



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110637036 A

(43)申请公布日 2019.12.31

(21)申请号 201880027775.4

(22)申请日 2018.04.27

(30)优先权数据

2017-090679 2017.04.28 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/017345 2018.04.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/199337 JA 2018.11.01

(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 山田慧 松田丰 藤井友博

敷田奈都纪 汤地玲子 新保和高  
伊东祐二

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 卢曼 杨戩

(51)Int.Cl.

*C07K 19/00*(2006.01)

*C07K 16/00*(2006.01)

*C12N 15/09*(2006.01)

权利要求书30页 说明书211页  
序列表46页 附图70页

(54)发明名称

具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐

(57)摘要

本发明提供可溶性蛋白质的修饰技术,尤其是可实现可溶性蛋白质的区域选择性修饰的技术。更具体地,本发明提供以下述式(I)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐;A-L-B-R(I)[式中,A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质;L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团;B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团;R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团]。

1. 一种以下述式 (I) 表示的化合物或其盐, 该化合物具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团;



式中,

A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

L为切割性连接体, 该切割性连接体是包含切割性部分的二价基团,

B为 (a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者 (b) 不含生物正交性官能团的二价基团,

R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团。

2. 根据权利要求1所述的化合物或其盐, 其中, L为:

(i) 切割性连接体, 该切割性连接体是包含切割性部分的二价基团, 该切割性部分具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力; 或者

(ii) 切割性连接体, 该切割性连接体是包含切割性部分的二价基团, 该切割性部分不具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力。

3. 根据权利要求2所述的化合物或其盐, 其中, L为所述 (i) 的切割性连接体。

4. 根据权利要求2或3所述的化合物或其盐, 其中, L为所述 (i) 的切割性连接体, 且B为所述 (b) 的二价基团。

5. 根据权利要求2所述的化合物或其盐, 其中, L为所述 (ii) 的切割性连接体, 且B为所述 (a) 的二价基团。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的化合物或其盐, 其中, 针对可溶性蛋白质的亲和性物质为肽。

7. 根据权利要求6所述的化合物或其盐, 其中, 肽为针对单克隆抗体的Fc区域的结合肽。

8. 根据权利要求7所述的化合物或其盐, 其中, 结合肽为针对IgG的Fc区域的结合肽。

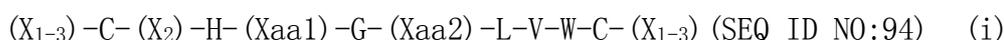
9. 根据权利要求1~8中任一项所述的化合物或其盐, 其中, 所述亲和性物质为针对抗体的亲和性物质, 该抗体包含选自下述 (A) ~ (C) 中的任一种Fc区域蛋白质, 且具有抗原结合能力:

(A) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;

(B) 包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中插入、添加、缺失或取代1个或数个氨基酸残基而形成的氨基酸序列的Fc区域蛋白质; 或者

(C) 包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列显示90%以上的同一性的氨基酸序列的Fc区域蛋白质。

10. 根据权利要求7~9中任一项所述的化合物或其盐, 其中, 结合肽为包含以下述式 (i) 表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列、且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐;



式中,

X相同或不同, 为除半胱氨酸以外的任意氨基酸残基,

C为半胱氨酸残基,

H为组氨酸残基，

Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，

G为甘氨酸残基，

Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基，

L为亮氨酸残基，

V为缬氨酸残基，且

W为色氨酸残基。

11. 根据权利要求7~9中任一项所述的化合物或其盐，其中，结合肽为包含以下述式(i-1)表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列、且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐；



式中，

X相同或不同，为除半胱氨酸以外的任意氨基酸残基，

C为半胱氨酸残基，

H为组氨酸残基，

Xaa1为赖氨酸残基、半胱氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，

G为甘氨酸残基，

Xaa2为谷氨酸残基或天冬酰胺残基，

L为亮氨酸残基，

V为缬氨酸残基，且

W为色氨酸残基。

12. 根据权利要求7~10中任一项所述的化合物或其盐，其中，结合肽为包含以下述式(i-2)表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列、且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐；



式中，

X相同或不同，为除半胱氨酸以外的任意氨基酸残基，

C为半胱氨酸残基，

H为组氨酸残基，

Xaa1为精氨酸残基或亮氨酸残基，

G为甘氨酸残基，

Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基或天冬氨酸残基，

L为亮氨酸残基，

V为缬氨酸残基，且

W为色氨酸残基。

13. 根据权利要求7~12中任一项所述的化合物或其盐，其中，结合肽为包含以下述式(v)表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列、且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或

其盐；

$(X_{1-3})-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7)$  (SEQ ID NO:102) (v)

式中，

X相同或不同，为除半胱氨酸以外的任意氨基酸残基，

C为半胱氨酸残基，

Xaa3为丙氨酸残基或赖氨酸残基，

Xaa4为色氨酸残基或酪氨酸残基，

H为组氨酸残基，

Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，

G为甘氨酸残基，

Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基，

L为亮氨酸残基，

V为缬氨酸残基，

W为色氨酸残基，

Xaa5为苏氨酸残基或赖氨酸残基，

Xaa6为酪氨酸残基、赖氨酸残基或不存在，且

Xaa7为组氨酸残基、赖氨酸残基或不存在。

14. 根据权利要求7~13中任一项所述的化合物或其盐，其中，结合肽的特征在于其为包含以下述式(vi)表示的由13~15个氨基酸残基组成的氨基酸序列、且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐；

$D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7)$  (SEQ ID NO:103) (vi)

式中，

D为天冬氨酸残基，

C为半胱氨酸残基，

Xaa3为丙氨酸残基或赖氨酸残基，

Xaa4为色氨酸残基或酪氨酸残基，

H为组氨酸残基，

Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，

G为甘氨酸残基，

Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基，

L为亮氨酸残基，

V为缬氨酸残基，

W为色氨酸残基，

Xaa5为苏氨酸残基或赖氨酸残基，

Xaa6为酪氨酸残基、赖氨酸残基或不存在，

Xaa7为组氨酸残基、赖氨酸残基或不存在。

15. 根据权利要求7~14中任一项所述的化合物或其盐,其中,结合肽的特征在于其为包含以下述式(vii)表示的由13个氨基酸残基组成的氨基酸序列、且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐;

D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-T (SEQ ID NO:104) (vii)

式中,

D为天冬氨酸残基,

C为半胱氨酸残基,

Xaa3为丙氨酸残基或赖氨酸残基,

Xaa4为色氨酸残基或酪氨酸残基,

H为组氨酸残基,

Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基,

G为甘氨酸残基,

Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基,

L为亮氨酸残基,

V为缬氨酸残基,

W为色氨酸残基,且

T为苏氨酸残基。

16. 根据权利要求7~13中任一项所述的化合物或其盐,其中,结合肽的特征在于其为包含以下述式(viii)表示的由13~15个氨基酸残基组成的氨基酸序列、且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐;

R-G-N-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7) (SEQ ID NO:105) (viii)

式中,

R为精氨酸残基,

G为甘氨酸残基,

N为天冬酰胺残基,

C为半胱氨酸残基,

Xaa3为丙氨酸残基或赖氨酸残基,

Xaa4为色氨酸残基或酪氨酸残基,

H为组氨酸残基,

Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基,

G为甘氨酸残基,

Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基,

L为亮氨酸残基,

V为缬氨酸残基,

W为色氨酸残基,

Xaa5为苏氨酸残基或赖氨酸残基，

Xaa6为酪氨酸残基、赖氨酸残基或不存在，且

Xaa7为组氨酸残基、赖氨酸残基或不存在。

17. 根据权利要求7~16中任一项所述的化合物或其盐，其特征在于，结合肽可与人IgG结合。

18. 根据权利要求7~9中任一项所述的化合物或其盐，其中，结合肽为包含具有下述(a)和(b)的特征的氨基酸序列的亲性肽或其盐，

(a) 在FNMQCRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:92) 的氨基酸序列中，任一氨基酸残基被选自赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基和二氨基丙酸残基中的1个氨基酸残基取代，且

(b) 对于SEQ ID NO:92的所述氨基酸序列具有90%以上的同一性。

19. 根据权利要求1~18中任一项所述的化合物或其盐，其中，切割性部分为可通过下述(a)~(c)中的任一种处理进行切割的部分，

(a) 采用选自酸性物质、碱性物质、还原剂、氧化剂、酶中的1种以上的物质进行的处理；

(b) 采用选自光的物理化学刺激进行的处理；或者

(c) 在使用包含自体分解性的切割性部分的切割性连接体的情况下的放置。

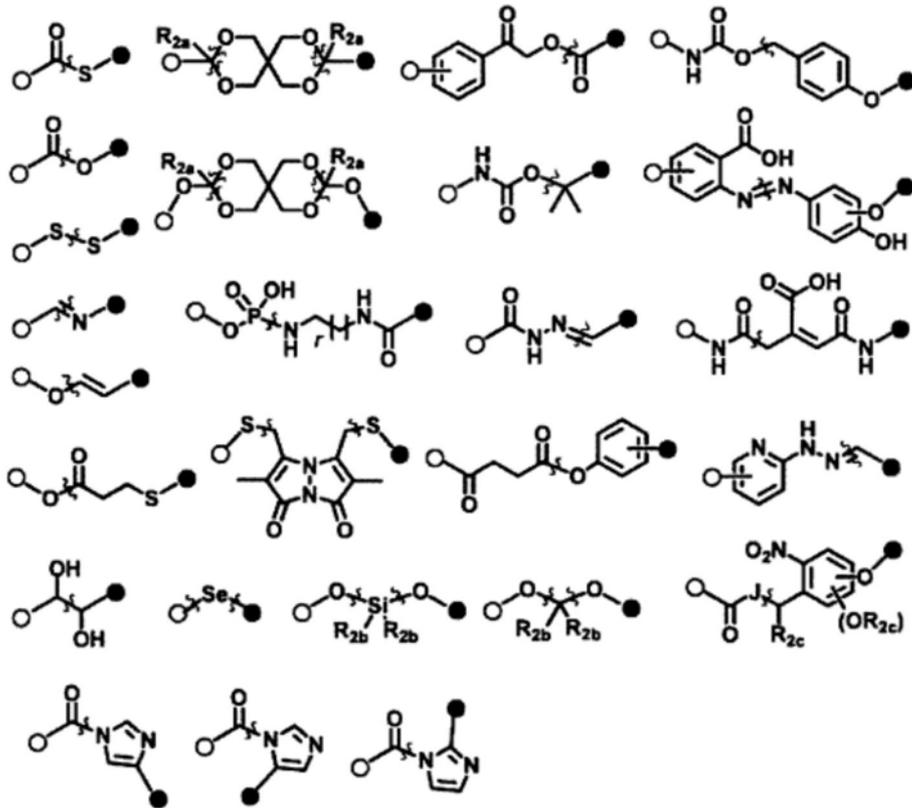
20. 根据权利要求1~19中任一项所述的化合物或其盐，其中，所述切割性部分选自二硫残基、缩醛残基、缩酮残基、酯残基、氨甲酰基残基、烷氧基烷基残基、亚胺残基、叔烷基氧基氨基甲酸酯残基、硅烷残基、含有脞的残基、氨基磷酸酯残基、乌头酰基残基、三苯甲基残基、偶氮残基、邻二醇残基、硒残基、含有具有吸电子基团的芳环的残基、含有香豆素的残基、含有砷的残基、含有不饱和键的链残基、糖基残基。

21. 根据权利要求2~20中任一项所述的化合物或其盐，其中，所述(i)的切割性部分选自二硫残基、酯残基、缩醛残基、缩酮残基、亚胺残基、邻二醇残基。

22. 根据权利要求2~20中任一项所述的化合物或其盐，其中，所述(ii)的切割性部分选自酯残基、氨甲酰基残基、烷氧基烷基残基、亚胺残基、叔烷基氧基氨基甲酸酯残基、硅烷残基、含有脞的残基、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、含有具有吸电子基团的芳环的残基、含有香豆素的残基、含有砷的残基、含有不饱和键的链残基、糖基残基。

23. 根据权利要求1~20中任一项所述的化合物或其盐，其中，切割性部分对应于选自下述组中的任一化学结构；

[化学式1]



在此,与键正交的波浪线表示切割位点,

多个 $R_{2a}$ 、多个 $R_{2b}$ 和多个 $R_{2c}$ 相同或不同,选自下述(i)~(vii):

(i) 氢原子或卤素原子;

(ii) 一价烃基;

(iii) 芳烷基;

(iv) 一价杂环基;

(v)  $R_c-O-$ 、 $R_c-C(=O)-$ 、 $R_c-O-C(=O)-$ 或 $R_c-C(=O)-O-$ ,其中 $R_c$ 表示氢原子或一价烃基;

(vi)  $NR_dR_e-$ 、 $NR_dR_e-C(=O)-$ 、 $NR_dR_e-C(=O)-O-$ 或 $R_d-C(=O)-NR_e-$ ,其中 $R_d$ 和 $R_e$ 相同或不同,表示氢原子或一价烃基;或者

(vii) 硝基、硫酸基、磺酸基、氰基或羧基,

J为 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 或 $-S-$ ,

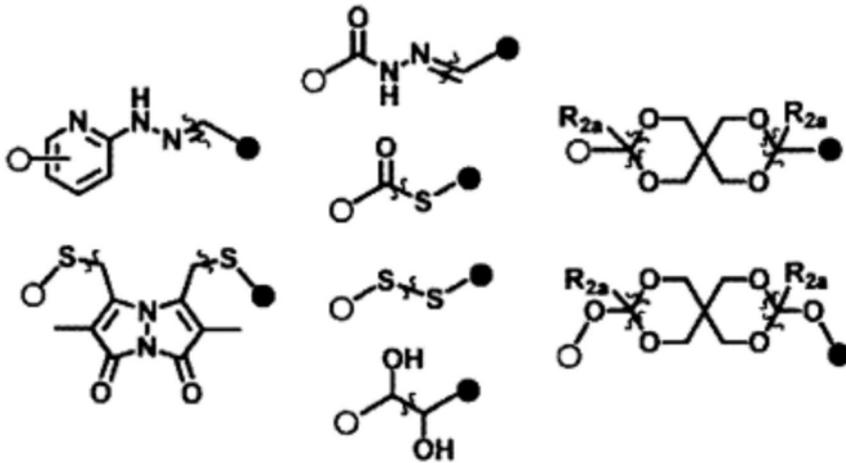
r为1~4的任意整数,

○(白色圆)表示与A结合的键,●(黑色圆)表示与B结合的键,

在化学结构以切割位点为中心呈不对称的情况下,可以是●表示与A结合的键,○表示与B结合的键。

24. 根据权利要求2~19、21、23中任一项所述的化合物或其盐,其中,所述(i)的切割性部分对应于选自下述组中的任一化学结构;

[化学式2]



在此,与键正交的波浪线表示切割位点,

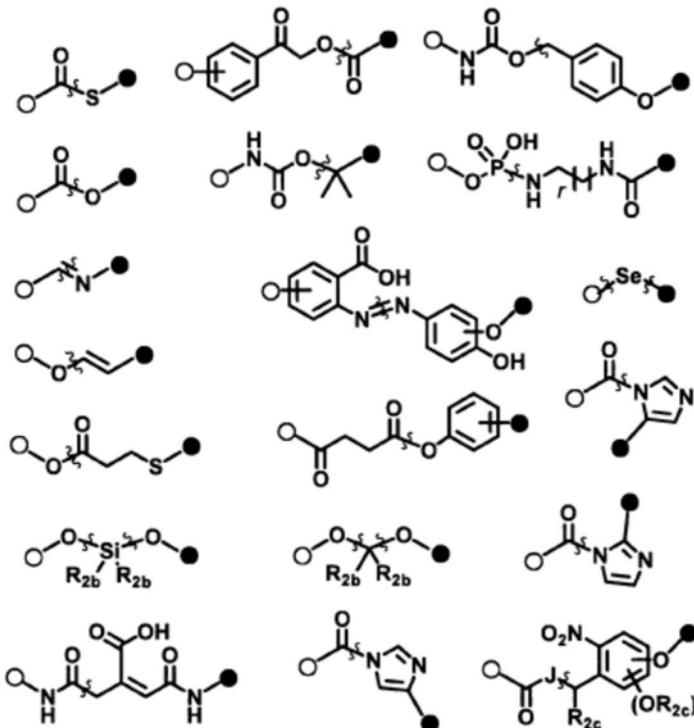
R<sub>2a</sub>与权利要求23中相应符号的含义相同,

○(白色圆)表示与A结合的键,●(黑色圆)表示与B结合的键,

在化学结构以切割位点为中心呈不对称的情况下,可以是●表示与A结合的键,○表示与B结合的键。

25. 根据权利要求2~19、22、23中任一项所述的化合物或其盐,其中,所述(ii)的切割性部分对应于选自下述组中的任一化学结构;

[化学式3]



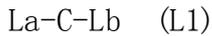
在此,与键正交的波浪线表示切割位点,

R<sub>2b</sub>、R<sub>2c</sub>、J、r与权利要求23中相应符号的含义相同,

○(白色圆)表示与A结合的键,●(黑色圆)表示与B结合的键,

在化学结构以切割位点为中心呈不对称的情况下,可以是●表示与A结合的键,○表示与B结合的键。

26. 根据权利要求1~25中任一项所述的化合物或其盐,其中,L以下述式(L1)~(L3)中的任一式表示;



式中,

La和Lb分别为二价基团,

C为切割性部分。

27. 根据权利要求26所述的化合物或其盐,其中,所述La和Lb分别以下述(La')和(Lb')表示;

[化学式4]



式中,

p和p'相同或不同,为0~10的任意整数,

q和q'相同或不同,为0~10的任意整数,

X和X'相同或不同,为碳原子、氮原子或单键;在此,在X为氮原子的情况下,R<sub>1b</sub>不存在;在X'为氮原子的情况下,R<sub>1b'</sub>不存在;在X为单键的情况下,R<sub>1a</sub>和R<sub>1b</sub>不存在;在X'为单键的情况下,R<sub>1a'</sub>和R<sub>1b'</sub>不存在,

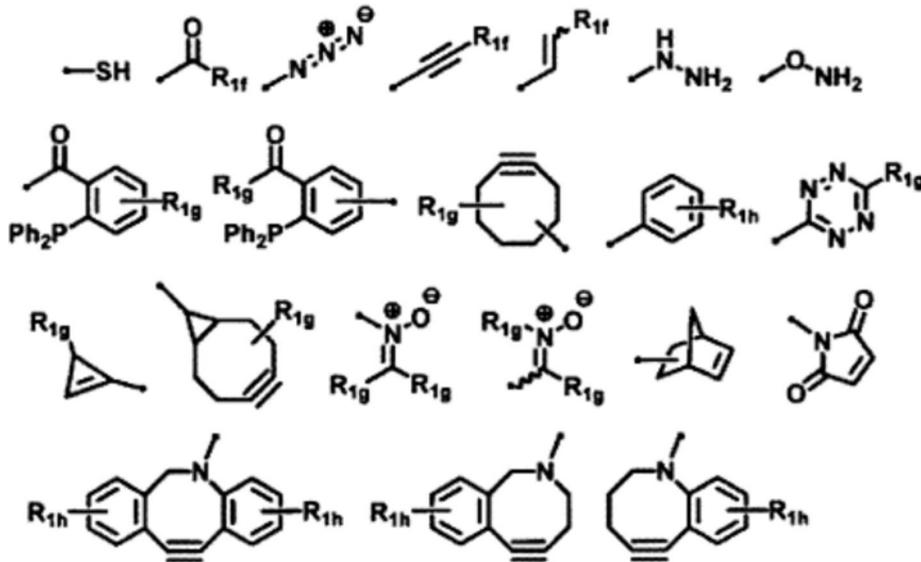
R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a'</sub>和R<sub>1b'</sub>相同或不同,为选自所述(i)~(vii)中的原子或基团。

28. 根据权利要求1~27中任一项所述的化合物或其盐,其中,包含生物正交性官能团的二价基团为:在主链中包含选自叠氮残基、醛残基、硫醇残基、炔烃残基、烯烃残基、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、二硫残基、硫酯基、 $\alpha$ -卤化羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基中的生物正交性官能团的二价基团。

29. 根据权利要求1~27中任一项所述的化合物或其盐,其中,包含生物正交性官能团的二价基团为:在侧链中包含选自叠氮残基、醛残基、硫醇残基、炔烃残基、烯烃残基、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、二硫残基、 $\alpha$ -卤化羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基中的生物正交性官能团的二价基团。

30. 根据权利要求1~29中任一项所述的化合物或其盐,其中,生物正交性官能团为以下述式表示的任一基团;

[化学式5]



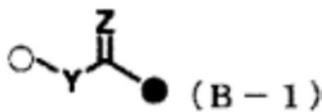
式中，

R<sub>1f</sub>、一个或多个R<sub>1g</sub>及一个或多个R<sub>1h</sub>相同或不同，为选自所述(i)～(vii)中的原子或基团、或者吸电子基团，

• 表示键。

31. 根据权利要求1～30中任一项所述的化合物或其盐，其中，所述(b)的二价基团选自可取代的亚烷基、可取代的亚环烷基、可取代的芳基、可取代的二价杂环基、-NR<sub>a</sub>-、-O-、或这些基团中的2个以上的组合；其中R<sub>a</sub>表示氢原子或取代基。

32. 根据权利要求1～31中任一项所述的化合物或其盐，其中，B以下述式(B-1)表示；  
[化学式6]



式中，

Y为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-、或下述式(B-2)

[化学式7]



式(B-2)中，

V和V'相同或不同，为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或单键，

V<sub>1</sub>为包含生物正交性官能团的二价基团，

s为0～10的任意整数，

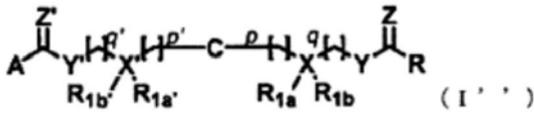
式(B-2)中的○和●的取向分别与式(B-1)中的○和●的取向相同；

Z为氧原子、硫原子或氢原子，在Z为氢原子的情况下，-C(=Z)-表示-CH<sub>2</sub>-；

式(B-1)中的○(白色圆)表示与L侧部分结合的键，●(黑色圆)表示与R侧部分结合的键。

33. 根据权利要求1～32中任一项所述的化合物或其盐，其中，反应性基团为对于赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基中的任一残基的侧链具有特异性的反应性基团。





式中，

A和R与权利要求1所述的式(I)中相应符号的含义相同，

C为切割性部分，

p、p'、q、q'、X、X'、R<sub>1a</sub>、R<sub>1a'</sub>、R<sub>1b</sub>和R<sub>1b'</sub>与权利要求27所述的式(La')和(Lb')中相应符号的含义相同，

Y和Y'相同或不同，与权利要求32所述的式(B-1)的Y含义相同，

Z和Z'相同或不同，与所述式(B-1)的Z含义相同。

41. 一种可溶性蛋白质的区域选择性修饰试剂，其中，包含以下述式(I)表示的化合物或其盐，该化合物具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团；



式中，

A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

B为(a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b) 不含生物正交性官能团的二价基团，

R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团。

42. 一种以下述式(I)表示的化合物或其盐，该化合物具有针对抗体的亲和性物质、切割性部分及反应性基团；



式中，

A为针对抗体的亲和性物质，

L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

B为(a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b) 不含生物正交性官能团的二价基团，

R为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

43. 一种抗体的区域选择性修饰试剂，其中，包含以下述式(I)表示的化合物或其盐，该化合物具有针对抗体的亲和性物质、切割性部分及反应性基团；



式中，

A为针对抗体的亲和性物质，

L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

B为(a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b) 不含生物正交性官能团的二价基团，

R为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

44. 一种以下述式(II)表示的可溶性蛋白质或其盐，该可溶性蛋白质具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分；

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

式中，

A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团，

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

T为可溶性蛋白质。

45. 根据权利要求44所述的可溶性蛋白质或其盐，其中，可溶性蛋白质为单克隆抗体。

46. 根据权利要求44或45所述的可溶性蛋白质或其盐，其中，可溶性蛋白质为IgG抗体。

47. 根据权利要求44~46中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐，其中，可溶性蛋白质来源于人。

48. 根据权利要求44~47中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐，其中，可溶性蛋白质为包含选自下述(A)~(C)中的任一种Fc区域蛋白质，且具有抗原结合能力的抗体：

(A) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的Fc区域蛋白质；

(B) 包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中插入、添加、缺失或取代1个或数个氨基酸残基而形成的氨基酸序列的Fc区域蛋白质；或者

(C) 包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列显示90%以上的同一性的氨基酸序列的Fc区域蛋白质。

49. 根据权利要求44~48中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐，其中，

可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基，且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基，

以A-L-B-R'表示的结构单元对于所述靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合。

50. 根据权利要求49所述的可溶性蛋白质或其盐，其中，所述靶区为由连续的1~10个氨基酸残基形成的区域。

51. 根据权利要求50所述的可溶性蛋白质或其盐，其中，所述靶区为由连续的1~3个氨基酸残基形成的区域。

52. 根据权利要求51所述的可溶性蛋白质或其盐，其中，所述靶区为：

(a) 由人IgG Fc区域中的第246~248位氨基酸残基形成的区域、

(b) 由人IgG Fc区域中的第288~290位氨基酸残基形成的区域、或者

(c) 由人IgG Fc区域中的第317位氨基酸残基形成的区域。

53. 根据权利要求49~52中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐，其中，所述区域选择性为50%以上。

54. 根据权利要求53所述的可溶性蛋白质或其盐，其中，所述区域选择性为70%以上。

55. 根据权利要求54所述的可溶性蛋白质或其盐，其中，所述区域选择性为90%以上。

56. 根据权利要求49~55中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐，其中，所述特定氨基酸残基在以存在于特定位置的特定氨基酸为中心时分别从N末端侧和C末端侧起到相隔a个氨基酸残基的位置为止的区域中，除所述存在于特定位置的特定氨基酸残基以外，不含与特

定氨基酸残基同种的氨基酸残基;在此,a为1~10的任意整数。

57. 根据权利要求44~56中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述可溶性蛋白质为包含多个单体蛋白质的多聚体蛋白质,

T在多个单体蛋白质中的对应的多个靶区中具有以A-L-B-R'表示的结构单元,因而所述多聚体蛋白质具有多个以A-L-B-R'表示的结构单元。

58. 根据权利要求44~57中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述可溶性蛋白质为包含多个重链的抗体,

T在多个重链中的对应的多个靶区中具有以A-L-B-R'表示的结构单元,因而所述抗体具有多个以A-L-B-R'表示的结构单元。

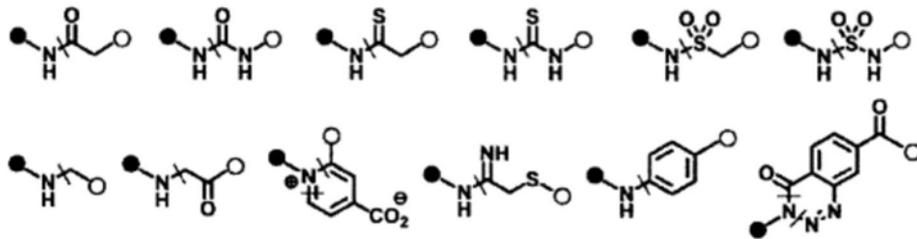
59. 根据权利要求58所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,重链的个数为2个。

60. 根据权利要求44~59中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分为:通过赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基与对于赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基中的任一残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分。

61. 根据权利要求44~60中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分为:通过赖氨酸残基与对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分。

62. 根据权利要求44~61中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述通过反应而生成的部分对应于选自下述组中的任一化学结构;

[化学式10]



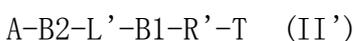
在此,●(黑色圆)表示与T侧的部分结合的键,○(白色圆)表示与B侧的部分结合的键,与键正交的直线表示通过反应而生成的键。

63. 根据权利要求44~62中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,连结A和R'的主链的原子数为4~20个。

64. 根据权利要求44~63中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,连结A和R的主链不含环结构。

65. 根据权利要求44~64中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,以L-B表示的部分结构不含肽部分。

66. 根据权利要求44~65中任一项所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,以所述式(II)表示的化合物为以下述式(II')表示的化合物:



式中,

A、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

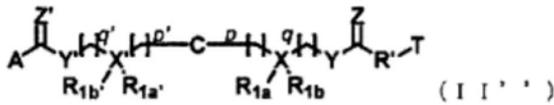
L'为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

B1和B2相同或不同,为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

B1和B2可具有以L'为中心的对称结构。

67. 根据权利要求66所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,以所述式(II')表示的化合物以下述式(II'')表示;

[化学式11]



式中,

A、R'和T与权利要求44所述的式(II)中相应符号的含义相同,

C为切割性部分,

p和p'相同或不同,为0~10的任意整数,

q和q'相同或不同,为0~10的任意整数,

X和X'相同或不同,为碳原子、氮原子或单键;在此,在X为氮原子的情况下,R<sub>1b</sub>不存在;在X'为氮原子的情况下,R<sub>1b</sub>'不存在;在X为单键的情况下,R<sub>1a</sub>和R<sub>1b</sub>不存在;在X'为单键的情况下,R<sub>1a</sub>'和R<sub>1b</sub>'不存在,

R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a</sub>'和R<sub>1b</sub>'相同或不同,选自下述(i)~(vii):

(i) 氢原子或卤素原子;

(ii) 一价烷基;

(iii) 芳烷基;

(iv) 一价杂环基;

(v) R<sub>c</sub>-O-、R<sub>c</sub>-C(=O)-、R<sub>c</sub>-O-C(=O)-或R<sub>c</sub>-C(=O)-O-,其中R<sub>c</sub>表示氢原子或一价烷基;

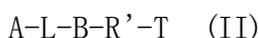
(vi) NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-、NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-C(=O)-、NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-C(=O)-O-或R<sub>d</sub>-C(=O)-NR<sub>e</sub>-,其中R<sub>d</sub>和R<sub>e</sub>相同或不同,表示氢原子或一价烷基;或者

(vii) 硝基、硫酸基、磺酸基、氰基或羧基,

Y和Y'相同或不同,与权利要求32所述的式(B-1)中的Y含义相同,

Z和Z'相同或不同,与权利要求32所述的式(B-1)中的Z含义相同。

68. 一种以下述式(II)表示的抗体或其盐,该抗体具有针对抗体的亲和性物质及切割性部分;



式中,

A为针对抗体的亲和性物质,

L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

R'为通过抗体与对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分,

T为抗体。

69. 一种方法,其是具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,该方法包含:

使以下述式(I)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应,生成以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序;

所述式(I)为:



式中,

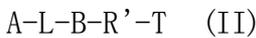
A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团;

所述式(II)为:



式中,

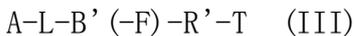
A、L和B与所述式(I)中相应符号的含义相同,

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

T为可溶性蛋白质。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中,可溶性蛋白质为抗体,反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

71. 一种以下述式(III)表示的复合物或其盐,该复合物具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质;



式中,

A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

F为功能性物质,

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

T为可溶性蛋白质。

72. 根据权利要求71所述的复合物或其盐,其中,可溶性蛋白质为单克隆抗体。

73. 根据权利要求71或72所述的复合物或其盐,其中,可溶性蛋白质为IgG抗体。

74. 根据权利要求71~73中任一项所述的复合物或其盐,其中,可溶性蛋白质来源于人。

75. 根据权利要求71~74中任一项所述的复合物或其盐,其中,可溶性蛋白质为包含选自下述(A)~(C)中的任一种Fc区域蛋白质,且具有抗原结合能力的抗体:

(A) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;

(B) 包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中插入、添加、缺失或取代1个或数个氨基酸残基

而形成的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;或者

(C) 包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列显示90%以上的同一性的氨基酸序列的Fc区域蛋白质。

76. 根据权利要求71~75中任一项所述的复合物或其盐,其中,

可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基,

以A-L-B' (-F) -R'表示的结构单元对于所述靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合。

77. 根据权利要求76所述的复合物或其盐,其中,所述特定氨基酸残基在以存在于特定位置的特定氨基酸为中心时分别从N末端侧和C末端侧起到相隔a个氨基酸残基的位置为止的区域中,除所述存在于特定位置的特定氨基酸残基以外,不含与特定氨基酸残基同种的氨基酸残基;在此,a为1~10的任意整数。

78. 根据权利要求71~77中任一项所述的复合物或其盐,其中,

所述可溶性蛋白质为包含多个单体蛋白质的多聚体蛋白质,

T在多个单体蛋白质中的对应的多个靶区中具有以A-L-B' (-F) -R'表示的结构单元,因而所述多聚体蛋白质具有多个以A-L-B' (-F) -R'表示的结构单元。

