1亲和性部分与重链恒定区的第1缔合位点和第2亲和性部分与重链恒定区的第2缔合位点立体干扰,并且处于一方缔合可抑制另一方缔合的关系,以抑制第1亲和性部分和第2亲和性部分与单一重链恒定区的缔合等。如果存在这样的关系,则在抗体构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中,可抑制包含亲和性物质和抗体反应性基团的化合物的2个分子(第1分子和第2分子)在单一的抗体构成单元(上述免疫球蛋白单元)中竞争缔合,因此可促进仅对一个重链恒定区的特异性修饰。作为第1亲和性部分和第2亲和性部分,例如可举出:规定的结构单元的聚合物物质[例如,肽(包含寡肽、多肽、蛋白)、核酸(包含寡核酸和多糖)、糖(包含寡糖和多糖)],以及非聚合物物质(例如,小分子化合物)。作为可用作对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的物质,报道了肽、核酸、糖、小分子化合物等许多物质(例如,参照国际公开第2007/004748号、国际公开第2008/054030号、国际公开2013/027796号、国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/090979号等公开公报;Nomura Y等人,Nucleic Acids Res.,2010Nov;38(21):7822-9;Miyakawa S等人,RNA.,2008Jun;14(6):1154-63和后述的科学论文)。第1亲和性部分和第2亲和性部分优选为相同。

[0789] 另外,可用作对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的物质,可通过任意的的方法得到。例如,这样的物质可通过从任意物质的文库(例如,小分子化合物文库、肽文库、适配体文库、糖文库、噬菌体文库、mRNA文库、cDNA文库)中筛选对抗体重链的恒定区具有亲和性的物质(例如,高通量筛选法、噬菌体展示法、SELEX法、mRNA展示法、核糖体展示法、cDNA展示法、酵母展示法)而得到。另外,在筛选对抗体的Fc区或恒定区中的特定区(例如,CH2结构域、CH3结构域)具有亲和性的物质的情况下,通过使用存在于各种抗体(例如,IgG、IgA、IgM、IgD、IgE)的Fc区的特定区(例如,CH1、CH2、CH3)中的部分肽,可有效地得到能够选择性地与这样的区域结合的物质。

[0790] 第1亲和性部分和第2亲和性部分可对抗体重链的恒定区具有亲和性。例如,第1亲和性部分和第2亲和性部分也可对抗体重链的Fc区具有亲和性。或者,第1亲和性部分和第2亲和性部分可对作为重链恒定区的CH1结构域、CH2结构域或CH3结构域、或跨越它们的区域(例如,CH1结构域和CH2结构域的邻接区域、CH2结构域和CH3结构域的邻接区域)具有亲和性。第1亲和性部分和第2亲和性部分也可对相同或不同的CHX结构域(X为1、2或3)具有亲和性,优选为对相同结构域具有亲和性。在此,“对CHX结构域具有亲和性”没有特别限定,只要对CHX结构域中的至少一部分区域具有亲和性即可,也可对CHX结构域中的一部分区域具有亲和性,或可对跨越CHX结构域和其它CHX结构域的区域(例如,邻接区域)具有亲和性。因此,对CH2结构域具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分可仅对CH2结构域中的一部分区域具有亲和性,或也可对跨越CH2结构域和CH1结构域或CH3结构域的区域(例如,CH1结构域和CH2结构域的邻接区域、CH2结构域和CH3结构域的邻接区域)具有亲和性。对CH2结构域具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分优选可仅对CH2结构域中的一部分区域具有亲和性,或也可对跨越CH2结构域和CH3结构域的区域(例如,CH2结构域和CH3结构域的邻

接区域)具有亲和性,更优选可仅对CH2结构域中的一部分区域具有亲和性。

[0791] 本发明的亲和性物质或其盐可直接连接第1亲和性部分和第2亲和性部分,而且,在第1亲和性物质与第2亲和性部分之间可插入接头。在由于第1亲和性部分和第2亲和性部分与抗体重链的恒定区的结合位点接近,而且第1亲和性物质和第2亲和性部分的尺寸足够大等原因,而不需要调节第1亲和性部分与第2亲和性部分之间的距离的情况下,第1亲和性部分和第2亲和性部分可直接连接。另一方面,在由于第1亲和性部分和第2亲和性部分与抗体重链的恒定区的结合位点不接近,而且第1亲和性物质和第2亲和性部分的尺寸不足够大等原因,而需要调节第1亲和性部分与第2亲和性部分之间的距离的情况下,在第1亲和性物质与第2亲和性部分之间可插入接头。作为接头,可使用2价基团。2价基团可被取代也可不被取代。作为2价基团,可举出上述的基团。作为2价基团被取代时的取代基,可举出上述的取代基。另外,作为接头,例如可使用肽、核酸、糖、其它聚合物性物质(例如,聚乙二醇)、2价烃基(例如,烷基链)等物质。本领域技术人员可根据所使用的第1亲和性部分和第2亲和性部分的种类来适当确定接头的有无和接头的种类。优选地,从优化第1亲和性部分和第2亲和性部分与抗体重链的恒定区的结合的观点出发,可插入接头。

[0792] 第1亲和性部分和第2亲和性部分具有亲和性的抗体重链的恒定区可来自上述的动物(例如,哺乳动物、鸟类)。抗体重链的恒定区可优选为哺乳动物恒定区,更优选为灵长类恒定区或啮齿类恒定区,更进一步优选为人恒定区。

[0793] 第1亲和性部分和第2亲和性部分具有亲和性的抗体重链的恒定区可以是2价抗体(例如,IgG、IgD、IgE)、或4价以上的抗体(例如,IgA抗体、IgM抗体)的恒定区。这样的恒定区优选为2价抗体(例如,IgG、IgD、IgE)的恒定区,更优选为IgG的恒定区。

[0794] 优选地,第1亲和性部分和第2亲和性部分可以是对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲和性肽。作为这样的亲和性肽,报道了许多肽。例如,这样的亲和性肽的例子,如下所示:

[0795] (1)对所有的人IgG(即,人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。下同)的特定区(CH2结构域)具有亲和性的各种IgG结合肽(例如,参照国际公开第2008/054030号、国际公开2013/027796号、国际公开第2016/186206号);

[0796] (2)对所有的人IgG的特定区(CH2结构域)具有亲和性的蛋白A模拟肽(ProteinA Mimetic(PAM)peptide)(例如,参照Fassina G等人,JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, 1996,第6卷,564-569);

[0797] (3)对所有的人IgG的特定区(CH2结构域)具有亲和性的EPIHRSTLTALL(SEQ ID NO:27)(例如,参照Ehrlich G.K等人,J.Biochem.Biophys.Methods,2001,第49卷,443-454);

[0798] (4)对所有的人IgG的特定区(Fc区)具有亲和性的(NH<sub>2</sub>-Cys1-X1-X2-X3-X4)<sub>2</sub>-Lys-Gly-OH(例如,参照Ruvo M等人,ChemBioChem,2005,第6卷,1242-1253);

[0799] (5)对所有的人IgG的特定区(Fc区)具有亲和性的FARLVSSIRY(SEQ ID NO:28)、FGRLVSSIRY(SEQ ID NO:29)和TWKTSRISIF(SEQ ID NO:30)(例如,参照Krook M等人,Journal of Immunological Methods,1998,第221卷,151-157);

[0800] (6)对所有的人IgG的特定区具有亲和性的QSYP(SEQ ID NO:31)(例如,参照Jacobs J.M.等人,Bio.Techniques,2003,第34卷,132-141);

[0801] (7) 对所有的人IgG的特定区(Fc区)具有亲和性的HWRGWV(SEQ ID NO:32)、HYFKFD(SEQ ID NO:33)和HFRRHL(SEQ ID NO:34)(例如,参照Carbonell R.G.等人,Journal of Chromatography A,2009,第1216卷,910-918);

[0802] (8) 对所有的人IgG的特定区(Fc区)具有亲和性的DAAG(SEQ ID NO:35)(例如,参照Lund L.N.等人,Journal of Chromatography A,2012,第1225卷,158-167);

[0803] (9) 对所有的人IgG的特定区(Fc区)具有亲和性的Fc-I、Fc-II和Fc-III(例如,参照Warren L.Delano等人,Science,2000,第287卷,1279-1283;国际公开2001/045746号);以及

[0804] (10) 对所有的人IgG的特定区(Fc区)具有亲和性的NARKFYKG(SEQ ID NO:36)和NKFRGKYK(SEQ ID NO:37)(例如,参照Biochemical Engineering Journal,2013,第79卷,33-40);

[0805] (11) 对所有的人IgG的特定区(Fc区)具有亲和性的蛋白A、蛋白G、蛋白L或蛋白Z、或它们的片段(例如,Moks T等人,Eur JBiochem.1986May 2;156(3):637-43;Sjobring UJ等人,Biol Chem.1991Jan 5;266(1):399-405;Graille M等人,Structure.2001Aug;9(8):679-87;Nilsson B等人,Protein Eng.1987Feb-Mar;1(2):107-13);

[0806] (12) 对所有的人IgG的特定区(Fc区或CH2结构域)具有亲和性的多种IgG结合肽(例如,参照国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/090979号)。

[0807] 另外,亲和性肽可通过上述的筛选法(例如,使用上述文库的方法或上述的展示法)而得到。

[0808] 作为构成亲和性肽的氨基酸残基,可利用构成蛋白的通常的20种天然氨基酸或非天然氨基酸的残基。作为构成蛋白的通常的20种天然氨基酸,例如可举出:L-丙氨酸(A)、L-天冬酰胺(N)、L-半胱氨酸(C)、L-谷氨酰胺(Q)、L-异亮氨酸(I)、L-亮氨酸(L)、L-蛋氨酸(M)、L-苯丙氨酸(F)、L-脯氨酸(P)、L-丝氨酸(S)、L-苏氨酸(T)、L-色氨酸(W)、L-酪氨酸(Y)、L-缬氨酸(V)、L-天冬氨酸(D)、L-谷氨酸(E)、L-精氨酸(R)、L-组氨酸(H)、或L-赖氨酸(K)、和甘氨酸(G)(以下,省略L的标记)。

[0809] 在特定的实施方式中,可为第1亲和性肽和第2亲和性肽的一方是具有1个赖氨酸残基的亲和性肽,另一方是不具有赖氨酸残基的亲和性肽。

[0810] 作为对抗体重链的恒定区具有亲和性且具有1个赖氨酸残基的亲和性肽,报道了许多肽(例如,参照国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/090979号)。因此,在本发明中,可将这样的肽用作第1亲和性肽和第2亲和性肽的一方。

[0811] 更具体而言,作为对抗体重链的恒定区具有亲和性且具有1个赖氨酸残基的亲和性肽,可使用以下的亲和性肽:

[0812] (1) 包含国际公开第2018/199337号的SEQ ID NO:39~72的氨基酸序列的亲和性肽;

[0813] (2) 包含国际公开第2019/240288号的SEQ ID NO:5、6、37~100的氨基酸序列的亲和性肽;

[0814] (3) 包含国际公开第2019/240287号的SEQ ID NO:5、8~57、68~92的氨基酸序列

的亲亲和性肽；

[0815] (4) 在N末端具有QET的亲亲和性肽(国际公开第2020/090979号的SEQ ID NO:7~10、22~25、52、53)；和

[0816] (5) 在作为亲亲和性肽的例子而列举的上述(1)~(12)的亲亲和性肽中具有1个赖氨酸残基的亲亲和性肽。

[0817] 在特定的实施方式中,作为对抗体重链的恒定区具有亲亲和性且具有1个赖氨酸残基的亲亲和性肽,例如可举出:下述(1)~(4)的亲亲和性肽:

[0818] (1) 包含RGNCAYHKGQIIWCTYH(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列(Fc3K)的亲亲和性肽;

[0819] (2) 包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲亲和性的亲亲和性肽:在RGNCAYHKGQIIWCTYH(SEQ ID NO:38)的氨基酸序列中,赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列;

[0820] (3) 包含FNKQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列(Z34CK)的亲亲和性肽;以及

[0821] (4) 包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲亲和性的亲亲和性肽:在FNKQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列中,赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列。

[0822] 在此,上述氨基酸序列中所含的2个半胱氨酸残基可通过二硫键交联。

[0823] 作为对抗体重链的恒定区具有亲亲和性且不具有赖氨酸残基的亲亲和性肽,报道了许多肽。另外,对抗体重链的恒定区具有亲亲和性且具有1个赖氨酸残基的上述亲亲和性肽中的赖氨酸残基,在很多情况下不是为了维持对抗体重链的恒定区的亲亲和性,而是为了与其它部分(例如,包含反应性基团的部分化合物)共价键合以衍生亲亲和性物质所引入的(例如,参照国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/090979号),因此即使将这样的赖氨酸残基取代成其它氨基酸残基,也可维持对抗体重链的恒定区的亲亲和性。因此,作为对抗体重链的恒定区具有亲亲和性且不具有赖氨酸残基的亲亲和性肽,可使用对抗体重链的恒定区具有亲亲和性的亲亲和性肽,其是在对抗体重链的恒定区具有亲亲和性且具有1个赖氨酸残基的亲亲和性肽中赖氨酸残基被取代成其它氨基酸残基(优选赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的构成蛋白的通常的天然氨基酸残基)的亲亲和性肽。

[0824] 更具体而言,作为对抗体重链的恒定区具有亲亲和性且不具有赖氨酸残基的亲亲和性肽,可使用以下的亲亲和性肽:

[0825] (1) 国际公开第2018/199337号的SEQ ID NO:20~38、73~75(Xaa1为赖氨酸残基以外的情况)、SEQ ID NO:92;

[0826] (2) 国际公开第2019/240288号的SEQ ID NO:7、11~14、108;

[0827] (3) 在作为对抗体重链的恒定区具有亲亲和性且具有1个赖氨酸残基的亲亲和性肽的例子而列举的上述(1)~(4)中赖氨酸残基被取代成其它氨基酸残基(优选半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基)的亲亲和性肽;和

[0828] (4) 在作为亲亲和性肽的例子而列举的上述(1)~(12)的亲亲和性肽中不具有赖氨酸

残基的亲性和性肽。

[0829] 在特定的实施方式中,作为不具有赖氨酸残基的亲性和性肽,例如可举出:下述(5)~(10)的亲性和性肽:

[0830] (5) 包含FNMQCRRFYALHDPNLNNEEQRNARIRSIREEC (SEQ ID NO:40)的氨基酸序列(Z34CM)的亲性和性肽;

[0831] (6) 包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲性和性肽:在FNMQCRRFYALHDPNLNNEEQRNARIRSIREEC (SEQ ID NO:40)的氨基酸序列中,半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列;

[0832] (7) 包含FNREQQNAFYELHLPNLNNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA (SEQ ID NO:41)的氨基酸序列(ProAR)的亲性和性肽;

[0833] (8) 包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲性和性肽:在FNREQQNAFYELHLPNLNNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA (SEQ ID NO:41)的氨基酸序列中,半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列;

[0834] (9) 包含RGNCAYHRGQIIWCTYH (SEQ ID NO:78)的氨基酸序列的亲性和性肽;以及

[0835] (10) 包含下述氨基酸序列、且对抗体重链的恒定区具有亲和性的亲性和性肽:在RGNCAYHRGQIIWCTYH (SEQ ID NO:78)的氨基酸序列中,半胱氨酸残基以外的1个或2个氨基酸残基被取代成赖氨酸残基和半胱氨酸残基以外的其它氨基酸残基的氨基酸序列。

[0836] 在此,上述氨基酸序列中所含的2个半胱氨酸残基可通过二硫键交联。

[0837] 氨基酸残基的取代可以是保守取代。术语“保守取代”是指,用具有类似侧链的氨基酸残基取代规定的氨基酸残基。具有类似侧链的氨基酸残基的家族是该领域中已知的。例如,作为这样的家族,可举出:具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有非带电极性侧链的氨基酸(例如,天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、具有 $\beta$ 位分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、具有芳族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)、具有含羟基(例如,醇式、酚式)侧链的氨基酸(例如,丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)和具有含硫侧链的氨基酸(例如,半胱氨酸、蛋氨酸)。有时将具有非带电极性侧链的氨基酸和具有非极性侧链的氨基酸统称为中性氨基酸。优选地,氨基酸的保守取代可以在天冬氨酸与谷氨酸之间的取代、在精氨酸、赖氨酸与组氨酸之间的取代、在色氨酸与苯丙氨酸之间的取代、在苯丙氨酸与缬氨酸之间的取代、在亮氨酸、异亮氨酸与丙氨酸之间的取代和在甘氨酸与丙氨酸之间的取代。

[0838] 在第1亲和性部分和第2亲和性部分为亲和性肽的情况下,本发明的亲和性物质或其盐可与第1亲和性肽和第2亲和性肽直接连接,也可在第1亲和性肽与第2亲和性肽之间插入接头,但从优化第1亲和性肽和第2亲和性肽与抗体重链的恒定区的结合的观点出发,优选插入接头。在第1亲和性部分和第2亲和性部分为亲和性肽的情况下,作为接头,优选肽接头。

[0839] 构成肽接头的氨基酸残基数可根据氨基酸残基的种类(例如, $\alpha$ -氨基酸、 $\beta$ -氨基

酸、 $\gamma$ -氨基酸。优选为 $\alpha$ -氨基酸)等条件适当设定。例如,肽接头可以是由20个以上的氨基酸残基构成的肽接头。肽接头可以是由22个以上、24个以上、26个以上、28个以上、30个以上、32个以上、34个以上、36个以上、38个以上或40个以上的氨基酸残基构成的肽接头。肽接头还可以是由少于50个、少于49个、少于48个、少于47个、少于46个或少于45个的氨基酸残基构成的肽接头。

[0840] 作为构成肽接头的氨基酸残基,可使用上述的天然氨基酸或非天然氨基酸的残基。优选地,构成肽接头的氨基酸残基也可仅包含上述的天然氨基酸残基。作为适合于肽接头的氨基酸残基,例如可举出:丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸和甘氨酸,但不限定于这些。作为肽接头,还可使用国际公开第2021/112249号和国际公开第2011/144756号中公开的肽接头。

[0841] 优选地,本发明的亲和性物质或其盐可以是下述的亲和性物质或其盐:第1亲和性部分和第2亲和性部分为亲和性肽,并且在第1亲和性肽与第2亲和性肽之间包含接头。这样的亲和性物质可由下述式(A)表示:

[0842]  $AP1-L_A-AP2(A)$

[0843] 式中,

[0844] AP1表示对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性肽,

[0845] AP2表示对抗体重链的恒定区具有亲和性的第2亲和性肽,

[0846]  $L_A$ 表示接头。

[0847] 在与本发明相关联而给出的式(A)和其它式中,-(连字符)表示在其两侧存在的2个单元共价键合。因此,在式(A)中,AP1与 $L$ 共价键合, $L$ 与AP1和AP2的两者共价键合,AP2与 $L$ 共价键合。

[0848] AP1和AP2分别所示的第1亲和性肽和第2亲和性肽的定义、示例和优选示例如上所述。

[0849]  $L_A$ 所示的接头为2价基团。2价基团可被取代也可不被取代。作为2价基团,可举出上述的2价基团。作为2价基团被取代时的取代基,可举出上述的取代基。优选地,作为接头,例如可使用肽、核酸、糖、其它聚合物性物质(例如,聚乙二醇)、2价烃基(例如,烷基链)等物质。

[0850] 更优选地,本发明的亲和性物质或其盐可以是下述的亲和性多肽或其盐:第1亲和性部分和第2亲和性部分为亲和性肽,并且在第1亲和性肽与第2亲和性肽之间包含肽接头。这样的亲和性多肽可由下述式(A')表示:

[0851]  $AP1-PL_A-AP2(A')$

[0852] 式中,

[0853] AP1表示对抗体重链的恒定区具有亲和性且存在于亲和性多肽的N末端侧的第1亲和性肽,

[0854] AP2表示对抗体重链的恒定区具有亲和性且存在于亲和性多肽的C末端侧的第2亲和性肽,

[0855]  $PL_A$ 表示肽接头。

[0856] 关于亲和性多肽等的亲和性物质或其盐,作为构成其的氨基酸残基,可包含上述的天然氨基酸或非天然氨基酸的残基。在亲和性物质仅包含上述的天然氨基酸残基的情况下,亲和性物质可通过例如使用宿主细胞的多肽的表达体系、无细胞合成体系或有机合成

体系(例如,固相合成)来制造。在亲和性物质包含非天然氨基酸残基的情况下,亲和性物质可通过例如有机合成体系(例如,固相合成)来制造。优选地,亲和性物质也可仅包含天然氨基酸残基,以允许通过使用宿主细胞的多肽的表达体系或无细胞合成体系来制造大量的亲和性物质。

[0857] 在本发明的亲和性物质为亲和性多肽等亲和性物质或其盐的情况下,可适当保护位于亲和性物质末端的氨基和羧基。作为N末端氨基的保护基,例如可举出:烷基羰基(酰基)(例如,乙酰基、丙氧基、叔丁氧基羰基等丁氧基羰基)、烷氧基羰基(例如,苄基甲氧基羰基)、芳氧基羰基、芳基烷基(芳烷基)氧基羰基(例如,苄氧基羰基)。优选地,N末端氨基可被烷基化、甲酰化或乙酰化。作为C末端羧基的保护基,例如可举出:可形成酯或酰胺的基团。作为可形成酯或酰胺的基团,例如可举出:烷氧基(例如,甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基、己氧基)、芳氧基(例如,苯氧基、萘氧基)、芳烷基氧基(例如,苄氧基)、氨基。

[0858] 另外,在亲和性物质的N-末端氨基酸为谷氨酸(E)或谷氨酰胺(Q)的情况下,可利用它们的侧链保护N末端。在N-末端氨基酸为谷氨酸的情况下,受保护的N-末端的谷氨酸可具有焦谷氨酸的环状结构。另外,在N-末端氨基酸为谷氨酰胺的情况下,受保护的N-末端的谷氨酰胺通过N-末端的氨基(NH<sub>2</sub>)与存在于其侧链的酰胺基反应(焦谷氨酰化),可具有焦谷氨酸型的环状结构。因此,N末端氨基酸可优选为谷氨酸或谷氨酰胺。

[0859] 在亲和性物质为亲和性多肽的情况下,亲和性多肽可在N末端进一步包含由Gln-Glu-Thr(QET)构成的三肽。在这种情况下,通过使用宿主细胞的多肽的表达体系,可通过Q的焦谷氨酰化保护N末端氨基,并且可大量且简便地分泌生产亲和性多肽(参照实施例、国际公开第2013/062029号、国际公开第2020/090979号)。在这种情况下,可在QET的N末端侧附加由MFNNRIRTAALAGAI AISTAASGVAIPAPA(SEQ ID NO:42)的氨基酸序列构成的信号肽(CspBss)等信号肽(参照实施例、国际公开第2013/062029号、国际公开第2020/090979号)。

[0860] 本发明的亲和性物质或其盐例如可用作包含亲和性物质和抗体反应性基团的本发明的化合物或其盐的合成中间体。因此,为了简便地实现包含抗体反应性基团的本发明的化合物或其盐的均匀合成,本发明的亲和性物质或其盐,除了亲和性物质之外,还可被衍生成仅包含1个特定的反应性基团,该特定的反应性基团可与包含抗体反应性基团的部分化合物进行特异性反应。在亲和性物质仅包含1个特定的反应性基团的情况下,由于亲和性物质和抗体反应性基团的两者均可经由亲和性物质中的特定的反应性基团特异性地进行反应,因此可容易地将包含亲和性物质和抗体反应性基团的本发明的化合物或其盐制造成均匀的化合物。

[0861] 作为上述的特定的反应性基团,例如,可举出如下。

[0862] (1) 氨基(NH<sub>2</sub>、NHR<sub>3</sub>、NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>。R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>分别独立地为上述的1价基团,优选为1价烃基,更优选为烷基,更进一步优选为碳原子数1~6的烷基);

[0863] (2) 可与氨基反应的残基。例如,活化酯残基(例如,N-羟基琥珀酰亚胺残基)、乙烯基砜残基、磺酰氯残基、异氰酸酯残基、异硫氰酸酯残基、醛残基、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸残基、2-亚氨基-2-甲氧基乙基残基、对苯二甲酸重氮盐残基;

[0864] (3) 羧基(COOH);

[0865] (4) 可与羧基反应的残基。例如,上述的氨基;

[0866] (5) 羟基(OH)(包含醇式羟基和酚式羟基);以及

[0867] (6) 可与羟基反应的残基。例如,重氮残基、偶氮二甲酸酯残基、2,3-二氢-1H-吡嗪-6-酮残基。

[0868] 特定的反应性基团可优选为(1)~(4)。更优选特定的反应性基团可以是(1)或(2)、或者可以是(3)或(4)。或者,更优选特定的反应性基团可以是(1)或(3)。特定的反应性基团更进一步优选为(1),可特别优选为氨基(NH<sub>2</sub>)。

[0869] 亲和性物质或其盐可仅包含1个含有特定反应性基团的氨基酸残基。在这种情况下,亲和性多肽可仅包含1个在侧链具有(a)特定的反应性基团(例如,氨基、羧基、羟基)的氨基酸残基(例如,赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、酪氨酸残基、苏氨酸残基或丝氨酸残基)。在亲和性多肽仅包含1个在侧链具有氨基的赖氨酸残基的情况下,亲和性多肽的N末端优选受保护(C末端也可受保护)。在亲和性多肽仅包含1个在侧链具有羧基的氨基酸残基(例如,天冬氨酸残基或谷氨酸残基)的情况下,亲和性多肽的C末端优选受保护(N末端也可受保护)。

[0870] 或者,亲和性多肽可以是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基(例如,赖氨酸残基)、并且通过在N末端具有氨基而仅包含1个氨基作为特定反应性基团的多肽。亲和性多肽还可以是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基(例如,天冬氨酸残基、谷氨酸残基)、并且通过在C末端具有羧基而仅包含1个羧基作为特定反应性基团的多肽。

[0871] 优选地,仅包含1个特定反应性基团的亲和性多肽可以是包含在侧链具有氨基的氨基酸残基的多肽。在亲和性多肽通过有机合成体系(例如,固相合成)制造的情况下,不仅可使用作为构成蛋白的天然氨基酸的赖氨酸残基,还可使用在侧链具有氨基的其它氨基酸残基(例如,鸟氨酸)。更优选地,为了不仅通过有机合成体系,而且通过使用宿主细胞的多肽的表达体系和无细胞合成体系也可容易地制造,仅包含1个特定反应性基团的亲和性多肽可以是仅包含1个在侧链具有氨基(NH<sub>2</sub>)的赖氨酸残基的多肽。在这种情况下,赖氨酸残基可包含在第1亲和性肽、或第2亲和性肽、或肽接头中的任一者中。在赖氨酸残基包含在肽接头中的情况下,可包含在接近第1亲和性肽或第2亲和性肽的位点(例如,从第1亲和性肽或第2亲和性肽起10个以下、5个以下或1~3个的氨基酸残基的位点)中。优选地,赖氨酸残基优选包含在第1亲和性肽或第2亲和性肽中的任一者中。

[0872] 优选地,上述式(A)所表示的亲和性物质或其盐中的AP1和AP2分别所示的第1亲和性肽和第2亲和性肽、以及L<sub>A</sub>所示的接头可进一步具有下述(1)或(2)的特性,优选为(1)的特性。

[0873] (1) 仅包含1个氨基作为特定反应性基团的亲和性物质或其盐:

[0874] (1-1) 亲和性物质或其盐,其中,(i)第1亲和性肽是仅包含1个在侧链具有氨基的氨基酸残基(优选为赖氨酸残基)、且具有受保护的N末端的亲和性肽,(ii)第2亲和性肽是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基的亲和性肽,并且接头是不含氨基的接头;

[0875] (1-2) 亲和性物质或其盐,其中,(i)第1亲和性肽是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基、且具有未保护的N末端的亲和性肽,(ii)第2亲和性肽是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基的亲和性肽,并且接头是不含氨基的接头;

[0876] (1-3) 亲和性物质或其盐,其中,(i)第1亲和性肽是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基、且具有受保护的N末端的亲和性肽,(ii)第2亲和性肽是仅包含1个在侧链具有氨基的氨基酸残基(优选为赖氨酸残基)的亲和性肽,并且接头是不含氨基的接头;

[0877] (1-4) 亲和性物质或其盐,其中,(i) 第1亲和性肽是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基、且具有受保护的N末端的亲和性肽,(ii) 第2亲和性肽是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基的亲和性肽,并且接头是仅包含1个氨基的接头。

[0878] 为了抑制不需要的反应(例如,分子内反应或分子间反应),仅包含1个氨基作为特定反应性基团的亲和性物质或其盐可以是不含可与氨基反应的基团(例如,羧基)的亲和性物质或其盐。因此,在上述(1-1)~(1-4)中,第1亲和性肽可以是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基的亲和性肽,第2亲和性肽可以是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基、和/或具有受保护的C末端的亲和性肽,接头可以是不含羧基的接头。

[0879] (2) 仅包含1个羧基作为特定反应性基团的亲和性物质或其盐:

[0880] (2-1) 亲和性物质或其盐,其中,(i) 第1亲和性肽是仅包含1个在侧链具有羧基的氨基酸残基(优选为天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸残基)的亲和性肽,(ii) 第2亲和性肽是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基的亲和性肽,并且接头是不含羧基的接头;

[0881] (2-2) 亲和性物质或其盐,其中,(i) 第1亲和性肽是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基的亲和性肽,(ii) 第2亲和性肽是仅包含1个在侧链具有羧基的氨基酸残基(优选为天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸残基)、且具有受保护的C末端的亲和性肽,并且接头是不含羧基的接头;

[0882] (2-3) 亲和性物质或其盐,其中,(i) 第1亲和性肽是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基的亲和性肽,(ii) 第2亲和性肽是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基、且具有未保护的C末端的亲和性肽,并且接头是不含羧基的接头;

[0883] (2-4) 亲和性物质或其盐,其中,(i) 第1亲和性肽是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基的亲和性肽,(ii) 第2亲和性肽是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基、且具有受保护的C末端的亲和性肽,并且接头是仅包含1个羧基的接头。

[0884] 为了抑制不需要的反应(例如,分子内反应或分子间反应),仅包含1个羧基作为特定反应性基团的亲和性物质或其盐可以是不含可与羧基反应的基团(例如,氨基)的亲和性物质或其盐。因此,在上述(2-1)~(2-4)中,第1亲和性肽可以是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基、和/或具有受保护的N末端的亲和性肽,第2亲和性肽可以是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基的亲和性肽,接头可以是不含氨基的接头。

[0885] 优选地,上述式(A')所表示的亲和性物质或其盐中的AP1和AP2分别所示的第1亲和性肽和第2亲和性肽、以及 $PL_A$ 所示的肽接头可进一步具有下述(1')或(2')的特性,优选为(1')的特性。

[0886] (1') 仅包含1个氨基作为特定反应性基团的亲和性物质或其盐:

[0887] (1-1') 亲和性物质或其盐,其中,(i) 第1亲和性肽是仅包含1个在侧链具有氨基的氨基酸残基(优选为赖氨酸残基)、且具有受保护的N末端的亲和性肽,(ii) 第2亲和性肽是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基的亲和性肽,并且肽接头是不含在侧链包含氨基的氨基酸残基的肽接头;

[0888] (1-2') 亲和性物质或其盐,其中,(i) 第1亲和性肽是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基、且具有未保护的N末端的亲和性肽,(ii) 第2亲和性肽是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基的亲和性肽,并且肽接头是不含在侧链包含氨基的氨基酸残基的肽接头;

[0889] (1-3') 亲和性物质或其盐,其中,(i) 第1亲和性肽是不含在侧链具有氨基的氨基

酸残基、且具有受保护的N末端的亲和性肽, (ii) 第2亲和性肽是仅包含1个在侧链具有氨基的氨基酸残基(优选为赖氨酸残基)的亲和性肽, 并且肽接头是不含在侧链包含氨基的氨基酸残基的肽接头;

[0890] (1-4') 亲和性物质或其盐, 其中, (i) 第1亲和性肽是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基、且具有受保护的N末端的亲和性肽, (ii) 第2亲和性肽是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基的亲和性肽, 并且肽接头是仅包含1个在侧链包含氨基的氨基酸残基的肽接头。

[0891] 为了抑制不需要的反应(例如, 分子内反应或分子间反应), 仅包含1个氨基作为特定反应性基团的亲和性物质或其盐可以是不含可与氨基反应的基团(例如, 羧基)的亲和性物质或其盐。因此, 在上述(1-1') ~ (1-4') 中, 第1亲和性肽可以是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基的亲和性肽, 第2亲和性肽可以是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基、和/或具有受保护的C末端的亲和性肽, 肽接头可以是不含在侧链包含羧基的氨基酸残基的肽接头。

[0892] (2') 仅包含1个羧基作为特定反应性基团的亲和性物质或其盐:

[0893] (2-1') 亲和性物质或其盐, 其中, (i) 第1亲和性肽是仅包含1个在侧链具有羧基的氨基酸残基(优选为天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸残基)的亲和性肽, (ii) 第2亲和性肽是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基的亲和性肽, 并且肽接头是不含在侧链包含羧基的氨基酸残基的肽接头;

[0894] (2-2') 亲和性物质或其盐, 其中, (i) 第1亲和性肽是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基的亲和性肽, (ii) 第2亲和性肽是仅包含1个在侧链具有羧基的氨基酸残基(优选为天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸残基)、且具有受保护的C末端的亲和性肽, 并且肽接头是不含在侧链包含羧基的氨基酸残基的肽接头;

[0895] (2-3') 亲和性物质或其盐, 其中, (i) 第1亲和性肽是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基的亲和性肽, (ii) 第2亲和性肽是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基、且具有未保护的C末端的亲和性肽, 并且肽接头是不含在侧链包含羧基的氨基酸残基的肽接头;

[0896] (2-4') 亲和性物质或其盐, 其中, (i) 第1亲和性肽是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基的亲和性肽, (ii) 第2亲和性肽是不含在侧链具有羧基的氨基酸残基、且具有受保护的C末端的亲和性肽, 并且肽接头是仅包含1个在侧链具有羧基的氨基酸残基的接头。

[0897] 为了抑制不需要的反应(例如, 分子内反应或分子间反应), 仅包含1个羧基作为特定反应性基团的亲和性物质或其盐可以是不含可与羧基反应的基团(例如, 氨基)的亲和性物质或其盐。因此, 在上述(2-1') ~ (2-4') 中, 第1亲和性肽可以是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基、和/或具有受保护的N末端的亲和性肽, 第2亲和性肽可以是不含在侧链具有氨基的氨基酸残基的亲和性肽, 肽接头可以是不含在侧链包含氨基的氨基酸残基的接头。

[0898] 2-2. 亲和性物质或其盐的相关发明

[0899] 在本发明的亲和性物质或其盐为包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性肽和第2亲和性肽的亲和性多肽的情况下, 这样的亲和性多肽可通过使用宿主细胞或使用无细胞系等调制, 所述宿主细胞包含表达单元, 所述表达单元包含编码亲和性多肽的多核苷酸和与其可操作地连接的启动子。本发明还提供这样的多核苷酸和宿主细胞、以及可用于制作宿主细胞的表达载体。

[0900] 本发明的多核苷酸为编码本发明的亲和性多肽的多核苷酸。本发明的多核苷酸可以是DNA或RNA, 但优选DNA。

[0901] 本发明的宿主细胞例如可通过使用包含本发明的多核苷酸的表达载体的方法(例如,感受态细胞法、电穿孔法)或基因组修饰技术来制作。在表达载体是与宿主细胞的基因组DNA产生同源重组的整合型(integrative)载体的情况下,表达单元可通过转化整合至宿主细胞的基因组DNA中。另一方面,在表达载体是不与宿主细胞的基因组DNA产生同源重组的非整合型载体的情况下,表达单元通过转化不被整合至宿主细胞的基因组DNA中,而是能够以表达载体的状态独立于基因组DNA存在于宿主细胞内。或者,根据基因组编辑技术(例如,CRISPR/Cas体系、转录激活因子样效应物核酸酶(Transcription Activator-Like Effector Nucleases,TALEN)),可将表达单元整合至宿主细胞的基因组DNA中,并可修饰宿主细胞特有的表达单元。

[0902] 本发明还提供表达载体,其包含本发明的多核苷酸和与其可操作地连接的启动子。本发明的表达载体可进一步包含在宿主细胞中起作用的终止子、核糖体结合位点和耐药基因等元件。作为耐药基因,例如可举出:针对四环素、氨苄西林、卡那霉素、潮霉素、膦丝菌素等药剂的耐性基因。

[0903] 表达载体还可进一步包含可与宿主细胞的基因组同源重组的区域,用于与宿主细胞的基因组DNA进行同源重组。例如,可设计表达载体,使其中所含的表达单元位于一对同源区(例如,与宿主细胞的基因组中的特定序列同源的同源臂或loxP或FRT)之间。作为要引入表达单元的宿主细胞的基因组区(同源区的靶标),没有特别限定,可以在宿主细胞中表达量多的基因的基因座。

[0904] 表达载体可以是质粒、病毒载体、噬菌体或人工染色体。表达载体还可以是整合型(integrative)载体或非整合型载体。整合型载体可以是其整体被整合至宿主细胞的基因组中的类型的载体。或者,整合型载体可以是仅其一部分(例如,表达单元)整合至宿主细胞的基因组中的类型的载体。而且,表达载体可以是DNA载体或RNA载体(例如,逆转录病毒)。表达载体还可以是通用的表达载体。作为这样的表达载体,例如可举出:pUC(例如,pUC19、pUC18)、pSTV、pBR(例如,pBR322)、pHSG(例如,pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398)、RSF(例如,RSF1010)、pACYC(例如,pACYC177、pACYC184)、pMW(例如,pMW119、pMW118、pMW219、pMW218)、pQE(例如,pQE30)及其衍生物。

[0905] 作为用于使本发明的亲和性多肽表达的宿主细胞,例如可使用以大肠杆菌(*Escherichia coli*)等大肠杆菌属细菌、棒状杆菌属细菌[例如,谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)]和芽孢杆菌属细菌[例如,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)]为代表的各种原核细胞,以酵母菌属细菌[例如,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)]、毕赤酵母属细菌[例如,毕赤酵母(*Pichia stipitis*)]、曲霉菌属细菌[例如,米曲霉菌(*Aspergillus oryzae*)]为代表的各种真核细胞。或者,作为宿主,可使用昆虫细胞、植物细胞、动物细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞等哺乳动物细胞)。作为宿主,也可使用缺失规定基因的株。作为宿主细胞,例如可举出:在细胞质中持有表达载体的宿主细胞和在基因组上引入了目标基因的宿主细胞。

[0906] 当本发明的亲和性多肽在末端包含由Gln-Glu-Thr(QET)构成的三肽的情况下,优选使用可通过将棒状杆菌型细菌用作宿主的多肽的分泌生产方法(国际公开第2013/062029号)调制的亲和性多肽。该方法由于可将Csp成熟蛋白的N末端3个残基Gln-Glu-Thr(QET)添加至目标多肽的N末端,而且可简便且大量地调制在N末端包含谷氨酰胺残基(Q)的

多肽,因此适于调制亲和性多肽。在这种情况下,可将由MFNNRIRTAALAGAIISTAASGVAIPAPA (SEQ ID NO:42)的氨基酸序列构成的信号肽(CspBss)等各种信号肽添加至QET的N末端侧(参照实施例、国际公开第2013/062029号、国际公开第2020/090979号)。作为可在该方法中使用的棒状杆菌型细菌,例如可举出:棒状杆菌属细菌(例如,谷氨酸棒状杆菌、停滞棒状杆菌(*Corynebacterium stationis*))和短杆菌(*Brevibacterium*)属细菌。

[0907] 本发明的宿主细胞可使用规定的培养装置(例如,试验管、烧瓶、小型发酵罐(jar fermentor)),例如在具有后述的组成的培养基中进行培养。培养条件可适当设定。具体而言,培养温度可以是10°C~37°C,pH可以是6.5~7.5,培养时间可以是1小时~100小时。另外,也可一边管理溶解氧浓度一边进行培养。在这种情况下,有时将培养液中的溶解氧浓度(DO值)作为控制指标使用。可控制通气/搅拌条件,以使大气中的氧浓度为21%时的相对溶解氧浓度DO值例如不低于1~10%、优选不低于3%~8%。另外,培养可以是分批培养,也可以是补料分批(fed-batch)培养。在补料分批培养的情况下,也可连续地或不连续地向培养液中依次添加作为糖源的溶液或包含磷酸的溶液来继续培养。

[0908] 作为使本发明的多核苷酸表达的启动子,可使用通常用于大肠杆菌中的异源蛋白生产的启动子,例如可举出:PhoA、PhoC、T7启动子、lac启动子、trp启动子、trc启动子、tac启动子、λ噬菌体的PR启动子、PL启动子、T5启动子等强力的启动子,优选PhoA、PhoC、lac。另外,作为载体,例如可使用pUC(例如,pUC19、pUC18)、pSTV、pBR(例如,pBR322)、pHSG(例如,pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398)、RSF(例如,RSF1010)、pACYC(例如,pACYC177、pACYC184)、pMW(例如,pMW119、pMW118、pMW219、pMW218)、pQE(例如,pQE30)及其衍生物等。

[0909] 另外,也可在本发明的多核苷酸的下游连接转录终止序列即终止子。作为这样的终止子,例如可举出:T7终止子、fd噬菌体终止子、T4终止子、四环素耐性基因的终止子、大肠杆菌trpA基因的终止子。

[0910] 作为培养基,可使用M9-酪蛋氨酸培养基、LB培养基等通常用于培养大肠杆菌的培养基。培养基可含有规定的碳源、氮源、辅酶(例如,盐酸吡哆醇)。具体而言,可使用蛋白胨、酵母提取物、NaCl、葡萄糖、MgSO<sub>4</sub>、硫酸铵、磷酸二氢钾、硫酸铁、硫酸锰等。另外,培养条件、生产诱导条件根据所使用的载体的标记物、启动子、宿主菌等的种类适当选择。

[0911] 为了回收本发明的亲和性多肽,有以下的方法等。本发明的亲和性多肽可在回收本发明的转化细胞之后,通过将菌体破碎(例如,超声处理、匀浆化)或溶解(例如,溶菌酶处理),以破碎物和溶解物的形式得到。在亲和性多肽分泌/漏出到细胞外的情况下,可通过离心分离或膜过滤,从培养液中获取包含亲和性多肽的除菌液。通过将这样的破碎物、溶解物和除菌液供于提取、沉淀、过滤、柱色谱等方法,可得到本发明的亲和性多肽。

[0912] 3. 化合物或其盐

[0913] 本发明的化合物或其盐包含:(A)包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、和(B)抗体反应性基团。亲和性物质及其构成要素(例如,亲和性肽等亲和性部分和肽接头等亲和性部分之间的接头)的定义、示例和优选示例如上所述。

[0914] 作为抗体反应性基团,可使用针对构成抗体(蛋白)的氨基酸残基中具有容易反应的侧链的氨基酸残基的反应性基团。在上述的构成蛋白的20种天然氨基酸中,没有侧链的甘氨酸以及侧链为烃基的丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和缬氨酸对通常的反应呈惰

性。因此,抗体反应性基团是可与由天冬酰胺、谷氨酰胺、蛋氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、组氨酸和赖氨酸构成的14种氨基酸的任1种或2种以上(例如,2种、3种、4种)的侧链反应的基团。根据抗体的氨基酸组成等条件,在本发明的化合物或其盐中可包含1种或2种以上(例如,2种、3种、4种)反应性基团,但优选可在本发明的化合物或其盐中包含1种反应性基团。

[0915] 优选地,抗体反应性基团是可与上述的构成蛋白的14种氨基酸中的任1种氨基酸的侧链反应的基团。更优选地,抗体反应性基团是对赖氨酸、酪氨酸、色氨酸或半胱氨酸中的1种氨基酸的侧链特异性的反应性基团,更进一步优选地,是对赖氨酸、酪氨酸或色氨酸中的任1种氨基酸的侧链特异性的反应性基团,特别优选地,是对赖氨酸或酪氨酸的侧链、其中优选对赖氨酸的侧链特异性的反应性基团。关于这样的反应性基团的细节,例如参照国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/090979号。

[0916] 对赖氨酸残基的侧链特异性的反应性基团是可与存在于赖氨酸残基的侧链中的氨基(NH<sub>2</sub>)特异性反应的基团,例如可举出:活化酯残基(例如,N-羟基琥珀酰亚胺残基)、乙烯基砜残基、磺酰氯残基、异氰酸酯残基、异硫氰酸酯残基、醛残基、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸残基、2-亚氨基-2-甲氧基乙基残基、对苯二甲酸重氮盐残基、 $\alpha$ -卤素取代的乙酰胺、 $\alpha$ -卤素取代的甲基酮。根据对赖氨酸残基的侧链特异性的上述反应性基团与存在于赖氨酸残基的侧链中的氨基(NH<sub>2</sub>)之间的反应,可生成例如酰胺残基、脲残基、吡啶残基、氨基甲酸酯残基、砜酰胺残基作为连接部分。

[0917] 在特定的实施方式中,本发明的化合物或其盐可由下述式(I)表示:

[0918] [化学式38]

[0919] R-L-A (I)

[0920] 式中,

[0921] R表示抗体反应性基团,

[0922] L表示接头,

[0923] A表示包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质。R所示的抗体反应性基团和A所示的亲和性物质的定义、示例和优选示例如上所述。

[0924] 接头为2价基团。2价基团可被取代也可不被取代。作为2价基团,可举出上述的2价基团。作为2价基团被取代时的取代基,可举出上述的取代基。

[0925] 在特定的实施方式中,本发明的化合物或其盐可在亲和性物质与抗体反应性基团之间进一步包含切割性部分。在这种情况下,上述式(I)所表示的化合物或其盐也可包含含有切割性部分的接头。

[0926] 切割性部分是可在不会引起蛋白的变性/降解(例如,酰胺键的切割)的条件(温和条件)下通过特定处理进行切割的位点。因此,可以说切割性部分是可在温和条件下通过特定切割处理进行切割的位点(酰胺键以外的键)。作为这样的特定处理,例如可举出:(a)通过选自酸性物质、碱性物质、还原剂、氧化剂、酶中的1种以上物质进行的处理;(b)通过光等物理化学刺激进行的处理;或(c)在使用了包含自分解性的切割性部分的切割性接头的情况下的放置(孵育)。这样的切割性接头及其切割条件是该领域中的技术常识(例如,

G.Leriché, L.Chisholm, A.Wagner, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*.20,571 (2012); Feng P.等人, *Journal of American Chemical Society*.132,1500(2010).; Bessodes M.等人, *Journal of Controlled Release*,99,423 (2004).; DeSimone, J.M., *Journal of American Chemical Society*.132,17928 (2010); Thompson, D.H., *Journal of Controlled Release*,91,187 (2003); Schoenmarks, R.G., *Journal of Controlled Release*,95,291 (2004)。关于温和条件的反应条件(例如,反应温度、反应时间、反应溶液)如后所述。作为上述的切割性部分,例如可举出:二硫化物残基、缩醛残基、缩酮残基、酯残基、氨基甲酰基残基、烷氧基烷基残基、亚胺残基,叔烷氧基氨基甲酸酯残基(例如,叔丁氧基氨基甲酸酯残基)、硅烷残基、含脲残基(例如,脲残基、酰脲残基、双芳基脲残基)、氨基磷酸酯残基、乌头酰基残基、三苯甲基残基、偶氮残基、邻二醇残基、硒残基、具有吸电子基团的含芳族环的残基、含香豆素的残基、含砜残基、含不饱和键的链残基、糖基残基。

[0927] 具有吸电子基团的芳族环基优选选自芳基、芳烷基、芳族杂环基、具有芳族杂环基的烷基中的具有芳族环基的基团,更优选芳烷基、具有芳族杂环基的烷基。吸电子基团优选结合于环的2位。更进一步优选地,具有吸电子基团的含芳族环的残基例如为在2位具有吸电子基团的芳烷基(例如,苄基)。作为吸电子基团,例如可举出:卤原子、被卤原子取代的烷基(例如,三氟甲基)、硼酸残基、甲磺酰基(mesyl)、甲苯磺酰基(tosyl)、三氟甲磺酸酯(triflate)、硝基、氰基、苯基、酮基(例如,酰基)。

[0928] 与作为切割性部分的残基名称相关联的作为前缀、后缀等术语出现的烷基、酰基(即,烷基羰基)、烷氧基(即,烷基氧基)、芳基、芳烷基等基团的定义、示例和优选示例与上述相同。

[0929] 作为酯残基,例如可举出:由碳原子和氧原子构成的通常的酯残基[例如,烷基酯(例如,叔丁氧基羰基等叔烷氧基羰基)、芳基酯(例如,苯甲酰甲基(phenacyl)酯)、2-(二苯基膦基)苯甲酸酯)、糖基酯残基、原酸酯残基]、包含硫原子和氧原子的酯残基(例如, $\alpha$ -硫代苯基酯残基、烷硫基酯残基等硫酯残基)、包含磷原子和氧原子的酯残基(例如,磷酸二酯残基、磷酸三酯残基)、活化酯残基(例如,N-羟基琥珀酰亚胺残基)。

[0930] 作为含砜残基,例如可举出:砜残基、喹啉基苯磺酸酯残基。

[0931] 硅烷残基优选为具有选自烷基、芳基、芳烷基和烷氧基中的基团的硅烷残基。作为这样的硅烷残基,例如可举出:二烷基二烷氧基硅烷残基(例如,二甲基二烷氧基硅烷,二乙基二烷氧基硅烷)或二芳基二烷氧基硅烷残基(例如,二苯基二烷氧基硅烷)。

[0932] 作为烷氧基烷基(即,烷基氧基烷基)残基,是将上述的烷氧基和烷基组合而得的基团,例如可举出:甲氧基甲基残基、乙氧基甲基残基、甲氧基乙基残基、乙氧基乙基残基,但并不限定于这些例子。

[0933] 含不饱和键的链残基是包含仅由碳原子构成的不饱和键部分的残基[例如,作为具有碳碳双键的最小单元的乙烯基(vinyl/ethenyl)、或作为具有碳碳三键的最小单元的乙炔基(acetylenyl/ethynyl)]、或包含由碳原子和杂原子(例如,氮原子、硫原子、氧原子)构成的不饱和键部分(例如,醛、氰基)的残基。作为含不饱和键的链残基,例如可举出:乙烯基醚残基、氰基乙基残基、乙烯残基、丙二醛残基。

[0934] 作为酸性物质(也称为亲电子试剂),例如可举出:盐酸、硫酸、硝酸等无机酸性物质;以及甲酸、乙酸、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙磺酸、3-吗啉代丙磺酸、磷酸二氢钠、柠檬酸、

十二烷基硫酸、N-十二烷酰基肌氨酸、三氟乙酸等有机酸性物质。作为可通过酸性物质进行切割的位点,例如可举出:烷氧基芳基烷基残基、叔烷氧基氨基甲酸酯残基、缩醛残基、硅烷残基、亚胺残基、乙烯基醚残基、 $\beta$ -硫代丙酸酯残基、三苯甲基残基、脞残基、乌头酰基残基、原酸酯残基、氨基甲酰基残基、2-(二苯基膦基)苯甲酸酯残基。

[0935] 作为碱性物质(也称为亲核试剂),例如可举出:氢氧化钠、氢氧化钾、乙酸钠、乙酸钾、乙酸铵等无机碱性物质;以及羟胺、三乙胺、N,N'-二异丙基胺等有机碱性物质。作为可通过碱性物质进行切割的位点,例如可举出:硅烷残基、氰基乙基残基、砷残基、乙烯残基、糖基二琥珀酸酯残基、 $\alpha$ -硫代苯基酯残基、不饱和乙烯基硫醚残基、丙二醛残基、酰基脞残基、烷硫基酯残基。

[0936] 作为还原剂,例如可举出:半胱氨酸、二硫苏糖醇、还原型谷胱甘肽、 $\beta$ -巯基乙醇。作为可通过还原剂进行切割的位点,例如可举出:二硫化物残基、烷氧基烷基残基、偶氮残基。

[0937] 作为氧化剂,例如可举出:高碘酸钠、氧化型谷胱甘肽。作为可通过氧化剂进行切割的位点,例如可举出:邻二醇残基、硒残基。

[0938] 作为酶,例如可举出:胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、TEV、凝血酶、组织蛋白酶B、组织蛋白酶D、组织蛋白酶K、半胱天冬酶、蛋白酶、基质金属蛋白酶、脂肪酶、内切糖苷酶、肽N糖苷酶F(PNGase F)。作为可通过酶进行切割的位点,例如可举出:酯残基、磷酸二酯残基、糖基残基。

[0939] 作为可通过光进行切割的位点,例如可举出:2-硝基苄基残基、苯甲酰甲基酯残基、8-喹啉苯磺酸酯残基、香豆素残基、磷酸三酯残基、双芳基脞残基、Bimane二硫代丙酸(ビマンジチオプロピオン酸)残基。

[0940] 作为自分解性的切割性部分,例如可举出:活化酯残基(例如,N-羟基琥珀酰亚胺残基)。

[0941] 在本发明的化合物或其盐包含切割性部分的情况下,切割性部分可通过切割在上述反应性基团侧生成生物正交性官能团。作为这样的切割性部分,例如可举出:二硫化物残基、酯残基(包含通常的酯残基和如硫酯残基之类的上述其它酯残基)、缩醛残基(包含通常的酯残基和如硫缩醛残基之类的其它缩醛残基)、缩酮残基、亚胺残基、邻二醇残基。

[0942] 在本发明的化合物或其盐包含可通过切割在上述反应性基团侧生成生物正交性官能团的切割性部分的情况下,可由下述式(Ia)表示:

[0943] [化学式39]

[0944]  $R-L_1-CLE(B)-L_2-A$  (Ia)

[0945] 式中,

[0946] R表示抗体反应性基团,

[0947]  $L_1$ 表示第1接头,

[0948]  $L_2$ 表示第2接头,

[0949] CLE(B)表示可通过切割在上述反应性基团侧生成生物正交性官能团的切割性部分,

[0950] A表示包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质。R所示的抗体反应性基团、A所示的亲和性物质和CLE(B)所示的可通过切割在

上述反应性基团侧生成生物正交性官能团的切割性部分的定义、示例和优选示例如上所述。

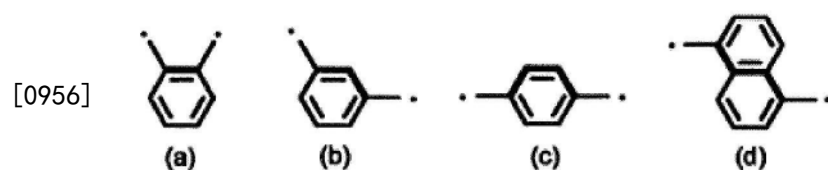
[0951]  $L_1$ 所示的第1接头和 $L_2$ 所示的第2接头可以是相同或不同的2价基团。2价基团可被取代也可不被取代。作为2价基团,可举出上述的2价基团。作为2价基团被取代时的取代基,可举出上述的取代基。

[0952] 在特定的实施方式中,构成第1接头和第2接头中的主链的原子数的总计可以是2~10个。这样的原子数的总计可以是3个以上或4个以上。这样的原子数的总计可以是9个以下、8个以下或7个以下。更具体而言,这样的原子数的总计可以是3~9个、4~8个或4~7个。

[0953] 构成第1接头和第2接头中的主链的原子数分别可以是1~9个。这样的原子数可以是2个以上或3个以上。这样的原子数可以是8个以下、7个以下或6个以下。更具体而言,这样的原子数可以是2~8个、3~7个或3~6个。

[0954] 第1接头和第2接头中的主链由链状结构或环状结构、或包含它们的组合的结构构成。在主链是不含环状结构的链状结构的情况下,可通过计数链状结构中的原子数来确定主链的原子数。另一方面,在主链是包含环状结构的结构的情况下,可通过将构成环状结构的规定原子数作为主链的原子数计数来确定。具体而言,环状结构中的主链的原子数可通过计数连接环状结构中的2个结合键的最短路径的原子数来确定(例如,参照以下(a)~(d)的粗体路径)。在主链是包含链状结构和环状结构的组合的结构的情况下,主链的原子数可通过将不含环状结构的链状结构中的原子数与连接环状结构中的2个结合键的最短路径的原子数相加来确定。对于其它接头而言,主链的原子数的计数方法也是同样的。

[0955] [化学式40]



[0957] • 为结合键。

[0958] (a)的情况下,由于最短路径为粗体路径,因此作为主链的原子数而计数的2价环状结构中的原子数为2。

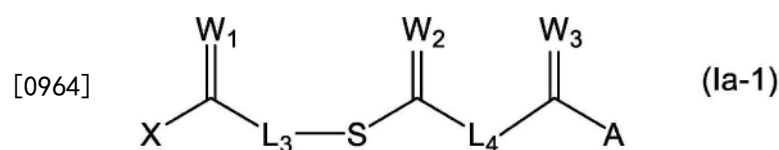
[0959] (b)的情况下,由于最短路径为粗体路径,因此作为主链的原子数而计数的2价环状结构中的原子数为3。

[0960] (c)的情况下,由于任一路径均为最短路径(等距离),因此作为主链的原子数而计数的2价环状结构中的原子数为4。

[0961] (d)的情况下,由于稠合部位的路径为最短路径,因此作为主链的原子数而计数的2价环状结构中的原子数为4。

[0962] 在特定的实施方式中,本发明的化合物或其盐可以是下述式(Ia-1)所表示的化合物或其盐:

[0963] [化学式41]



[0965] 式中,

[0966] X表示离去基团,

[0967]  $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[0968]  $L_3$ 表示第3接头,

[0969]  $L_4$ 表示第4接头,

[0970] S表示硫原子,

[0971] A表示包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质。A所示的亲和性物质的定义、示例和优选示例如上所述。

[0972] X所示的离去基团是可通过与X邻接的 $C=W_1$ 中的碳原子和氨基之间的反应而离去的基团。本领域技术人员可适当设定这样的离去基团。作为这样的离去基团,例如可举出如下:

[0973] (a)  $R_A-S$  (在此,  $R_A$ 表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基, S表示硫原子);

[0974] (b)  $R_A-O$  (在此,  $R_A$ 表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基, O表示氧原子);

[0975] (c)  $R_A-(R_B)N$  (在此,  $R_A$ 和 $R_B$ 分别独立地表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基, N表示氮原子); 或

[0976] (d) 卤原子。

[0977] 优选地, X所示的离去基团可以是下述基团:

[0978] (a)  $R_A-S$  (在此,  $R_A$ 表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基, S表示硫原子);

[0979] (b)  $R_A-O$  (在此,  $R_A$ 表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基, O表示氧原子); 或

[0980] (c)  $R_A-(R_B)N$  (在此,  $R_A$ 和 $R_B$ 分别独立地表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基, N表示氮原子)。

[0981] 更优选地, X所示的离去基团可以是下述基团:

[0982] (a)  $R_A-S$  (在此,  $R_A$ 表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基, S表示硫原子); 或

[0983] (b)  $R_A-O$  (在此,  $R_A$ 表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基, O表示氧原子)。

[0984] 更进一步优选地, X所示的离去基团可以是下述基团:

[0985] (a)  $R_A-S$  (在此,  $R_A$ 表示氢原子、可具有取代基的1价烃基或可具有取代基的1价杂环基, S表示硫原子)。

[0986] 特别优选地, X所示的离去基团可以是下述基团:

[0987] ( $a'$ )  $R_A-S$  (在此,  $R_A$ 表示可具有取代基的1价芳族烃基 (例如, 苯基), S表示硫原子)。

[0988]  $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 分别独立地表示氧原子或硫原子。优选 $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 可以是氧原子。

[0989]  $L_3$ 所示的第3接头和 $L_4$ 所示的第4接头可以是相同或不同的2价基团。2价基团可被取代也可不被取代。作为2价基团, 可举出上述的2价基团。作为2价基团被取代时的取代基, 可举出上述的取代基。

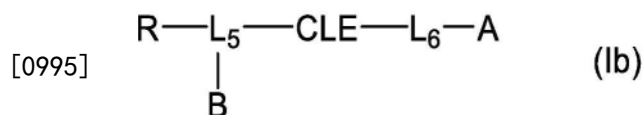
[0990] 在特定的实施方式中,构成第3接头和第4接头中的主链的原子数的总计可以是2~10个。这样的原子数的总计可以是3个以上或4个以上。这样的原子数的总计可以是9个以下、8个以下或7个以下。更具体而言,这样的原子数的总计可以是3~9个、4~8个或4~7个。

[0991] 构成第3接头和第4接头中的主链的原子数分别可以是1~9个。这样的原子数可以是2个以上或3个以上。这样的原子数可以是8个以下、7个以下或6个以下。更具体而言,这样的原子数可以是2~8个、3~7个或3~6个。

[0992] 另外,在本发明的化合物或其盐包含切割性部分的情况下,还可在抗体反应性基团与切割性部分之间进一步包含生物正交性官能团。生物正交性官能团如上所述。优选地,生物正交性官能团可举出:叠氮残基、炔烃残基(优选可被上述取代基取代的具有碳碳三键的环基)、四嗪残基、烯炔残基、硫醇残基、马来酰亚胺残基、硫醇残基、呋喃残基和卤代羰基残基。

[0993] 当本发明的化合物或其盐在抗体反应性基团与切割性部分之间进一步包含生物正交性官能团的情况下,可由下述式(Ib)表示:

[0994] [化学式42]



[0996] 式中,

[0997] R表示抗体反应性基团,

[0998]  $\text{L}_5$ 表示第5接头,

[0999]  $\text{L}_6$ 表示第6接头,

[1000] B表示包含生物正交性官能团的基团,

[1001] CLE表示切割性部分,

[1002] A表示包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质。R所示的抗体反应性基团、A所示的亲和性物质和CLE所示的切割性部分的定义、示例和优选示例如上所述。

[1003]  $\text{L}_5$ 所示的第5接头和 $\text{L}_6$ 所示的第6接头可以是相同或不同的2价基团。2价基团可被取代也可不被取代。作为2价基团,可举出上述的2价基团。作为2价基团被取代时的取代基,可举出上述的取代基。

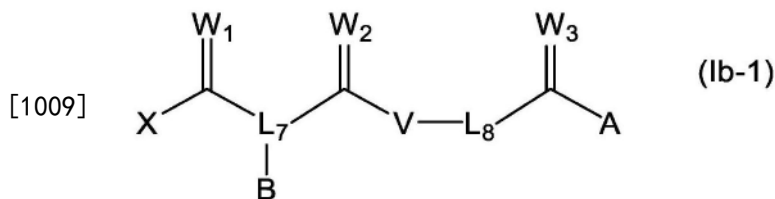
[1004] 在特定的实施方式中,构成第5接头和第6接头中的主链的原子数的总计可以是2~10个。这样的原子数的总计可以是3个以上或4个以上。这样的原子数的总计可以是9个以下、8个以下或7个以下。更具体而言,这样的原子数的总计可以是3~9个、4~8个或4~7个。

[1005] 构成第5接头和第6接头中的主链的原子数分别可以是1~9个。这样的原子数可以是2个以上或3个以上。这样的原子数可以是8个以下、7个以下或6个以下。更具体而言,这样的原子数可以是2~8个、3~7个或3~6个。

[1006] B所示的包含生物正交性官能团的基团可以由生物正交性官能团构成的基团,也可以是包含生物正交性官能团和其它部分的基团。作为其它部分,例如可举出:生物正交性官能团与接头的连接部分。连接部分例如为2价基团。2价基团可被取代也可不被取代。生物正交性官能团、2价基团和2价基团被取代时的取代基的定义、示例和优选示例如上所述。

[1007] 在特定的实施方式中,本发明的化合物或其盐可以是下述式(Ib-1)所表示的化合物或其盐:

[1008] [化学式43]



[1010] 式中,

[1011] X表示离去基团,

[1012]  $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1013]  $L_7$ 表示第7接头,

[1014]  $L_8$ 表示第8接头,

[1015] B表示包含生物正交性官能团的基团,

[1016] V表示氧原子或硫原子,

[1017] A表示包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质。X所示的离去基团、B所示的包含生物正交性官能团的基团和A所示的亲和性物质的定义、示例和优选示例如上所述。

[1018]  $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 分别独立地表示氧原子或硫原子。优选地, $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 可以是氧原子。

[1019]  $L_7$ 所示的第7接头和 $L_8$ 所示的第8接头可以是相同或不同的2价基团。2价基团可被取代也可不被取代。作为2价基团,可举出上述的2价基团。作为2价基团被取代时的取代基,可举出上述的取代基。

[1020] 在特定的实施方式中,构成第7接头和第8接头中的主链的原子数的总计可以是2~10个。这样的原子数的总计可以是3个以上或4个以上。这样的原子数的总计可以是9个以下、8个以下或7个以下。更具体而言,这样的原子数的总计可以是3~9个、4~8个或4~7个。

[1021] 构成第7接头和第8接头中的主链的原子数分别可以是1~9个。这样的原子数可以是2个以上或3个以上。这样的原子数可以是8个以下、7个以下或6个以下。更具体而言,这样的原子数可以是2~8个、3~7个或3~6个。

[1022] V表示氧原子或硫原子。优选地,V可以是硫原子。

[1023] 本发明的化合物或其盐可容易地仅修饰抗体的构成单元中的一个重链。本发明的化合物或其盐还可提供容易地仅修饰抗体的构成单元中的一个重链、并且位点选择性地修饰的抗体。

[1024] 上述一系列化合物或其盐的制造可通过使本发明的亲和性物质与包含抗体反应性基团的部分化合物反应来进行。例如,这样的反应可在适当的有机溶剂体系(例如, $CH_2Cl_2$ 等卤代烷基(例如,卤代甲基)和包含三乙胺等胺的有机溶剂)中,在适当温度(例如,约-10~30℃)下来进行。反应时间例如为1分钟~20小时,优选为10分钟~15小时,更优选为20分钟~10小时,更进一步优选为30分钟~8小时。

[1025] 上述一系列化合物或其盐的生成的确认还取决于其具体的原料和产物的分子量,例如,可通过电泳法、色谱法(例如,凝胶过滤色谱法、离子交换色谱法、反相色谱法、HPLC)、NMR或质谱分析来进行。这样的化合物或其盐可通过色谱法(例如,上述的色谱法及

亲和色谱法)等任意方法来适当纯化。

[1026] 4.亲和性物质修饰的抗体或其盐

[1027] 4-1.包含至少1个亲和性物质(包含第1亲和性部分和第2亲和性部分)的亲和性物质修饰的抗体或其盐

[1028] 本发明提供亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,亲和性物质包含在抗体重链的恒定区中,所述亲和性物质包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分。亲和性物质和抗体、以及构成它们的要素(例如,亲和性肽等亲和性部分、肽接头等亲和性部分之间的接头和恒定区)的定义、示例和优选示例如上所述。

[1029] 优选地,亲和性物质修饰的抗体或其盐可包含(a)抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)以及(b)亲和性物质,并且(c)亲和性物质仅引入至上述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中(即,在免疫球蛋白单元的一个重链的恒定区中引入亲和性物质修饰的抗体,在另一个重链的恒定区中未引入亲和性物质修饰的抗体)。抗体、免疫球蛋白单元和亲和性物质、以及构成它们的要素(例如,恒定区)的定义、示例和优选示例如上所述。

[1030] 亲和性物质修饰的抗体或其盐经由存在于上述恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的由天冬酰胺、谷氨酰胺、蛋氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、组氨酸和赖氨酸构成的14种氨基酸残基中的任1种或2种以上(例如,2种、3种、4种)的侧链中的官能团的修饰,可包含亲和性物质。亲和性物质修饰的抗体或其盐优选经由存在于上述恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的赖氨酸、酪氨酸、色氨酸或半胱氨酸中的任1种氨基酸的侧链中的官能团的修饰,更优选经由赖氨酸、酪氨酸或色氨酸中的任1种氨基酸的侧链中的官能团的修饰,更进一步优选经由赖氨酸或酪氨酸的侧链中的官能团的修饰,特别优选经由赖氨酸的侧链中的氨基的修饰,可包含亲和性物质。上述恒定区中的这些氨基酸残基的位点如上所述。亲和性物质对抗体或其盐的修饰位点可通过肽图分析(Peptide Mapping)来确认。如上所述,修饰可以是位点选择性的。因此,在后述的式(II)、(IIa)、(IIa-1)、(IIb)和(IIb-1)中,免疫球蛋白单元经由上述氨基酸残基的侧链中的官能团,可位点选择性地具有相应的修饰单元。

[1031] 优选地,亲和性物质修饰的抗体经由抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的一个重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,可包含上述亲和性物质(换言之,经由免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中的赖氨酸残基的侧链中的氨基而含有亲和性物质,经由另一个重链的恒定区中的赖氨酸残基的侧链中的氨基而不含亲和性物质)。更具体而言,1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基的位点可以是依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位(例如,参照国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/009165号、国际公开第2020/090979号)。如上所述,修饰可以是位点选择性的。因此,在后述的式(II)、(IIa)、(IIa-1)、(IIb)和(IIb-1)中,免疫球蛋白单元经由上述赖氨酸残基的侧链中的氨基,可位点选择性地具有相应的修饰单元。

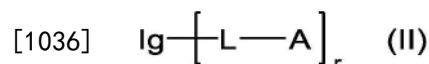
[1032] 亲和性物质修饰的抗体或其盐的制造可通过使本发明的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应来进行。在反应中,

本发明的化合物或其盐相对于抗体的当量(本发明的化合物或其盐/抗体)会根据本发明的化合物或其盐及抗体的种类等因素而变动,因此没有特别限定,例如为1~100,优选为2~80,更优选为4~60,更进一步优选为5~40,特别优选为6~20。

[1033] 这样的反应可在不引起蛋白的变性/降解(例如,酰胺键的切割)的条件(温和条件)下适当进行。例如,在这样的温和条件下的反应可在适当的反应体系例如缓冲液中、在室温(例如,约15~30℃)下来进行。缓冲液的pH例如为5~9,优选为5.5~8.5,更优选为6.0~8.0。缓冲液可包含适当的催化剂。反应时间例如为1分钟~20小时,优选为10分钟~15小时,更优选为20分钟~10小时,更进一步优选为30分钟~8小时。关于这样的反应的细节,例如参照G. J. L. Bernardes等人, *Chem. Rev.*, 115, 2174 (2015); G. J. L. Bernardes等人, *Chem. Asian. J.*, 4, 630 (2009); B. G. Davies等人, *Nat. Commun.*, 5, 4740 (2014); A. Wagner等人, *Bioconjugate. Chem.*, 25, 825 (2014)。

[1034] 在特定的实施方式中,亲和性物质修饰的抗体或其盐可以是包含下述式(II)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1035] [化学式44]



[1037] 式中,

[1038] Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[1039] L表示接头,

[1040] A表示包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质,

[1041] 上述亲和性物质对上述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。Ig所示的免疫球蛋白单元、L所示的接头和A所示的亲和性物质、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述(例如,关于L所示的接头,参照式(I)的化合物中L所示的接头)。

[1042] 亲和性物质对上述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。平均修饰百分率r可以是66%以上、67%以上、68%以上、69%以上、70%以上、72%以上、74%以上、76%以上、78%以上、80%以上、82%以上、84%以上、86%以上、88%以上、90%以上、92%以上、94%以上或96%以上。平均修饰百分率r还可以是130%以下、125%以下、120%以下、115%以下、110%以下、105%以下、100%以下、98%以下、96%以下、94%以下、92%以下、90%以下、88%以下、86%以下、84%以下、82%以下或80%以下。平均修饰百分率r可通过质谱分析(可并用DAR计算器(Agilent公司软件)。参照实施例)来确定。

[1043] 平均修饰百分率r还可优选为65~100%,更优选为70~100%,更进一步优选为75~100%,特别优选为80~100%、85~100%、90~100%或95~100%。在这些平均修饰百分率中,上限值可以是98%以下或96%以下等的上述百分率以下的值。或者,平均修饰百分率r可以是96~100%、97~100%、98~100%、99~100%或100%。

[1044] 上述平均修饰百分率r的程度也同样地适用于其它平均修饰百分率r。即,上述平均修饰百分率r的程度不仅适用于基于亲和性物质的后述的平均修饰百分率r,也同样地适用于基于任意修饰(例如,生物正交性官能团、功能性物质)的后述的平均修饰百分率r。

[1045] 包含式(II)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过使式(I)所表示的化合

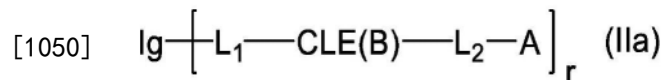
物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应来进行。

[1046] 在特定的实施方式中,亲和性物质修饰的抗体或其盐也可在亲和性物质与抗体(免疫球蛋白单元)之间进一步包含切割性部分。在这种情况下,上述包含式(II)所表示的结构单元的抗体或其盐也可含有包含切割性部分的接头。切割性部分的定义、示例和优选示例如上所述。

[1047] 在亲和性物质修饰的抗体或其盐包含切割性部分的情况下,切割性部分可通过切割在抗体(免疫球蛋白单元)侧生成生物正交性官能团。作为这样的切割性部分,例如可举出:二硫化物残基、酯残基(包含通常的酯残基和如硫酯残基之类的上述其它酯残基)、缩醛残基(包含通常的酯残基和如硫缩醛残基之类的其它缩醛残基)、缩酮残基、亚胺残基、邻二醇残基。

[1048] 当亲和性物质修饰的抗体或其盐包含可通过切割在抗体(免疫球蛋白单元)侧生成生物正交性官能团的切割性部分的情况下,可以是包含下述式(IIa)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1049] [化学式45]



[1051] 式中,

[1052] Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[1053]  $\text{L}_1$ 表示第1接头,

[1054]  $\text{L}_2$ 表示第2接头,

[1055] CLE(B)表示可通过切割在上述免疫球蛋白单元侧生成生物正交性官能团的切割性部分,

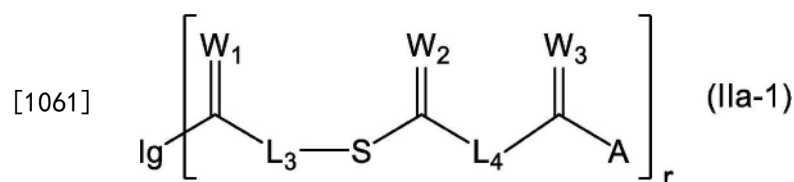
[1056] A表示包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质,

[1057] 上述亲和性物质对上述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。Ig所示的免疫球蛋白单元、 $\text{L}_1$ 所示的第1接头、 $\text{L}_2$ 所示的第2接头、CLE(B)所示的切割性部分、A所示的亲和性物质和r所示的平均修饰百分率、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述。

[1058] 包含式(IIa)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过使式(Ia)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应来进行。

[1059] 在特定的实施方式中,亲和性物质修饰的抗体或其盐可以是包含下述式(IIa-1)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1060] [化学式46]



[1062] 式中,

[1063] Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元，

[1064]  $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 分别独立地表示氧原子或硫原子，

[1065]  $L_3$ 表示第3接头，

[1066]  $L_4$ 表示第4接头，

[1067] S表示硫原子，

[1068] A表示包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质，

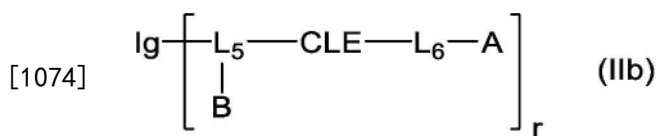
[1069] 上述亲和性物质对上述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。Ig所示的免疫球蛋白单元、 $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 所示的原子、 $L_3$ 所示的第3接头、 $L_4$ 所示的第4接头、A所示的亲和性物质和r所示的平均修饰百分率、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述。

[1070] 包含式(IIa-1)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过使式(Ia-1)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应来进行。

[1071] 另外，在亲和性物质修饰的抗体或其盐包含切割性部分的情况下，可在抗体(免疫球蛋白单元)与切割性部分之间进一步包含生物正交性官能团。生物正交性官能团如上所述。优选地，生物正交性官能团可举出：叠氮残基、炔烃残基(优选可被上述取代基取代的具有碳碳三键的环基)、四嗪残基、烯炔残基、硫醇残基、马来酰亚胺残基、硫醇残基、咪唑残基和卤代羰基残基。

[1072] 当亲和性物质修饰的抗体或其盐在抗体(免疫球蛋白单元)与切割性部分之间进一步包含生物正交性官能团的情况下，可以是包含下述式(IIb)所表示的结构单元的抗体或其盐：

[1073] [化学式47]



[1075] 式中，

[1076] Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元，

[1077]  $L_5$ 表示第5接头，

[1078]  $L_6$ 表示第6接头，

[1079] B表示包含生物正交性官能团的基团，

[1080] CLE表示切割性部分，

[1081] A表示包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质，

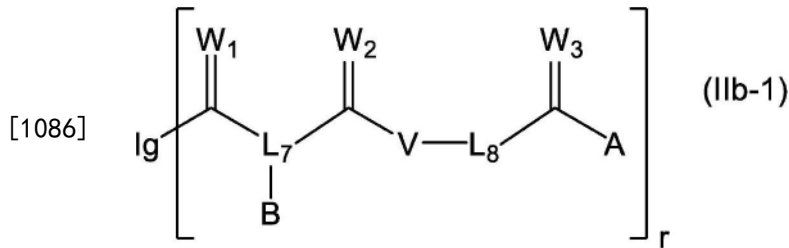
[1082] 上述亲和性物质对上述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。Ig所示的免疫球蛋白单元、 $L_5$ 所示的第5接头、 $L_6$ 所示的第6接头、B所示的包含生物正交性官能团的基团、CLE所示的切割性位点、A所示的亲和性物质和r所示的平均修饰百分率、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述。

[1083] 包含式(IIb)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过使式(Ib)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反

应来进行。

[1084] 在特定的实施方式中,亲和性物质修饰的抗体或其盐可以是包含下述式(IIb-1)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1085] [化学式48]



[1087] 式中,

[1088] Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[1089]  $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1090]  $L_7$ 表示第7接头,

[1091]  $L_8$ 表示第8接头,

[1092] B表示包含生物正交性官能团的基团,

[1093] V表示氧原子或硫原子,A表示包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质,

[1094] 上述亲和性物质对上述免疫球蛋白单元的修饰百分率r为65~135%。Ig所示的免疫球蛋白单元、 $W_1$ 、 $W_2$ 和 $W_3$ 所示的原子、 $L_7$ 所示的第7接头、 $L_8$ 所示的第8接头、B所示的包含生物正交性官能团的基团、V所示的原子、A所示的亲和性物质和r所示的平均修饰百分率、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述。

[1095] 包含式(IIb-1)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过使式(Ib-1)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应来进行。

[1096] 亲和性物质修饰的抗体或其盐也可进一步包含追加修饰部分。作为抗体的修饰方法,已知有各种方法。因此,在本发明中,可对亲和性物质修饰的抗体或其盐进行修饰,以进一步包含追加修饰部分。追加修饰部分可引入至抗体的重链或轻链中,优选引入至抗体的重链中(特别是,重链的恒定区中)。

[1097] 在特定的实施方式中,追加修饰部分可以是包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第3亲和性部分的追加亲和性物质。“第3亲和性部分”中的“亲和性部分”和“追加亲和性物质”中的“亲和性物质”分别与上述相同。第3亲和性部分可与上述的第1亲和性部分和/或第2亲和性部分相同或不同,优选为不同。

[1098] 在特定的实施方式中,包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第3亲和性部分的追加修饰部分,可经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。亲和性物质修饰的抗体或其盐经由抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的2个重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,可包含追加修饰部分。更具体而言,1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸

酸残基的位点可以是依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位(例如,参照国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/009165号、国际公开第2020/090979号)。优选引入包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第3亲和性部分的追加修饰部分的位点与引入包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质的位点不同。例如,在引入上述亲和性物质的位点为246/248位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选288/290位或317位的赖氨酸残基,更优选288/290位的赖氨酸残基。在引入上述亲和性物质的位点为288/290位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选246/248位或317位的赖氨酸残基,更优选246/248位的赖氨酸残基。在引入上述亲和性物质的位点为317位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选246/248位或288/290位的赖氨酸残基。

[1099] 4-2. 包含至少2个亲和性物质(包含第1亲和性部分、第2亲和性部分、第3亲和性部分和第4亲和性部分)的亲和性物质修饰的抗体或其盐

[1100] 本发明还提供包含第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐,其中,第1修饰部分以及第2修饰部分包含在抗体重链的恒定区中,所述第1修饰部分包含:包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的第1亲和性物质,所述第2修饰部分包含:包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第3亲和性部分和第4亲和性部分的第2亲和性物质。亲和性物质和抗体、以及构成它们的要素(例如,亲和性肽等亲和性部分、肽接头等亲和性部分之间的接头和恒定区)的定义、示例和优选示例如上所述。第1修饰部分和第2修饰部分可相同也可不同,优选为不同。

[1101] 优选地,这样的亲和性物质修饰的抗体或其盐可包含:(a) 抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)、以及(b) 上述第1修饰部分和第2修饰部分,(c) 所述第1修饰部分引入至所述免疫球蛋白单元中的第1重链的恒定区中,并且(d) 所述第2修饰部分引入至所述免疫球蛋白单元中的第2重链的恒定区中。抗体、免疫球蛋白单元和亲和性物质、以及构成它们的要素(例如,恒定区)的定义、示例和优选示例如上所述。

[1102] 亲和性物质修饰的抗体或其盐经由存在于上述恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的由天冬酰胺、谷氨酰胺、蛋氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、组氨酸和赖氨酸构成的14种氨基酸残基中的任1种或2种以上(例如,2种、3种、4种)的侧链中的官能团的修饰,可含有包含第1亲和性物质的第1修饰部分和包含第2亲和性物质的第2修饰部分。亲和性物质修饰的抗体或其盐优选经由存在于上述恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的赖氨酸、酪氨酸、色氨酸或半胱氨酸中的任1种氨基酸的侧链中的官能团的修饰,更优选经由赖氨酸、酪氨酸或色氨酸中的任1种氨基酸的侧链中的官能团的修饰,更进一步优选经由赖氨酸或酪氨酸的侧链中的官能团的修饰,特别优选经由赖氨酸的侧链中的氨基的修饰,可含有包含第1亲和性物质的第1修饰部分和包含第2亲和性物质的第2修饰部分。上述恒定区中的这些氨基酸残基的位点如上所述。亲和性物质对抗体或其盐的修饰位点可通过肽图分析来确认。如上所述,修饰可以是位点选择性的。因此,在后述的式中,免疫球蛋白单元经由上述氨基酸残基的侧链中的官能团,可位点选择性地具有相应的修饰单元。

[1103] 优选地,亲和性物质修饰的抗体经由抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的

2个轻链的免疫球蛋白单元)中的第1重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,可含有包含上述第1亲和性物质的第1修饰部分,另外,经由第2重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,可含有包含上述第2亲和性物质的第2修饰部分。更具体而言,1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基的位点可以是依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。如上所述,修饰可以是位点选择性的。因此,在后述的式中,免疫球蛋白单元经由上述赖氨酸残基的侧链中的氨基,可位点选择性地具有相应的修饰单元。

[1104] 亲和性物质修饰的抗体或其盐的制造可通过以下(1)和(2)来进行:

[1105] (1)使本发明的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体反应,生成在所述免疫球蛋白单元的重链的恒定区中含有包含所述第1亲和性物质的第1修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐;以及

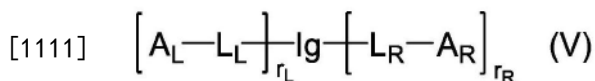
[1106] (2)使在所述免疫球蛋白单元的重链的恒定区中包含所述第1亲和性物质的亲和性物质修饰的抗体或其盐与本发明的化合物或其盐反应,生成在所述免疫球蛋白单元的重链的恒定区中包含所述第1修饰部分和第2修饰部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐。

[1107] 工序(1)中使用的本发明的化合物或其盐和工序(2)中使用的本发明的化合物或其盐可相同也可不同,优选为不同。在反应中,本发明的化合物或其盐相对于抗体的当量(本发明的化合物或其盐/抗体)会根据本发明的化合物或其盐及抗体的种类等因素而变动,因此没有特别限定,例如为1~100,优选为2~80,更优选为4~60,更进一步优选为5~40,特别优选为6~20。

[1108] 这样的反应可在不会引起蛋白的变性/降解(例如,酰胺键的切割)的条件(温和条件)下适当地进行。例如,这样的温和条件下的反应与上述相同。

[1109] 在特定的实施方式中,这样的亲和性物质修饰的抗体或其盐可以是包含下述式(V)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1110] [化学式49]



[1112] 式中,

[1113] Ig表示包含由第1重链和第2重链构成的2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[1114]  $L_L$ 和 $L_R$ 分别独立地表示接头,

[1115]  $A_L$ 表示所述第1亲和性物质,

[1116]  $A_R$ 表示所述第2亲和性物质,

[1117] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

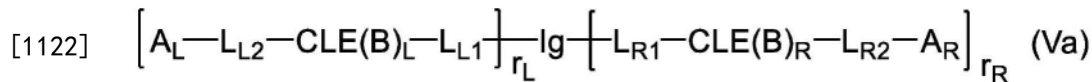
[1118] 在特定的实施方式中,亲和性物质修饰的抗体或其盐可在(i')所述第1亲和性物质与(ii')所述免疫球蛋白单元之间进一步包含(iii')第1切割性部分;和/或可在(ii'')所述第2亲和性物质与(ii'')所述免疫球蛋白单元之间进一步包含(iii'')第2切割性部分。第1切割性部分和第2切割性部分与上述的切割性部分同样。第1切割性部分和第2切割性部分

可相同也可不同。

[1119] 在亲和性物质修饰的抗体或其盐包含切割性部分的情况下,切割性部分可通过切割在免疫球蛋白单元侧生成生物正交性官能团。作为这样的切割性部分,例如可举出:二硫化物残基、酯残基(包含通常的酯残基和如硫酯残基之类的上述其它酯残基)、缩醛残基(包含通常的酯残基和如硫缩醛残基之类的其它缩醛残基)、缩酮残基、亚胺残基、邻二醇残基。

[1120] 当亲和性物质修饰的抗体或其盐包含可通过切割在免疫球蛋白单元侧生成生物正交性官能团的切割性部分的情况下,可以是包含下述式(Va)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1121] [化学式50]



[1123] 式中,

[1124] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1125]  $L_{L1}$ 和 $L_{R1}$ 分别独立地表示第1接头,

[1126]  $L_{L2}$ 和 $L_{R2}$ 分别独立地表示第2接头,

[1127]  $CLE(B)_L$ 和 $CLE(B)_R$ 分别独立地表示可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成生物正交性官能团的切割性部分,

[1128]  $A_L$ 表示所述第1亲和性物质,

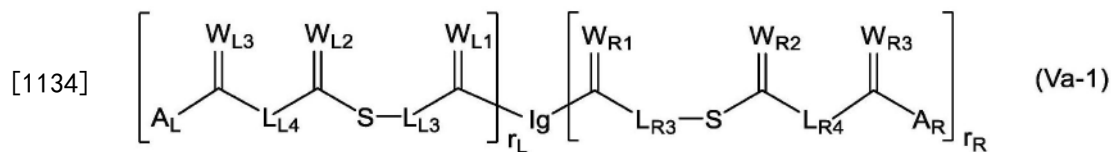
[1129]  $A_R$ 表示所述第2亲和性物质,

[1130] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1131] 包含式(Va)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过使式(Ia)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应来进行。

[1132] 在特定的实施方式中,亲和性物质修饰的抗体或其盐可以是包含下述式(Va-1)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1133] [化学式51]



[1135] 式中,

[1136] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1137]  $W_{L1}$ 、 $W_{L2}$ 和 $W_{L3}$ 、以及 $W_{R1}$ 、 $W_{R2}$ 和 $W_{R3}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1138]  $L_{L3}$ 和 $L_{R3}$ 分别独立地表示第3接头,

[1139]  $L_{L4}$ 和 $L_{R4}$ 分别独立地表示第4接头,

[1140] S表示硫原子,

[1141]  $A_L$ 表示所述第1亲和性物质,

[1142]  $A_R$ 表示所述第2亲和性物质,

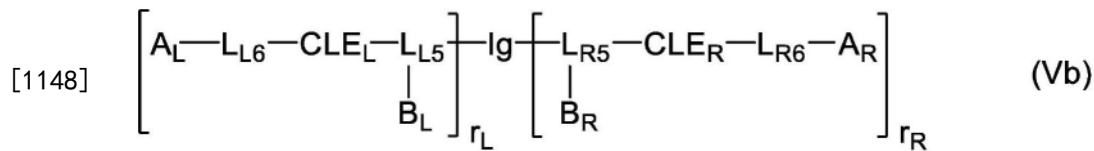
[1143] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1144] 包含式(Va-1)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过使式(Ia-1)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应来进行。

[1145] 另外,亲和性物质修饰的抗体或其盐可在(ii')免疫球蛋白单元与(iii')所述第1切割性部分之间进一步包含(iv')第1生物正交性官能团;和/或可在(ii'')免疫球蛋白单元与(iii'')所述第2切割性部分之间进一步包含(iv'')第2生物正交性官能团。生物正交性官能团如上所述。优选地,生物正交性官能团可举出:叠氮残基、炔烃残基(优选可被上述取代基取代的具有碳碳三键的环基)、四嗪残基、烯炔残基、硫醇残基、马来酰亚胺残基、硫醇残基、咪唑残基和卤代羰基残基。

[1146] 当亲和性物质修饰的抗体或其盐在免疫球蛋白单元与切割性部分之间进一步包含生物正交性官能团的情况下,可以是包含下述式(Vb)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1147] [化学式52]



[1149] 式中,

[1150]  $Ig$ 表示所述免疫球蛋白单元,

[1151]  $L_{L5}$ 和 $L_{R5}$ 分别独立地表示第5接头,

[1152]  $L_{L6}$ 和 $L_{R6}$ 分别独立地表示第6接头,

[1153]  $B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

[1154]  $B_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

[1155]  $CLE_L$ 和 $CLE_R$ 分别独立地表示切割性部分,

[1156]  $A_L$ 表示所述第1亲和性物质,

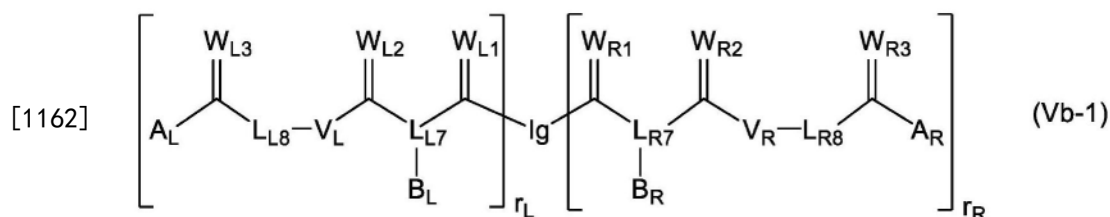
[1157]  $A_R$ 表示所述第2亲和性物质,

[1158] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1159] 包含式(Vb)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过使式(Ib)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应来进行。

[1160] 在特定的实施方式中,亲和性物质修饰的抗体或其盐可以是包含下述式(Vb-1)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1161] [化学式53]



[1163] 式中,

[1164] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1165]  $W_{L1}$ 、 $W_{L2}$ 和 $W_{L3}$ 、以及 $W_{R1}$ 、 $W_{R2}$ 和 $W_{R3}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1166]  $L_{L7}$ 和 $L_{R7}$ 分别独立地表示第7接头,

[1167]  $L_{L8}$ 和 $L_{R8}$ 分别独立地表示第8接头,

[1168]  $B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

[1169]  $B_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

[1170]  $V_L$ 和 $V_R$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1171]  $A_L$ 表示所述第1亲和性物质,

[1172]  $A_R$ 表示所述第2亲和性物质,

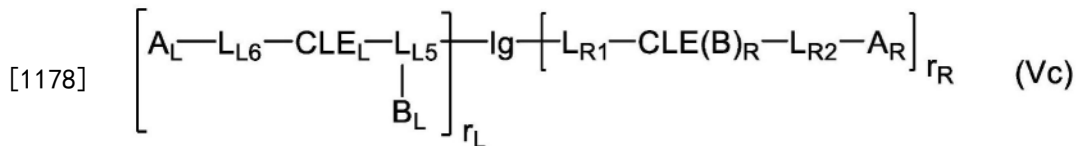
[1173] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1174] 包含式(Vb-1)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过使式(Ib-1)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应来进行。

[1175] 另外,亲和性物质修饰的抗体或其盐可在(i')第1亲和性物质与(ii')所述免疫球蛋白单元之间进一步包含(iii')第1切割性部分;并且可在(ii'')所述免疫球蛋白单元与(iii'')第2切割性部分之间进一步包含(iv'')第1生物正交性官能团。在这种情况下,上述第1切割性部分可以是可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成第2生物正交性官能团的切割性部分。

[1176] 在特定的实施方式中,亲和性物质修饰的抗体或其盐可以是包含下述式(Vc)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1177] [化学式54]



[1179] 式中,

[1180] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1181]  $L_{R1}$ 表示第1接头,

[1182]  $L_{R2}$ 表示第2接头,

[1183]  $L_{L5}$ 表示第5接头,

[1184]  $L_{L6}$ 表示第6接头,

[1185]  $B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的基团,

[1186]  $CLE_L$ 表示第1切割性部分,

[1187]  $CLE(B)_R$ 表示可通过切割在所述免疫球蛋白单元侧生成第2生物正交性官能团的第2切割性部分,

[1188]  $A_L$ 表示所述第1亲和性物质,

[1189]  $A_R$ 表示所述第2亲和性物质,

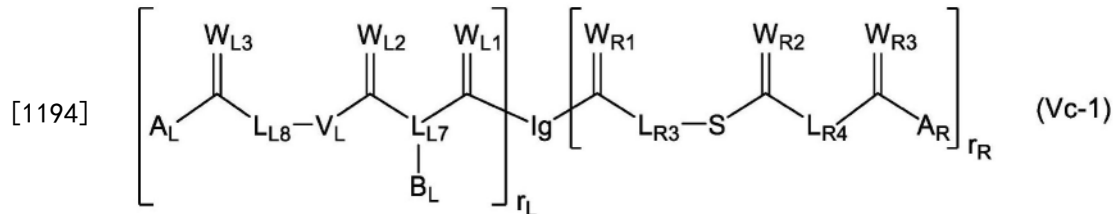
[1190] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部

分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1191] 包含式(Vc)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过使式(Ia)所表示的化合物或其盐和式(Ib)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应来进行。

[1192] 在特定的实施方式中,亲和性物质修饰的抗体或其盐可以是包含下述式(Vc-1)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1193] [化学式55]



[1195] 式中,

[1196] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1197]  $W_{L1}$ 、 $W_{L2}$ 和 $W_{L3}$ 、以及 $W_{R1}$ 、 $W_{R2}$ 和 $W_{R3}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1198]  $L_{R3}$ 分别独立地表示第3接头,

[1199]  $L_{R4}$ 分别独立地表示第4接头,

[1200]  $L_{L7}$ 分别独立地表示第7接头,

[1201]  $L_{L8}$ 分别独立地表示第8接头,

[1202]  $B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的基团,

[1203]  $V_L$ 表示氧原子或硫原子,

[1204]  $A_L$ 表示所述第1亲和性物质,

[1205]  $A_R$ 表示所述第2亲和性物质,

[1206] 所述第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和所述第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1207] 包含式(Vc-1)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过使式(Ia-1)所表示的化合物或其盐和式(Ib-1)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应来进行。

[1208] 在上述式(V)、(Va)、(Va-1)、(Vb)、(Vb-1)、(Vc)和(Vc-1)中,Ig所示的免疫球蛋白单元和抗体的定义、示例和优选示例如上所述。

[1209] 在本申请说明书中,任何符号的下标字符“L”方便地用于相对于免疫球蛋白单元(Ig)位于左侧(Left)的符号。另一方面,任何符号的下标字符“R”方便地用于相对于免疫球蛋白单元(Ig)位于右侧(Right)的符号。带有下标字符“L”和“R”的符号的含义与不带下标字符“L”和“R”的符号的含义相同。

[1210] 因此,在上述式(V)、(Va)、(Va-1)、(Vb)、(Vb-1)、(Vc)和(Vc-1)中,带有下标字符“L”和“R”的符号如下所示。

[1211]  $W_{L1}$ 和 $W_{R1}$ 与 $W_1$ 同样,优选氧原子。

[1212]  $W_{L2}$ 和 $W_{R2}$ 与 $W_2$ 同样,优选氧原子。

[1213]  $W_{L3}$ 和 $W_{R3}$ 与 $W_3$ 同样,优选氧原子。

[1214]  $L_L$ 和 $L_R$ 所示的接头与 $L$ 所示的接头同样。 $L_L$ 和 $L_R$ 所示的接头可相同也可不同,优选为不同。

[1215]  $L_{L1}$ 和 $L_{R1}$ 所示的第1接头与 $L_1$ 所示的第1接头同样。 $L_{L1}$ 和 $L_{R1}$ 所示的第1接头可相同也可不同,优选为不同。

[1216]  $L_{L2}$ 和 $L_{R2}$ 所示的第2接头与 $L_2$ 所示的第2接头同样。 $L_{L2}$ 和 $L_{R2}$ 所示的第2接头可相同也可不同,优选为不同。

[1217]  $L_{L3}$ 和 $L_{R3}$ 所示的第3接头与 $L_3$ 所示的第3接头同样。 $L_{L3}$ 和 $L_{R3}$ 所示的第3接头可相同也可不同,优选为不同。

[1218]  $L_{L4}$ 和 $L_{R4}$ 所示的第4接头与 $L_4$ 所示的第4接头同样。 $L_{L4}$ 和 $L_{R4}$ 所示的第4接头可相同也可不同,优选为不同。

[1219]  $L_{L5}$ 和 $L_{R5}$ 所示的第5接头与 $L_5$ 所示的第5接头同样。 $L_{L5}$ 和 $L_{R5}$ 所示的第1接头可相同也可不同,优选为不同。

[1220]  $L_{L6}$ 和 $L_{R6}$ 所示的第6接头与 $L_6$ 所示的第6接头同样。 $L_{L6}$ 和 $L_{R6}$ 所示的第6接头可相同也可不同,优选为不同。

[1221]  $L_{L7}$ 和 $L_{R7}$ 所示的第7接头与 $L_7$ 所示的第7接头同样。 $L_{L7}$ 和 $L_{R7}$ 所示的第7接头可相同也可不同,优选为不同。

[1222]  $L_{L8}$ 和 $L_{R8}$ 所示的第8接头与 $L_8$ 所示的第8接头同样。 $L_{L8}$ 和 $L_{R8}$ 所示的第8接头可相同也可不同,优选为不同。

[1223]  $CLE(B)_L$ 和 $CLE(B)_R$ 所示的切割性部分与 $CLE(B)$ 所示的切割性部分同样。 $CLE(B)_L$ 和 $CLE(B)_R$ 所示的切割性部分可相同也可不同,优选为不同。

[1224] 包含 $B_L$ 所示的第1生物正交性官能团的第1基团和包含 $B_R$ 所示的第2生物正交性官能团的第2基团与包含 $B$ 所示的生物正交性官能团的基团同样。包含 $B_L$ 所示的第1生物正交性官能团的第1基团和包含 $B_R$ 所示的第2生物正交性官能团的第2基团可相同也可不同,优选为不同。

[1225]  $CLE_L$ 和 $CLE_R$ 所示的切割性部分与 $CLE$ 所示的切割性部分同样。 $CLE_L$ 和 $CLE_R$ 所示的切割性部分可相同也可不同,优选为不同。

[1226]  $A_L$ 和 $A_R$ 所示的亲和性物质与 $A$ 所示的亲和性物质同样。 $A_L$ 和 $A_R$ 所示的亲和性物质可相同也可不同。

[1227]  $r_L$ 和 $r_R$ 所示的平均修饰百分率的程度及其确定方法与 $r$ 所示的平均修饰百分率同样。 $r_L$ 和 $r_R$ 所示的平均修饰百分率可相同也可不同,优选为不同。

[1228] 目标亲和性物质修饰的抗体或其盐的生成的确认还取决于其具体的原料和产物的分子量,例如通过电泳法、色谱法(例如,凝胶过滤色谱法、离子交换色谱法、反相柱色谱法、HPLC)或质谱分析来进行。位点选择性的确认可通过肽图分析来进行。肽图分析例如可通过蛋白酶处理和质谱分析来进行。作为蛋白酶,优选内切蛋白酶。作为这样的内切蛋白酶,例如可举出:胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、Glu-C、Lys-N、Lys-C、Asp-N。亲和性物质的引入个数的确认可通过质谱分析(可并用DAR计算器(Agilent公司软件))来进行。亲和性物质修饰的抗体或其盐可通过色谱法(例如,上述的色谱法和亲和色谱法)等任意方法来适当纯化。

[1229] 亲和性物质修饰的抗体或其盐可进一步包含追加修饰部分。作为抗体的修饰方

法,已知有各种方法。因此,在本发明中,可对亲和性物质修饰的抗体或其盐进行修饰,以进一步包含追加修饰部分。追加修饰部分可引入至抗体的重链或轻链中,优选引入至抗体的重链中(特别是,重链的恒定区中)。

[1230] 在特定的实施方式中,追加修饰部分可以是包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第5亲和性部分的追加亲和性物质。“第5亲和性部分”中的“亲和性部分”和“追加亲和性物质”中的“亲和性物质”分别与上述相同。第5亲和性部分与上述的第1亲和性部分、第2亲和性部分、第3亲和性部分和/或第4亲和性部分可相同也可不同,优选为不同。

[1231] 在特定的实施方式中,包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第5亲和性部分的追加修饰部分,可经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。亲和性物质修饰的抗体或其盐经由抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的2个重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,可包含追加修饰部分。更具体而言,1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基的位点可以是依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位(例如,参照国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/009165号、国际公开第2020/090979号)。优选引入包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第5亲和性部分的追加修饰部分的位点与引入含有包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的第1亲和性物质的第1修饰部分、以及含有包含对抗体重链的恒定区具有亲和性的第3亲和性部分和第4亲和性部分的第2亲和性物质的第2修饰部分的位点不同。例如,在引入上述第1修饰部分和第2修饰部分的两者的位点为246/248位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选288/290位或317位的赖氨酸残基,更优选288/290位的赖氨酸残基。在引入上述第1修饰部分和第2修饰部分的两者的位点为288/290位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选246/248位或317位的赖氨酸残基,更优选246/248位的赖氨酸残基。在引入上述第1修饰部分和第2修饰部分的两者的位点为317位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选246/248位或288/290位的赖氨酸残基。

[1232] 5. 不含亲和性物质的抗体或其盐

[1233] 5-1. 概要

[1234] 不含亲和性物质的抗体或其盐可使用亲和性物质修饰的抗体或其盐来制造,所述亲和性物质修饰的抗体或其盐包含:(A) 包含对抗体(免疫球蛋白单元)重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、以及(B) 抗体(免疫球蛋白单元),并且(C) 在(A) 该亲和性物质与(B) 抗体(免疫球蛋白单元)之间进一步包含切割性部分。

[1235] 更具体而言,不含亲和性物质的抗体或其盐的制造方法可以是下述的方法1-1或方法1-2。

[1236] (方法1-1) 不含亲和性物质的抗体或其盐的制造方法,其包括:将亲和性物质修饰的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成不含亲和性物质的抗体或其盐,所述亲和性物质修饰的抗体或其盐包含:(A) 包含对抗体(免疫球蛋白单元)重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、以及(B) 抗体(免疫球蛋白单元),并且(C) 在(A) 该亲和性物质与(B) 抗体(免疫球蛋白单元)之间进一步包含切割性部分。

[1237] (方法1-2) 不含亲和性物质的抗体或其盐的制造方法,其包括下述(1)和(2):

[1238] (1) 使化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应,生成在下述亲和性物质与上述抗体之间包含切割性部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐,所述化合物或其盐包含:(A) 包含对抗体(免疫球蛋白单元)重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、以及(B) 抗体(免疫球蛋白单元)反应性基团,并且(C) 在(A) 该亲和性物质与(B) 该反应性基团之间进一步包含切割性部分;以及

[1239] (2) 将在上述亲和性物质与上述抗体之间包含切割性部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成不含亲和性物质的抗体或其盐。

[1240] 作为切割处理,可举出:(a) 通过选自上述的酸性物质、碱性物质、还原剂、氧化剂、酶中的1种以上物质进行的处理;(b) 通过光等物理化学刺激进行的处理;或(c) 在使用了包含自分解性的切割性部分的切割性接头的情况下的放置(孵育)。关于这些切割处理,还可参照国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/009165号、国际公开第2020/090979号。

[1241] 这样的切割反应可在不引起蛋白的变性/降解(例如,酰胺键的切割)的条件(温和条件)下适当进行。例如,这样的温和条件如上所述。另外,在切割性位点为酯(例如,通常的酯或硫酸酯等其它酯)的情况下,切割反应可通过在羟胺盐酸盐溶液(例如,pH4.0~8.0,10mM~10M)中孵育适当的时间(例如,1小时)来进行(例如,Vance,N.等人,Bioconjugate Chem.2019,30,148-160)。

[1242] 通过切割反应得到的不含亲和性物质的抗体或其盐的生成的确认还取决于其具体的原料和产物的分子量,例如,可通过电泳法、色谱法(例如,凝胶过滤色谱法、离子交换色谱法、反相柱色谱法、HPLC)或质谱分析来进行。位点选择性的确认可通过上述的肽图分析来进行。亲和性物质的引入个数的确认可通过质谱分析(可并用DAR计算器(Agilent公司软件))来进行。亲和性物质修饰的抗体或其盐可通过色谱法(例如,上述的色谱法和亲和色谱法)等任意方法来适当纯化。

[1243] 然而,对于在(A) 包含对抗体(免疫球蛋白单元)重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质与(B) 抗体(免疫球蛋白单元)之间包含切割性部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐,(a) 在包含可通过切割在抗体(免疫球蛋白单元)侧生成生物正交性官能团的切割性部分作为切割性部分的情况下,或者(b) 在抗体(免疫球蛋白单元)与切割性部分之间包含生物正交性官能团的情况下,可作为不含亲和性物质的抗体或其盐来制造包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐。

[1244] 另外,通过使包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,可作为不含亲和性物质的抗体或其盐来制造抗体和功能性物质的缀合物或其盐。

[1245] 以下,作为不含亲和性物质的抗体或其盐,对(1) 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐、以及(2) 抗体和功能性物质的缀合物或其盐进行详细说明。

[1246] 5-2. 包含至少1个生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐

[1247] 本发明提供包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐,其包含:(a) 抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)、以及(b) 生物正交性官能团,并且(c) 生物正交性官能团仅引入至上述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中(即,在

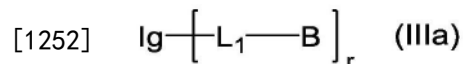
免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中引入生物正交性官能团,在另一个重链的恒定区中未引入生物正交性官能团)。抗体、免疫球蛋白单元和生物正交性官能团、以及构成它们的要素(例如,恒定区)的定义、示例和优选示例如上所述。

[1248] 抗体衍生物或其盐经由存在于上述恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的由天冬酰胺、谷氨酰胺、蛋氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、组氨酸和赖氨酸构成的14种氨基酸残基中的任1种或2种以上(例如,2种、3种、4种)的侧链中的官能团的修饰,可包含生物正交性官能团。抗体衍生物或其盐优选经由存在于上述恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的由赖氨酸、酪氨酸、色氨酸或半胱氨酸中的任1种氨基酸的侧链中的官能团的修饰,更优选经由赖氨酸、酪氨酸或色氨酸中的任1种氨基酸的侧链中的官能团的修饰,更进一步优选经由赖氨酸或酪氨酸的侧链中的官能团的修饰,特别优选经由赖氨酸的侧链中的氨基的修饰,可包含生物正交性官能团。上述恒定区中的这些氨基酸残基的位点如上所述。生物正交性官能团对抗体或其盐的修饰位点可通过肽图分析来确认。如上所述,修饰可以是位点选择性的。因此,在后述的式(IIIa)、(IIIa-1)、(IIIb)和(IIIb-1)中,免疫球蛋白单元经由上述氨基酸残基的侧链中的官能团,可位点选择性地具有相应的修饰单元。

[1249] 优选地,抗体衍生物经由抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的一个重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,可包含生物正交性官能团(换言之,经由免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中的赖氨酸残基的侧链中的氨基而包含生物正交性官能团,经由另一个重链的恒定区中的赖氨酸残基的侧链中的氨基而不含生物正交性官能团)。更具体而言,1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基的位点可以是依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位(例如,参照国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/090979号)。如上所述,修饰可以是位点选择性的。因此,在后述的式(IIIa)、(IIIa-1)、(IIIb)和(IIIb-1)中,免疫球蛋白单元经由上述赖氨酸残基的侧链中的氨基,可位点选择性地具有相应的修饰单元。

[1250] 在特定的实施方式中,抗体衍生物或其盐可以是包含下述式(IIIa)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1251] [化学式56]



[1253] 式中,

[1254] Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[1255] L<sub>1</sub>表示第1接头,

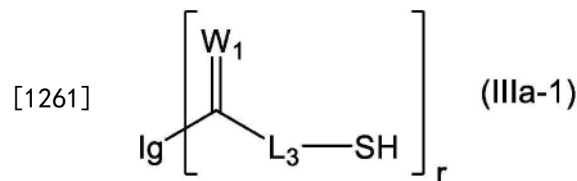
[1256] B表示包含生物正交性官能团的基团,

[1257] 生物正交性官能团对上述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。Ig所示的免疫球蛋白单元、L<sub>1</sub>所示的第1接头、B所示的包含生物正交性官能团的基团和r所示的平均修饰百分率、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述。特别优选的生物正交性官能团为硫醇基。

[1258] 在式(IIIa)中,  $L_1$ -B所示的部分结构的分子量可以是700以下。在 $L_1$ -B所示的部分结构的分子量为700以下的情况下, 具有生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐由于上述部分结构的分子量相对于抗体整体的分子量的比例非常小, 因此基于分子量的差异的纯化相对困难, 但根据可进行DAR的高度控制的本发明, 未必需要基于分子量差异的纯化, 即能够以高纯度得到显示所希望的DAR的抗体衍生物。 $L_1$ -B所示的部分结构的分子量可优选为600以下, 更优选为500以下, 更进一步优选为400以下, 特别优选为300以下、250以下、200以下或100以下。

[1259] 在另一个特定的实施方式中, 抗体衍生物或其盐可以是包含下述式(IIIa-1)所示的结构单元的抗体或其盐:

[1260] [化学式57]



[1262] 式中,

[1263]  $Ig$ 表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[1264]  $W_1$ 表示氧原子或硫原子,

[1265]  $L_3$ 表示第3接头,

[1266]  $SH$ 表示巯醇基,

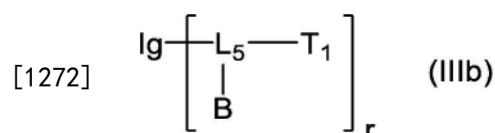
[1267] 生物正交性官能团对上述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r$ 为65~135%。 $Ig$ 所示的免疫球蛋白单元、 $W_1$ 所示的原子、 $L_3$ 所示的第3接头和 $r$ 所示的平均修饰百分率、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述。

[1268] 在式(IIIa-1)中,  $C(=W_1)-L_3-SH$ 所示的部分结构的分子量可以是700以下。 $C(=W_1)-L_3-SH$ 所示的部分结构的分子量可优选为600以下, 更优选为500以下, 更进一步优选为400以下, 特别优选为300以下、250以下、200以下、150以下或100以下。

[1269] 在式(IIIa-1)中,  $L_3$ 所示的第3接头可以是 $(CH_2)_{n1}$ 。 $n1$ 为1~10的整数。优选地,  $n1$ 可以是2以上的整数。 $n1$ 还可以是9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下或2以下的整数。特别优选地,  $n1$ 为2。

[1270] 在又一个特定的实施方式中, 抗体衍生物或其盐可以是包含下述式(IIIb)所示的结构单元的抗体或其盐:

[1271] [化学式58]



[1273] 式中,

[1274]  $Ig$ 表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[1275]  $L_5$ 表示第5接头,

[1276]  $B$ 表示包含生物正交性官能团的基团,

[1277]  $T_1$ 表示1价基团,

[1278] 生物正交性官能团对上述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r$ 为65~135%。Ig所示的免疫球蛋白单元、 $L_5$ 所示的第5接头、B所示的包含生物正交性官能团的基团和 $r$ 所示的平均修饰百分率、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述。特别优选的生物正交性官能团为叠氮基。

[1279]  $T_1$ 为1价基团,可通过切割性部分的切割来生成。1价基团可被取代也可不被取代。作为1价基团,可举出上述的1价基团。作为1价基团被取代时的取代基,可举出上述的取代基。

[1280] 在特定的实施方式中, $T_1$ 所示的1价基团可以是可被取代的羟基氨基。可被取代的羟基氨基可由下述式( $\alpha$ )表示。

[1281]  $NR_i-OR_{ii}$  ( $\alpha$ )

[1282] 式中,

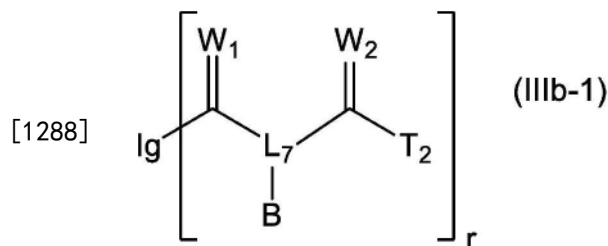
[1283]  $R_i$ 、 $R_{ii}$ 分别独立地表示氢原子或1价烃基。

[1284] 在此,1价烃基可被取代也可不被取代。1价烃基以及1价烃基被取代时的取代基的定义、示例和优选示例如上所述。优选地,可被取代的羟基氨基可以是 $NH-OR_{ii}$  (在此, $R_{ii}$ 表示烷基)。更优选地,可被取代的羟基氨基可以是 $NH-OR_{ii}$  (在此, $R_{ii}$ 表示碳原子数1~6的烷基)。

[1285] 在式(IIIb)中, $L_5(-B)-T_1$ 所示的部分结构的分子量可以是700以下。 $L_5(-B)-T_1$ 所示的部分结构的分子量可优选为600以下,更优选为500以下,更进一步优选为400以下,特别优选为300以下、250以下、200以下或100以下。

[1286] 在又一个特定的实施方式中,抗体衍生物或其盐可以是包含下述式(IIIb-1)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1287] [化学式59]



[1289] 式中,

[1290] Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[1291]  $W_1$ 和 $W_2$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1292]  $L_7$ 表示第7接头,

[1293] B表示包含生物正交性官能团的基团,

[1294]  $T_2$ 表示1价基团,

[1295] 生物正交性官能团对上述免疫球蛋白单元的修饰百分率 $r$ 为65~135%。Ig所示的免疫球蛋白单元、 $W_1$ 和 $W_2$ 所示的原子、 $L_7$ 所示的第7接头、B所示的包含生物正交性官能团的基团和 $r$ 所示的平均修饰百分率、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述。特别优选的生物正交性官能团为叠氮基。

[1296]  $T_2$ 为1价基团,可通过切割性部分的切割来生成。1价基团可被取代也可不被取代。

作为1价基团,可举出上述的1价基团。作为1价基团被取代时的取代基,可举出上述的取代基。 $T_2$ 所示的1价基团可以是可被取代的羟基氨基。可被取代的羟基氨基的细节与 $T_1$ 中所述的相同。

[1297] 在式(IIIb-1)中, $C(=W_1)-L_7(-B)-C(=W_2)-T_2$ 所示的部分结构的分子量可以是700以下。 $C(=W_1)-L_7(-B)-C(=W_2)-T_2$ 所示的部分结构的分子量可优选为600以下,更优选为500以下,更进一步优选为400以下,特别优选为300以下、250以下、200以下或100以下。

[1298] 在式(IIIb-1)中, $L_7$ 所示的第7接头可以是 $(CH_2)_{n_2}$ 。 $n_2$ 为1~10的整数。优选地, $n_2$ 可以是2以上或3以上的整数。 $n_2$ 还可以是9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下或3以下的整数。特别优选地, $n_2$ 可以是3。

[1299] 在式(IIIb-1)中,包含生物正交性官能团的基团可以是 $NH-C(=O)-(CH_2)_{n_3}-N_3$ 。 $n_3$ 为1~10的整数。优选地, $n_3$ 可以是2以上、3以上或4以上的整数。 $n_3$ 还可以是9以下、8以下、7以下、6以下、5以下或4以下的整数。特别优选地, $n_3$ 可以是4。

[1300] 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造可使用亲和性物质修饰的抗体或其盐来进行,所述亲和性物质修饰的抗体或其盐包含:(A)包含对抗体(免疫球蛋白单元)重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、以及(B)抗体(免疫球蛋白单元),并且(C)在(A)该亲和性物质与(B)抗体(免疫球蛋白单元)之间进一步包含切割性部分。

[1301] 在特定的实施方式中,当上述亲和性物质修饰的抗体或其盐包含(a)可通过切割在抗体(免疫球蛋白单元)侧生成生物正交性官能团的切割性部分的情况下,可制造包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐。

[1302] 更具体而言,作为这样的制造方法,例如可举出:下述(2-1)~(2-6)(图2~6)。

[1303] (方法2-1)包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造方法,其包括:将亲和性物质修饰的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐,所述亲和性物质修饰的抗体或其盐包含:(A)包含对抗体(免疫球蛋白单元)重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、以及(B)抗体(免疫球蛋白单元),并且(C)在(A)该亲和性物质与(B)抗体(免疫球蛋白单元)之间进一步包含切割性部分(在此,切割性部分是可通过切割在抗体(免疫球蛋白单元)侧生成生物正交性官能团的切割性部分)。

[1304] (方法2-2)包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造方法,其包括下述(1)和(2):

[1305] (1)使化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应,生成在下述亲和性物质与上述抗体之间包含切割性部分(在此,切割性部分是可通过切割在该抗体侧生成生物正交性官能团的切割性部分)的亲和性物质修饰的抗体或其盐,所述化合物或其盐包含:(A)包含对抗体(免疫球蛋白单元)重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、和(B)抗体(免疫球蛋白单元)反应性基团,并且(C)在(A)该亲和性物质与(B)该反应性基团之间进一步包含切割性部分(在此,切割性部分是可通过切割在针对抗体(免疫球蛋白单元)的反应性基团侧生成生物正交性官能团的切割性部分);以及

[1306] (2)将在上述亲和性物质与上述抗体之间包含切割性部分的亲和性物质修饰的抗

体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐。

[1307] (方法2-3) 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造方法,其包括:将包含上述式 (IIa) 所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式 (IIIa) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐。

[1308] (方法2-4) 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造方法,其包括下述 (1) 和 (2):

[1309] (1) 使上述式 (Ia) 所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应,生成包含上述式 (IIa) 所表示的结构单元的抗体或其盐;以及

[1310] (2) 将包含上述式 (IIa) 所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式 (IIIa) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐。

[1311] (方法2-5) 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造方法,其包括:将包含上述式 (IIa-1) 所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式 (IIIa-1) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐。

[1312] (方法2-6) 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造方法,其包括下述 (1) 和 (2):

[1313] (1) 使上述式 (Ia-1) 所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应,生成包含上述式 (IIa-1) 所表示的结构单元的抗体或其盐;以及

[1314] (2) 将包含上述式 (IIa-1) 所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式 (IIIa-1) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐。

[1315] 上述方法2-1可通过上述方法2-3或2-5来进行。上述方法2-2可通过上述方法2-4或2-6来进行。上述方法2-2、2-4和2-6可进一步包括:使本发明的亲和性物质与包含抗体反应性基团的部分化合物反应,生成本发明的化合物或其盐 (图2~6)。

[1316] 在另一个特定的实施方式中,当上述亲和性物质修饰的抗体或其盐在 (b) 抗体 (免疫球蛋白单元) 与切割性部分之间包含生物正交性官能团的情况下,可制造包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐。