79. 根据权利要求71~78中任一项所述的复合物或其盐,其中,

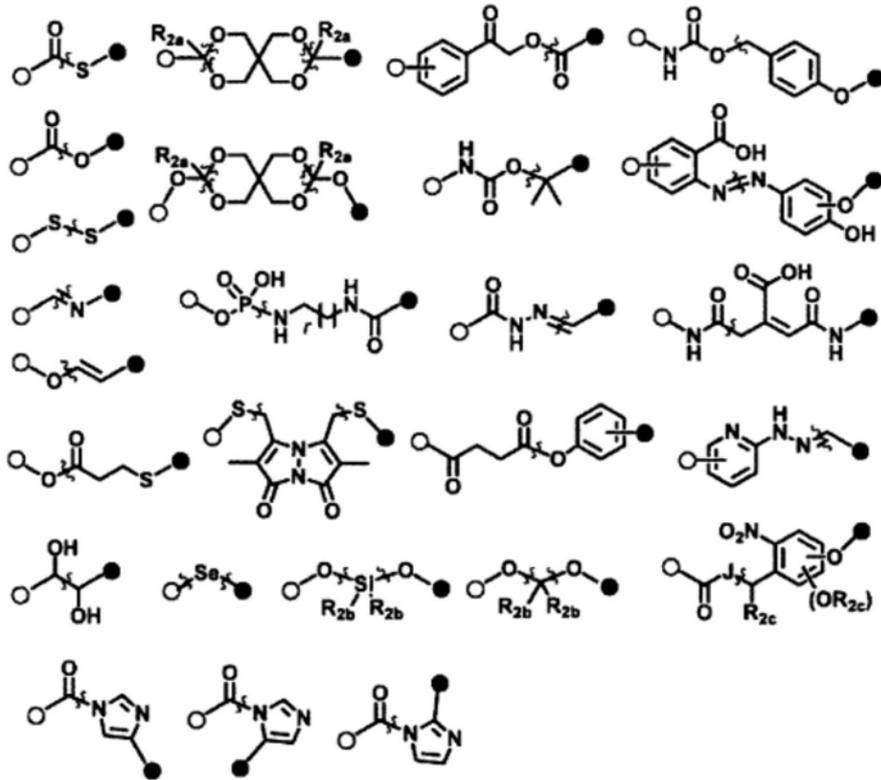
所述可溶性蛋白质为包含多个重链的抗体,

T在多个重链中的对应的多个靶区中具有以A-L-B' (-F) -R'表示的结构单元,因而所述抗体具有多个以A-L-B' (-F) -R'表示的结构单元。

80. 根据权利要求71~79中任一项所述的复合物或其盐,其中,包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团为:包含选自二硫残基、缩醛残基、缩酮残基、酯残基、氨甲酰基残基、烷氧基烷基残基、亚胺残基、叔烷基氧基氨基甲酸酯残基、硅烷残基、含有脞的残基、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、含有具有吸电子基团的芳环的残基、含有香豆素的残基、含有砷的残基、含有不饱和键的链残基、糖基残基中的反应部分的二价基团。

81. 根据权利要求71~80中任一项所述的复合物或其盐,其中,所述通过反应而生成的部分对应于选自下述组中的任一化学结构;

[化学式12]



在此,与键正交的波浪线表示通过反应而生成的键,

多个 $R_{2a}$ 、多个 $R_{2b}$ 和多个 $R_{2c}$ 相同或不同,选自下述(i)~(vii):

(i) 氢原子或卤素原子;

(ii) 一价烃基;

(iii) 芳烷基;

(iv) 一价杂环基;

(v)  $R_c-O-$ 、 $R_c-C(=O)-$ 、 $R_c-O-C(=O)-$ 或 $R_c-C(=O)-O-$ ,其中 $R_c$ 表示氢原子或一价烃基;

(vi)  $NR_dR_e-$ 、 $NR_dR_e-C(=O)-$ 、 $NR_dR_e-C(=O)-O-$ 或 $R_d-C(=O)-NR_e-$ ,其中 $R_d$ 和 $R_e$ 相同或不

同,表示氢原子或一价烃基;或者

(vii) 硝基、硫酸基、磺酸基、氰基或羧基,

J为 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 或 $-S-$ ,

r为1~4的任意整数,

○(白色圆)表示与A结合的键,●(黑色圆)表示与B结合的键,

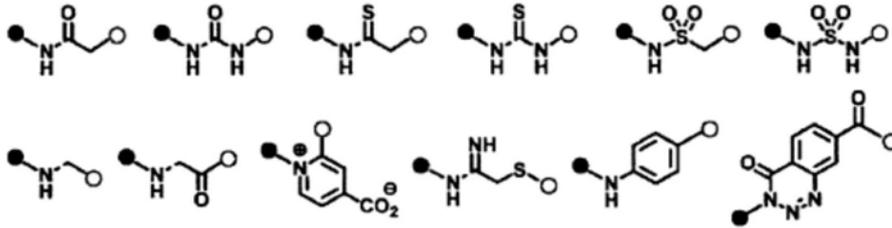
在化学结构以切割位点为中心呈不对称的情况下,可以是●表示与A结合的键,○表示与B结合的键。

82. 根据权利要求71~81中任一项所述的复合物或其盐,其中,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分为:通过赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基与对于赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基中的任一残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分。

83. 根据权利要求71~82中任一项所述的复合物或其盐,其中,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分为:通过赖氨酸残基与对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分。

84. 根据权利要求71~83中任一项所述的复合物或其盐,其中,所述通过反应而生成的部分对应于选自下述组中的任一化学结构;

[化学式13]



在此,●(黑色圆)表示与T侧的部分结合的键,○(白色圆)表示与B侧的部分结合的键。

85. 根据权利要求71~84中任一项所述的复合物或其盐,其中,功能性物质为药物或标记物质。

86. 根据权利要求71~85中任一项所述的复合物或其盐,其中,功能性物质为低分子化合物。

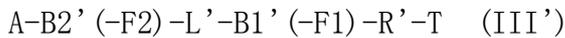
87. 根据权利要求85或86所述的复合物或其盐,其中,药物为抗癌剂。

88. 根据权利要求71~87中任一项所述的复合物或其盐,其中,连结A和R'的主链的原子数为4~20个。

89. 根据权利要求71~88中任一项所述的复合物或其盐,其中,连结A和R的主链不含环结构。

90. 根据权利要求71~89中任一项所述的复合物或其盐,其中,以L-B表示的部分结构不含肽部分。

91. 根据权利要求71~90中任一项所述的复合物或其盐,其中,以所述式(III)表示的化合物以下述式(III')表示;



式中,

A、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

L'为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

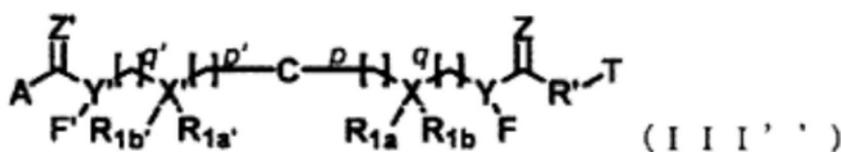
B1'和B2'相同或不同,为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

F1和F2相同或不同,为功能性物质,

B1'(-F1)和B2'(-F2)可具有以L'为中心的对称结构。

92. 根据权利要求91所述的复合物或其盐,其中,以所述式(III')表示的化合物以下述式(III'')表示;

[化学式14]



式中,

A、R'和T与权利要求71所述的式(III)中相应符号的含义相同,

C为切割性部分，

p和p'相同或不同，为0~10的任意整数，

q和q'相同或不同，为0~10的任意整数，

X和X'相同或不同，为碳原子、氮原子或单键；在此，在X为氮原子的情况下，R<sub>1b</sub>不存在；在X'为氮原子的情况下，R<sub>1b'</sub>不存在；在X为单键的情况下，R<sub>1a</sub>和R<sub>1b</sub>不存在；在X'为单键的情况下，R<sub>1a'</sub>和R<sub>1b'</sub>不存在，

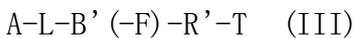
R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a'</sub>和R<sub>1b'</sub>相同或不同，选自所述(i)~(vii)，

Y和Y'相同或不同，为从权利要求32所述的式(B-1)的Y除去1个氢原子而得的残基，

Z和Z'相同或不同，与所述式(B-1)的Z含义相同，

F和F'相同或不同，为功能性物质。

93. 一种以下述式(III)表示的复合物或其盐，该复合物具有亲和性物质、功能性物质及抗体；



式中，

A为针对抗体的亲和性物质，

L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团，

F为功能性物质，

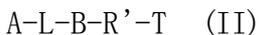
R'为通过抗体与对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分，

T为抗体。

94. 一种方法，其是具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的制造方法，其中，该方法包含：

使以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应，生成以下述式(III)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序；

所述式(II)为：



式中，

A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

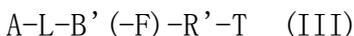
L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团，

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

T为可溶性蛋白质；

所述式(III)为：



式中，

A、L、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同，

B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团，

F为功能性物质。

95. 根据权利要求94所述的方法,其中,可溶性蛋白质为抗体,反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

96. 一种方法,其是具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的制造方法,其中,该方法包含:

(A) 使以下述式(I)表示的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应,生成以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序;以及

(B) 使所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成以下述式(III)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序;

所述式(I)为:



式中,

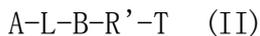
A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团,

R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团;

所述式(II)为:



式中,

A、L和B与所述式(I)中相应符号的含义相同,

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

T为可溶性蛋白质;

所述式(III)为:



式中,

A和L与所述式(I)中相应符号的含义相同,

R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

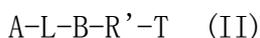
B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

F为功能性物质。

97. 一种方法,其是具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,该方法包含:

对以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式(IV)表示的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序;

所述式(II)为:



式中,

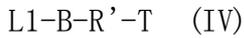
A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,  
B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(a)不含生物正交性官能团的二价基团,

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

T为可溶性蛋白质;

所述式(IV)为:



式中,

B、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团。

98.根据权利要求97所述的方法,其中,L为:

(i)切割性连接体,该切割性连接体是包含切割性部分的二价基团,该切割性部分具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力;或者

(ii)切割性连接体,该切割性连接体是包含切割性部分的二价基团,该切割性部分不具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力。

99.根据权利要求98所述的方法,其中,

L为所述(i)的切割性连接体,

L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团,

B为所述(a)或(b)的二价基团。

100.根据权利要求98或99所述的方法,其中,

L为所述(i)的切割性连接体,

L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团,

B为所述(b)的二价基团。

101.根据权利要求98所述的方法,其中,

L为所述(ii)的切割性连接体,

L1为(i')不含生物正交性官能团的一价基团,

B为所述(a)的二价基团。

102.根据权利要求97~101中任一项所述的方法,其中,可溶性蛋白质为抗体,反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

103.一种方法,其是具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,该方法包含:

(A)使以下述式(I)表示的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应,生成以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序;以及

(B)对所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式(IV)表示的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序;

所述式(I)为:



式中，

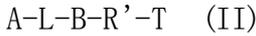
A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

B为 (a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者 (a) 不含生物正交性官能团的二价基团，

R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团；

所述式 (II) 为：



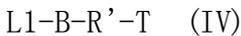
式中，

A、L和B与所述式 (I) 中相应符号的含义相同，

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

T为可溶性蛋白质；

所述式 (IV) 为：



式中，

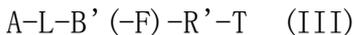
B、R'和T与所述式 (II) 中相应符号的含义相同，

L1为 (i') 包含生物正交性官能团的一价基团、或者 (ii') 不含生物正交性官能团的一价基团。

104. 一种方法，其是具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法，其中，该方法包含：

对以下述式 (III) 表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割，或者使以下述式 (IV) 表示的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应，生成以下述式 (V) 表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序；

所述式 (III) 为：



式中，

A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

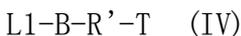
B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团，

F为功能性物质，

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

T为可溶性蛋白质；

所述式 (IV) 为：



式中，

L1为 (i') 包含生物正交性官能团的一价基团、或者 (ii') 不含生物正交性官能团的一价基团，

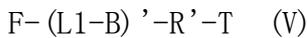
B为 (a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者 (b) 不含生物正交性官能团的二价基

团，

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

T为可溶性蛋白质；

所述式(V)为：



式中，

L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团，

B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团，

以(L1-B)'表示的结构单元为包含通过功能性物质与(i')及(a)中的生物正交性官能团中的任一者或两者之间的反应而生成的部分的二价结构单元，

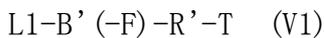
F为功能性物质，

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

T为可溶性蛋白质。

105. 根据权利要求104所述的方法，其中，该方法包含：

对所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割，生成以下述式(V1)表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序；



式中，

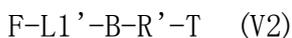
L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团，

B'、F、R'和T与所述式(III)中相应符号的含义相同。

106. 根据权利要求104所述的方法，其中，该方法包含：

使所述具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与1种或2种功能性物质反应，生成以下述式(V2)或以下述式(V3)表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序；

所述式(V2)为：



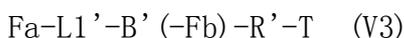
式中，

B、R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同，

L1'为包含通过功能性物质与(i')包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团，

F为功能性物质；

所述式(V3)为：



式中，

R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同，

L1'与所述式(V2)中相应符号的含义相同，

B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团，Fa和Fb分别为相同或不同的功能性物质。

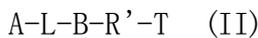
107. 根据权利要求104~106中任一项所述的方法，其中，可溶性蛋白质为抗体，反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

108. 一种方法，其是具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法，其中，该方法包含：

(A) 使以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应，生成以下述式(III)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序；以及

(B) 对所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割，生成以下述式(V1)表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序；

所述式(II)为：



式中，

A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

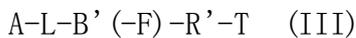
L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团，

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

T为可溶性蛋白质；

所述式(III)为：



式中，

A、L、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同，

B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团，

F为功能性物质；

所述式(V1)为：



式中，

L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团，

B'、F、R'和T与所述式(III)中相应符号的含义相同。

109. 一种方法，其是具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法，其中，该方法包含：

(A) 使以下述式(I)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应，生成以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序；

(B) 使所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应，生成以下述式(III)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割

性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序；以及

(C) 对所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式 (V1) 表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序;

所述式 (I) 为:



式中,

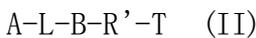
A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

B为 (a) 包含生物正交性官能团的二价基团,

R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团;

所述式 (II) 为:



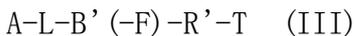
式中,

A、L和B与所述式 (I) 中相应符号的含义相同,

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

T为可溶性蛋白质;

所述式 (III) 为:



式中,

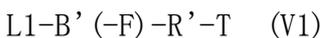
A和L与所述式 (I) 中相应符号的含义相同,

R'和T与所述式 (II) 中相应符号的含义相同,

B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

F为功能性物质;

所述式 (V1) 为:



式中,

L1为 (i') 包含生物正交性官能团的一价基团、或者 (ii') 不含生物正交性官能团的一价基团,

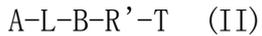
B'、F、R'和T与所述式 (III) 中相应符号的含义相同。

110. 一种方法,其是具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,该方法包含:

(A) 对以下述式 (II) 表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式 (IV) 表示的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序;以及

(B) 使所述具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与1种或2种以上的功能性物质反应,生成以下述式 (V2) 或以下述式 (V3) 表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序;

所述式 (II) 为:



式中，

A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

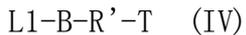
L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

B为(a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者(a) 不含生物正交性官能团的二价基团，

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

T为可溶性蛋白质；

所述式(IV)为：

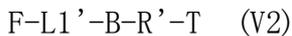


式中，

B、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同，

L1为(i') 包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii') 不含生物正交性官能团的一价基团；

所述式(V2)为：



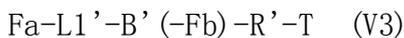
式中，

B、R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同，

L1'为包含通过功能性物质与(i') 包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团，

F为功能性物质；

所述式(V3)为：



式中，

R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同，

L1'与所述式(V2)中相应符号的含义相同，

B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团，

Fa和Fb分别为相同或不同的功能性物质。

111. 一种方法，其是具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法，其中，该方法包含：

(A) 使以下述式(I)表示的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应，生成以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序；

(B) 对所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割，生成以下述式(IV)表示的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序；以及

(C) 使所述具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与1种或2种以上的功能性物质反应，生成以下述式(V2)或以下述式(V3)表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序；

所述式(I)为：

A-L-B-R (I)

式中，

A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

B为(a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者(a) 不含生物正交性官能团的二价基团，

R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团；

所述式(II)为：

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

式中，

A、L和B与所述式(I)中相应符号的含义相同，

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

T为可溶性蛋白质；

所述式(IV)为：

L1-B-R'-T (IV)

式中，

B、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同，

L1为(i') 包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii') 不含生物正交性官能团的一价基团；

所述式(V2)为：

F-L1'-B-R'-T (V2)

式中，

B、R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同，

L1'为包含通过功能性物质与(i') 包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团，

F为功能性物质；

所述式(V3)为：

Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

式中，

R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同，

L1'与所述式(V2)中相应符号的含义相同，

B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团，

Fa和Fb分别为相同或不同的功能性物质。

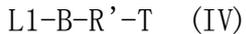
112. 一种区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐，其中，

可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基，且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基，且

生物正交性官能团经由不含肽部分的连接体对于所述靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合。

113. 一种区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐，其中，该可溶

性蛋白质以下述式 (IV) 表示, 且以 L1-B-R' 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的 1 个以上的特定氨基酸残基以 30% 以上的区域选择性结合;



式中,

L1 为 (i') 包含生物正交性官能团的一价基团、或者 (ii') 不含生物正交性官能团的一价基团,

B 为 (a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者 (b) 不含生物正交性官能团的二价基团,

R' 为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

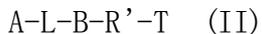
T 为可溶性蛋白质,

所述可溶性蛋白质在由连续的 1~50 个氨基酸残基形成的靶区中包含 1 个以上的特定氨基酸残基, 且在除所述靶区以外的非靶区中包含 5 个以上的所述特定氨基酸残基。

114. 一种方法, 其是区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法, 其中, 该方法包含:

对区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割, 生成区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序;

所述区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质以下述式 (II) 表示, 且以 L1-B-R' 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的 1 个以上的特定氨基酸残基以 30% 以上的区域选择性结合,



式中,

A 为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

L 为切割性连接体, 该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

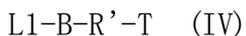
B 为 (a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者 (a) 不含生物正交性官能团的二价基团,

R' 为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

T 为可溶性蛋白质,

所述可溶性蛋白质在由连续的 1~50 个氨基酸残基形成的靶区中包含 1 个以上的特定氨基酸残基, 且在除所述靶区以外的非靶区中包含 5 个以上的所述特定氨基酸残基;

所述区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质以下述式 (IV) 表示, 且以 L1-B-R' 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的 1 个以上的特定氨基酸残基以 30% 以上的区域选择性结合,



式中,

B、R' 和 T 与所述式 (II) 中相应符号的含义相同,

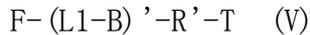
L1 为 (i') 包含生物正交性官能团的一价基团、或者 (ii') 不含生物正交性官能团的一价基团。

115. 一种区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐, 其中,

可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基,且

功能性物质经由不含肽部分的连接体对于所述靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合。

116.一种区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐,其中,该可溶性蛋白质以下述式(V)表示,且以F-(L1-B)'-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合;



式中,

L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团,

B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

以(L1-B)'表示的结构单元为包含通过功能性物质与(i')及(a)中的生物正交性官能团中的任一者或两者之间的反应而生成的部分的二价结构单元,

F为功能性物质,

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

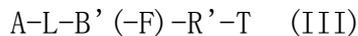
T为可溶性蛋白质,

所述可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基。

117.一种方法,其是区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,该方法包含:

对区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割,或者使区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序;

所述区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物以下述式(III)表示,且以A-L-B'(-F)-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合,



式中,

A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

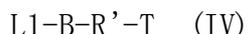
F为功能性物质,

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

T为可溶性蛋白质,

所述可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基;

所述区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质以下述式(IV)表示,且以A-L-B'(-F)-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合,



式中,

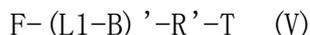
L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团,

B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

T为在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基的可溶性蛋白质;

所述区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质以下述式(V)表示,且以F-(L1-B)'-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合,



式中,

L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团,

B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

以(L1-B)'表示的结构单元为包含通过功能性物质与(i')及(a)中的生物正交性官能团中的任一者或两者之间的反应而生成的部分的二价结构单元,

F为功能性物质,

R'和T与所述式(III)或(IV)中相应符号的含义相同。

## 具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐

### 技术领域

[0001] 本发明涉及具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐等。

### 背景技术

[0002] 近年来,进行了大量抗体药物偶联物 (Antibody Drug Conjugation:ADC) (抗体药物复合物) 的研究开发。如其名称所示,ADC是在抗体上偶联药物 (例如抗癌剂) 而得的药剂,对于癌细胞等具有直接的细胞杀伤活性。作为代表性的ADC,有Immunogene公司和罗氏公司 (Roche) 共同开发的T-DM1 (商品名:Kadcyla (注册商标)) (非专利文献1~3)。

[0003] 以T-DM1为代表的ADC从开发初期就存在其不均一性的问题。即,由于使低分子药物随机与抗体中存在70~80个左右的Lys残基反应,因此药物抗体比 (Drug Antibody Ratio:DAR) 和偶联位置不确定。已知通常如果是这样的随机偶联法,则DAR在0~8的范围内,产生药物的结合数不同的多种药剂。近年来,有报道称,如果改变ADC的药物的结合数和结合位置,则体内动力学和药物的释放速度、效果会发生变化。基于这些情况,对于下一代的ADC,要求控制偶联的药物的个数和位置。一般认为如果个数和位置确定,则所期待的疗效 (efficacy)、偶联药剂的多样性、批次差异、即所谓标准化 (regulation) 的问题得到解决 (非专利文献4)。

[0004] 全球都在研究抗体的区域选择性修饰方法,但几乎全都是使用基因工程手段或酶的修饰方法。关于基因工程修饰方法,虽然可以控制区域选择性 (位置选择性)、个数选择性,但被指出存在抗体本身的表达效率下降 (制备ADC时的总收率下降) 等问题。此外,抗体表达体系的构建等需要较长的时间也成为问题 (非专利文献5~7)。

[0005] 此外,近年来报道了利用小分子探针在细胞内这样混杂的环境下对蛋白质进行化学修饰的方法。本方法在进行成像或低分子药物的重新定位方面被用于受体的鉴定等。此外,生化领域中,使用合成小分子探针的有机化学蛋白质修饰方法受到关注 (非专利文献8~10)。

[0006] 最近,开发出了C-CAP (亲和性肽化学偶联,Chemical Conjugation by Affinity Peptide) 法。本方法通过使在亲和性肽 (Affinity Peptide) 上连接了NHS活性酯和药物而得的肽试剂与抗体反应的方法 (即,经由含肽部分的连接体的ADC的制作方法),成功地实现了抗体的区域选择性修饰。本方法是世界上首次通过化学合成手段用药物成功地对抗体Fc区域进行区域选择性修饰的方法,而且实际使用中也确认了良好的结果 [反应时间30分钟,收率70% (DAR1的情况),区域选择性100%]。证实了可通过加入5当量左右的肽试剂而将DAR控制为2,还可控制修饰位置,这方面是划时代的 (专利文献1)。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2016/186206号

- [0010] 非专利文献
- [0011] 非专利文献1:Reichert JM等,Nat Biotechnol 2005;23:1073-8
- [0012] 非专利文献2:Kubota T等,Cancer Sci 2009;100:1566-72
- [0013] 非专利文献3:Wu AM等,Nat Biotechnol 2005;23:1137-46
- [0014] 非专利文献4:Junutula JR等,Nat Biotechnol 2008;26:925-32
- [0015] 非专利文献5:Shen BQ等,Nat Biotechnol 2012;30:184-9
- [0016] 非专利文献6:Hofer T等,Biochemistry 2009;48:12047-57
- [0017] 非专利文献7:Liu W等,Nat Methods 2007;4:239-44
- [0018] 非专利文献8:S.T.Laughlin等,Science 2008;320,664
- [0019] 非专利文献9:A.E.Speers等,ChemBioChem 2004;5,41
- [0020] 非专利文献10:Y.Takaoka等,Angew.Chem.Int.Ed.2013;52,4088

## 发明内容

[0021] 发明所要解决的技术问题

[0022] 本发明的目的在于开发可溶性蛋白质的修饰、特别是可实现可溶性蛋白质的区域选择性修饰的技术。

[0023] 解决技术问题所采用的技术方案

[0024] 本发明人进行了认真研究,结果发现,具有包含(1)针对可溶性蛋白质的亲和性物质、及(2)针对构成该可溶性蛋白质的氨基酸残基的反应性基团、以及(3)在该亲和性物质与该反应性基团之间的切割性部分,并且(4)可通过在切割性部分的切割而生成在反应性基团侧具有生物正交性官能团的结构单元(即包含生物正交性官能团及反应性基团的结构单元)这样的结构特征的基于新颖且独创性的设计思想开发的化合物可用于可溶性蛋白质的位置特异性修饰(例如图1-1、图1-2、图1-3、图2)。本发明人还发现通过使用这样的化合物,可制备不含肽部分作为连接体且区域选择性地具有功能性物质(例如药物)的可溶性蛋白质(例如抗体药物偶联物(ADC))等。避免使用具有潜在的免疫原性且包含血中易水解的肽部分的连接体,在ADC的临床应用上理想的。即,本发明人开发的方法全球首次能够成功地通过化学合成手段,且不使用包含肽部分的连接体,用药物对抗体Fc区域进行区域选择性修饰。本发明人还成功地开发了具备如上述(1)~(4)的结构特征的各种化合物等(例如图1-1、图1-2、图1-3、图2),从而完成了本发明。

[0025] 即,本发明如下。

[0026] 第一实施方式中,本发明提供具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐,以及包含该化合物或其盐的可溶性蛋白质的区域选择性修饰试剂。

[0027] [1]一种以下述式(I)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐;

[0028] A-L-B-R (I)

[0029] 式中,

[0030] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[0031] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[0032] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[0033] R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团。

[0034] [2]根据[1]的化合物或其盐,其中,L为:

[0035] (i)切割性连接体,该切割性连接体是包含切割性部分的二价基团,该切割性部分具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力;或者

[0036] (ii)切割性连接体,该切割性连接体是包含切割性部分的二价基团,该切割性部分不具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力。

[0037] [3]根据[2]的化合物或其盐,其中,L为所述(i)的切割性连接体。

[0038] [4]根据[2]或[3]的化合物或其盐,其中,L为所述(i)的切割性连接体,且B为所述(b)的二价基团。

[0039] [5]根据[2]的化合物或其盐,其中,L为所述(ii)的切割性连接体,且B为所述(a)的二价基团。

[0040] [6]根据[1]~[5]中任一项的化合物或其盐,其中,针对可溶性蛋白质的亲和性物质为肽。

[0041] [7]根据[6]的化合物或其盐,其中,肽为针对单克隆抗体的Fc区域的结合性肽(结合肽)。

[0042] [8]根据[7]的化合物或其盐,其中,结合性肽为针对IgG的Fc区域的结合性肽。

[0043] [9]根据[1]~[8]中任一项的化合物或其盐,其中,所述亲和性物质为针对抗体的亲和性物质,该抗体包含选自下述(A)~(C)中的任一种Fc区域蛋白质,且具有抗原结合能力:

[0044] (A)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;

[0045] (B)包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中插入、添加、缺失或取代1个或数个氨基酸残基而形成的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;或者

[0046] (C)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列显示90%以上的同一性的氨基酸序列的Fc区域蛋白质。

[0047] [10]根据[7]~[9]中任一项的化合物或其盐,其中,结合性肽为包含以下述式(i)表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列,且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐;

[0048]  $(X_{1-3})-C-(X_2)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3})$  (SEQ ID NO:94) (i)

[0049] 式中,

[0050] X相同或不同,为除半胱氨酸以外的任意氨基酸残基,

[0051] C为半胱氨酸残基,

[0052] H为组氨酸残基,

[0053] Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基,

[0054] G为甘氨酸残基,

[0055] Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基,

[0056] L为亮氨酸残基,

[0057] V为缬氨酸残基,且

[0058] W为色氨酸残基。

[0059] [11]根据[7]~[9]中任一项的化合物或其盐,其中,结合性肽为包含以下述式(i-1)表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列,且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐;

[0060]  $(X_{1-3})-C-(X_2)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3})$  (SEQ ID NO:95) (i-1)

[0061] 式中,

[0062] X相同或不同,为除半胱氨酸以外的任意氨基酸残基,

[0063] C为半胱氨酸残基,

[0064] H为组氨酸残基,

[0065] Xaa1为赖氨酸残基、半胱氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基,

[0066] G为甘氨酸残基,

[0067] Xaa2为谷氨酸残基或天冬酰胺残基,

[0068] L为亮氨酸残基,

[0069] V为缬氨酸残基,且

[0070] W为色氨酸残基。

[0071] [12]根据[7]~[10]中任一项的化合物或其盐,其中,结合性肽为包含以下述式(i-2)表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列,且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐;

[0072]  $(X_{1-3})-C-(X_2)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3})$  (SEQ ID NO:96) (i-2)

[0073] 式中,

[0074] X相同或不同,为除半胱氨酸以外的任意氨基酸残基,

[0075] C为半胱氨酸残基,

[0076] H为组氨酸残基,

[0077] Xaa1为精氨酸或亮氨酸残基,

[0078] G为甘氨酸残基,

[0079] Xaa2为赖氨酸、谷氨酰胺残基或天冬氨酸残基,

[0080] L为亮氨酸残基,

[0081] V为缬氨酸残基,且

[0082] W为色氨酸残基。

[0083] [13]根据[7]~[12]中任一项的化合物或其盐,其中,结合性肽为包含以下述式(v)表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列,且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐;

[0084]  $(X_{1-3})-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7)$   
(SEQ ID NO:102) (v)

[0085] 式中,

[0086] X相同或不同,为除半胱氨酸以外的任意氨基酸残基,

[0087] C为半胱氨酸残基,

- [0088] Xaa3为丙氨酸残基或赖氨酸残基，
- [0089] Xaa4为色氨酸残基或酪氨酸残基，
- [0090] H为组氨酸残基，
- [0091] Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，
- [0092] G为甘氨酸残基，
- [0093] Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基，
- [0094] L为亮氨酸残基，
- [0095] V为缬氨酸残基，
- [0096] W为色氨酸残基，
- [0097] Xaa5为苏氨酸残基或赖氨酸残基，
- [0098] Xaa6为酪氨酸残基、赖氨酸残基或不存在，且
- [0099] Xaa7为组氨酸残基、赖氨酸残基或不存在。
- [0100] [14]根据[7]~[13]中任一项的化合物或其盐，其中，结合性肽的特征在于其为包含以下述式(vi)表示的由13~15个氨基酸残基组成的氨基酸序列且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐；
- [0101] D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7) (SEQ ID NO:103) (vi)
- [0102] 式中，
- [0103] D为天冬氨酸残基，
- [0104] C为半胱氨酸残基，
- [0105] Xaa3为丙氨酸残基或赖氨酸残基，
- [0106] Xaa4为色氨酸残基或酪氨酸残基，
- [0107] H为组氨酸残基，
- [0108] Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，
- [0109] G为甘氨酸残基，
- [0110] Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基，
- [0111] L为亮氨酸残基，
- [0112] V为缬氨酸残基，
- [0113] W为色氨酸残基，
- [0114] Xaa5为苏氨酸残基或赖氨酸残基，
- [0115] Xaa6为酪氨酸残基、赖氨酸残基或不存在，
- [0116] Xaa7为组氨酸残基、赖氨酸残基或不存在。
- [0117] [15]根据[7]~[14]中任一项的化合物或其盐，其中，结合性肽的特征在于其为包含以下述式(vii)表示的由13个氨基酸残基组成的氨基酸序列且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐；
- [0118] D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-T (SEQ ID NO:104) (vii)
- [0119] 式中，

- [0120] D为天冬氨酸残基，
- [0121] C为半胱氨酸残基，
- [0122] Xaa3为丙氨酸残基或赖氨酸残基，
- [0123] Xaa4为色氨酸残基或酪氨酸残基，
- [0124] H为组氨酸残基，
- [0125] Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，
- [0126] G为甘氨酸残基，
- [0127] Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基，
- [0128] L为亮氨酸残基，
- [0129] V为缬氨酸残基，
- [0130] W为色氨酸残基，且
- [0131] T为苏氨酸残基。
- [0132] [16]根据[7]～[13]中任一项的化合物或其盐，其中，结合性肽的特征在于其为包含以下述式(viii)表示的由13～15个氨基酸残基组成的氨基酸序列，且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐；
- [0133] R-G-N-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7)  
(SEQ ID NO:105) (viii)
- [0134] 式中，
- [0135] R为精氨酸残基，
- [0136] G为甘氨酸残基，
- [0137] N为天冬酰胺残基，
- [0138] C为半胱氨酸残基，
- [0139] Xaa3为丙氨酸残基或赖氨酸残基，
- [0140] Xaa4为色氨酸残基或酪氨酸残基，
- [0141] H为组氨酸残基，
- [0142] Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，
- [0143] G为甘氨酸残基，
- [0144] Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基，
- [0145] L为亮氨酸残基，
- [0146] V为缬氨酸残基，
- [0147] W为色氨酸残基，
- [0148] Xaa5为苏氨酸残基或赖氨酸残基，
- [0149] Xaa6为酪氨酸残基、赖氨酸残基或不存在，且
- [0150] Xaa7为组氨酸残基、赖氨酸残基或不存在。
- [0151] [17]根据[7]～[16]中任一项的化合物或其盐，其特征在于，结合性肽可与人IgG结合。
- [0152] [18]根据[7]～[9]中任一项的化合物或其盐，其中，结合性肽为包含具有下述(a)