[1317] 更具体而言,作为这样的制造方法,例如可举出:下述 (2-7) ~ (2-12) (图2~6)。

[1318] (方法2-7) 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造方法,其包括:将亲和性物质修饰的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐,所述亲和性物质修饰的抗体或其盐包含:(A) 包含对抗体 (免疫球蛋白单元) 重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、以及 (B) 抗体 (免疫球蛋白单元), 并且 (C) 在 (A) 该亲和性物质与 (B) 抗体 (免疫球蛋白单元) 之间进一步包含切割性部分,和在 (D) 抗体 (免疫球蛋白单元) 与切割性部分之间进一步包含生物正交性官能团。

[1319] (方法2-8) 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造方法,其包括下述 (1) 和 (2):

[1320] (1) 使化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应,生成在上述亲和性物质与上述抗体之间包含切割性部分、和在 (D) 抗体

(免疫球蛋白单元)与切割性部分之间包含生物正交性官能团的亲和性物质修饰的抗体或其盐,所述化合物或其盐包含:(A)包含对抗体(免疫球蛋白单元)重链的恒定区具有亲和性的第1亲和性部分和第2亲和性部分的亲和性物质、和(B)抗体(免疫球蛋白单元)反应性基团,并且(C)在(A)该亲和性物质与(B)该反应性基团之间进一步包含切割性部分、和在(D)该反应性基团与切割性部分之间进一步包含生物正交性官能团;以及

[1321] (2)将在上述亲和性物质与上述抗体之间包含切割性部分的亲和性物质修饰的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐。

[1322] (方法2-9)包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造方法,其包括:将包含上述式(IIb)所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式(IIIb)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐。

[1323] (方法2-10)包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造方法,其包括下述(1)和(2):

[1324] (1)使上述式(Ib)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应,生成包含上述式(IIb)所表示的结构单元的抗体或其盐;以及

[1325] (2)将包含上述式(IIb)所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式(IIIb)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐。

[1326] (方法2-11)包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造方法,其包括:将包含上述式(IIb-1)所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式(IIIb-1)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐。

[1327] (方法2-12)包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的制造方法,其包括下述(1)和(2):

[1328] (1)使上述式(Ib-1)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应,生成包含上述式(IIb-1)所表示的结构单元的抗体或其盐;以及

[1329] (2)将包含上述式(IIb-1)所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式(IIIb-1)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐。

[1330] 上述方法2-7可通过上述方法2-9或2-11来进行。上述方法2-8可通过上述方法2-10或2-11来进行。上述方法2-8、2-10和2-12可进一步包括:使本发明的亲和性物质与包含抗体反应性基团的部分反应,生成本发明的化合物或其盐(图2~6)。

[1331] 抗体衍生物或其盐可进一步包含追加修饰部分。作为抗体的修饰方法,已知有各种方法。因此,在本发明中,可对抗体衍生物或其盐进行修饰以进一步包含追加修饰部分。追加修饰部分可引入至抗体的重链或轻链中,优选引入至抗体的重链中(特别是,重链的恒定区中)。

[1332] 在特定的实施方式中,追加修饰部分可以是包含生物正交性官能团的追加修饰部分。生物正交性官能团与上述相同。追加修饰部分中所含的生物正交性官能团与上述(b)的生物正交性官能团可相同也可不同,优选为不同。

[1333] 在特定的实施方式中,包含生物正交性官能团的追加修饰部分可经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重

链的恒定区中。抗体衍生物或其盐经由抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的2个重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,可包含追加修饰部分。更具体而言,1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基的位点可以是依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位(例如,参照国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/009165号、国际公开第2020/090979号)。优选引入包含生物正交性官能团的追加修饰部分的位点与引入上述(b)的生物正交性官能团的位点不同。例如,在引入上述(b)的生物正交性官能团的位点为246/248位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选288/290位或317位的赖氨酸残基,更优选288/290位的赖氨酸残基。在引入上述(b)的生物正交性官能团的位点为288/290位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选246/248位或317位的赖氨酸残基,更优选246/248位的赖氨酸残基。在引入上述(b)的生物正交性官能团的位点为317位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选246/248位或288/290位的赖氨酸残基。

[1334] 5-3. 包含至少2个生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐

[1335] 本发明还提供包含第1修饰部分和第2修饰部分的抗体衍生物或其盐,其包含第1修饰部分和第2修饰部分,所述第1修饰部分包含:(a) 包含由第1重链和第2重链构成的2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b) 第1生物正交性官能团,所述第2修饰部分包含第2生物正交性官能团,

[1336] (c) 第1修饰部分引入至所述第1重链的恒定区中,

[1337] (d) 第2修饰部分引入至所述第2重链的恒定区中,并且

[1338] (e) 第1修饰部分和第2修饰部分彼此不同。抗体、免疫球蛋白单元和生物正交性官能团、以及构成它们的要素(例如,恒定区)的定义、示例和优选示例如上所述。

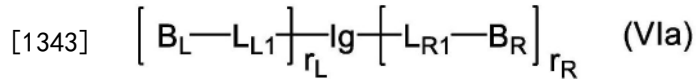
[1339] 抗体衍生物或其盐经由存在于上述恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的由天冬酰胺、谷氨酰胺、蛋氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、组氨酸和赖氨酸构成的14种氨基酸残基中的任1种或2种以上(例如,2种、3种、4种)的侧链中的官能团的修饰,可含有包含第1生物正交性官能团的第1修饰部分和包含第2生物正交性官能团的第2修饰部分。抗体衍生物或其盐优选经由存在于上述恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的赖氨酸、酪氨酸、色氨酸或半胱氨酸中的任1种氨基酸的侧链中的官能团的修饰,更优选经由赖氨酸、酪氨酸或色氨酸中的任1种氨基酸的侧链中的官能团的修饰,更进一步优选经由赖氨酸或酪氨酸的侧链中的官能团的修饰,特别优选经由赖氨酸的侧链中的氨基的修饰,可含有包含第1生物正交性官能团的第1修饰部分和包含第2生物正交性官能团的第2修饰部分。上述恒定区中的这些氨基酸残基的位点如上所述。生物正交性官能团对抗体或其盐的修饰位点可通过肽图分析来确认。如上所述,修饰可以是位点选择性的。因此,在后述的式中,免疫球蛋白单元经由上述氨基酸残基的侧链中的官能团,可位点选择性地具有相应的修饰单元。

[1340] 优选地,抗体衍生物经由抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的一个重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,分别可含有包含第1生物正交性官能

团的第1修饰部分和包含第2生物正交性官能团的第2修饰部分。更具体而言,1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基的位点可以是依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。如上所述,修饰可以是位点选择性的。因此,在后述的式中,免疫球蛋白单元经由上述赖氨酸残基的侧链中的氨基,可位点选择性地具有相应的修饰单元。

[1341] 在特定的实施方式中,抗体衍生物或其盐可以是包含下述式(VIa)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1342] [化学式60]



[1344] 式中,

[1345] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1346]  $\text{L}_{L1}$ 和 $\text{L}_{R1}$ 分别独立地表示第1接头,

[1347]  $\text{B}_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

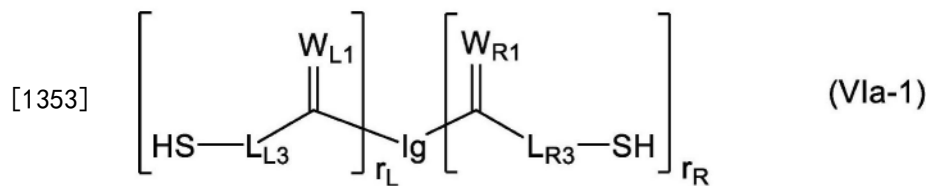
[1348]  $\text{B}_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

[1349] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1350] 包含式(VIa)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过切割包含式(Va)所表示的结构单元的亲和性物质修饰的抗体或其盐中的CLE(B)<sub>L</sub>和CLE(B)<sub>R</sub>所示的2个切割性部分来进行。在2个切割性部分相同的情况下,切割反应可通过1次切割反应来进行。在2个切割性部分不同的情况下,切割反应可通过1次切割反应(例如,不同的2个切割性部分可通过相同的切割处理或切割剂进行切割的情况)或2次切割反应(例如,不同的2个切割性部分可通过不同的切割处理或切割剂进行切割的情况)来进行。切割反应的细节如上所述。

[1351] 在特定的实施方式中,抗体衍生物或其盐可以是包含下述式(VIa-1)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1352] [化学式61]



[1354] 式中,

[1355] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1356]  $\text{W}_{L1}$ 和 $\text{W}_{R1}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1357]  $\text{L}_{L3}$ 和 $\text{L}_{R3}$ 分别独立地表示第3接头,

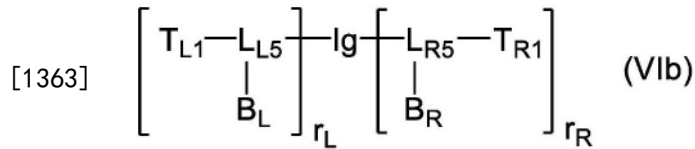
[1358] SH表示作为生物正交性官能团的硫醇基,

[1359] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1360] 包含式(VIa-1)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过切割包含式(Va-1)所表示的结构单元的亲和性物质修饰的抗体或其盐中的C-S所示的2个切割性部分来进行。切割反应可通过1次切割反应来进行。切割反应的细节如上所述。

[1361] 在特定的实施方式中,抗体衍生物或其盐可以是包含下述式(VIb)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1362] [化学式62]



[1364] 式中,

[1365] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1366]  $L_{L5}$ 和 $L_{R5}$ 分别独立地表示第5接头,

[1367]  $B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

[1368]  $B_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

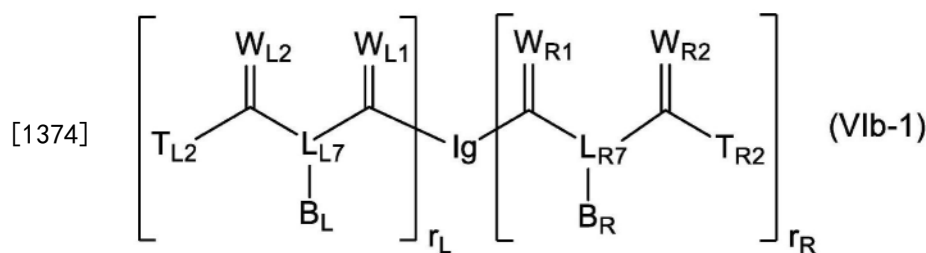
[1369]  $T_{L1}$ 和 $T_{R1}$ 分别独立地表示1价基团,

[1370] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1371] 包含式(VIb)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过切割包含式(Vb)所表示的结构单元的亲和性物质修饰的抗体或其盐中的 $CLE_L$ 和 $CLE_R$ 所示的2个切割性部分来进行。在2个切割性部分相同的情况下,切割反应可通过1次切割反应来进行。在2个切割性部分不同的情况下,切割反应可通过1次切割反应(例如,不同的2个切割性部分可通过相同的切割处理或切割剂进行切割的情况)或2次切割反应(例如,不同的2个切割性部分可通过不同的切割处理或切割剂进行切割的情况)来进行。切割反应的细节如上所述。

[1372] 在特定的实施方式中,抗体衍生物或其盐可以是包含下述式(VIb-1)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1373] [化学式63]



[1375] 式中,

[1376] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1377]  $W_{L1}$ 和 $W_{L2}$ 、以及 $W_{R1}$ 和 $W_{R2}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1378]  $L_{L7}$ 和 $L_{R7}$ 分别独立地表示第7接头,

[1379]  $B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

[1380]  $B_R$ 表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

[1381]  $T_{L2}$ 和 $T_{R2}$ 分别独立地表示1价基团,

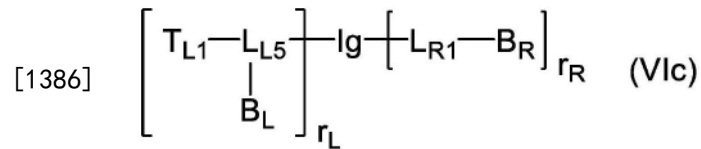
[1382] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1383] 包含式(VIb-1)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过切割包含式(Vb-1)

所表示的结构单元的亲和性物质修饰的抗体或其盐中的C-V<sub>L</sub>和C-V<sub>R</sub>所示的2个切割性部分来进行。在2个切割性部分相同的情况下,切割反应可通过1次切割反应来进行。在2个切割性部分不同的情况下,切割反应可通过1次切割反应(例如,不同的2个切割性部分可通过相同的切割处理或切割剂进行切割的情况)或2次切割反应(例如,不同的2个切割性部分可通过不同的切割处理或切割剂进行切割的情况)来进行。切割反应的细节如上所述。

[1384] 在特定的实施方式中,抗体衍生物或其盐可以是包含下述式(VIc)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1385] [化学式64]



[1387] 式中,

[1388] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1389] L<sub>R1</sub>表示第1接头,

[1390] L<sub>L5</sub>表示第5接头,

[1391] B<sub>L</sub>表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

[1392] B<sub>R</sub>表示包含第2生物正交性官能团的第2基团,

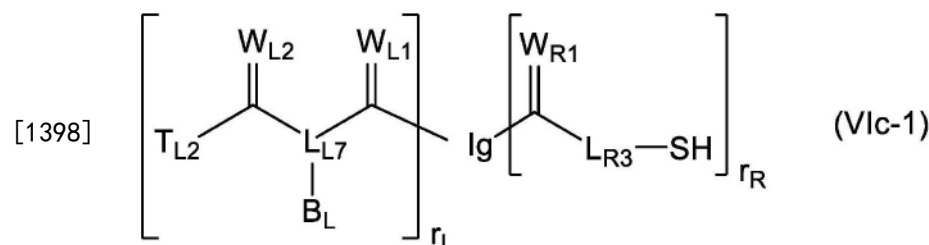
[1393] T<sub>L1</sub>表示1价基团,

[1394] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r<sub>L</sub>和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r<sub>R</sub>分别为65~135%。

[1395] 包含式(VIc)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过切割包含式(Vc)所表示的结构单元的亲和性物质修饰的抗体或其盐中的CLE<sub>L</sub>和CLE(B)<sub>R</sub>所示的2个切割性部分来进行。在2个切割性部分相同的情况下,切割反应可通过1次切割反应来进行。在2个切割性部分不同的情况下,切割反应可通过1次切割反应(例如,不同的2个切割性部分可通过相同的切割处理或切割剂进行切割的情况)或2次切割反应(例如,不同的2个切割性部分可通过不同的切割处理或切割剂进行切割的情况)来进行。切割反应的细节如上所述。

[1396] 在特定的实施方式中,抗体衍生物或其盐可以是包含下述式(VIc-1)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1397] [化学式65]



[1399] 式中,

[1400] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1401] W<sub>L1</sub>和W<sub>L2</sub>、以及W<sub>R1</sub>分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1402] L<sub>R3</sub>表示第3接头,

[1403]  $L_{L7}$ 表示第7接头,

[1404]  $B_L$ 表示包含第1生物正交性官能团的第1基团,

[1405] SH表示作为第2生物正交性官能团的硫醇基,

[1406]  $T_{L2}$ 表示1价基团,

[1407] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1408] 包含式(VIc-1)所表示的结构单元的抗体或其盐的制造可通过切割包含式(Vc-1)所表示的结构单元的亲和性物质修饰的抗体或其盐中的C- $V_L$ 和C-S所示的2个切割性部分来进行。在2个切割性部分相同的情况下,切割反应可通过1次切割反应来进行。在2个切割性部分不同的情况下,切割反应可通过1次切割反应(例如,不同的2个切割性部分可通过相同的切割处理或切割剂进行切割的情况)或2次切割反应(例如,不同的2个切割性部分可通过不同的切割处理或切割剂进行切割的情况)来进行。切割反应的细节如上所述。

[1409] 在上述式(VIa)、(VIa-1)、(VIb)、(VIb-1)、(VIc)和(VIc-1)中,Ig所示的免疫球蛋白单元和抗体的定义、示例和优选示例如上所述。

[1410] 在上述式(VIa)、(VIa-1)、(VIb)、(VIb-1)、(VIc)和(VIc-1)中,带有下标字符“L”和“R”的符号如下所示。

[1411]  $W_{L1}$ 和 $W_{R1}$ 与 $W_1$ 同样,优选氧原子。

[1412]  $W_{L2}$ 和 $W_{R2}$ 与 $W_2$ 同样,优选氧原子。

[1413]  $L_{L1}$ 和 $L_{R1}$ 所示的第1接头与 $L_1$ 所示的第1接头同样。 $L_{L1}$ 和 $L_{R1}$ 所示的第1接头可相同也可不同,优选为不同。

[1414]  $L_{L3}$ 和 $L_{R3}$ 所示的第3接头与 $L_3$ 所示的第3接头同样。 $L_{L3}$ 和 $L_{R3}$ 所示的第3接头可相同也可不同,优选为不同。

[1415]  $L_{L5}$ 和 $L_{R5}$ 所示的第5接头与 $L_5$ 所示的第5接头同样。 $L_{L5}$ 和 $L_{R5}$ 所示的第1接头可相同也可不同,优选为不同。

[1416]  $L_{L7}$ 和 $L_{R7}$ 所示的第7接头与 $L_7$ 所示的第7接头同样。 $L_{L7}$ 和 $L_{R7}$ 所示的第7接头可相同也可不同,优选为不同。

[1417]  $B_L$ 所示的包含第1生物正交性官能团的第1基团和 $B_R$ 所示的包含第2生物正交性官能团的第2基团与B所示的包含生物正交性官能团的基团同样。 $B_L$ 所示的包含第1生物正交性官能团的第1基团和 $B_R$ 所示的包含第2生物正交性官能团的第2基团可相同也可不同,优选为不同。

[1418]  $T_{L1}$ 和 $T_{R1}$ 所示的1价基团与 $T_1$ 所示的1价基团同样。 $T_{L1}$ 和 $T_{R1}$ 所示的1价基团可相同也可不同。

[1419]  $T_{L2}$ 和 $T_{R2}$ 所示的1价基团与 $T_2$ 所示的1价基团同样。 $T_{L2}$ 和 $T_{R2}$ 所示的1价基团可相同也可不同。

[1420]  $r_L$ 和 $r_R$ 所示的平均修饰百分率的程度及其确定方法与r所示的平均修饰百分率同样。 $r_L$ 和 $r_R$ 所示的平均修饰百分率可相同也可不同,优选为不同。

[1421] 在特定的实施方式中,式(VIa)和(VIc)中, $L_{L1}-B_L$ 和/或 $L_{R1}-B_R$ 所示的部分结构的分子量可与式(IIIa)中的 $L_1-B$ 所示的部分结构的上述分子量同样。

[1422] 在特定的实施方式中,式(VIa-1)和(VIc-1)中, $C(=W_{L1})-L_{L3}-SH$ 和/或 $C(=W_{R1})-$

$L_{R3}$ -SH所示的部分结构的分子量可与式(IIIa-1)中的 $C(=W_1)-L_3$ -SH所示的部分结构的上述分子量同样。

[1423] 在特定的实施方式中,式(VIa-1)和(VIc-1)中, $L_{L3}$ 和/或 $L_{R3}$ 所示的第3接头可与式(IIIa-1)中的 $L_3$ 所示的第3接头即 $(CH_2)_{n1}$ 同样。

[1424] 在特定的实施方式中,式(VIb)、(VIc)、(VIb-1)和(VIc-1)中, $T_{L1}$ 、 $T_{R1}$ 、 $T_{L2}$ 和/或 $T_{R2}$ 所示的1价基团可以是如式(IIIb)中的 $T_1$ 和/或 $T_2$ 所示的可被取代的羟基氨基。

[1425] 在特定的实施方式中,式(VIb)和(VIc)中, $L_{L5}(-B_L)-T_{L1}$ 和/或 $L_{R5}(-B_R)-T_{R1}$ 所示的部分结构的分子量可与式(IIIb)中的 $L_5(-B)-T_1$ 所示的部分结构的分子量同样。

[1426] 在特定的实施方式中,式(VIb-1)和(VIc-1)中, $C(=W_{L1})-L_{L7}(-B_L)-C(=W_{L2})-T_{L2}$ 和/或 $C(=W_{R1})-L_{R7}(-B_R)-C(=W_{R2})-T_{R2}$ 所示的部分结构的分子量可与式(IIIb-1)中的 $C(=W_1)-L_7(-B)-C(=W_2)-T_2$ 所示的部分结构的分子量同样。

[1427] 在特定的实施方式中,式(VIb-1)和(VIc-1)中, $L_{L7}$ 和/或 $L_{R7}$ 所示的第7接头可与式(IIIb-1)中的 $L_7$ 所示的第7接头即 $(CH_2)_{n2}$ 同样。

[1428] 在特定的实施方式中,式(VIb-1)和(VIc-1)中,包含第1生物正交性官能团的第1基团和/或包含第2生物正交性官能团的第2基团可以是如式(IIIb-1)中的作为包含生物正交性官能团的基团所示的 $NH-C(=O)-(CH_2)_{n3}-N_3$ 。

[1429] 抗体衍生物或其盐可进一步包含追加修饰部分。作为抗体的修饰方法,已知有各种方法。因此,在本发明中,可对抗体衍生物或其盐进行修饰以进一步包含追加修饰部分。追加修饰部分可引入至抗体的重链或轻链中,优选引入至抗体的重链中(特别是,重链的恒定区中)。

[1430] 在特定的实施方式中,追加修饰部分可以是包含生物正交性官能团的追加修饰部分。生物正交性官能团与上述相同。追加修饰部分中所含的生物正交性官能团与上述(b)中的第1生物正交性官能团和第2生物正交性官能团可相同也可不同,优选为不同。

[1431] 在特定的实施方式中,包含生物正交性官能团的追加修饰部分可经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。抗体衍生物或其盐经由抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的2个重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,可包含追加修饰部分。更具体而言,1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基的位点可以是依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位(例如,参照国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/009165号、国际公开第2020/090979号)。优选引入包含生物正交性官能团的追加修饰部分的位点与引入上述(b)中的包含第1生物正交性官能团的第1修饰部分和包含第2生物正交性官能团的第2修饰部分的位点不同。例如,在引入上述(b)中的第1修饰部分和第2修饰部分的两者的位点为246/248位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选288/290位或317位的赖氨酸残基,更优选288/290位的赖氨酸残基。在引入上述(b)中的第1修饰部分和第2修饰部分的两者的位点为288/290位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选246/248位或317位的赖氨酸残基,更优选246/248位的赖氨酸残基。在引入上述(b)中的第1修饰部分和第2修饰部分的两者的位点为317位的赖氨酸残基的情况

下,引入上述追加修饰部分的位点优选246/248位或288/290位的赖氨酸残基。

[1432] 包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐的生成的确认还取决于其具体的原料和产物的分子量,例如可通过电泳法、色谱法(例如,凝胶过滤色谱法、离子交换色谱法、反相柱色谱法、HPLC)或质谱分析来进行。位点选择性的确认可通过上述的肽图分析来进行。生物正交性官能团的引入个数的确认可通过质谱分析(可并用DAR计算器(Agilent公司软件))来进行。包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐可通过色谱法(例如,上述的色谱法和亲和色谱法)等任意方法来适当纯化。

[1433] 5-4. 抗体和至少1个功能性物质的缀合物或其盐

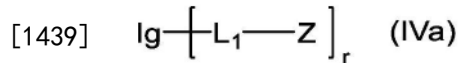
[1434] 本发明提供抗体和功能性物质的缀合物或其盐,其包含:(a)抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)、以及(b)功能性物质,并且(c)功能性物质仅引入至上述免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中(即,在免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中引入功能性物质,在另一个重链的恒定区中未引入功能性物质)。抗体、免疫球蛋白单元和抗体和功能性物质的缀合物、以及构成它们的要素(例如,恒定区)的定义、示例和优选示例如上所述。

[1435] 缀合物或其盐经由存在于上述恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的由天冬酰胺、谷氨酰胺、蛋氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、组氨酸和赖氨酸构成的14种氨基酸残基中的任1种或2种以上(例如,2种、3种、4种)的侧链中的官能团的修饰,可包含功能性物质。缀合物或其盐优选经由存在于上述恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的赖氨酸、酪氨酸、色氨酸或半胱氨酸中的任1种氨基酸的侧链中的官能团的修饰,更优选经由赖氨酸、酪氨酸或色氨酸中的任1种氨基酸的侧链中的官能团的修饰,更进一步优选经由赖氨酸或酪氨酸的侧链中的官能团的修饰,特别优选经由赖氨酸的侧链中的氨基的修饰,可包含功能性物质。上述恒定区中的这些氨基酸残基的位点如上所述。功能性物质对抗体或其盐的修饰位点可通过肽图分析来确定。如上所述,修饰可以是位点选择性的。因此,在后述的式(IVa)、(IVa-1)、(IVb)和(IVb-1)中,免疫球蛋白单元经由上述氨基酸残基的侧链中的官能团,可位点选择性地具有相应的修饰单元。

[1436] 优选地,缀合物经由抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的一个重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,可包含功能性物质(换言之,经由免疫球蛋白单元中的一个重链的恒定区中的赖氨酸残基的侧链中的氨基而包含功能性物质,不经由另一个重链的恒定区中的赖氨酸残基的侧链中的氨基而包含功能性物质)。更具体而言,1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基的位点可以是依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位(例如,参照国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/009165号、国际公开第2020/090979号)。如上所述,修饰可以是位点选择性的。因此,在后述的式(IVa)、(IVa-1)、(IVb)和(IVb-1)中,免疫球蛋白单元经由上述赖氨酸残基的侧链中的氨基,可位点选择性地具有相应的修饰单元。

[1437] 在特定的实施方式中,缀合物或其盐可以是包含下述式(IVa)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1438] [化学式66]



[1440] 式中,

[1441] Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[1442]  $\text{L}_1$ 表示第1接头,

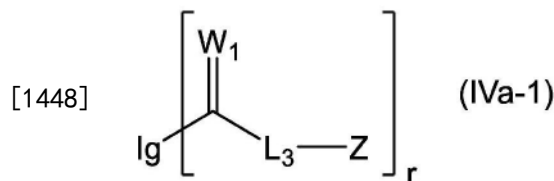
[1443] Z表示功能性物质,

[1444] 功能性物质对上述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。Ig所示的免疫球蛋白单元、 $\text{L}_1$ 所示的第1接头、Z所示的功能性物质和r所示的平均修饰百分率、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述。特别优选的生物正交性官能团为硫醇基。

[1445] 在式(IVa)中, $\text{L}_1$ -Z所示的部分结构的分子量可以是700以下。在 $\text{L}_1$ -Z所示的部分结构的分子量为700以下的情况下,缀合物或其盐由于上述部分结构的分子量相对于抗体整体的分子量的比例非常小,因此基于分子量的差异的纯化相对困难,但根据可进行DAR的高度控制的本发明,未必需要基于分子量的差异的纯化,即能够以高纯度得到显示所希望的DAR的缀合物。 $\text{L}_1$ -Z所示的部分结构的分子量可优选为600以下,更优选为500以下,更进一步优选为400以下,特别优选为300以下、250以下、200以下或100以下。

[1446] 在另一个特定的实施方式中,缀合物或其盐可以是包含下述式(IVa-1)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1447] [化学式67]



[1449] 式中,

[1450] Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[1451]  $\text{W}_1$ 表示氧原子或硫原子,

[1452]  $\text{L}_3$ 表示第3接头,

[1453] Z表示功能性物质,

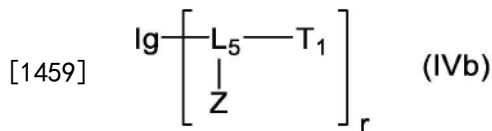
[1454] 功能性物质对上述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。Ig所示的免疫球蛋白单元、 $\text{W}_1$ 所示的原子、 $\text{L}_3$ 所示的第3接头、Z所示的功能性物质和r所示的平均修饰百分率、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述。

[1455] 在式(IVa-1)中, $\text{C}(=\text{W}_1)$ - $\text{L}_3$ -Z所示的部分结构的分子量可以是700以下。 $\text{C}(=\text{W}_1)$ - $\text{L}_3$ -Z所示的部分结构的分子量可优选为600以下,更优选为500以下,更进一步优选为400以下,特别优选为300以下、250以下、200以下、150以下或100以下。

[1456] 在式(IVa-1)中, $\text{L}_3$ 所示的部分结构可以是 $(\text{CH}_2)_{n1}$ 。 $n1$ 的定义、示例和优选示例如上所述。

[1457] 在又一个特定的实施方式中,缀合物或其盐可以是包含下述式(IVb)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1458] [化学式68]



[1460] 式中,

[1461] Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[1462]  $\text{L}_5$ 表示第5接头,

[1463] Z表示功能性物质,

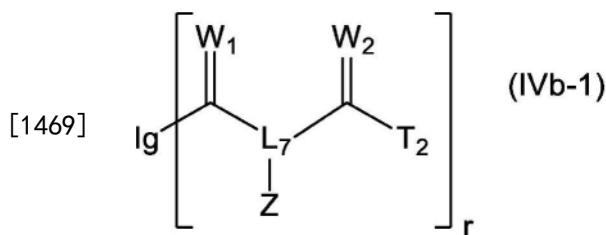
[1464]  $\text{T}_1$ 表示1价基团,

[1465] 功能性物质对上述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率r为65~135%。Ig所示的免疫球蛋白单元、 $\text{L}_5$ 所示的第5接头、Z所示的功能性物质、 $\text{T}_1$ 所示的1价基团和r所示的平均修饰百分率、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述。特别优选的生物正交性官能团为叠氮基。

[1466] 在式(IVb)中, $\text{L}_5(-\text{Z})-\text{T}_1$ 所示的部分结构的分子量可以是700以下。 $\text{L}_5(-\text{Z})-\text{T}_1$ 所示的部分结构的分子量可优选为600以下,更优选为500以下,更进一步优选为400以下,特别优选为300以下、250以下、200以下或100以下。

[1467] 在又一个特定的实施方式中,缀合物或其盐可以是包含下述式(IVb-1)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1468] [化学式69]



[1470] 式中,

[1471] Ig表示包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元,

[1472]  $\text{W}_1$ 和 $\text{W}_2$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1473]  $\text{L}_7$ 表示第7接头,

[1474] Z表示功能性物质,

[1475]  $\text{T}_2$ 表示1价基团,

[1476] 功能性物质对上述免疫球蛋白单元的修饰百分率r为65~135%。Ig所示的免疫球蛋白单元、 $\text{W}_1$ 和 $\text{W}_2$ 所示的原子、 $\text{L}_7$ 所示的第7接头、Z所示的功能性物质、 $\text{T}_2$ 所示的1价基团和r所示的平均修饰百分率、以及抗体的定义、示例和优选示例如上所述。特别优选的生物正交性官能团为叠氮基。

[1477] 在式(IVb-1)中, $\text{C}(=\text{W}_1)-\text{L}_7(-\text{Z})-\text{C}(=\text{W}_2)-\text{T}_2$ 所示的部分结构的分子量可以是700以下。 $\text{C}(=\text{W}_1)-\text{L}_7(-\text{Z})-\text{C}(=\text{W}_2)-\text{T}_2$ 所示的部分结构的分子量可优选为600以下,更优选为500以下,更进一步优选为400以下,特别优选为300以下、250以下、200以下或100以下。

[1478] 在式(IVb-1)中, $\text{L}_7$ 所示的部分结构可以是 $(\text{CH}_2)_{n_2} \cdot n_2$ 的定义、示例和优选示例如上所述。

[1479] 在式(IVb-1)中,包含生物正交性官能团的基团可以是 $\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{n_3}-\text{N}_3 \cdot n_3$

的定义、示例和优选示例如上所述。

[1480] 缀合物或其盐的制造方法可通过使包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐来进行。

[1481] 或者,缀合物或其盐的制造方法可通过包括下述(1)和(2)的方法来进行:

[1482] (1)通过上述的方法制造包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐;以及

[1483] (2)使包含生物正交性官能团的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含抗体和功能性物质的缀合物或其盐。

[1484] 更具体而言,作为缀合物或其盐的制造方法,例如可举出:下述(3-1)~(3-12)(图2~6)。

[1485] (方法3-1)抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括:使包含上述式(IIIa)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含上述式(IVa)所表示的结构单元的缀合物或其盐。

[1486] (方法3-2)抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括下述(1)和(2):

[1487] (1)将包含上述式(IIa)所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式(IIIa)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐;以及

[1488] (2)使包含上述式(IIIa)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含上述式(IVa)所表示的结构单元的缀合物或其盐。

[1489] (方法3-3)抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括下述(1)~(3):

[1490] (1)使上述式(Ia)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应,生成包含上述式(IIa)所表示的结构单元的抗体或其盐;

[1491] (2)将包含上述式(IIa)所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式(IIIa)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐;以及

[1492] (3)使包含上述式(IIIa)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含上述式(IVa)所表示的结构单元的缀合物或其盐。

[1493] (方法3-4)抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括:使包含上述式(IIIa-1)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含上述式(IVa-1)所表示的结构单元的缀合物或其盐。

[1494] (方法3-5)抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括下述(1)和(2):

[1495] (1)将包含上述式(IIa-1)所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式(IIIa-1)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐;以及

[1496] (2)使包含上述式(IIIa-1)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含上述式(IVa-1)所表示的结构单元的缀合物或其盐。

[1497] (方法3-6)抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括下述(1)~(3):

[1498] (1)使上述式(Ia-1)所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应,生成包含上述式(IIa-1)所表示的结构单元的抗体或其盐;

[1499] (2)将包含上述式(IIa-1)所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式(IIIa-1)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐;以及

[1500] (3) 使包含上述式 (IIIa-1) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含上述式 (IVa-1) 所表示的结构单元的缀合物或其盐。

[1501] (方法3-7) 抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括:使包含上述式 (IIIb) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含上述式 (IVb) 所表示的结构单元的缀合物或其盐。

[1502] (方法3-8) 抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括下述 (1) 和 (2) :

[1503] (1) 将包含上述式 (IIb) 所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式 (IIIb) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐;以及

[1504] (2) 使包含上述式 (IIIb) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含上述式 (IVb) 所表示的结构单元的缀合物或其盐。

[1505] (方法3-9) 抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括下述 (1) ~ (3) :

[1506] (1) 使上述式 (Ib) 所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应,生成包含上述式 (IIb) 所表示的结构单元的抗体或其盐;

[1507] (2) 将包含上述式 (IIb) 所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式 (IIIb) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐;以及

[1508] (3) 使包含上述式 (IIIb) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含上述式 (IVb) 所表示的结构单元的缀合物或其盐。

[1509] (方法3-10) 抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括:使包含上述式 (IIIb-1) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含上述式 (IVb-1) 所表示的结构单元的缀合物或其盐。

[1510] (方法3-11) 抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括下述 (1) 和 (2) :

[1511] (1) 将包含上述式 (IIb-1) 所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式 (IIIb-1) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐;以及

[1512] (2) 使包含上述式 (IIIb-1) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含上述式 (IVb-1) 所表示的结构单元的缀合物或其盐。

[1513] (方法3-12) 抗体和功能性物质的缀合物或其盐的制造方法,其包括下述 (1) ~ (3) :

[1514] (1) 使上述式 (IB-1) 所表示的化合物或其盐与含有包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元的抗体或其盐反应,生成包含上述式 (IIb-1) 所表示的结构单元的抗体或其盐;

[1515] (2) 将包含上述式 (IIb-1) 所表示的结构单元的抗体或其盐在切割性部分进行切割处理,生成包含上述式 (IIIb-1) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐;以及

[1516] (3) 使包含上述式 (IIIb-1) 所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐与功能性物质反应,生成包含上述式 (IVb-1) 所表示的结构单元的缀合物或其盐。

[1517] 上述方法3-1 ~ 3-12可进一步包括:使本发明的亲和性物质与包含抗体反应性基团的部分化合物反应,生成本发明的化合物或其盐 (图2 ~ 6)。

[1518] 缀合物或其盐可进一步包含追加修饰部分。作为抗体的修饰方法,已知有各种方

法。因此,在本发明中,可对缀合物或其盐进行修饰以进一步包含追加修饰部分。追加修饰部分可引入至抗体的重链或轻链中,优选引入至抗体的重链中(特别是,重链的恒定区中)。

[1519] 在特定的实施方式中,追加修饰部分可以是包含功能性物质的追加修饰部分。功能性物质与上述相同。追加修饰部分中所含的功能性物质与上述(b)的功能性物质可相同也可不同,优选为不同。

[1520] 在特定的实施方式中,包含功能性物质的追加修饰部分可经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。缀合物或其盐经由抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的2个重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,可包含追加修饰部分。更具体而言,1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基的位点可以是依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位(例如,参照国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/009165号、国际公开第2020/090979号)。优选引入包含功能性物质的追加修饰部分的位点与引入上述(b)的功能性物质的位点不同。例如,在引入上述(b)的功能性物质的位点为246/248位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选288/290位或317位的赖氨酸残基,更优选288/290位的赖氨酸残基。在引入上述(b)的功能性物质的位点为288/290位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选246/248位或317位的赖氨酸残基,更优选246/248位的赖氨酸残基。在引入上述(b)的功能性物质的位点为317位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选246/248位或288/290位的赖氨酸残基。

[1521] 5-5. 抗体和至少2个功能性物质的缀合物或其盐

[1522] 本发明还提供抗体以及第1修饰部分和第2修饰部分的缀合物或其盐,其包含第1修饰部分和第2修饰部分,所述第1修饰部分包含:(a)包含由第1重链和第2重链构成的2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元、以及(b)第1功能性物质,所述第2修饰部分包含第2功能性物质,

[1523] (c)第1修饰部分引入至所述第1重链的恒定区中,

[1524] (d)第2修饰部分引入至所述第2重链的恒定区中,并且

[1525] (e)第1修饰部分和第2修饰部分彼此不同。抗体、免疫球蛋白单元和生物正交性官能团、以及构成它们的要素(例如,恒定区)的定义、示例和优选示例如上所述。

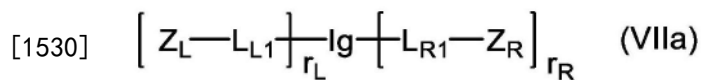
[1526] 缀合物或其盐经由存在于上述恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的由天冬酰胺、谷氨酰胺、蛋氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、组氨酸和赖氨酸构成的14种氨基酸残基中的任1种或2种以上(例如,2种、3种、4种)的侧链中的官能团的修饰,可含有包含第1功能性物质的第1修饰部分和包含第2功能性物质的第2修饰部分。抗体衍生物或其盐优选经由存在于上述恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的赖氨酸、酪氨酸、色氨酸或半胱氨酸中的任1种氨基酸的侧链中的官能团的修饰,更优选经由赖氨酸、酪氨酸或色氨酸中的任1种氨基酸的侧链中的官能团的修饰,更进一步优选经由赖氨酸或酪氨酸的侧链中的官能团的修饰,特别优选经由赖氨酸的侧链中的氨基的修饰,可含有包含第1功能性物质的第1修饰部分和包含第2功能性物质的第2修饰部分。上述恒定区中的这些氨基酸残基的位点如上所述。功能性物质对抗体或其盐的修饰位点可通过肽图

分析来确认。如上所述,修饰可以是位点选择性的。因此,在后述的式中,免疫球蛋白单元经由上述氨基酸残基的侧链中的官能团,可位点选择性地具有相应的修饰单元。

[1527] 优选地,缀合物或其盐经由抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的第1重链和第2重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,可分别含有包含第1功能性物质的第1修饰部分和包含第2功能性物质的第2修饰部分。更具体而言,1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基的位点可以是依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位。如上所述,修饰可以是位点选择性的。因此,在后述的式中,免疫球蛋白单元经由上述赖氨酸残基的侧链中的氨基,可位点选择性地具有相应的修饰单元。

[1528] 在特定的实施方式中,缀合物或其盐可以是包含下述式(VIIa)所表示的结构单元的缀合物或其盐:

[1529] [化学式70]



[1531] 式中,

[1532] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1533]  $L_{L1}$ 和 $L_{R1}$ 分别独立地表示第1接头,

[1534]  $Z_L$ 表示第1功能性物质,

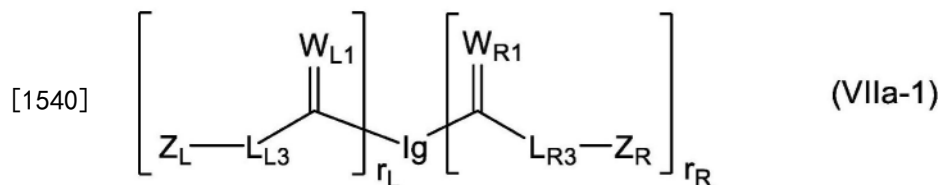
[1535]  $Z_R$ 表示第2功能性物质,

[1536] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1537] 包含式(VIIa)所表示的结构单元的缀合物或其盐的制造可通过使功能性物质与包含式(VIa)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐反应来进行。在包含式(VIa)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐中的2个生物正交性官能团相同的情况下,反应可通过1次反应来进行。在2个生物正交性官能团不同的情况下,反应可通过1次反应(例如,不同的2个生物正交性官能团可在同样的反应条件下反应的情况)或2次反应(例如,不同的2个生物正交性官能团可在不同的反应条件下反应的情况)来进行。反应的细节如上所述。

[1538] 在特定的实施方式中,抗体衍生物或其盐可以是包含下述式(VIIa-1)所表示的结构单元的抗体或其盐:

[1539] [化学式71]



[1541] 式中,

[1542] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1543]  $W_{L1}$ 和 $W_{R1}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1544]  $L_{L3}$ 和 $L_{R3}$ 分别独立地表示第3接头,

[1545]  $Z_L$ 表示第1功能性物质,

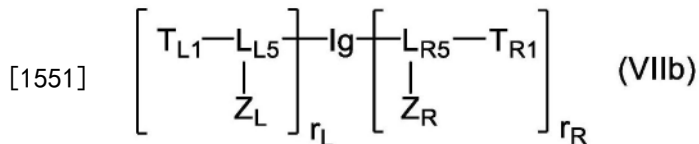
[1546]  $Z_R$ 表示第2功能性物质,

[1547] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1548] 包含式(VIIa-1)所表示的结构单元的缀合物或其盐的制造可通过使功能性物质与包含式(VIa-1)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐反应来进行。切割反应可通过1次反应来进行。反应的细节如上所述。

[1549] 在特定的实施方式中,缀合物或其盐可以是包含下述式(VIIb)所表示的结构单元的缀合物或其盐:

[1550] [化学式72]



[1552] 式中,

[1553] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1554]  $L_{L5}$ 和 $L_{R5}$ 分别独立地表示第5接头,

[1555]  $Z_L$ 表示第1功能性物质,

[1556]  $Z_R$ 表示第2功能性物质,

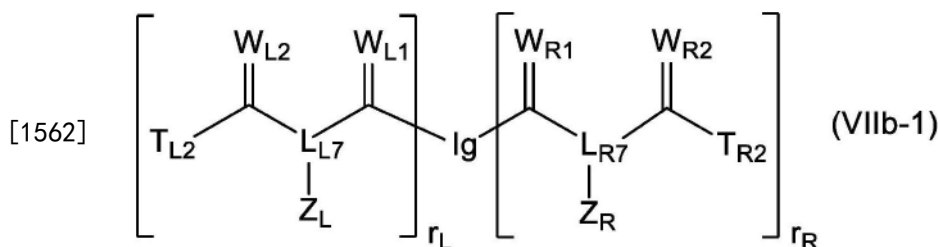
[1557]  $T_{L1}$ 和 $T_{R1}$ 分别独立地表示1价基团,

[1558] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1559] 包含式(VIIb)所表示的结构单元的缀合物或其盐的制造可通过使功能性物质与包含式(VIb)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐反应来进行。在包含式(VIb)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐中的2个生物正交性官能团相同的情况下,反应可通过1次反应来进行。在2个生物正交性官能团不同的情况下,反应可通过1次反应(例如,不同的2个生物正交性官能团可在同样的反应条件下反应的情况)或2次反应(例如,不同的2个生物正交性官能团可在不同的反应条件下反应的情况)来进行。反应的细节如上所述。

[1560] 在特定的实施方式中,缀合物或其盐可以是包含下述式(VIIb-1)所表示的结构单元的缀合物或其盐:

[1561] [化学式73]



[1563] 式中,

[1564] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1565]  $W_{L1}$ 和 $W_{L2}$ 、以及 $W_{R1}$ 和 $W_{R2}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1566]  $L_{L7}$ 和 $L_{R7}$ 分别独立地表示第7接头,

[1567]  $Z_L$ 表示第1功能性物质,

[1568]  $Z_R$ 表示第2功能性物质,

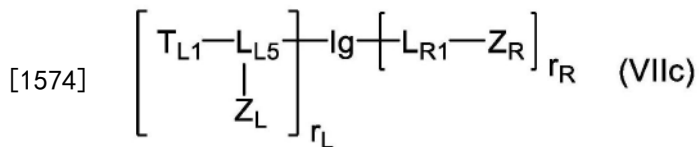
[1569]  $T_{L2}$ 和 $T_{R2}$ 分别独立地表示1价基团,

[1570] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1571] 包含式(VIIb-1)所表示的结构单元的缀合物或其盐的制造可通过使功能性物质与包含式(VIb-1)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐反应来进行。在包含式(VIb-1)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐中的2个生物正交性官能团相同的情况下,反应可通过1次反应来进行。在2个生物正交性官能团不同的情况下,反应可通过1次反应(例如,不同的2个生物正交性官能团可在同样的反应条件下反应的情况)或2次反应(例如,不同的2个生物正交性官能团可在不同的反应条件下反应的情况)来进行。反应的细节如上所述。

[1572] 在特定的实施方式中,缀合物或其盐可以是包含下述式(VIIc)所表示的结构单元的缀合物或其盐:

[1573] [化学式74]



[1575] 式中,

[1576] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1577]  $L_{R1}$ 表示第1接头,

[1578]  $L_{L5}$ 表示第5接头,

[1579]  $Z_L$ 表示第1功能性物质,

[1580]  $Z_R$ 表示第2功能性物质,

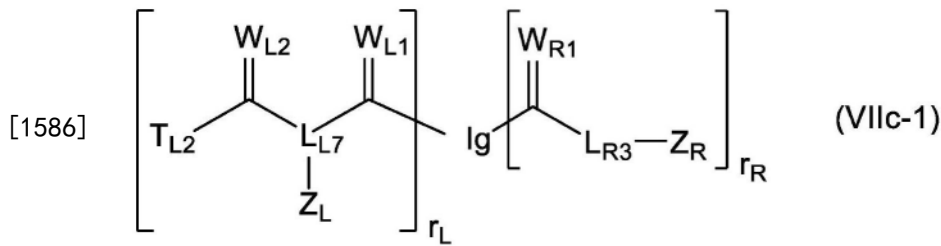
[1581]  $T_{L1}$ 表示1价基团,

[1582] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1583] 包含式(VIIc)所表示的结构单元的缀合物或其盐的制造可通过使功能性物质与包含式(VIc)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐反应来进行。在包含式(VIc)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐中的2个生物正交性官能团相同的情况下,反应可通过1次反应来进行。在2个生物正交性官能团不同的情况下,反应可通过1次反应(例如,不同的2个生物正交性官能团可在同样的反应条件下反应的情况)或2次反应(例如,不同的2个生物正交性官能团可在不同的反应条件下反应的情况)来进行。反应的细节如上所述。

[1584] 在特定的实施方式中,缀合物或其盐可以是包含下述式(VIIc-1)所表示的结构单元的缀合物或其盐:

[1585] [化学式75]



[1587] 式中,

[1588] Ig表示所述免疫球蛋白单元,

[1589]  $\text{W}_{L1}$ 和 $\text{W}_{L2}$ 、以及 $\text{W}_{R1}$ 分别独立地表示氧原子或硫原子,

[1590]  $\text{L}_{R3}$ 表示第3接头,

[1591]  $\text{L}_{L7}$ 表示第7接头,

[1592]  $\text{Z}_L$ 表示第1功能性物质,

[1593]  $\text{Z}_R$ 表示第2功能性物质,

[1594]  $\text{T}_{L2}$ 表示1价基团,

[1595] 第1修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_L$ 和第2修饰部分对所述免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r_R$ 分别为65~135%。

[1596] 包含式(VIIc-1)所表示的结构单元的缀合物或其盐的制造可通过使功能性物质与包含式(VIc-1)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐反应来进行。在包含式(VIc)所表示的结构单元的抗体衍生物或其盐中的2个生物正交性官能团相同的情况下,反应可通过1次反应来进行。在2个生物正交性官能团不同的情况下,反应可通过1次反应(例如,不同的2个生物正交性官能团可在同样的反应条件下反应的情况)或2次反应(例如,不同的2个生物正交性官能团可在不同的反应条件下反应的情况)来进行。反应的细节如上所述。

[1597] 在上述式(VIa)、(VIa-1)、(VIb)、(VIb-1)、(VIc)和(VIc-1)中,Ig所示的免疫球蛋白单元和抗体的定义、示例和优选示例如上所述。

[1598] 在上述式(VIa)、(VIa-1)、(VIb)、(VIb-1)、(VIc)和(VIc-1)中,带有下标字符“L”和“R”的符号如下所示。

[1599]  $\text{W}_{L1}$ 和 $\text{W}_{R1}$ 与 $\text{W}_1$ 同样,优选氧原子。

[1600]  $\text{W}_{L2}$ 和 $\text{W}_{R2}$ 与 $\text{W}_2$ 同样,优选氧原子。

[1601]  $\text{L}_{L1}$ 和 $\text{L}_{R1}$ 所示的第1接头与 $\text{L}_1$ 所示的第1接头同样。 $\text{L}_{L1}$ 和 $\text{L}_{R1}$ 所示的第1接头可相同也可不同,优选为不同。

[1602]  $\text{L}_{L3}$ 和 $\text{L}_{R3}$ 所示的第3接头与 $\text{L}_3$ 所示的第3接头同样。 $\text{L}_{L3}$ 和 $\text{L}_{R3}$ 所示的第3接头可相同也可不同,优选为不同。

[1603]  $\text{L}_{L5}$ 和 $\text{L}_{R5}$ 所示的第5接头与 $\text{L}_5$ 所示的第5接头同样。 $\text{L}_{L5}$ 和 $\text{L}_{R5}$ 所示的第1接头可相同也可不同,优选为不同。

[1604]  $\text{L}_{L7}$ 和 $\text{L}_{R7}$ 所示的第7接头与 $\text{L}_7$ 所示的第7接头同样。 $\text{L}_{L7}$ 和 $\text{L}_{R7}$ 所示的第7接头可相同也可不同,优选为不同。

[1605]  $\text{B}_L$ 所示的包含第1生物正交性官能团的第1基团和 $\text{B}_R$ 所示的包含第2生物正交性官能团的第2基团与B所示的包含生物正交性官能团的基团同样。 $\text{B}_L$ 所示的包含第1生物正交性官能团的第1基团和 $\text{B}_R$ 所示的包含第2生物正交性官能团的第2基团可相同也可不同,优选为不同。

[1606]  $T_{L1}$ 和 $T_{R1}$ 所示的1价基团与 $T_1$ 所示的1价基团同样。 $T_{L1}$ 和 $T_{R1}$ 所示的1价基团可相同也可不同。

[1607]  $T_{L2}$ 和 $T_{R2}$ 所示的1价基团与 $T_2$ 所示的1价基团同样。 $T_{L2}$ 和 $T_{R2}$ 所示的1价基团可相同也可不同。

[1608]  $r_L$ 和 $r_R$ 所示的平均修饰百分率的程度及其确定方法与 $r$ 所示的平均修饰百分率同样。 $r_L$ 和 $r_R$ 所示的平均修饰百分率可相同也可不同,优选为不同。

[1609] 在特定的实施方式中,式(VIIa)和(VIIc)中, $L_{L1}-Z_L$ 和/或 $L_{R1}-Z_R$ 所示的部分结构的分子量可与式(IVa)中的 $L_1-Z$ 所示的部分结构的上述分子量同样。

[1610] 在特定的实施方式中,式(VIIa-1)和(VIIc-1)中, $C(=W_{L1})-L_{L3}-Z_L$ 和/或 $C(=W_{R1})-L_{R3}-Z_R$ 所示的部分结构的分子量可与式(IVa-1)中的 $C(=W_1)-L_3-Z$ 所示的部分结构的上述分子量同样。

[1611] 在特定的实施方式中,式(VIIa-1)和(VIIc-1)中, $L_{L3}$ 和/或 $L_{R3}$ 所示的第3接头可与式(IVa-1)中的 $L_3$ 所示的第3接头即 $(CH_2)_{n1}$ 同样。

[1612] 在特定的实施方式中,式(VIIb)、(VIIc)、(VIIb-1)和(VIIc-1)中, $T_{L1}$ 、 $T_{R1}$ 、 $T_{L2}$ 和/或 $T_{R2}$ 所示的1价基团可以是如式(IVb)中的 $T_1$ 和/或 $T_2$ 所示的可被取代的羟基氨基。

[1613] 在特定的实施方式中,式(VIIb)和(VIIc)中, $L_{L5}(-Z_L)-T_{L1}$ 和/或 $L_{R5}(-Z_R)-T_{R1}$ 所示的部分结构的分子量可与式(IVb)中的 $L_5(-Z)-T_1$ 所示的部分结构的分子量同样。

[1614] 在特定的实施方式中,式(VIIb-1)和(VIIc-1)中, $C(=W_{L1})-L_{L7}(-Z_L)-C(=W_{L2})-T_{L2}$ 和/或 $C(=W_{R1})-L_{R7}(-Z_R)-C(=W_{R2})-T_{R2}$ 所示的部分结构的分子量可与式(IVb-1)中的 $C(=W_1)-L_7(-Z)-C(=W_2)-T_2$ 所示的部分结构的分子量同样。

[1615] 在特定的实施方式中,式(VIIb-1)和(VIIc-1)中, $L_{L7}$ 和/或 $L_{R7}$ 所示的第7接头可与式(IVb-1)中的 $L_7$ 所示的第7接头即 $(CH_2)_{n2}$ 同样。

[1616] 在特定的实施方式中,式(VIIb-1)和(VIIc-1)中,包含第1生物正交性官能团的第1基团和/或包含第2生物正交性官能团的第2基团可以是如式(IVb-1)中的作为包含生物正交性官能团的基团所示的 $NH-C(=O)-(CH_2)_{n3}-N_3$ 。

[1617] 缀合物或其盐可进一步包含追加修饰部分。作为抗体的修饰方法,已知有各种方法。因此,在本发明中,可对缀合物或其盐进行修饰以进一步包含追加修饰部分。追加修饰部分可引入至抗体的重链或轻链中,优选引入至抗体的重链中(特别是,重链的恒定区中)。

[1618] 在特定的实施方式中,追加修饰部分可以是包含功能性物质的追加修饰部分。功能性物质与上述相同。追加修饰部分中所含的功能性物质与上述(b)中的第1功能性物质和第2功能性物质可相同也可不同,优选为不同。

[1619] 在特定的实施方式中,包含功能性物质的追加修饰部分可经由存在于所述2个重链的恒定区中的1个以上位点的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,引入至所述2个重链的恒定区中。缀合物或其盐经由抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的2个重链的恒定区(优选为Fc区或CH2结构域)中的1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基侧链中的氨基的修饰,可包含追加修饰部分。更具体而言,1个以上(优选为1或2,更优选为1)的赖氨酸残基的位点可以是依据EU编号的人IgG重链的246/248位、288/290位或317位(例如,参照国际公开第2016/186206号、国际公开第2018/199337号、国际公开第2019/240287号、国际公开第2019/240288号、国际公开第2020/009165号、国际

公开第2020/090979号)。优选引入包含功能性物质的追加修饰部分的位点与引入上述(b)中的包含第1功能性物质的第1修饰部分和包含第2功能性物质的第2修饰部分的位点不同。例如,在引入上述(b)中的引入第1修饰部分和第2修饰部分的两者的位点为246/248位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选288/290位或317位的赖氨酸残基,更优选288/290位的赖氨酸残基。在引入上述(b)中的第1修饰部分和第2修饰部分的两者的位点为288/290位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选246/248位或317位的赖氨酸残基,更优选246/248位的赖氨酸残基。在引入上述(b)中的第1修饰部分和第2修饰部分的两者的位点为317位的赖氨酸残基的情况下,引入上述追加修饰部分的位点优选246/248位或288/290位的赖氨酸残基。

[1620] 缀合物或其盐的生成的确认还取决于其具体的原料和产物的分子量,例如可通过电泳法、色谱法(例如,凝胶过滤色谱法、离子交换色谱法、反相柱色谱法,HPLC)或质谱分析来进行。位点选择性的确认可通过上述的肽图分析来进行。功能性物质的引入个数的确认可通过质谱分析(可并用DAR计算器(Agilent公司软件))来进行。缀合物或其盐可通过色谱法(例如,上述的色谱法和亲和色谱法)等任意方法来适当纯化。

#### [1621] 6. 用途

[1622] 本发明的化合物或其盐可容易地仅修饰抗体的构成单元(包含2个重链和根据需要的2个轻链的免疫球蛋白单元)中的一个重链(免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r$ 为65~135%)。另外,本发明的化合物或其盐可位点选择性地修饰免疫球蛋白单元中的重链中的特定氨基酸残基(优选为赖氨酸残基)。因此,本发明提供抗体衍生用试剂,其包含本发明的化合物或其盐。

[1623] 本发明的试剂能够以进一步包含其它成分的组合物的形式提供。作为这样的其它成分,例如可举出:溶液、稳定剂(例如,抗氧化剂、保存剂)。作为溶液,优选水溶液。作为水溶液,例如可举出:水(例如,蒸馏水、灭菌蒸馏水、纯净水、生理盐水)、缓冲液(例如,磷酸水溶液、Tris-盐酸缓冲液、碳酸-碳酸氢盐缓冲液、硼酸水溶液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液、柠檬酸缓冲液),优选缓冲液。溶液的pH例如为5.0~9.0,优选为5.5~8.5。本发明的试剂能够以液态或粉末状(例如,冷冻干燥粉末)来提供。

[1624] 本发明的亲和性物质修饰的抗体、抗体衍生物或其盐例如可用于作用于调制本发明的缀合物或其盐的中间体。

[1625] 本发明的缀合物或其盐可用作例如药物或试剂(例如,诊断药、研究用试剂)。特别是,可仅修饰抗体的构成单元中的一个重链(免疫球蛋白单元的平均修饰百分率 $r$ 为65~135%)、并且用功能性物质位点选择性地修饰的本发明的缀合物或其盐可用作药物。据报道,如果改变抗体药物复合物(ADC)的药物的结合数和结合位点,则会改变体内动力学或药物的释放速度、效果。基于这些情况,对于下一代ADC,要求控制待缀合的药物的个数和位点。据信,如果个数和位点恒定,则预期的功效、缀合药剂的多样性、批次差异即所谓的标准化问题就迎刃而解了。因此,本发明的缀合物或其盐可解决这样的标准化问题。

[1626] 本发明的缀合物或其盐能够以药物组合物的形式提供。这样的药物组合物除了包含本发明的缀合物或其盐之外,还包含药学上可接受的载体。作为药学上可接受的载体,例如可举出:蔗糖、淀粉、甘露醇、山梨糖醇、乳糖、葡萄糖、纤维素、滑石、磷酸钙、碳酸钙等赋形剂;纤维素、甲基纤维素、羟丙基纤维素、聚丙烯吡咯烷酮、明胶、阿拉伯树胶、聚乙二醇、

蔗糖、淀粉等粘合剂;淀粉、羧甲基纤维素、羟丙基淀粉、碳酸氢钠、磷酸钙、柠檬酸钙等崩解剂;硬脂酸镁、AEROSIL、滑石、十二烷基硫酸钠等润滑剂;柠檬酸、薄荷醇、甘草酸铵盐(glycyrrhizic acid ammonium salt)、甘氨酸、橙粉等芳香剂;苯甲酸钠、亚硫酸氢钠、尼泊金甲酯、尼泊金丙酯等保存剂;柠檬酸、柠檬酸钠、乙酸等稳定剂;甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、硬脂酸铝等助悬剂;表面活性剂等分散剂;水、生理盐水、橙汁等稀释剂;可可脂、聚乙二醇、灯用煤油等基础蜡等,但并不限于这些。另外,本发明的缀合物或其盐也可具有实现稳定性的任意修饰(例如,PEG化)。

[1627] 适合于口服给药的制剂为:将有效量的配体溶解于水、生理盐水、橙汁这样的稀释液而得的液体制剂;以固体或颗粒的形式包含有效量的配体的胶囊剂、香囊剂或片剂;在适当的分散介质中悬浮有效量的有效成分而得的悬浮液剂;将溶解了有效量的有效成分的溶液在适当的分散介质中分散、乳化而得的乳剂等。

[1628] 药物组合物适合于胃肠外给药(例如,静脉内注射、皮下注射、肌肉注射、局部注入、腹腔内给药)。作为这样的适合于胃肠外给药的药物组合物,有水性和非水性的等渗无菌注射液剂,其中可包含抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂、等渗剂等。还可举出:水性和非水性的无菌悬浮液剂,其中可包含助悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂、防腐剂等。

[1629] 药物组合物的给药量根据有效成分的种类/活性、疾病的严重程度、成为给药对象的动物种类、给药对象的药物耐受性、体重、年龄等不同,可适当设定。

[1630] 实施例

[1631] 通过以下的实施例来更详细地说明本发明,但本发明并不限于以下的实施例。

[1632] (实施例1)亲和性物质的设计和谷氨酸棒状杆菌中的亲和性物质的分泌表达

[1633] (1-1)亲和性物质的设计概要

[1634] 在本发明中,需要设计在分子内包含2处以上可与抗体结合的位点的亲和性物质。即,亲和性物质需要设计成:

[1635] A) 包含可与抗体结合的2个以上位点(根据必要,用于连接这些位点的接头)的分子。

[1636] 其次,在本发明中,为了可修饰免疫球蛋白单元,优选使具有免疫球蛋白单元反应性基团的化合物与亲和性物质结合。

[1637] 另外,为了在免疫球蛋白单元的修饰后去除亲和性物质,优选在反应性基团与亲和性物质之间包含切割性部分。

[1638] 而且,为了达成化合物与亲和性物质中的特定位点的特异性结合,优选设计成在亲和性物质中仅存在一个可与化合物反应的位点。因此,在使用亲和性多肽作为亲和性物质,经由亲和性多肽中的赖氨酸残基(K)的侧链中的氨基,使亲和性多肽与化合物结合的情况下,优选设计亲和性多肽,使亲和性多肽中仅存在一个赖氨酸残基。因此,如下设计了亲和性多肽。

[1639] B) 多肽仅包含1个残基K

[1640] C) 通过使N末端的氨基酸为Q(谷氨酰胺),进行焦谷氨酰化,以将N末端氨基转换为酰胺

[1641] 依据上述A)、B)和C)的规则,如以下(a)-(h)那样地设计了多肽性的亲和性物质。

[1642] (1-2)亲和性物质的调制

- [1643] 调制了以下的亲和性物质。
- [1644] (a) QET-Z34CM-PA32-Fc3K
- [1645] QET-FNMQCQRRFYEALHDPNLNNEEQRNARIRSIREEC-GGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPGG-RGNCAHYHKGQIIWCTYH-NH2 (SEQ ID NO:1)
- [1646] (b) QET-Z34CM-PA48-Fc3K
- [1647] QET-FNMQCQRRFYEALHDPNLNNEEQRNARIRSIREEC-GGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPGG-RGNCAHYHKGQIIWCTYH-NH2 (SEQ ID NO:2)
- [1648] (c) QET-Fc3K-PA32-Z34CM
- [1649] QETRGNCAYHKGQIIWCTYH-GGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPGG-FNMQCQRRFYEALHDPNLNNEEQRNARIRSIREEC-NH2 (SEQ IDNO:3)
- [1650] (d) QET-Fc3K-PA48-Z34CM
- [1651] QETRGNCAYHKGQIIWCTYH-GGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPGG-FNMQCQRRFYEALHDPNLNNEEQRNARIRSIREEC-NH2 (SEQ ID NO:4)
- [1652] (e) QET-Fc3K-PA32-ProAR
- [1653] QETRGNCAYHKGQIIWCTYH-GGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPGG-FNREQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA-NH2 (SEQ ID NO:5)
- [1654] (f) QET-Fc3K-PA48-ProAR
- [1655] QETRGNCAYHKGQIIWCTYH-GGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPGG-FNREQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA-NH2 (SEQ ID NO:6)
- [1656] (g) QET-ProAR-PA32-Z34CK
- [1657] QET-FNREQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA-GGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAPAAPGG-FNKQCQRRFYEALHDPNLNNEEQRNARIRSIREEC-NH2 (SEQ ID NO:7)
- [1658] (h) QET-ProAR-PA48-Z34CK
- [1659] QET-FNREQQNAFYEILHLPNLNNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA-GGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPGG-FNKQCQRRFYEALHDPNLNNEEQRNARIRSIREEC-NH2 (SEQ ID NO:8)
- [1660] (1-3) 亲和性物质的表达
- [1661] 使用Corynex (注册商标) 进行了这些多肽性的亲和性物质的表达研究。在Corynex (注册商标) 的表达中,有效利用了CspB融合法 (W02013/062029) 的技术,即在编码信号肽的核苷酸序列与编码目标多肽的核苷酸序列之间插入编码包含CspB成熟蛋白的N末端3个残基Gln-Glu-Thr (QET) 的氨基酸序列的核苷酸序列,从而可提高目标多肽的分泌产量。另外,由于CspB标签的N末端为Q,因此具有下述优点:在信号序列切割后,第1残基的Q可进行焦谷氨酰化而保护N末端氨基。即,除了上述A)、B)和C)的规则之外,还考虑下述D)的规则,这在使用Corynex (注册商标) 提高亲和性多肽的表达方面是有效的。
- [1662] D) 在N末端添加3个残基QET,以提高利用Corynex (注册商标) 的分泌效率
- [1663] 以下,记载利用Corynex (注册商标) 的表达研究的实施例。
- [1664] (1-4) 构建QET-Z34CM-PA32-Fc3K、QET-Z34CM-PA48-Fc3K、QET-Fc3K-PA32-Z34CM、QET-Fc3K-PA48-Z34CM、QET-Fc3K-PA32-ProAR、QET-Fc3K-PA48-ProAR、QET-ProAR-PA32-Z34CK和QET-ProAR-PA48-Z34CK的各分泌表达质粒

[1665] 作为亲和性多肽,分别设计了上述QET-Z34CM-PA32-Fc3K、QET-Z34CM-PA48-Fc3K、QET-Fc3K-PA32-Z34CM、QET-Fc3K-PA48-Z34CM、QET-Fc3K-PA32-ProAR、QET-Fc3K-PA48-ProAR、QET-ProAR-PA32-Z34CM和QET-ProAR-PA48-Z34CM的8种氨基酸序列,并考虑谷氨酸棒状杆菌的密码子使用频率,设计了编码这些多肽的核苷酸序列。而且,为了可通过谷氨酸棒状杆菌进行分泌表达,分别设计了以下的表达盒。

[1666] QET-Z34CM-PA32-Fc3K作为谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的CspB的信号肽30个氨基酸残基、同株来源的CspB成熟蛋白的N末端3个氨基酸残基QET和Z34CM-PA32-Fc3K的融合蛋白(以下,表述为“CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K”)而分泌表达。将编码所设计的CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10中。

[1667] 编码CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K的核苷酸序列

[1668] atgtttaacaaccgtatccgcaactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccttaacatgcagtgccaacggcgcttttacgaagcgctccacgatcccaacctgaacgaggaacagcgtaacgcgcgcattcgctccatccgtgaggaatgtggcggtgctgcccctgctgccccagcaccggcagcactgcgccaccagctccggcagctccagctgcaccggccccctgccgctccagcagcgccagctccccggaggtcgaggcaattgcgccctatcacaaggggcagatcatctggtgcacttaccattaa (SEQ ID NO:9)

[1669] CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K的氨基酸序列

[1670] MFNNRIRTAALAGAIISTAASGVAIPAFQETFMQCQRRFY EALHDPNLNEEQRNARIRSIREECGGAAPAAPAPAAPAPAAPAPA APAPAAPAAPAPGGRGNCAYHKGQIIWCTYH (SEQ ID NO:10)

[1671] QET-Z34CM-PA48-Fc3K作为谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的CspB的信号肽30个氨基酸残基、同株来源的CspB成熟蛋白的N末端3个氨基酸残基QET和Z34CM-PA48-Fc3K的融合蛋白(以下,表述为“CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K”)而分泌表达。将编码所设计的CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12中。

[1672] 编码CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K的核苷酸序列

[1673] atgtttaacaaccgtatccgcaactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccttaacatgcagtgccaacgctcgtttttacgaagcgctgcacgatcccaacctgaacgaggaacagcgcaatgcgcgaatacgcctcattcgcgaggaatgtggcgagcagctcccgcgctctctgctccagcagcgctgctcctgcccctgcggcacctgcagcactgcaccagcagctccggcagcaccagctccagctgcaccggccccagctcctgcagcgccagccgctccggccccggaggtaggggcaactgcgcatatcacaaggggcagataatctggtgcacttataactaa (SEQ ID NO:11)

[1674] CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K的氨基酸序列

[1675] MFNNRIRTAALAGAIISTAASGVAIPAFQETFMQCQRRFY EALHDPNLNEEQRNARIRSIREECGGAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPGGRGNCAYHKGQIIWCTYH (SEQ ID NO:12)

[1676] QET-Fc3K-PA32-Z34CM作为谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的CspB的信号肽30个氨基酸残基、同株来源的CspB成熟蛋白的N末端3个氨基酸残基QET和Fc3K-PA32-Z34CM的融合蛋白(以下,表述为“CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM”)而分泌表达。将编码所设计的

CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14中。

[1677] 编码CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM的核苷酸序列

[1678] atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccctggcaactgtgcctaccacaagggccagatcatctggtgcagtaccacggaggtgccgcgctgccgcacctgctccagctgctcccgtgccccctgcaccagctgcgccagcagcacagctccagcggcacctgcagcaccggcacctggtggcttcaacatgcagtgccaacgacgcttctacgaggctctgcacgatccgaacctcaacgaggaacagcgcgaatgcccgtattcggtccatcaggaggagaatgctaa (SEQ ID NO:13)

[1679] CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM的氨基酸序列

[1680] MFNNRIRTAALAGAIISTAASGVAIPAFQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGGAAPAAPAPAAPAPAPAAPAPAAPAPAPGGFNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC (SEQ ID NO:14)

[1681] QET-Fc3K-PA48-Z34CM作为谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的CspB的信号肽30个氨基酸残基、同株来源的CspB成熟蛋白的N末端3个氨基酸残基QET和Fc3K-PA48-Z34CM的融合蛋白(以下,表述为“CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM”)而分泌表达。将编码所设计的CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16中。

[1682] 编码CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM的核苷酸序列

[1683] atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccctggcaattgcgcctatcacaagggtcagatcatttggtgcaccaccatggtggtgcagcaccagctgccccggctccggctgcgcctgctgcacctgcgccagctgcacctgcagcacggcacctgctgctccagcagcacccgctcctgcagctcccgtgccccagctccagcggcgctgcccgcgccagcacctggagggttcaacatgcagtgccaacgtcgcttttacgaggctttgcatgatcctaactgaacgaggaacagcggaatgcgcggatagctccatacgcgaagaatgttaa (SEQ ID NO:15)

[1684] CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM的氨基酸序列

[1685] MFNNRIRTAALAGAIISTAASGVAIPAFQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGGAAPAAPAPAAPAPAPAAPAPAAPAPAPAPAPAPGGFNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIREEC (SEQ ID NO:16)

[1686] QET-Fc3K-PA32-ProAR作为谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的CspB的信号肽30个氨基酸残基、同株来源的CspB成熟蛋白的N末端3个氨基酸残基QET和Fc3K-PA32-ProAR的融合蛋白(以下,表述为“CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR”)而分泌表达。将编码所设计的CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18中。

[1687] 编码CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR的核苷酸序列

[1688] atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccctggcaactgtgcctaccacaaggggagatcatctggtgcaccatcacggtggtgcggctccggctgctccagcggcagcagctcccgtgaccagccccagcggcacctgccgcacctgcacctgcagctccagcggctcccgcaccgggagctttaaccgcgaacagcagaacgccttctacgagattctccatctgcccacctcaacgaggagcaacggaatggcttcatccagagcttgctgacgatccgtctcaatccgcc

aatctgcttgcggaagcctaa (SEQ ID NO:17)

[1689] CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR的氨基酸序列

[1690] MFNNRIRTAALAGAI A I STAASGVAIPAF AQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGG A APAAPAPAAPAPAPAAPAPAPAAPAPGGFNREQQNAFY E ILHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLAEA (SEQ ID NO:18)

[1691] QET-Fc3K-PA48-ProAR作为谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的CspB的信号肽30个氨基酸残基、同株来源的CspB成熟蛋白的N末端3个氨基酸残基QET和Fc3K-PA48-ProAR的融合蛋白(以下,表述为“CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR”)而分泌表达。将编码所设计的CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20中。

[1692] 编码CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR的核苷酸序列

[1693] atgtttaacaaccgatccgcaactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccg gcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccgctgggaactgcgcgtaccataagggccagatcatctggtgcacc tatcatggcggtgctgcgcctgcagctccggctcctgcccgtccagccgcgccagccccagcagctccagcagcac ctgcacctgctgcaccagcggtccagctcctgcccgcaccgctgcaccggcaccagccgctccggctgccccagc tccgggtggctttaaccgcaacagcagaacgccttctacgagatactccacctcccaacctgaacgaggagcag cgaaacggcttcatccagtctcttcgcatgatccatcccagagcgctaacttgcttgcaagaagcgtaa (SEQ ID NO:19)

[1694] CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR的氨基酸序列

[1695] MFNNRIRTAALAGAI A I STAASGVAIPAF AQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGG A APAAPAPAAPAPAPAAPAPAPAAPAPGGFNREQQNAFY E ILHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPSQSANLLA EA (SEQ ID NO:20)

[1696] QET-ProAR-PA32-Z34CK作为谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的CspB的信号肽30个氨基酸残基、同株来源的CspB成熟蛋白的N末端3个氨基酸残基QET和ProAR-PA32-Z34CK的融合蛋白(以下,表述为“CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK”)而分泌表达。将编码所设计的CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22中。

[1697] 编码CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK的核苷酸序列

[1698] atgtttaacaaccgatccgcaactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccg gcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccttaaccgcaacagcagaacgccttctacgagatcctgcatctc cccaatctgaacgaagagcagaggaatggctttatccagagccttcgtgacgatccgtcgcaatctgccaacctgt tggcggaagctggaggtgccgcgccagcggcaccagcaccagctgcaccggctgctcccgcacctgccgcaccagc cgctcctgccccagcagctccggcagctcctgcacctggtggcttcaacaagcagtgccaacgtcgcttctatgaa gcgctacacgatcccaacctcaacgaggaacagcgcaatgcgcgaatccgggtccattcgcaagagtgttaa (SEQ ID NO:21)

[1699] CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK的氨基酸序列

[1700] MFNNRIRTAALAGAI A I STAASGVAIPAF AQETFNREQQNAFY E ILHLPNLNEEQRNGFIQSLRDDPS QSANLLAEAGGAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPGGFNKQCQRRFY E ALHDPNLNEEQRNARIRSIR EEC (SEQ ID NO:22)

[1701] QET-ProAR-PA48-Z34CK作为谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的CspB的信号肽30

个氨基酸残基、同株来源的CspB成熟蛋白的N末端3个氨基酸残基QET和ProAR-PA48-Z34CK的融合蛋白(以下,表述为“CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK”)而分泌表达。将编码所设计的CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24中。

[1702] 编码CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK的核苷酸序列

[1703] atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccttaaccgcgaacagcagaacgccttctacgagatcctccatctgccaaacctgaacgaagaacagcgcgaacggctttatccagtcacctcaggacgatccgtctcagtcggccaatttgc tagccgaagcgggaggtgctgctccggcagcaccgcaccagccgcgcccgtgctccagcgcggcagctcctggcaccagctccagcagcaccagcggctccagcacctgccgcacctgcagctccggctctgcagccccgcccgtcctgcccgggtgcttcaacaagcagtgccaacgacgcttctatgaggcgttcacgateccaacctgaatgaggagcaacggaatgcccgtatccgtagcattcgccaagaatggttaa (SEQ ID NO:23)

[1704] CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK的氨基酸序列

[1705] MFNNRIRTAALAGAI A I STAASGVAIP AFAQETFNREQQNAFY EILHLPNLNEEQ R N GFIQSLRDDPS QSANLLAEAGGAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPGGFNKQCQRRFY EALHD PNLNEEQ R NARIRSIREEC (SEQ ID NO:24)

[1706] 设计并全合成了在CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K、CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K、CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM、CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM、CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR、CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR、CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK和CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK中记载的核苷酸序列的上游连接谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的cspB基因的启动子、并且在5'-侧添加KpnI位点、在3'-侧添加BamHI位点的8种亲和性多肽的表达盒。将全合成的DNA片段(亲和性多肽的表达盒)插入至日本特开平9-322774中记载的pPK4的KpnI-BamHI位点,从而分别构建了作为亲和性多肽的分泌表达质粒的pPK4\_CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K、pPK4\_CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K、pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM、pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM、pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR、pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR、pPK4\_CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK和pPK4\_CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK。插入片段的核苷酸序列确定的结果确认到:分别构建了符合设计的亲和性多肽的表达盒。核苷酸序列的确定使用BigDye (R) Terminator v3.1循环测序试剂盒(Applied Biosystems)和3500xL基因分析仪(Applied Biosystems)来进行。

[1707] (1-5) 谷氨酸棒状杆菌中的亲和性多肽的分泌表达

[1708] 使用上述构建的pPK4\_CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K、pPK4\_CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K、pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM、pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM、pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR、pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR、pPK4\_CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK和pPK4\_CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK,转化W02016/171224中记载的谷氨酸棒状杆菌YDK0107株,得到了YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K株、YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Z34CM-PA48-Fc3K株、YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM株、YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM株、YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR株、YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR株、YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK株和YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK株。

[1709] 在包含25mg/L卡那霉素的MMTG液体培养基(120g葡萄糖、3g硫酸镁七水合物、30g硫酸铵、1.5g磷酸二氢钾、0.03g硫酸亚铁七水合物、0.03g硫酸锰五水合物、0.45mg硫酸素盐酸盐、0.45mg生物素、0.15g DL-蛋氨酸、大豆盐酸水解液(总氮量0.2g)、50g碳酸钙,用水调节至1L,pH7.0)中,将所得的各转化体分别在30℃下培养72小时。

[1710] 培养结束后,使用NuPAGE(注册商标)12%Bis-Tris Gel(Thermo Fisher Scientific),将6.5μL对各培养液进行离心分离而得到的培养上清供于还原SDS-PAGE后,用Quick-CBB(Wako)进行染色。其结果,分别检测到:在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K株的培养上清中推测为QET-Z34CM-PA32-Fc3K的多肽条带(图16,泳道2-5),在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Z34CM-PA32-Fc3K株的培养上清中推测为QET-Z34CM-PA32-Fc3K的多肽条带(图16,泳道6-9),在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA32-Z34CM株的培养上清中推测为QET-Fc3K-PA32-Z34CM的多肽条带(图16,泳道10-13),在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA48-Z34CM株的培养上清中推测为QET-Fc3K-PA48-Z34CM的多肽条带(图16,泳道14-17),在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA32-ProAR株的培养上清中推测为QET-Fc3K-PA32-ProAR的多肽条带(图16,泳道18-21),在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3K-PA48-ProAR株的培养上清中推测为QET-Fc3K-PA48-ProAR的多肽条带(图16,泳道22-25),在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-ProAR-PA32-Z34CK株的培养上清中推测为QET-ProAR-PA32-Z34CK的多肽条带(图16,泳道26-29)和在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-ProAR-PA48-Z34CK株的培养上清中推测为QET-ProAR-PA48-Z34CK的多肽条带(图16,泳道30-33)。

[1711] (实施例2)亲和性物质的纯化、和亲和性物质与IgG1抗体Fc区的亲和性的测定

[1712] 用于大量培养实施例1(1-5)中得到的菌株的在发酵层中的培养,依据公知的方法(Appl Microbiol Biotechnol(2008)78:621-625)实施。使用0.2μm的PVDF膜过滤器,对培养液的离心上清进行无菌过滤。为了去除培养液中的夹杂物成分,所表达的多肽通过使用阳离子交换柱的制备HPLC进行纯化。接下来,实施了所得多肽的亲和性测定。具体而言,如下进行。

[1713] 各多肽与IgG1抗体Fc区的亲和性通过SPR测定(Biacore T200(GE Healthcare))进行评价。测定在25℃下实施,运行缓冲液使用了HBS-EP+。将人IgG1抗体Fc蛋白作为配体用乙酸钠缓冲液pH4.5(GE Healthcare)稀释为30μg/mL,并通过胺偶联法在CM5 Sensor Chip(GE Healthcare)表面上固定了约1400RU。各肽用包含0.1%DMSO的HBS-EP+缓冲液稀释为100nM。对于测定而言,采用单循环动力学法,在分析物的添加时间120秒、流速30μL/分钟、解离时间120秒条件下进行测定。另外,所得的传感图通过亲和力进行拟合,并计算出解离常数(KD)的值。测定的结果确认到:所有已表达的多肽均与人IgG1抗体Fc蛋白结合(表1和图17-1~17-8)。

[1714] [表1]

[1715] 表1各种亲和性物质与抗体的KD值

	KD(M)
SEQ ID NO: 1	7.91×10 <sup>-9</sup>
SEQ ID NO: 2	8.98×10 <sup>9</sup>
SEQ ID NO: 3	1.27×10 <sup>-8</sup>
[1716] SEQ ID NO: 4	8.48×10 <sup>-9</sup>
SEQ ID NO: 5	2.41×10 <sup>-7</sup>
SEQ ID NO: 6	2.69×10 <sup>-7</sup>
SEQ ID NO: 7	9.43×10 <sup>-8</sup>
SEQ ID NO: 8	1.08×10 <sup>9</sup>

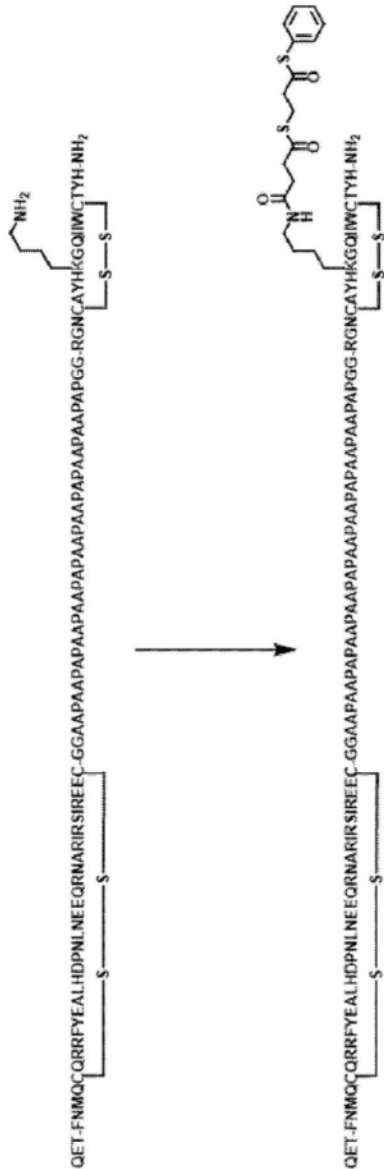
[1717] (实施例3) 具有针对抗体的亲和性物质、切割性部分和反应性基团的化合物的调制

[1718] 使具有切割性部分和反应性基团的化合物与已纯化的多肽结合。

[1719] 依据已有报道 (W02019/0240287), 通过将实施例1-2中调制的亲和性物质QET-Z34CM-PA32-Fc3K酰胺化, 调制了亲和性试剂(1)。

[1720] [化学式76]

[1721]



亲和性试剂(1)

上述氨基酸序列均为 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列。

- [1722] MS (ESI)  $m/z: z=11$  885.80  $[M+3H]^{3+}$
- [1723] 同样地,由实施例1-2中调制的亲和性物质QET-Z34CM-PA48-Fc3K调制了亲和性试剂(2)。
- [1724] MS (ESI)  $m/z: z=13$  849.35  $[M+3H]^{3+}$
- [1725] 同样地,由实施例1-2中调制的亲和性物质QET-Fc3K-PA32-Z34CM调制了亲和性试剂(3)。
- [1726] MS (ESI)  $m/z: z=11$  886.15  $[M+3H]^{3+}$
- [1727] 同样地,由实施例1-2中调制的亲和性物质QET-Fc3K-PA48-Z34CM调制了亲和性试剂(4)。
- [1728] MS (ESI)  $m/z: z=13$  849.20  $[M+3H]^{3+}$
- [1729] 同样地,由实施例1-2中调制的亲和性物质QET-Fc3K-PA32-ProAR调制了亲和性试剂(5)。
- [1730] MS (ESI)  $m/z: z=12$  885.1  $[M+3H]^{3+}$
- [1731] 同样地,由实施例1-2中调制的亲和性物质QET-Fc3K-PA48-ProAR调制了亲和性试剂(6)。
- [1732] MS (ESI)  $m/z: z=11$  1082.00  $[M+3H]^{3+}$
- [1733] 同样地,由实施例1-2中调制的亲和性物质QET-ProAR-PA32-Z34CK调制了亲和性试剂(7)。
- [1734] MS (ESI)  $m/z: z=15$  855.20  $[M+3H]^{3+}$
- [1735] 同样地,由实施例1-2中调制的亲和性物质QET-ProAR-PA48-Z34CK调制了亲和性试剂(8)。
- [1736] MS (ESI)  $m/z: z=17$  830.75  $[M+3H]^{3+}$
- [1737] [化学式77]





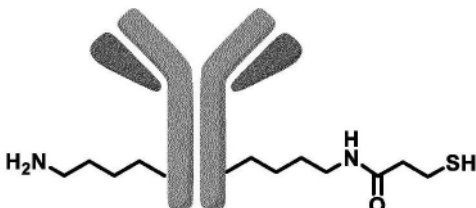


[1749]	DAR峰	观测的质量 (Da)	峰面积	面积%
	0	148400	3.11E+004	2.34
	1	159300	1.28E+006	95.93
	2	170390	2.31E+004	1.74

[1750] (4-3) 通过硫酯基的切割来合成引入硫醇基的抗体衍生物 (T-1-SH)

[1751] 依据已有报道 (W02019/240287), 将上述得到的抗体供于硫酯基的切割反应 (通过羟胺进行的处理), 由此得到了引入了一个硫醇基的下述结构式的引入硫醇基的抗体衍生物 (T-1-SH)。利用ESI-TOFMS测定质量时, 在进行了切割反应的148489处确认到峰。

[1752] [化学式80]



[1753]

[1754] (4-4) 使用亲和性试剂 (6) 的抗HER2抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和通过硫酯基的切割来合成引入硫醇基的抗体衍生物

[1755] 同样地, 使用实施例3中合成的亲和性试剂 (6), 实施了曲妥珠单抗的修饰反应。去除过量的亲和性试剂 (6) 后, 利用ESI-TOFMS测定质量时, 原料的曲妥珠单抗在148227处观测到峰, 引入了一个结合性肽的产物在160165处观测到峰, 引入了二个结合性肽的产物在171953处确认到峰。另外, 将利用DAR计算器 (Agilent公司软件) 进行肽/抗体结合比的确认的结果示于表3中。

[1756] [表3]

[1757]	DAR峰	观测的质量 (Da)	峰面积	面积%
	0	148227	9.64E+004	14.38
	1	160165	5.24E+005	78.12
	2	171953	4.99E+004	7.44

[1758] 依据已有报道 (W02019/0240287), 将上述得到的抗体供于硫酯基的切割反应, 由此得到了引入了一个硫醇基的引入硫醇基的抗体衍生物 (T-1-SH)。利用ESI-TOFMS测定质量时, 在进行了切割反应的148489处确认到峰。

[1759] (4-5) 基于胰蛋白酶处理的肽图分析

[1760] 对于 (4-3) 中得到的曲妥珠单抗硫醇引入体 (T-1-SH), 在下述工序中进行了肽图分析。

[1761] (4-5-1) 曲妥珠单抗硫醇引入体的胰蛋白酶处理

[1762] 在1.5mL低吸附微型试管中加入10 $\mu$ L的样品溶液、150mM Tris-盐酸缓冲液 (pH8.0)、10 $\mu$ L的溶解于40%三氟乙醇的20mM二硫苏糖醇水溶液, 在65 $^{\circ}$ C下加热1小时后, 添加10 $\mu$ L的50mM碘乙酰胺水溶液, 在避光、室温条件下反应30分钟。反应后, 加入40 $\mu$ L的150mM Tris-盐酸缓冲液 (pH8.0) 进行搅拌, 添加10 $\mu$ L的20ng/ $\mu$ L胰蛋白酶水溶液, 在37 $^{\circ}$ C下进行了16小时酶消化。消化后, 对于添加2 $\mu$ L的20%三氟乙酸水溶液而停止反应的样品溶液, 用0.1%甲酸、2%乙腈水溶液进行10倍稀释, 并供于LC-MS/MS测定。

- [1763] (4-5-2) 曲妥珠单抗的LC-MS/MS测定
- [1764] (分析装置)
- [1765] 纳米HPLC:EASY-nLC 1000(Thermo Fisher Scientific公司)
- [1766] 质谱仪:Tribid质谱仪Orbitrap Fusion(Thermo Fisher Scientific公司)
- [1767] (HPLC分析条件)
- [1768] 捕集柱:Acclaim PepMap(注册商标)100,75 $\mu$ m $\times$ 2cm(Thermo Fisher Scientific公司)
- [1769] 分析柱:ESI-column (NTCC-360/75-3-125,75 $\mu$ m $\times$ 12.5cm,3 $\mu$ m(日京TECHNOS公司))
- [1770] 流动相A:0.1%甲酸水溶液
- [1771] 流动相B:0.1%甲酸、乙腈溶液
- [1772] 加样溶液:0.1%三氟乙酸水溶液
- [1773] 流速:300nL/分钟
- [1774] 样品注入量:0.6 $\mu$ L
- [1775] 梯度条件(B%):2%(0.0-0.5分钟)、2% $\rightarrow$ 50%(0.5-50分钟)、50%(50-55.5分钟)、50% $\rightarrow$ 95%(55.5-56.5分钟)、95%(56.5-60分钟)
- [1776] (质谱仪分析条件)
- [1777] 离子化方法:ESI,正离子(Positive)模式
- [1778] 扫描类型:数据依赖性采集(Data Dependent Acquisition)
- [1779] 活化类型:碰撞诱导解离(Collision-Induced Dissociation,CID)
- [1780] 数据的获取使用作为附带软件的Xcalibur 4.3(Thermo Fisher Scientific公司)和Thermo Orbitrap Fusion Tune Application 3.3(Thermo Fisher Scientific公司)来进行。
- [1781] (4-5-3) 曲妥珠单抗的修饰位点的分析
- [1782] 关于对LC-MS/MS测定结果的修饰位点分析,使用BioPharma Finder 3.2(Thermo Fisher Scientific公司)来进行。
- [1783] 利用BioPharma Finder的分析是将S/N阈值设定为64、将MS噪声级设定为4000来实施。另外,将消化酶设定为胰蛋白酶、将特异性设定为高(High)。在静态修饰中,将脲甲基(carbamidomethyl)(+57.021Da)设定为碘乙酰胺对半胱氨酸残基的修饰。关于动态修饰,设定了蛋氨酸残基和色氨酸残基的氧化(+15.995Da)、谷氨酸残基和天冬氨酸残基的脱酰胺化(+0.984Da)、和对赖氨酸残基的修饰体(通过碘乙酰胺进行脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))。另外,将谷氨酸残基的焦谷氨酰化(-18.011Da)设定为对蛋白的N末端的动态修饰,将赖氨酸添加(+128.095Da)设定为对蛋白的C末端的动态修饰。而且,设定了过滤器,使得置信度分数为80以上,肽鉴定时的质量精度为5ppm以内,只有MS/MS可观测到。需要说明的是,关于赖氨酸残基的残基编号,对于重链VH结构域和轻链上,以序列中的编号(即,将N末端的氨基酸设为第1位。下同)来表述,对于重链CH1、CH2、CH3结构域上,使用EU编号来表述。
- [1784] (4-5-4) 基于LC-MS/MS的曲妥珠单抗的修饰位点的分析结果
- [1785] 使用LC-MS/MS的分析结果,观测到由23个氨基酸残基构成的肽、THTCPPCPAPPELLG

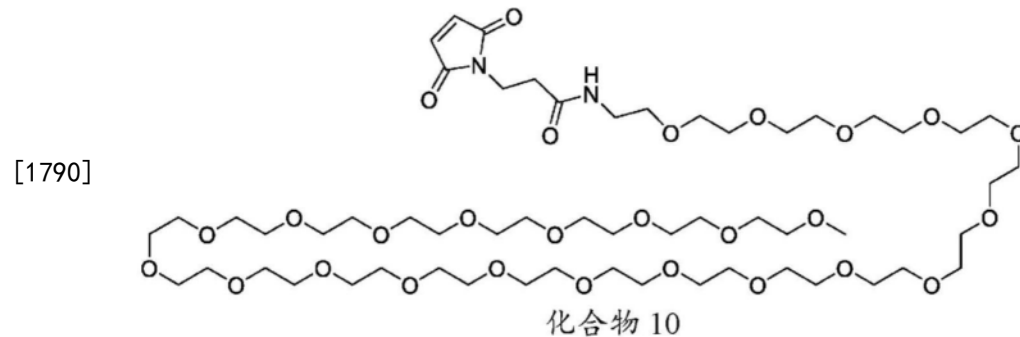
GPSVFLFPPKPKDTLMISR (SEQ ID NO:25) 的肽片段的MS谱 (实测值:m/z 952.22949,理论值:952.22942,4价),所述23个氨基酸残基包含曲妥珠单抗的通过胰蛋白酶消化对赖氨酸残基的修饰位点(通过碘乙酰胺进行脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))(图19-1),由CID谱确认到表示重链的EU编号中的246位或248位的赖氨酸残基的修饰的、相当于2价y20的m/z1167.12(理论值:1166.61)的产物离子(图19-2)。另外,通过利用BioPharma Finder的分析,显示出高选择性地引起对248位的赖氨酸残基的修饰(图19-3)。

[1786] 根据该结果可知,在上述(4-3)中得到的曲妥珠单抗硫醇引入体(T-1-SH)中,在抗体的重链上,在EU编号中的Lys246或Lys248位点选择性地进行了缀合。

[1787] (4-6)合成ADC模拟物

[1788] 使m-dPEG-马来酰亚胺(quanta biodesign公司制造,化合物10)与实施例(4-3)中得到的硫醇引入抗体(T-1-SH,PBS溶液)反应。反应后,利用ESI-TOFMS测定质量时,在149735处确认到峰。而且,其DAR为0.9。

[1789] [化学式81]



[1791] (实施例5)其它IgG抗体的特异性修饰

[1792] 依据实施例(4-1)的条件,使修饰试剂(4)与各种抗体反应。与实施例4-1同样地测定ESI-TOFMS,利用DAR计算器计算出平均的肽/抗体结合比。将抗体与平均的肽/抗体结合比的列表记载于表4中。

[1793] [表4]

[1794] 表4

[1795]

抗体	肽/抗体结合比
利妥昔单抗	0.9
英夫利昔单抗	0.9
西妥昔单抗	1.0

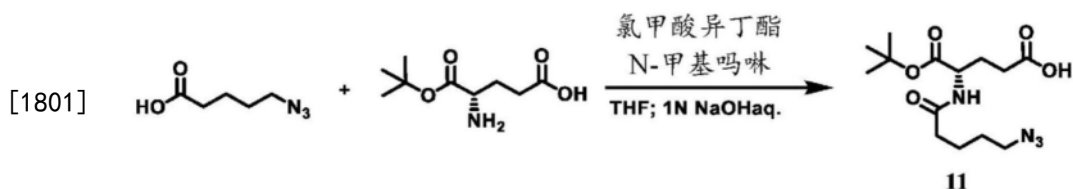
[1796] 由此可知,无论抗体的差异如何,均可控制肽/抗体结合比。

[1797] (实施例6)向抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗中特异性地引入叠氨基和ADC模拟物的合成

[1798] (6-1)合成具有叠氨基的小分子接头

[1799] (6-1-1)合成接头中间体(11)

[1800] [化学式82]



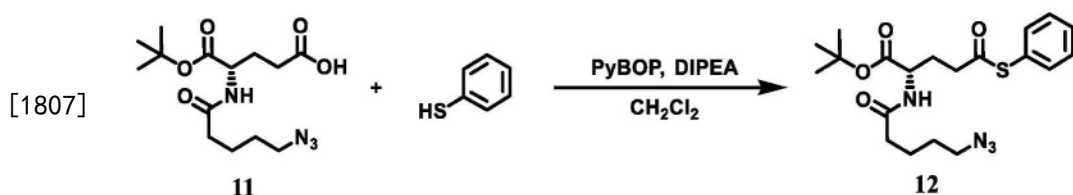
[1802] 将5-叠氮戊酸(800mg, 5.59mmol)溶解于THF(14mL),加入氯甲酸异丁酯(808 $\mu$ L, 6.15mmol)、N-甲基吗啉(873 $\mu$ L, 8.39mmol),在0 $^{\circ}$ C下搅拌30分钟后,加入溶解于1M NaOH水溶液(4mL)的胍水合物(1.36g, 6.71mmol),在室温下搅拌3小时。减压下浓缩后,加入1M NaOH水溶液,将体系内的pH调节为pH10,用乙酸乙酯洗涤后,向水层中加入1M HCl水溶液,将体系内的pH调节为3.0,加入乙酸乙酯进行洗涤,向所得的乙酸乙酯溶液中加入硫酸钠。通过过滤去除硫酸钠,减压下用浓缩柱色谱(二氯甲烷:甲醇=10:1)进行纯化。回收包含产物的馏分,进行减压浓缩,由此得到了接头中间体(11)。

[1803]  $^1\text{H NMR}$ (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$ 6.29(d,  $J=7.7\text{Hz}$ , 1H), 4.56(td,  $J=8.0, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 3.32(t,  $J=6.6\text{Hz}$ , 2H), 2.53-2.38(m, 3H), 2.36-2.16(m, 3H), 2.12(s, 2H), 1.96(dq,  $J=14.7, 7.6\text{Hz}$ , 1H), 1.84-1.59(m, 4H), 1.50(s, 9H)。

[1804] MS(ESI)  $m/z$ : 329[M+H] $^+$

[1805] (6-1-2) 合成接头中间体(12)

[1806] [化学式83]



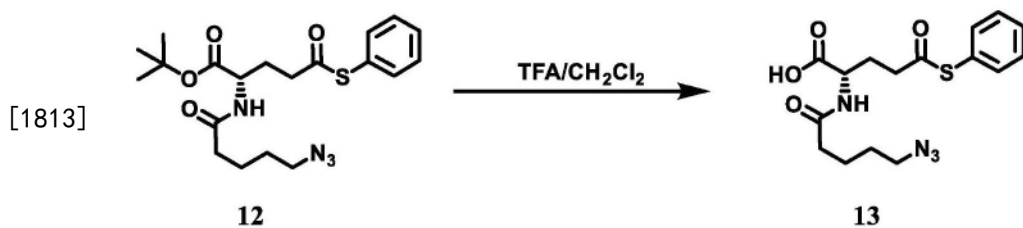
[1808] 将接头中间体(11)(2.41g, 5.59mmol)溶解于二氯甲烷(28mL),加入苯硫酚(627 $\mu$ L, 6.15mmol)、苯并三唑-1-基氧基(3.49g, 6.71mmol)、DIPEA(1.42mL, 8.39mmol),在室温下搅拌2小时。之后,减压下浓缩,用柱色谱(己烷:乙酸乙酯=4:1)进行纯化。回收包含产物的馏分,减压下进行浓缩,由此得到了接头中间体(12)(2.20g, 5.23mmol)。

[1809]  $^1\text{H NMR}$ (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$ 7.43(s, 5H), 6.10(d,  $J=7.8\text{Hz}$ , 1H), 4.55(td,  $J=7.7, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 3.31(t,  $J=6.7\text{Hz}$ , 2H), 2.87-2.63(m, 2H), 2.28(dd,  $J=8.7, 5.9\text{Hz}$ , 2H), 2.16-1.98(m, 1H), 1.83-1.58(m, 4H), 1.50(s, 9H), 1.37-1.22(m, 2H), 0.91(t,  $J=6.7\text{Hz}$ , 1H)。

[1810] MS(ESI)  $m/z$ : 421[M+H] $^+$

[1811] (6-1-3) 合成接头中间体(13)

[1812] [化学式84]



[1814] 将接头中间体(12)(2.20g, 5.23mmol)溶解于二氯甲烷(10mL),加入三氟乙酸(10mL),在室温下搅拌1小时后,减压下浓缩,去除二氯甲烷,加入水,进行冷冻干燥,由此得

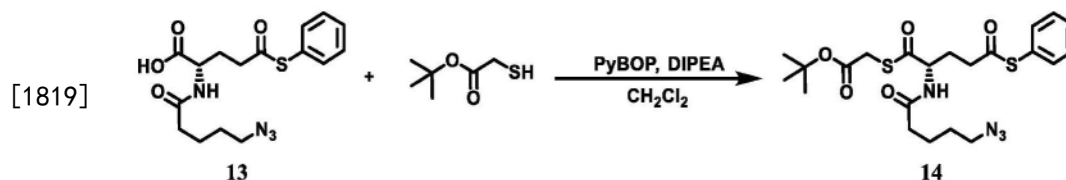
到了接头中间体 (13) (1.98g, 5.43mmol)。

[1815]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$ 7.44 (s,  $J=6.3, 4.6, 2.4\text{Hz}$ , 5H), 6.76 (s, 1H), 4.62 (td,  $J=7.5, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 3.31 (t,  $J=6.6\text{Hz}$ , 2H), 2.88 (qt,  $J=16.8, 6.8\text{Hz}$ , 2H), 2.33 (dt,  $J=12.4, 6.8\text{Hz}$ , 3H), 2.18 (dq,  $J=14.4, 7.4\text{Hz}$ , 1H), 1.74 (dq,  $J=11.8, 7.5, 6.9\text{Hz}$ , 2H), 1.63 (ddd,  $J=17.7, 10.5, 4.8\text{Hz}$ , 2H)。

[1816] MS (ESI)  $m/z$ : 365  $[\text{M}+\text{H}]^+$

[1817] (6-1-4) 合成接头中间体 (14)

[1818] [化学式85]



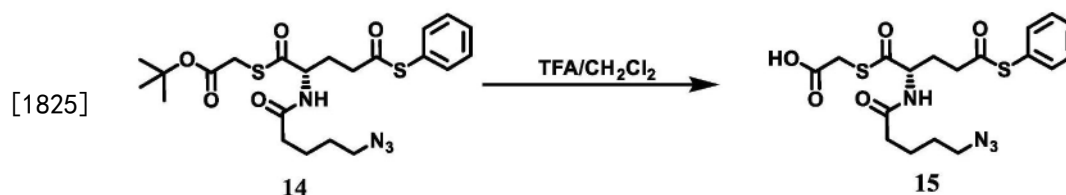
[1820] 将接头中间体 (13) (100mg, 0.274mmol) 溶解于二氯甲烷 (3mL), 加入 (40.6 $\mu\text{L}$ , 0.280mmol)、苯并三唑-1-基氧基 (150mg, 0.288mmol)、DIPEA (70.1 $\mu\text{L}$ , 0.412mmol), 在室温下搅拌2小时。加入1M HCl水溶液, 将体系内调节为pH3, 加入二氯甲烷进行稀释, 用水、食盐水洗涤后, 加入硫酸钠。通过过滤去除硫酸钠后, 减压下浓缩, 用柱色谱 (己烷: 乙酸乙酯=4:1) 进行纯化。回收包含产物的馏分, 减压下进行浓缩, 由此得到了接头中间体 (14) (84.7mg, 0.171mmol)。

[1821]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$ 7.50-7.38 (m, 5H), 6.33 (d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H), 4.78 (tdd,  $J=7.8, 4.6, 3.0\text{Hz}$ , 1H), 3.70-3.54 (m, 2H), 3.32 (dt,  $J=9.1, 6.7\text{Hz}$ , 2H), 2.96-2.67 (m, 2H), 2.30 (pd,  $J=7.1, 4.5\text{Hz}$ , 2H), 1.85-1.60 (m, 6H), 1.49 (d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 9H)。

[1822] MS (ESI)  $m/z$ : 495  $[\text{M}+\text{H}]^+$

[1823] (6-1-5) 合成接头中间体 (15)

[1824] [化学式86]



[1826] 将接头中间体 (14) (84.7mg, 0.171mmol) 溶解于二氯甲烷 (5mL), 加入三氟乙酸 (5mL), 在室温下搅拌1小时后, 减压下浓缩, 去除二氯甲烷, 加入水, 进行冷冻干燥后, 用柱色谱 (二氯甲烷: 甲醇=10:1) 进行纯化。回收包含产物的馏分, 减压下进行浓缩, 由此得到了接头中间体 (15) (46.8mg, 0.107mmol)。

[1827]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 甲醇-d4)  $\delta$ 7.44 (dq,  $J=2.3, 1.5\text{Hz}$ , 5H), 4.69-4.57 (m, 1H), 3.79-3.67 (m, 2H), 3.40-3.30 (m, 2H), 2.89-2.71 (m, 2H), 2.44-2.23 (m, 4H), 2.08-1.95 (m, 1H), 1.82-1.61 (m, 4H)。

[1828] MS (ESI)  $m/z$ : 439  $[\text{M}+\text{H}]^+$

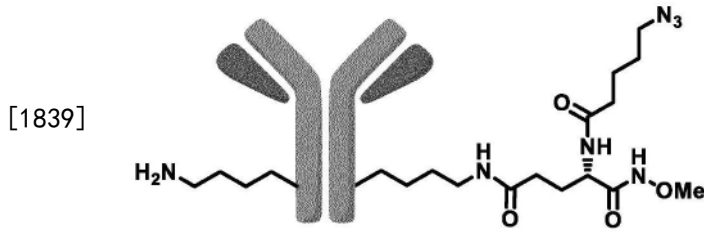
[1829] (6-2) 合成具有叠氮基的修饰试剂 (9)

[1830] [化学式87]



TOFMS测定质量时,在进行了切割反应的148672处确认到峰。

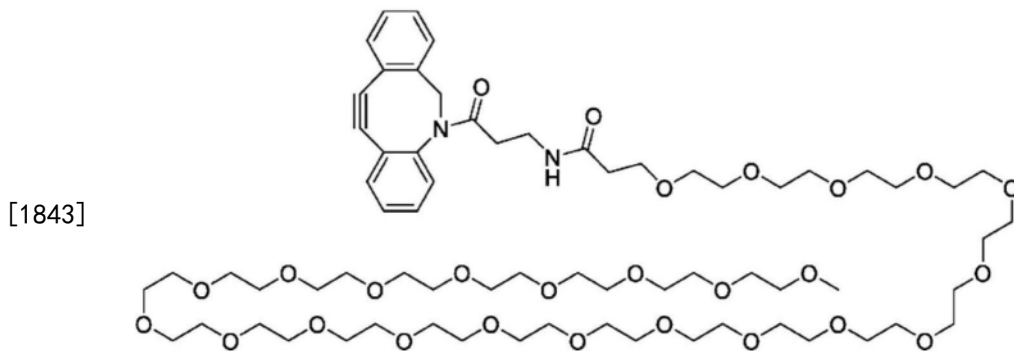
[1838] [化学式88]



[1840] (6-5) 合成ADC模拟物

[1841] 使m-dPEG-DBCO(Quanta Biodesign公司制造,化合物16)与实施例(6-4)中得到的引入叠氮基的抗体(T-1-N3)(PBS溶液)反应。反应后,利用ESI-TOFMS测定质量时,在149893处确认到峰。而且,其DAR为0.9。

[1842] [化学式89]

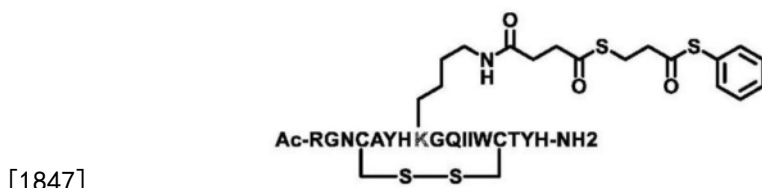


化合物 16

[1844] (比较例1) 使用得到DAR=2的抗体修饰试剂的抗HER2抗体曲妥珠单抗的特异性修饰

[1845] 使用已有报道(WO2019/0240287)中报道的得到DAR=2的ADC的亲合性试剂(17),实施了曲妥珠单抗的特异性修饰。此时,通过研究试剂的当量数,研究了提高抗体中引入了一个肽的化合物的选择性的亲合性试剂(17)的当量数。

[1846] [化学式90]



修饰试剂(17)

上述氨基酸序列为 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列。

[1848] [表5]

[1849] 表5

[1850]

亲和性试剂(17)的当量数	抗体中引入了一个肽的化合物的选择性
0.2	5.7%

0.5	26.6%
0.8	40.4%
1.2	59.8%
1.5	44.3%
1.8	23.5%
2.0	20.8%

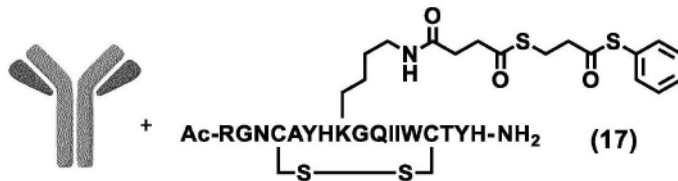
[1851] 与实施例4-2同样地,利用DAR计算器的面积%求出了选择性。如表5中所示,即使改变当量数,修饰试剂(17)也只能显示小于60%的选择性。另一方面,如实施例4-1、4-4中所示,亲和性试剂(4)、(6)可显示65%以上的选择性,得到了抗体中引入了一个肽的化合物。

[1852] (实施例7)合成引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的抗体

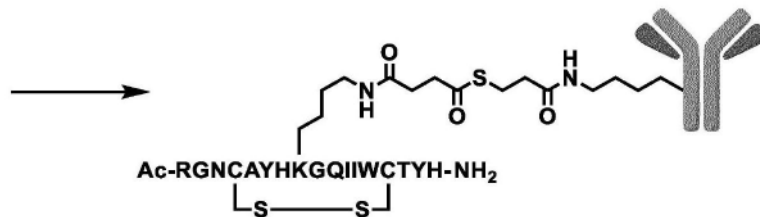
[1853] (7-1)合成引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的曲妥珠单抗(T-2-N3/SH)

[1854] (7-1-1)通过缀合和HPLC纯化进行抗HER2抗体曲妥珠单抗的亲和性试剂的一分子特异性修饰

[1855] [化学式91]



[1856]



[1857] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[1858] 向抗人HER2单克隆抗体曲妥珠单抗(中外制药)的10mg/mL乙酸缓冲液(50mM乙酸钠,pH5.5)溶液中加入已有报道(WO2019/240287A1)记载的修饰试剂(17)的二甲基甲酰胺溶液(相对于抗体为1当量,二甲基甲酰胺(DMF)(8%v/v)溶液),在室温振荡1小时。使用NAP-25脱盐柱(Cytiva公司制造)纯化反应溶液后,使用AKTA pure25(Cytiva公司制造)获取了引入了1分子肽试剂的抗体。引入了1分子肽试剂的抗体的DAR分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到引入了1个肽试剂。

[1859] 通过AKTA pure25(Cytiva公司制造)的纯化在下述条件下进行。

[1860] 柱:RESOURCE S(Cytiva公司制造)

[1861] 洗脱液A:50mM乙酸钠,0.1%吐温20(pH5.0)

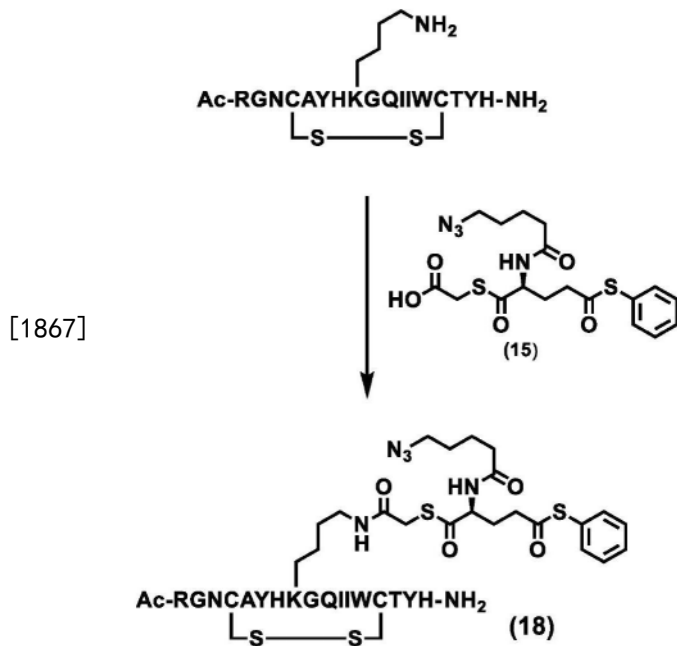
[1862] 洗脱液B:50mM乙酸钠,1M NaCl,0.1%吐温20(pH5.0)

[1863] 流速:5.0ml/分钟

[1864] 检测器:在215nm和280nm的波长下检测。

[1865] (7-1-2)调制具有叠氮基的亲和性试剂(18)

[1866] [化学式92]

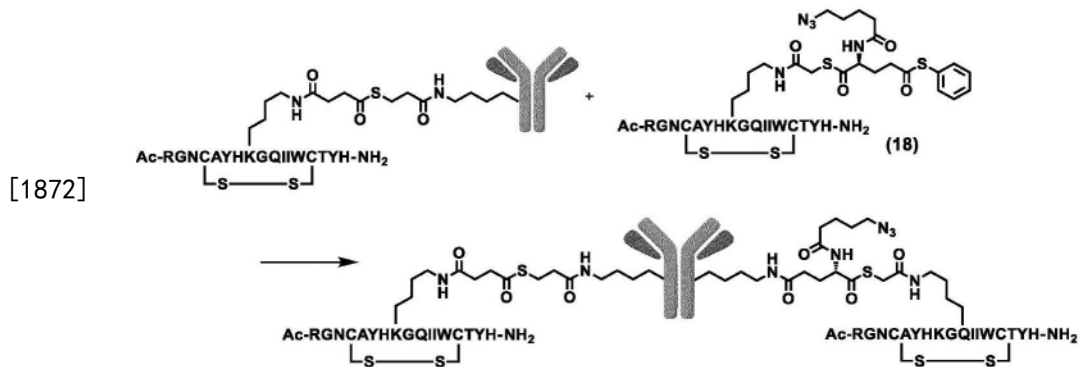


[1868] 上述氨基酸序列均为SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[1869] 将已有报道(WO2019/240287A1)记载的Ac-RGNCAYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO: 26, 30.9mg, 14.9μmol, 其中,第4位和第14位的2个半胱氨酸分别在分子内形成二硫键)溶解于二甲基甲酰胺(468μL),加入实施例6-1-5中合成的接头中间体(15)(46.8mg, 0.107mmol)、WSC·HCl(29.7mg, 0.155mmol),在室温下搅拌5小时后,通过反相制备色谱法进行洗脱。回收包含产物的馏分,通过减压下浓缩去除乙腈后,进行冷冻干燥,得到了上述修饰试剂(18)(15.1mg, 6.02μmol)。

[1870] (7-1-3)向曲妥珠单抗中引入2分子肽试剂

[1871] [化学式93]

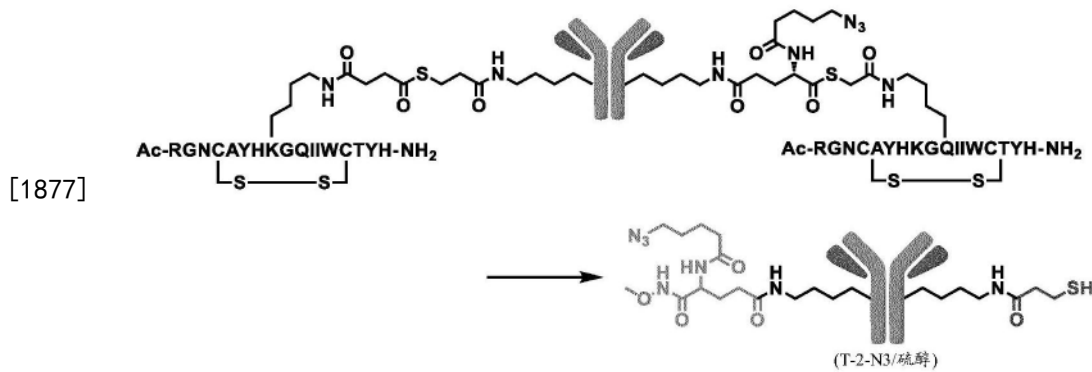


[1873] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[1874] 接下来,使用实施例7-1-2中调制的肽试剂(18),依据已有报道(WO2019/240287A1)的方法,对实施例7-1-1中得到的引入了1分子肽试剂的抗体实施了缀合。结果,得到了引入了修饰试剂(17)和修饰试剂(18)的抗体。引入了肽试剂(17)和肽试剂(18)的抗体的DAR分析是依据已有报道(Anal.Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到引入了2个肽试剂。

[1875] (7-1-4)合成引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的曲妥珠单抗(T-1)

[1876] [化学式94]



[1878] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[1879] 参照已有报道(WO2019/240287A1)的方法,向实施例7-1-2中得到的引入了修饰试剂(17)和修饰试剂(18)的抗体中加入甲氧基胺溶液,在室温下振荡3小时,由此实施了切割反应。结果,得到了引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的抗体(T-2-N3/SH)。引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的抗体(T-2-N3/SH)的DAR分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基。

[1880] (7-1-5)向曲妥珠单抗中引入2分子肽试剂

[1881] 对于实施例4-1中得到的引入了1分子亲和性试剂(4)的抗体,依据已有报道(WO2019/240287A1)的方法,接下来使用实施例7-1-2中调制的修饰试剂(18)实施了缀合。结果,得到了引入了亲和性试剂(4)和亲和性试剂(18)的抗体。引入了亲和性试剂(4)和修饰试剂(11)的抗体的DAR分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到引入了2个肽试剂。

[1882] (7-1-6)合成引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的曲妥珠单抗(T-1)

[1883] 依据实施例7-1-4,向实施例7-1-5中得到的引入了修饰试剂(4)和修饰试剂(18)的抗体中加入甲氧基胺溶液,在室温下振荡3小时,由此实施了切割反应。结果,得到了引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的抗体(T-2-N3/SH)。引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的抗体(T-2-N3/SH)的DAR分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基。

[1884] (7-1-7)向曲妥珠单抗中引入2分子肽试剂

[1885] 对于实施例6-3中得到的引入了1分子亲和性试剂(9)的抗体,依据已有报道(WO2019/240287A1)的方法,使用修饰试剂(17)实施了缀合。结果,得到了引入了亲和性试剂(9)和修饰试剂(17)的抗体。引入了亲和性试剂(9)和修饰试剂(17)的抗体的DAR分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到引入了2个肽试剂。

[1886] (7-1-8)合成引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的曲妥珠单抗(T-1)

[1887] 依据实施例7-1-4,向实施例7-1-7中得到的引入了修饰试剂(9)和修饰试剂(17)的抗体中加入甲氧基胺溶液,在室温下振荡3小时,由此实施了切割反应。结果,得到了引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的抗体(T-2-N3/SH)。引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的抗体(T-2-N3/SH)的DAR分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基。

[1888] (7-2)合成引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的西妥昔单抗(C-2-N3/SH)

[1889] 依据实施例7-1,通过使用抗人EGFR单克隆抗体西妥昔单抗(Merck BioPharma),得到了引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的抗体(C-2-N3/SH)。引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的抗体的DAR分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基。

[1890] (7-3)合成引入了1分子叠氮基的西妥昔单抗(C-1-N3)

[1891] 依据实施例6-3,通过使用抗人EGFR单克隆抗体西妥昔单抗(Merck BioPharma)和修饰试剂(9),得到了仅引入了修饰试剂(9)的抗体(C-1-N3)。