和(b)的特征的氨基酸序列的亲中性肽或其盐,

[0153] (a) 在FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:92) 的氨基酸序列中,任一氨基酸残基被选自赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基和二氨基丙酸残基中的1个氨基酸残基取代,且

[0154] (b) 对于SEQ ID NO:92的所述氨基酸序列具有90%以上的同一性。

[0155] [19]根据[1]~[18]中任一项的化合物或其盐,其中,切割性部分为可通过下述(a)~(c)中的任一种处理进行切割的部分,

[0156] (a) 采用选自酸性物质、碱性物质、还原剂、氧化剂、酶中的1种以上的物质进行的处理;

[0157] (b) 采用选自光的物理化学刺激进行的处理;或者

[0158] (c) 在使用包含自体分解性的切割性部分的切割性连接体的情况下的放置。

[0159] [20]根据[1]~[19]中任一项的化合物或其盐,其中,所述切割性部分选自二硫残基、缩醛残基、缩酮残基、酯残基、氨甲酰基残基、烷氧基烷基残基、亚胺残基、叔烷基氧基氨基甲酸酯残基、硅烷残基、含有脞的残基、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、含有具有吸电子基团的芳环的残基、含有香豆素的残基、含有砜的残基、含有不饱和键的链残基、糖基残基。

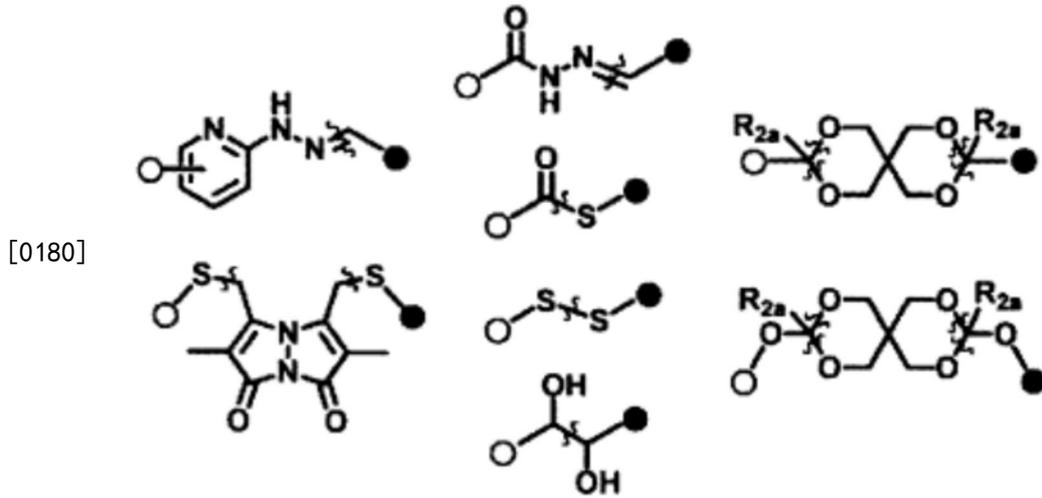
[0160] [21]根据[2]~[20]中任一项的化合物或其盐,其中,所述(i)的切割性部分选自二硫残基、酯残基、缩醛残基、缩酮残基、亚胺残基、邻二醇残基。

[0161] [22]根据[2]~[20]中任一项的化合物或其盐,其中,所述(ii)的切割性部分选自酯残基、氨甲酰基残基、烷氧基烷基残基、亚胺残基、叔烷基氧基氨基甲酸酯残基、硅烷残基、含有脞的残基、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、含有具有吸电子基团的芳环的残基、含有香豆素的残基、含有砜的残基、含有不饱和键的链残基、糖基残基。

[0162] [23]根据[1]~[20]中任一项的化合物或其盐,其中,切割性部分对应于选自下述组中的任一化学结构;

[0163] [化学式1]





[0181] 在此,与键正交的波浪线表示切割位点,

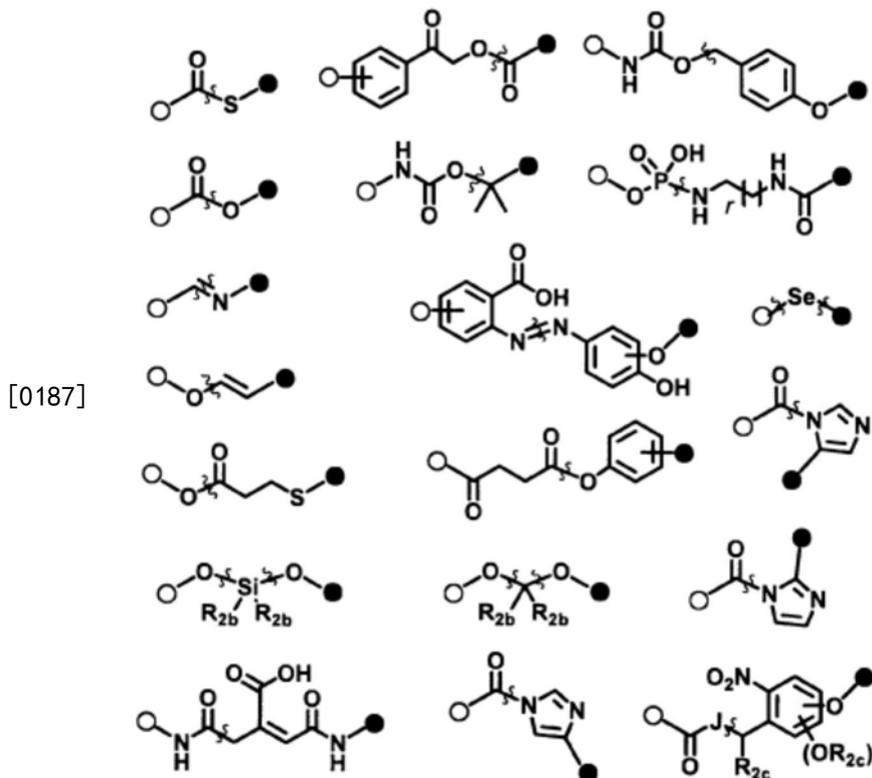
[0182]  $R_{2a}$ 与[23]中相应符号的含义相同,

[0183] ○(白色圆)表示与A结合的键,●(黑色圆)表示与B结合的键,

[0184] 在化学结构以切割位点为中心呈不对称的情况下,可以是●表示与A结合的键,○表示与B结合的键。

[0185] [25]根据[2]~[19]、[22]、[23]中任一项的化合物或其盐,其中,所述(i)的切割性部分对应于选自以下组中的任一化学结构;

[0186] [化学式3]



[0188] 在此,与键正交的波浪线表示切割位点,

[0189]  $R_{2b}$ 、 $R_{2c}$ 、J、r与[23]中相应符号的含义相同,

[0190] ○(白色圆)表示与A结合的键,●(黑色圆)表示与B结合的键,

[0191] 在化学结构以切割位点为中心呈不对称的情况下,可以是●表示与A结合的键,○表示与B结合的键。

[0192] [26]根据[1]~[25]中任一项的化合物或其盐,其中,L以下述式(L1)~(L3)中的任一式表示;

[0193]  $\text{La}-\text{C}-\text{Lb}$  (L1)

[0194]  $\text{La}-\text{C}$  (L2)

[0195]  $\text{C}-\text{Lb}$  (L3)

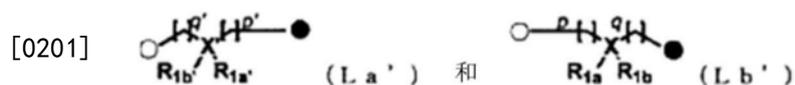
[0196] 式中,

[0197] La和Lb分别为二价基团,

[0198] C为切割性部分。

[0199] [27]根据[26]所述的化合物或其盐,其中,所述La和Lb分别以下述(La')和(Lb')表示;

[0200] [化学式4]



[0202] 式中,

[0203] p和p'相同或不同,为0~10的任意整数,

[0204] q和q'相同或不同,为0~10的任意整数,

[0205] X和X'相同或不同,为碳原子、氮原子或单键;在此,在X为氮原子的情况下,R1b不存在;在X'为氮原子的情况下,R1b'不存在;在X为单键的情况下,R1a和R1b不存在;在X'为单键的情况下,R1a'和R1b'不存在,

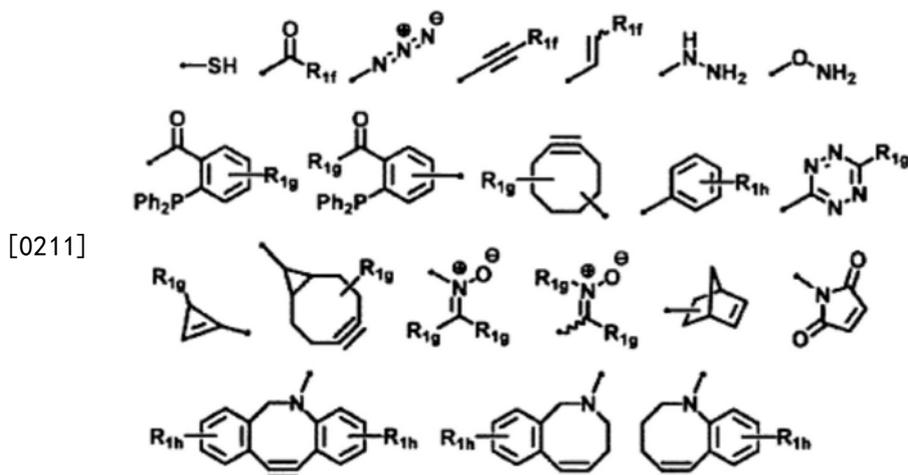
[0206] R1a、R1b、R1a'和R1b'相同或不同,为选自所述(i)~(vii)中的原子或基团。

[0207] [28]根据[1]~[27]中任一项的化合物或其盐,其中,包含生物正交性官能团的二价基团为:在主链中包含选自叠氮残基、醛残基、硫醇残基、炔烃残基、烯烃残基、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、二硫残基、硫酸基、 $\alpha$ -卤化羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基中的生物正交性官能团的二价基团。

[0208] [29]根据[1]~[27]中任一项的化合物或其盐,其中,包含生物正交性官能团的二价基团为:在侧链中包含选自叠氮残基、醛残基、硫醇残基、炔烃残基、烯烃残基、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、二硫残基、 $\alpha$ -卤化羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基中的生物正交性官能团的二价基团。

[0209] [30]根据[1]~[29]中任一项的化合物或其盐,其中,生物正交性官能团为以下述式表示的任一基团;

[0210] [化学式5]



[0212] 式中,

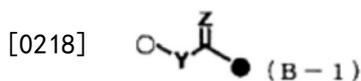
[0213] R<sub>1f</sub>、一个或多个R<sub>1g</sub>及一个或多个R<sub>1h</sub>相同或不同,为选自所述(i)~(vii)中的原子或基团、或者吸电子基团,

[0214] • 表示键。

[0215] [31]根据[1]~[30]中任一项的化合物或其盐,其中,所述(b)的二价基团选自可取代的亚烷基、可取代的亚环烷基、可取代的芳基、可取代的二价杂环基、-NR<sub>a</sub>-、-O-、或这些基团中的2个以上的组合,其中R<sub>a</sub>表示氢原子或取代基。

[0216] [32]根据[1]~[31]中任一项的化合物或其盐,其中,B以下述式(B-1)表示;

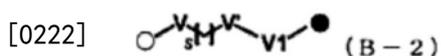
[0217] [化学式6]



[0219] 式中,

[0220] Y为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或下述式(B-2),

[0221] [化学式7]



[0223] 式(B-2)中,

[0224] V和V'相同或不同,为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或单键,

[0225] V<sub>1</sub>为包含生物正交性官能团的二价基团,

[0226] s为0~10的任意整数,

[0227] 式(B-2)中的○和●的取向分别与式(B-1)中的○和●的取向相同;

[0228] Z为氧原子、硫原子或氢原子,在Z为氢原子的情况下,-C(=Z)-表示-CH<sub>2</sub>-;

[0229] 式(B-1)中的○(白色圆)表示与L侧部分结合的键,●(黑色圆)表示与R侧部分结合的键。

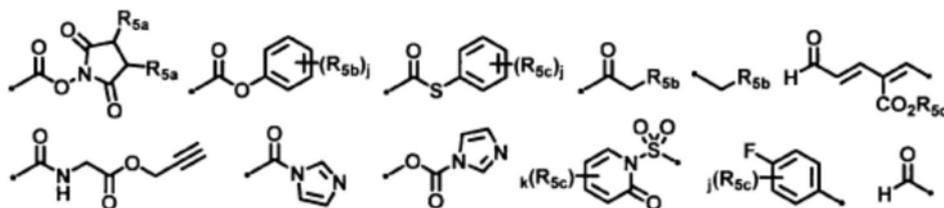
[0230] [33]根据[1]~[32]中任一项的化合物或其盐,其中,反应性基团为对于赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基中的任一残基的侧链具有特异性的反应性基团。

[0231] [34]根据[33]所述的化合物或其盐,其中,反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

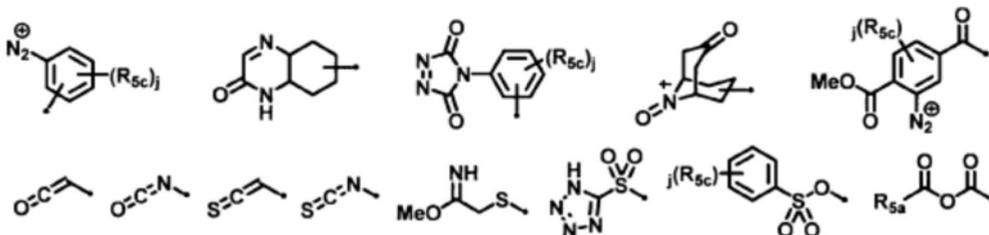
[0232] [35]根据[1]~[34]中任一项的化合物或其盐,其中,反应性基团对应于选自下述

组中的任一化学结构；

[0233] [化学式8]



[0234]



[0235] 在此，

[0236] R<sub>5a</sub>和R<sub>5c</sub>为选自所述(i)~(vii)中的原子或基团，

[0237] R<sub>5b</sub>为吸电子基团，

[0238] j为1~5的任意整数，

[0239] k为1~4的任意整数。

[0240] [36]根据[1]~[35]中任一项的化合物或其盐，其中，连结A和R的主链的原子数为4~20个。

[0241] [37]根据[1]~[36]中的任一项的化合物或其盐，其中，连结A和R的主链不含环结构。

[0242] [38]根据[1]~[37]中任一项的化合物或其盐，其中，以L-B表示的部分结构不含肽部分。

[0243] [39]根据[1]~[38]中任一项的化合物或其盐，其中，以所述式(I)表示的化合物为以下述式(I')表示的化合物；

[0244] A-B<sub>2</sub>-L'-B<sub>1</sub>-R (I')

[0245] 式中，

[0246] A和R与所述式(I)中相应符号的含义相同，

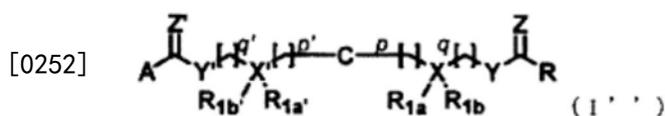
[0247] L'为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

[0248] B<sub>1</sub>和B<sub>2</sub>相同或不同，为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团，

[0249] B<sub>1</sub>和B<sub>2</sub>可具有以L'为中心的对称结构。

[0250] [40]根据[39]的化合物或其盐，其中，以所述式(I')表示的化合物以下述式(I'')表示；

[0251] [化学式9]



[0253] 式中，

- [0254] A和R与[1]所述的式(I)中相应符号的含义相同,
- [0255] C为切割性部分,
- [0256] p、p'、q、q'、X、X'、R<sub>1a</sub>、R<sub>1a'</sub>、R<sub>1b</sub>和R<sub>1b'</sub>与[27]所述的式(La')和(Lb')中相应符号的含义相同,
- [0257] Y和Y'相同或不同,与[32]所述的式(B-1)的Y含义相同,
- [0258] Z和Z'相同或不同,与所述式(B-1)的Z含义相同。
- [0259] [41]一种可溶性蛋白质的区域选择性修饰试剂,其中,包含以下述式(I)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐;
- [0260] A-L-B-R (I)
- [0261] 式中,
- [0262] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,
- [0263] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,
- [0264] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,
- [0265] R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团;
- [0266] [42]一种以下述式(I)表示的具有针对抗体的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐;
- [0267] A-L-B-R (I)
- [0268] 式中,
- [0269] A为针对抗体的亲和性物质,
- [0270] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,
- [0271] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,
- [0272] R为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。
- [0273] [43]一种抗体的区域选择性修饰试剂,其中,包含以下述式(I)表示的具有针对抗体的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐;
- [0274] 下述式(I):
- [0275] A-L-B-R (I)
- [0276] 式中,
- [0277] A为针对抗体的亲和性物质,
- [0278] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,
- [0279] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,
- [0280] R为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。
- [0281] 第二实施方式中,本发明提供具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐、以及其制造方法。
- [0282] (具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐)
- [0283] [44]一种以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐;

- [0284] A-L-B-R'-T (II)
- [0285] 式中,
- [0286] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,
- [0287] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,
- [0288] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,
- [0289] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,
- [0290] T为可溶性蛋白质;
- [0291] [45]根据[44]的可溶性蛋白质或其盐,其中,可溶性蛋白质为单克隆抗体。
- [0292] [46]根据[44]或[45]的可溶性蛋白质或其盐,其中,可溶性蛋白质为IgG抗体。
- [0293] [47]根据[44]~[46]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,可溶性蛋白质来源于人。
- [0294] [48]根据[44]~[47]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,可溶性蛋白质为包含选自下述(A)~(C)中的任一种Fc区域蛋白质,且具有抗原结合能力的抗体:
- [0295] (A)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;
- [0296] (B)包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中插入、添加、缺失或取代1个或数个氨基酸残基而形成的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;或者
- [0297] (C)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列显示90%以上的同一性的氨基酸序列的Fc区域蛋白质。
- [0298] [49]根据[44]~[48]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,
- [0299] 可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基,
- [0300] 以A-L-B-R'表示的结构单元对于所述靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合。
- [0301] [50]根据[49]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述靶区为由连续的1~10个氨基酸残基形成的区域。
- [0302] [51]根据[50]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述靶区为由连续的1~3个氨基酸残基形成的区域。
- [0303] [52]根据[51]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述靶区为:
- [0304] (a)由人IgG Fc区域中的第246~248位氨基酸残基形成的区域、
- [0305] (b)由人IgG Fc区域中的第288~290位氨基酸残基形成的区域、或者
- [0306] (c)由人IgG Fc区域中的第317位氨基酸残基形成的区域。
- [0307] [53]根据[49]~[52]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述区域选择性为50%以上。
- [0308] [54]根据[53]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述区域选择性为70%以上。
- [0309] [55]根据[54]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述区域选择性为90%以上。
- [0310] [56]根据[49]~[55]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述特定氨基酸残基在以存在于特定位置的特定氨基酸为中心时分别从N末端侧和C末端侧起到相隔a个氨基酸残基的位置为止的区域中,除所述存在于特定位置的特定氨基酸残基以外,不含与特定

氨基酸残基同种的氨基酸残基;在此,a为1~10的任意整数。

[0311] [57]根据[44]~[56]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,

[0312] 所述可溶性蛋白质为包含多个单体蛋白质的多聚体蛋白质,

[0313] T在多个单体蛋白质中的对应的多个靶区中具有以A-L-B-R'表示的结构单元,因而所述多聚体蛋白质具有多个以A-L-B-R'表示的结构单元。

[0314] [58]根据[44]~[57]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,

[0315] 所述可溶性蛋白质为包含多个重链的抗体,

[0316] T在多个重链中的对应的多个靶区中具有以A-L-B-R'表示的结构单元,因而所述抗体具有多个以A-L-B-R'表示的结构单元。

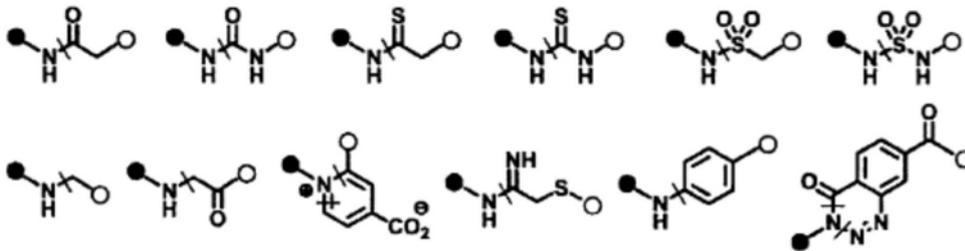
[0317] [59]根据[58]的可溶性蛋白质或其盐,其中,重链的个数为2个。

[0318] [60]根据[44]~[59]中任一项的化合物或其盐,其中,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分为:通过赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基与对于赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基中的任一残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分。

[0319] [61]根据[44]~[60]中任一项的化合物或其盐,其中,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分为:通过赖氨酸残基与对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分。

[0320] [62]根据[44]~[61]中任一项的化合物或其盐,其中,所述通过反应而生成的部分对应于选自下述组中的任一化学结构;

[0321] [化学式10]



[0323] 在此,●(黑色圆)表示与T侧的部分结合的键,○(白色圆)表示与B侧的部分结合的键,与键正交的直线表示通过反应而生成的键。

[0324] [63]根据[44]~[62]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,连结A'和R'的主链的原子数为4~20个。

[0325] [64]根据[44]~[63]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,连结A和R的主链不含环结构。

[0326] [65]根据[44]~[64]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,以L-B表示的部分结构不含肽部分。

[0327] [66]根据[44]~[65]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,以所述式(II)表示的化合物为以下述式(II')表示的化合物;

[0328] A-B2-L'-B1-R'-T (II')

[0329] 式中,

[0330] A、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

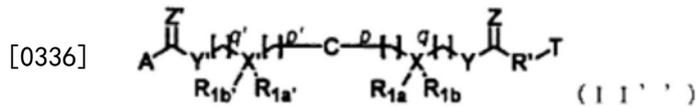
[0331] L'为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[0332] B1和B2相同或不同,为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[0333] B1和B2可具有以L'为中心的对称结构。

[0334] [67]根据[66]所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,以所述式(II')表示的化合物以下述式(II'')表示;

[0335] [化学式11]



[0337] 式中,

[0338] A、R'和T与[44]所述的式(II)中相应符号的含义相同,

[0339] C为切割性部分,

[0340] p和p'相同或不同,为0~10的任意整数,

[0341] q和q'相同或不同,为0~10的任意整数,

[0342] X和X'相同或不同,为碳原子、氮原子或单键;在此,在X为氮原子的情况下,R1b不存在;在X'为氮原子的情况下,R1b'不存在;在X为单键的情况下,R1a和R1b不存在;在X'为单键的情况下,R1a'和R1b'不存在,

[0343] R1a、R1b、R1a'和R1b'相同或不同,选自下述(i)~(vii):

[0344] (i) 氢原子或卤素原子;

[0345] (ii) 一价烷基;

[0346] (iii) 芳烷基;

[0347] (iv) 一价杂环基;

[0348] (v) R<sub>c</sub>-O-、R<sub>c</sub>-C(=O)-、R<sub>c</sub>-O-C(=O)-或R<sub>c</sub>-C(=O)-O-,其中R<sub>c</sub>表示氢原子或一价烷基;

[0349] (vi) NR<sub>d</sub>Re-、NR<sub>d</sub>Re-C(=O)-、NR<sub>d</sub>Re-C(=O)-O-或R<sub>d</sub>-C(=O)-NR<sub>e</sub>-,其中R<sub>d</sub>和R<sub>e</sub>相同或不同,表示氢原子或一价烷基;或者

[0350] (vii) 硝基、硫酸基、磺酸基、氰基或羧基,

[0351] Y和Y'相同或不同,与[32]所述的式(B-1)的Y相同,

[0352] Z和Z'相同或不同,与所述式(B-1)的Z相同。

[0353] [68]一种以下述式(II)表示的具有针对抗体的亲和性物质及切割性部分的抗体或其盐;

[0354] A-L-B-R'-T (II)

[0355] 式中,

[0356] A为针对抗体的亲和性物质,

[0357] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[0358] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[0359] R'为通过抗体与对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而

生成的部分，

[0360] T为抗体。

[0361] (具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的制造方法)

[0362] [69]一种具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,包括:

[0363] 使以下述式(I)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应,生成以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[0364] 所述式(I)为:

[0365]  $A-L-B-R$  (I)

[0366] 式中,

[0367] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[0368] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[0369] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[0370] R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团;

[0371] 所述式(II)为:

[0372]  $A-L-B-R'-T$  (II)

[0373] 式中,

[0374] A、L和B与所述式(I)中相应符号的含义相同,

[0375] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[0376] T为可溶性蛋白质。

[0377] [70]根据[69]的方法,其中,可溶性蛋白质为抗体,反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

[0378] 第三实施方式中,本发明提供具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐、以及其制造方法。

[0379] (具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐)

[0380] [71]一种以下述式(III)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐;

[0381]  $A-L-B'(-F)-R'-T$  (III)

[0382] 式中,

[0383] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[0384] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[0385] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[0386] F为功能性物质,

[0387] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[0388] T为可溶性蛋白质。

[0389] [72]根据[71]的复合物或其盐,其中,可溶性蛋白质为单克隆抗体。

[0390] [73]根据[71]或[72]的复合物或其盐,其中,可溶性蛋白质为IgG抗体。

[0391] [74]根据[71]~[73]中任一项的复合物或其盐,其中,可溶性蛋白质来源于人。

[0392] [75]根据[71]~[74]中任一项的复合物或其盐,其中,可溶性蛋白质为包含选自下述(A)~(C)中的任一种Fc区域蛋白质,且具有抗原结合能力的抗体:

[0393] (A)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;

[0394] (B)包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中插入、添加、缺失或取代1个或数个氨基酸残基而形成的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;或者

[0395] (C)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列显示90%以上的同一性的氨基酸序列的Fc区域蛋白质。

[0396] [76]根据[71]~[75]中任一项的复合物或其盐,其中,

[0397] 可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基,

[0398] 以A-L-B'(-F)-R'表示的结构单元对于所述靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合。

[0399] [77]根据[76]的复合物或其盐,其中,所述特定氨基酸残基在以存在于特定位置的特定氨基酸为中心时分别从N末端侧和C末端侧起到相隔a个氨基酸残基的位置为止的区域中,除所述存在于特定位置的特定氨基酸残基以外,不含与特定氨基酸残基同种的氨基酸残基;在此,a为1~10的任意整数。

[0400] [78]根据[71]~[77]中任一项的复合物或其盐,其中,

[0401] 所述可溶性蛋白质为包含多个单体蛋白质的多聚体蛋白质,

[0402] T在多个单体蛋白质中的对应的多个靶区中具有以A-L-B'(-F)-R'表示的结构单元,因而所述多聚体蛋白质具有多个以A-L-B'(-F)-R'表示的结构单元。

[0403] [79]根据[71]~[78]中任一项的复合物或其盐,其中,

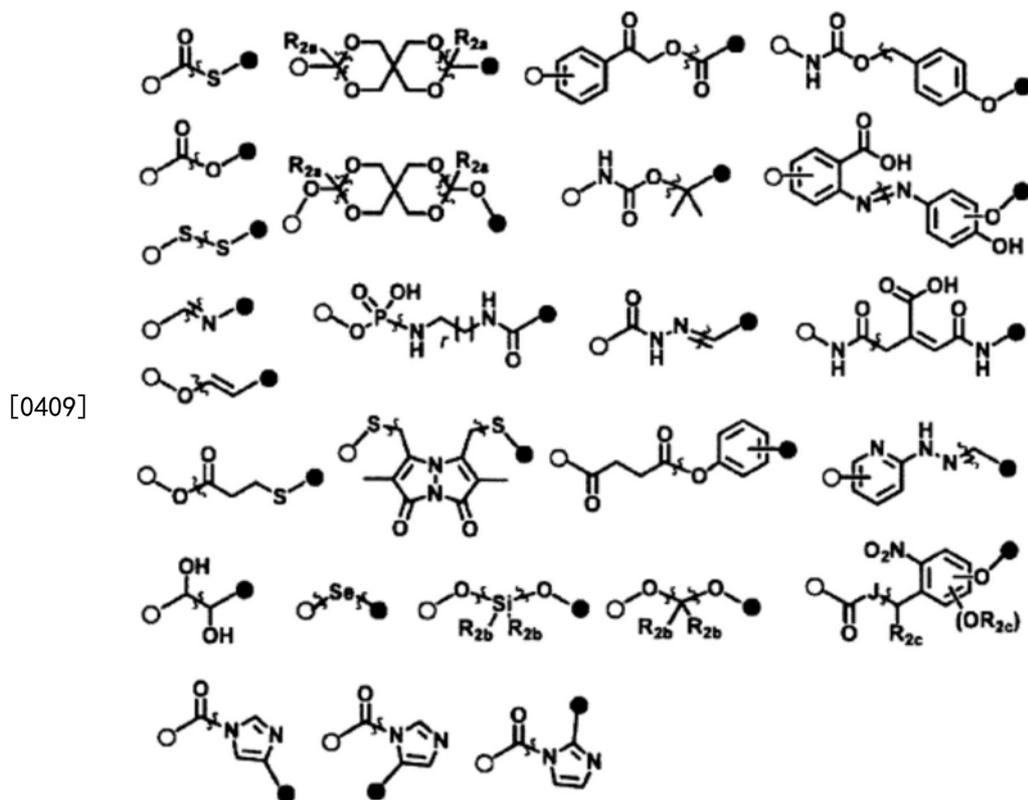
[0404] 所述可溶性蛋白质为包含多个重链的抗体,

[0405] T在多个重链中的对应的多个靶区中具有以A-L-B'(-F)-R'表示的结构单元,因而所述抗体具有多个以A-L-B'(-F)-R'表示的结构单元。

[0406] [80]根据[71]~[79]中任一项的复合物或其盐,其中,包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团为:包含选自二硫残基、缩醛残基、缩酮残基、酯残基、氨甲酰基残基、烷氧基烷基残基、亚胺残基、叔烷基氧基氨基甲酸酯残基、硅烷残基、含有脲的残基、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、含有具有吸电子基团的芳环的残基、含有香豆素的残基、含有砷的残基、含有不饱和键的链残基、糖基残基中的反应部分的二价基团。

[0407] [81]根据[71]~[80]中任一项的复合物或其盐,其中,所述通过反应而生成的部分对应于选自下述组中的任一化学结构;

[0408] [化学式12]



[0410] 在此,与键正交的波浪线表示通过反应而生成的键,

[0411] 多个 $R_{2a}$ 、多个 $R_{2b}$ 和多个 $R_{2c}$ 相同或不同,选自下述(i)~(vii):

[0412] (i) 氢原子或卤素原子;

[0413] (ii) 一价烃基;

[0414] (iii) 芳烷基;

[0415] (iv) 一价杂环基;

[0416] (v)  $R_c-O-$ 、 $R_c-C(=O)-$ 、 $R_c-O-C(=O)-$ 或 $R_c-C(=O)-O-$ ,其中 $R_c$ 表示氢原子或一价烃基;

[0417] (vi)  $NR_dR_e-$ 、 $NR_dR_e-C(=O)-$ 、 $NR_dR_e-C(=O)-O-$ 或 $R_d-C(=O)-NR_e-$ ,其中 $R_d$ 和 $R_e$ 相同或不同,表示氢原子或一价烃基;或者

[0418] (vii) 硝基、硫酸基、磺酸基、氰基或羧基,

[0419] J为 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 或 $-S-$ ,

[0420] r为1~4的任意整数,

[0421] ○(白色圆)表示与A结合的键,●(黑色圆)表示与B结合的键,

[0422] 在化学结构以切割位点为中心呈不对称的情况下,可以是●表示与A结合的键,○表示与B结合的键。

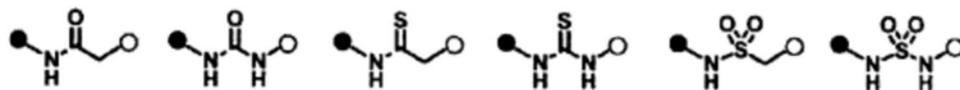
[0423] [82]根据[71]~[81]中任一项的复合物或其盐,其中,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分为:通过赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基与对于赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基中的任一残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分。

[0424] [83]根据[71]~[82]中任一项的复合物或其盐,其中,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分为:通过赖氨酸残基与对于赖氨酸残基的侧链具有特异性

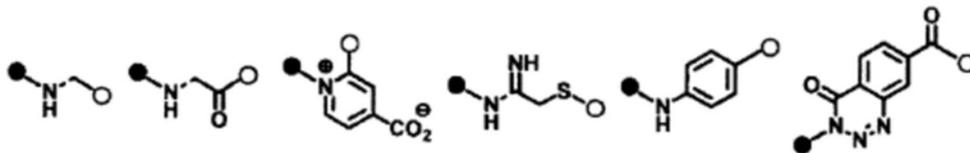
的反应性基团之间的反应而生成的部分。

[0425] [84]根据[71]~[83]中任一项的复合物或其盐,其中,所述通过反应而生成的部分对应于选自下述组中的任一化学结构;

[0426] [化学式13]



[0427]