[1892] 接下来,依据已有报道(WO2019/240287A1),加入甲氧基胺溶液,在室温下振荡3小时,由此得到了仅引入了1分子叠氮基的抗体(C-1-N3)。仅引入了1分子叠氮基的抗体的DAR分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到仅引入了1分子叠氮基。

[1893] (7-4)合成各引入了2分子叠氮基的西妥昔单抗(C-2-N3)

[1894] 依据已有报道(WO2019/240287A1)的方法,向抗人EGFR单克隆抗体西妥昔单抗(Merck BioPharma)的乙酸缓冲液(50mM乙酸钠,pH5.5)溶液中加入实施例7-1-2中调制的肽试剂(18),在室温下振荡1小时。

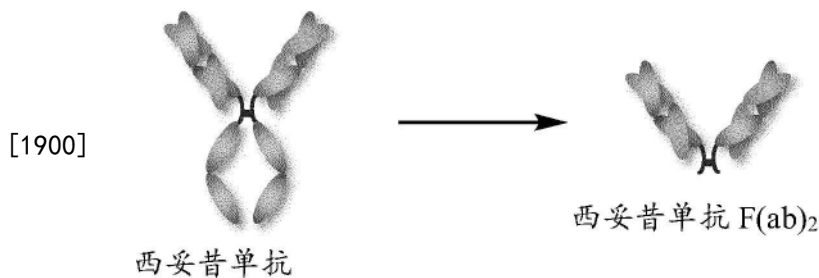
[1895] 接下来,依据已有报道(WO2019/240287A1),加入甲氧基胺溶液,在室温下振荡3小时,由此得到了引入叠氮基的抗体(C-2-N3)。各引入了2分子叠氮基的抗体的DAR分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到各引入了2分子叠氮基。

[1896] (实施例8)合成引入了接头的Fab分子

[1897] (8-1)向西妥昔单抗中引入接头

[1898] (8-1-1)合成西妥昔单抗的F(ab)<sub>2</sub>

[1899] [化学式95]



[1901] 向抗人EGFR单克隆抗体西妥昔单抗(Merck BioPharma)的10mg/mL乙酸缓冲液(50mM乙酸钠,pH4.5)溶液中添加固定化胃蛋白酶(Thermo Fisher),在37°C下振荡4小时。使用NAP-25脱盐柱(Cytiva公司制造)纯化反应溶液后,使用AKTA pure25(Cytiva公司制造)获取了西妥昔单抗的F(ab)<sub>2</sub>分子。Fab的分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在101581处观测到峰。

[1902] 通过AKTA pure25(Cytiva公司制造)的纯化在下述条件下进行。

[1903] 柱:RESOURCE S(Cytiva公司制造)

[1904] 洗脱液A:50mM乙酸钠,0.1%吐温20(pH5.0)

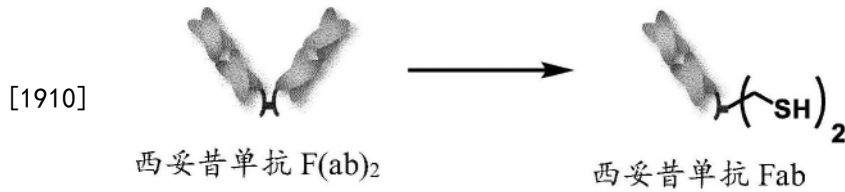
[1905] 洗脱液B:50mM乙酸钠,1M NaCl,0.1%吐温20(pH5.0)

[1906] 流速:5.0ml/分钟

[1907] 检测器:在215nm和280nm的波长下检测。

[1908] (8-1-2) 合成西妥昔单抗的Fab

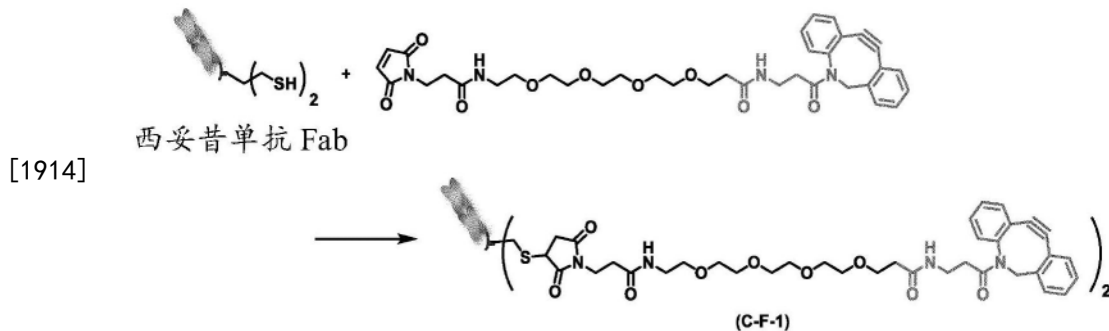
[1909] [化学式96]



[1911] 向实施例8-1-1中得到的F(ab)<sub>2</sub>的PBSE缓冲液(10mM磷酸缓冲盐水(PBS),10mM EDTA,pH7.4)溶液中添加2-巯基乙胺的PBSE缓冲液溶液(10mM),在37°C下振荡1小时。使用NAP-25脱盐柱(Cytiva公司制造)纯化反应溶液,获取了Fab。Fab的分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在50793处观测到峰。

[1912] (8-1-3) 向西妥昔单抗的Fab中引入PEG4-DBCO基(C-F-1)

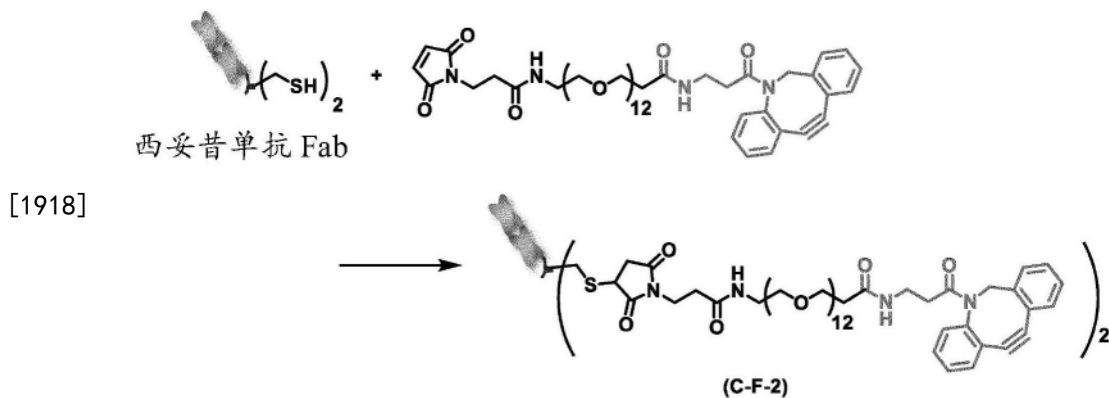
[1913] [化学式97]



[1915] 向实施例8-1-2中得到的西妥昔单抗的Fab的乙酸缓冲液(50mM乙酸钠,pH5.5)溶液中加入市售的DBCO-PEG4-马来酰亚胺的二甲基甲酰胺溶液(相对于Fab为3当量,二甲基甲酰胺(DMF)(8%v/v)溶液),在室温下振荡1小时。使用NAP-25脱盐柱(Cytiva公司制造)纯化反应溶液,获取了引入了PEG4-DBCO基的Fab。分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在52142处观测到峰。

[1916] (8-1-4) 向西妥昔单抗的Fab中引入PEG12-DBCO基(C-F-2)

[1917] [化学式98]



[1919] 依据实施例8-1-3,通过使用实施例8-1-2中得到的西妥昔单抗的Fab和市售的DBCO-PEG12-马来酰亚胺,获取了引入了PEG12-DBCO基的Fab。分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在52846处观测到峰。

[1920] (8-2) 向曲妥珠单抗中引入接头

[1921] (8-2-1) 合成曲妥珠单抗的F(ab)<sub>2</sub>

[1922] 依据实施例8-1-1,使用抗HER2单克隆抗体曲妥珠单抗(中外制药)获取了曲妥珠单抗的F(ab)<sub>2</sub>分子。Fab的分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在97286处观测到峰。

[1923] (8-2-2) 合成曲妥珠单抗的Fab

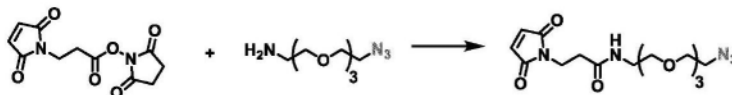
[1924] 依据实施例8-1-2,使用实施例2-2-1中得到的F(ab)<sub>2</sub>获取了Fab。Fab的分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在48644处观测到峰。

[1925] (8-2-3) 向曲妥珠单抗的Fab中引入PEG4-DBCO基(T-F-1)

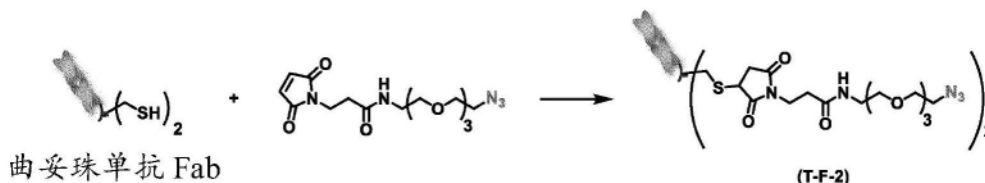
[1926] 依据实施例8-1-3,使用实施例8-2-2中得到的曲妥珠单抗的Fab获取了引入了PEG4-DBCO基的Fab。分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在49994处观测到峰。

[1927] (8-2-4) 向曲妥珠单抗的Fab中引入叠氮基(T-F-2)

[1928] [化学式99]



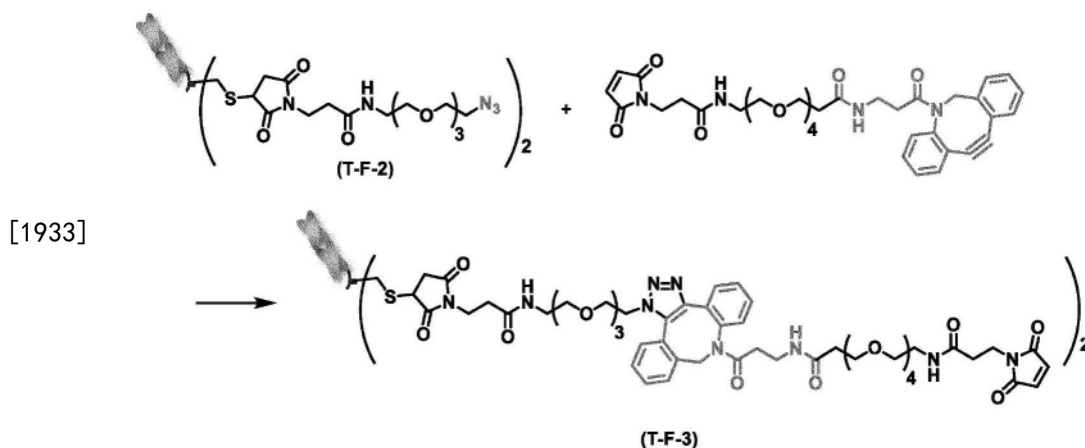
[1929]



[1930] 向市售的3-马来酰亚胺丙酸N-琥珀酰亚胺酯的二甲基甲酰胺溶液(20mM)中添加等量的3-叠氮基丙胺的二甲基甲酰胺溶液(20mM),振荡30分钟,调制了叠氮-PEG3-马来酰亚胺的二甲基甲酰胺溶液(10mM)。向实施例8-2-2中得到的曲妥珠单抗的Fab的乙酸缓冲液(50mM乙酸钠(PBS),pH5.5)溶液中添加已调制的叠氮-PEG3-马来酰亚胺的二甲基甲酰胺溶液(相对于Fab为3当量,二甲基甲酰胺(DMF)(8%v/v)溶液),振荡1小时。使用NAP-25脱盐柱(Cytiva公司制造)纯化反应溶液,获取了引入了叠氮基的Fab。分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在49383处观测到峰。

[1931] (8-2-5) 向曲妥珠单抗的Fab中引入马来酰亚胺基(T-F-3)

[1932] [化学式100]



[1934] 向实施例8-2-4中得到的引入了叠氮基的曲妥珠单抗的Fab的乙酸缓冲液(50mM乙酸钠,pH5.5)溶液中添加市售的DBCO-PEG4-马来酰亚胺的二甲基甲酰胺溶液(相对于Fab为3当量,二甲基甲酰胺(DMF)(8%v/v)溶液),振荡20小时。使用NAP-25脱盐柱(Cytiva公司制造)纯化反应溶液,合成了引入了马来酰亚胺基的曲妥珠单抗的Fab。分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在50733处观测到峰。

[1935] (8-3) 向帕博利珠单抗中引入接头

[1936] (8-3-1) 合成帕博利珠单抗的F(ab)<sub>2</sub>

[1937] 依据实施例8-1-1,使用抗人PD-1单克隆抗体帕博利珠单抗(MSD)获取了帕博利珠单抗的F(ab)<sub>2</sub>分子。Fab的分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在98151处观测到峰。

[1938] (8-3-2) 合成帕博利珠单抗的Fab

[1939] 依据实施例8-1-2,使用实施例8-3-1中得到的F(ab)<sub>2</sub>获取了Fab。Fab的分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在49076处观测到峰。

[1940] (8-3-3) 向帕博利珠单抗的Fab中引入PEG4-DBCO基(P-F-1)

[1941] 依据实施例8-1-3,使用实施例8-3-2中得到的帕博利珠单抗的Fab获取了引入了PEG4-DBCO基的Fab。分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在50426处观测到峰。

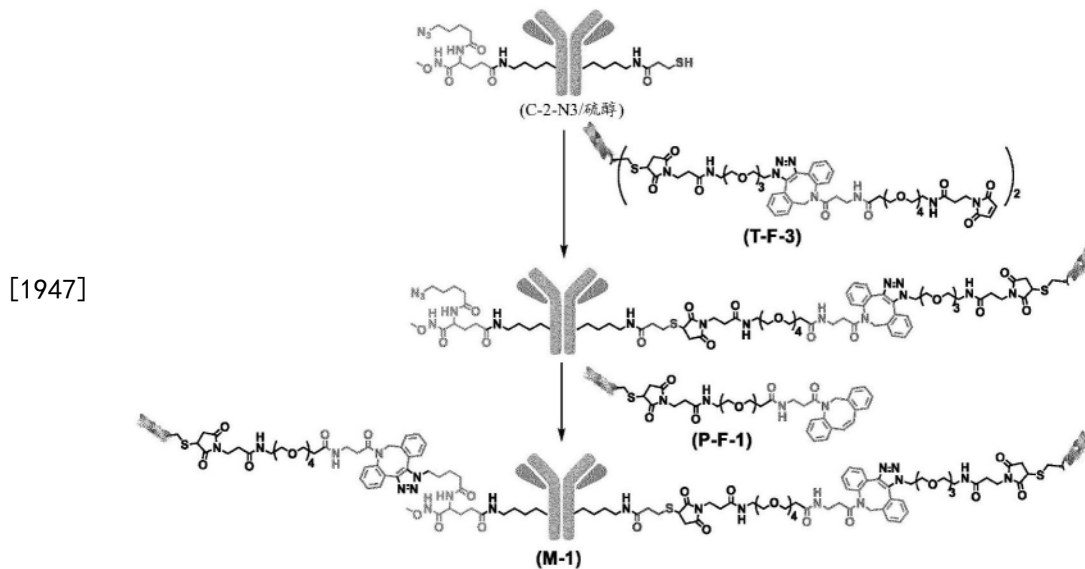
[1942] (8-3-4) 向帕博利珠单抗的Fab中引入PEG12-DBCO基(P-F-2)

[1943] 依据实施例8-1-3,使用实施例8-3-2中得到的帕博利珠单抗的Fab获取了引入了PEG12-DBCO基的Fab。分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在51130处观测到峰。

[1944] (实施例9) 合成多特异性抗体

[1945] (9-1) 合成三特异性抗体(M-1)

[1946] [化学式101]



[1948] 向实施例7-2中合成的引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的西妥昔单抗的PBSE缓冲液(10mM磷酸缓冲盐水(PBS), 10mM EDTA, pH7.4)溶液中添加实施例8-2-5中合成的引入了马来酰亚胺基的曲妥珠单抗的Fab的PBSE缓冲液(10mM磷酸缓冲盐水(PBS), 10mM EDTA, pH7.4)溶液(相对于抗体为1.5当量), 振荡1小时。向该反应液中加入实施例8-3-3中合成的引入了PEG4-DBCO基的帕博利珠单抗的Fab的PBSE缓冲液(10mM磷酸缓冲盐水(PBS), 10mM EDTA, pH7.4)溶液(相对于抗体为2.0当量), 振荡20小时。通过使用AKTA pure25(Cytiva公司制造)纯化反应溶液, 获取了三特异性抗体(M-1)。三特异性抗体(M-1)的分析是依据已有报道(Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)进行ESI-TOFMS分析, 在254362处观测到峰。

[1949] 通过AKTA pure25(Cytiva公司制造)的纯化在下述条件下进行。

[1950] 柱: Superdex200 Increase 10/300GL(Cytiva公司制造)

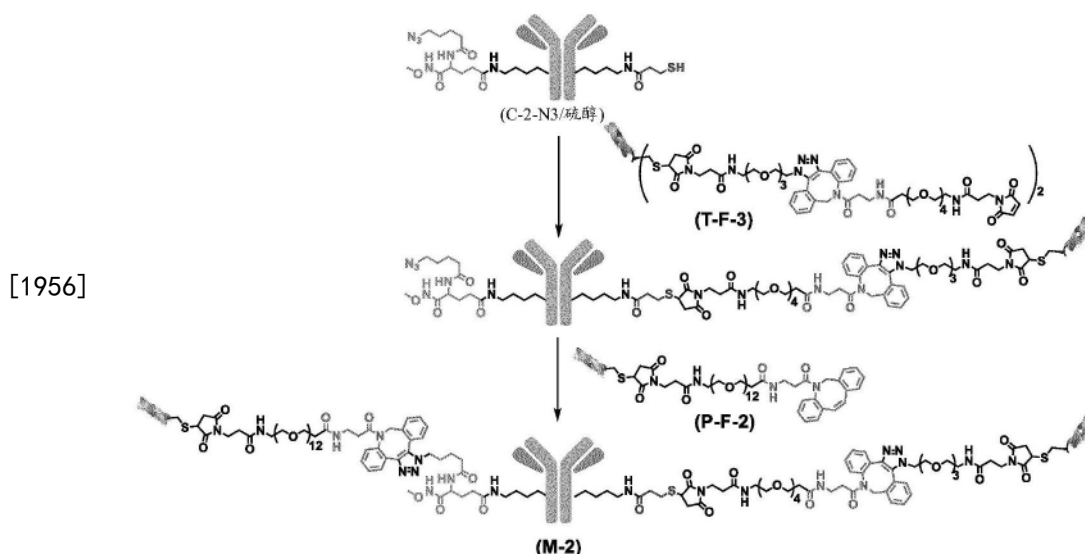
[1951] 洗脱液: PBS缓冲液(10mM磷酸缓冲盐水(PBS), pH7.4)

[1952] 流速: 0.6ml/分钟

[1953] 检测器: 在215nm和280nm的波长下检测。

[1954] (9-2) 合成三特异性抗体(M-2)

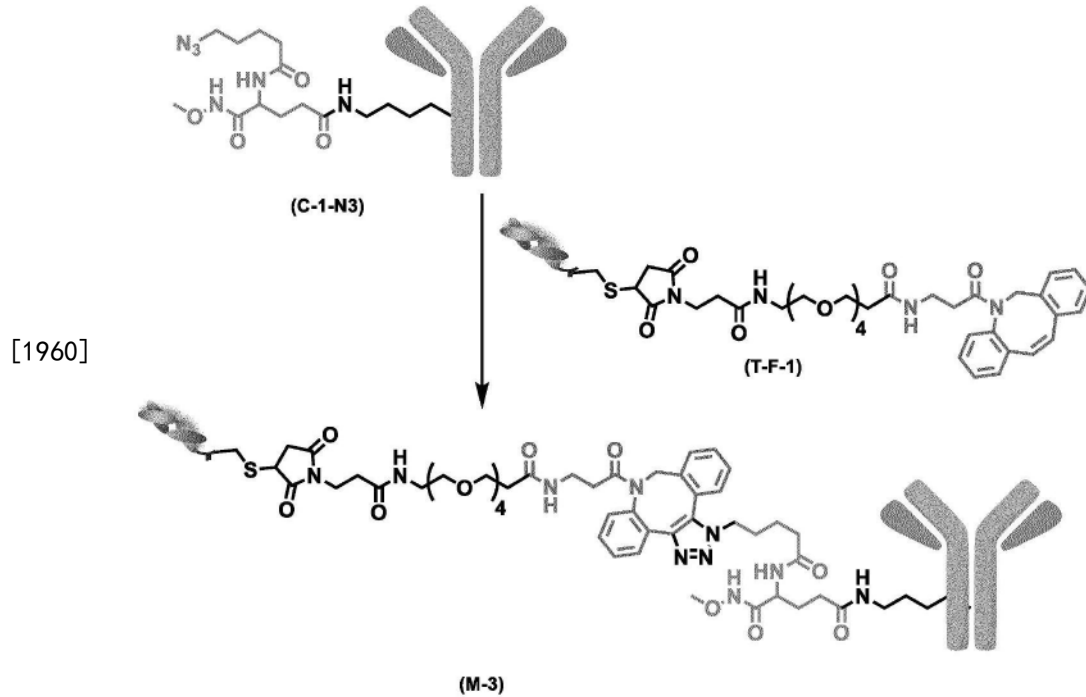
[1955] [化学式102]



[1957] 依据实施例9-1,通过使用实施例7-2中合成的引入了1分子硫醇基和1分子叠氮基的抗体和实施例8-2-5中合成的引入了马来酰亚胺基的曲妥珠单抗的Fab和实施例8-3-4中合成的引入了PEG12-DBCO基的帕博利珠单抗的Fab,获取了三特异性抗体。三特异性抗体的分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在255090处观测到峰。

[1958] (9-3) 合成DAR1双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab) (M-3)

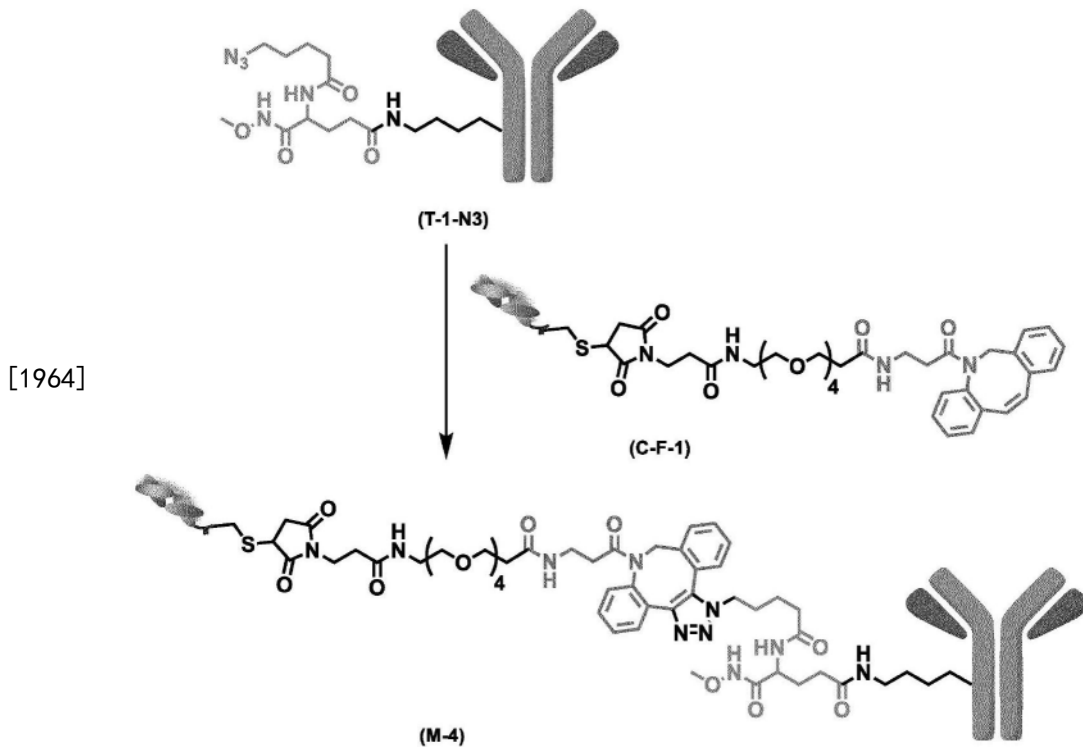
[1959] [化学式103]



[1961] 向实施例7-3中合成的仅引入了1分子叠氮基的抗体(C-1-N3)的乙酸缓冲液(50mM乙酸钠,pH5.5)溶液中加入实施例8-2-3中合成的引入了PEG4-DBCO基的曲妥珠单抗的Fab的乙酸缓冲液(50mM乙酸钠,pH5.5)溶液(相对于抗体为2.0当量),振荡20小时。通过使用AKTA pure25(Cytiva公司制造)纯化反应溶液,获取了双特异性抗体。纯化条件与实施例9-1相似。双特异性抗体的分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在202941处观测到峰。

[1962] (9-4) 合成DAR1双特异性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab) (M-4)

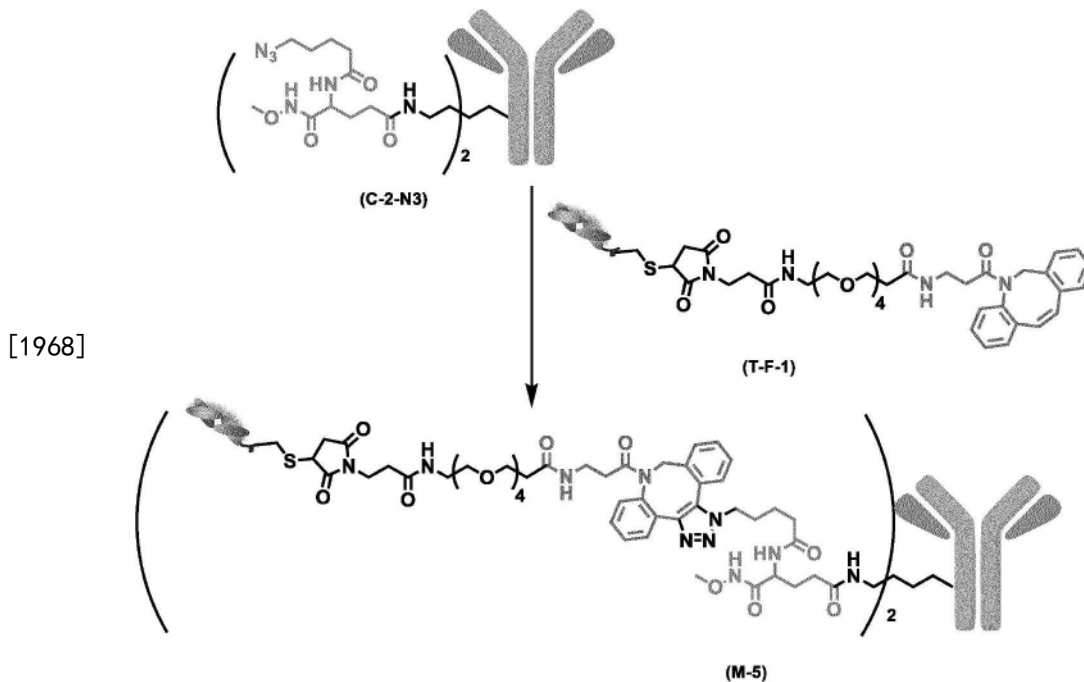
[1963] [化学式104]



[1965] 依据实施例9-3,通过使用实施例6-4中合成的仅引入了1分子叠氮基的抗体 (T-1-N3) 和实施例8-1-4中合成的PEG12-DBC0基,获取了双特异性抗体。双特异性抗体的分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在201356处观测到峰。

[1966] (9-5) 合成DAR2双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab) (M-5)

[1967] [化学式105]



[1969] 向实施例7-4中合成的引入了2分子叠氮基的抗体 (C-2-N3) 的乙酸缓冲液 (50mM 乙酸钠, pH5.5) 溶液中加入实施例8-2-3中合成的引入了PEG4-DBC0基的曲妥珠单抗的Fab的

乙酸缓冲液(50mM乙酸钠,pH5.5)溶液(相对于抗体为2.5当量),振荡20小时。通过使用AKTA pure25(Cytiva公司制造)纯化反应溶液,获取了双特异性抗体。纯化条件与实施例9-1相似。双特异性抗体的分析是依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在253224处观测到峰。

[1970] (比较例2)通过表面等离子体共振(SPR)法评价抗体的亲和性

[1971] 曲妥珠单抗、西妥昔单抗、帕博利珠单抗与抗原(HER2、EGFR、PD-1)和新生儿Fc受体(FcRn)的结合常数通过使用Biacore T200(Cytiva)的SPR分析进行定量。

[1972] 使用生物素标记试剂盒(Dojindo),对重组人HER2-Fc(R&D Systems)、重组人EGFR-Fc(R&D Systems)、重组人PD-1-Fc(R&D Systems)进行生物素化,使用生物素捕获试剂盒(Cytiva),将其固定在传感器芯片上。使用生物素化重组人FcRn(Immunitrack),将FcRn固定在传感器芯片SA(Cytiva)上。针对抗原的亲和性评价的运行缓冲液使用了HBS-EP+缓冲液(Cytiva)。对于针对FcRn的亲和性评价,结合时的运行缓冲液使用了调节为pH6.0的HBS-EP+缓冲液,解离时的运行缓冲液使用了pH7.4的HBS-EP+缓冲液。

[1973] 关于各抗体与抗原和FcRn的结合,以5个浓度点添加各抗体,通过单循环动力学法进行评价。对于所得的传感图,以1:1结合模型进行拟合,计算出结合常数。各抗体与FcRn结合后,通过添加pH7.4的缓冲液,确认了抗体的解离。

[1974] 将西妥昔单抗的亲和性评价结果的传感图示于图20-1~20-3中。明确了西妥昔单抗与EGFR结合,解离常数为 $K_D=610\text{pM}$ 。另外,明确了在pH6.0下以 $K_D=4.7\text{nM}$ 与FcRn结合,在pH7.4下解离。

[1975] (实施例10)通过表面等离子体共振(SPR)法评价多特异性抗体的亲和性

[1976] (10-1)评价双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-3)的亲和性

[1977] 依据比较例2的方法,对实施例9-3中合成的双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-3)进行了亲和性评价。将结果的传感图示于图21-1~21-4中。明确了双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-3)与亲本抗体西妥昔单抗的抗原EGFR结合,解离常数为 $K_D=300\text{pM}$ 。另外,明确了也与曲妥珠单抗的抗原HER2结合,解离常数为 $K_D=110\text{pM}$ 。而且,明确了在pH6.0下以 $K_D=2.6\text{nM}$ 与FcRn结合,在pH7.4下解离。

[1978] (10-2)评价双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-4)的亲和性

[1979] 依据比较例2的方法,对实施例9-4中合成的双特异性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab)(M-4)进行了亲和性评价。将结果的传感图示于图22-1~22-4中。明确了双特异性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab)(M-4)与亲本抗体曲妥珠单抗的抗原HER2结合,解离常数为 $K_D=1.9\text{pM}$ 以下。另外,明确了也与西妥昔单抗的抗原EGFR结合,解离常数为 $K_D=190\text{pM}$ 。而且,明确了在pH6.0下以 $K_D=2.4\text{nM}$ 与FcRn结合,在pH7.4下解离。

[1980] (10-3)评价三特异性抗体(M-2)的亲和性

[1981] 将实施例9-2中合成的三特异性抗体(M-2)的亲和性评价结果的传感图示于图23-1~23-5中。明确了三特异性抗体(M-2)与亲本抗体西妥昔单抗的抗原EGFR结合,解离常数为 $K_D=250\text{pM}$ 。另外,明确了也与曲妥珠单抗的抗原HER2和帕博利珠单抗的抗原PD-1结合,解离常数分别为 $K_D=6.8\text{pM}$ 、 $K_D=1.1\text{nM}$ 。而且,明确了在pH6.0下以 $K_D=2.4\text{nM}$ 与FcRn结合,在pH7.4下解离。

[1982] 由这些结果明确了:双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab)(M-3)和双特异

性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab) (M-4) 是分别对EGFR和HER2具有亲和性的双特异性抗体,三特异性抗体(M-2) 是对EGFR、HER2和PD-1具有亲和性的三重特异性抗体。另外,明确了还保持了与生物体内的抗体的再循环相关的FcRn的亲亲和性和解离能力。

[1983] (实施例11) 通过流式细胞术评价多特异性抗体与细胞上抗原的结合

[1984] 细胞使用了CD3活化人T细胞,其中包括HER2阳性SKBR-3细胞、EGFR阳性A-431细胞和PD-1阳性细胞。针对各细胞的西妥昔单抗、曲妥珠单抗、帕博利珠单抗、双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab) (M-3)、双特异性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab) (M-4)、三特异性抗体(M-2)的结合评价通过流式细胞术法实施。

[1985] 将在添加了10%FBS(Thermo Fisher Scientific)的D-MEM培养基(Thermo Fisher Scientific)中培养的各细胞回收200,000个细胞,加入20 $\mu$ L添加了Human TruStain FcX(Biolegend)的PBS,在冰上对Fc受体进行10分钟的封闭。向细胞染色缓冲液(添加了1%FBS的PBS)中加入所述各抗体作为一抗,使其终浓度为20 $\mu$ g/mL,向细胞中添加20 $\mu$ L,通过在冰上孵育20分钟,进行了一抗反应。进行了一抗反应的细胞用细胞染色缓冲液洗涤2次。向细胞中加入40 $\mu$ L作为二抗的用细胞染色缓冲液稀释为10 $\mu$ g/mL的山羊抗人IgG(H+L)交叉吸附二抗、Alexa Fluor<sup>TM</sup>488(Thermo Fisher Scientific),通过在冰上孵育20分钟,进行了二抗反应。用细胞染色缓冲液洗涤2次后,使用Attune NxT流式细胞仪(Thermo Fisher Scientific)进行分析。

[1986] 将对各细胞的分析结果示于图24-1~24-8中。对于SKBR-3细胞,曲妥珠单抗、双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab) (M-3)、双特异性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab) (M-4)、三特异性抗体(M-2)的各抗体在97%以上的细胞中观察到荧光。另外,对于A-431细胞,西妥昔单抗、双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab) (M-3)、双特异性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab) (M-4)、三特异性抗体(M-2)的各抗体在98%以上的细胞中观察到荧光。即,确认到:曲妥珠单抗仅与作为HER2阳性细胞的SKBR3细胞结合,西妥昔单抗仅与作为EGFR阳性细胞的A-431细胞结合,而作为双特异性抗体的双特异性抗体(西妥昔单抗-曲妥珠单抗Fab) (M-3)、双特异性抗体(曲妥珠单抗-西妥昔单抗Fab) (M-4)、三特异性抗体(M-2)可与SKBR3细胞和A-431细胞这两者结合。对于CD3活化人T细胞,不识别PD-1的西妥昔单抗几乎未观察到荧光,相对于此,PD-1特异性的帕博利珠单抗在约23%的细胞中观察到荧光,因此明确了包含约23%的表达PD-1的细胞。三特异性抗体(M-2)在几乎相同程度的细胞中观察到荧光,因此明确了三特异性抗体(M-2)可与PD-1结合。由这些结果确认到:三特异性抗体(M-2)可与EGFR、HER2、PD-1的所有抗原结合。

[1987] (实施例12) 位点特异性地引入了叠氮苯丙氨酸(AzF)的VHH抗体(CD3-VHH,V-1)的表达

[1988] (12-1) 构建在pPK5载体中携带了AzFN3 DNA盒的质粒载体(pPK14e)

[1989] 已知在谷氨酸棒状杆菌的异源蛋白的分泌生产中,可在目标蛋白中位点特异性地引入叠氮苯丙氨酸(AzF)(W02023/282315)。

[1990] 参照W02023/282315,通过全合成获取了AzFN3 DNA盒(SEQ ID NO:43)。AzFN3 DNA盒包含叠氮苯丙氨酰tRNA合成酶(AzFRS)基因及其下游的ApaI位点,还包含在其下游可将F1启动子及其下游连接的UAG密码子翻译成叠氮苯丙氨酸(AzF)的抑制型tRNA(suppressor-tRNA)(tRNA<sub>CTA</sub>)基因,进一步在其下游包含rrnC终止子,并且在5'-末端包含

KpnI位点,在3'-末端包含XbaI位点。AzFRS是古细菌詹氏甲烷球菌(Methanococcus jannaschii)来源的修饰型酪氨酰tRNA合成酶,其具有Y32T/E107N/D158P/I159L/L162Q突变,被修饰为以叠氮苯丙氨酸为底物(J.AM.CHEM.SOC.2002,124,9026-9027)。将AzFRS基因的核苷酸序列和AzFRS的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45中。tRNA<sub>CTA</sub>是古细菌詹氏甲烷球菌来源的修饰型酪氨酰tRNA,其被修饰成具有对应于UAG(Amber,琥珀)的反密码子(CTA)。将tRNA<sub>CTA</sub>基因的核苷酸序列和该基因所编码的tRNA(Tyr)的核苷酸序列分别示于SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:47中。将该AzFN3 DNA盒引入至棒状杆菌型细菌中,在添加了叠氮苯丙氨酸的培养基中进行培养时,叠氮苯丙氨酸被棒状杆菌型细菌摄入,通过AzFRS结合于tRNA<sub>CTA</sub>的末端,生成叠氮苯丙氨酰tRNA。叠氮苯丙氨酰tRNA在蛋白翻译过程中与mRNA中的UAG密码子结合,UAG密码子被翻译成叠氮苯丙氨酸,合成在UAG密码子的位点引入了叠氮苯丙氨酸的蛋白。

[1991] 通过In-Fusion反应,将全合成的AzFN3 DNA盒(SEQ ID NO:43)整合到W02016/171224中记载的pPK5载体的KpnI-XbaI位点上,构建了整合有AzFN3 DNA盒的载体pPK14e。在In-Fusion反应中使用In-Fusion(注册商标)HD克隆试剂盒(Takara Bio),反应条件按照技术人员推荐的方案。插入片段的核苷酸序列确定的结果确认到:构建了符合设计的携带AzFN3 DNA盒的载体。核苷酸序列的确定使用BigDye(注册商标)Terminator v3.1循环测序试剂盒(Applied Biosystems)和3500xL基因分析仪(Applied Biosystems)来进行。

[1992] SEQ ID NO:43

[1993] ggtaccggagaccacaacggtttccctctagaataatTTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCA  
atggatgagttcgagatgatcaaacgtaacacttccgagatcatttccgaggaagaactgcgcaagtgccttaaga  
aagatgagaagtctgacgacgattggcttcgaaccatcaggggaagattcaccttggccactacttgcagatcaagaa  
gatgatcgacttgcagaatgctggcttcgacatcatcattctgctggcggatctgcatgcctacctcaatcagaag  
ggagaactggacgaaatccgcaagatcggcgactacaacaagaaagtcttgaagcaatgggtctgaaggcgaat  
acgtctatgggagcaacttccagcttgacaaagactacaccttgaacgtgtatcggcttgctctgaaaaccacact  
caaacgtgcacgccgatcgatggaactcatcgacgggaggacgagaatccgaaggttgctgaagtcatctatccc  
atcatgcaagttaaccgcttcattaccaaggagtggatggtgcagttgggtgatggaacagcgcaagattcaca  
tgttggcacgcaactgctgccgaagaaagtggtctgcatccacaatcccgtgctcactggtttgacgggtgaagg  
caagatgagctcctctaaaggcaactttatcgctgtcgatgattcgctgaagagattcgtgccaagattaagaag  
gcttactgtccagcgggagtagtggaggcaaccaatcatggagattgccaagtacttctggagatccattga  
ccatcaagcgtcctgagaagtttggcggtgatctcacgtaaacctctacgaggaactggaatccctcttcaagaa  
caaagagctgcaccaatggatctcaagaacgcagttgccgaggagctgatcaagatccttgagcctattcgcaaa  
cgctgtgaaggcccggcatggatgaactatacgatctactcgttactcaaggcaagctcgagcgggacggctgaa  
ccagcttcaagcagccgatgagtagttacagtagatagcgacgggtctcatagtaaagtagtaggagcgcaccaa  
acgaggtgccccgccttagttcagcagggcagaacggcgactctaaatccgcatggcacgggttcaaatcccc  
taggcgggaccactgcagatccttagcgaagctaaggatTTTTTTTTGATATCTCTAGA

[1994] SEQ ID NO:44

[1995] atggatgagttcgagatgatcaaacgtaacacttccgagatcatttccgaggaagaactgcgcaagt  
gcttaagaaagatgagaagtctgacgacgattggcttcgaaccatcaggggaagattcaccttggccactacttgcag  
atcaagaagatgatcgacttgcagaatgctggcttcgacatcatcattctgctggcggatctgcatgcctacctca

atcagaagggagaactggacgaaatccgcaagatcggcgactacaacaagaaagtccttgaagcaatgggtctgaa  
 ggcgaaatacgtctatgggagcaacttccagcttgacaaagactacacctgacgtgtatcggttgctctgaaa  
 accacactcaaactgcacgccgatcgtggaactcatcgacgggaggacgagaatccgaaggttgctgaagtca  
 tctatcccatcatgcaagttaaccgcttcattaccaaggagtggatggtgcagttggtggtatggaacagcgcaa  
 gattcacatggtggcagcggaactgctgccgaagaaagtggctgcatccacaatcccgtgctcactggtttgac  
 ggtgaaggcaagatgagctcctctaaaggcaactttatcgctgctgatgattcgctgaagagattcgtgccaaga  
 ttaagaaggcttactgtccagcgggagtagtggaaggcaaccaatcatggagattgccaagtacttctggagta  
 tccattgaccatcaagcgtcctgagaagtttggcgggtgatctcaccgtaaactcctacgaggaactggaatccctc  
 ttcaagaacaaagagctgcaccaatggatctcaagaacgcagttgccgaggagctgatcaagatccttgagccta  
 ttcgcaaacgcctgtaa

[1996] SEQ ID NO:45

[1997] MDEFEMIKRNTSEIISEEELREVLKKDEKSATIGFEPGSKIHLGHYLQIKKMIDLQNAGFDIIILLADL  
 HAYLNQKGELDEIRKIGDYNKKVFEAMGLKAKYVYGSNFQLDKDYTLNVYRLALKTTLKRARRSMELIAREDENPKV  
 AEVIYPIMQVNPLHYQGVDVAVGGMEQRKIHMLARELLPKKVVCIHNPVLTGLDGEGKMSSSKGNFIAVDDSPPEIR  
 AKIKKAYCPAGVVEGNPIMEIAKYFLEYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYEELESFLKNKELHPMDLKNVAEELIKILE  
 PIRKRL

[1998] SEQ ID NO:46

[1999] cccgccttagttcagcagggcagaacggcggactcctaaatccgcatggcaggggttcaaatcccgtag  
 gcgggacca

[2000] SEQ ID NO:47

[2001] cccgccuuaguucagcagggcagaacggcggacucuaaaauccgcauggcaggggucaaaucgggag  
 gcgggacca

[2002] pPK14e载体可用作引入AzF的蛋白表达的基础载体。即,通过利用pPK14e的ApaI位  
 点对目标蛋白的表达盒进行亚克隆,使AzFN3 DNA盒(叠氮苯丙氨酰tRNA合成酶(AzFRS)基  
 因和可将UAG密码子翻译成叠氮苯丙氨酸(AzF)的抑制型tRNA( $tRNA_{CTA}$ )基因)和引入AzF的  
 蛋白的表达盒可在1个质粒中同时表达。

[2003] (12-2) 构建CD3-VHH-PA24H6-WT和CD3-VHH-PA24H6-AzF的各分泌表达质粒

[2004] 作为引入叠氮苯丙氨酸的VHH抗体,使用了W02015/095412中记载的抗CD3-VHH抗  
 体(CD3-VHH)。为了在不修饰CD3-VHH序列内部的情况下引入叠氮苯丙氨酸,设计了在CD3-  
 VHH的C末端添加了PA24接头和6xHis标签的修饰型CD3-VHH(CD3-VHH-PA24H6-WT)。另外,为  
 了在CD3-VHH-PA24H6-WT的PA24接头内(141-142位之间)引入AzF而设计了突变型CD3-VHH-  
 PA24H6(CD3-VHH-PA24H6-AzF)。将所设计的CD3-VHH-PA24H6-WT和CD3-VHH-PA24H6-AzF的  
 氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49中。

[2005] CD3-VHH-PA24H6-WT的氨基酸序列

[2006] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSNYHMGWFRQAPGKERELVAAISGSGGSTYYTDSVKGRF  
 TISRNNAKNTMSLQMSNLKPEDTGYYCTTPTEKSSIDYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYAAPAAPAAPAAPA  
 PAAPAAPAPHHHHH(SEQ ID NO:48)

[2007] CD3-VHH-PA24H6-AzF的氨基酸序列

[2008] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSNYHMGWFRQAPGKERELVAAISGSGGSTYYTDSVKGRF

TISRNNAKNTMSLQMSNLKPEDTGVYYCTTPTEKGSSIDYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYAAPAAPAPAPAFAP  
APAAPAAPAPHHHHHHH (SEQ ID NO:49;142位的F被叠氮化)

[2009] 考虑谷氨酸棒状杆菌的密码子使用频率,设计了编码这些多肽的核苷酸序列。而且,为了可通过谷氨酸棒状杆菌进行分泌表达,分别设计了以下的表达盒。

[2010] CD3-VHH-PA24H6-WT作为停滞棒状杆菌 (*Corynebacterium stationis*) 来源的CspA的信号肽25个氨基酸残基和CD3-VHH-PA24H6-WT的融合蛋白(以下,表述为“CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT”)而分泌表达。将编码所设计的CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51中。

[2011] SEQ ID NO:50

[2012] atgaaacgcatgaaatcgctggctgcgccgctcaccgtcgctggggccatgctggccgcacctgtggc  
aacggcacaggtacagctacaggaatccggaggcggtctttgtacaggcaggaggcagtttgctctgtcctgtgct  
gcgtctggctcgctacgttctccaactatacatgggggtggtttcgccaagcaccaggcaagaacgcgagttggttg  
ccgccattagcgggtctggaggaagcacgtactacaccgatagcgtcaaaggccgtttcacgatcagccgcaataa  
cgctaagaacacccatgtctctgcagatgtcgaacctcaagcctgaagacactggcgtgtactactgcactacacct  
accgagaaaggttctcgcgatcgactattgggggtcaaggcactcaagtcaccgtctcgagtgggaggtatccctatg  
atgtgccggattatgctgcacccgcagcaccgcgccagcagcgcagctgcgcctgctccagcagcaccagccgc  
tctgctccgcaccatcaccaccatacactaa

[2013] SEQ ID NO:51

[2014] MKRMKSLAAALTVAGAMLAAPVATAQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSAAASGRFTFSNYHMGWFRQAPGKE  
RELVAALISGSGGSTYYTDSVKGRFTISRNNAKNTMSLQMSNLKPEDTGVYYCTTPTEKGSSIDYWGQGTQVTVSSGR  
YPYDVPDYAAPAAPAPAPAPAPAPAPAPAPHHHHHHH

[2015] CD3-VHH-PA24H6-AzF作为停滞棒状杆菌来源的CspA的信号肽25个氨基酸残基和  
CD3-VHH-PA24H6-AzF的融合蛋白(以下,表述为“CspAss-CD3-VHH-PA24H6-琥珀”)而分泌表  
达。具体而言,CspAss-CD3-VHH-PA24H6-琥珀基因包含插入与UAG密码子(琥珀)对应的TAG  
三联体,所述UAG密码子是在CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT基因的核苷酸序列中的终止密  
码子之一,该TAG三联体可翻译成AzF。将编码所设计的CspAss-CD3-VHH-PA24H6-琥珀的核  
苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53中。

[2016] SEQ ID NO:52

[2017] atgaaacgcatgaaatcgctggctgcgccgctcaccgtcgctggggccatgctggccgcacctgtggc  
aacggcacaggtacagctacaggaatccggaggcggtctttgtacaggcaggaggcagtttgctctgtcctgtgct  
gcgtctggctcgctacgttctccaactatacatgggggtggtttcgccaagcaccaggcaagaacgcgagttggttg  
ccgccattagcgggtctggaggaagcacgtactacaccgatagcgtcaaaggccgtttcacgatcagccgcaataa  
cgctaagaacacccatgtctctgcagatgtcgaacctcaagcctgaagacactggcgtgtactactgcactacacct  
accgagaaaggttctcgcgatcgactattgggggtcaaggcactcaagtcaccgtctcgagtgggaggtatccctatg  
atgtgccggattatgctgcacccgcagcaccgcgccagcagcgcagctTAGgcgcctgctccagcagcaccagc  
cgctctgctccgcaccatcaccaccatacactaa

[2018] SEQ ID NO:53 (167位的F被叠氮化)

[2019] MKRMKSLAAALTVAGAMLAAPVATAQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSAAASGRFTFSNYHMGWFRQAPGKE  
RELVAALISGSGGSTYYTDSVKGRFTISRNNAKNTMSLQMSNLKPEDTGVYYCTTPTEKGSSIDYWGQGTQVTVSSGR

YPYDVPDYAAPAAPAPAFAPAPAAPAAPHHHHHH

[2020] 分别设计并全合成了在CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT和CspAss-CD3-VHH-PA24H6-琥珀中记载的核苷酸序列的上游连接谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的cspB基因的启动子、并且在5'-侧和3'-侧添加了ApaI位点的野生型和突变型的CD3-VHH-PA24H6表达盒。通过将全合成的DNA片段(CD3-VHH-PA24H6的表达盒)插入至实施例(12-1)中构建的pPK14e载体的ApaI位点,分别构建了作为野生型和突变型的CD3-VHH-PA24H6的分泌表达质粒的pPK14e\_CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT和pPK14e\_CspAss-CD3-VHH-PA24H6-琥珀。插入片段的核苷酸序列确定的结果确认到:分别构建了符合设计的携带CD3-VHH-PA24H6+AzFN3的载体。

[2021] (12-3)引入了叠氮苯丙氨酸的CD3-VHH-PA24H6(CD3-VHH-PA24H6-AzF,V-1)在谷氨酸棒状杆菌中的分泌表达

[2022] 使用上述构建的作为CD3-VHH-PA24H6-琥珀+AzFN3表达载体的pPK14e\_CspAss-CD3-VHH-PA24H6-琥珀,转化谷氨酸棒状杆菌YDK0107株,得到了CD3-VHH-PA24H6-琥珀表达株。作为对照,使用作为CD3-VHH-PA24H6-WT+AzFN3表达载体的pPK14e\_CspAss-CD3-VHH-PA24H6-WT,转化谷氨酸棒状杆菌YDK0107株,得到了CD3-VHH-PA24H6-WT表达株。

[2023] 在包含0.3mM叠氮苯丙氨酸和25mg/L卡那霉素的MMTG液体培养基中,将所得的各转化体分别在25℃下培养120小时。培养结束后,使用NuPAGE(注册商标)12%Bis-Tris Gel(Thermo Fisher Scientific),将1.0μL离心分离各培养液而得到的培养上清供于还原SDS-PAGE,然后用Quick-CBB(Wako)进行染色。

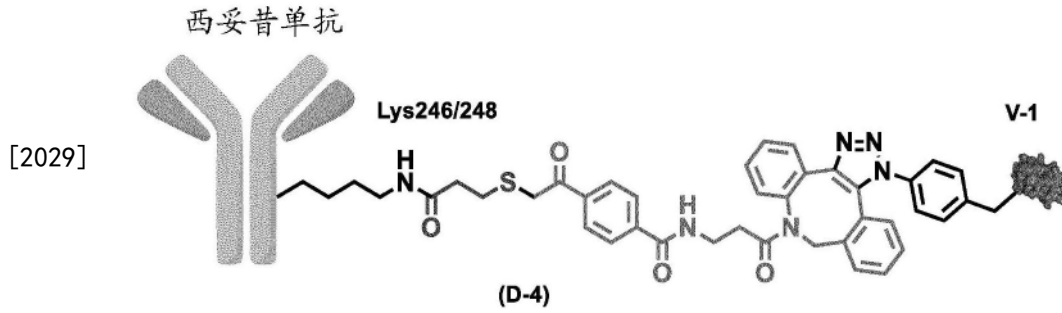
[2024] 其结果,在CD3-VHH-PA24H6-WT表达株的培养上清中,无论是否存在叠氮苯丙氨酸,均分别检测到推测为CD3-VHH-PA24H6-WT的蛋白条带(图25,泳道4-5)。另外,在CD3-VHH-PA24H6-琥珀表达株的培养上清中,在不存在叠氮苯丙氨酸的情况下,主要检测到比CD3-VHH-PA24H6-WT更小分子侧的蛋白条带,因此推测主要分泌在PA24接头内的琥珀密码子位点(142位)翻译结束的蛋白条带(图25,泳道6),另一方面,在叠氮苯丙氨酸的存在下,主要检测到与CD3-VHH-PA24H6-WT相同位置的蛋白条带,因此推测在PA24接头内的琥珀密码子位点(142位)翻译未结束,而是表达了引入了叠氮苯丙氨酸的全长CD3-VHH-PA24H6-AzF(图25,泳道7)。

[2025] (12-4)CD3-VHH-PA24H6-AzF(V-1)的纯化

[2026] 使用0.2μm的PVDF膜过滤器,将实施例(12-3)中得到的CD3-VHH-PA24H6-AzF表达株培养液的离心上清进行无菌过滤。为了去除培养液中的夹杂物成分和未引入AzF的类似物,通过利用了C末端的6xHis-标签的亲和柱,将所表达的CD3-VHH-PA24H6-AzF纯化。添加6xHis-标签的蛋白的纯化使用Ni-NTA Spin Kin(QIAGEN),纯化条件按照技术人员推荐的方案。

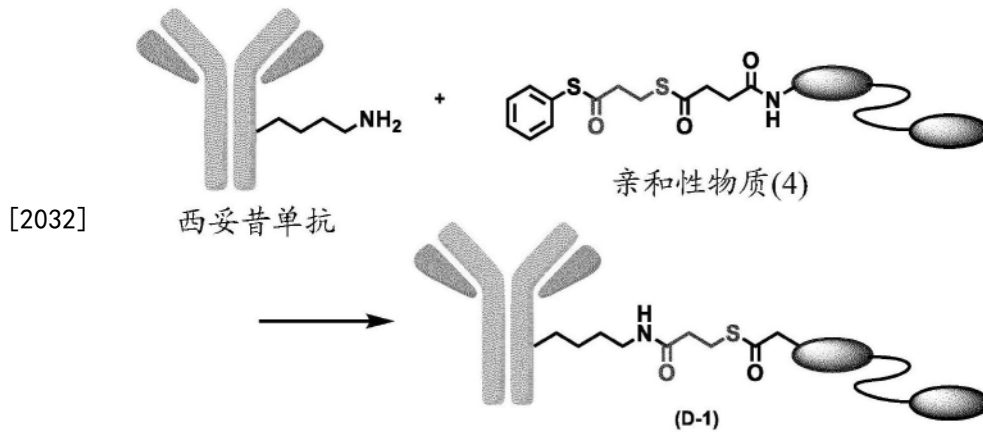
[2027] (实施例13)合成结合了1分子VHH(V-1)的西妥昔单抗(D-4)

[2028] [化学式106]



[2030] (13-1) 使用亲和性试剂(4)修饰西妥昔单抗(D-1)

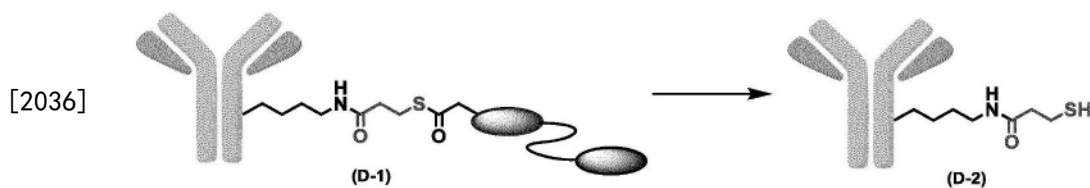
[2031] [化学式107]



[2033] 向抗人EGFR单克隆抗体西妥昔单抗(Merck BioPharma)的乙酸缓冲液(50mM乙酸钠, pH5.5)溶液中加入实施例3中合成的亲和性试剂(4)的DMF溶液(相对于抗体为5当量), 振荡1小时。使用NAP-25脱盐柱(Cytiva公司制造)纯化反应溶液, 获取了结合了1分子亲和性试剂(4)的西妥昔单抗(D-1)。依据已有报道(Anal.Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)进行HIC-HPLC分析, 确认到在西妥昔单抗上结合了1分子亲和性试剂(4)。

[2034] (13-2) 合成具有一分子硫醇基的西妥昔单抗(D-2)

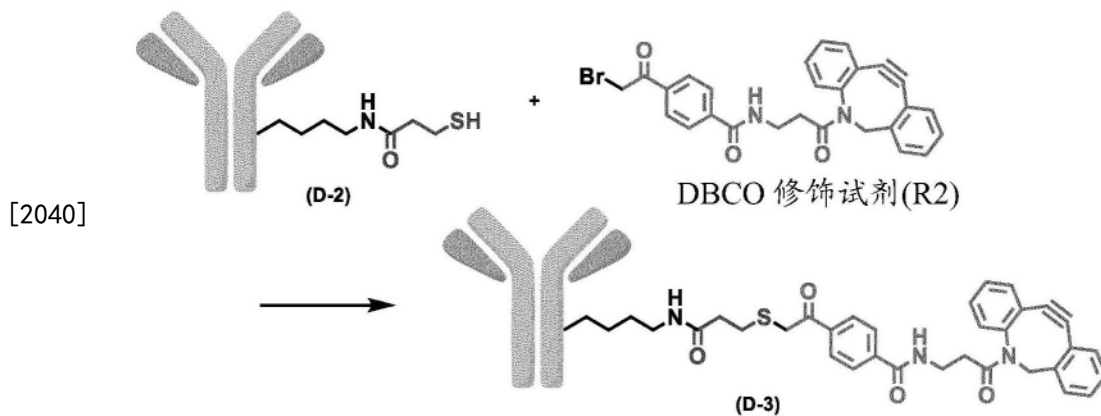
[2035] [化学式108]



[2037] 接下来, 依据实施例(4-3), 加入羟胺溶液, 在室温下振荡1小时, 由此得到了引入硫醇基的抗体(D-2)。依据已有报道(Anal.Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732)进行HIC-HPLC分析, 确认到引入了1分子硫醇基。

[2038] (13-3) 合成具有一分子DBCO基的西妥昔单抗(D-3)

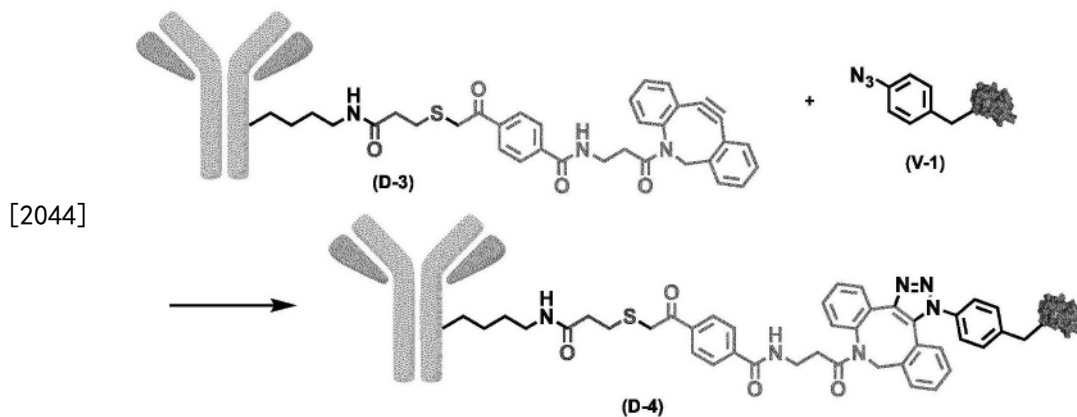
[2039] [化学式109]