[0428] 在此,●(黑色圆)表示与T侧的部分结合的键,○(白色圆)表示与B侧的部分结合的键。

[0429] [85]根据[71]~[84]中任一项的复合物或其盐,其中,功能性物质为药物或标记物质。

[0430] [86]根据[71]~[85]中任一项的复合物或其盐,其中,功能性物质为低分子化合物。

[0431] [87]根据[85]或[86]所述的复合物或其盐,其中,药物为抗癌剂。

[0432] [88]根据[71]~[87]中任一项的复合物或其盐,其中,连结A和R'的主链的原子数为4~20个。

[0433] [89]根据[71]~[88]中的任一项所述的复合物或其盐,其中,连结A和R的主链不含环结构。

[0434] [90]根据[71]~[89]中任一项的复合物或其盐,其中,以L-B表示的部分结构不含肽部分。

[0435] [91]根据[71]~[90]中任一项的复合物或其盐,其中,以所述式(III)表示的化合物以下述式(III')表示;

[0436] A-B2'(-F2)-L'-B1'(-F1)-R'-T (III')

[0437] 式中,

[0438] A、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

[0439] L'为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

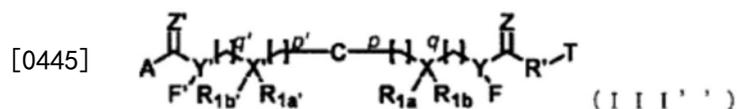
[0440] B1'和B2'相同或不同,为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[0441] F1和F2相同或不同,为功能性物质,

[0442] B1'(-F1)和B2'(-F2)可具有以L'为中心的对称结构。

[0443] [92]根据[91]所述的复合物或其盐,其中,以所述式(III')表示的化合物以下述式(III'')表示;

[0444] [化学式14]



[0446] 式中,

[0447] A、R'和T与[71]所述的式(III)中相应符号的含义相同,

- [0448] C为切割性部分，
- [0449] p和p'相同或不同，为0~10的任意整数，
- [0450] q和q'相同或不同，为0~10的任意整数，
- [0451] X和X'相同或不同，为碳原子、氮原子或单键；在此，在X为氮原子的情况下，R<sub>1b</sub>不存在；在X'为氮原子的情况下，R<sub>1b</sub>'不存在；在X为单键的情况下，R<sub>1a</sub>和R<sub>1b</sub>不存在；在X'为单键的情况下，R<sub>1a</sub>'和R<sub>1b</sub>'不存在，
- [0452] R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a</sub>'和R<sub>1b</sub>'相同或不同，选自所述(i)~(vii)，
- [0453] Y和Y'相同或不同，为从权利要求32所述的式(B-1)的Y除去1个氢原子而得的残基，
- [0454] Z和Z'相同或不同，与所述式(B-1)的Z含义相同，
- [0455] F和F'相同或不同，为功能性物质。
- [0456] [93]一种以下述式(III)表示的具有亲和性物质、功能性物质及抗体的复合物或其盐；
- [0457] A-L-B'(-F)-R'-T (III)
- [0458] 式中，
- [0459] A为针对抗体的亲和性物质，
- [0460] L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，
- [0461] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团，
- [0462] F为功能性物质，
- [0463] R'为通过抗体与对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分，
- [0464] T为抗体。
- [0465] (具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的制造方法)
- [0466] [94]一种具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的制造方法，其中，包括：
- [0467] 使以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应，生成以下述式(III)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序；
- [0468] 所述式(II)为：
- [0469] A-L-B-R'-T (II)
- [0470] 式中，
- [0471] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，
- [0472] L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，
- [0473] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团，
- [0474] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，
- [0475] T为可溶性蛋白质；
- [0476] 所述式(III)为：

[0477]  $A-L-B'(-F)-R'-T$  (III)

[0478] 式中,

[0479] A、L、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

[0480] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[0481] F为功能性物质。

[0482] [95]根据[94]的方法,其中,可溶性蛋白质为抗体,反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

[0483] [96]一种具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的制造方法,其中,包括:

[0484] (A)使以下述式(I)表示的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应,生成以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序;以及

[0485] (B)使所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成以下述式(III)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序;

[0486] 所述式(I)为:

[0487]  $A-L-B-R$  (I)

[0488] 式中,

[0489] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[0490] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[0491] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团,

[0492] R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团;

[0493] 所述式(II)为:

[0494]  $A-L-B-R'-T$  (II)

[0495] 式中,

[0496] A、L和B与所述式(I)中相应符号的含义相同,

[0497] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[0498] T为可溶性蛋白质;

[0499] 所述式(III)为:

[0500]  $A-L-B'(-F)-R'-T$  (III)

[0501] 式中,

[0502] A和L与所述式(I)中相应符号的含义相同,

[0503] R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

[0504] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[0505] F为功能性物质。

[0506] 第四实施方式中,本发明提供具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质的制造方法。

[0507] [97]一种具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,包括:  
[0508] 对以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式(IV)表示的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[0509] 所述式(II)为:

[0510]  $A-L-B-R'-T$  (II)

[0511] 式中,

[0512] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[0513] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[0514] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(a)不含生物正交性官能团的二价基团,

[0515] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[0516] T为可溶性蛋白质;

[0517] 所述式(IV)为:

[0518]  $L1-B-R'-T$  (IV)

[0519] 式中,

[0520] B、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

[0521] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团。

[0522] [98]根据[97]的方法,其中,L为:

[0523] (i)切割性连接体,该切割性连接体是包含切割性部分的二价基团,该切割性部分具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力;或者

[0524] (ii)切割性连接体,该切割性连接体是包含切割性部分的二价基团,该切割性部分不具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力。

[0525] [99]根据[98]的方法,其中,

[0526] L为所述(i)的切割性连接体,

[0527] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团,

[0528] B为所述(a)或(b)的二价基团。

[0529] [100]根据[98]或[99]的方法,其中,

[0530] L为所述(i)的切割性连接体,

[0531] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团,

[0532] B为所述(b)的二价基团。

[0533] [101]根据[98]的方法,其中,

[0534] L为所述(ii)的切割性连接体,

[0535] L1为(i')不含生物正交性官能团的一价基团,

[0536] B为所述(a)的二价基团。

[0537] [102]根据[97]~[101]中任一项的方法,其中,可溶性蛋白质为抗体,反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

[0538] [103]一种具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,包

括：

[0539] (A) 使以下述式 (I) 表示的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应,生成以下述式 (II) 表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序；以及

[0540] (B) 对所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式 (IV) 表示的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序；

[0541] 所述式 (I) 为：

[0542]  $A-L-B-R$  (I)

[0543] 式中，

[0544] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

[0545] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

[0546] B为 (a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者 (a) 不含生物正交性官能团的二价基团，

[0547] R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团；

[0548] 所述式 (II) 为：

[0549]  $A-L-B-R'-T$  (II)

[0550] 式中，

[0551] A、L和B与所述式 (I) 中相应符号的含义相同，

[0552] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

[0553] T为可溶性蛋白质；

[0554] 所述式 (IV) 为：

[0555]  $L1-B-R'-T$  (IV)

[0556] 式中，

[0557] B、R'和T与所述式 (II) 中相应符号的含义相同，

[0558] L1为 (i') 包含生物正交性官能团的一价基团、或者 (ii') 不含生物正交性官能团的一价基团。

[0559] 第五实施方式中,本发明提供具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法。

[0560] [104] 一种具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,包括：

[0561] 对以下述式 (III) 表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割,或者使以下述式 (IV) 表示的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成以下述式 (V) 表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序；

[0562] 所述式 (III) 为：

[0563]  $A-L-B'(-F)-R'-T$  (III)

[0564] 式中，

[0565] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

[0566] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

- [0567] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团，
- [0568] F为功能性物质，
- [0569] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，
- [0570] T为可溶性蛋白质；
- [0571] 所述式(IV)为：
- [0572]  $L1-B-R'-T$  (IV)
- [0573] 式中，
- [0574] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团，
- [0575] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团，
- [0576] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，
- [0577] T为可溶性蛋白质；
- [0578] 所述式(V)为：
- [0579]  $F-(L1-B)-R'-T$  (V)
- [0580] 式中，
- [0581] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团，
- [0582] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团，
- [0583] 以(L1-B)'表示的结构单元为包含通过功能性物质与(i')及(a)中的生物正交性官能团中的任一者或两者之间的反应而生成的部分的二价结构单元，
- [0584] F为功能性物质，
- [0585] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，
- [0586] T为可溶性蛋白质。
- [0587] [105]根据[104]的方法，其中，该方法包含：
- [0588] 对所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割，生成以下述式(V1)表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序；
- [0589]  $L1-B'(-F)-R'-T$  (V1)
- [0590] 式中，
- [0591] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团，
- [0592] B'、F、R'和T与所述式(III)中相应符号的含义相同。
- [0593] [106]根据[104]的方法，其中，该方法包含：
- [0594] 使所述具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与1种或2种功能性物质反应，生成以下述式(V2)或以下述式(V3)表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序；

- [0595] 所述式 (V2) 为:
- [0596]  $F-L1'-B-R'-T$  (V2)
- [0597] 式中,
- [0598] B、R'和T与所述式 (IV) 中相应符号的含义相同,
- [0599] L1'为包含通过功能性物质与(i')包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团,
- [0600] F为功能性物质;
- [0601] 所述式 (V3) 为:
- [0602]  $Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T$  (V3)
- [0603] 式中,
- [0604] R'和T与所述式 (IV) 中相应符号的含义相同,
- [0605] L1'与所述式 (V2) 中相应符号的含义相同,
- [0606] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,
- [0607] Fa和Fb分别为相同或不同的功能性物质。
- [0608] [107]根据[104]~[106]中任一项的方法,其中,可溶性蛋白质为抗体,反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。
- [0609] [108]一种具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,包括:
- [0610] (A)使以下述式 (II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成以下述式 (III)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序;以及
- [0611] (B)对所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式 (V1)表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序;
- [0612] 所述式 (II) 为:
- [0613]  $A-L-B-R'-T$  (II)
- [0614] 式中,
- [0615] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,
- [0616] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,
- [0617] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团,
- [0618] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,
- [0619] T为可溶性蛋白质;
- [0620] 所述式 (III) 为:
- [0621]  $A-L-B'(-F)-R'-T$  (III)
- [0622] 式中,
- [0623] A、L、R'和T与所述式 (II) 中相应符号的含义相同,
- [0624] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,
- [0625] F为功能性物质;

[0626] 所述式(V1)为:

[0627]  $L1-B'(-F)-R'-T$  (V1)

[0628] 式中,

[0629] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团,

[0630] B'、F、R'和T与所述式(III)中相应符号的含义相同。

[0631] [109]一种具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,包括:

[0632] (A)使以下述式(I)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应,生成以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[0633] (B)使所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成以下述式(III)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序;以及

[0634] (C)对所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式(V1)表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[0635] 所述式(I)为:

[0636]  $A-L-B-R$  (I)

[0637] 式中,

[0638] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[0639] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[0640] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团,

[0641] R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团;

[0642] 所述式(II)为:

[0643]  $A-L-B-R'-T$  (II)

[0644] 式中,

[0645] A、L和B与所述式(I)中相应符号的含义相同,

[0646] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[0647] T为可溶性蛋白质;

[0648] 所述式(III)为:

[0649]  $A-L-B'(-F)-R'-T$  (III)

[0650] 式中,

[0651] A和L与所述式(I)中相应符号的含义相同,

[0652] R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

[0653] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[0654] F为功能性物质;

[0655] 所述式(V1)为:

[0656]  $L1-B'(-F)-R'-T$  (V1)

[0657] 式中，

[0658] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团，

[0659] B'、F、R'和T与所述式(III)中相应符号的含义相同。

[0660] [110]一种具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法，其中，包括：

[0661] (A)对以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割，生成以下述式(IV)表示的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序；以及

[0662] (B)使所述具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与1种或2种以上的功能性物质反应，生成以下述式(V2)或以下述式(V3)表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序；

[0663] 所述式(II)为：

[0664] A-L-B-R'-T (II)

[0665] 式中，

[0666] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

[0667] L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

[0668] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(a)不含生物正交性官能团的二价基团，

[0669] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

[0670] T为可溶性蛋白质；

[0671] 所述式(IV)为：

[0672] L1-B-R'-T (IV)

[0673] 式中，

[0674] B、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同，

[0675] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团；

[0676] 所述式(V2)为：

[0677] F-L1'-B-R'-T (V2)

[0678] 式中，

[0679] B、R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同，

[0680] L1'为包含通过功能性物质与(i')包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团，

[0681] F为功能性物质；

[0682] 所述式(V3)为：

[0683] Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

[0684] 式中，

[0685] R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同，

[0686] L1'与所述式(V2)中相应符号的含义相同，

[0687] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价

基团，

[0688] Fa和Fb分别为相同或不同的功能性物质。

[0689] [111]一种具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法，其中，包括：

[0690] (A)使以下述式(I)表示的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应，生成以下述式(II)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序；

[0691] (B)对所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割，生成以下述式(IV)表示的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序；以及

[0692] (C)使所述具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与1种或2种以上的功能性物质反应，生成以下述式(V2)或以下述式(V3)表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序；

[0693] 所述式(I)为：

[0694]  $A-L-B-R$  (I)

[0695] 式中，

[0696] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

[0697] L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

[0698] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(a)不含生物正交性官能团的二价基团，

[0699] R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团；

[0700] 所述式(II)为：

[0701]  $A-L-B-R'-T$  (II)

[0702] 式中，

[0703] A、L和B与所述式(I)中相应符号的含义相同，

[0704] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

[0705] T为可溶性蛋白质；

[0706] 所述式(IV)为：

[0707]  $L1-B-R'-T$  (IV)

[0708] 式中，

[0709] B、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同，

[0710] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团；

[0711] 所述式(V2)为：

[0712]  $F-L1'-B-R'-T$  (V2)

[0713] 式中，

[0714] B、R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同，

[0715] L1'为包含通过功能性物质与(i')包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团，

[0716] F为功能性物质；

[0717] 所述式(V3)为：

- [0718] Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)
- [0719] 式中，
- [0720] R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同，
- [0721] L1'与所述式(V2)中相应符号的含义相同，
- [0722] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团，
- [0723] Fa和Fb分别为相同或不同的功能性物质。
- [0724] 第六实施方式中，本发明提供区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐、以及其制造方法。
- [0725] (区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐)
- [0726] [1]一种区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐，其中，
- [0727] 可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基，且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基，且
- [0728] 生物正交性官能团经由不含肽部分的连接体对于所述靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合。
- [0729] [2]一种区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐，其中，
- [0730] 该可溶性蛋白质以下述式(IV)表示，且以L1-B-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合；
- [0731] L1-B-R'-T (IV)
- [0732] 式中，
- [0733] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团，
- [0734] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团，
- [0735] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，
- [0736] T为可溶性蛋白质，
- [0737] 所述可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基，且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基。
- [0738] [3]根据[1]或[2]的可溶性蛋白质或其盐，其中，可溶性蛋白质为单克隆抗体。
- [0739] [4]根据[1]~[3]中任一项的可溶性蛋白质或其盐，其中，可溶性蛋白质为IgG抗体。
- [0740] [5]根据[1]~[4]中任一项的可溶性蛋白质或其盐，其中，可溶性蛋白质来源于人。
- [0741] [6]根据[1]~[5]中任一项的可溶性蛋白质或其盐，其中，可溶性蛋白质为包含选自下述(A)~(C)中的任一种Fc区域蛋白质，且具有抗原结合能力的抗体：
- [0742] (A)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的Fc区域蛋白质；
- [0743] (B)包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中插入、添加、缺失或取代1个或数个氨基酸残基而形成的氨基酸序列的Fc区域蛋白质；或者
- [0744] (C)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列显示90%以上的同一性的氨基酸序列的Fc区域蛋白质。
- [0745] [7]根据[1]~[6]中任一项的可溶性蛋白质或其盐，其中，所述靶区为由连续的1

~10个氨基酸残基形成的区域。

[0746] [8]根据[1]~[7]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述靶区为由连续的1~3个氨基酸残基形成的区域。

[0747] [9]根据[8]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述靶区为(a)由人IgG Fc区域中的第246~248位的氨基酸残基形成的区域、(b)由人IgG Fc区域中的第288~290位的氨基酸残基形成的区域、或者(c)由人IgG Fc区域中的第317位的氨基酸残基形成的区域。

[0748] [10]根据[1]~[9]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述区域选择性为50%以上。

[0749] [11]根据[10]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述区域选择性为70%以上。

[0750] [12]根据[11]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述区域选择性为90%以上。

[0751] [13]根据[1]~[12]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述特定氨基酸残基在存在于特定位置的特定氨基酸为中心时分别从N末端侧和C末端侧起到相隔a个氨基酸残基的位置为止的区域中,除所述存在于特定位置的特定氨基酸残基以外,不含与特定氨基酸残基同种的氨基酸残基;在此,a为1~10的任意整数。

[0752] [14]根据[1]、[3]~[13]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述可溶性蛋白质为包含多个单体蛋白质的多聚体蛋白质,

[0753] 多聚体蛋白质所含的多个单体蛋白质中的所述位置存在的多个特定的氨基酸残基上具有生物正交性官能团,因而所述多聚体蛋白质具有多个生物正交性官能团。

[0754] [15]根据[1]、[3]~[14]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述可溶性蛋白质为包含多个重链的抗体,

[0755] 抗体所含的多个重链中的所述位置存在的多个特定的氨基酸残基上具有生物正交性官能团,因而抗体具有多个生物正交性官能团。

[0756] [16]根据[2]~[13]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述可溶性蛋白质为包含多个单体蛋白质的多聚体蛋白质,

[0757] T在多个单体蛋白质中的对应的多个靶区中具有以A-L-B-R'表示的结构单元,因而多聚体蛋白质具有多个以A-L-B-R'表示的结构单元。

[0758] [17]根据[2]~[13]、[16]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述可溶性蛋白质为包含多个重链的抗体,

[0759] T在多个重链中的对应的多个靶区中具有以A-L-B-R'表示的结构单元,因而抗体具有多个以A-L-B-R'表示的结构单元。

[0760] [18]根据[15]或[17]的可溶性蛋白质或其盐,其中,重链的个数为2个。

[0761] [19]根据[2]~[13]、[16]~[18]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,L1以下述式(L1-1)~(L1-2)中的任一式表示;

[0762] C1-Lb (L1-1)

[0763] C1 (L1-2)

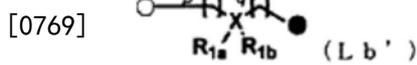
[0764] 式中,

[0765] Lb为二价基团,

[0766] C1为生物正交性官能团、或者除生物正交性官能团以外的基团。

[0767] [20]根据[19]所述的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述Lb以下述式(Lb')表示;

[0768] [化学式15]



[0770] 式中,

[0771] p为0~10的任意整数,

[0772] q为0~10的任意整数,

[0773] X为碳原子、氮原子或单键,在此,X为氮原子的情况下,R<sub>1b</sub>不存在,X为单键的情况下,R<sub>1a</sub>和R<sub>1b</sub>不存在,

[0774] R<sub>1a</sub>和R<sub>1b</sub>相同或不同,选自氢原子或者上述的取代基,

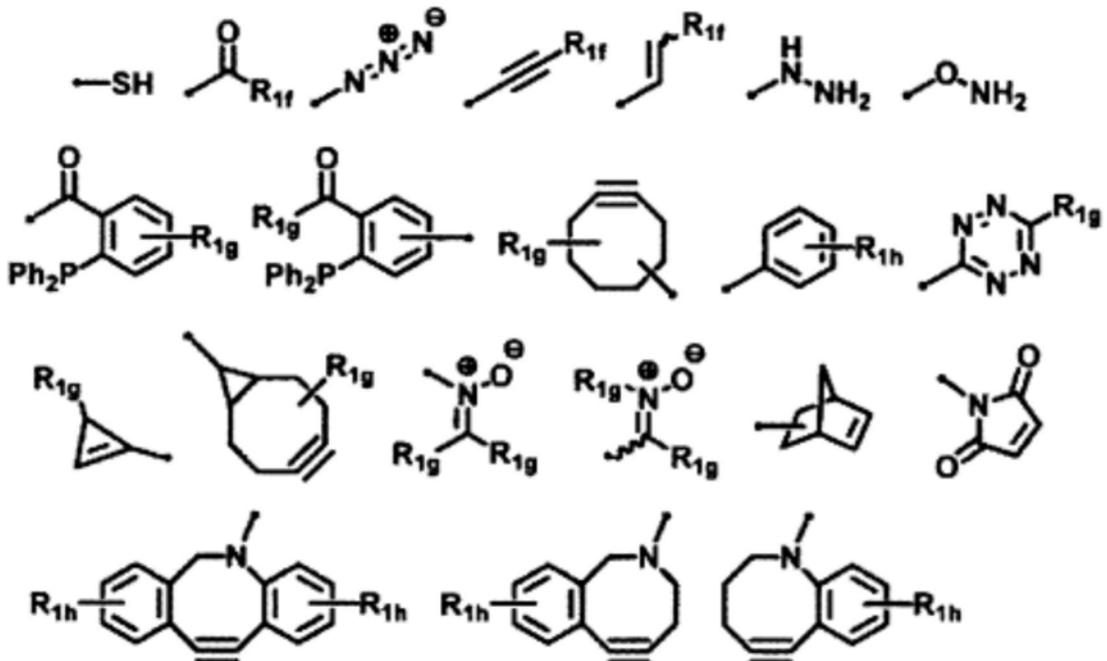
[0775] ○(白色圆)表示与C1结合的键,●(黑色圆)表示与B结合的键,

[0776] [21]根据[1]~[20]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,包含生物正交性官能团的二价基团为:在主链中包含选自叠氮残基、醛残基、硫醇残基、炔烃残基、烯烃残基、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、二硫残基、硫酯基、α-卤化羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基中的生物正交性官能团的二价基团。

[0777] [22]根据[1]~[20]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,包含生物正交性官能团的二价基团为:在侧链中包含选自叠氮残基、醛残基、硫醇残基、炔烃残基、烯烃残基、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、二硫残基、α-卤化羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基中的生物正交性官能团的二价基团。

[0778] [23]根据[1]~[22]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,生物正交性官能团为以下述式表示的任一个;

[0779] [化学式16]



[0781] 式中,

[0782] R<sub>1f</sub>、一个或多个R<sub>1g</sub>和一个或多个R<sub>1h</sub>相同或不同,为选自所述(i)~(vii)的原子或

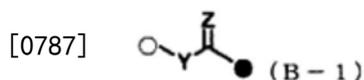
基团、或者吸电子基团，

[0783] • 表示键。

[0784] [24]根据[2]~[13]、[16]~[23]中任一项的可溶性蛋白质或其盐，其中，所述(b)的二价基团选自可取代的亚烷基、可取代的亚环烷基、可取代的芳基、可取代的二价杂环基、-NR<sub>a</sub>-、-O-、或这些基团中的2个以上的组合；其中R<sub>a</sub>表示氢原子或取代基。

[0785] [25]根据[2]~[13]、[16]~[24]中任一项的可溶性蛋白质或其盐，其中，B以下述式(B-1)表示；

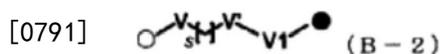
[0786] [化学式17]



[0788] 式中，

[0789] Y为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或下述式(B-2)，

[0790] [化学式18]



[0792] 式(B-2)中，

[0793] V和V'相同或不同，为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或单键，

[0794] V1为包含生物正交性官能团的二价基团，

[0795] s为0~10的任意整数，

[0796] 式(B-2)中的○和●的取向分别与式(B-1)中的○和●的取向相同；

[0797] Z为氧原子、硫原子或氢原子，在Z为氢原子的情况下，-C(=Z)-表示-CH<sub>2</sub>-；

[0798] 式(B-1)中的○(白色圆)表示与L侧部分结合的键，●(黑色圆)表示与R侧部分结合的键。

[0799] [26]根据[1]~[25]中任一项的可溶性蛋白质或其盐，其中，生物正交性官能团经由赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基中的任一残基的侧链与可溶性蛋白质结合。

[0800] [27]根据[26]的可溶性蛋白质或其盐，其中，生物正交性官能团经由赖氨酸残基的侧链与可溶性蛋白质结合。

[0801] [28]根据[2]~[13]、[16]~[26]中任一项的可溶性蛋白质或其盐，其中，反应性基团为对于赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基中的任一残基的侧链具有特异性的反应性基团。

[0802] [29]根据[2]~[13]、[16]~[28]中任一项的可溶性蛋白质或其盐，其中，反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

[0803] [30]根据[2]~[13]、[16]~[29]中任一项的可溶性蛋白质或其盐，其中，反应性基团对应于选自下述组的任一化学结构；

[0804] [化学式19]



氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基,且  
[0826] 生物正交性官能团经由不含肽部分的连接体对于所述靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合,

[0827] 生物正交性官能团经由赖氨酸残基的侧链与可溶性蛋白质结合,

[0828] 可溶性蛋白质为包含多个重链的抗体,

[0829] 抗体所含的多个重链中的所述位置存在的多个特定的氨基酸残基上具有生物正交性官能团,因而抗体具有多个生物正交性官能团。

[0830] [38]一种区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐,其中,该可溶性蛋白质以下述式(IV)表示,

[0831]  $L1-B-R'-T$  (IV)

[0832] 且以 $L1-B-R'$ 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合;

[0833] 式(IV)中,

[0834]  $L1$ 为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团,

[0835]  $B$ 为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[0836]  $R'$ 为通过抗体与对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分,

[0837]  $T$ 为可溶性蛋白质;

[0838] 所述可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基。

[0839] (区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法)

[0840] 本发明还提供上述[1]~[38]的可溶性蛋白质中需要用式(IV)或其下位的式特定的区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法。

[0841] [39]一种区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,包括:

[0842] 对区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割,生成区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[0843] 所述区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质以下述式(II)表示,且以 $L1-B-R'$ 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合,

[0844]  $A-L-B-R'-T$  (II)

[0845] 式中,

[0846]  $A$ 为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[0847]  $L$ 为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[0848]  $B$ 为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(a)不含生物正交性官能团的二价基团,

[0849] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

[0850] T为可溶性蛋白质，

[0851] 所述可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基，且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基；

[0852] 所述区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质以下述式(IV)表示，且以L1-B-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合，

[0853] L1-B-R'-T (IV)

[0854] 式中，

[0855] B、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同，

[0856] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团。

[0857] 较好是上述[39]的方法可以是如下的方法。

[0858] [40]根据[39]的方法，其中，可溶性蛋白质为抗体，反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

[0859] [41]一种区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法，其中，包括：

[0860] (A)使以下述式(I)表示的化合物或其盐与可溶性蛋白质(在此，可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基，且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基)反应，

[0861] A-L-B-R (I)

[0862] 生成以下述式(II)表示

[0863] A-L-B-R'-T (II)

[0864] 且以L1-B-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序；以及

[0865] (B)对所述具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割，生成以下述式(IV)表示

[0866] L1-B-R'-T (IV)

[0867] 且以L1-B-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序；

[0868] 式(I)中，

[0869] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质，

[0870] L为切割性连接体，该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团，

[0871] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(a)不含生物正交性官能团的二价基团，

[0872] R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团；

[0873] 式(II)中，

- [0874] A、L和B与所述式(I)中相应符号的含义相同，
- [0875] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，
- [0876] T为可溶性蛋白质；
- [0877] 式(IV)中，
- [0878] B、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同，
- [0879] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团。
- [0880] 第七实施方式中，本发明提供区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐、以及其制造方法。
- [0881] (区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐)
- [0882] [1]一种区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐，其中，
- [0883] 可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基，且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基，且
- [0884] 功能性物质经由不含肽部分的连接体对于所述靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合。
- [0885] [2]一种区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐，其以下述式(V)表示
- [0886]  $F-(L1-B)'-R'-T$  (V)
- [0887] 且以 $F-(L1-B)'-R'$ 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合；
- [0888] 式中，
- [0889] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团，
- [0890] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团，
- [0891] 以 $(L1-B)'$ 表示的结构单元为包含通过功能性物质与(i')和(a)中的生物正交性官能团中的任一者或两者之间的反应而生成的部分的二价结构单元，
- [0892] F为功能性物质，
- [0893] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，
- [0894] T为可溶性蛋白质；
- [0895] 所述可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基，且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基。
- [0896] [3]根据[2]的可溶性蛋白质或其盐，其中，所述可溶性蛋白质或其盐是以下述式(V1)表示
- [0897]  $L1-B'(-F)-R'-T$  (V1)
- [0898] 且以 $L1-B'(-F)-R'$ 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐；
- [0899] 式中，
- [0900] L1、F、R'和T与所述式(V)中相应符号的含义相同，

[0901] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团。

[0902] [4]根据[2]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述可溶性蛋白质或其盐是以下述式(V2)表示

[0903]  $F-L1'-B-R'-T$  (V2)

[0904] 且以 $F-L1'-B-R'$ 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐,或者

[0905] 以下述式(V3)表示

[0906]  $Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T$  (V3)

[0907] 且以 $Fa-L1'-B'(-Fb)-R'$ 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐;

[0908] 式(V2)中,

[0909] F、B、R'和T与所述式(V)中相应符号的含义相同,

[0910] L1'为包含通过功能性物质与(i')包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团;

[0911] 式(V3)中,

[0912] R'和T与所述式(V)中相应符号的含义相同,

[0913] L1'与所述式(V2)的L1'相同,

[0914] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[0915] Fa和Fb分别为相同或不同的功能性物质。

[0916] [5]根据[1]~[4]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,可溶性蛋白质为单克隆抗体。

[0917] [6]根据[1]~[5]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,可溶性蛋白质为IgG抗体。

[0918] [7]根据[1]~[6]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,可溶性蛋白质来源于人。

[0919] [8]根据[1]~[7]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,可溶性蛋白质为包含选自下述(A)~(C)中的任一种Fc区域蛋白质,且具有抗原结合能力的抗体:

[0920] (A)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;

[0921] (B)包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中插入、添加、缺失或取代1个或数个氨基酸残基而形成的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;或者

[0922] (C)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列显示90%以上的同一性的氨基酸序列的Fc区域蛋白质。

[0923] [9]根据[1]~[8]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述靶区为由连续的1~10个氨基酸残基形成的区域。

[0924] [10]根据[9]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述靶区为由连续的1~3个氨基酸残基形成的区域。

[0925] [11]根据[10]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述靶区为(a)由人IgG Fc区域中的

第246~248位的氨基酸残基形成的区域、(b)由人IgG Fc区域中的第288~290位的氨基酸残基形成的区域、或者(c)由人IgG Fc区域中的第317位的氨基酸残基形成的区域。

[0926] [12]根据[1]~[11]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述区域选择性为50%以上。

[0927] [13]根据[12]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述区域选择性为70%以上。

[0928] [14]根据[13]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述区域选择性为90%以上。

[0929] [15]根据[1]~[14]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述特定氨基酸残基在以存在于特定位置的特定氨基酸为中心时分别从N末端侧和C末端侧起到相隔a个氨基酸残基的位置为止的区域中,除所述存在于特定位置的特定氨基酸残基以外,不含与特定氨基酸残基同种的氨基酸残基;在此,a为1~10的任意整数。

[0930] [16]根据[1]、[5]~[15]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述可溶性蛋白质为包含多个单体蛋白质的多聚体蛋白质,

[0931] 多聚体蛋白质所含的多个单体蛋白质中的所述位置存在的多个特定的氨基酸残基上具有功能性物质,因而所述多聚体蛋白质具有多个功能性物质。

[0932] [17]根据[1]、[5]~[16]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述可溶性蛋白质为包含多个重链的抗体,

[0933] 抗体所含的多个重链中的所述位置存在的多个特定的氨基酸残基上具有功能性物质,因而抗体具有多个功能性物质。

[0934] [18]根据[2]~[15]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述可溶性蛋白质为包含多个单体蛋白质的多聚体蛋白质,

[0935] T在多个单体蛋白质中的对应的多个靶区中具有以A-L-B-R'表示的结构单元,因而所述多聚体蛋白质具有多个以A-L-B-R'表示的结构单元。

[0936] [19]根据[2]~[15]、[18]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,

[0937] 所述可溶性蛋白质为包含多个重链的抗体,

[0938] T在多个重链中的对应的多个靶区中具有以A-L-B-R'表示的结构单元,因而所述抗体具有多个以A-L-B-R'表示的结构单元。

[0939] [20]根据[17]或[19]的可溶性蛋白质或其盐,其中,重链的个数为2个。

[0940] [21]根据[2]~[15]、[18]~[20]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,L1以下述式(L1-1)~(L1-2)中的任一式表示;

[0941] C1-Lb (L1-1)

[0942] C1 (L1-2)

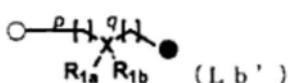
[0943] 式中,

[0944] Lb为二价基团,

[0945] C1为生物正交性官能团、或者除生物正交性官能团以外的基团。

[0946] [22]根据[21]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述Lb以下述式(Lb')表示;

[0947] [化学式21]

[0948]  (Lb')

[0949] 式中,

[0950] p为0~10的任意整数,

[0951] q为0~10的任意整数,

[0952] X为碳原子、氮原子或单键,在此,X为氮原子的情况下,R<sub>1b</sub>不存在,X为单键的情况下,R<sub>1a</sub>和R<sub>1b</sub>不存在,

[0953] R<sub>1a</sub>和R<sub>1b</sub>相同或不同,选自氢原子或者上述的取代基,

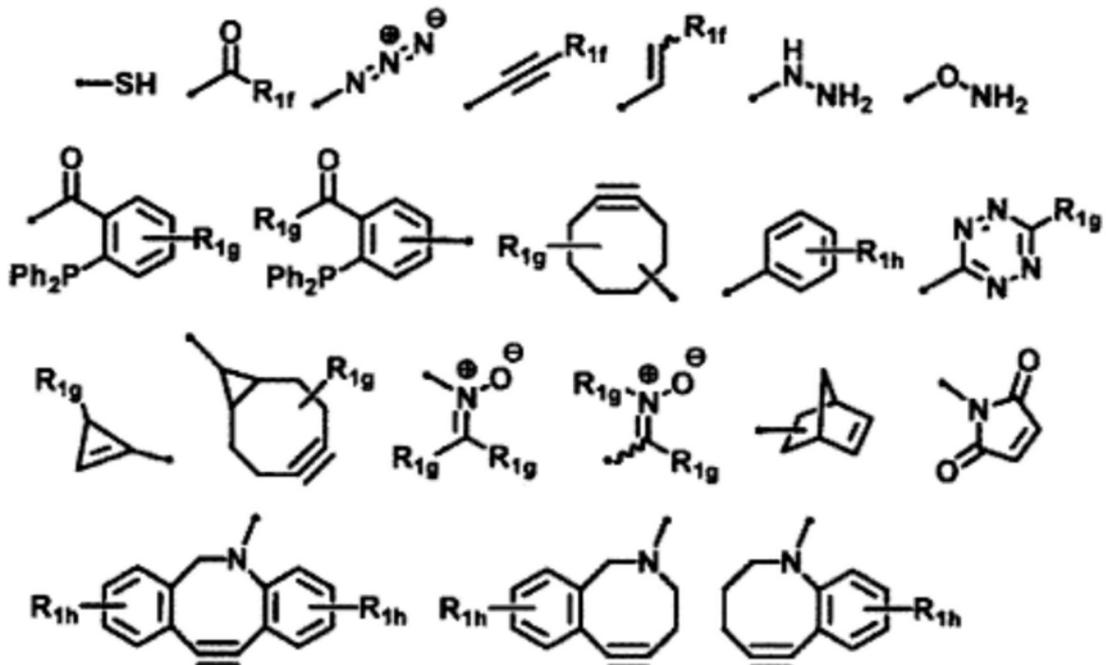
[0954] ○(白色圆)表示与C1结合的键,●(黑色圆)表示与B结合的键,

[0955] [23]根据[1]~[22]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,包含生物正交性官能团的二价基团为:在主链中包含选自叠氮残基、醛残基、硫醇残基、炔烃残基、烯炔残基、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、二硫残基、硫酯基、 $\alpha$ -卤化羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基中的生物正交性官能团的二价基团。

[0956] [24]根据[1]~[22]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,包含生物正交性官能团的二价基团为:在侧链中包含选自叠氮残基、醛残基、硫醇残基、炔烃残基、烯炔残基、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、二硫残基、 $\alpha$ -卤化羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基中的生物正交性官能团的二价基团。

[0957] [25]根据[1]~[24]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,生物正交性官能团为以下述式表示的任一个;

[0958] [化学式22]



[0960] 式中,

[0961] R<sub>1f</sub>、一个或多个R<sub>1g</sub>和一个或多个R<sub>1h</sub>相同或不同,为选自所述(i)~(vii)中的原子或基团、或者吸电子基团,

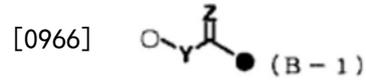
[0962] •表示键。

[0963] [26]根据[1]~[25]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述(b)的二价基团

选自可取代的亚烷基、可取代的亚环烷基、可取代的芳基、可取代的二价杂环基、 $-\text{NR}_a-$ 、 $-0-$ 、或这些基团中的2个以上的组合,其中 $R_a$ 表示氢原子或取代基。

[0964] [27]根据[2]~[15]、[18]~[26]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,B以下述式(B-1)表示;

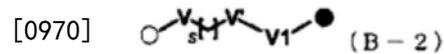
[0965] [化学式23]



[0967] 式中,

[0968] Y为 $-\text{NH}-$ 、 $-0-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 或下述式(B-2),

[0969] [化学式24]



[0971] 式(B-2)中,

[0972] V和V'相同或不同,为 $-\text{NH}-$ 、 $-0-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 或单键,

[0973] V1为包含生物正交性官能团的二价基团,

[0974] s为0~10的任意整数,

[0975] 式(B-2)中的○和●的取向分别与式(B-1)中的○和●的取向相同;

[0976] Z为氧原子、硫原子或氢原子,在Z为氢原子的情况下, $-\text{C}(=\text{Z})-$ 表示 $-\text{CH}_2-$ ;

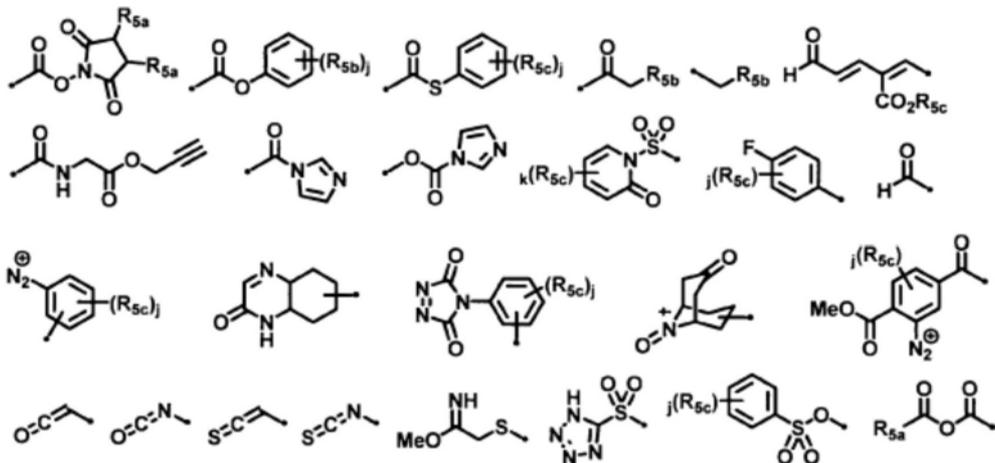
[0977] 式(B-1)中的○(白色圆)表示与L侧部分结合的键,●(黑色圆)表示与R侧部分结合的键。

[0978] [28]根据[2]~[15]、[18]~[27]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,反应性基团为对于赖氨酸残基、酪氨酸残基或色氨酸残基中的任一残基的侧链具有特异性的反应性基团。

[0979] [29]根据[2]~[15]、[18]~[28]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

[0980] [30]根据[2]~[15]、[18]~[29]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,反应性基团对应于选自下述组中的任一化学结构;

[0981] [化学式25]



[0983] 在此,

[0984]  $R_{5a}$ 和 $R_{5c}$ 为选自所述(i)~(vii)的原子或基团,

[0985]  $R_{5b}$ 为吸电子基团,

[0986]  $j$ 为1~5的任意整数,

[0987]  $k$ 为1~4的任意整数。

[0988] [31]根据[1]~[30]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,生物正交性官能团经由连接“功能性物质”和“特定氨基酸残基的侧链”的主链的原子数为2~10个的连接体与可溶性蛋白质结合。

[0989] [32]根据[1]~[31]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,生物正交性官能团经由连接功能性物质和特定氨基酸残基的侧链的主链不含环结构的连接体与可溶性蛋白质结合。

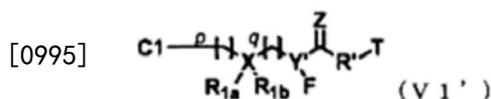
[0990] [33]根据[2]~[15]、[18]~[32]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,连结L1末端部分和 $R'$ 的主链的原子数为2~10个。

[0991] [34]根据[2]~[15]、[18]~[33]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,连结A和R的主链不含环结构。

[0992] [35]根据[2]~[15]、[18]~[34]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,以L1-B表示的部分结构不含肽部分。

[0993] [36]根据[2]~[15]、[18]~[35]中任一项的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述以式(V1)、(V2)和(V3)表示的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐分别是以下述式(V1')、(V2')和(V3')表示的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐;

[0994] [化学式26]



[0996] 式(V1')中,

[0997]  $C1$ 为生物正交性官能团、或者除生物正交性官能团以外的基团,

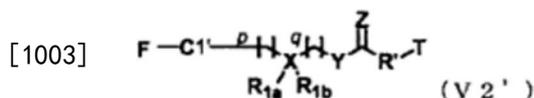
[0998]  $p$ 、 $q$ 、 $X$ 、 $R_{1a}$ 和 $R_{1b}$ 与所述式(Lb')中相应符号的含义相同,

[0999]  $Y'$ 为从所述式(B-1)的 $Y$ 除去1个氢原子而得的残基,

[1000]  $Z$ 与所述式(B-1)的 $Z$ 相同,

[1001]  $F$ 、 $R'$ 和 $T$ 与所述式(V)中相应符号的含义相同;

[1002] [化学式27]



[1004] 式(V2')中,

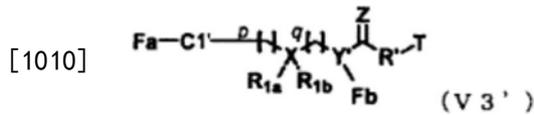
[1005]  $C1'$ 为通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分,

[1006]  $p$ 、 $q$ 、 $X$ 、 $R_{1a}$ 和 $R_{1b}$ 与所述式(Lb')中相应符号的含义相同,

[1007]  $Y$ 和 $Z$ 与所述式(B-1)中相应符号的含义相同,

[1008]  $F$ 、 $R'$ 和 $T$ 与所述式(V)中相应符号的含义相同;

[1009] [化学式28]



[1011] 式(V3')中,

[1012] C1'为通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分,

[1013] p、q、X、R<sub>1a</sub>和R<sub>1b</sub>与所述式(Lb')中相应符号的含义相同,

[1014] Y'为从所述式(B-1)的Y除去1个氢原子而得的残基,

[1015] Z与所述式(B-1)的Z相同,

[1016] Fa和Fb为相同或不同的功能性物质,

[1017] R'和T与所述式(V)中相应符号的含义相同。

[1018] [37]一种区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐,其中,

[1019] 可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基,且

[1020] 功能性物质经由不含肽部分的连接体对于所述靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合,

[1021] 功能性物质经由赖氨酸残基的侧链与可溶性蛋白质结合,

[1022] 可溶性蛋白质为包含多个重链的抗体,

[1023] 抗体所含的多个重链中的所述位置存在的多个特定的氨基酸残基上具有功能性物质,因而抗体具有多个功能性物质。

[1024] [38]一种以下述式(V)表示

[1025] F-(L1-B)'-R'-T (V)

[1026] 且以F-(L1-B)'-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐;

[1027] 式中,

[1028] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团,

[1029] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[1030] 以(L1-B)'表示的结构单元为包含通过功能性物质与(i')和(a)中的生物正交性官能团中的任一者或两者之间的反应而生成的部分的二价结构单元,

[1031] F为功能性物质,

[1032] R'为通过抗体的赖氨酸残基与对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分,

[1033] T为抗体,

[1034] 抗体在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基。

[1035] [39]根据[38]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述可溶性蛋白质或其盐是以下述式(V1)表示

[1036]  $L1-B'(-F)-R'-T$  (V1)

[1037] 且以 $L1-B'(-F)-R'$ 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐;

[1038] 式中,

[1039]  $L1$ 、 $F$ 、 $R'$ 和 $T$ 与所述式(V)中相应符号的含义相同,

[1040]  $B'$ 为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团。

[1041] [40]根据[38]的可溶性蛋白质或其盐,其中,所述可溶性蛋白质或其盐是以下述式(V2)表示

[1042]  $F-L1'-B-R'-T$  (V2)

[1043] 且以 $F-L1'-B-R'$ 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐,或者

[1044] 以下述式(V3)表示

[1045]  $Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T$  (V3)

[1046] 且以 $Fa-L1'-B'(-Fb)-R'$ 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐;

[1047] 式(V2)中,

[1048]  $F$ 、 $B$ 、 $R'$ 和 $T$ 与所述式(V)中相应符号的含义相同,

[1049]  $L1'$ 为包含通过功能性物质与(i')包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团;

[1050] 式(V3)中,

[1051]  $R'$ 和 $T$ 与所述式(V)中相应符号的含义相同,

[1052]  $L1'$ 与所述式(V2)的 $L1'$ 相同,

[1053]  $B'$ 为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[1054]  $Fa$ 和 $Fb$ 分别为相同或不同的功能性物质。

[1055] (区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法)

[1056] 本发明还提供上述[1]~[40]的可溶性蛋白质中需要用式(V)或其下位的式特定的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法。

[1057] [41]一种区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,包括:

[1058] 对区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割,或者使区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[1059] 所述区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物

质及可溶性蛋白质的复合物以下述式 (III) 表示, 且以 A-L-B' (-F)-R' 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的 1 个以上的特定氨基酸残基以 30% 以上的区域选择性结合,

[1060] A-L-B' (-F)-R'-T (III)

[1061] 式中,

[1062] A 为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[1063] L 为切割性连接体, 该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[1064] B' 为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[1065] F 为功能性物质,

[1066] R' 为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[1067] T 为可溶性蛋白质,

[1068] 所述可溶性蛋白质在由连续的 1~50 个氨基酸残基形成的靶区中包含 1 个以上的特定氨基酸残基, 且在除所述靶区以外的非靶区中包含 5 个以上的所述特定氨基酸残基;

[1069] 所述区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质以下述式 (IV) 表示, 且以 A-L-B' (-F)-R' 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的 1 个以上的特定氨基酸残基以 30% 以上的区域选择性结合,

[1070] L1-B-R'-T (IV)

[1071] 式中,

[1072] L1 为 (i') 包含生物正交性官能团的一价基团、或者 (ii') 不含生物正交性官能团的一价基团,

[1073] B 为 (a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者 (b) 不含生物正交性官能团的二价基团,

[1074] R' 为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[1075] T 为在由连续的 1~50 个氨基酸残基形成的靶区中包含 1 个以上的特定氨基酸残基, 且在除所述靶区以外的非靶区中包含 5 个以上的所述特定氨基酸残基的可溶性蛋白质;

[1076] 所述区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质以下述式 (V) 表示, 且以 F-(L1-B)'-R' 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的 1 个以上的特定氨基酸残基以 30% 以上的区域选择性结合,

[1077] F-(L1-B)'-R'-T (V)

[1078] 式中,

[1079] L1 为 (i') 包含生物正交性官能团的一价基团、或者 (ii') 不含生物正交性官能团的一价基团,

[1080] B 为 (a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者 (b) 不含生物正交性官能团的二价基团,

[1081] 以 (L1-B)' 表示的结构单元为包含通过功能性物质与 (i') 及 (a) 中的生物正交性官能团中的任一者或两者之间的反应而生成的部分的二价结构单元,

[1082] F 为功能性物质,

[1083] R' 和 T 与所述式 (III) 或 (IV) 中相应符号的含义相同。

[1084] 较好是上述[41]的方法可以是如下的方法。

[1085] [42]根据[41]的方法,其中,包括:

[1086] 对所述区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式(V1)表示

[1087]  $L1-B'(-F)-R'-T$  (V1)

[1088] 且以 $L1-B'(-F)-R'$ 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[1089] 式中,

[1090]  $L1$ 为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团,

[1091]  $B'$ 、 $F$ 、 $R'$ 和 $T$ 与所述式(III)中相应符号的含义相同。

[1092] [43]根据[41]的方法,其中,包括:

[1093] 使所述区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与1种或2种功能性物质反应,生成以下述式(V2)表示

[1094]  $F-L1'-B-R'-T$  (V2)

[1095] 且以 $F-L1'-B-R'$ 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质,或者,以下述式(V3)表示

[1096]  $Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T$  (V3)

[1097] 且以 $Fa-L1'-B'(-Fb)-R'$ 表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[1098] 式(V2)中,

[1099]  $B$ 、 $R'$ 和 $T$ 与所述式(IV)中相应符号的含义相同,

[1100]  $L1'$ 为包含通过功能性物质与(i')包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[1101]  $F$ 为功能性物质;

[1102] 式(V3)中,

[1103]  $R'$ 和 $T$ 与所述式(IV)中相应符号的含义相同,

[1104]  $L1'$ 与所述式(V2)中相应符号的含义相同,

[1105]  $B'$ 为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[1106]  $Fa$ 和 $Fb$ 分别为相同或不同的功能性物质。

[1107] [44]根据[41]~[43]中任一项的方法,其中,可溶性蛋白质为抗体,反应性基团为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团。

[1108] [45]一种区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,包括:

[1109] (A)使以下述式(II)表示

[1110] A-L-B-R'-T (II)

[1111] 且以A-L-B-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成以下述式(III)表示

[1112] A-L-B'(-F)-R'-T (III)

[1113] 且以A-L-B'(-F)-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序,以及

[1114] (B)对所述区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式(VI)表示

[1115] L1-B'(-F)-R'-T (VI)

[1116] 且以L1-B'(-F)-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[1117] 式(II)中,

[1118] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[1119] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[1120] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团,

[1121] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[1122] T为可溶性蛋白质,

[1123] 所述可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基;

[1124] 式(III)中,

[1125] A、L、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

[1126] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[1127] F为功能性物质;

[1128] 式(VI)中,

[1129] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团,

[1130] B'、F、R'和T与所述式(III)中相应符号的含义相同。

[1131] [46]一种区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,包括:

[1132] (A)使以下述式(I)表示

[1133] A-L-B-R (I)

[1134] 的区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐与可溶性蛋白质(此处,可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的

所述特定氨基酸残基)反应,生成以下述式(II)表示

[1135]  $A-L-B-R'-T$  (II)

[1136] 且以A-L-B-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序,

[1137] (B)使所述区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成以下述式(III)表示

[1138]  $A-L-B'(-F)-R'-T$  (III)

[1139] 且以A-L-B'(-F)-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序,以及

[1140] (C)对所述区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式(V1)表示

[1141]  $L1-B'(-F)-R'-T$  (V1)

[1142] 且以L1-B'(-F)-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[1143] 式(I)中,

[1144] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[1145] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[1146] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团,

[1147] R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团;

[1148] 式(II)中,

[1149] A、L和B与所述式(I)中相应符号的含义相同,

[1150] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[1151] T为可溶性蛋白质;

[1152] 式(III)中,

[1153] A和L与所述式(I)中相应符号的含义相同,

[1154] R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

[1155] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[1156] F为功能性物质;

[1157] 式(V1)中,

[1158] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团,

[1159] B'、F、R'和T与所述式(III)中相应符号的含义相同。

[1160] [47]一种区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,包括:

[1161] (A)对以下述式(II)表示

[1162] A-L-B-R'-T (II)

[1163] 且以A-L-B-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式(IV)表示

[1164] L1-B-R'-T (IV)

[1165] 且以L1-B-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序,以及

[1166] (B)使所述区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与1种或2种以上的功能性物质反应,生成以下述式(V2)表示

[1167] F-L1'-B-R'-T (V2)

[1168] 且以F-L1'-B-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐、或者以下述式(V3)表示

[1169] Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

[1170] 且以Fa-L1'-B'(-Fb)-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[1171] 式(II)中,

[1172] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[1173] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[1174] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(a)不含生物正交性官能团的二价基团,

[1175] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[1176] T为可溶性蛋白质,

[1177] 所述可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基;

[1178] 式(IV)中,

[1179] B、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

[1180] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团;

[1181] 式(V2)中,

[1182] B、R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同,

[1183] L1'为包含通过功能性物质与(i')包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[1184] F为功能性物质;

[1185] 式(V3)中,

[1186] R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同,

- [1187] L1'与所述式(V2)中相应符号的含义相同,
- [1188] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,
- [1189] Fa和Fb分别为相同或不同的功能性物质。
- [1190] [48]一种区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法,其中,包括:
- [1191] (A)使以下述式(I)表示
- [1192] A-L-B-R (I)
- [1193] 的化合物或其盐与可溶性蛋白质(此处,可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基)反应,生成以下述式(II)表示
- [1194] A-L-B-R'-T (II)
- [1195] 且以A-L-B-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序,
- [1196] (B)对所述区域选择性地具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割,生成以下述式(IV)表示
- [1197] L1-B-R'-T (IV)
- [1198] 且以L1-B-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序,以及
- [1199] (C)使所述区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与1种或2种以上的功能性物质反应,生成以下述式(V2)表示
- [1200] F-L1'-B-R'-T (V2)
- [1201] 且以F-L1'-B-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐、或者以下述式(V3)表示
- [1202] Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)
- [1203] 且以Fa-L1'-B'(-Fb)-R'表示的结构单元对于所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基以30%以上的区域选择性结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序;
- [1204] 式(I)中,
- [1205] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,
- [1206] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,
- [1207] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(a)不含生物正交性官能团的二价基团,
- [1208] R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团;
- [1209] 式(II)中,
- [1210] A、L和B与所述式(I)中相应符号的含义相同,

- [1211] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，
- [1212] T为可溶性蛋白质；
- [1213] 式(IV)中，
- [1214] B、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同，
- [1215] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团；
- [1216] 式(V2)中，
- [1217] B、R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同，
- [1218] L1'为包含通过功能性物质与(i')包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团，
- [1219] F为功能性物质；
- [1220] 式(V3)中，
- [1221] R'和T与所述式(IV)中相应符号的含义相同，
- [1222] L1'与所述式(V2)中相应符号的含义相同，
- [1223] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团，
- [1224] Fa和Fb分别为相同或不同的功能性物质。
- [1225] 发明的效果
- [1226] (I)具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的本发明的化合物或其盐可用于例如可溶性蛋白质的区域选择性修饰。
- [1227] (II)(区域选择性地)具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的本发明的可溶性蛋白质或其盐、(III)(区域选择性地)具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的本发明的复合物或其盐、以及(IV)(区域选择性地)具有生物正交性官能团的本发明的可溶性蛋白质或其盐，可用作例如用以制备(区域选择性地)具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的中间体。
- [1228] (V)(区域选择性地)具有功能性物质的本发明的可溶性蛋白质或其盐可用作例如药物或者试剂(例如诊断药物、研究用试剂)。特别是可溶性蛋白质为抗体的情况下，(区域选择性地)具有功能性物质的本发明的抗体或其盐适合于这些用途。

## 附图说明

[1229] 图1-1是表示采用本发明的化合物[具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物:A-L-B-R(I)]的可溶性蛋白质(例如抗体)的区域选择性修饰的概念的示意图(其一)。首先,本发明的化合物经由针对可溶性蛋白质的亲和性物质(A)与抗体等可溶性蛋白质(T)缔合。接着,本发明的化合物经由反应性基团(R)(图中为活性酯)与存在于亲和性物质和可溶性蛋白质的缔合部位附近的靶区中的特定氨基酸残基的侧链(图中为赖氨酸残基的侧链)反应,生成本发明的化合物与可溶性蛋白质的偶联物(复合物)[区域选择性地具有包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的结构单元的可溶性蛋白质:A-L-B-R'-T(II)]。

[1230] 图1-2是表示采用本发明的化合物的可溶性蛋白质(例如抗体)的区域选择性修饰

的概念的示意图(其二)。通过连接体(L)中的切割性部分的切割,生成以生物正交性官能团区域选择性地进行了修饰的可溶性蛋白质(例如抗体)。

[1231] 图1-3是表示采用本发明的化合物的可溶性蛋白质(例如抗体)的区域选择性修饰的概念的示意图(其三)。通过生物正交性官能团与功能性物质(例如药物)的反应,生成以功能性物质位置特异性地进行了修饰的可溶性蛋白质(例如抗体)。

[1232] 图2是表示本发明的各发明的关联性的图(关于盐的表述省略)。反应(1)中,使具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物与可溶性蛋白质反应,生成具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质。反应(2)中,使具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质与功能性物质反应,生成具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物。反应(3)中,对具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物的切割性部分进行切割,生成具有功能性物质的可溶性蛋白质(这时,作为副产物生成亲和性物质的含有部分)。反应(4)中,对具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质的切割性部分进行切割,生成具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质(这时,作为副产物生成亲和性物质的含有部分)。反应(5)中,使具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质与功能性物质反应,生成具有功能性物质的可溶性蛋白质。反应(2)和(5)可同样地进行。反应(3)和(5)也可同样地进行。

[1233] 图3是表示以肽试剂(肽二硫连接体(peptide disulfide linker)连接物-NHS活化体)特异性地进行了修饰的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(Trastuzumab)的HIC-HPLC分析(检测:225nm)的图。对于样品,按照以下的条件进行反应。a:曲妥珠单抗+肽试剂12当量(等量)(反应后用Amicon10K进行溶剂置换);b:曲妥珠单抗+肽试剂12当量;c:曲妥珠单抗+肽试剂6当量;d:曲妥珠单抗原料;e:仅肽试剂;f:仅DMF。

[1234] 图4是表示以肽试剂(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)特异性地进行了修饰的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的HIC-HPLC分析(检测:280nm)的图。对于样品,按照与图1同样的条件进行反应。

[1235] 图5是表示以肽试剂(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)特异性地进行了修饰的抗CD20抗体利妥昔单抗(Rituximab)的HIC-HPLC分析(检测:225nm)的图。对于样品,按照以下的条件进行反应。a:利妥昔单抗+肽试剂12当量(反应后用Amicon10K进行溶剂置换);b:利妥昔单抗+肽试剂12当量;c:利妥昔单抗+肽试剂6当量;d:利妥昔单抗原料;e:仅肽试剂;f:仅DMF。

[1236] 图6是表示以肽试剂(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)特异性地进行了修饰的抗CD20抗体利妥昔单抗的HIC-HPLC分析(检测:280nm)的图。对于样品,按照以下的条件进行反应。a:利妥昔单抗+肽试剂12当量(反应后用Amicon10K进行溶剂置换);b:利妥昔单抗+肽试剂12当量;c:利妥昔单抗+肽试剂6当量;d:利妥昔单抗原料;e:仅肽试剂;f:仅DMF。

[1237] 图7是表示通过曲妥珠单抗-肽复合物的连接体切割和再氧化而得到的产物(产物)的采用RP-HPLC的分析(检测:225nm及280nm)图。a:曲妥珠单抗;b:曲妥珠单抗+肽试剂6当量;c:将曲妥珠单抗通过DTT还原;d:缓冲液pH8.0,抗体浓度72 $\mu$ M下通过D,L-二硫苏糖醇还原;e:将d通过脱氢抗坏血酸再氧化3小时后;f:将d通过脱氢抗坏血酸再氧化24小时后。

[1238] 图8是表示(1)将糖链用PNGase切割后的曲妥珠单抗的重链的氨基酸序列、(2)将

糖链用PNGase切割后的IgG1 Fc区域的氨基酸序列、及(3)曲妥珠单抗的轻链的氨基酸序列的图。

[1239] 图9是表示曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酸的羧甲基(Carboxymethyl)化的硫醇引入体(+146.004Da))的THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK(SEQ ID NO:5)的肽片段的MS谱(m/z 998.14796,3价)的图。

[1240] 图10是表示曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酸的羧甲基化的硫醇引入体(+146.004Da))的THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK(SEQ ID NO:5)的肽片段的CID谱的图。

[1241] 图11是表示曲妥珠单抗的采用Glu-C消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酸的羧甲基化的硫醇引入体(+146.004Da))的LLGGPSVFLFPPKPKD(SEQ ID NO:6)的肽片段的MS谱(m/z 929.49651,二价)的图。

[1242] 图12是表示曲妥珠单抗的采用Glu-C消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酸的羧甲基化的硫醇引入体(+146.004Da))的LLGGPSVFLFPPKPKD(SEQ ID NO:6)的肽片段的CID谱的图。

[1243] 图13是表示IgG1 Fc的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酸的羧甲基化的硫醇引入体(+146.004Da))的THTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK(SEQ ID NO:7)的肽片段的MS谱(m/z 994.12546,3价)的图。

[1244] 图14是表示IgG1 Fc的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酸的羧甲基化的硫醇引入体(+146.004Da))的THTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK(SEQ ID NO:7)的肽片段的CID谱的图。

[1245] 图15是表示IgG1 Fc的采用Glu-C消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酸的羧甲基化的硫醇引入体(+146.004Da))的GAPSVFLFPPKPKD TLMISRTPE(SEQ ID NO:8)的肽片段的MS谱(m/z 892.12624,3价)的图。

[1246] 图16是表示IgG1 Fc的采用Glu-C消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酸的羧甲基化的硫醇引入体(+146.004Da))的GAPSVFLFPPKPKD TLMISRTPE(SEQ ID NO:8)的肽片段的CID谱的图。

[1247] 图17是表示曲妥珠单抗的重链中的Fc区域、及IgG1 Fc区域的共有氨基酸序列(SEQ ID NO:1)的图。

[1248] 图18是表示对于经修饰的曲妥珠单抗(IgG1)进行鉴定所得的氨基酸序列及修饰的图。灰色部分为鉴定所得的氨基酸序列。此外,氨基酸序列的上部标记了鉴定所得的修饰。确认了仅所框出的两处赖氨酸残基(按照EU numbering的第246位和第248位)的区域选择性叠氮引入体的修饰。

[1249] 图19是表示曲妥珠单抗的叠氮引入体的修饰位点的图。PSM(肽匹配图谱,Peptide Spectrum Matches)是指,与对应的肽一致的图谱被观测到的次数,越多则正确性越高。通过关于信号强度的筛选,如(2)所示仅在第246位的赖氨酸残基处鉴定到修饰。认为仅在(1)鉴定出的修饰位点很有可能是噪声。

[1250] 图20是表示曲妥珠单抗的包含叠氮引入体的修饰位点的肽的CID谱的图。对应于图18中所框出的部分的肽的CID谱。显示出具有与理论值一致的m/z的谱图。

[1251] 图21表示CID谱所鉴定的b/y离子的图。示出图20中所鉴定的b/y离子。由鉴定出

b25离子可知,按照EU numbering的第246位被修饰的可能性高。

[1252] 图22是表示修饰曲妥珠单抗与未修饰曲妥珠单抗的面积值比较的图。关于发生修饰的部位,基于未修饰肽的面积值变小的预测,与未修饰曲妥珠单抗所得的面积值相比,发现仅仅是包含按照EU numbering的第246位、第248位的赖氨酸残基的肽出现显著的面积值减少。

[1253] 图23是表示采用了Q-TOFMS的修饰曲妥珠单抗的DAR的分析的图。根据峰的观测结果,平均DAR为2。

[1254] 图24是表示用于检索的氨基酸序列数据的图。已知通过进行脱糖链,曲妥珠单抗的重链的第300个残基的N变为D,因此对于重链的氨基酸序列,分析中使用了两种。

[1255] 图25是表示曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(叠氮引入体(+254.102Da))的THTCPPEPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR (SEQ ID NO:40)的肽片段的MS谱(实测值:m/z 979.49982,理论值:m/z 979.49975,4价)的图。

[1256] 图26是表示曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(叠氮引入体(+254.102Da))的THTCPPEPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR (SEQ ID NO:40)的肽片段的CID谱的图。

[1257] 图27是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例16)。

[1258] 图28是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例17)。

[1259] 图29是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例18)。

[1260] 图30是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例19)。

[1261] 图31是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例20)。

[1262] 图32是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例21)。

[1263] 图33是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例22)。

[1264] 图34是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例23)。

[1265] 图35是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例24)。

[1266] 图36是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例25)。

[1267] 图37是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例26)。

[1268] 图38是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例27)。

[1269] 图39是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例28)。

[1270] 图40是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例29)。

[1271] 图41是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV225nm或UV280nm)的图(实施例30)。

[1272] 图42是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例31)。纵轴的AU表示吸光度(以下的附图中同样)。

[1273] 图43是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例32)。

[1274] 图44是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例33)。

[1275] 图45是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例34)。

[1276] 图46是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例35)。

[1277] 图47是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例36)。

[1278] 图48是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例37)。

[1279] 图49是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例38)。

[1280] 图50是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例39)。

[1281] 图51是表示实施例39的用结合性肽(binder peptide)修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化(Carbamidomethyl)化的硫醇引入体(+145.019Da))的VVSVLTVLHQDWLNGKEYK (SEQ ID NO:66)的肽片段的MS谱(m/z 791.74872,3价)的图。

[1282] 图52是表示实施例39的用结合性肽修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的VVSVLTVLHQDWLNGKEYK (SEQ ID NO:66)的肽片段的CID谱的图。

[1283] 图53是表示实施例39的用结合性肽修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的EEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK (SEQ ID NO:67)的肽片段的MS谱(m/z 886.93408,4价)的图。

[1284] 图54是表示实施例39的用结合性肽修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的EEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK (SEQ ID NO:67)的肽片段的CID谱的图。

[1285] 图55是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:

UV280nm)的图(实施例40)。

[1286] 图56是表示实施例40的用结合性肽修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的FNWYVDGVEVHNAKTKPR(SEQ ID NO:69)的肽片段的MS谱(m/z769.04688,3价)的图。

[1287] 图57是表示实施例40的用结合性肽修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的FNWYVDGVEVHNAKTKPR(SEQ ID NO:69)的肽片段的CID谱的图。

[1288] 图58是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例41)。

[1289] 图59是表示用硫醇引入体修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的THC PPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(SEQ ID NO:40)的肽片段的MS谱(m/z 952.23145,4价)的图。

[1290] 图60是表示用硫醇引入体修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的THC PPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(SEQ ID NO:40)的肽片段的CID谱的图。