[2041] 使用实施例13-2中合成的引入了1分子硫醇基的西妥昔单抗(D-2)和W02022154127记载的DBCO基试剂(R2),依据W02022154127中记载的方法,获取了引入了1分子DBCO基的抗体(D-3)。依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到在西妥昔单抗上结合了1分子DBCO基。

[2042] (13-4)合成结合了一分子VHH(V-1)的西妥昔单抗(D-4)

[2043] [化学式110]



[2045] 向实施例(13-3)中合成的结合了一分子DBCO基的西妥昔单抗(D-3)的乙酸缓冲液(50mM乙酸钠,pH5.5)溶液中加入实施例Z中合成的引入叠氮苯丙氨酸的VHH(相对于抗体为3当量),振荡20小时。通过使用AKTA pure25(Cytiva公司制造)纯化反应溶液,获取了结合了一分子VHH的抗体(D-4)。依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在170492处观测到峰。

[2046] 通过AKTA pure25(Cytiva公司制造)的纯化在下述条件下进行。

[2047] 柱:Superdex200 Increase 10/300GL(Cytiva公司制造)

[2048] 洗脱液:PBS缓冲液(10mM磷酸缓冲盐水(PBS),pH7.4)

[2049] 流速:0.6ml/分钟

[2050] 检测器:在215nm和280nm的波长下检测。

[2051] (13-5)通过表面等离子体(SPR)法评价结合了一分子VHH(V-1)的西妥昔单抗(D-4)的亲合性

[2052] 对于实施例(13-4)中合成的结合了一分子VHH(V-1)的西妥昔单抗(D-4)与抗原(EGFR,CD3)的结合常数,通过使用Biacore T200(Cytiva)的SPR分析进行定量。

[2053] 使用生物素标记试剂盒(Dojindo)将重组人EGFR-Fc(R&DSystems)进行生物素化,

使用生物素捕获试剂盒 (Cytiva), 将其固定在传感器芯片上。使用生物素化重组人CD3 $\epsilon$ / $\delta$ -Fc (ACROBiosystems), 使用生物素捕获试剂盒 (Cytiva), 将CD3固定在传感器芯片上。对于针对抗原的亲水性评价的运行缓冲液, 使用了HBS-EP+缓冲液 (Cytiva)。

[2054] 关于结合了一分子VHH (V-1) 的西妥昔单抗 (D-4) 与各抗原的结合, 分别以5个浓度点添加, 通过单循环动力学法进行评价。对于所得的传感图, 以1:1结合模型进行拟合, 计算出结合常数。

[2055] 如比较例2中所示, 西妥昔单抗以解离常数为 $K_D=610\text{pM}$ 与抗原EGFR结合。

[2056] 将CD3-VHH (V-1) 的亲水性评价结果的传感图示于图26中。明确了CD3-VHH (V-1) 与CD3 $\epsilon$ / $\delta$ 结合, 解离常数为 $K_D=7.6\text{nM}$ 。

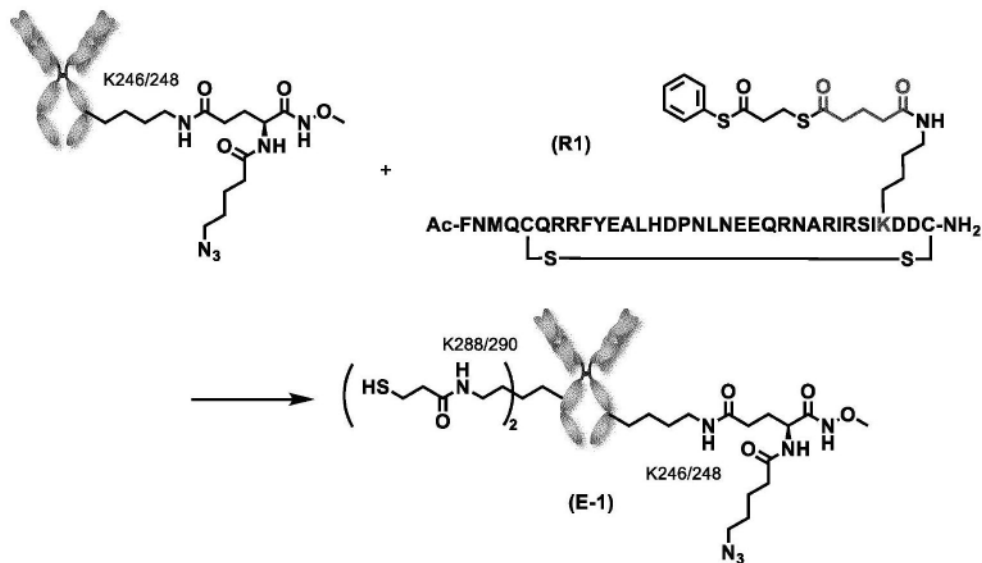
[2057] 将结合了一分子VHH (V-1) 的西妥昔单抗 (D-4) 的亲水性评价结果的传感图示于图27中。明确了 (D-4) 与亲本抗体西妥昔单抗的抗原EGFR结合, 解离常数为 $K_D=630\text{pM}$ 。另外, 明确了CD3-VHH (V-1) 还与抗原CD3 $\epsilon$ / $\delta$ 结合, 解离常数为 $K_D=13\text{nM}$ 。

[2058] 由这些结果明确了: 结合了一分子VHH (V-1) 的西妥昔单抗 (D-4) 是可与EGFR和CD3结合的双特异性抗体, 而不会损害作为各自结合分子的抗体和VHH的结合亲水性。

[2059] (实施例14)

[2060] (14-1) 合成使2分子硫醇基与抗体的Lys288/290结合的曲妥珠单抗 (E-1)

[2061] [化学式111]

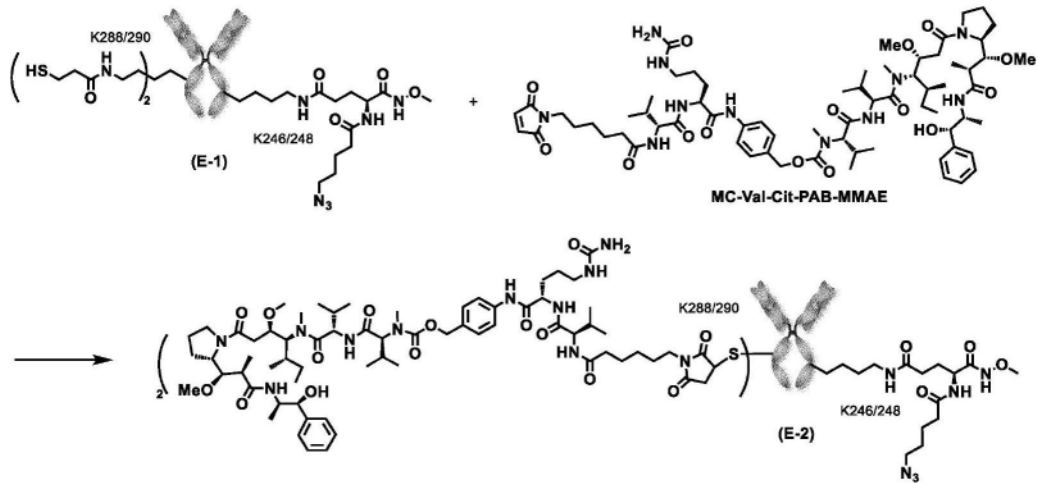


[2062]

[2063] 使用实施例 (6-4) 中合成的引入了1分子叠氮基的曲妥珠单抗和已有报道 (W02022/154116A1) 记载的肽试剂 (R1), 依据已有报道 (W02022/154116A1) 记载的方法, 获取了引入了2分子硫醇基的抗体 (E-1)。依据已有报道 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) 进行HIC-HPLC分析, 确认到引入了1分子叠氮基和2分子硫醇基。

[2064] (14-2) 合成DAR2的ADC (E-2)

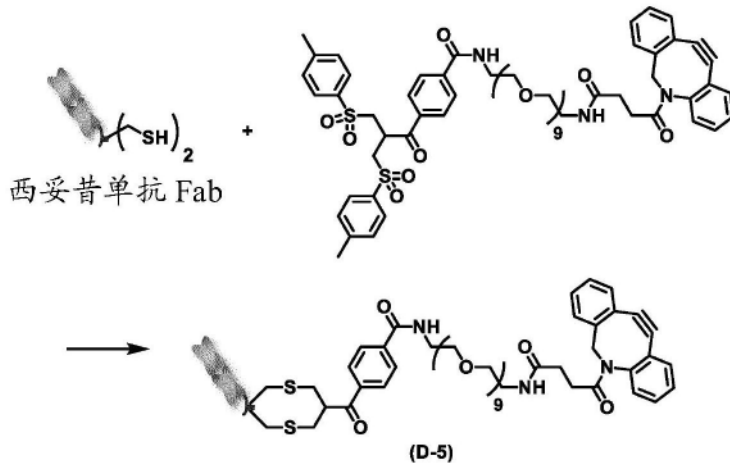
[2065] [化学式112]



[2067] 使用实施例14-1中得到的具有1分子叠氮基和2分子硫醇基的抗体 (E-1) 和作为已知物的MC-Val-Cit-PABA-MMAE (Organic&Biomolecular Chemistry, 2016, 14, 9501-9518), 获取了引入了2分子Val-Cit-PABA-MMAE的抗体 (E-2)。依据已有报道 (WO2019/240287A1) 进行HIC-HPLC分析, 确认到引入了2分子Val-Cit-PABA-MMAE。

[2068] (14-3) 合成具有DBCO基的西妥昔单抗的Fab (D-5)

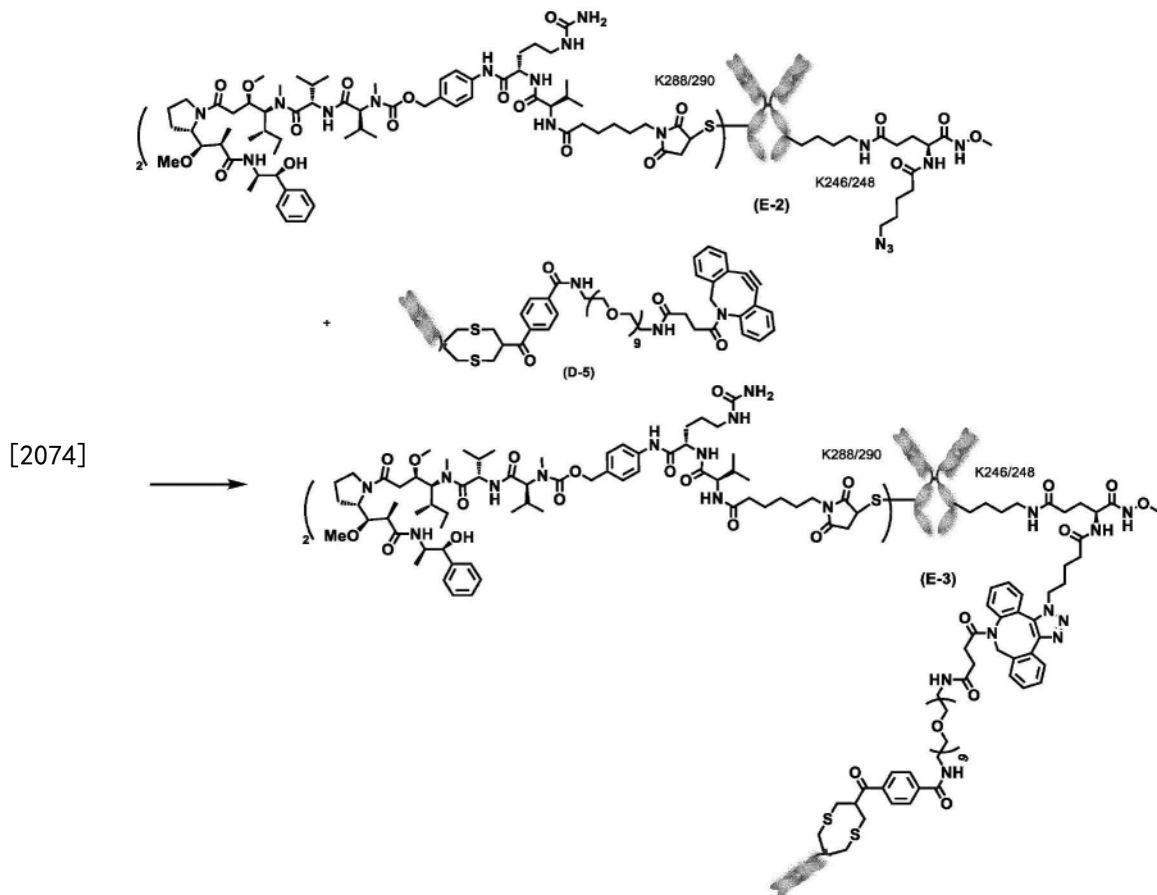
[2069] [化学式113]



[2071] 向实施例 (8-1-2) 中合成的西妥昔单抗的Fab的PBSE缓冲液 (10mM磷酸缓冲盐水 (PBS), 10mM EDTA, pH7.4) 溶液中添加市售的Bis-Sulfone-PEG9-DBCO (Broadpharma公司) 的二甲基甲酰胺溶液 (相对于Fab为3当量, 二甲基甲酰胺 (DMF) (8% v/v) 溶液), 振荡2小时。使用NAP-25脱盐柱 (Cytiva公司制造) 纯化反应溶液, 合成了引入了DBCO基的西妥昔单抗的Fab (D-5)。分析是依据已有报道 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) 进行ESI-TOFMS分析, 在51706处观测到峰。

[2072] (14-4) 合成结合了一分子西妥昔单抗的Fab的DAR2的ADC (E-3)

[2073] [化学式114]



[2075] 向实施例(14-2)中合成的具有1分子叠氮基的DAR2的ADC (E-2) 的乙酸缓冲液(50mM乙酸钠,pH5.5)溶液中添加实施例(B-3)中合成的具有DBC0基的西妥昔单抗的Fab的乙酸缓冲液(50mM乙酸钠,pH5.5)溶液(相对于抗体为3当量),振荡40小时。通过使用AKTA pure25(Cytiva公司制造)纯化反应溶液,获取了结合了1分子Fab的ADC (E-3)。依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行ESI-TOFMS分析,在203036处观测到峰。

[2076] 通过AKTA pure25(Cytiva公司制造)的纯化在下述条件下进行。

[2077] 柱:Superdex200 Increase 10/300GL(Cytiva公司制造)

[2078] 洗脱液:PBS缓冲液(10mM磷酸缓冲盐水(PBS),pH7.4)

[2079] 流速:0.6ml/分钟

[2080] 检测器:在215nm和280nm的波长下检测。

[2081] 实施例15:亲和性物质的设计及其在谷氨酸棒状杆菌中的分泌表达

[2082] (15-1)亲和性物质的设计概要

[2083] 在本发明中,需要设计亲和性物质,使其在分子内包含2处以上可与抗体结合的位点。即,亲和性物质需要设计成:

[2084] A) 2个以上可与抗体结合的位点经由接头连接而成的分子,所述接头用于连接所述可与抗体结合的位点。

[2085] 另外,在本发明中,需要使接头与亲和性物质结合。即,为了达成接头与亲和性物质中的特定位点的特异性结合,需要设计成在亲和性物质中仅存在一个可与接头反应的位点。

[2086] 在将亲和性物质作为多肽并使接头与多肽的K(赖氨酸)的氨基结合的情况下,需



QET-Fc3K-PAS60-Fc3R、QET-Fc3K-PAS64-Fc3R、QET-Fc3K-PAS68-Fc3R和QET-Fc3K-PAS80-Fc3R的6种氨基酸序列,并考虑谷氨酸棒状杆菌的密码子使用频率,设计了编码这些多肽的核苷酸序列。而且,为了可通过谷氨酸棒状杆菌进行分泌表达,分别设计了以下的表达盒。

[2110] QET-Fc3K-PA48G-Fc3R作为谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的CspB的信号肽30个氨基酸残基、同株来源的CspB成熟蛋白的N末端3个氨基酸残基QET和Fc3K-PA48G-Fc3R的融合蛋白(以下,表述为“CspBss-QET-Fc3KR-PA48G”)而分泌表达。将编码所设计的CspBss-QET-Fc3KR-PA48G的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61中。

[2111] 编码CspBss-QET-Fc3KR-PA48G的核苷酸序列

[2112] atgtttaacaaccgatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccgpcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccgctggcaattgcgcctatcacaagggtcagatcatttggtgcaccaccatggtggtggagggttctggtggtgccgccccggctgcaccagcgccagcgccccagcggtctctgcaccgctgctccagctgcgccagctcctgcagctcccgcagcaccggcgctgcagcaccagcgccaccagcaccggcgctccggcgccccctgccccggcggtctccggggaggcgccagcgaggacgcggtaactgcgcataccatcgcgggcacaattatctggtgcacttatacactaa (SEQ ID NO:60)

[2113] CspBss-QET-Fc3KR-PA48G的氨基酸序列

[2114] MFNNRIRTAALAGAI A I STAASGVAIPAF AQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGGSGGAAPAAPAPAAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPAAPAPGGSGGGSGGRGNCA YHRGQIIWCTYH (SEQ ID NO:61)

[2115] QET-Fc3K-PAS56-Fc3R作为谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的CspB的信号肽30个氨基酸残基、同株来源的CspB成熟蛋白的N末端3个氨基酸残基QET和Fc3K-PAS56-Fc3R的融合蛋白(以下,表述为“CspBss-QET-Fc3KR-PAS56”)而分泌表达。将编码所设计的CspBss-QET-Fc3KR-PAS56的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63中。

[2116] 编码CspBss-QET-Fc3KR-PAS56的核苷酸序列

[2117] atgtttaacaaccgatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccgpcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccgctggcaattgcgcctatcacaagggtcagatcatttggtgcaccaccatggtggtggtgccgctccagcatccccagccccggccgcacctgcaagccctgctcccgtgctccggcttcaccagcgccagcagcaccctgcctctcccgtcctgcggcaccagcgagtcctgcgccagccgctccggcatcgcccgccaccagcggtccggctccccggccccggcgaggacgcggtaactgcgcataccatcgcgggccaaattatctggtgcacttatacactaa (SEQ ID NO:62)

[2118] CspBss-QET-Fc3KR-PAS56的氨基酸序列

[2119] MFNNRIRTAALAGAI A I STAASGVAIPAF AQETRGNCAYHKGQIIWCTYHGGGAAPASPAPAAPASPAAPASPAPAAPASPAPAAPASPAPAAPASPAPGGGRGNCA YHRGQIIWCTYH (SEQ ID NO:63)

[2120] QET-Fc3K-PAS60-Fc3R作为谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的CspB的信号肽30个氨基酸残基、同株来源的CspB成熟蛋白的N末端3个氨基酸残基QET和Fc3K-PAS60-Fc3R的融合蛋白(以下,表述为“CspBss-QET-Fc3KR-PAS60”)而分泌表达。将编码所设计的CspBss-QET-Fc3KR-PAS60的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65中。

[2121] 编码CspBss-QET-Fc3KR-PAS60的核苷酸序列

[2122] atgtttaacaaccgatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccgpcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccgctggcaattgcgcctatcacaagggtcagatcatttggtgcacc



融合蛋白(以下,表述为“CspBss-QET-Fc3KR-PAS80”)而分泌表达。将编码所设计的CspBss-QET-Fc3KR-PAS80的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71中。

[2136] 编码CspBss-QET-Fc3KR-PAS80的核苷酸序列

[2137] atgtttaacaaccgtatccgcactgcagctctcgctggtgcaatcgcaatctccaccgcagcttccggcgtagctatcccagcattcgctcaggagaccctggcaattgctgcctatcacaagggtcagatcatttggtgcaccaccatggtggtgccccgtcctccccatccccatctgcccccttcgagcccatcccctgcatcaccctcctcggtctctcctcaccctctccatccgcgccatctagcccatctccagcctcccccttcttccgctccttcatctccttcgccctccgcacccagctccccaagcctgcgtccccgtctagcgcaccgtcgtcgccgtccccatccgcaccgtcatcccgtcaccagctagccccctcctccggaggacgcggtaactgcgcataccatcgcgggccaaattatctggtgcactt atcactaa (SEQ ID NO:70)

[2138] CspBss-QET-Fc3KR-PAS80的氨基酸序列

[2139] MFNNRIRTAALAGAIISTAASGVAIPAF AQETRGNCA YHKGQIIWCTYHGGAPSSSPSPAPSSPSPA SPSSAPSSPSAPSSPSAPSSAPSSPSAPSSPSAPSSPSAPSSPSAPSSPSAPSSGGRGNCA YHRGQ IIWCTYH (SEQ ID NO:71)

[2140] 设计并全合成了在CspBss-QET-Fc3KR-PA48G、CspBss-QET-Fc3KR-PAS56、CspBss-QET-Fc3KR-PAS60、CspBss-QET-Fc3KR-PAS64、CspBss-QET-Fc3KR-PAS68和CspBss-QET-Fc3KR-PAS80中记载的核苷酸序列的上游连接谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株来源的cspB基因的启动子、并且在5' -侧添加KpnI位点、在3' -侧添加BamHI位点的6种亲和性多肽的表达盒。通过将全合成的DNA片段(亲和性多肽的表达盒)插入至日本特开平9-322774中记载的pPK4的KpnI-BamHI位点,分别构建了作为亲和性多肽的分泌表达质粒的pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G、pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56、pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60、pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64、pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68和pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80。插入片段的核苷酸序列确定的结果确认到:分别构建了符合设计的亲和性多肽的表达盒。核苷酸序列的确定使用BigDye (R) Terminator v3.1循环测序试剂盒(Applied Biosystems)和3500xL基因分析仪(Applied Biosystems)来进行。

[2141] (15-5)亲和性多肽在谷氨酸棒状杆菌中的分泌表达

[2142] 使用实施例(15-4)中构建的pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G、pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56、pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60、pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64、pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68和pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80,转化W02016/171224中记载的谷氨酸棒状杆菌YDK0107株,得到了YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G株、YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56株、YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60株、YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64株、YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68株和YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80株。

[2143] 同样地,使用各质粒转化后述的(参考例1)中构建的YDK0107  $\Delta$  pmt1株,得到了YDK0107  $\Delta$  pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G株、YDK0107  $\Delta$  pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56株、YDK0107  $\Delta$  pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60株、YDK0107  $\Delta$  pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64株、YDK0107  $\Delta$  pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68株和YDK0107  $\Delta$  pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80株。

[2144] 在包含25mg/L卡那霉素的MMTG液体培养基中,将所得的各转化体分别在30°C下培

养72小时。

[2145] 培养结束后,使用NuPAGE(注册商标)12%Bis-Tris Gel(Thermo Fisher Scientific),将6.5 $\mu$ L离心分离各培养液而得到的培养上清供于还原SDS-PAGE后,用Quick-CBB(Wako)进行染色。其结果,分别检测到:在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G株和YDK0107  $\Delta$  pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G株的培养上清中推测为QET-Fc3KR-PA48G的多肽条带(图28,泳道3-4),在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56株和YDK0107  $\Delta$  pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56株的培养上清中推测为QET-Fc3KR-PAS56的多肽条带(图28,泳道5-6),在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60株和YDK0107  $\Delta$  pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60株的培养上清中推测为QET-Fc3KR-PAS60的多肽条带(图28,泳道7-8),在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64株和YDK0107  $\Delta$  pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64株的培养上清中推测为QET-Fc3KR-PAS64的多肽条带(图28,泳道9-10),在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68株和YDK0107  $\Delta$  pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68株的培养上清中推测为QET-Fc3KR-PAS68的多肽条带(图28,泳道11-12),在YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80株和YDK0107  $\Delta$  pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80株的培养上清中推测为QET-Fc3KR-PAS80的多肽条带(图28,泳道13-14)。

[2146] 在以YDK0107株为宿主表达QET-Fc3KR-PAS56、QET-Fc3KR-PAS60、QET-Fc3KR-PAS64、QET-Fc3KR-PAS68和QET-Fc3KR-PAS80的多肽时,检测到拖尾状的条带,表明在PAS接头中的Ser残基上产生了O-型糖链修饰(图28,泳道5、7、9、11、13)。

[2147] 另一方面,在以YDK0107  $\Delta$  pmt1株为宿主表达这些多肽时,检测到锐化的条带,因此表明O-型糖链修饰被消除(图28,泳道6、8、10、12、14)。

[2148] (参考例1)构建使O-甘露糖基转移酶基因pmt1缺失的谷氨酸棒状杆菌

[2149] (1)构建pmt1基因缺失用载体pBS5T  $\Delta$  pmt1

[2150] 已知在以谷氨酸棒状杆菌为宿主而表达的分泌蛋白中产生O-型糖链修饰,以及由于蛋白O-甘露糖基转移酶PMT1的缺失,可导致分泌蛋白的O-型糖链修饰能力丧失(Martina Mahne等人,The *Corynebacterium glutamicum* gene pmt encoding a glycosyltransferase related to eukaryotic protein-O-mannosyltransferases is essential for glycosylation of the resuscitation promoting factor(Rpf2)and other secreted proteins.FEMS Microbiol Lett.2006Jun;259(2):226-33.)。

[2151] 另外,已知在以谷氨酸棒状杆菌YDK0107株为宿主而分泌表达脯氨酸/丙氨酸/丝氨酸(PAS)生物聚合物时,在PAS序列中的Ser残基上产生O-型糖链修饰,以及通过以缺失PMT1基因的YDK0107  $\Delta$  pmt1株为宿主,可消除O-型糖链修饰(L.Friedrichl等人,Efficient secretory production of proline/alanine/serine(PAS)biopolymers in *Corynebacterium glutamicum* yielding a monodisperse biological alternative to polyethylene glycol(PEG).Microb Cell Fact.2022Oct 28;21(1):227)。

[2152] 谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株的基因组序列和编码蛋白O-甘露糖基转移酶PMT1的pmt1基因的核苷酸序列已经被确定(GenBank Accession No.AP017557,NCBI locus\_tag CGBL\_0109730)。将谷氨酸棒状杆菌ATCC13869株的pmt1基因的核苷酸序列和该基因所编码的PMT1的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73中。

[2153] SEQ ID NO:72

[2154] gtgagccaagccctacctgttcgtgaccagggcgggaccaggggattttcgtggtactctcccgcc  
cgcaccgccaagttcaagtgacccegcctggatacctatacctgggcgatcatcgcggtgtttgctttagtcacg  
cgttttacaggtttgagcagtgcaaccgcctcaggcaccacagttttgatgaaaaactacgtcccacaagcct  
gggacatggtccgctcctggatcaacccatcaccggcggcattgaatccaaccccgatacggactcgctcgttca  
cccaccgttggccaacaacttgaagcactcggatgaatgggtcttcggatacaccctcggctggcgcacatg  
gtcgccattttcggaacactcaccattttcgccatcatggcaatcgacggcgccctcagcggatccaccattgtga  
ctttcatcgccgaattctcgcgcttggcagggcgtcctcctcgtctcatcacgcttcggcatgctggacatctt  
ccttgttttcttcatcaccgcagcagcatgggcattgatccgagatcaccaacaaatgcaccaacgcctcaacgat  
ttactctcaccaacggccaaatcaccaaagactttggccccgattcggcttcgatggtggcggtttcaccacag  
gtgtattccttggctcgcgctctcgtcaaatggctccggactgtactacatcgattcttcggcctgaccagcgt  
gttcttagacttggctgcgcaaacgctacggcgtccgacgctacgtcaccggcaccctaaaaatgacgtcacc  
ccagcgtcggctccttggatcaccctgcctgctttatatctggagctggcgagcctggttcgctccgaaa  
cctcgtctaccgccacgcaaaacagacggcaccatcacagaagactccatcctgcagctcttcctgaaatcaat  
tgccggctggatccactatcacatcagcgtcctggaattccacggctcactgaccacatcctcaggtcacagccac  
cctgggattccaagcctgggctggcttgtctccggtcgaccatcctctacttctcctccaccgacatctct  
gcgacgttggcggcacctgccgacgatgatctacctcttcggcacgcccgcatttggtggctgacagtcccagt  
cattctgtggcgctgtggtctttcttcgcagctcggagctcgtggctatattgtcccactagtgcccttcgctgca  
ggatTTTTGCCGTGGCTTGcagcatacaccgccaatgtacttcttctacgccaccgattggtgccattcacca  
tcatcatgTTGGCactcgctgcggtgaactgtggggcctggaaaaatgacccccactggcttaaccgcggatc  
aatggcagtggtcacctacatttcctcgtggtgatgatgtttctcgcgttttcgccactgttttacggatttgc  
atcccagattatgtctacgaatccttgatgtggttcccaagctggcgctaa

[2155] SEQ ID NO:73

[2156] MSQALPVRDQGRDQGIFAGTLPPAPPKFKWTRLDTYTWAI IAVFALVTRFTGLSSATASGTPVFDEKHY  
VPQAWDMVRSWINPITGGIESNPGYGLVVHPPLAKQLEALGEVWVFGYTPLGWRIMVAIFGTLTIFAIMAIARRLSGS  
TIVTFIAGILALADGVLLVSSRFGLDIFLVFFITAAAWALIRDHQQMHQRLNDLLL TNGQITKDFGPRFGFRWRF  
TTGVFLGLALS VKWGLYYIAFFGLTSVFLDLWLRKRYGVRRYVTGTLKNDVIPALGSLVIIPALLYIWSRAWFAS  
ETSVYRHAKTDGTITEDSILQLFPESIAGWIHYHISVLEFHGSLTSSGHSHPWDSKPWAWLVSGRPILYFSSTDIS  
CDVGGTCRRMIYLFGTPAIWWLTVPVILWALWSFFARRSRGYIVPLVAFAAGFLPWLAAYDRQMYFFYATALVPFTI  
IMLALACGELWGRGKMTPTGLTRGSMVVTYISLVMMFLAFSPLFYGFVIPDYVYESLMWFPSWR

[2157] 以使用PurElute™基因组DNA试剂盒 (EdgeBio) 调制的谷氨酸棒状杆菌ATCC13869  
株的染色体DNA为模板,通过PCR法,使用SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75的引物扩增了pmt1  
基因的5' 侧上游约1kbp的区域,使用SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77的引物扩增了pmt1基因  
的3' 侧下游约1kbp的区域。接着,以所扩增的两个DNA片段为模板,通过使用将SEQ ID NO:  
74和SEQ ID NO:77所示的DNA用作引物的PCR法,得到了两个DNA片段融合而成的约2kbp的  
DNA片段。PCR使用Pyrobest (注册商标)DNA聚合酶 (Takara Bio),反应条件按照技术人员推  
荐的方案。通过将该DNA片段插入至W02006/057450中记载的pBS5T的SmaI位点,得到了pmt1  
基因缺失用的载体pBS5T Δ pmt1。连接反应使用DNA连接试剂盒 <Mighty Mix> (Takara  
Bio),反应条件按照技术人员推荐的方案。

[2158] pmt1基因缺失用引物序列

- [2159] SEQ ID NO:74
- [2160] gtttcgtacctaaccgacccgaacc
- [2161] SEQ ID NO:75
- [2162] tcggttgattgtagagccttggcg
- [2163] SEQ ID NO:76
- [2164] gccaaaggctctacaatcaaccgatggccgaaccaagtgaccaatgc
- [2165] SEQ ID NO:77
- [2166] aagctccggcattgattccgttacc
- [2167] (2) 构建谷氨酸棒状杆菌YDK0107株的pmt1基因缺失株
- [2168] 利用(1)中构建的pBS5T  $\Delta$  pmt1,转化W02016/171224中记载的谷氨酸棒状杆菌YDK0107株。谷氨酸棒状杆菌YDK0107株是以谷氨酸棒状杆菌YDK010株为亲株而得到的、在phoS基因中引入了W302C突变的自然突变株(W02016/171224)。谷氨酸棒状杆菌YDK010株是谷氨酸棒状杆菌AJ12036(FERM BP-734)的细胞表层蛋白CspB的缺失株(W02002/081694)。依据W02006/057450中记载的方法,从所得的转化体中进行菌株的选择,得到了pmt1基因缺失的YDK0107  $\Delta$  pmt1株。
- [2169] 实施例16
- [2170] (16-1) 合成亲和性试剂
- [2171] 依据实施例3,将实施例15中合成的肽(SEQ ID NO:54~59)酰胺化,由此调制了亲和性物质(W-1、2、3、4、5、6)。
- [2172] [化学式115]





[2181] 表6

	DAR 峰	观测的质量(Da)	峰面积	面积%
W-3	0	148224	2.73E+04	4.6
	1	158484	5.67E+05	95.4
W-4	1	158506	8.65E+05	90.98
	2	168788	8.57E+04	9.02
W-5	1	158957	5.29E+05	65.35
	2	169690	2.81E+05	34.65

[2183] 其结果,在使亲和性试剂(W-3)反应的情况下,确认到以比例为约95%的选择性得到了结合了1分子亲和性试剂的曲妥珠单抗。

[2184] 在使亲和性试剂(W-4)反应的情况下,确认到以比例为约91%的选择性得到了结合了1分子亲和性试剂的曲妥珠单抗。

[2185] 在使亲和性试剂(W-5)反应的情况下,确认到以比例为约65%的选择性得到了结合了1分子亲和性试剂的曲妥珠单抗。

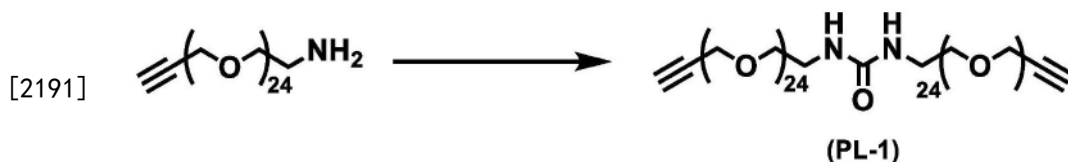
[2186] (16-4)合成具有一分子硫醇基的曲妥珠单抗

[2187] 依据实施例(4-3),通过使用实施例(16-3)中合成的结合了1分子亲和性试剂的抗体,得到了引入硫醇基的抗体。依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到引入了1分子硫醇基。

[2188] 实施例17合成亲和性试剂

[2189] (17-1)合成化合物(PL-1)

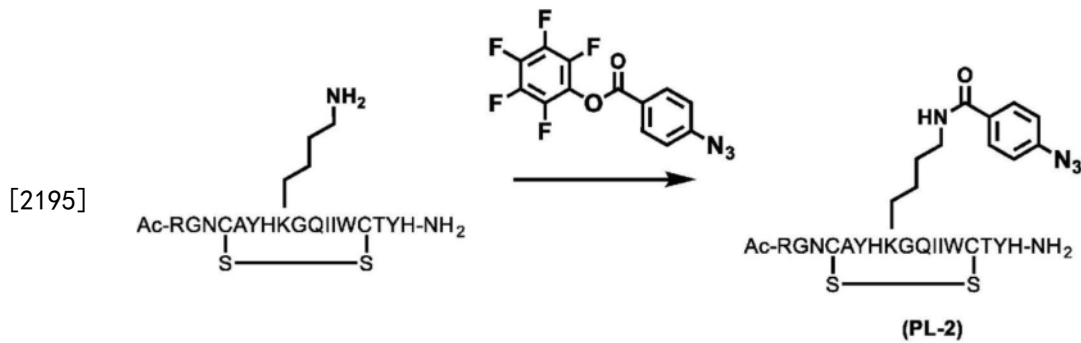
[2190] [化学式117]



[2192] 向市售的炔丙基-PEG 24-胺(BroadPharma公司,51.7mg)的DMF溶液(1mL)中加入1,1'-碳二咪唑(3.3mg)和三乙胺(8.5 $\mu$ L),在室温下搅拌3小时。反应结束后,通过反相制备色谱法进行洗脱。回收包含产物的馏分,通过减压下浓缩去除乙腈后,进行冷冻干燥,得到了上述修饰试剂(PL-1)(34.7mg)。

[2193] (17-2)合成化合物(PL-2)

[2194] [化学式118]

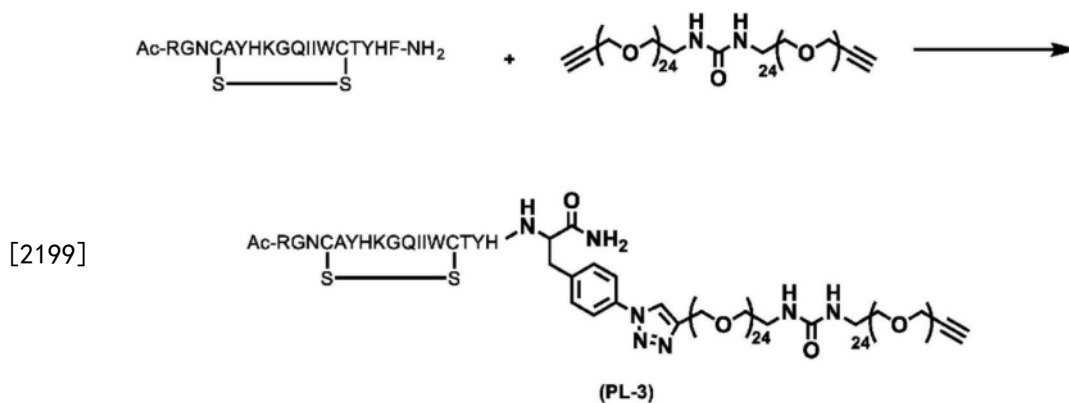


上述氨基酸序列均为 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列。

[2196] 将已有报道 (W02019/240287A1) 记载的 Ac-RGNCAYHKGQIIWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 38, 51.7mg, 其中, 第4位和第14位的2个半胱氨酸分别在分子内形成二硫键) 溶解于二甲基甲酰胺 (1mL), 加入已知的4-叠氮苯甲酸2,3,4,5,6-五氟苯基酯 (40.7mg) 和三乙胺 (17.2μL), 在室温下搅拌1小时。反应结束后, 通过反相制备色谱法进行洗脱。回收包含产物的馏分, 通过减压下浓缩去除乙腈后, 进行冷冻干燥, 得到了上述修饰试剂 (PL-2) (37.8mg)。

[2197] (17-3) 合成化合物 (PL-3)

[2198] [化学式119]



[2199]

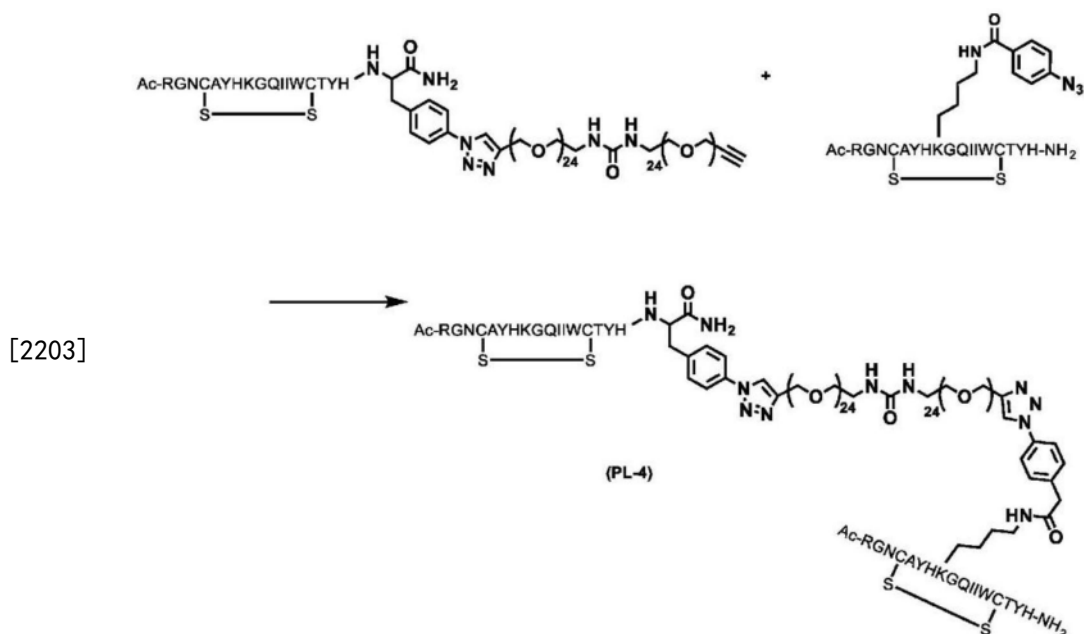
上段的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 79 的氨基酸序列。

下段的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列。

[2200] 将依据已有报道 (W02019/240287A1) 记载的方法合成的 Ac-RGNCAYHKGQIIWCTYHF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 79, 6.7mg, 其中, 第4位和第14位的2个半胱氨酸分别在分子内形成二硫键, F被叠氮化) 和 (17-1) 中合成的化合物 (PL-1, 10mg) 溶解于水 (0.3mL), 加入硫酸铜五水合物 (3.0μmol) 和 L (+)-抗坏血酸钠 (7.4μmol)、三 (3-羟丙基三唑甲基) 胺 (3.0μmol), 在室温下搅拌20分钟。反应结束后, 通过反相制备色谱法进行洗脱。回收包含产物的馏分, 通过减压下浓缩去除乙腈后, 进行冷冻干燥, 得到了上述修饰试剂 (PL-3) (1.5mg)。

[2201] (17-4) 合成化合物 (PL-4)

[2202] [化学式120]

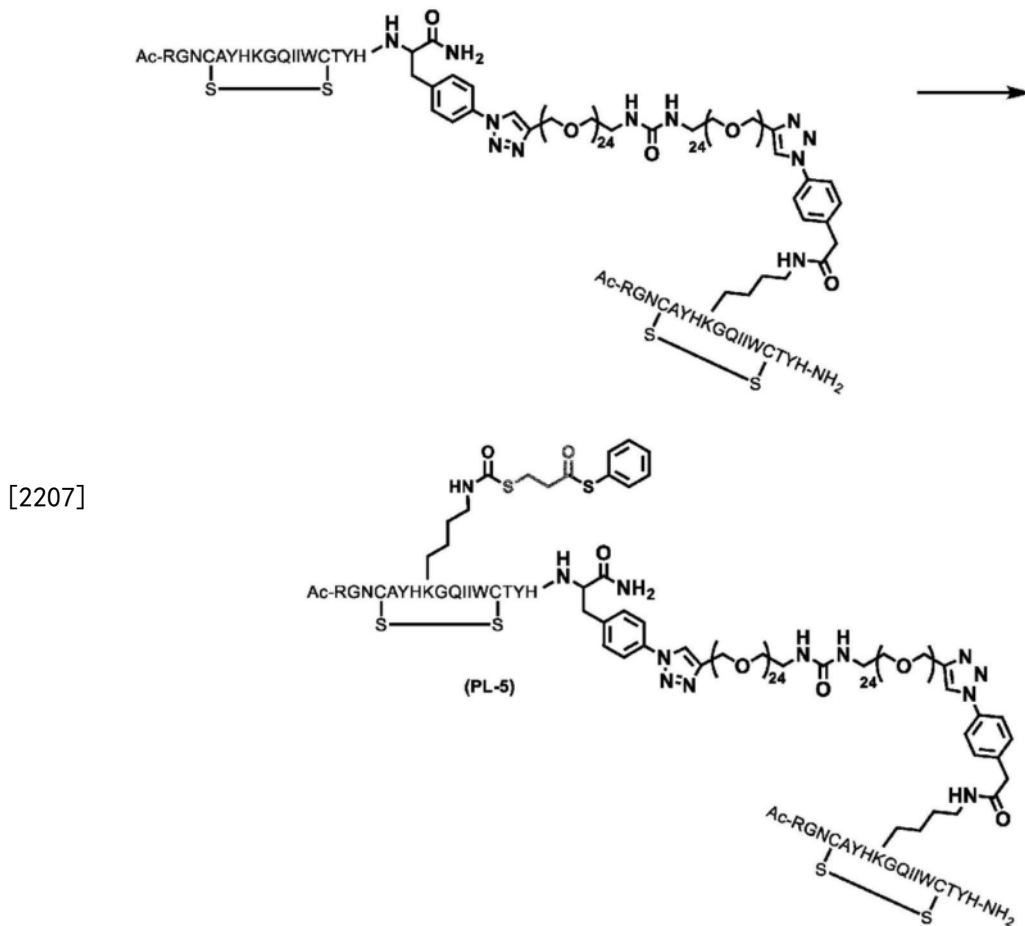


上述氨基酸序列均为 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列。

[2204] 将 (17-3) 中合成的 PL-3 (1.5mg) 和 (17-2) 中合成的 PL-2 (1.1mg) 溶解于水 (1.0mL), 加入硫酸铜五水合物 (0.33 $\mu$ mol) 和 L(+)-抗坏血酸钠 (0.83 $\mu$ mol)、三(3-羟丙基三唑甲基)胺 (0.33 $\mu$ mol), 在室温下搅拌 20 分钟。反应结束后, 通过反相制备色谱法进行洗脱。回收包含产物的馏分, 通过减压下浓缩去除乙腈后, 进行冷冻干燥, 得到了上述修饰试剂 (PL-4) (2.0mg)。

[2205] (17-5) 合成亲和性物质 (PL-5)

[2206] [化学式 121]



上述氨基酸序列均为 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列。

[2208] 依据已有报道 (W02019/0240287), 通过将 (17-4) 中调制的 PL-4 酰胺化, 调制了亲和性试剂 (PL-5)。

[2209] MS (ESI)  $m/z$ :  $z = 17$  1174  $[M+6H]^{6+}$

[2210] 实施例 18 使用亲和性试剂 (PL-5) 修饰曲妥珠单抗

[2211] (18-1) 使用亲和性试剂 (PL-5) 修饰曲妥珠单抗

[2212] 依据实施例 (4-1), 向抗人 HER2 单克隆抗体曲妥珠单抗 (中外制药) 的乙酸缓冲液 (50mM 乙酸钠, pH6.5) 溶液中加入实施例 (17-5) 中合成的亲和性试剂 (PL-5) 的 DMF 溶液 (相对于抗体为 5 当量), 振荡 1 小时。通过使用 Nap25 (Cytiva 公司制造) 纯化反应溶液, 获取了结合了 1 分子亲和性试剂的曲妥珠单抗。依据已有报道 (Anal. Chem., 2019, 91, 20, 12724-12732) 进行 ESI-TOFMS 分析, 确认在曲妥珠单抗上结合了 1 分子亲和性试剂。

[2213] (18-2) 利用 DAR 计算器确认曲妥珠单抗的特异性修饰体的肽/抗体结合比

[2214] 对于实施例 (18-1) 中分析的 MS 数据, 将利用 DAR 计算器 (Agilent 公司软件) 进行了肽/抗体结合比的确认的结果示于表 7 中。

[2215] [表 7]

[2216] 表 7

[2217]

DAR 峰	观测的质量 (Da)	峰面积	面积 %
1	155271	3.52E+05	66.8
2	162314	1.75E+05	33.2

[2218] 其结果,在使亲和性试剂(PL-5)反应的情况下,确认到以比例为约67%的选择性得到了结合了1分子亲和性试剂的曲妥珠单抗。

[2219] (18-3)合成具有一分子硫醇基的曲妥珠单抗

[2220] 依据实施例(4-3),通过使用实施例(18-1)中合成的结合了1分子亲和性试剂的抗体,得到了引入硫醇基的抗体。依据已有报道(Anal.Chem.,2019,91,20,12724-12732)进行HIC-HPLC分析,确认到引入了1分子硫醇基。

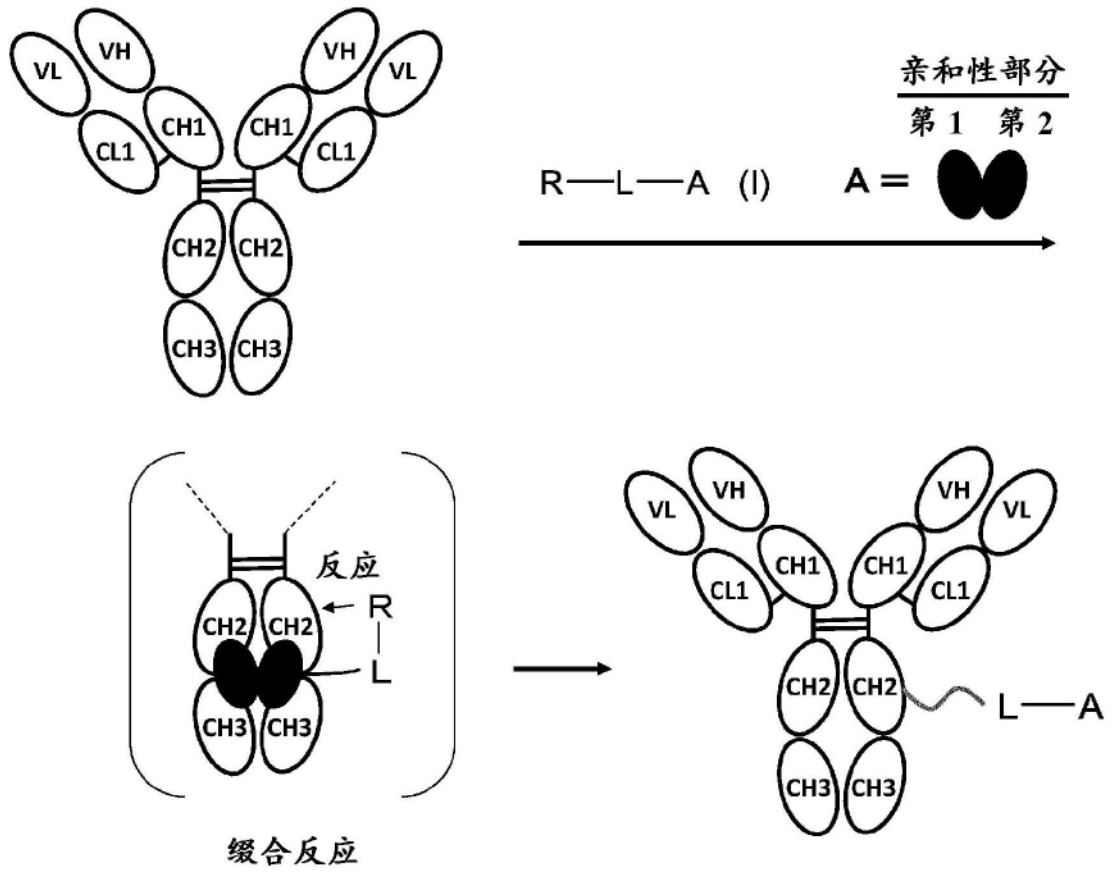


图1

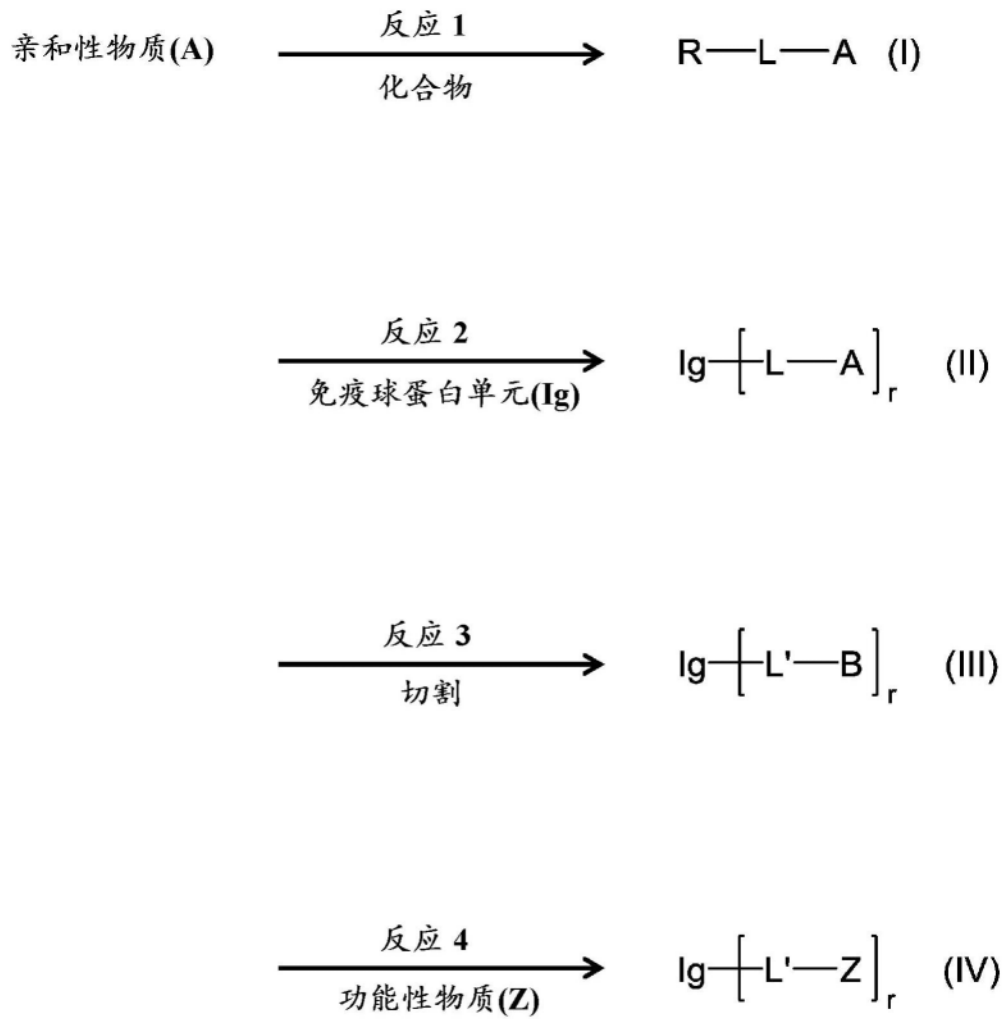


图2

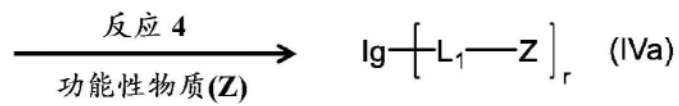
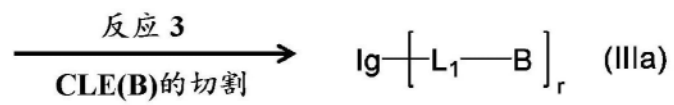
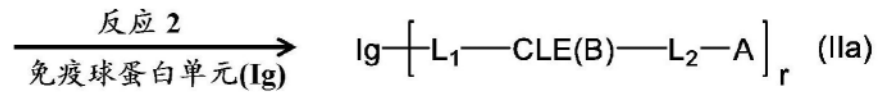
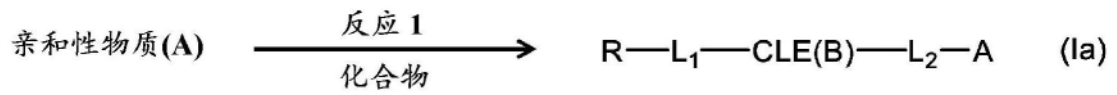


图3

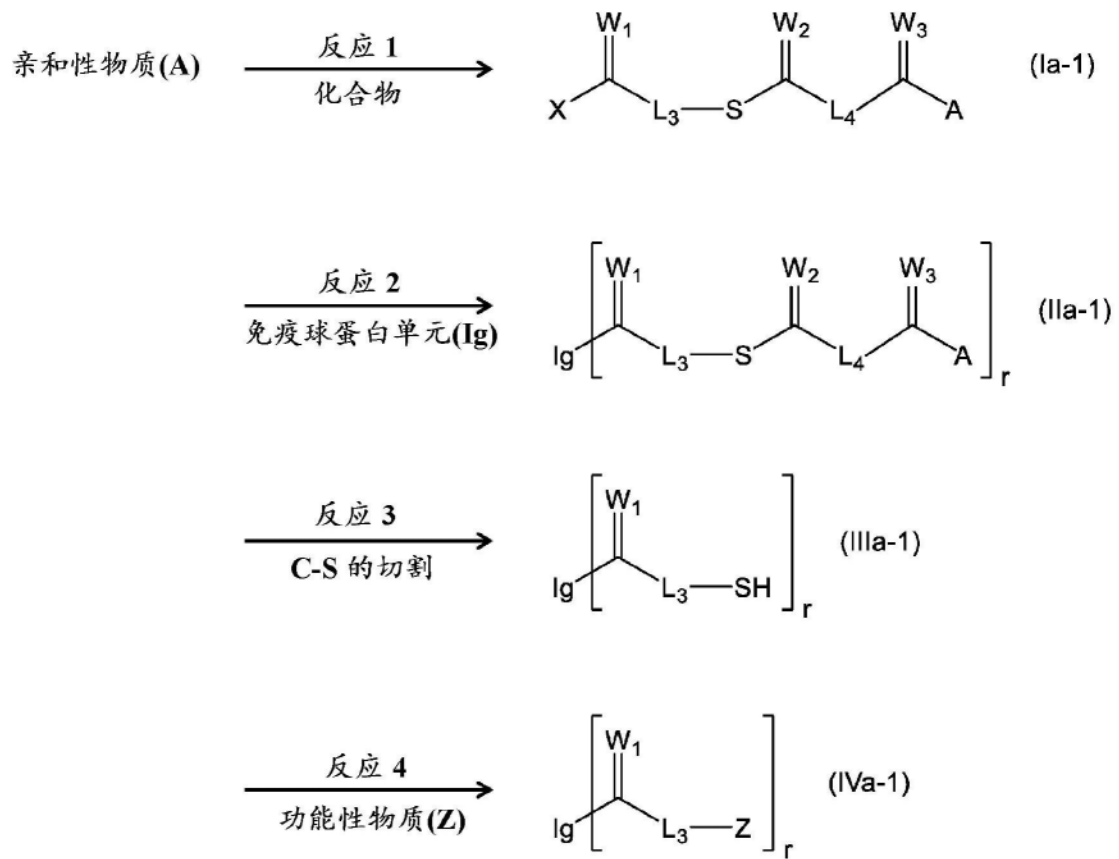


图4

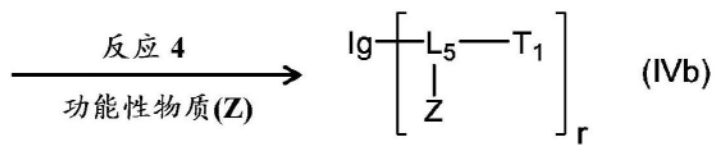
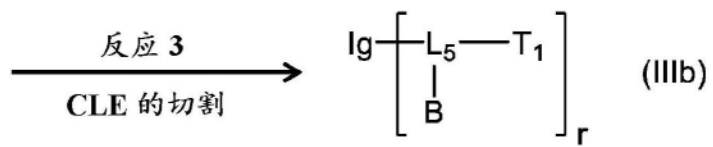
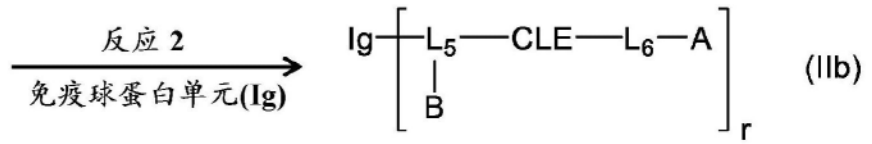
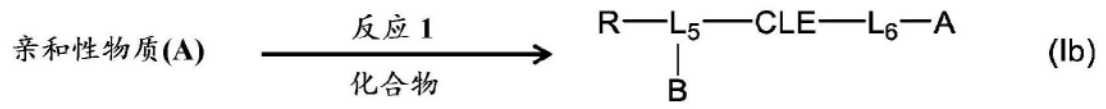