[1291] 图61是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例42)。

[1292] 图62是表示用硫醇引入体修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的THC PPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(SEQ ID NO:40)的肽片段的MS谱(m/z 952.22968,4价)的图。

[1293] 图63是表示用硫醇引入体修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的THC PPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(SEQ ID NO:40)的肽片段的CID谱的图。

[1294] 图64是表示曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例43)。

[1295] 图65是表示用硫醇引入体修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的FNWYVDGVEVHNAKTKPR(SEQ ID NO:69)的肽片段的MS谱(m/z 769.04529,3价)的图。

[1296] 图66是表示用硫醇引入体修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的FNWYVDGVEVHNAKTKPR(SEQ ID NO:69)的肽片段的CID谱的图。

[1297] 图67是表示人IgG2抗体的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例2-2)。

[1298] 图68是表示人IgG2抗体的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例43)。

[1299] 图69是表示人IgG4抗体的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:

UV280nm)的图(实施例2-2)。

[1300] 图70是表示人IgG4抗体的特异性修饰的HIC-UPLC分析的结果(检测波长:UV280nm)的图(实施例43)。

### 具体实施方式

[1301] 1.包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐

[1302] 1-1.概要

[1303] 本发明提供以式(I)表示的包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐;

[1304] A-L-B-R (I)

[1305] 式中,

[1306] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[1307] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[1308] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[1309] R为针对所述可溶性蛋白质的反应性基团。

[1310] 关于本发明所示出的式(I)及其他式中,-(连字符)表示存在于其两侧的2个单元共价结合。因此,式(I)中,A与L共价结合,L与A及B共价结合,B与L及R共价结合,R与B共价结合。

[1311] 1-2.针对可溶性蛋白质的亲和性物质(A)

[1312] 式(I)中,A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质。亲和性物质是指对于目标具有基于非共价结合的结合能力的物质。

[1313] 本发明中所用的亲和性物质以也被称为分泌蛋白的可溶性蛋白质为目标。作为此种可溶性蛋白质,可例举例如抗体、可溶性受体、配体、白蛋白、红细胞生成素(EPO)、血管内皮细胞生长因子(Anti-VEGF)、骨形态发生蛋白、卵泡刺激素(FSH)、胰高血糖素、粒细胞集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、绒毛膜促性腺激素、胰岛素、白细胞介素、干扰素、血小板衍生生长因子(PDGF)、生长因子(TGF家族、FGF家族)。可溶性蛋白质可以是经生物分子(例如糖)修饰的蛋白质(例如糖蛋白),也可以是未经生物分子修饰的蛋白质。

[1314] 作为亲和性物质的目标的可溶性蛋白质还可以是天然蛋白质或者人工蛋白质。

[1315] 作为天然蛋白质,可例举例如来源于生物及病毒的蛋白质。作为来源于生物的蛋白质,可例举例如来源于哺乳动物、鸟类(例如鸡)等动物、昆虫、微生物、植物、菌类及鱼类的蛋白质。天然蛋白质较好是来源于哺乳动物的蛋白质。作为哺乳动物,可例举例如灵长类(例如人、猴、黑猩猩)、啮齿类(例如小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔)、玩赏动物(例如狗、猫)、家畜(例如牛、猪、山羊)、役用动物(例如马、绵羊)。天然蛋白质更好是来源于灵长类或啮齿类的蛋白质,从本发明的临床应用的观点来看,进一步更好是来源于人的蛋白质。作为来源于病毒的蛋白质,可例举例如流感病毒(例如禽流感病毒、猪流感病毒)、艾滋病病毒、埃博拉病毒、噬菌体病毒。

[1316] 作为人工蛋白质,可例举例如天然蛋白质的改造蛋白质(例如在天然蛋白质中引

入选自取代、缺失及插入的1种以上的氨基酸残基的变异而得的蛋白质)、融合蛋白及人工设计的单克隆抗体。作为人工设计的单克隆抗体,可例举例如嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、附加了规定糖链的抗体(例如以具有N型糖链结合共有序列等的糖链结合共有序列的方式进行了改造的抗体)、双特异性抗体、scFv抗体、Fab抗体、F(ab')<sub>2</sub>抗体、VHH抗体、Fc区域蛋白、Fc融合蛋白。

[1317] 作为亲和性物质的目标的可溶性蛋白质还可以是单体蛋白质或者多聚体(例如二聚体、三聚体或四聚体)蛋白质。作为亲和性物质的目标的可溶性蛋白质为多聚体蛋白质的情况下,多聚体蛋白质是同源多聚体或异源多聚体。多聚体蛋白质可以通过共价结合(例如二硫键)形成多聚体的蛋白质(例如具有2个由轻链及重链形成的单元通过二硫键连接的结构抗体),也可以是通过非共价结合(即缔合)形成多聚体的蛋白质,较好是通过共价结合形成多聚体的蛋白质。作为亲和性物质的目标的多聚体蛋白质,可例举例如二价的抗体(例如IgG、IgD、IgE)、4价以上的抗体(例如IgA抗体、IgM抗体)、白蛋白。

[1318] 作为亲和性物质的目标的可溶性蛋白质还可由任意的氨基酸残基构成,较好是由通常构成蛋白质的天然的20种L- $\alpha$ -氨基酸残基构成。作为这样的氨基酸残基,可例举例如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-甲硫氨酸(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)、及L-甘氨酸(G)(以下省略L的表述)。可溶性蛋白质例如可由100个以上、较好是120个以上、更好是150个以上、进一步更好是180个以上、特别好是200个以上的氨基酸残基构成。可溶性蛋白质还可以是例如1000个以下,较好是900个以下,更好是800个以下,进一步更好是700个以下,特别好是600个以下。更具体来说,可溶性蛋白质例如可由100~1000个、较好是120~900个、更好是150~800个、进一步更好是180~700个、特别好是200~600个的氨基酸残基构成。可溶性蛋白质为抗体(例如上述的人工设计的单克隆抗体)的情况下,上述个数的氨基酸残基可以相当于抗体的重链的氨基酸残基。

[1319] 作为亲和性物质的目标的可溶性蛋白质还可以是在1个位置或多个位置(较好是多个位置)包含具有能与如后所述的反应性基团反应的侧链或末端(N末端和/或C末端)、较好是侧链的特定氨基酸残基的蛋白质。作为这样的特定氨基酸残基,可例举例如如后所述的14种氨基酸残基,较好是选自赖氨酸残基、酪氨酸残基、色氨酸残基及半胱氨酸残基的氨基酸残基。如果考虑到本发明的化合物可区域选择性地修饰可溶性蛋白质,较好是在多个位置包含这样的特定氨基酸残基的可溶性蛋白质。作为多个位置,只要是2个以上的位置即可,无特别限定,例如可以是3个以上的位置,较好是5个以上的位置,更好是10个以上的位置,进一步更好是20个以上的位置,特别好是30个以上的位置。多个位置还例如可以是200个以下的位置,较好是180个以下的位置,更好是150个以下的位置,进一步更好是120个以下的位置,特别好是100个以下的位置。更具体来说,多个位置例如可以是3~200个位置,较好是5~180个位置,更好是10~150个位置,进一步更好是20~120个位置,特别好是30~100个位置。即使是这样的在多个位置包含特定氨基酸残基的可溶性蛋白质,本发明的化合物也可对存在于特定的位置的特定氨基酸残基区域选择性地修饰。例如,人IgG1的赖氨酸残基数一般被认为是70~90个左右,但也根据可变区中的氨基酸组成而不同。本发明中,成功实现了这样的对存在于IgG1的特定位置的赖氨酸残基的区域选择性修饰。

[1320] 更具体来说,本发明中,从在维持抗体等蛋白质的功能的同时(即,在不使蛋白质变性的情况下维持原有折叠的同时),对存在于蛋白质中的特定位置的氨基酸残基进行修饰的观点来看,较好是露出于蛋白质表面的氨基酸残基的区域选择性修饰。例如,人IgG1等人IgG中,露出赖氨酸残基及露出酪氨酸残基存在于以下的位置(基于EU numbering,参照[http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu\\_IGHGnber.html](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html))。

[1321] (1) 露出赖氨酸残基

[1322] CH2结构域(246位、248位、274位、288位、290位、317位、320位、322位、338位)

[1323] CH3结构域(360位、414位、439位)

[1324] (2) 露出酪氨酸残基

[1325] CH2结构域(278位、296位、300位)

[1326] CH3结构域(436位)

[1327] 因此,人IgG1等人IgG在赖氨酸残基或酪氨酸残基被修饰的情况下,较好是在上述位置的修饰。

[1328] 较好的是,人IgG1等人IgG在赖氨酸残基或酪氨酸残基被修饰的情况下,上述(1)及(2)的位置中,可以是存在于向表面的露出性高的以下位置的赖氨酸残基或酪氨酸残基被修饰。

[1329] (1') 露出赖氨酸残基

[1330] CH2结构域(246位、248位、274位、288位、290位、317位、320位、322位)

[1331] CH3结构域(360位、414位、439位)

[1332] (2') 露出酪氨酸残基

[1333] CH2结构域(278位、296位、300位)

[1334] CH3结构域(436位)

[1335] 因此,人IgG1等人IgG在赖氨酸残基或酪氨酸残基被修饰的情况下,更好是在上述位置的修饰。

[1336] 更好的是,人IgG1等人IgG在赖氨酸残基被修饰的情况下,上述(1)的位置中,可以是存在于本发明中可有效地进行修饰的CH2结构域中的规定位置(例如246位、248位、288位、290位、317位)的赖氨酸残基被修饰。

[1337] 特定的实施方式中,作为亲和性物质的目标的可溶性蛋白质,在如上所述在多个位置包含特定氨基酸残基的情况下,可以是在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的特定氨基酸残基。靶区可以较好是由1~30个、更好是1~20个、进一步更好是1~10个、1~5个、或1~3个(即1个、2个、或3个)氨基酸残基形成。特别好是靶区可以是由存在于特定位置的特定氨基酸残基形成的区域。这样的特定位置也根据目标蛋白质及亲和性物质的种类等而变动,例如可以是抗体的恒定区中的特定区域(例如CH1、CH2、CH3)中的特定位置,较好可以是抗体的CH2中的位置。更具体来说,靶区可以是人IgG Fc中的基于EU numbering的下述残基:

[1338] (1) Lys248残基(以下,本说明书中也简记为“Lys248”,相当于人IgG CH2区域(SEQ ID NO:1)的第18个残基)或者Lys246残基(以下,本说明书中也简记为“Lys246”,相当于人IgG CH2区域(SEQ ID NO:1)的第16个残基);

[1339] (2) Lys288残基(以下,本说明书中也简记为“Lys288”,相当于人IgG CH2区域(SEQ

ID NO:1)的第58个残基)或者Lys290残基(以下,本说明书中也简记为“Lys290”,相当于人IgG CH2区域(SEQ ID NO:1)的第60个残基);

[1340] (3)Lys317残基(以下,本说明书中也简记为“Lys317”,相当于人IgG CH2区域(SEQ ID NO:1)的第87个残基)。

[1341] 如果采用本发明,可对上述靶区中的特定氨基酸残基高度区域选择性地修饰。这样的区域选择性可以是例如30%以上,较好是40%以上,更好是50%以上,进一步更好是60%以上,特别好是70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、或100%以上。

[1342] 靶区还可以是存在于特定位置的特定氨基酸残基在以该特定位置为中心时分别从N末端侧和C末端侧起到相隔a个氨基酸残基的位置为止的区域中,除存在于该特定位置的特定氨基酸残基以外,不含与特定氨基酸残基同种的氨基酸残基的区域;在此,a为1~10的任意整数。a较好是1~5的整数,更好是1~3的整数,进一步更好是1或2,特别好是1。

[1343] 优选的实施方式中,针对可溶性蛋白质的亲和性物质为针对抗体的亲和性物质。抗体为多克隆抗体或者单克隆抗体。作为抗体的同型,可例举例如IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA、IgD、IgE和IgY。抗体为全长抗体或者抗体片段(例如F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、单链抗体),较好是全长抗体。

[1344] 抗体是针对任意抗原的抗体。例如,这样的抗原可以是如上所述的生物或病毒中所发现的成分。作为这样的抗原,还可例举例如蛋白质[包括寡肽、多肽。可以是经糖等生物分子修饰的蛋白质(例如糖蛋白)]、糖链、核酸、低分子化合物。

[1345] 较好是抗体可为以蛋白质为抗原的抗体。作为蛋白质,可例举例如细胞膜受体、除细胞膜受体以外的细胞膜蛋白质(例如细胞外基质蛋白质)、配体、可溶性受体。

[1346] 更具体来说,作为抗体的抗原的蛋白质可以是疾病靶向蛋白质。作为疾病靶向蛋白质,可例举例如以下的蛋白质。

[1347] (1) 癌症领域

[1348] 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、纤维连接蛋白、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(内皮因子)、ICAM-1、CD30、CD16A、CD38、MUC1、EGFR、KIR2DL1,2、NKG2A、肌腱蛋白C(tenascin-C)、IGF(胰岛素样生长因子,Insulin-like growth factor)、CTLA-4、间皮素(mesothelin)、CD138、c-Met、Ang2、VEGF-A、CD79b、ENPD3、叶酸受体 $\alpha$ 、TEM-1、GM2、Glypican-3、巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage inhibitory factor)、CD74、Notch1、Notch2、Notch3、CD37、TLR-2、CD3、CSF-1R、FGFR2b、HLA-DR、GM-CSF、EphA3、B7-H3、CD123、gpA33、Frizzled7受体、DLL4、VEGF、RSP0、LIV-1、SLITRK6、结合素4(Nectin-4)、CD70、CD40、CD19、SEMA4D(CD100)、CD25、MET、组织因子(Tissue Factor)、IL-8、EGFR、cMet、KIR3DL2、Bst1(CD157)、P-钙粘蛋白、CEA、GITR、TAM(肿瘤相关巨噬细胞,tumor associated macrophage)、CEA、DLL4、Ang2、CD73、FGFR2、CXCR4、LAG-3、GITR、Fucosyl GM1、IGF-1、血管生成素2(Angiopoietin 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、EGFR $\nu$ III、CD16A、CD32B、PIGF、

Axl、MICA/B、Thomsen-Friedenreich、CD39、CD37、CD73、CLEC12A、Lgr3、转铁蛋白受体、TGFβ、IL-17、5T4、RTK、免疫抑制蛋白 (Immune Suppressor Protein)、NaPi2b、路易斯血型B抗原、A34、赖氨酰氧化酶 (Lysyl-Oxidase)、DLK-1、TROP-2、整合素α9、TAG-72 (CA72-4)、CD70

[1349] (2) 自身免疫疾病-炎性疾病

[1350] IL-17、IL-6R、IL-17R、INF-α、IL-5R、IL-13、IL-23、IL-6、ActRIIB、整合素β7 (β7-Integrin)、IL-4αR、HAS、嗜酸性粒细胞趋化因子1 (Eotaxin-1)、CD3、CD19、TNF-α、IL-15、CD3ε、纤维连接蛋白 (Fibronectin)、IL-1β、IL-1α、IL-17、TSLP (胸腺基质淋巴细胞生成素, Thymic Stromal Lymphopoietin)、LAMP (整合素α4β7)、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、钙粘蛋白11 (Cadherin-11)、CX3CL1、CCL20、IL-36R、IL-10R、CD86、TNF-α、IL-7R、Kv1.3、整合素α9、LIFHT

[1351] (3) 脑神经疾病

[1352] CGRP、CD20、β-淀粉样蛋白、β-淀粉样蛋白原纤维、降钙素基因相关肽受体 (Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor)、LINGO (Ig Domain Containing1)、α突触核蛋白 (synuclein)、细胞外tau、CD52、胰岛素受体、tau蛋白、TDP-43、SOD1、TauC3、JC病毒

[1353] (4) 传染病

[1354] 艰难梭菌毒素B (Clostridium Difficile toxin B)、巨细胞病毒、RS病毒、LPS、金黄色葡萄球菌α毒素 (S. Aureus Alpha-toxin)、M2e蛋白、Psl、PcrV、金黄色葡萄球菌毒素 (S. Aureus toxin)、甲型流感、藻蛋白酸盐 (Alginate)、金黄色葡萄球菌、PD-L1、乙型流感、不动杆菌、F蛋白、Env、CD3、病原性大肠杆菌、克雷白氏杆菌、肺炎球菌

[1355] (5) 遗传性-罕见疾病

[1356] 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、甲状腺素转运蛋白 (transthyretin)、亨廷顿舞蹈病 (huntingtin)

[1357] (6) 眼部疾病

[1358] D因子、IGF-1R、PGDFR、Ang2、VEGF-A、CD-105 (内皮因子, Endoglin)、IGF-1R、β淀粉样蛋白

[1359] (7) 骨科-整形外科领域

[1360] 硬骨素 (Sclerostin)、肌抑素 (Myostatin)、Dickkopf-1、GDF8、RNAKL、HAS、Siglec-15

[1361] (8) 血液疾病

[1362] vWF、IXa因子、X因子、IFNγ、C5、BMP-6、铁转运蛋白 (Ferroportin)、TFPI

[1363] (9) 其他疾病

[1364] BAFF (B细胞活化因子, B cell activating factor)、IL-1β、PCSK9、NGF、CD45、TLR-2、GLP-1、TNFR1、C5、CD40、LPA、催乳素受体、VEGFR-1、CB1、内皮因子 (Endoglin)、PTH1R、CXCL1、CXCL8、IL-1β、AT2-R、IAPP

[1365] 更优选的实施方式中, 针对可溶性蛋白质的亲和性物质为针对单克隆抗体的亲和性物质。单克隆抗体的同型, 关于抗体与上述相同, 较好是IgG (例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。较好是单克隆抗体为全长单克隆抗体。

[1366] 进一步更优选的实施方式中, 针对可溶性蛋白质的亲和性物质为针对作为全长单

克隆抗体的嵌合抗体、人源化抗体、或人抗体(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等IgG)的亲性和物质。

[1367] 特别优选的实施方式中,针对可溶性蛋白质的亲和性物质为针对抗体的亲和性物质,该抗体包含选自下述(A)~(C)中的任一种Fc区域蛋白质,且具有抗原结合能力:

[1368] (A)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;

[1369] (B)包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列中插入、添加、缺失或取代1个或数个氨基酸残基而形成的氨基酸序列的Fc区域蛋白质;或者

[1370] (C)包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列显示90%以上的同一性的氨基酸序列的Fc区域蛋白质。

[1371] SEQ ID NO:1的氨基酸序列为Fc区域蛋白质。已知这样的Fc区域蛋白质具有分泌能力。因此,上述(A)~(C)的Fc区域蛋白质可具有分泌能力。此外,包含这样的Fc区域蛋白质的抗体可具有抗原结合能力。SEQ ID NO:1中的第18位的氨基酸残基为任意的氨基酸残基,较好是中性氨基酸残基,更好是如后所述的具有非极性侧链的氨基酸残基,进一步更好是亮氨酸、异亮氨酸或丙氨酸,特别好是亮氨酸或丙氨酸。SEQ ID NO:1中的第19位的氨基酸残基为任意的氨基酸残基,较好是中性氨基酸残基或酸性氨基酸残基,更好是具有非极性侧链的氨基酸残基或酸性氨基酸残基,进一步更好是亮氨酸或谷氨酸。SEQ ID NO:1中的第21位的氨基酸残基为任意的氨基酸残基,较好是中性氨基酸残基,更好是具有非极性侧链的氨基酸残基,进一步更好是甘氨酸或丙氨酸。SEQ ID NO:1中的第140位的氨基酸残基为任意的氨基酸残基,较好是酸性氨基酸残基,更好是谷氨酸或天冬氨酸。SEQ ID NO:1中的第142位的氨基酸残基为任意的氨基酸残基,较好是中性氨基酸残基,更好是具有非极性侧链的氨基酸残基,进一步更好是甲硫氨酸、亮氨酸或异亮氨酸,特别好是甲硫氨酸或亮氨酸。SEQ ID NO:1中的第177位的氨基酸残基为任意的氨基酸残基,较好是中性氨基酸残基,更好是如后所述的具有不带电的极性侧链的氨基酸残基或具有非极性侧链的氨基酸残基,进一步更好是苏氨酸、丙氨酸或甘氨酸,特别好是苏氨酸或丙氨酸。

[1372] 优选的实施方式中,SEQ ID NO:1的氨基酸序列可以是由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:41的氨基酸序列中的第220~449位的氨基酸残基形成的氨基酸序列。

[1373] 另一优选的实施方式中,SEQ ID NO:1的氨基酸序列可以是由SEQ ID NO:3的氨基酸序列中的第7~236位的氨基酸残基形成的氨基酸序列。

[1374] 特定的实施方式中,包含“含有如上所述的氨基酸序列的Fc区域蛋白质”的抗体,可以是包含“含有如上所述的氨基酸序列的Fc区域蛋白质”及“抗体的恒定区”的抗体。作为这样的抗体的恒定区,可以是嵌合抗体、人源化抗体、或人抗体(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等IgG)的恒定区。

[1375] Fc区域蛋白质(B)中,1个或数个氨基酸残基可通过选自缺失、取代、添加及插入的1、2、3或4种变异而改变。氨基酸残基的变异可被引入氨基酸序列中的1个区域,也可被引入多个不同的区域。术语“1个或数个”表示不大幅破坏蛋白质活性的个数。术语“1个或数个”所示的数量例如为1~100个,较好是1~80个,更好是1~50个、1~30个、1~20个、1~10个或1~5个(例如1个、2个、3个、4个或5个)。

[1376] Fc区域蛋白质(C)中,与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的同一性%可以是70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%

以上、96%以上、97%以上、98%以上或99%以上。本发明中,肽或多肽(蛋白质)的同一性%的计算可通过算法blastp进行。更具体来说,多肽的同一性%的计算可使用National Center for Biotechnology Information (NCBI)所提供的算法blastp中默认设定的评分参数(Matrix: BLOSUM62; Gap Costs: Existence=11 Extension=1; Compositional Adjustments: Conditional compositional score matrix adjustment)进行。此外,多核苷酸(基因)的同一性%的计算可通过算法blastn进行。更具体来说,多核苷酸的同一性%的计算可使用NCBI所提供的算法blastn中默认设定的评分参数(Match/Mismatch Scores =1, -2; Gap Costs=Linear)进行。

[1377] 分泌能力中的分泌是与分泌蛋白的分泌(所谓的可溶性)同样的含义。因此,“具有分泌能力”是指与通常的抗体同样,作为可溶性蛋白质发挥作用。

[1378] 上述包含Fc区域蛋白质的抗体只要保持目标的特性(例如分泌能力、抗原结合能力),可在特定的部位引入变异。可保持目标的特性的可引入变异的氨基酸残基的位置对本领域技术人员不言自明。具体来说,对于本领域技术人员而言,1)比较具有同种特性的多种蛋白质的氨基酸序列,2)明确相对保存的区域和相对不保存的区域,接着3)由相对保存的区域和相对不保存的区域可分别预测能发挥对于功能重要的作用的区域和不能发挥对于功能重要的作用的区域,所以能够识别结构及功能的相关性。因此,本领域技术人员能够对上述包含Fc区域蛋白质的抗体的氨基酸序列中可引入变异的氨基酸残基的位置进行特定。

[1379] 氨基酸残基通过取代(置换)变异的情况下,氨基酸残基的取代可以是保存性取代。本说明书中使用的情况下,术语“保存性取代”是指,将规定的氨基酸残基用具有类似侧链的氨基酸残基进行取代。具有类似侧链的氨基酸残基的家族在该领域中周知。例如,作为这样的家族,可例举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)、具有不带电的极性侧链的氨基酸(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、甲硫氨酸、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)、具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)、具有含羟基(例如醇性、酚性)的侧链的氨基酸(例如丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)、及具有含硫的侧链的氨基酸(例如半胱氨酸、甲硫氨酸)。较好是氨基酸的保存性取代可以是天冬氨酸与谷氨酸之间的取代,精氨酸与赖氨酸与组氨酸之间的取代,色氨酸与苯丙氨酸之间的取代,苯丙氨酸与缬氨酸之间的取代,亮氨酸与异亮氨酸与丙氨酸之间的取代,以及甘氨酸与丙氨酸之间的取代。

[1380] 作为包含选自上述(A)~(C)中的任一种Fc区域的抗体,可例举例如嵌合抗体(例如利妥昔单抗(Rituximab)、巴利昔单抗(Basiliximab)、英夫利昔单抗(Infliximab)、西妥昔单抗(Cetuximab)、司妥昔单抗(Siltuximab)、达妥昔单抗(Dinutuximab)、奥塔昔单抗(オルタトキサシマブ))、人源化抗体(例如达利珠单抗(Daclizumab)、帕利珠单抗(Palivizumab)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)、阿伦单抗(Alemtuzumab)、奥马珠单抗(Omalizumab)、依法利珠单抗(Efalizumab)、贝伐珠单抗(Bevacizumab)、那他珠单抗(Natalizumab)(IgG4)、托珠单抗(Tocilizumab)、依库珠单抗(Eculizumab)(IgG2)、莫加木珠单抗(Mogamulizumab)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、奥滨尤妥珠单抗(Obinutuzumab)、维多珠单抗(Vedolizumab)、派姆单抗(Pembrolizumab)(IgG4)、美泊利单抗(Mepolizumab)、

埃罗妥珠单抗 (Elotuzumab)、达雷木单抗 (Daratumumab)、依奇珠单抗 (Ixekizumab) (IgG4)、瑞利珠单抗 (Reslizumab) (IgG4)、阿特珠单抗 (Atezolizumab)、人抗体 (例如阿达木单抗 (Adalimumab)、帕尼单抗 (Panitumumab)、戈利木单抗 (Golimumab)、优特克单抗 (Ustekinumab)、卡纳单抗 (Canakinumab)、奥法木单抗 (Ofatumumab)、地诺单抗 (Denosumab) (IgG2)、伊匹单抗 (Ipirimumab)、贝利木单抗 (Belimumab)、雷昔库单抗 (Raxibacumab)、雷莫芦单抗 (Ramucirumab)、纳武单抗 (Nivolumab) (IgG4)、苏金单抗 (Secukinumab)、依伏库单抗 (Evolocumab) (IgG2)、阿利珠单抗 (Alirocumab)、耐昔妥珠单抗 (Necitumumab)、布洛鲁单抗 (Brodalumab) (IgG2)、奥拉单抗 (Olaratumab)) (未提及IgG型的情况下表示是IgG1)。

[1381] 作为如上所述的针对可溶性蛋白质的亲和性物质,可例举例如肽 (包括寡肽、多肽、及蛋白质)、低分子化合物、核酸、核酸-肽复合物、肽-低分子化合物复合物、核酸-低分子复合物。

[1382] 特定的实施方式中,如上所述的针对可溶性蛋白质的亲和性物质可以是肽 (包括寡肽、多肽、蛋白质。也可以是糖蛋白)。作为这样的肽,例如报道有以下的肽:

[1383] (1) 对所有的人IgG (即,人IgG1、IgG2、IgG3及IgG4,下同)的特定区域 (CH2区域) 具有亲和性的IgG结合性肽 (参照例如国际公开第2016/186206号、国际公开第2013/027796号、国际公开第2008/054030号);

[1384] (2) 对所有的人IgG的特定区域 (CH2区域) 具有亲和性的蛋白质A模拟肽 (Protein A Mimetic (PAM) peptide) (参照例如Fassina G等, JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, 1996, VOL.6, 564-569);

[1385] (3) 对所有的人IgG的特定区域 (CH2区域) 具有亲和性的EPIHRSTLTALL (SEQ ID NO:9) (参照例如Ehrlich G.K等, J.Biochem.Biophys.Methods, 2001, VOL.49, 443-454);

[1386] (4) 对所有的人IgG的特定区域 (Fc区域) 具有亲和性的 (NH<sub>2</sub>-Cys1-X1-X2-X3-X4) 2-Lys-Gly-OH (参照例如Ruvo M等, ChemBioChem, 2005, VOL.6, 1242-1253);

[1387] (5) 对所有的人IgG的特定区域 (Fc区域) 具有亲和性的FARLVSSIRY (SEQ ID NO:10)、FGRLVSSIRY (SEQ ID NO:11)、及TWKTSRISIF (SEQ ID NO:12) (参照例如Krook M等, Journal of Immunological Methods, 1998, VOL.221, 151-157);

[1388] (6) 对所有的人IgG的特定区域具有亲和性的QSYP (SEQ ID NO:13) (参照例如Jacobs J.M.等, Bio.Techniques, 2003, VOL.34, 132-141);

[1389] (7) 对所有的人IgG的特定区域 (Fc区域) 具有亲和性的HWRGWV (SEQ ID NO:14)、HYFKFD (SEQ ID NO:15)、及HFRRHL (SEQ ID NO:16) (参照例如Carbonell R.G.等, Journal of Chromatography A, 2009, VOL.1216, 910-918);

[1390] (8) 对所有的人IgG的特定区域 (Fc区域) 具有亲和性的DAAG (SEQ ID NO:17) (参照例如Lund L.N.等, Journal of Chromatography A, 2012, VOL.1225, 158-167);

[1391] (9) 对所有的人IgG的特定区域 (Fc区域) 具有亲和性的Fc-I、Fc-II、及Fc-III (参照例如Warren L.Delano等, Science, 2000, VOL.287, 1279-1283; 国际公开2001/045746号); 以及

[1392] (10) 对所有的人IgG的特定区域 (Fc区域) 具有亲和性的NARKFYKG (SEQ ID NO:18)、及NKFRGKYK (SEQ ID NO:19) (参照例如Biochemical Engineering Journal, 2013,

VOL.79,33-40)。

[1393] 另一特定的实施方式中,如上所述的针对可溶性蛋白质的亲和性物质可以是肽以外的物质。作为这样的物质,报道有例如对人IgG(例如人IgG1~4)的特定区域(CH2区域、特别是Lys340的侧链)具有亲和性的适体[例如,含有GGUGCU及GGUGAU等GGUG(C/A)(U/T)模体(motif)的适体](参照例如国际公开第2007/004748号公报;Nomura Y等,Nucleic Acids Res.,2010 Nov;38(21):7822-9;Miyakawa S等,RNA.,2008 Jun;14(6):1154-63)。

[1394] 如上所述的针对可溶性蛋白质的亲和性物质可以通过该领域中的任意的公知方法获得。例如,可使用可溶性蛋白质整体或可溶性蛋白质中的部分肽(例如蛋白质表面露出区域明确的情况下,存在于该区域中的部分肽),通过制作抗体(例如杂交瘤法),或者从可获得亲和性物质的文库(例如肽文库、抗体文库、抗体产生细胞文库、适体文库、噬菌体文库、mRNA文库、cDNA文库)中筛选亲和性物质(例如噬菌体展示法、SELEX法、mRNA展示法、核糖体展示法、cDNA展示法、酵母展示法),从而获得。此外,针对可溶性蛋白质的亲和性物质为针对抗体的Fc区域(可溶性区域)的亲和性物质的情况下,可通过使用存在于各种抗体(例如IgG、IgA、IgM、IgD、IgE)的Fc区域的特定区域(例如CH1、CH2、CH3)中的部分肽,有效地获得能够与抗体的Fc区域中的任意部分选择性结合的亲和性物质(例如抗体、适体)。这样获得的亲和性物质中,混入有亲和结合能力相对较强的物质和较弱的物质。但是,即使是亲和结合能力较弱的亲和性物质,也可通过过量使用来补足其亲和结合能力。

[1395] 如上所述的针对可溶性蛋白质的亲和性物质可以是以下述式(i)表示的IgG结合性肽或其盐(例如实施例及国际公开第2016/186206号)。

[1396]  $(X_{1-3})-C-(X_2)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3})$  (SEQ ID NO:94) (i)

[1397] 包含以上述式(i)表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列,且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐;

[1398] 式中,

[1399] X相同或不同,为除半胱氨酸以外的任意的氨基酸残基,

[1400] C为半胱氨酸残基,

[1401] H为组氨酸残基,

[1402] Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基,

[1403] G为甘氨酸残基,

[1404] Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基,

[1405] L为亮氨酸残基,

[1406] V为缬氨酸残基,且

[1407] W为色氨酸残基。

[1408] 较好是Xaa1和Xaa2分别为不同的氨基酸残基。

[1409] 本说明书中,N末端或C末端的 $X_{1-3}$ 的表述是指除半胱氨酸(C或Cys)以外的独立的任意氨基酸残基X为连续1~3个,构成其的氨基酸残基是相同或不同的残基,较好是由3个不全部为同样残基的序列形成。同样地, $X_2$ 也是指除半胱氨酸(C或Cys)以外的独立的任意氨基酸残基X为连续2个,构成其的氨基酸残基是相同或不同的残基,较好是由这2个连续的氨基酸残基不全部为同样残基的序列形成。后述的 $X_1$ 也是指除半胱氨酸(C或Cys)以外的独

立的任意氨基酸残基X存在1个。

[1410] 此外,本说明书中,肽的各氨基酸序列中隔开的至少2个半胱氨酸残基可通过二硫键形成环状肽。通常,上述式(i)等式的肽中,外侧的2个半胱氨酸残基进行二硫键合。或者,上述式(i)等式的肽中,外侧的2个半胱氨酸中的硫基(sulfide group)可通过以下所示的含羰基的连接体连接。

[1411] [化学式29]