图5

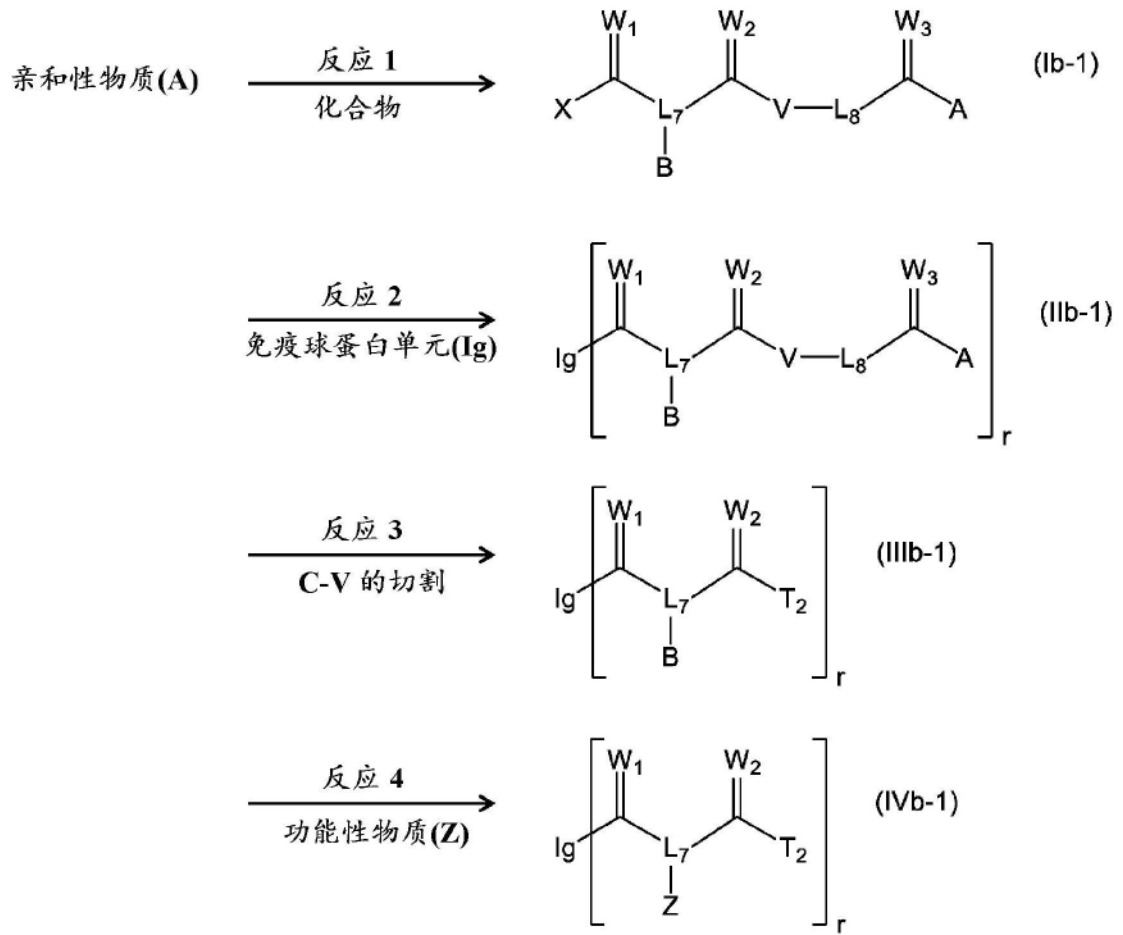


图6

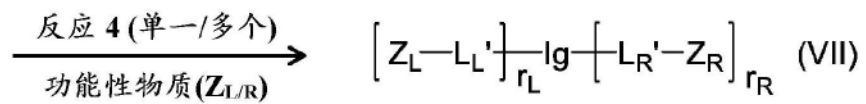
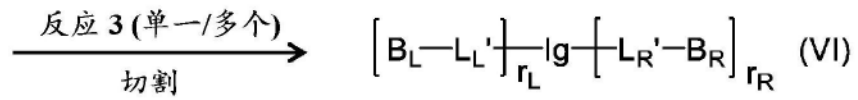
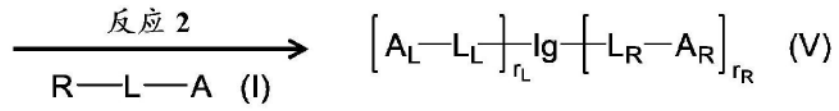
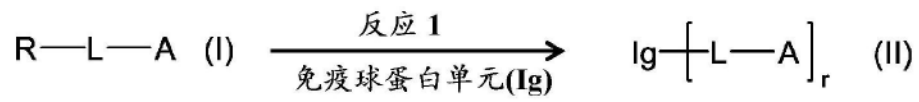


图7

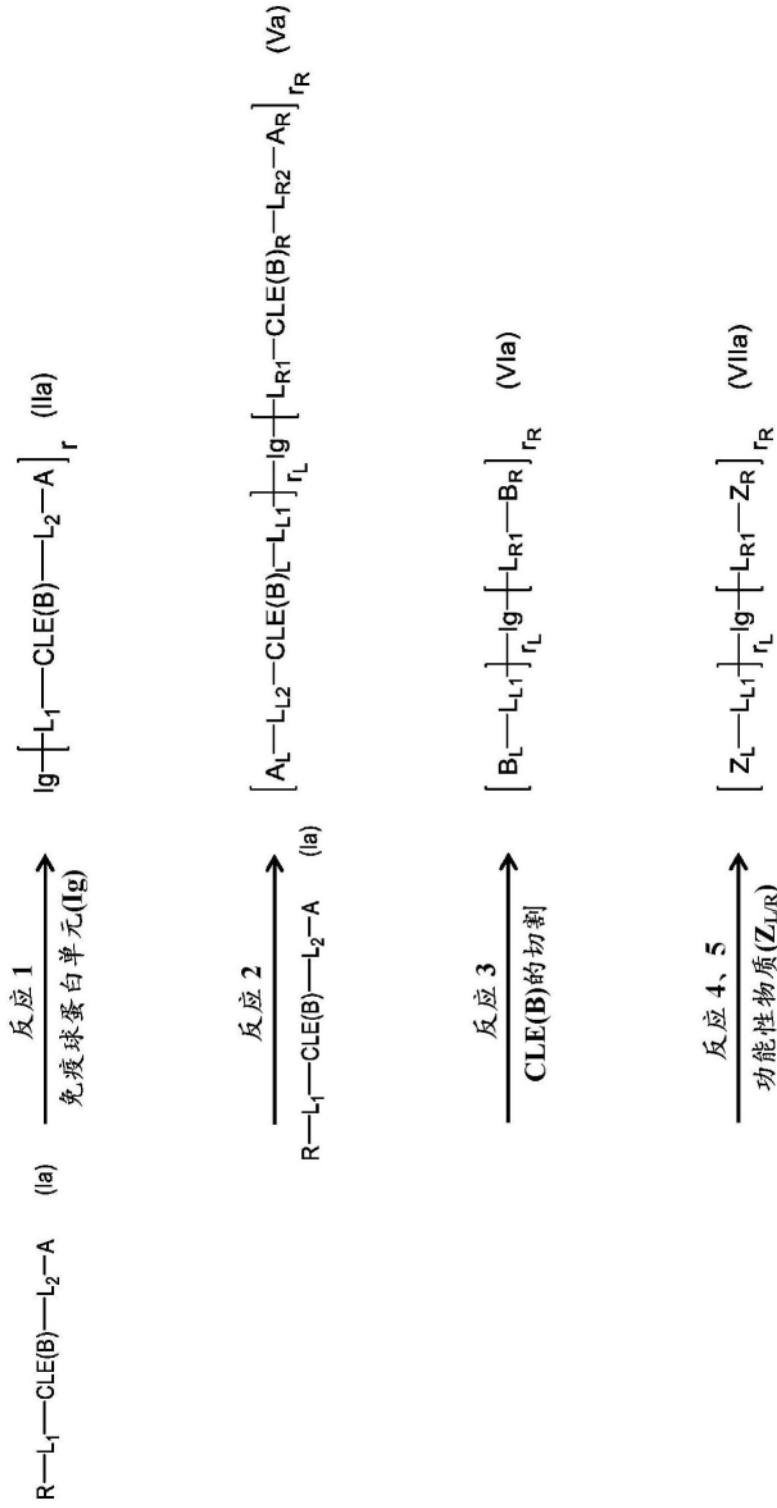


图8

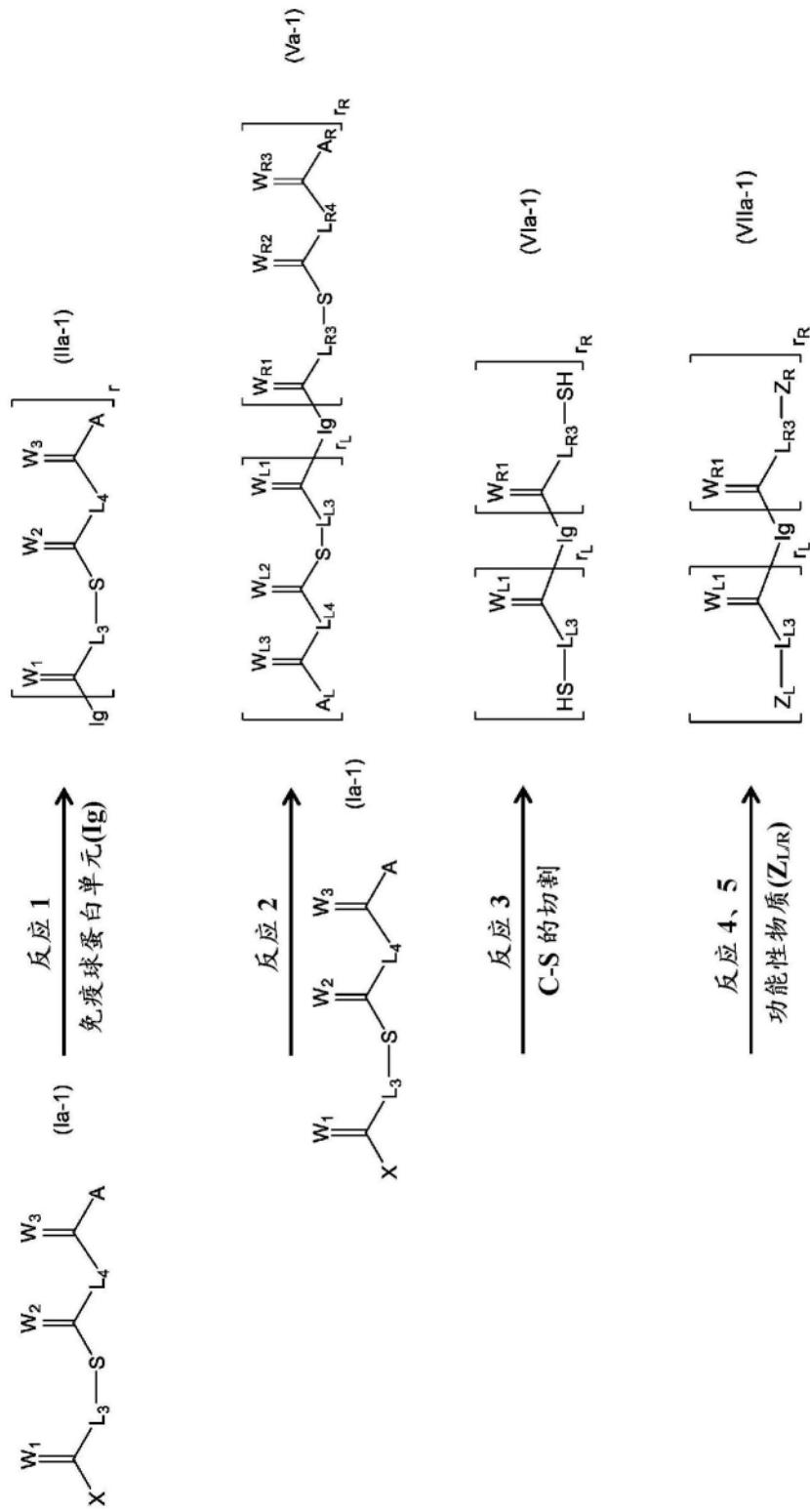


图9

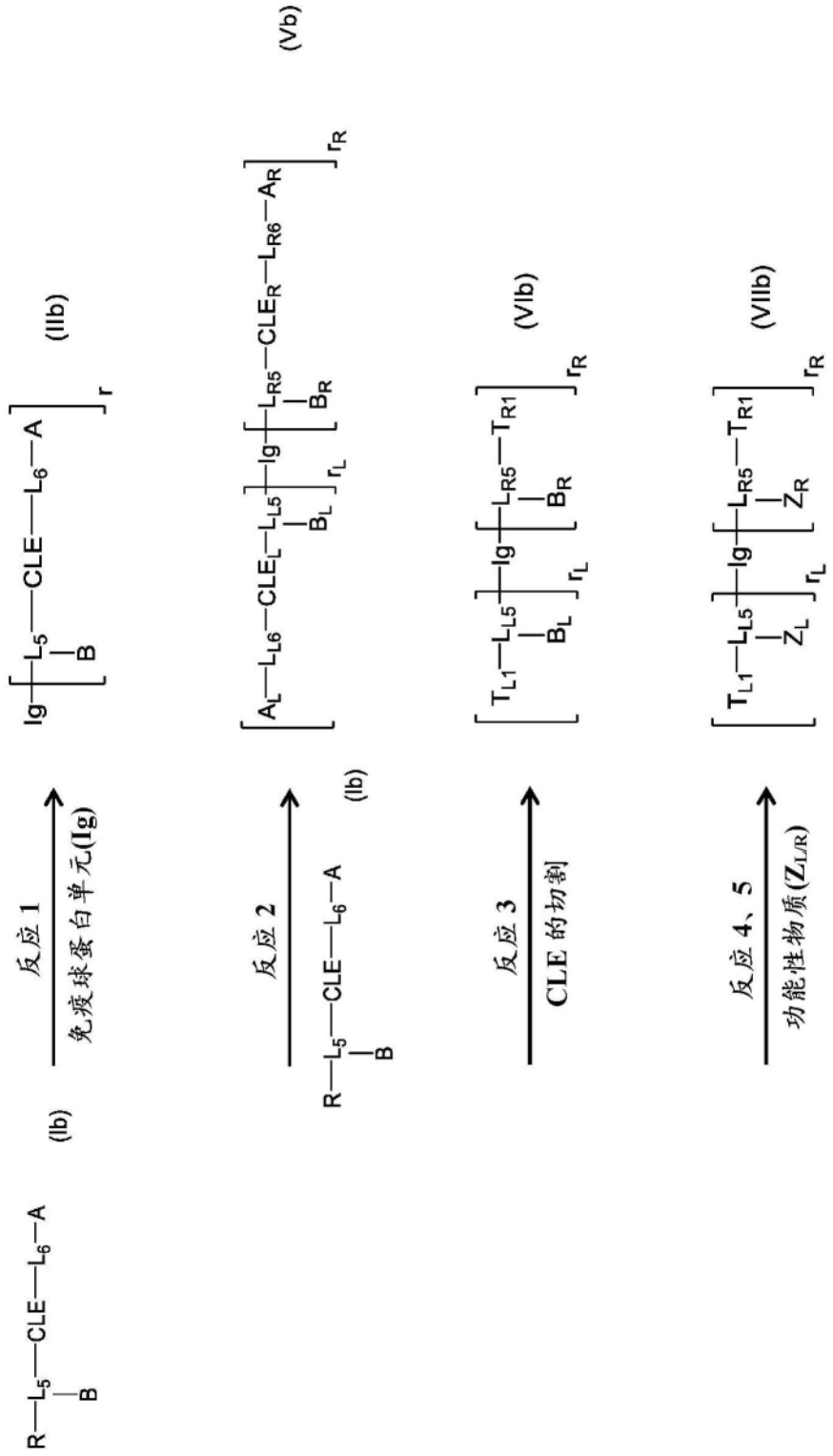


图10

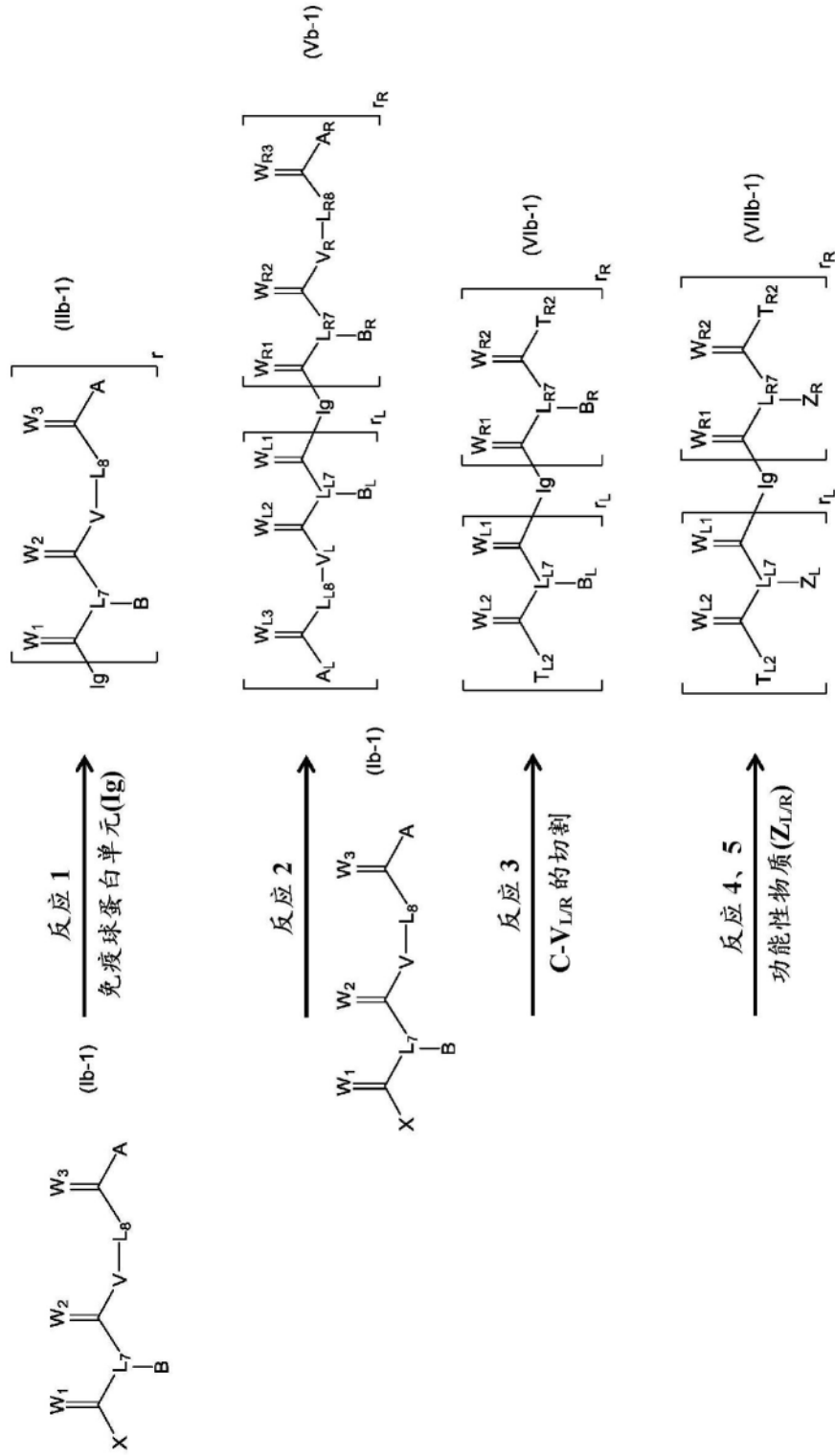


图11

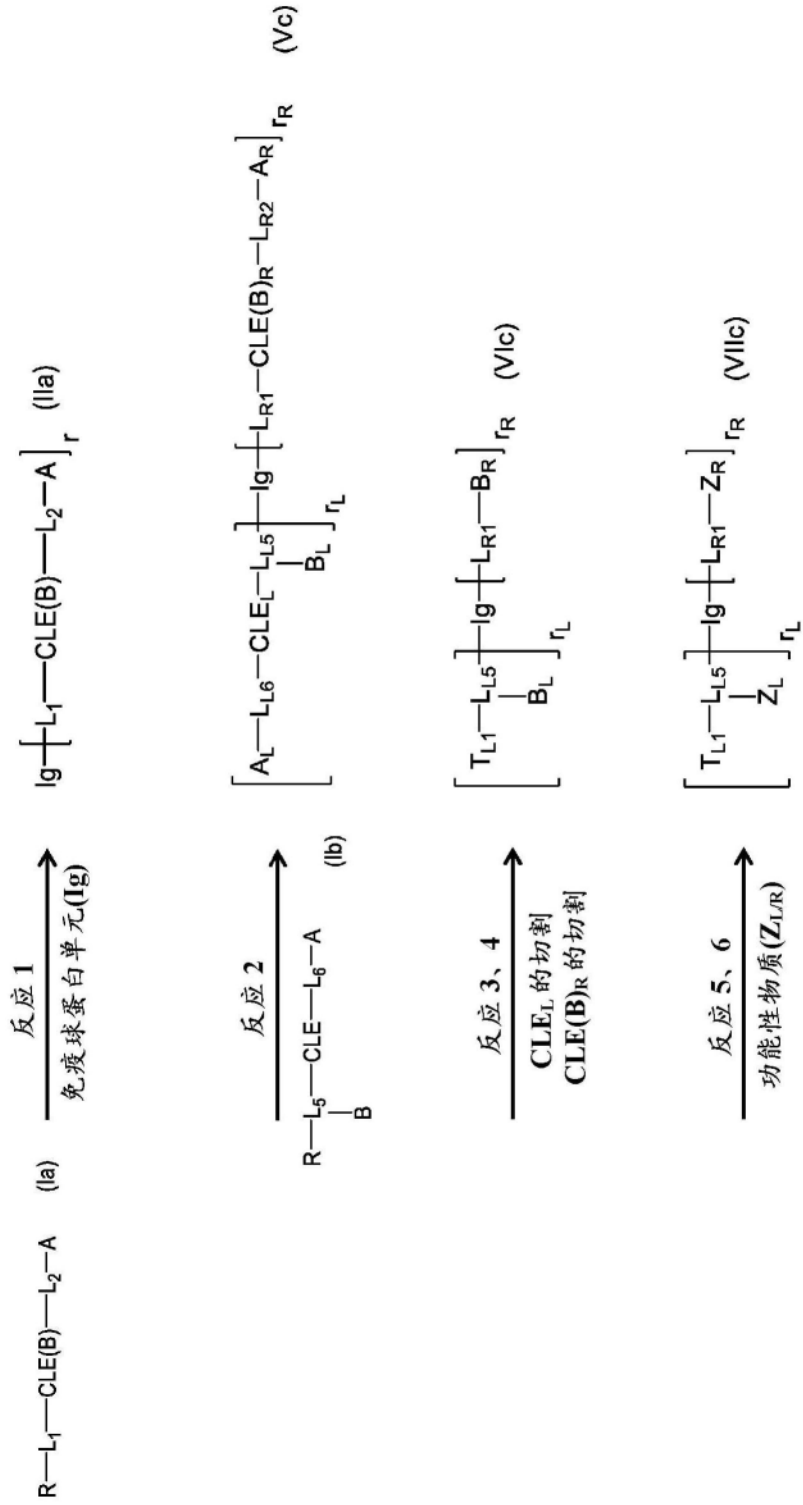


图12

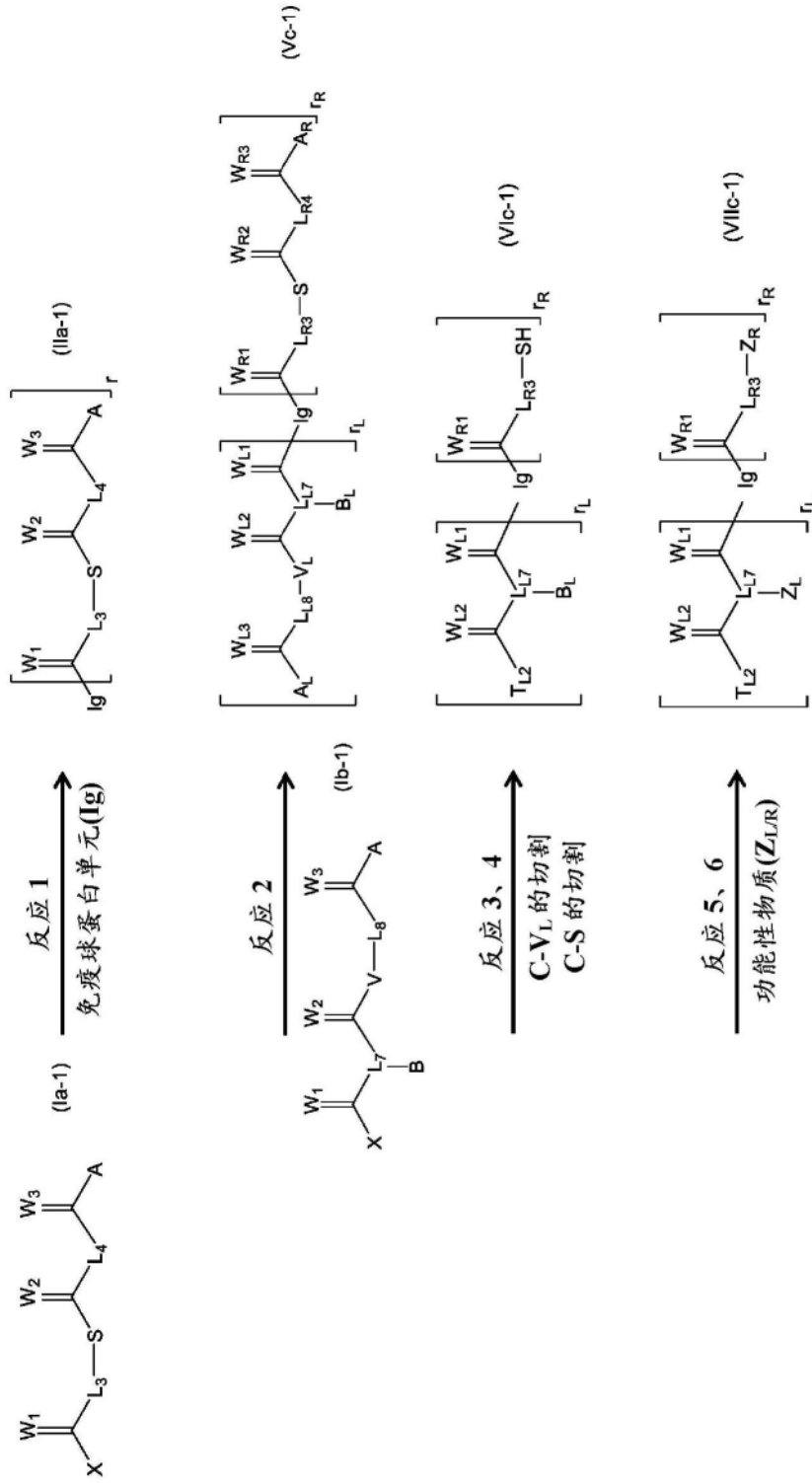


图13

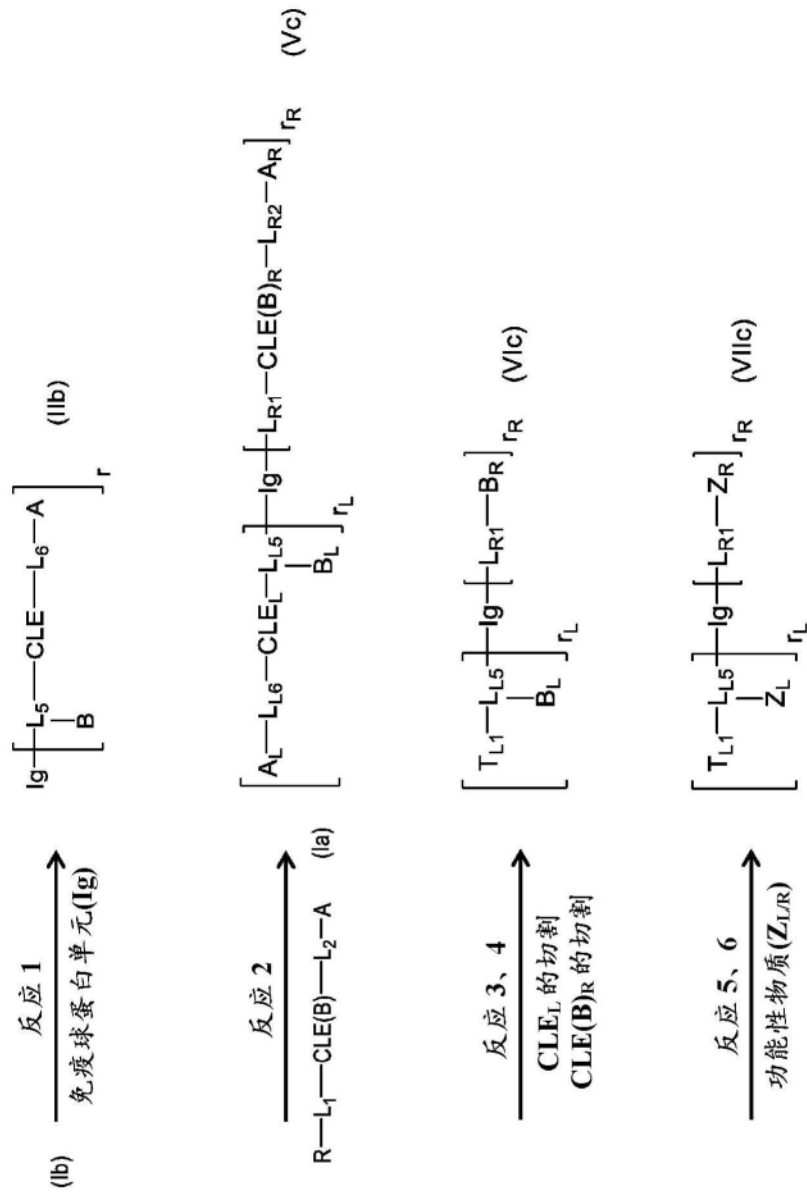


图14

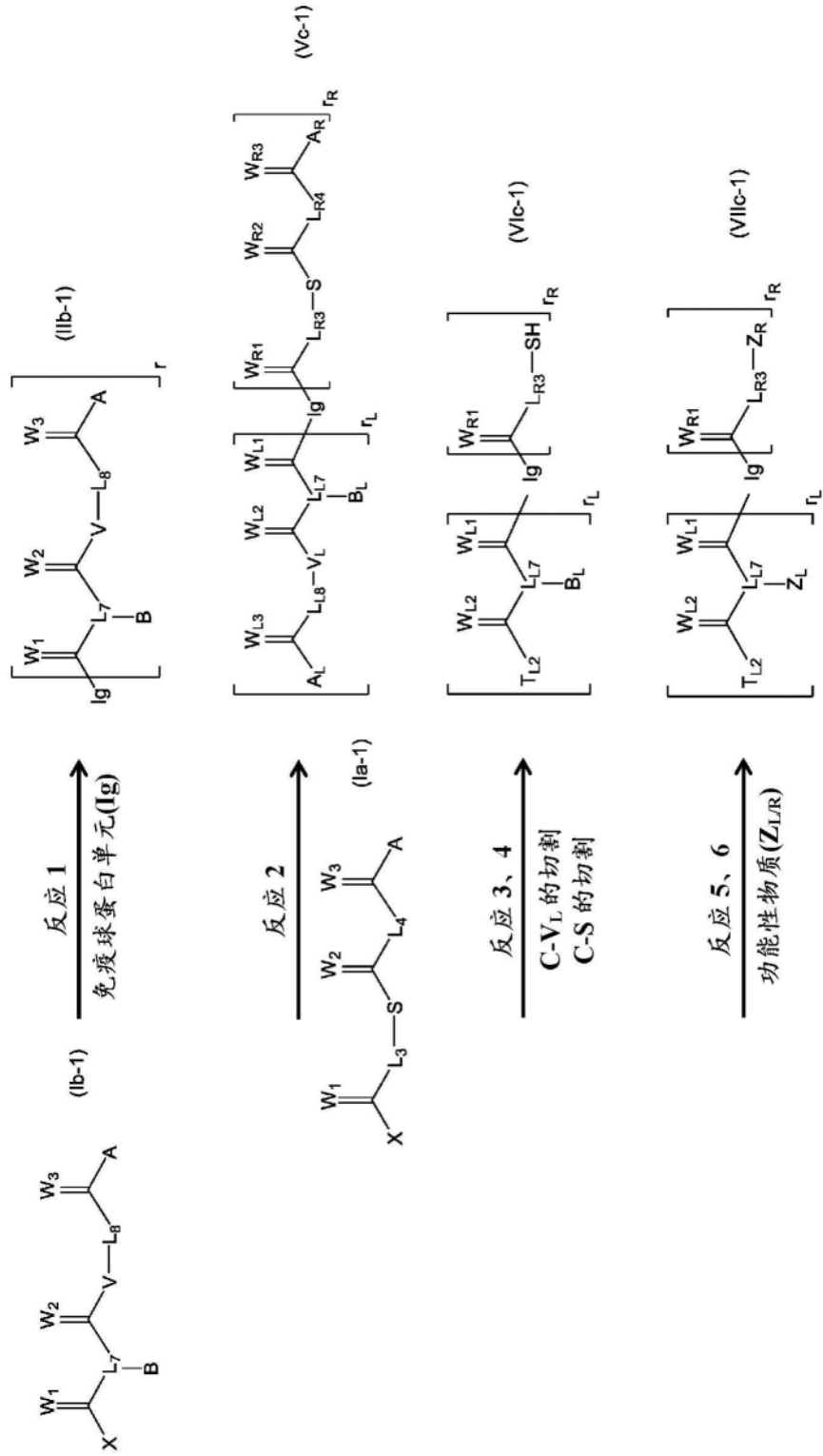


图15

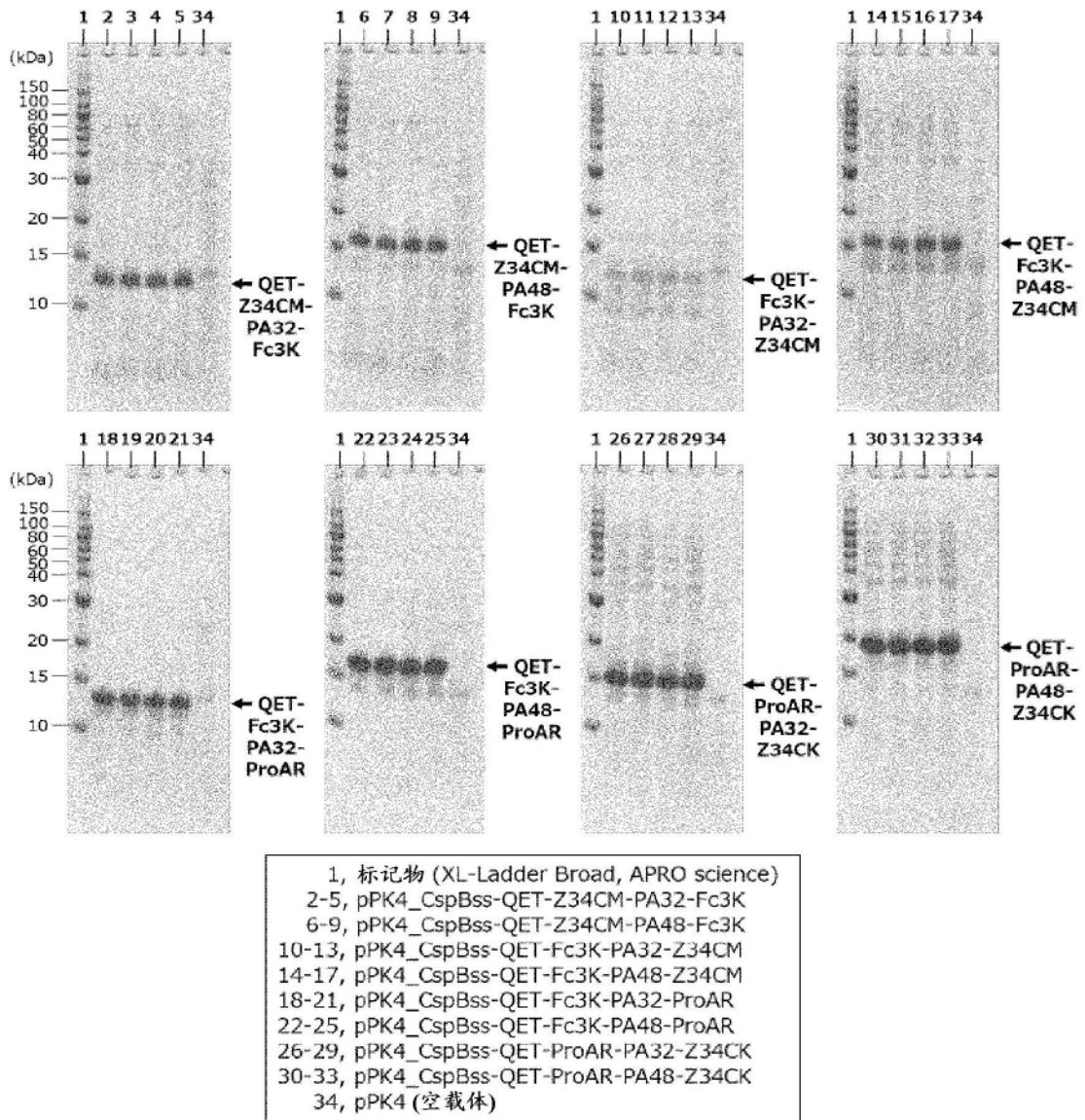


图16

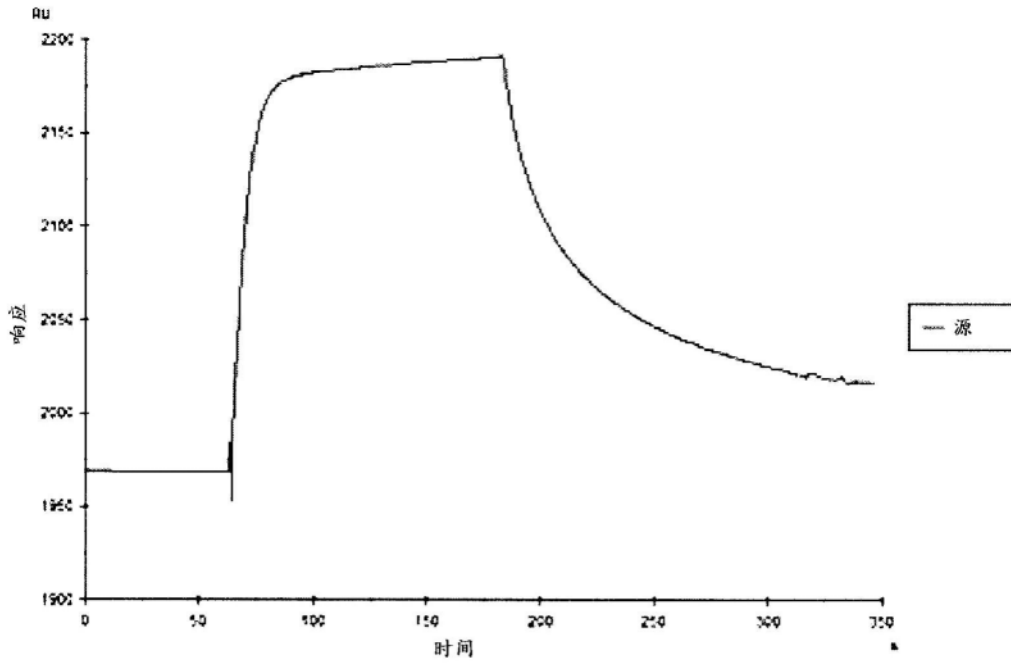


图17-1

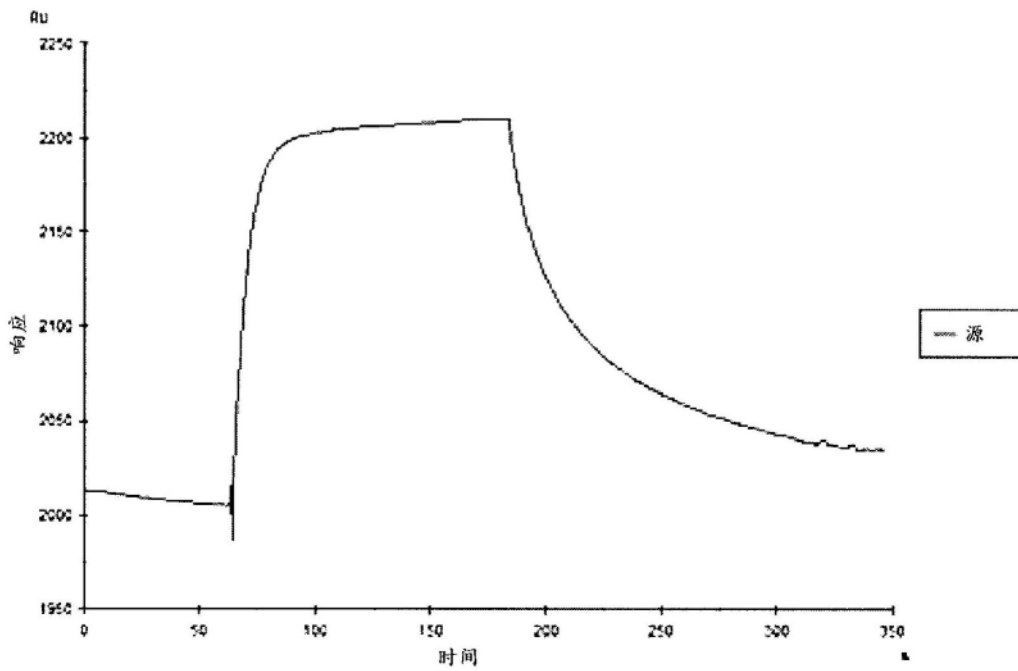


图17-2

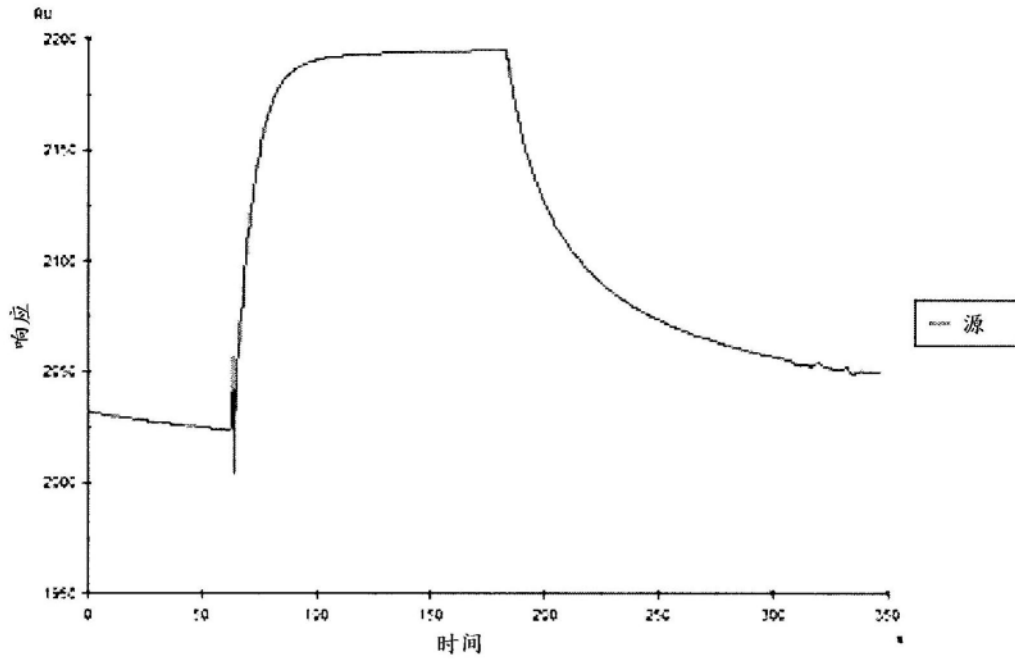


图17-3

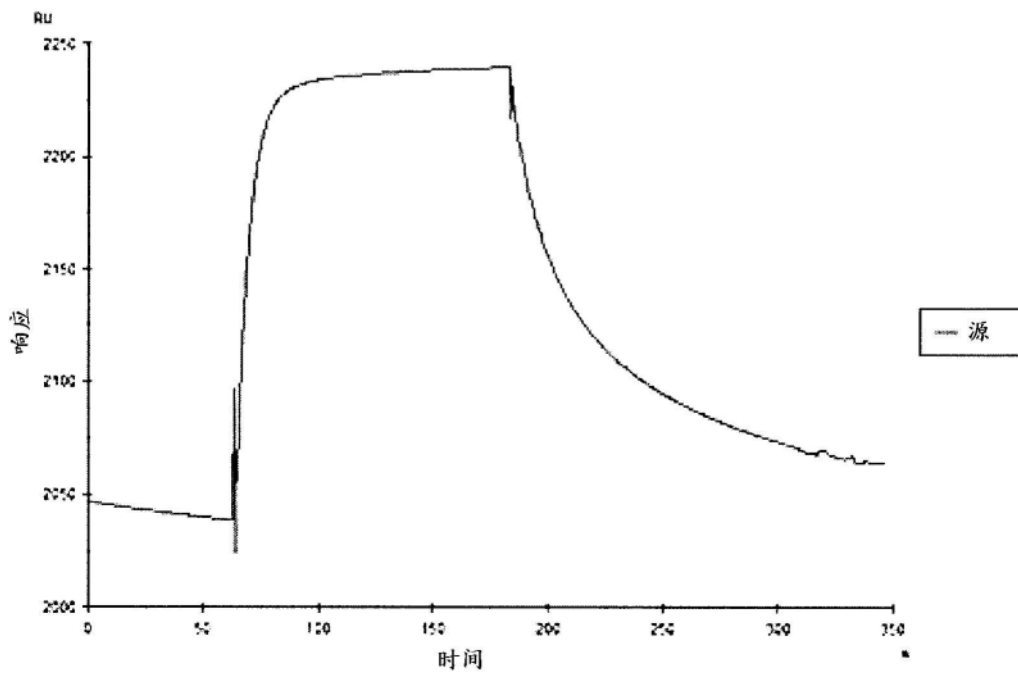


图17-4

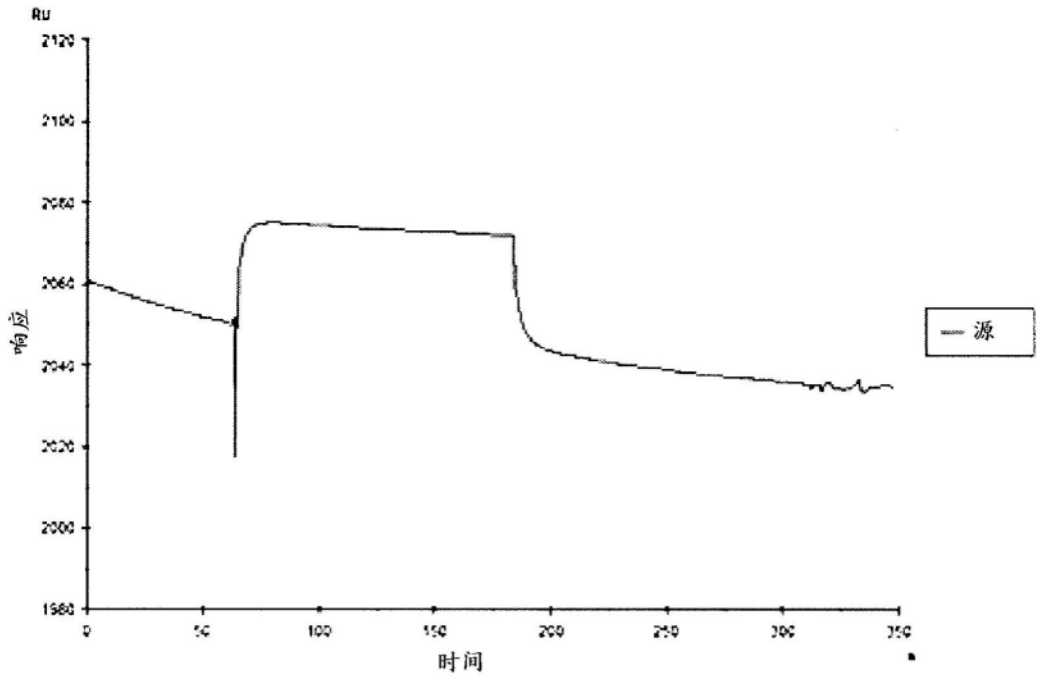


图17-5

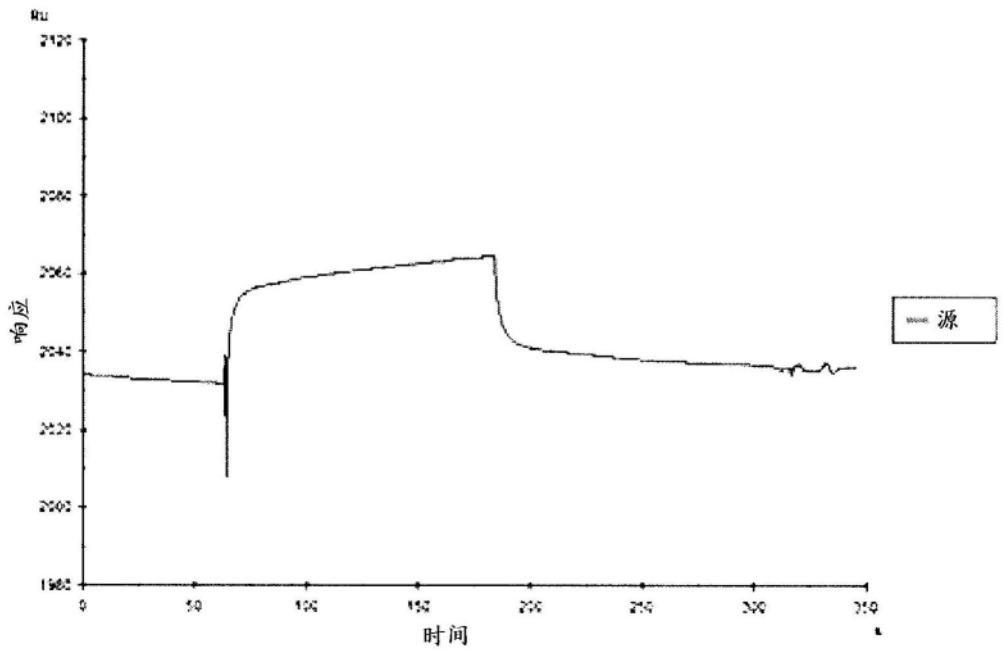


图17-6

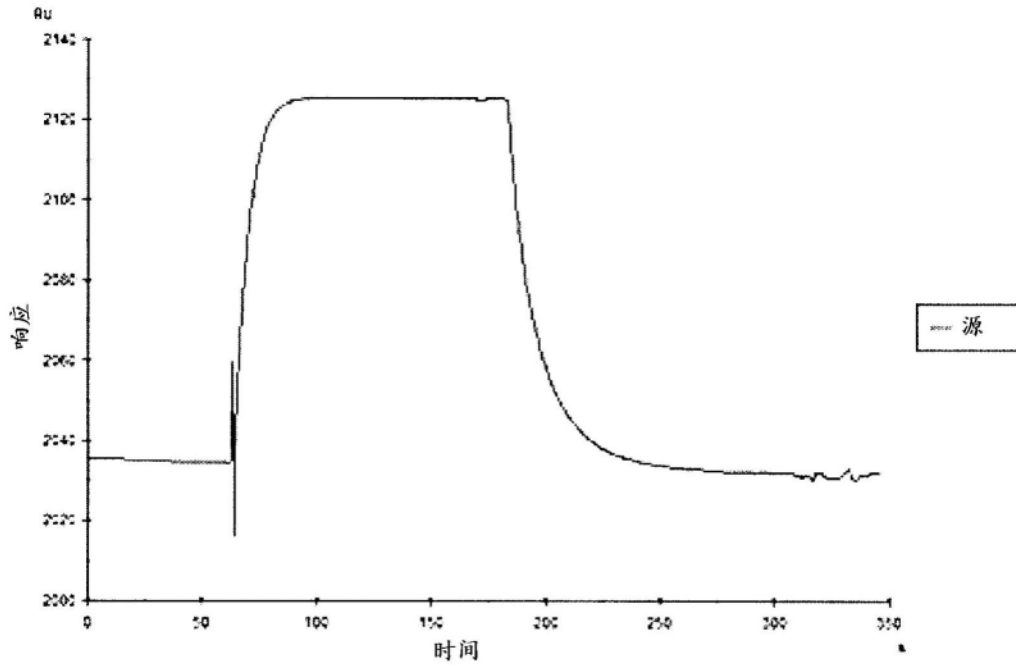


图17-7

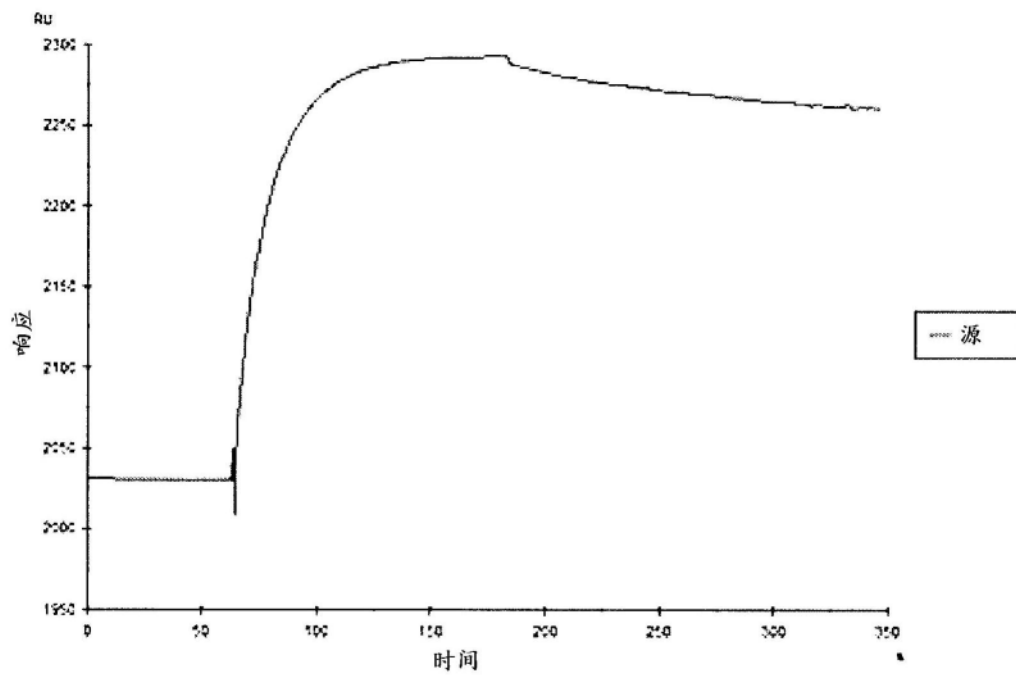
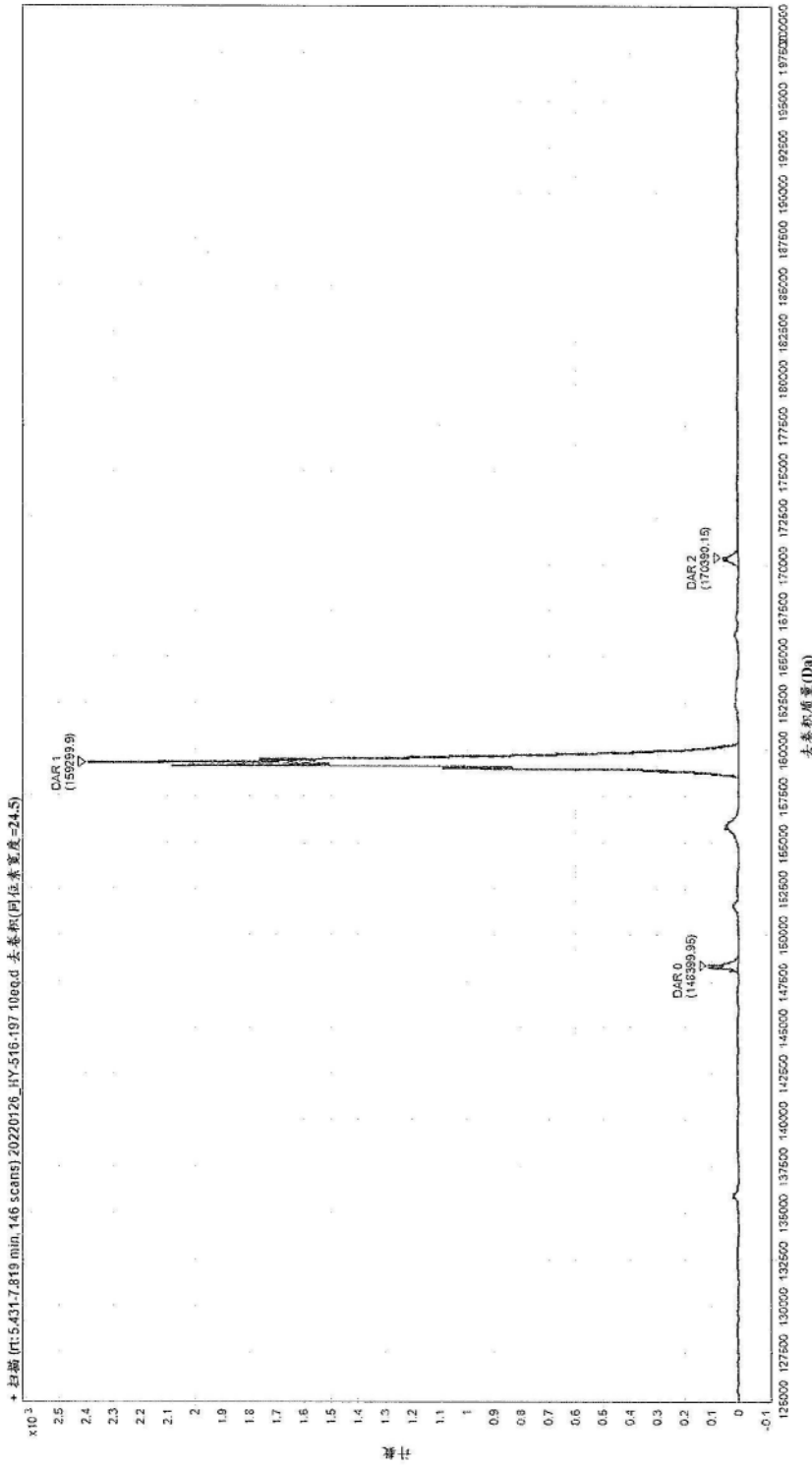


图17-8

去卷积光谱(Deconvoluted Spectrum)



DAR 峰列表

DAR 峰	理论质量(Da)	观测的质量(Da)	面积	面积%
0	148225	148399.95	3.11E+004	2.34
1	159945	159299.9	1.28E+006	95.93
2	171665	170390.15	2.31E+004	1.74

图18

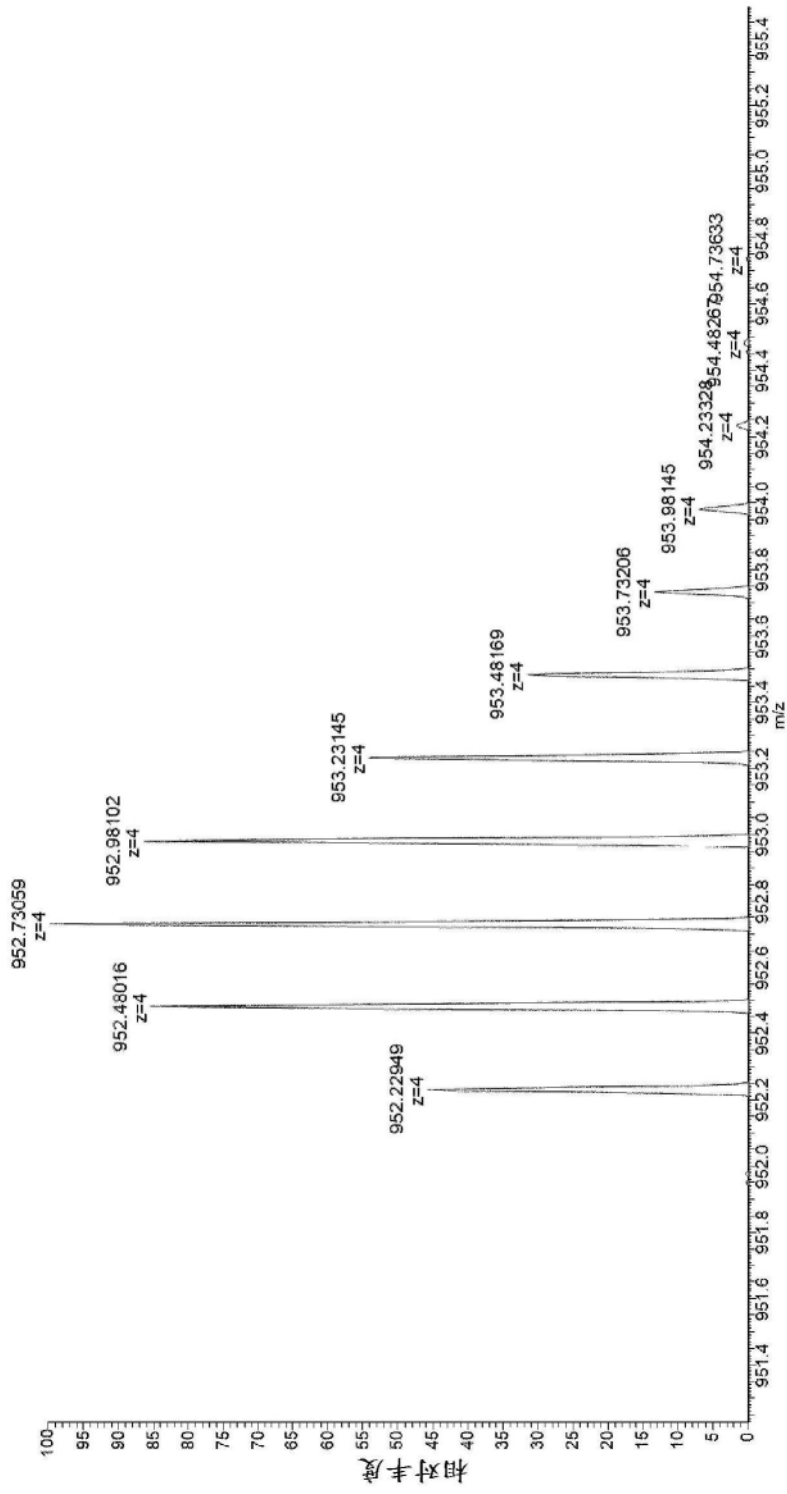


图19-1

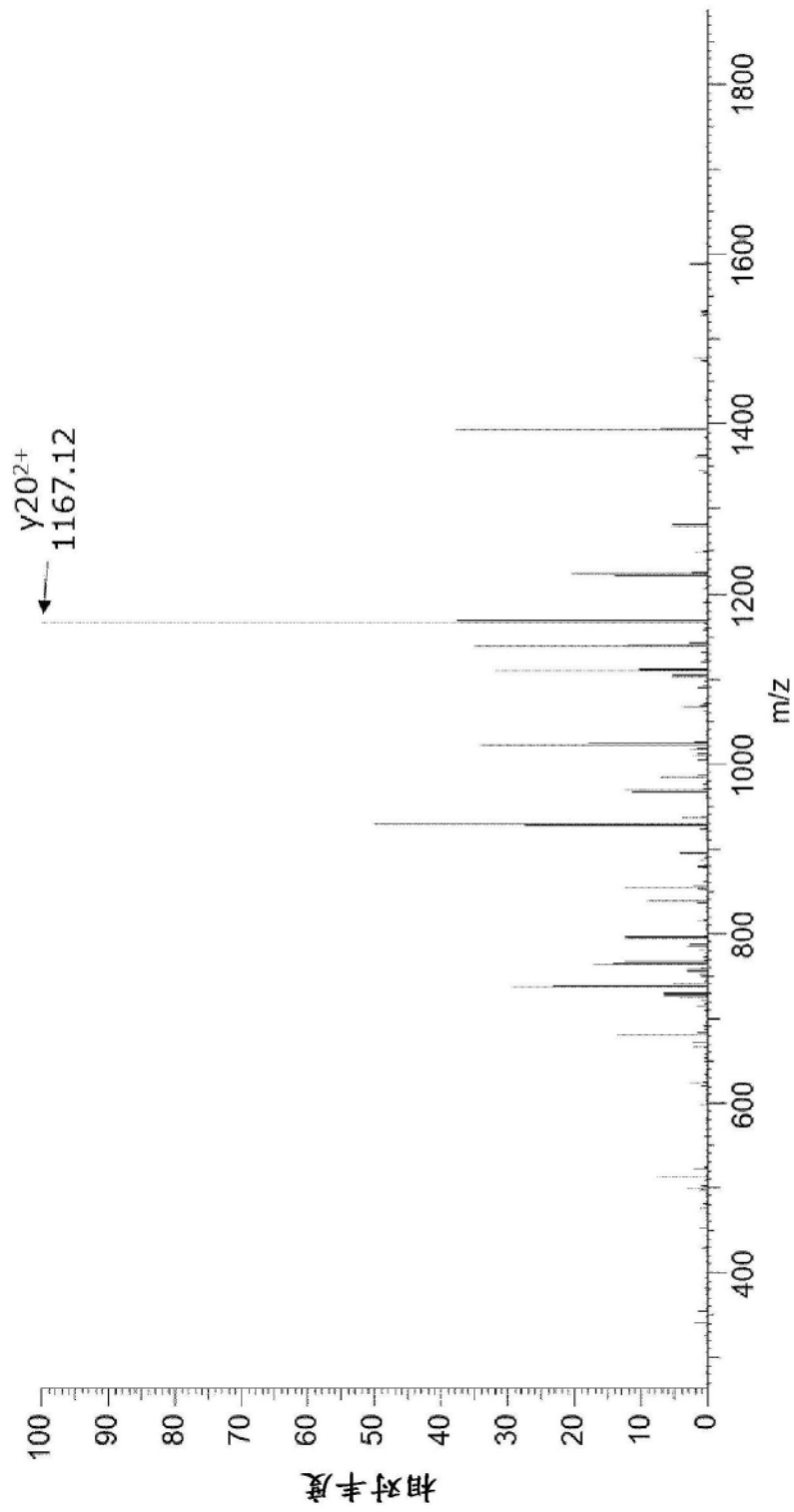


图19-2

曲妥珠单抗的 PARI 疏醇引入体  
BioPharma Finder 分析结果

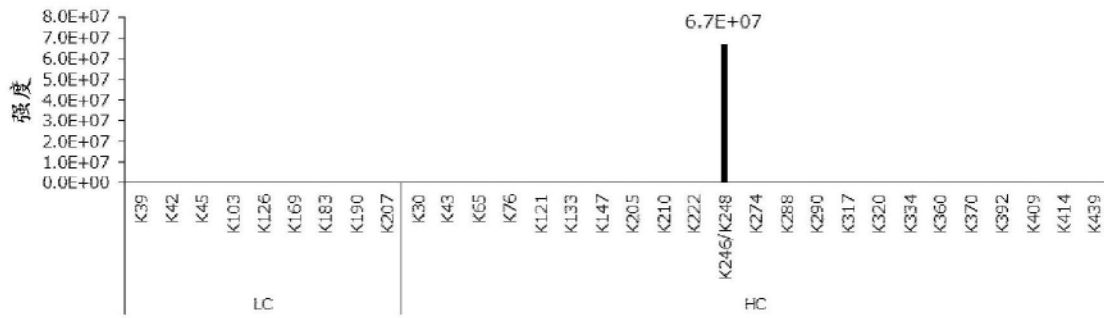


图19-3

配体: 生物素化的 EGFR-Fc

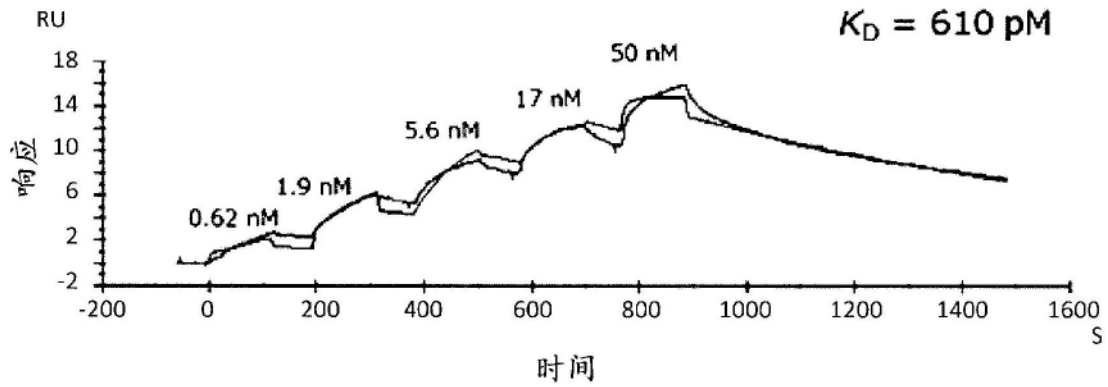


图20-1

配体: 生物素化的 FcRn-Fc

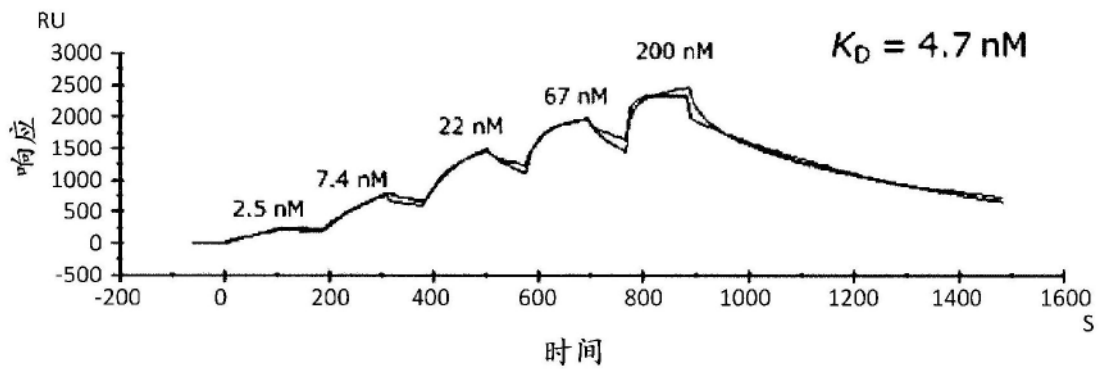


图20-2

配体：生物素化的 FcRn-Fc Fc

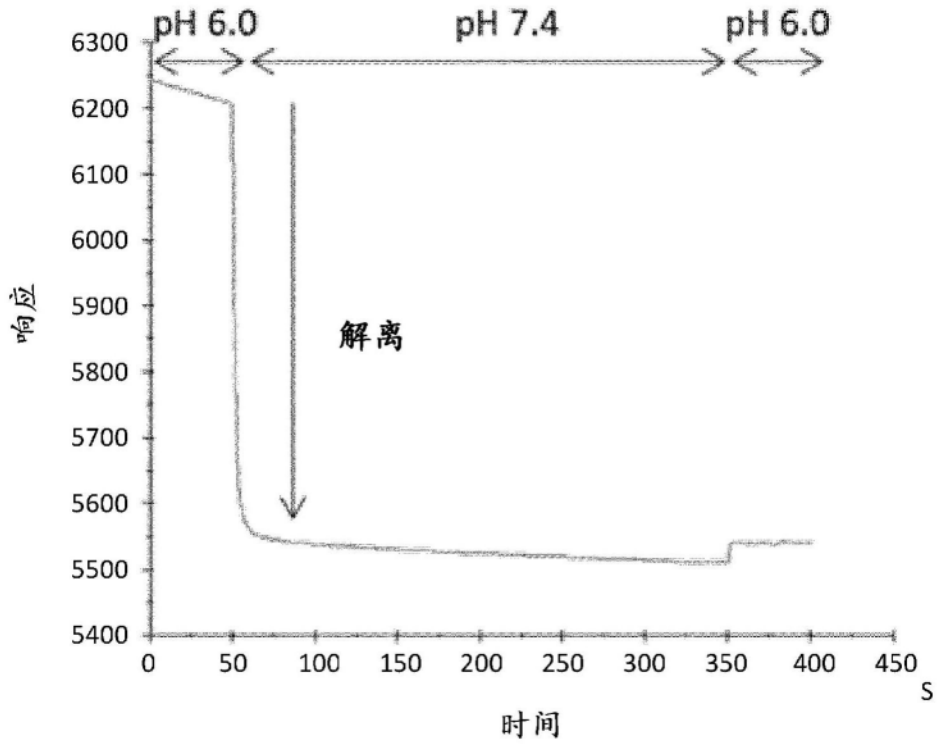


图20-3

配体：生物素化的 EGFR-Fc

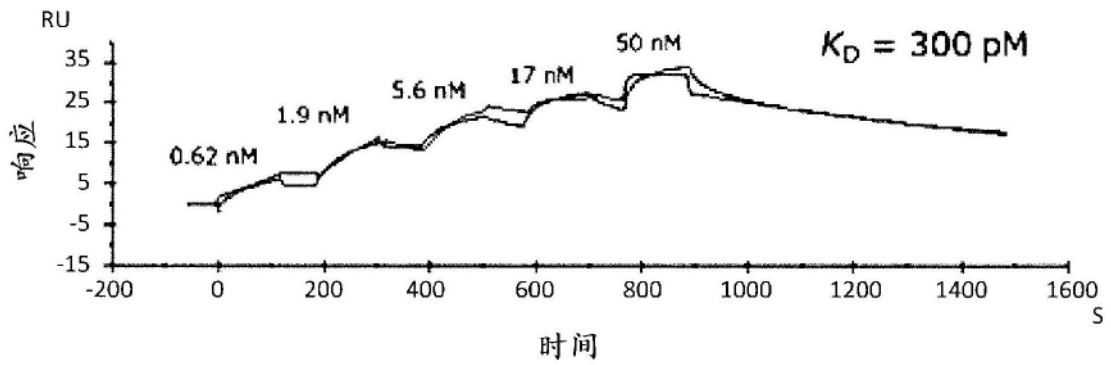


图21-1

配体：生物素化的 HER2-Fc

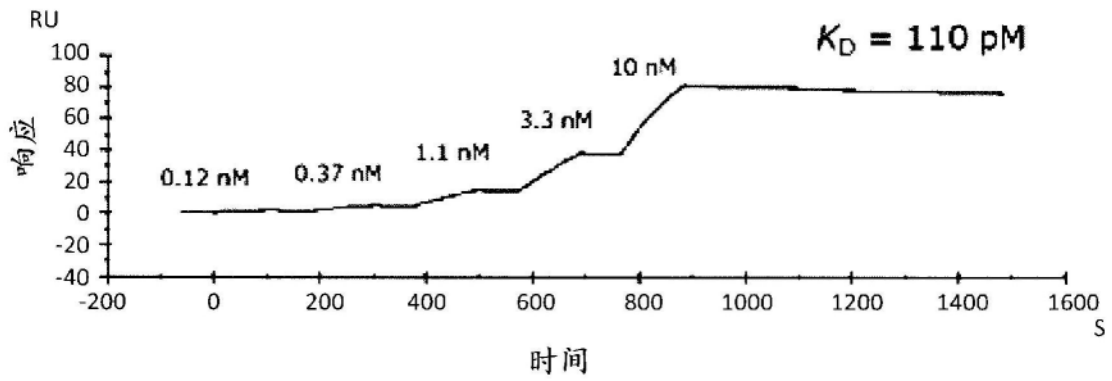


图21-2

配体：生物素化的 FcRn-Fc

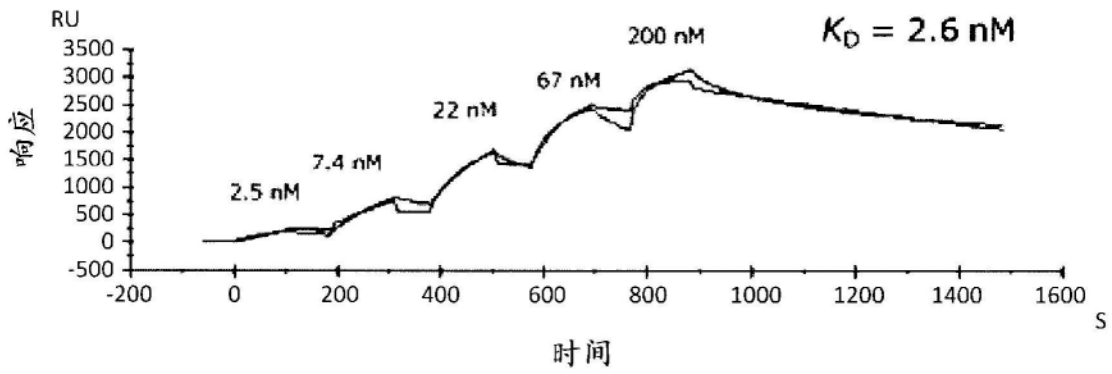


图21-3

配体：生物素化的 FcRn-Fc

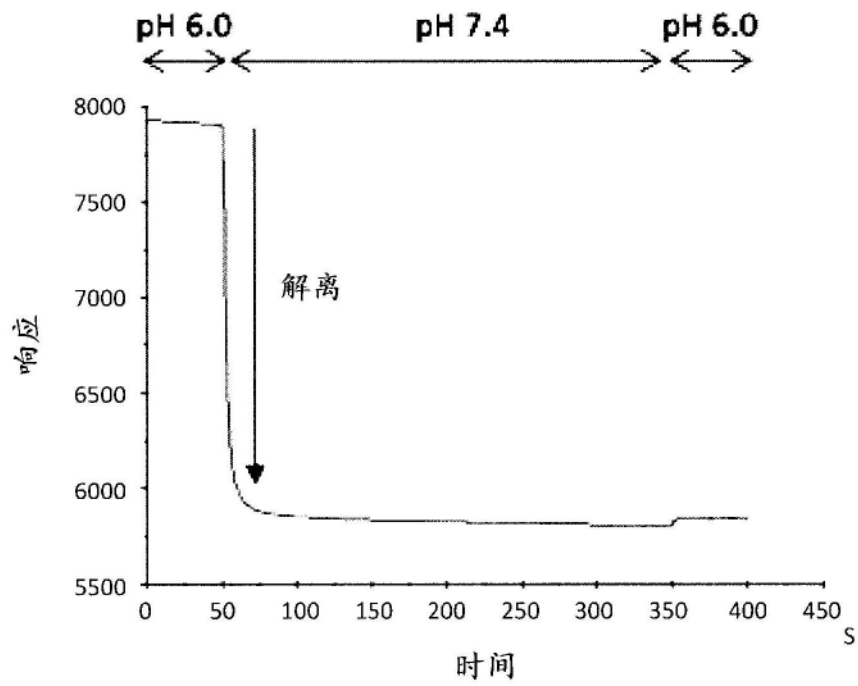


图21-4

配体：生物素化的 EGFR-Fc

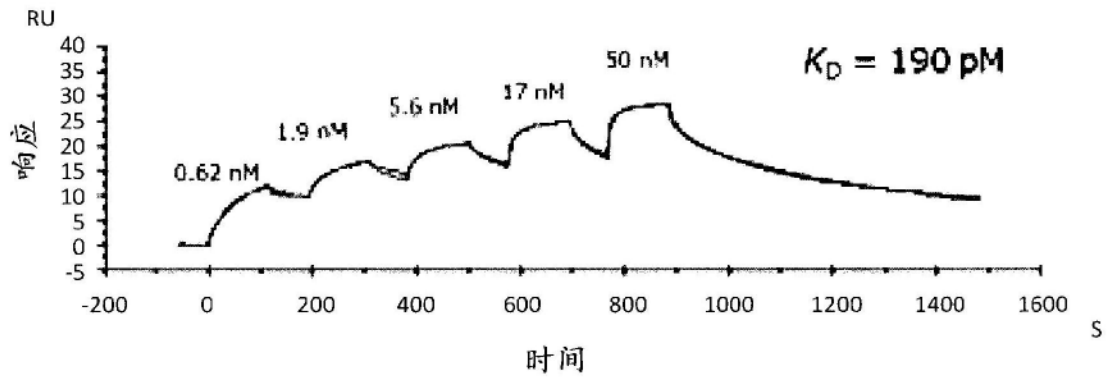


图22-1

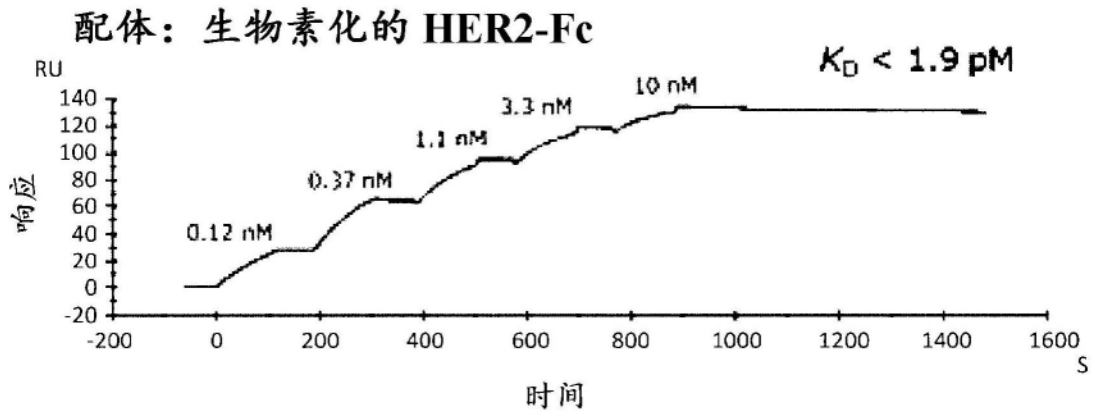


图22-2

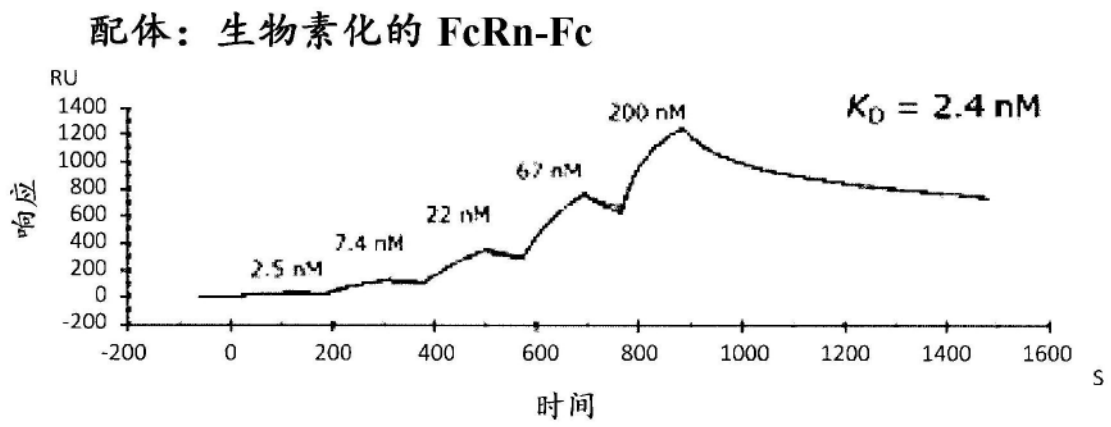


图22-3

配体：生物素化的 FcRn-Fc

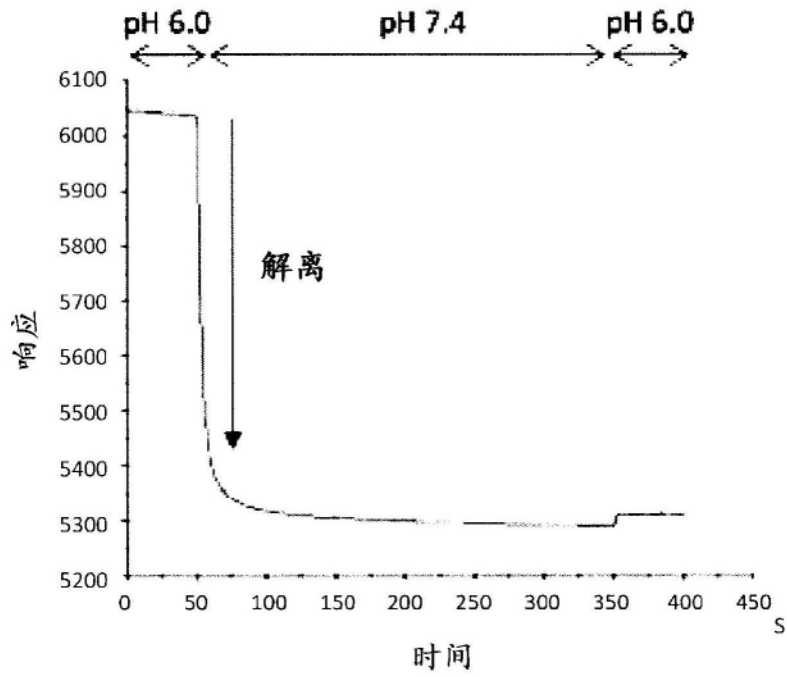


图22-4

配体：生物素化的 EGFR-Fc

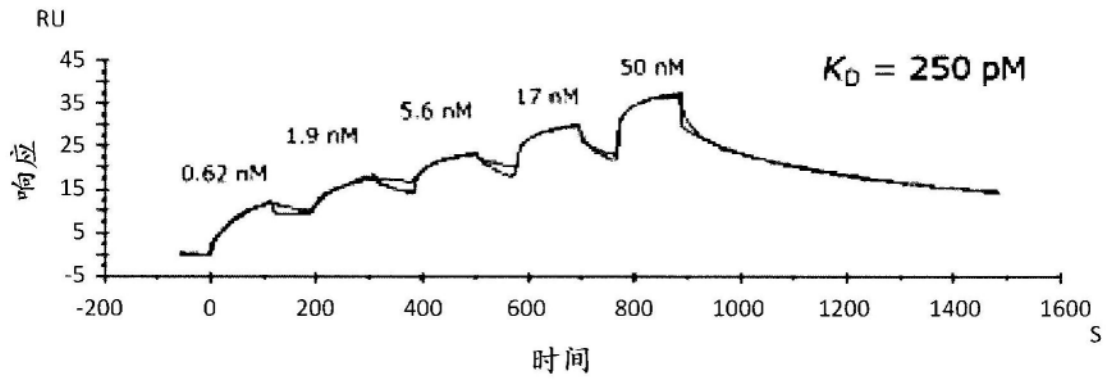


图23-1

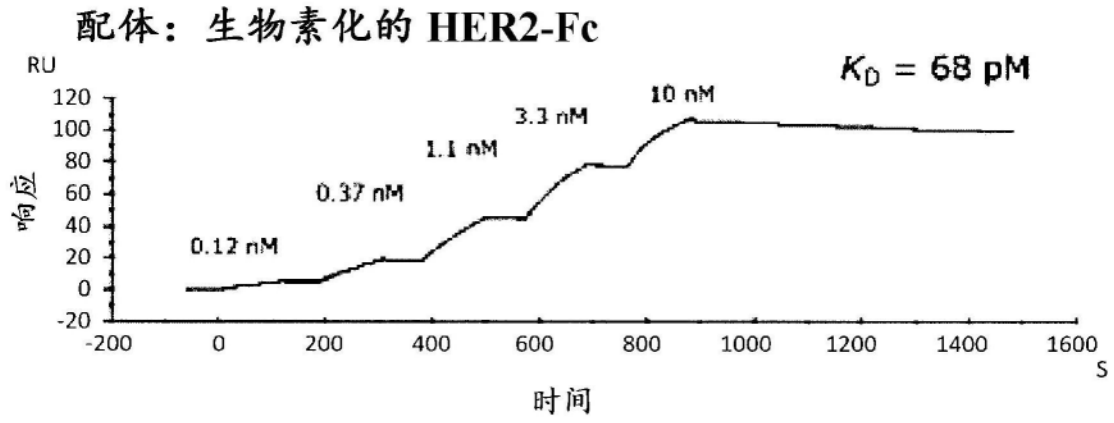


图23-2

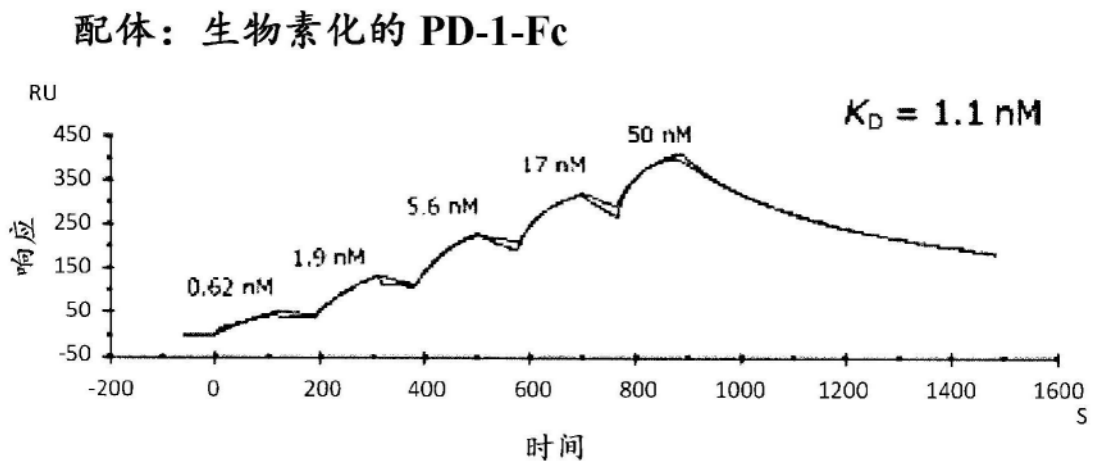


图23-3

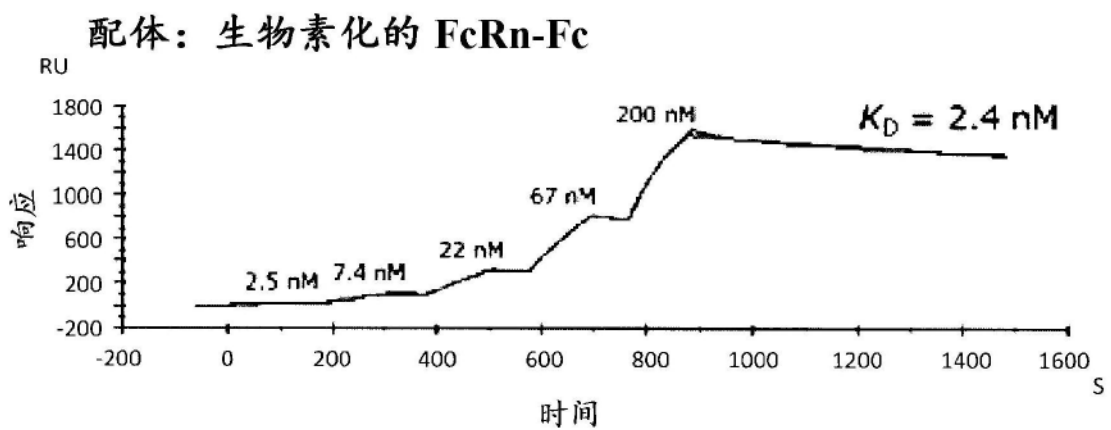


图23-4

配体：生物素化的 FcRn-Fc

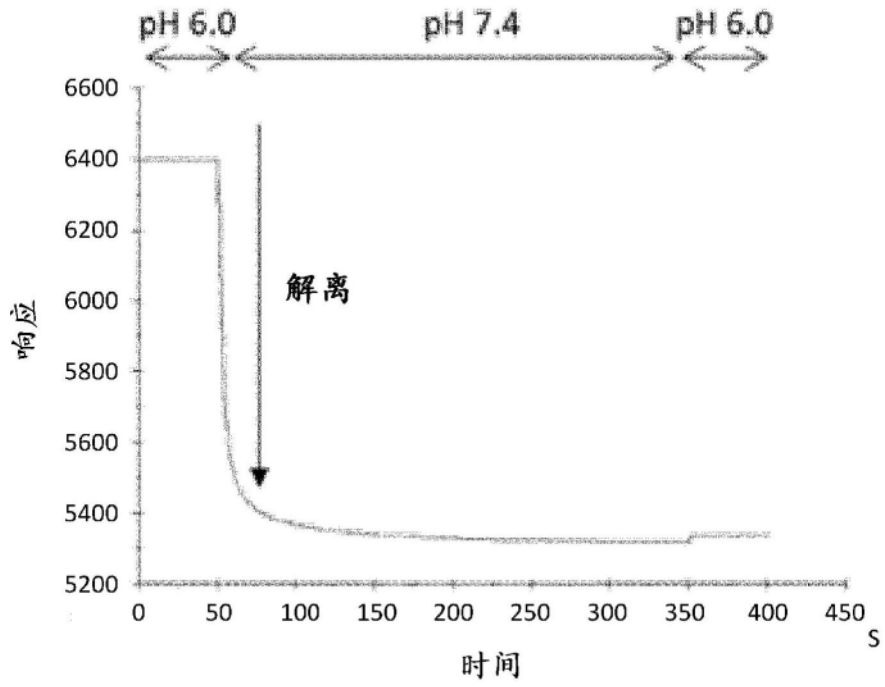


图23-5

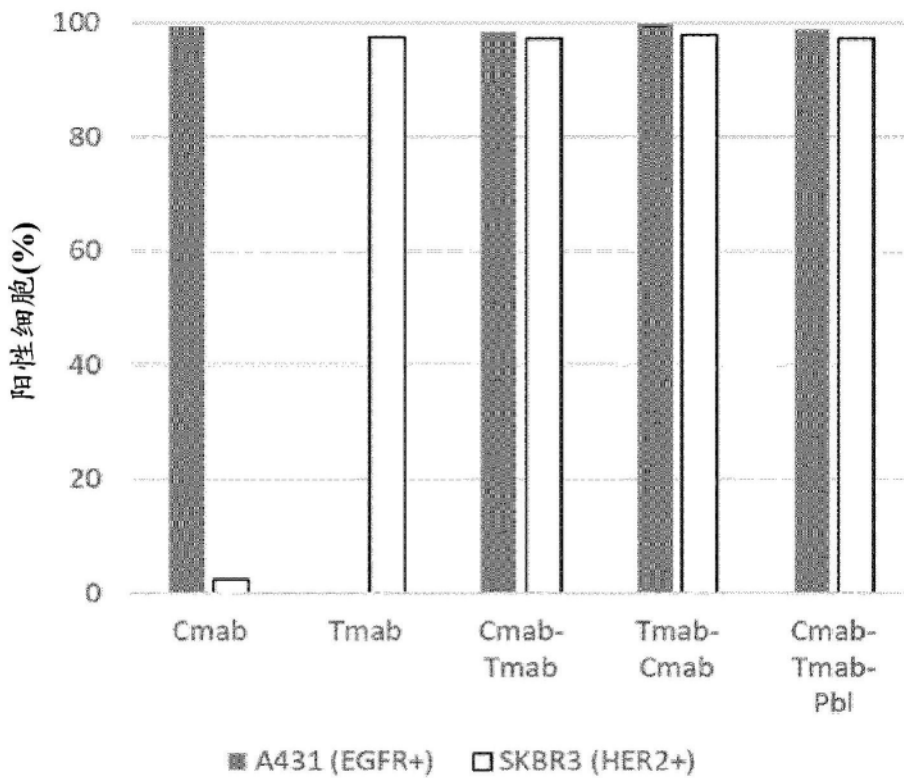


图24-1

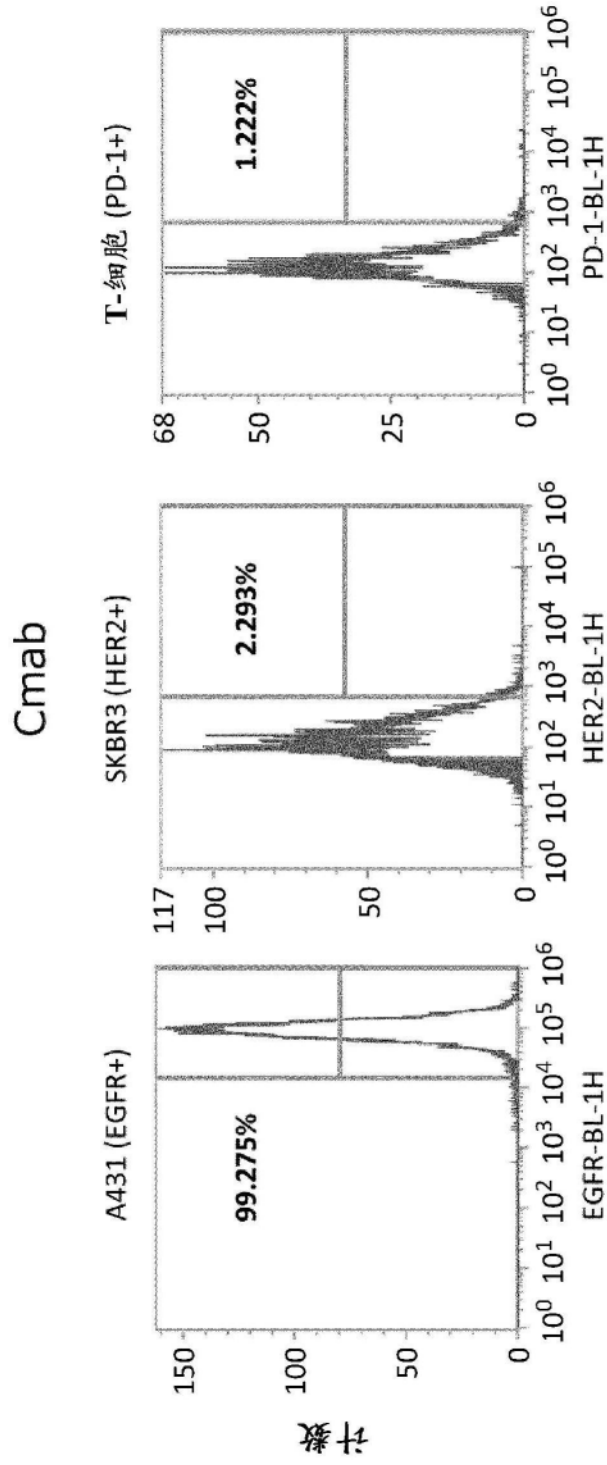


图24-2

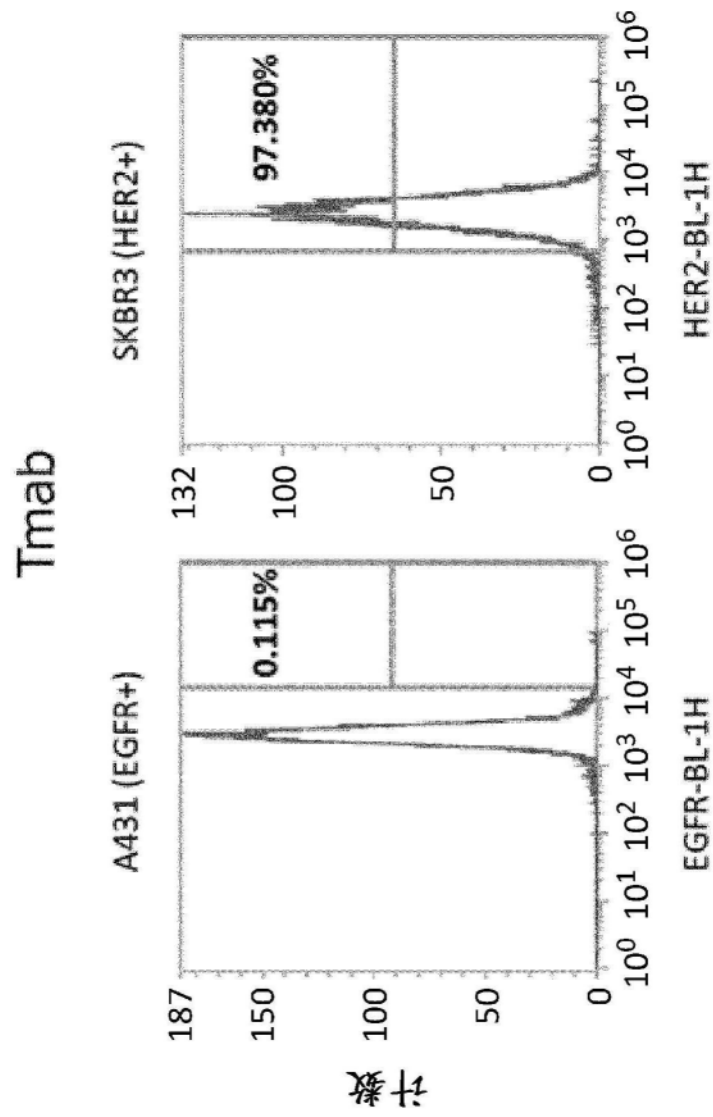


图24-3

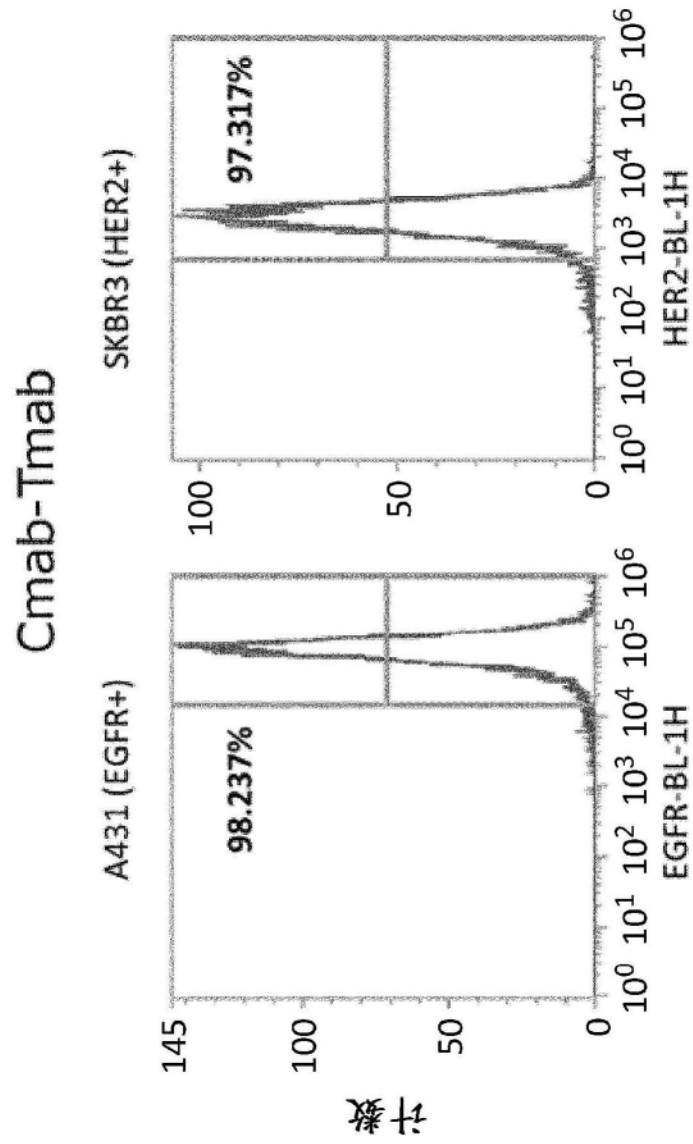


图24-4

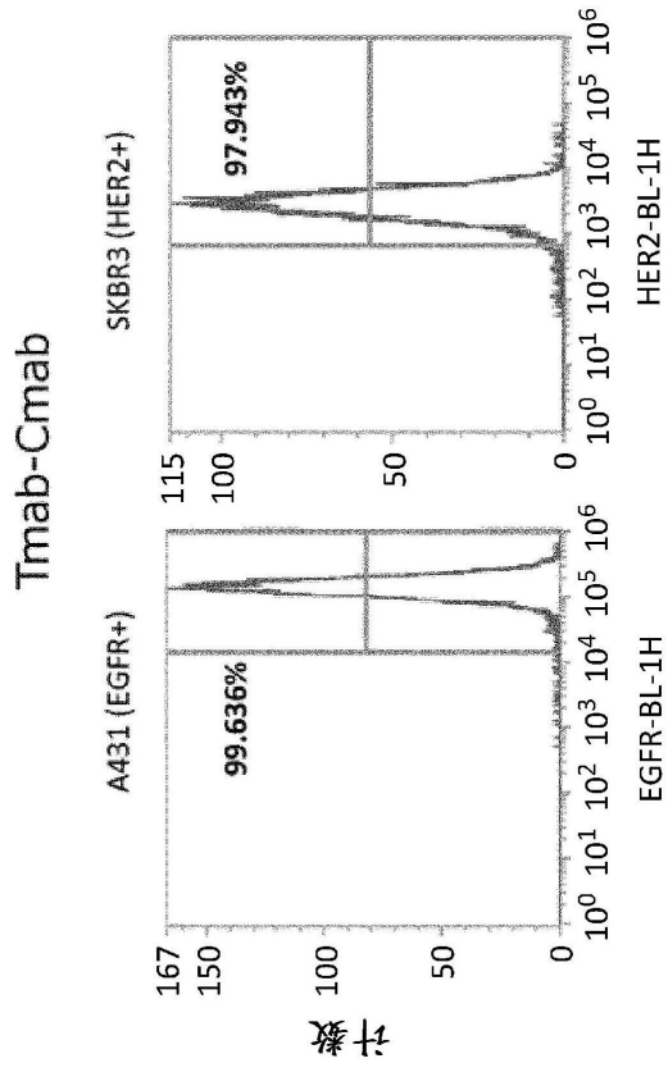


图24-5

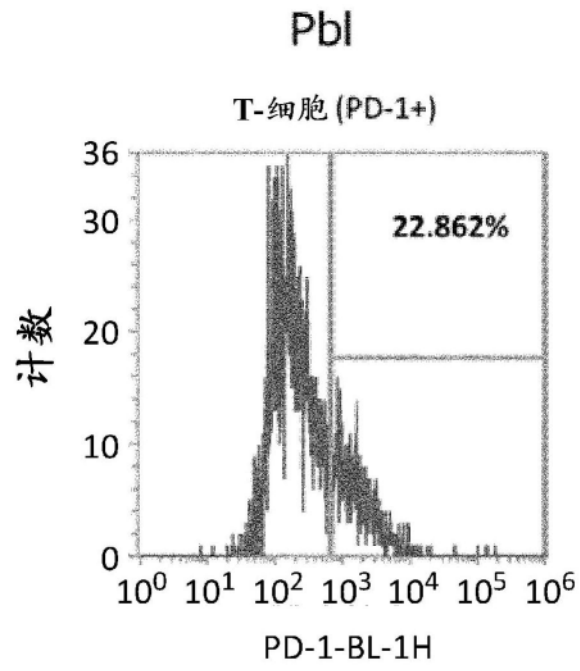


图24-6

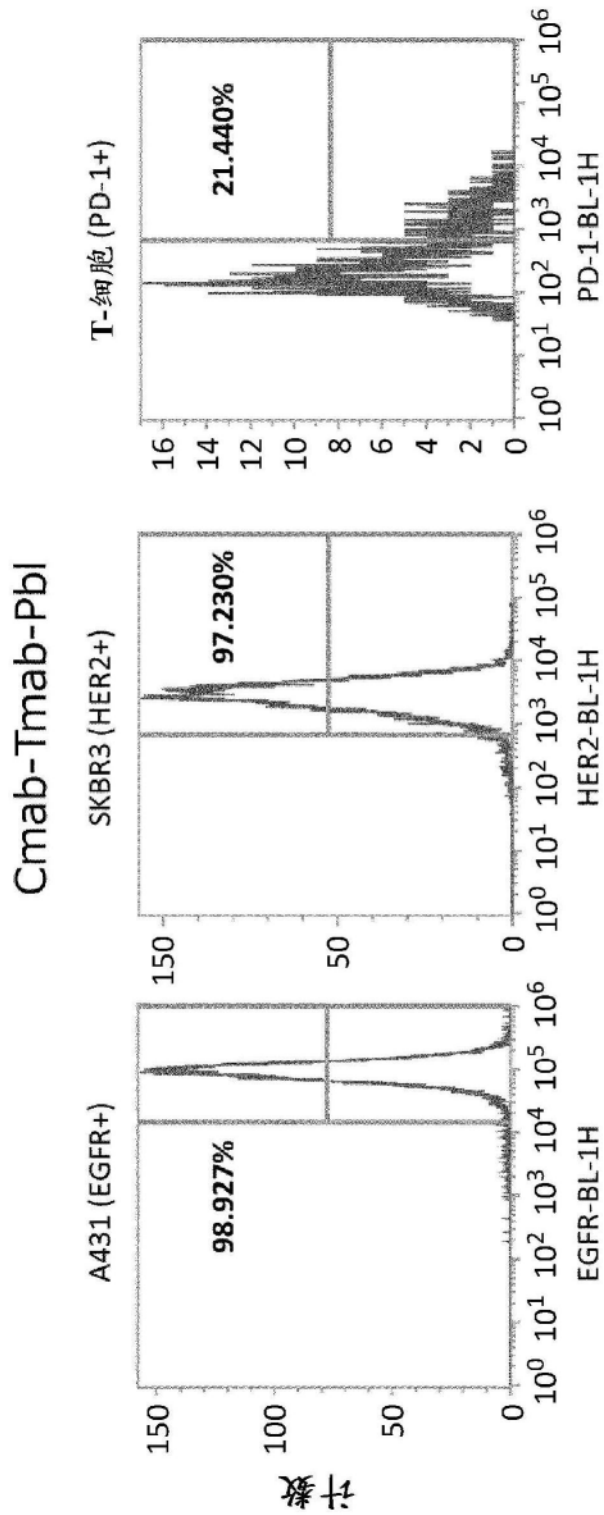


图24-7

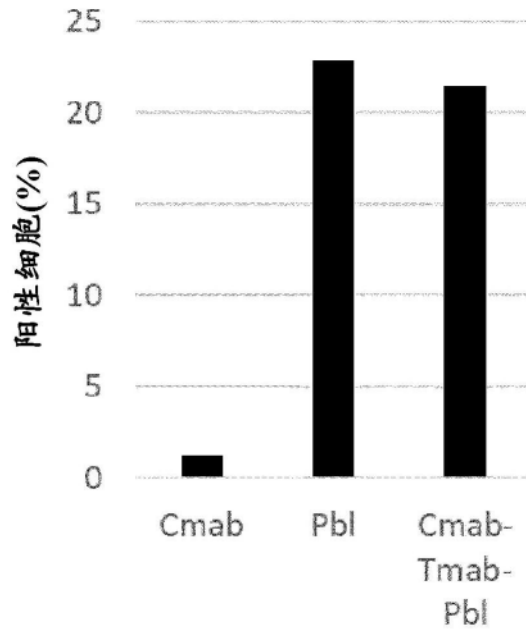


图24-8

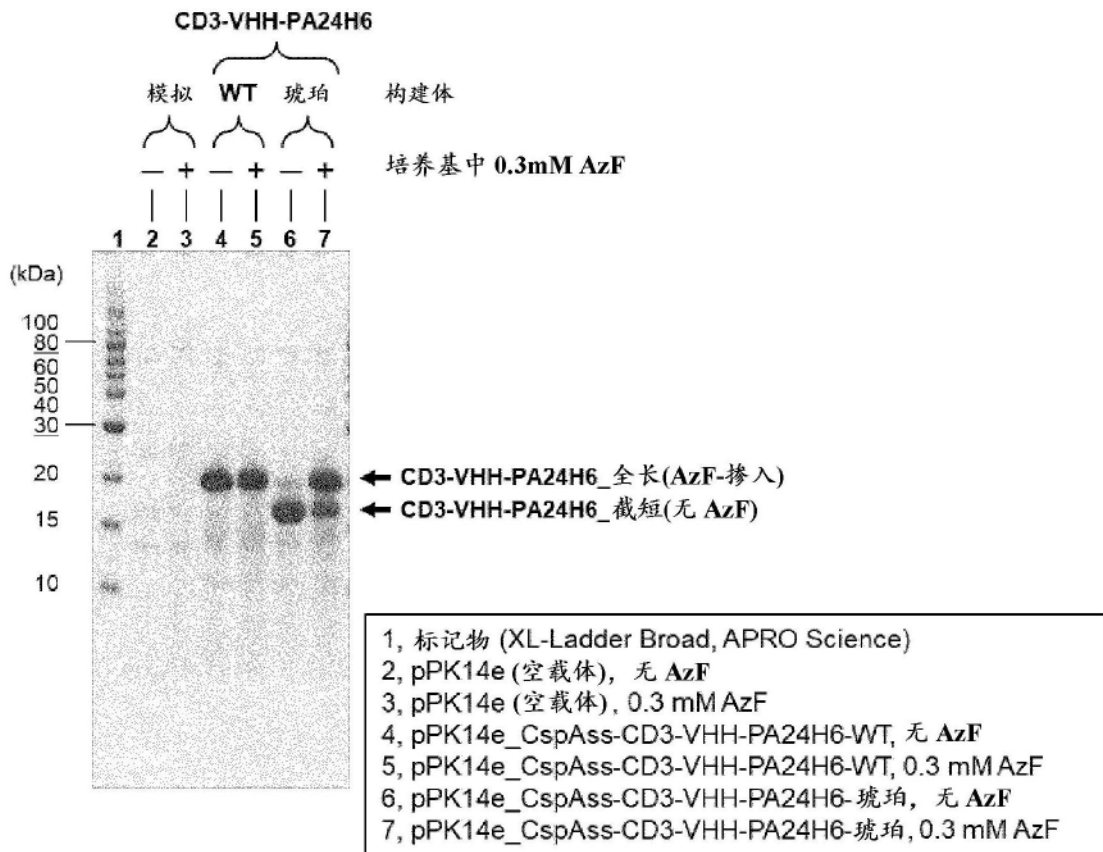


图25

### 配体: rhCD3 $\epsilon$ / $\delta$

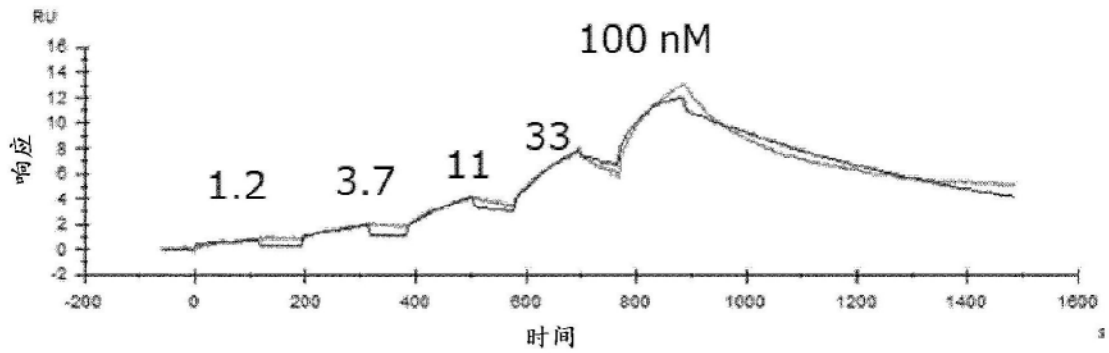
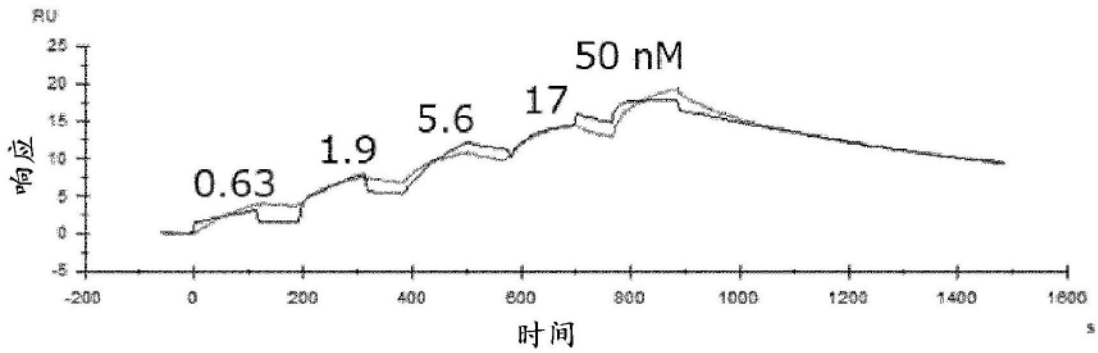


图26

### 配体: rhEGFR



### 配体: rhCD3 $\epsilon$ / $\delta$

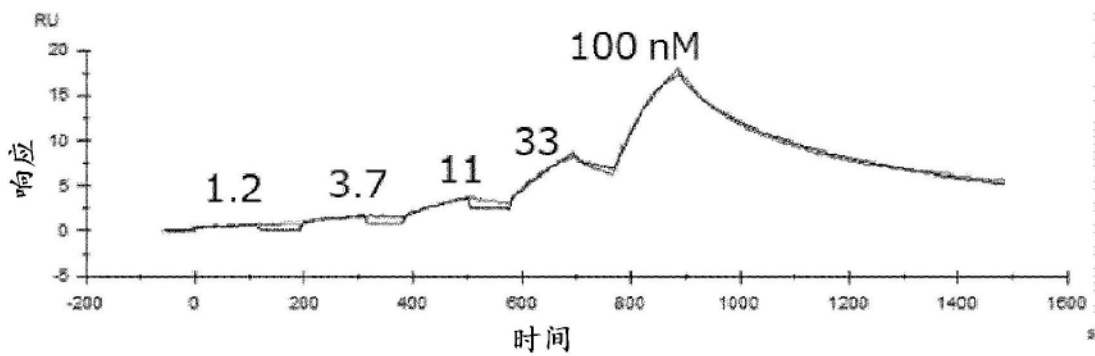
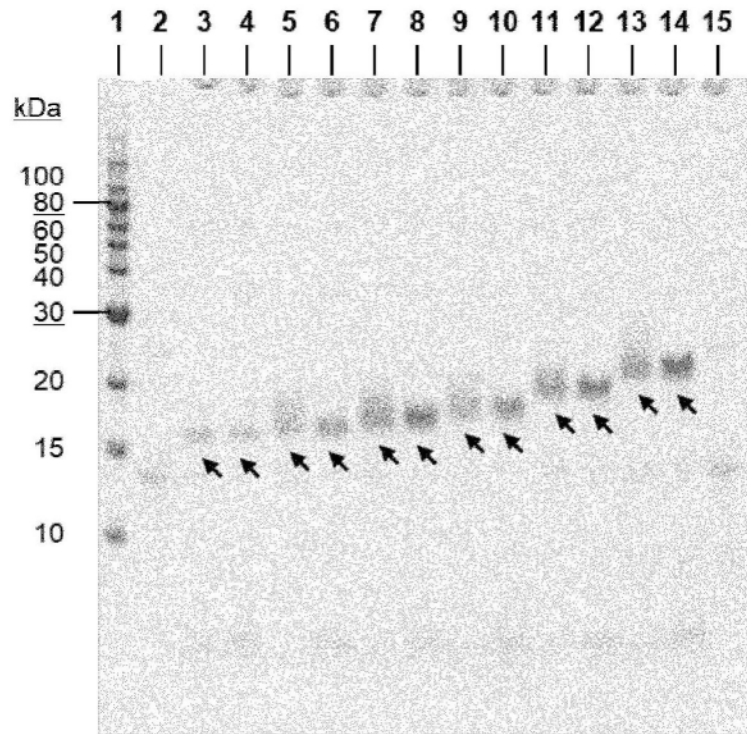


图27



- 1, 标记物 (XL-Ladder Broad, APRO science)
- 2, YDK0107/pPK4 (空载体)
- 3, YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G
- 4, YDK0107 $\Delta$ pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PA48G
- 5, YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56
- 6, YDK0107 $\Delta$ pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS56
- 7, YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60
- 8, YDK0107 $\Delta$ pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS60
- 9, YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64
- 10, YDK0107 $\Delta$ pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS64
- 11, YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68
- 12, YDK0107 $\Delta$ pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS68
- 13, YDK0107/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80
- 14, YDK0107 $\Delta$ pmt1/pPK4\_CspBss-QET-Fc3KR-PAS80
- 15, YDK0107 $\Delta$ pmt1/pPK4 (空载体)

图28