[1413] 上述所示的含羰基的连接体的虚线部分表示与硫基的结合部分。该连接体对于还原反应等比通常的二硫键更稳定。该肽可通过例如国际公开第2016/186206号中所记载的方法制备。

[1414] 特定的实施方式中,上述式(i)的亲性物质可以是以下述式(i-1)表示的IgG结合性肽或其盐(例如国际公开第2016/186206号)。

[1415]  $(X_{1-3})-C-(X_2)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3})$  (SEQ ID NO:95) (i-1)

[1416] 包含以上述式(i-1)表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列,且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐;

[1417] 式中,

[1418] X相同或不同,为除半胱氨酸以外的任意的氨基酸残基,

[1419] C为半胱氨酸残基,

[1420] H为组氨酸残基,

[1421] Xaa1为赖氨酸残基、半胱氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基,

[1422] G为甘氨酸残基,

[1423] Xaa2为谷氨酸残基或天冬酰胺残基,

[1424] L为亮氨酸残基,

[1425] V为缬氨酸残基,且

[1426] W为色氨酸残基。

[1427] 较好是Xaa1和Xaa2分别为不同的氨基酸残基。

[1428] 另一特定的实施方式中,如上所述的针对可溶性蛋白质的亲和性物质可以是以下述式(i-2)表示的IgG结合性肽或其盐(例如实施例)。

[1429]  $(X_{1-3})-C-(X_2)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3})$  (SEQ ID NO:96) (i-2)

[1430] 包含以上述式(i-2)表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列,且可与人IgG和/或兔IgG结合的肽或其盐;

[1431] 式中,

[1432] X相同或不同,为除半胱氨酸以外的任意的氨基酸残基,

[1433] C为半胱氨酸残基,

[1434] H为组氨酸残基,

[1435] Xaa1为精氨酸残基或亮氨酸残基,

[1436] G为甘氨酸残基,

- [1437] Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基或天冬氨酸残基，
- [1438] L为亮氨酸残基，
- [1439] V为缬氨酸残基，且
- [1440] W为色氨酸残基。
- [1441] 具有这样的特定结构的国际公开第2016/186206号中未揭示的亲性物质可用于人IgG Fc中基于Eu numbering的Lys248残基或Lys246残基、或者除Lys248残基或Lys246残基以外的其他氨基酸残基的区域选择性修饰(实施例)。
- [1442] 式(i-1)的肽的氨基酸序列中对氨基酸残基X进一步特定的以式(i-1')和式(i-1'')表示的肽如下所示。
- [1443] 即,以式(i-1')表示的肽的特征是包含以
- [1444]  $(X_{1-3})-C-(X1)-Y-H-(Xaa1)-G-N-L-V-W-C-(X_{1-3})$  (SEQ ID NO:97) (i-1')
- [1445] 表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列,且可与人IgG和/或兔IgG结合;式中,
- [1446] X相同或不同,为除半胱氨酸以外的任意的氨基酸残基,
- [1447] C为半胱氨酸残基,
- [1448] Y为酪氨酸残基,
- [1449] H为组氨酸残基,
- [1450] Xaa1为赖氨酸残基、半胱氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基,
- [1451] G为甘氨酸残基,
- [1452] N为天冬酰胺残基,
- [1453] L为亮氨酸残基,
- [1454] V为缬氨酸残基,且
- [1455] W为色氨酸残基。
- [1456] 以式(i-1'')表示的肽的特征是包含以
- [1457]  $(X_{1-3})-C-A-(X1)-H-(Xaa1)-G-E-L-V-W-C-(X_{1-3})$  (SEQ ID NO:98) (i-1'')
- [1458] 表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列,且可与人IgG和/或兔IgG结合;式中,
- [1459] X相同或不同,为除半胱氨酸以外的任意的氨基酸残基,
- [1460] C为半胱氨酸残基,
- [1461] A为丙氨酸残基,
- [1462] H为组氨酸残基,
- [1463] Xaa1为赖氨酸残基、半胱氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基,
- [1464] G为甘氨酸残基,
- [1465] E为谷氨酸残基,
- [1466] L为亮氨酸残基,
- [1467] V为缬氨酸残基,且
- [1468] W为色氨酸残基。

[1469] 此外,式(i-1)的肽的氨基酸序列中对氨基酸残基X进一步特定的以式(ii)表示的肽如下所示。

[1470] 即,以式(ii)表示的肽的特征是包含以

[1471]  $(X_{1-3})-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3})$  (SEQ ID NO:99)

(ii)表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列,且可与人IgG和/或兔IgG结合;式中,

[1472] X相同或不同,为除半胱氨酸以外的任意的氨基酸残基,

[1473] C为半胱氨酸残基,

[1474] H为组氨酸残基,

[1475] Xaa1为赖氨酸残基、半胱氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基,

[1476] G为甘氨酸残基,

[1477] Xaa2为谷氨酸残基或天冬酰胺残基,

[1478] L为亮氨酸残基,

[1479] V为缬氨酸残基,

[1480] W为色氨酸残基,

[1481] Xaa3为丙氨酸残基、丝氨酸残基或苏氨酸残基,且

[1482] Xaa4为酪氨酸残基或色氨酸残基。

[1483] 式(i)等式的肽的氨基酸序列中,设为17个氨基酸残基的情况下,自N末端起的第1个和第2个、以及第16个和第17个的氨基酸残基X可缺失,这样的肽的氨基酸个数(氨基酸长度)为13个。

[1484] 本说明书中使用的“设为17个氨基酸残基的情况下”是为了在用氨基酸编号称呼肽的氨基酸残基时,对于式(i)的肽等自作为最长的氨基酸个数(氨基酸长度)的17个残基的N末端起依次编号为第1个至第17个而简单地进行表述的术语。

[1485] 此外,式(i-1)的肽的氨基酸序列中对氨基酸残基X进一步特定的以式(iii)表示的肽如下所示。

[1486] 即,以式(iii)表示的肽的特征是包含以

[1487]  $(X_{1-3})-C-A-Y-H-(Xaa1)-G-E-L-V-W-C-(X_{1-3})$  (SEQ ID NO:100) (iii)

[1488] 表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列,且可与人IgG和/或兔IgG结合;式中,

[1489] X相同或不同,为除半胱氨酸以外的任意的氨基酸残基,

[1490] C为半胱氨酸残基,

[1491] A为丙氨酸残基,

[1492] Y为酪氨酸残基,

[1493] H为组氨酸残基,

[1494] Xaa1为赖氨酸残基、半胱氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基,

[1495] G为甘氨酸残基,

[1496] E为谷氨酸残基,

- [1497] L为亮氨酸残基，
- [1498] V为缬氨酸残基，且
- [1499] W为色氨酸残基。
- [1500] 式(iii)的肽的氨基酸序列中，设为17个氨基酸残基的情况下，自N末端起的第1个和第2个、以及第16个和第17个的氨基酸残基X可缺失，这样的肽的氨基酸个数为13个。
- [1501] 另外，上述的各式的肽的氨基酸序列的除半胱氨酸(C)以外的氨基酸残基，即，设为17个氨基酸残基的情况下，自N末端起的第1~3、5、6、15~17个的各氨基酸残基较好是选自以下的残基。在此，各大写字母为氨基酸的单字母表示方式：
- [1502] 第1个氨基酸残基=S、G、F或不存在
- [1503] 第2个氨基酸残基=D、G、A、S、P、高半胱氨酸(同型半胱氨酸)或不存在
- [1504] 第3个氨基酸残基=S、D、T、N、E或R
- [1505] 第15个氨基酸残基=S、T或D
- [1506] 第16个氨基酸残基=H、G、Y、T、N、D、F、高半胱氨酸或不存在
- [1507] 第17个氨基酸残基=Y、F、H、M或不存在。
- [1508] 第5个氨基酸残基=A或T，
- [1509] 第6个氨基酸残基=Y或W。
- [1510] 此外，式(i-1)的肽的氨基酸序列中对氨基酸残基X进一步特定的以式(iv)表示的肽如下所示。
- [1511] 即，以式(iv)表示的肽的特征是包含以
- [1512] D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-T (SEQ ID NO:101) (iv)
- [1513] 表示的由13个氨基酸残基组成的氨基酸序列，且可与人IgG和/或兔IgG结合；
- [1514] 式中，
- [1515] D为天冬氨酸残基，
- [1516] C为半胱氨酸残基，
- [1517] H为组氨酸残基，
- [1518] Xaa1为赖氨酸残基、半胱氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，
- [1519] G为甘氨酸残基，
- [1520] Xaa2为谷氨酸残基或天冬酰胺残基，
- [1521] L为亮氨酸残基，
- [1522] V为缬氨酸残基，
- [1523] W为色氨酸残基，
- [1524] T为苏氨酸残基，
- [1525] Xaa3为丙氨酸残基或苏氨酸残基，且
- [1526] Xaa4为酪氨酸残基或色氨酸残基。
- [1527] 以下的(1)~(19)例举若干式(i-1)的肽的具体例子，但当然并不仅限于这些例子：
- [1528] (1) DCAYH(Xaa1)GELVWCT (SEQ ID NO:20)；
- [1529] (2) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH (SEQ ID NO:21)；

- [1530] (3) RCAYH (Xaa1) GELVWCS (SEQ ID NO:22) ;
- [1531] (4) GPRCAYH (Xaa1) GELVWCSFH (SEQ ID NO:23) ;
- [1532] (5) SPDCAYH (Xaa1) GELVWCTFH (SEQ ID NO:24) ;
- [1533] (6) GDDCAYH (Xaa1) GELVWCTFH (SEQ ID NO:25) ;
- [1534] (7) GPSCAYH (Xaa1) GELVWCTFH (SEQ ID NO:26) ;
- [1535] (8) GPDCAYH (Xaa1) GELVWCSFH (SEQ ID NO:27) ;
- [1536] (9) GPDCAYH (Xaa1) GELVWCTHH (SEQ ID NO:28) ;
- [1537] (10) GPDCAYH (Xaa1) GELVWCTFY (SEQ ID NO:29) ;
- [1538] (11) SPDCAYH (Xaa1) GELVWCTFY (SEQ ID NO:30) ;
- [1539] (12) SDDCAYH (Xaa1) GELVWCTFY (SEQ ID NO:31) ;
- [1540] (13) RGNCAHYH (Xaa1) GQLVWCTYH (SEQ ID NO:32) ;
- [1541] (14) G (Xaa2) DCAYH (Xaa1) GELVWCT (Xaa2) H (SEQ ID NO:33) ;
- [1542] (15) RRGPDCAHYH (Xaa1) GELVWCTFH (SEQ ID NO:34) ;
- [1543] (16) DCTYH (Xaa1) GNLVWCT (SEQ ID NO:35) ;
- [1544] (17) DCAYH (Xaa1) GNLVWCT (SEQ ID NO:36) ;
- [1545] (18) DCTYH (Xaa1) GELVWCT (SEQ ID NO:37) ; 及
- [1546] (19) DCAWH (Xaa1) GELVWCT (SEQ ID NO:38) 。
- [1547] 式中，
- [1548] Xaa1为赖氨酸残基、半胱氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，
- [1549] Xaa2为高半胱氨酸，
- [1550] 较好是高半胱氨酸彼此相互形成二硫键。
- [1551] 作为式 (i-1) 的肽的优选的具体例子，可列举以下的肽：
- [1552] (1) DCAYH (Xaa1) GELVWCT (SEQ ID NO:20) ;
- [1553] (2) GPDCAYH (Xaa1) GELVWCTFH (SEQ ID NO:21) ;
- [1554] (13) RGNCAHYH (Xaa1) GQLVWCTYH (SEQ ID NO:22) ;
- [1555] (14) G (Xaa2) DCAYH (Xaa1) GELVWCT (Xaa2) H (SEQ ID NO:33) ; 及
- [1556] (15) RRGPDCAHYH (Xaa1) GELVWCTFH (SEQ ID NO:34) 。
- [1557] 式中，
- [1558] Xaa1为赖氨酸残基，
- [1559] Xaa2为高半胱氨酸，
- [1560] 较好是半胱氨酸彼此和/或高半胱氨酸彼此相互形成二硫键。
- [1561] 上述 (13) 的肽可以是RGNCAHYHKGQLVWCTYH (SEQ ID NO:39) 。
- [1562] 另一特定的实施方式中，上述式 (i) 的亲性物质可以是以下述式 (v) 表示的IgG结合性肽或其盐 (例如实施例) 。
- [1563]  $(X_{1-3})-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7)$   
(SEQ ID NO:102) (v)
- [1564] 包含以上述式 (v) 表示的由13~17个氨基酸残基组成的氨基酸序列，且可与人IgG结合的肽或其盐；

- [1565] 式中，
- [1566] X相同或不同，为除半胱氨酸以外的任意的氨基酸残基，
- [1567] C为半胱氨酸残基，
- [1568] Xaa3为丙氨酸残基或赖氨酸残基，
- [1569] Xaa4为色氨酸残基或酪氨酸残基，
- [1570] H为组氨酸残基，
- [1571] Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，
- [1572] G为甘氨酸残基，
- [1573] Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基，
- [1574] L为亮氨酸残基，
- [1575] V为缬氨酸残基，
- [1576] W为色氨酸残基，
- [1577] Xaa5为苏氨酸残基或赖氨酸残基，
- [1578] Xaa6为酪氨酸残基、赖氨酸残基或不存在，且
- [1579] Xaa7为组氨酸残基、赖氨酸残基或不存在。
- [1580] 具有这样的特定结构的国际公开第2016/186206号中未揭示的亲性物质可用于人IgG Fc中基于Eu numbering的Lys248残基或Lys246残基、或者除Lys248残基或Lys246残基以外的其他氨基酸残基的区域选择性修饰(实施例)。较好是Xaa3、Xaa1、Xaa2、Xaa5、Xaa6和Xaa7中的任一个为赖氨酸残基。Xaa1可优选为精氨酸或亮氨酸残基。或者，Xaa1可优选为赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，更优选为赖氨酸残基、天冬氨酸残基或谷氨酸残基。
- [1581] 式(v)的肽的氨基酸序列中，设为17个氨基酸残基的情况下，自N末端起的第1个和第2个、以及第16个和第17个的氨基酸残基X可缺失，这样的肽的氨基酸个数为13个。
- [1582] 另外，上述式(v)的肽的氨基酸序列的除半胱氨酸(C)以外的氨基酸残基，即，设为17个氨基酸残基的情况下，自N末端起的第1~3个的各氨基酸残基较好是选自以下的残基。在此，各大写字母为氨基酸的单字母表示方式：
- [1583] 第1个氨基酸残基=R、S、G、F或不存在，较好是R或不存在
- [1584] 第2个氨基酸残基=D、G、A、S、P、高半胱氨酸或不存在，较好是G或不存在
- [1585] 第3个氨基酸残基=S、D、T、N、E或R，较好是N或D。
- [1586] 以下的(16)~(34)例举若干式(v)的肽的具体例子，但当然并不仅限于这些例子：
- [1587] (16) RGNCAHYH (Xaa1) GQLVWCTYH (SEQ ID NO:73)
- [1588] (17) RGNCAWH (Xaa1) GQLVWCTYH (SEQ ID NO:74)
- [1589] (18) RGNCAWH (Xaa1) GELVWCTYH (SEQ ID NO:75)
- [1590] (19) RGNCKWH (Xaa1) GQLVWCTYH (SEQ ID NO:76)
- [1591] (20) RGNCKYH (Xaa1) GELVWCTYH (SEQ ID NO:77)
- [1592] (21) RGNCKYH (Xaa1) GQLVWCTYH (SEQ ID NO:78)
- [1593] (22) DCKWH (Xaa1) GELVWCT (SEQ ID NO:79)
- [1594] (23) DCKYH (Xaa1) GELVWCT (SEQ ID NO:80)

- [1595] (24) DCKWH (Xaa1) GELVWCT (SEQ ID NO:81)
- [1596] (25) DCKWH (Xaa1) GQLVWCT (SEQ ID NO:82)
- [1597] (26) DCKYH (Xaa1) GELVWCT (SEQ ID NO:83)
- [1598] (27) DCKYH (Xaa1) GQLVWCT (SEQ ID NO:84)
- [1599] (28) DCKWH (Xaa1) GQLVWCT (SEQ ID NO:85)
- [1600] (29) DCKYH (Xaa1) GQLVWCT (SEQ ID NO:86)
- [1601] (30) RGNCAWH (Xaa1) GQLVWCKYH (SEQ ID NO:87)
- [1602] (31) RGNCAWH (Xaa1) GELVWCKYH (SEQ ID NO:88)
- [1603] (32) RGNCAYH (Xaa1) GQLVWCTKH (SEQ ID NO:89)
- [1604] (33) RGNCAYH (Xaa1) GQLVWCTYK (SEQ ID NO:90)
- [1605] (34) RGNCAYH (Xaa1) GQLVWCTKH (SEQ ID NO:91)。
- [1606] 式中，
- [1607] Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基。
- [1608] 较好是Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基，更好是赖氨酸残基。
- [1609] 此外，作为广义的一级结构，IgG结合性肽是以包含以下述的式(vi)：
- [1610] D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7) (SEQ ID NO:103) (vi)
- [1611] 表示的由13~15个氨基酸残基组成的氨基酸序列，且可与人IgG和/或兔IgG结合为特征的肽(例如实施例及国际公开第2016/186206号)；
- [1612] 式中，
- [1613] D为天冬氨酸残基，
- [1614] C为半胱氨酸残基，
- [1615] Xaa3为丙氨酸残基或赖氨酸残基，
- [1616] Xaa4为色氨酸残基或酪氨酸残基，
- [1617] H为组氨酸残基，
- [1618] Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基，
- [1619] G为甘氨酸残基，
- [1620] Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基，
- [1621] L为亮氨酸残基，
- [1622] V为缬氨酸残基，
- [1623] W为色氨酸残基，
- [1624] Xaa5为苏氨酸残基或赖氨酸残基，
- [1625] Xaa6为酪氨酸残基、赖氨酸残基或不存在，
- [1626] Xaa7为组氨酸残基、赖氨酸残基或不存在。
- [1627] 较好是Xaa3、Xaa1、Xaa2、Xaa5、Xaa6和Xaa7中的任一个为赖氨酸残基。Xaa1较好是赖氨酸残基、精氨酸残基或亮氨酸残基，Xaa2较好是赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基。

[1628] 特定的实施方式中, IgG结合性肽是以包含以下述的式(vii):

[1629]  $D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-T$  (SEQ ID NO:104) (vii) 表示的由13个氨基酸残基组成的氨基酸序列, 且可与人IgG和/或兔IgG结合为特征的肽(例如国际公开第2016/186206号);

[1630] 式中,

[1631] D为天冬氨酸残基,

[1632] C为半胱氨酸残基,

[1633] Xaa3为丙氨酸残基或赖氨酸残基,

[1634] Xaa4为色氨酸残基或酪氨酸残基,

[1635] H为组氨酸残基,

[1636] Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基,

[1637] G为甘氨酸残基,

[1638] Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基,

[1639] L为亮氨酸残基,

[1640] V为缬氨酸残基,

[1641] W为色氨酸残基, 且

[1642] T为苏氨酸残基。较好是Xaa3、Xaa1和Xaa2中的任一个为赖氨酸残基。Xaa1较好是赖氨酸残基、精氨酸残基或亮氨酸残基, Xaa2较好是赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基。

[1643] 另一特定的实施方式中, IgG结合性肽是以包含以下述的式(viii):

[1644]  $R-G-N-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7)$  (SEQ ID NO:105) (viii)

[1645] 表示的由13~15个氨基酸残基组成的氨基酸序列, 且可与人IgG和/或兔IgG结合为特征的肽(例如实施例);

[1646] 式中,

[1647] R为精氨酸残基,

[1648] G为甘氨酸残基,

[1649] N为天冬酰胺残基,

[1650] C为半胱氨酸残基,

[1651] Xaa3为丙氨酸残基或赖氨酸残基,

[1652] Xaa4为色氨酸残基或酪氨酸残基,

[1653] H为组氨酸残基,

[1654] Xaa1为精氨酸残基、亮氨酸残基、赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基或二氨基丙酸残基,

[1655] G为甘氨酸残基,

[1656] Xaa2为赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基、天冬酰胺残基或天冬氨酸残基,

[1657] L为亮氨酸残基,

[1658] V为缬氨酸残基,

[1659] W为色氨酸残基，

[1660] Xaa5为苏氨酸残基或赖氨酸残基，

[1661] Xaa6为酪氨酸残基、赖氨酸残基或不存在，且

[1662] Xaa7为组氨酸残基、赖氨酸残基或不存在。具有这样的特定结构的国际公开第2016/186206号中未揭示的化合物可用于人IgG Fc中基于Eu numbering的Lys248残基或Lys246残基、或者除Lys248残基或Lys246残基以外的其他氨基酸残基的区域选择性修饰(实施例)。较好是Xaa3、Xaa1、Xaa2、Xaa5、Xaa6和Xaa7中的任一个为赖氨酸残基。Xaa1可优选为精氨酸残基或亮氨酸残基。或者，Xaa1较好是赖氨酸残基、精氨酸残基或亮氨酸残基，Xaa2较好是赖氨酸残基、谷氨酰胺残基、谷氨酸残基。

[1663] 关于肽，各氨基酸序列中隔开的至少2个半胱氨酸(C)残基可通过二硫键合而形成环状肽，在各半胱氨酸残基的N末端侧和C末端侧可具有1或2个除半胱氨酸以外的任意的氨基酸残基。在各半胱氨酸残基的N末端侧和C末端侧具有1或2个氨基酸残基的情况下，设为17个氨基酸残基的情况下，自N末端起的第1~2、16~17个的各氨基酸残基为上述示例的残基。此外，构成上述肽的氨基酸可为L体或D体中的任一种，但较好是L体(实施例中构成肽的氨基酸残基全部为L体)。

[1664] 如上所述，IgG结合性肽中，上述Xaa的氨基酸残基为可通过交联剂容易地进行修饰的氨基酸残基(赖氨酸残基、半胱氨酸残基、精氨酸残基或谷氨酸残基等蛋白质构成氨基酸、或者二氨基丙酸残基或2-氨基辛二酸残基等非蛋白质构成氨基酸)的情况下，这些氨基酸中，较好是赖氨酸残基。作为这样的交联剂，可例举例如DSG(disuccinimidyl glutarate、双琥珀酰亚胺戊二酸酯)、DSS(disuccinimidyl suberate、双琥珀酰亚胺辛二酸酯)等的优选包含2个以上的琥珀酰亚胺基的交联剂，DMA(dimethyl adipimidate • 2HCl、二亚胺代己二酸二甲酯二盐酸盐)、DMP(dimethyl pimelimidate • 2 HCl、庚二亚氨酸二甲酯二盐酸盐)、及DMS(dimethyl suberimidate • 2 HCl、辛二亚氨酸二甲酯二盐酸盐)等的优选包含2个以上的亚氨酸部分的交联剂，以及DTBP(dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate • 2HCl、3,3'-二硫代双丙亚氨酸二甲酯二盐酸盐)及DSP(dithiobis(succinimidyl propionate)、二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯))等的具有SS键的交联剂(例如国际公开第2016/186206号)。为了提高通过交联剂修饰IgG结合性肽时的部位特异性，IgG结合性肽较好是在其序列中完全不具有或几乎不具有与Xaa1相同的残基(例如仅具有1个或2个)。例如，Xaa1为赖氨酸残基的情况下，IgG结合性肽较好是在其序列中除Xaa1以外的地方完全不具有或几乎不具有赖氨酸残基。

[1665] IgG结合性肽与IgG的Fc结构域结合。对于IgG结合性肽而言，在上述Xaa1等上述Xaa的氨基酸残基中，与IgG Fc的特定区域、即人IgG Fc中的基于Eu numbering的Lys248残基或Lys246残基、较好是Lys248接近(参照实施例及国际公开第2016/186206号)。或者，IgG结合性肽中，上述Xaa的氨基酸残基可与人IgG Fc中的基于Eu numbering的除Lys248残基或Lys246残基以外的其他氨基酸残基接近。

[1666] 更具体来说，以上述式(i)~(viii)表示的肽如下。

[1667] (1') RGNCA YHKGQLVWCTYH (SEQ ID NO:39)

[1668] (2') RGNCKYHRGQLVWCTYH (SEQ ID NO:42)

[1669] (3') RGNCAWHRGKLVWCTYH (SEQ ID NO:43)

- [1670] (4') RGNCKWHRGELVWCTYH (SEQ ID NO:44)  
[1671] (5') RGNCKWHRGQLVWCTYH (SEQ ID NO:45)  
[1672] (6') RGNCKYHLGELVWCTYH (SEQ ID NO:46)  
[1673] (7') RGNCKYHLGQLVWCTYH (SEQ ID NO:47)  
[1674] (8') DCKWHLGELVWCT (SEQ ID NO:48)  
[1675] (9') DCKYHLGELVWCT (SEQ ID NO:49)  
[1676] (10') DCKWHRGELVWCT (SEQ ID NO:50)  
[1677] (11') DCKWHLGQLVWCT (SEQ ID NO:51)  
[1678] (12') DCKYHRGELVWCT (SEQ ID NO:52)  
[1679] (13') DCKYHLGQLVWCT (SEQ ID NO:53)  
[1680] (14') DCKWHRGQLVWCT (SEQ ID NO:54)  
[1681] (15') DCKYHRGQLVWCT (SEQ ID NO:55)  
[1682] (16') RGNCAWHLGQLVWCKYH (SEQ ID NO:56)  
[1683] (17') RGNCAWHLGELVWCKYH (SEQ ID NO:57)  
[1684] (18') RGNCAYHLGQLVWCTKH (SEQ ID NO:58)  
[1685] (19') RGNCAYHLGQLVWCTYK (SEQ ID NO:59)  
[1686] (20') RGNCAYHRGQLVWCTKH (SEQ ID NO:60)

[1687] 此外,如上所述的针对可溶性蛋白质的亲和性物质可以是包含具有下述(a)和(b)的特征的氨基酸序列的亲和性肽:

[1688] (a) 在FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:92) 的氨基酸序列中,任一氨基酸残基被选自赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基和二氨基丙酸残基(可通过交联剂容易地进行修饰的氨基酸残基)中的1个氨基酸残基(较好是赖氨酸残基、天冬氨酸残基或谷氨酸残基,更好是赖氨酸残基)取代,且

[1689] (b) 对于SEQ ID NO:92的所述氨基酸序列具有90%以上的同一性。

[1690] 较好是具有(a)和(b)的特性的上述氨基酸序列可与本说明书中所记载的人IgG结合。

[1691] 由SEQ ID NO:92的氨基酸序列组成的肽,基于肽试剂合成上的情况,是作为Z34C已知的亲和性肽中从N末端数第26个和第28个的2个K(赖氨酸)变更为R(精氨酸)的肽,可进一步将N末端乙酰基化并将C末端酰胺化后使用。更具体来说,作为这样的亲和性肽,可例举Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:92)。具有这样的特定结构的亲和性物质可用于人IgG Fc中的基于Eu numbering的Lys248残基或Lys246残基、Lys288或Lys290、Lys317、或者除这些残基以外的其他氨基酸残基的区域选择性修饰(实施例)。应予说明,上述Z34C的氨基酸序列为FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDC (SEQ ID NO:93) (参照例如Starovasnik, M.A.等, Structural mimicry of a native protein by a minimized binding domain., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 10080-10085 (1997))。

[1692] 亲和性肽可具有针对人IgG(例如上述的人IgG,较好是人IgG1)的亲和性。关于上述亲和性肽,第5位和第34位的半胱氨酸残基可进行二硫键合而形成环状肽。

[1693] 作为引入通过交联剂容易修饰的氨基酸残基的位置,只要具有针对人IgG1等人IgG的亲和性,则可利用任意的位点。对于这样的位点,只要是本领域技术人员,均可容易地

鉴定。优选的是,引入可通过交联剂容易地进行修饰的氨基酸残基的位置是除可进行二硫键合的第5位和第34位的半胱氨酸残基以外的氨基酸残基。更优选地,作为引入可通过交联剂容易地进行修饰的氨基酸残基的位置,可例举例如第1位、3位、6位、7位、13位、20位、24位、31位和32位的氨基酸残基。

[1694] 优选地,具有(a)和(b)的特性的上述氨基酸序列还较好是在规定位置具有选自赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基和二氨基丙酸残基(可通过交联剂容易地进行修饰的氨基酸残基)中的1个特定的氨基酸残基(较好是赖氨酸残基、天冬氨酸残基或谷氨酸残基,更好是赖氨酸残基),并且在除该规定位置以外的位置具有构成天然蛋白质的通常的20种氨基酸残基(较好是除赖氨酸残基、天冬氨酸残基和谷氨酸残基以外的17种氨基酸残基,更好是除赖氨酸残基以外的19种氨基酸残基)的变异。这样的规定位置无特别限定,可例举例如第1位、3位、6位、7位、13位、20位、24位、31位和32位。具有(a)和(b)的特性的上述氨基酸序列,维持第5位和第34位的2个半胱氨酸残基,这2个半胱氨酸残基可通过二硫键结合。对于SEQ ID NO:92的所述氨基酸序列具有90%以上的同一性的氨基酸序列可以是1~3个(较好是1或2个、更好是1个)氨基酸残基通过选自氨基酸残基的缺失、取代、添加及插入的1、2、3或4种变异(较好是取代)而改变。氨基酸残基的变异可被引入氨基酸序列中的1个区域,也可被引入多个不同的区域。

[1695] 更好是具有(a)和(b)的特性的上述氨基酸序列可以是以下的(c)或(d)。

[1696] (c)选自以下的(1)~(9)的氨基酸序列中的氨基酸序列:

[1697] (1) KNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:61);

[1698] (2) FNMQCQKRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:62);

[1699] (3) FNMQCQRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:63);

[1700] (4) FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC (SEQ ID NO:64);

[1701] (5) FNMQCQRRFYALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:65);

[1702] (6) FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC (SEQ ID NO:68);

[1703] (7) FNKQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:70);

[1704] (8) FNMQCCKRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC (SEQ ID NO:71);及

[1705] (9) FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC (SEQ ID NO:72);或者

[1706] (d)在上述(1)~(9)中的任一氨基酸序列中,在除1个赖氨酸残基和2个半胱氨酸残基以外的位置(例如第1位、3位、6位、7位、13位、20位、24位、31位和32位的位置),具有除赖氨酸残基以外的19种氨基酸残基的变异的对于上述(1)~(9)中的任一氨基酸序列具有90%以上的同一性(可以是如上所述的个数的氨基酸残基的修饰)的氨基酸序列。(d)的上述氨基酸序列较好是维持第5位和第34位的2个半胱氨酸残基,这2个半胱氨酸残基可通过二硫键结合。较好是具有(d)的上述氨基酸序列的亲中性肽可与本说明书中所记载的人IgG结合。

[1707] 上述亲中性肽只要对于SEQ ID NO:92的所述氨基酸序列或者上述(1)~(9)的氨基酸序列具有90%以上的同一性,除引入通过交联剂容易修饰的1个氨基酸残基以外,还可具有进一步的氨基酸残基的变异。对于可引入进一步的氨基酸变异的位置,只要是本领域技术人员,均可容易地鉴定。作为这样的位置,可利用例如除第5位和第34位的半胱氨酸残基以外的位置。例如,即使是第1位的苯丙氨酸残基、第6位的精氨酸残基、第13位的亮氨酸

残基、第20位的谷氨酸残基、第24位的天冬氨酸残基或第31位的精氨酸残基(已引入通过交联剂可容易地进行修饰的氨基酸残基的位置除外)也可利用。作为可通过进一步的氨基酸变异而引入的氨基酸,可例举例如丙氨酸(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)、甲硫氨酸(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)、及赖氨酸(L)。优选地,可利用除赖氨酸以外的这19种氨基酸。氨基酸为L体或D体中的任一种,但较好是L体(实施例中构成肽的氨基酸残基全部为L体)。

[1708] 对于SEQ ID NO:92的所述氨基酸序列或者(1)~(9)的所述氨基酸序列的同一性%的程度可如上所述确定。同一性%的程度可以为较好是92%以上、更好是94%以上、进一步更好是95%以上、特别好是97%以上(即,对于SEQ ID NO:92的氨基酸序列,仅具有选自赖氨酸残基、天冬氨酸残基、谷氨酸残基、2-氨基辛二酸残基和二氨基丙酸残基中的1个氨基酸残基的变异)。

[1709] 亲和性物质为肽的情况下,位于肽末端的氨基和羧基可被保护。作为N-末端氨基的保护基,可例举例如烷基羰基(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)。作为N-末端氨基的保护基,较好是乙酰基。作为C-末端羧基的保护基,可例举例如可形成酯或酰胺的基团。作为可形成酯或酰胺的基团,可例举例如烷氧基(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。作为C-末端羧基的保护基,较好是氨基。亲和性物质为包含2个以上的半胱氨酸残基的肽的情况下,可介以位于半胱氨酸残基的侧链的硫醇基形成二硫键。

[1710] 1-3.连接体(L)

[1711] 式(I)中,L为作为包含切割性部分的二价基团的切割性连接体。

[1712] 以L表示的切割性连接体为包含切割性部分的二价基团。切割性部分是可通过在不会引发蛋白质的变性、分解(例如酰胺键的断裂)的条件(温和条件)下的特定处理进行切割的位点。因此,切割性部分可以是通过在温和条件下的特定的切割处理进行切割的位点(除酰胺键以外的键)。作为这样的特定处理,可例举例如(a)采用选自酸性物质、碱性物质、还原剂、氧化剂、酶中的1种以上的物质的处理,(b)采用选自光的物理化学刺激的处理,或者(c)使用包含自体分解性的切割性部分的切割性连接体的情况下的放置。这样的切割性连接体及其切割条件是该领域的技术常识(例如G.Leriche,L.Chisholm,A.Wagner, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*.20,571(2012);Feng P.等,*Journal of American Chemical Society*.132,1500(2010).;Bessodes M.等,*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))。作为这样的切割性部分,可例举例如二硫残基、缩醛残基、缩酮残基、酯残基、氨甲酰基残基、烷氧基烷基残基、亚胺残基、叔烷基氧基氨基甲酸酯残基(例如叔丁基氧基氨基甲酸酯残基)、硅烷残基、含有脲的残基(例如脲残基、酰基脲残基、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、含有具有吸电子基团的芳环的残基、含有香豆素的残基、含有砜的残基、含有不饱和键的链残基、糖基残基。

[1713] 含有具有吸电子基团的芳环基较好是选自芳基、芳烷基、芳香族杂环基、具有芳香族杂环基的烷基中的具有芳环基的基团,更好是芳烷基、具有芳香族杂环基的烷基。吸电子基团较好是结合于环的2位。更优选地,含有具有吸电子基团的芳环的残基例如为在2位具有吸电子基团的芳烷基(例如苄基)。作为吸电子基团,可例举例如卤素原子、被卤素原子取代的烷基(例如三氟甲基)、硼酸残基、甲磺酰基、甲苯磺酰基、三氟甲磺酸盐或酯(三氟甲磺酰基)、硝基、氰基、苯基、酮基(例如酰基)。

[1714] 作为与切割性部分的残基的名称相关被用作接头词、接尾词等术语的烷基、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、例子及优选例与后述相同。

[1715] 作为酯残基,可例举例如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基氧基羰基)、芳基酯(例如苯甲酰甲基酯、2-(二苯基膦)苯甲酸酯)、糖基酯残基、原酸酯残基、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)、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)、活性酯残基(例如N-羟基琥珀酰亚胺残基)。

[1716] 作为含有砷的残基,可例举例如砷残基、喹啉基苯磺酸酯残基。

[1717] 硅烷残基较好是具有选自烷基、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,可例举例如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)、或者二芳基二烷氧基硅烷残基(例如二苯基二烷氧基硅烷)。

[1718] 作为烷氧基烷基(即,烷基氧基烷基)残基,是将后述的烷氧基和烷基组合而得的基团(烷氧基和烷基的定义、例子和优选例与前述相同),可例举例如甲氧基甲基残基、乙氧基甲基残基、甲氧基乙基残基、乙氧基乙基残基,但并不仅限于这些例子。

[1719] 含有不饱和键的链残基是包含仅由碳原子形成的不饱和键部分的残基(例如作为具有碳原子间双键的最小单元的乙烯基、或者作为具有碳原子间三键的最小单元的乙炔基)、或者包含由碳原子和杂原子(例如氮原子、硫原子、氧原子)形成的不饱和键部分(例如醛、氰基)的残基。作为含有不饱和键的链残基,可例举例如乙烯基醚残基、氰基乙基残基、乙烯残基、丙二醛残基。

[1720] 作为酸性物质(也称为亲电子试剂),可例举例如盐酸、硫酸、硝酸等无机酸性物质,以及甲酸、乙酸、4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪丙磺酸、3-吗啉丙磺酸、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,可例举例如烷氧基芳基烷基残基、叔烷基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、氨甲酰基残基、2-(二苯基膦)苯甲酸酯残基。

[1721] 作为碱性物质(也称为亲核试剂),可例举例如氢氧化钠、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,可例举例如硅烷残基、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。

[1722] 作为还原剂,可例举例如半胱氨酸、二硫苏糖醇、还原型谷胱甘肽、羟胺、 $\beta$ -巯基乙醇。作为可通过还原剂进行切割的位点,可例举例如二硫残基、烷氧基烷基残基、偶氮残基。

[1723] 作为氧化剂,可例举例如高碘酸钠、氧化型谷胱甘肽。作为可通过氧化剂进行切割的位点,可例举例如邻二醇残基、硒残基。

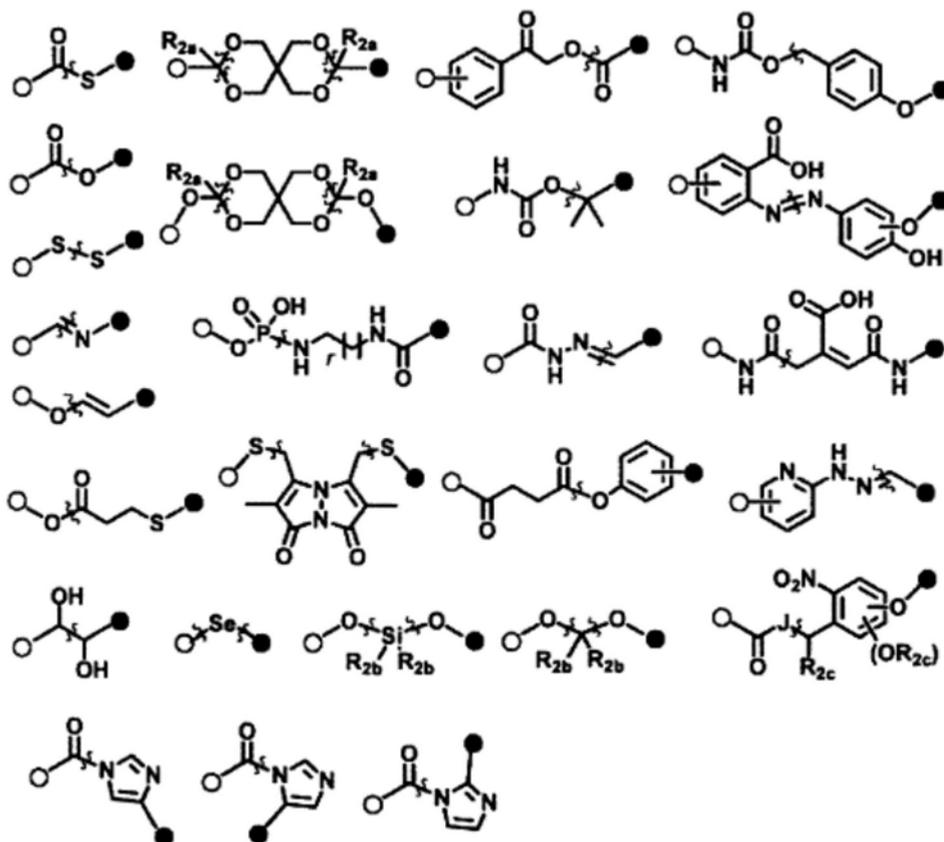
[1724] 作为酶,可例举例如胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、TEV、凝血酶、组织蛋白酶B、组织蛋白酶D、组织蛋白酶K、半胱天冬酶、蛋白酶、基质金属蛋白酶、脂肪酶、内切糖苷酶、肽N糖苷酶F(PNGase F)。作为可通过酶进行切割的位点(部位),可例举例如酯残基、磷酸二酯残基、糖基残基。

[1725] 作为可通过光进行切割的位点,可例举例如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、二硫代丙酸残基。

[1726] 作为自体分解性的切割性部分,可例举例如活性酯残基(例如N-羟基琥珀酰亚胺残基)。

[1727] 更具体来说,切割性部分可对应于选自下述组中的任一化学结构;

[1728] [化学式30]



[1730] 在此,与键正交的波浪线表示切割位点,

[1731] 多个R<sub>2a</sub>、多个R<sub>2b</sub>和多个R<sub>2c</sub>相同或不同,选自氢原子或后述的取代基,

[1732] J为-CH<sub>2</sub>-、-O-或-S-,

[1733] r为1~4的任意整数,

[1734] ○(白色圆)表示与A(或后述的La)结合的键,●(黑色圆)表示与B(或后述的Lb)结合的键,

[1735] 化学结构以切割位点为中心呈不对称的情况下,可以是●表示与A(或后述的La)结合的键,○表示与B(或后述的Lb)结合的键。

[1736] J为-CH<sub>2</sub>-、-O-或-S-。J较好是-CH<sub>2</sub>-或-O-,更好是-CH<sub>2</sub>-。

[1737] r为1~4的任意整数,较好是1~3的任意整数,更好是1或2。

[1738] 一个实施方式中,切割性连接体可以是

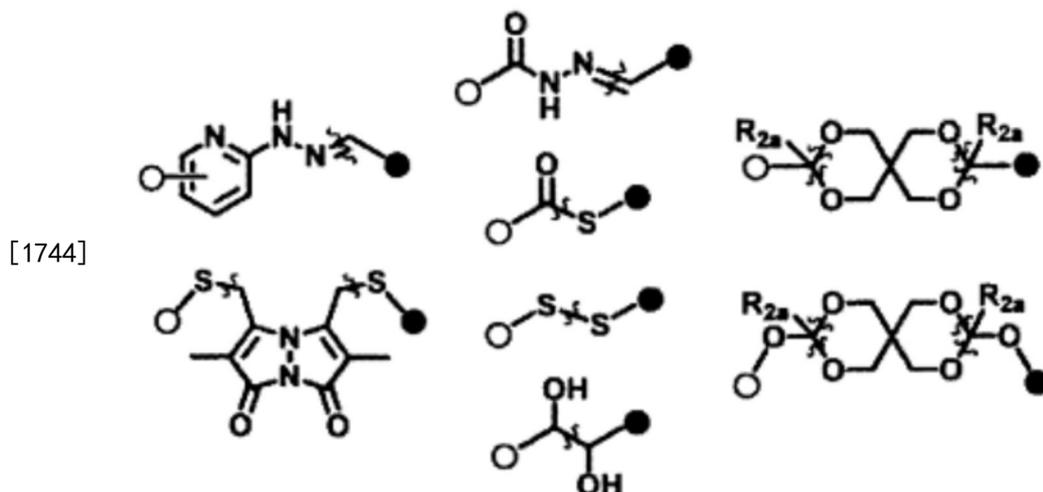
[1739] (i) 切割性连接体,该切割性连接体是包含切割性部分的二价基团,该切割性部分具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力;或者

[1740] (ii) 切割性连接体,该切割性连接体是包含切割性部分的二价基团,该切割性部分不具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力。

[1741] 作为(i)的切割性部分,可例举例如二硫残基、酯残基、缩醛残基、缩酮残基、亚胺残基、邻二醇残基。

[1742] 更具体来说,(i)的切割性部分可对应于例如选自下述组中的任一化学结构;

[1743] [化学式31]



[1745] 在此,与键正交的波浪线表示切割位点,

[1746] 多个R<sub>2a</sub>相同或不同,选自氢原子或者后述的取代基,

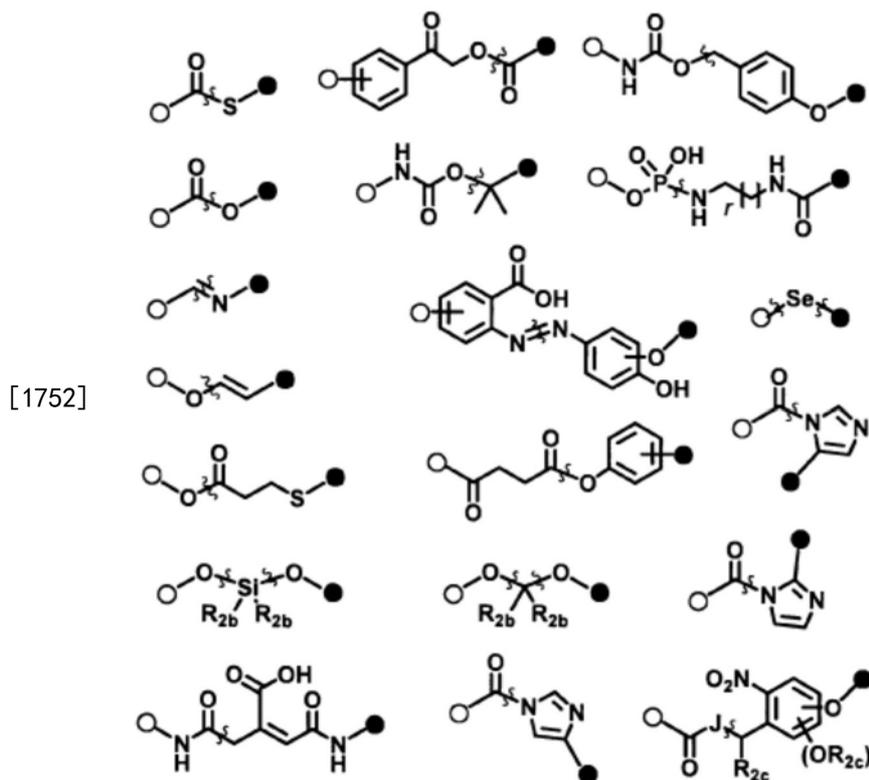
[1747] ○(白色圆)表示与A(或后述的La)结合的键,●(黑色圆)表示与B(或后述的Lb)结合的键,

[1748] 化学结构以切割位点为中心呈不对称的情况下,可以是●表示与A(或后述的La)结合的键,○表示与B(或后述的Lb)结合的键。

[1749] 作为(ii)的切割性部分,可例举例如酯残基、氨甲酰基残基、烷氧基烷基残基、亚胺残基、叔烷基氧基氨基甲酸酯残基、硅烷残基、含有胍的残基、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、含有具有吸电子基团的芳环的残基、含有香豆素的残基、含有砷的残基、含有不饱和键的链残基、糖基残基。

[1750] 更具体来说,(ii)的切割性部分可对应于例如选自下述组中的任一化学结构。

[1751] [化学式32]



[1753] 在此,与键正交的波浪线表示切割位点,

[1754] 多个 $R_{2b}$ 、多个 $R_{2c}$ 、 $J$ 、 $r$ 选自氢原子或后述的取代基,

[1755] ○(白色圆)表示与A(或后述的La)结合的键,●(黑色圆)表示与B(或后述的Lb)结合的键,

[1756] 化学结构以切割位点为中心呈不对称的情况下,可以是●表示与A(或后述的La)结合的键,○表示与B(或后述的Lb)结合的键。

[1757] 特定的实施方式中,切割性连接体(L)可由下述式(L1)~(L3)中的任一个表示;

[1758]  $La-C-Lb$  (L1)

[1759]  $La-C$  (L2)

[1760]  $C-Lb$  (L3)

[1761] 式中,

[1762] La和Lb分别为二价基团,

[1763] C为切割性部分。

[1764] 作为二价基团,可例举例如可具有取代基的二价烃基、可具有取代基的二价杂环基、 $-C(=O)-$ 、 $-NR_a-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(=S)-$ 、及它们中的2个以上(例如2~8、较好是2~6、更好是2~4)的组合, $R_a$ 表示氢原子或取代基。

[1765] 作为二价烃基,是直链、支链或环状的二价烃基,较好是直链或支链的二价烃基。作为二价烃基,可例举亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基。

[1766] 作为亚烷基,较好是碳原子数1~12的亚烷基,更好是碳原子数1~6的亚烷基,特别好是碳原子数1~4的亚烷基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。亚烷基可以是直链、支链或环状中的任一种,较好是直链的亚烷基。作为这样的亚烷基,可例举例如亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基。

[1767] 作为亚烯基,较好是碳原子数2~12的亚烯基,更好是碳原子数2~6的亚烯基,特别好是碳原子数2~4的亚烯基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。亚烯基可以是直链、支链或环状中的任一种,较好是直链的亚烯基。作为这样的亚烯基,可例举例如亚乙烯基、亚丙烯基、亚丁烯基、亚戊烯基、亚己烯基。

[1768] 作为亚炔基,较好是碳原子数2~12的亚炔基,更好是碳原子数2~6的亚炔基,特别好是碳原子数2~4的亚炔基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。亚炔基可以是直链、支链或环状中的任一种,较好是直链的亚炔基。作为这样的亚炔基,可例举例如亚乙炔基、亚丙炔基、亚丁炔基、亚戊炔基、亚己炔基。

[1769] 作为亚芳基,较好是碳原子数6~24的亚芳基,更好是碳原子数6~18的亚芳基,进一步更好是碳原子数6~14的亚芳基,再进一步更好是碳原子数6~10的亚芳基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。作为亚芳基,可例举例如亚苯基、亚萘基、亚蒽基。

[1770] 二价杂环基是二价芳香族杂环基或者二价非芳香族杂环基。作为构成杂环的杂原子,较好是包括选自氧原子、硫原子、氮原子、磷原子、硼原子和硅原子中的1种以上,更好是包括选自氧原子、硫原子和氮原子中的1种以上。

[1771] 作为二价芳香族杂环基,较好是碳原子数3~21的二价芳香族杂环基,更好是碳原子数3~15的二价芳香族杂环基,进一步更好是碳原子数3~9的二价芳香族杂环基,再进一步更好是碳原子数3~6的二价芳香族杂环基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。更具体来说,作为二价芳香族杂环基,可例举例如茚二基、吡咯二基、咪唑二基、噻吩二基、吡啶二基、哒嗪二基、嘧啶二基、吡嗪二基、三嗪二基、吡咯啉二基、哌啶二基、三唑二基、嘌呤二基、噻吩二基、呋啉二基、茚二基、喹啉二基及异喹啉二基。

[1772] 作为二价非芳香族杂环基,较好是碳原子数3~21的非芳香族杂环基,更好是碳原子数3~15的非芳香族杂环基,进一步更好是碳原子数3~9的非芳香族杂环基,再进一步更好是碳原子数3~6的非芳香族杂环基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。更具体来说,作为二价非芳香族杂环基,可例举例如吡咯二酮二基、吡咯啉二酮二基、氧杂环丙烷二基、氮丙啶二基、氮杂环丁烷二基、氧杂环丁烷二基、硫杂环丁烷二基、吡咯烷二基、二氢咪唑二基、四氢咪唑二基、二氧戊环二基、四氢噻吩二基、咪唑烷二基、噁唑烷二基、哌啶二基、二氢吡喃二基、四氢吡喃二基、四氢噻喃二基、吗啉二基、硫代吗啉二基、吡嗪二基、二氢噁嗪二基、四氢噁嗪二基、二氢嘧啶二基、及四氢嘧啶二基。

[1773] 以La和Lb表示的二价基团可具有例如1~5个、较好是1~3个、更好是1或2个取代基。这样的取代基与以上述R<sub>a</sub>和R<sub>b</sub>表示的取代基相同。作为这样的取代基,可例举例如以下的取代基:

[1774] (i) 卤素原子,

[1775] (ii) 一价烃基,

[1776] (iii) 芳烷基,

[1777] (iv) 一价杂环基,

[1778] (v) R<sub>c</sub>-O-, R<sub>c</sub>-C(=O)-, R<sub>c</sub>-O-C(=O)-或R<sub>c</sub>-C(=O)-O- (R<sub>c</sub>表示氢原子或一价烃基), 或者

[1779] (vi) NR<sub>d</sub>Re-, NR<sub>d</sub>Re-C(=O)-, NR<sub>d</sub>Re-C(=O)-O-或R<sub>d</sub>-C(=O)-NR<sub>e</sub>- (R<sub>d</sub>和R<sub>e</sub>相同或不同,表示氢原子或一价烃基),

- [1780] (vii) 硝基、硫酸基、磺酸基、氰基和羧基。
- [1781] 作为卤素原子,可例举例如氟原子、氯原子、溴原子、碘原子。
- [1782] 作为一价烃基,可例举例如一价链状烃基、一价脂环族烃基及一价芳烃基。
- [1783] 一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。其中,链状结构可以是直链状,也可以是支链状。作为一价链状烃基,可例举烷基、烯基、炔基。烷基、烯基及炔基可以是直链状或支链状中的任一种。
- [1784] 作为烷基,较好是碳原子数1~12的烷基,更好是碳原子数1~6的烷基,进一步更好是碳原子数1~4的烷基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数1~12的烷基,可例举例如甲基、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。
- [1785] 作为烯基,较好是碳原子数2~12的烯基,更好是碳原子数2~6的烯基,进一步更好是碳原子数2~4的烯基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数2~12的烯基,可例举例如乙烯基、丙烯基、正丁烯基。
- [1786] 作为炔基,较好是碳原子数2~12的炔基,更好是碳原子数2~6的炔基,进一步更好是碳原子数2~4的炔基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数2~12的炔基,可例举例如乙炔基、丙炔基、正丁炔基。
- [1787] 作为一价链状烃基,较好是烷基。
- [1788] 作为一价脂环族烃基,是指作为环结构仅含脂环族烃且不含芳环的烃基,脂环族烃可以是单环、多环中的任一种。其中,不需要仅由脂环族烃构成,其一部分可以包含链状结构。作为一价脂环族烃基,可例举例如环烷基、环烯基、环炔基,这些基团可以是单环、多环中的任一种。
- [1789] 作为环烷基,较好是碳原子数3~12的环烷基,更好是碳原子数3~6的环烷基,进一步更好是碳原子数5~6的环烷基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数3~12的环烷基,可例举例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基。
- [1790] 作为环烯基,较好是碳原子数3~12的环烯基,更好是碳原子数3~6的环烯基,进一步更好是碳原子数5~6的环烯基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数3~12的环烯基,可例举例如环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基。
- [1791] 作为环炔基,较好是碳原子数3~12的环炔基,更好是碳原子数3~6的环炔基,进一步更好是碳原子数5~6的环炔基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数3~12的环炔基,可例举例如环丙炔基、环丁炔基、环戊炔基、环己炔基。
- [1792] 作为一价脂环族烃基,较好是环烷基。
- [1793] 一价芳烃基是指含芳环结构的烃基。其中,不需要仅由芳环构成,其一部分可含链状结构或脂环族烃,芳环可以是单环、多环中的任一种。作为一价芳烃基,较好是碳原子数6~12的芳基,更好是碳原子数6~10的芳基,进一步更好是碳原子数6的芳基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。作为碳原子数6~12的芳基,可例举例如苯基、萘基。
- [1794] 作为一价芳烃基,较好是苯基。
- [1795] 其中,作为一价烃基,较好是烷基、环烷基、芳基,更好是烷基。
- [1796] 芳烷基是指芳基烷基。芳基烷基中的芳基和烷基的定义、例子和优选例如上所述。作为芳烷基,较好是碳原子数3~15的芳烷基。作为这样的芳烷基,可例举例如苯甲酰基、苯

乙基、萘甲基、萘乙基。

[1797] 一价杂环基是指从杂环式化合物的杂环除去1个氢原子而得的基团。一价杂环基是一价芳香族杂环基或者一价非芳香族杂环基。作为构成杂环基的杂原子,较好是包括选自氧原子、硫原子、氮原子、磷原子、硼原子和硅原子中的1种以上,更好是包括选自氧原子、硫原子和氮原子中的1种以上。

[1798] 作为一价芳香族杂环基,较好是碳原子数3~15的芳香族杂环基,更好是碳原子数3~9的芳香族杂环基,进一步更好是碳原子数3~6的芳香族杂环基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。作为一价芳香族杂环基,可例举例如茚基、吡咯基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、吡咯啉基、哌啶基、三唑基、嘌呤基、咪唑基、茚基、喹啉基及异喹啉基。

[1799] 作为一价非芳香族杂环基,较好是碳原子数3~15的非芳香族杂环基,更好是碳原子数3~9的非芳香族杂环基,进一步更好是碳原子数3~6的非芳香族杂环基。上述碳原子数不包括取代基的碳原子数。作为一价非芳香族杂环基,可例举例如氧杂环丙烷基、氮杂环丙烷基、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、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、吡嗪基、二氢噁嗪基、四氢噁嗪基、二氢嘧啶基及四氢嘧啶基。

[1800] 其中,作为一价杂环基,较好是5元或6元的杂环基。

[1801] 优选地,取代基可以是以下的基团:

[1802] (i') 卤素原子,

[1803] (ii') 碳原子数1~12的烷基、苯基或萘基,

[1804] (iii') 碳原子数3~15的芳烷基,

[1805] (iv') 5元或6元的杂环,

[1806] (v')  $R_c-O-$ 、 $R_c-C(=O)-$ 、 $R_c-O-C(=O)-$ 或 $R_c-C(=O)-O-$  ( $R_c$ 表示氢原子或碳原子数1~12的烷基),或者

[1807] (vi')  $NR_dR_e-$ 、 $NR_dR_e-C(=O)-$ 、 $NR_dR_e-C(=O)-O-$ 或 $R_d-C(=O)-NR_e-$  ( $R_d$ 和 $R_e$ 相同或不同,表示氢原子或碳原子数1~12的烷基),

[1808] (vii') 与上述(vii)列举的取代基相同的基团。

[1809] 更优选地,取代基可以是以下的基团:

[1810] (i'') 卤素原子,

[1811] (ii'') 碳原子数1~12的烷基,

[1812] (iii'')  $R_c-O-$ 、 $R_c-C(=O)-$ 、 $R_c-O-C(=O)-$ 或 $R_c-C(=O)-O-$  ( $R_c$ 表示氢原子或碳原子数1~12的烷基),或者

[1813] (iv'')  $NR_dR_e-$ 、 $NR_dR_e-C(=O)-$ 、 $NR_dR_e-C(=O)-O-$ 或 $R_d-C(=O)-NR_e-$  ( $R_d$ 和 $R_e$ 相同或不同,表示氢原子或碳原子数1~12的烷基),

[1814] (v'') 与上述(vii)列举的取代基相同的基团。

[1815] 进一步更优选地,取代基可以是以下的基团:

[1816] (i''') 卤素原子,

[1817] (ii''') 碳原子数1~6的烷基,

[1818] (iii''')  $R_c-O-$ 、 $R_c-C(=O)-$ 、 $R_c-O-C(=O)-$ 或 $R_c-C(=O)-O-$  ( $R_c$ 表示氢原子或碳原子

数1~6的烷基),或者

[1819] (iv'') NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-、NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-C(=O)-、NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-C(=O)-O-或R<sub>d</sub>-C(=O)-NR<sub>e</sub>- (R<sub>d</sub>和R<sub>e</sub>相同或不同,表示氢原子或碳原子数1~6的烷基),

[1820] (v'')与上述(vii)列举的取代基相同的基团。

[1821] 特别优选地,取代基可以是以下的基团:

[1822] (i''')卤素原子,

[1823] (ii''')碳原子数1~4的烷基,

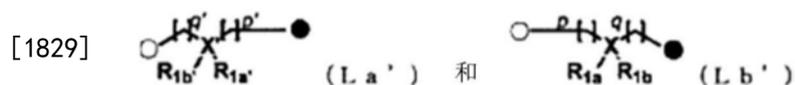
[1824] (iii''') R<sub>c</sub>-O-、R<sub>c</sub>-C(=O)-、R<sub>c</sub>-O-C(=O)-或R<sub>c</sub>-C(=O)-O- (R<sub>c</sub>表示氢原子或碳原子数1~4的烷基),或者

[1825] (iv''') NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-、NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-C(=O)-、NR<sub>d</sub>R<sub>e</sub>-C(=O)-O-或R<sub>d</sub>-C(=O)-NR<sub>e</sub>- (R<sub>d</sub>和R<sub>e</sub>相同或不同,表示氢原子或碳原子数1~4的烷基),

[1826] (v''')与上述(vii)列举的取代基相同的基团。

[1827] 特定的实施方式中,L<sub>a</sub>和L<sub>b</sub>可分别以下述(L<sub>a</sub>')和(L<sub>b</sub>')表示;

[1828] [化学式33]



[1830] 式中,

[1831] p和p'相同或不同,为0~10的任意整数,

[1832] q和q'相同或不同,为0~10的任意整数,

[1833] X和X'相同或不同,为碳原子、氮原子或单键(在此,X为氮原子的情况下,R<sub>1b</sub>不存在。X'为氮原子的情况下,R<sub>1b</sub>'不存在。X为单键的情况下,R<sub>1a</sub>和R<sub>1b</sub>不存在。X'为单键的情况下,R<sub>1a</sub>'和R<sub>1b</sub>'不存在),

[1834] R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a</sub>'和R<sub>1b</sub>'相同或不同,选自氢原子或者上述的取代基。

[1835] p和p'相同或不同,为0~10的任意整数,较好是0~8的整数,更好是0~6的整数,进一步更好是0~4的整数,特别好是0、1或2。较好是p和p'相同。

[1836] q和q'相同或不同,为0~10的任意整数,较好是0~8的整数,更好是0~6的整数,进一步更好是0~4的整数,特别好是0、1或2。较好是q和q'相同。

[1837] X和X'相同或不同,为碳原子、氮原子或单键,较好是碳原子或单键。较好是X和X'相同。

[1838] R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a</sub>'和R<sub>1b</sub>'相同或不同,选自氢原子或者后述的取代基。取代基的定义、例子和优选例如上所述。较好是R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a</sub>'和R<sub>1b</sub>'为氢原子。

[1839] 1-4. (a) 包含生物正交性官能团的二价基团或者 (b) 不含生物正交性官能团的二价基团(B)

[1840] 式(I)中,B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团。

[1841] 生物正交性官能团是指不会与生物构成成分(例如氨基酸、核酸、脂质、糖、磷酸)反应,或者对于生物构成成分的反应速度慢,但选择性地与除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周知(参照例如Sharpless K.B.等,Angew.Chem.Int.Ed.40,2004(2015);Bertozzi C.R.等,Science 291,2357(2001);

Bertozzi C.R.等,Nature Chemical Biology 1,13(2005))。

[1842] 亲和性物质的目标为可溶性蛋白质的情况下,生物正交性官能团是针对蛋白质的生物正交性官能团。针对蛋白质的生物正交性官能团是指,不与构成蛋白质的天然的20种氨基酸残基的侧链反应,与规定的官能团反应的基团。构成蛋白质的天然的20种氨基酸为丙氨酸(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)、甲硫氨酸(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)、及赖氨酸(L)。这些天然的20种氨基酸中,无侧链(即氢原子)的甘氨酸以及侧链为烃基(即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、苯丙氨酸及缬氨酸对于通常的反应为惰性。因此,针对蛋白质的生物正交性官能团是,对于“对于通常的反应为惰性的具有侧链的这些氨基酸的侧链”不会发生反应,并且对于天冬酰胺、谷氨酰胺、甲硫氨酸、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、组氨酸及赖氨酸的侧链也不会发生反应的官能团。

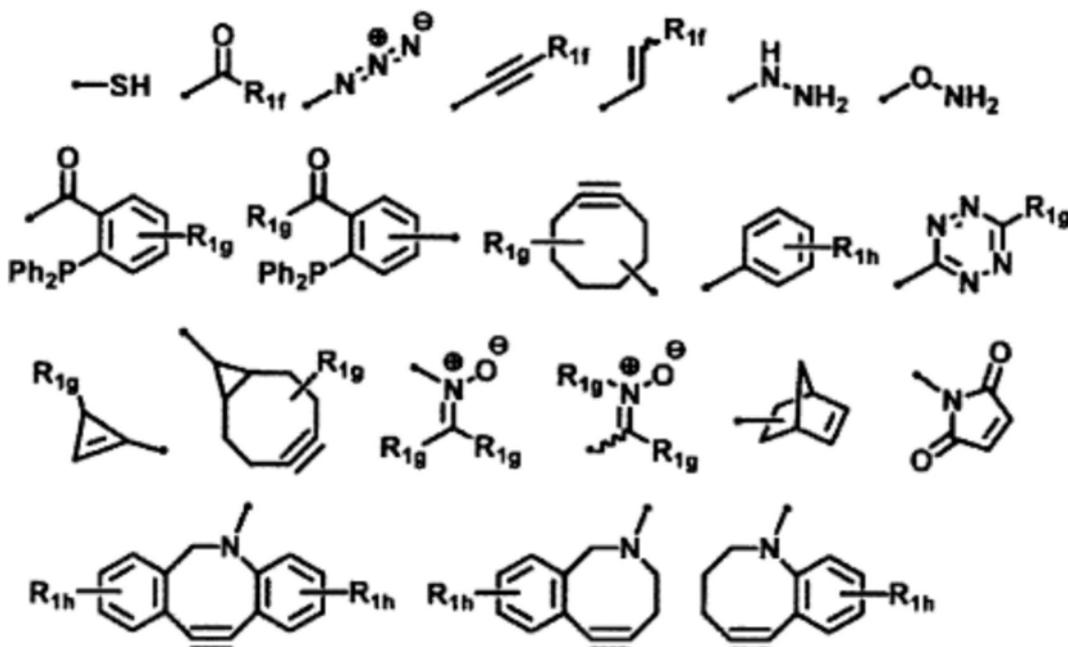
[1843] 作为对于蛋白质不会发生反应的这样的生物正交性官能团,可例举例如叠氮残基、醛残基、硫醇残基、炔烃残基(换言之,具有作为具有碳原子间双键的最小单元的乙烯基部分即可,下同)、炔烃残基(换言之,具有作为具有碳原子间三键的最小单元的乙炔基部分即可,下同)、卤素残基、四嗪残基、硝酮残基、羟胺残基、腈残基、肼残基、酮残基、硼酸残基、氰基苯并噻唑残基、烯丙基残基、膦残基、马来酰亚胺残基、二硫残基、硫酯基、 $\alpha$ -卤化羰基残基(例如在 $\alpha$ 位具有氟原子、氯原子、溴原子或碘原子的羰基残基,下同)、异腈残基、斯德酮残基、硒残基。作为蛋白质,存在可含游离的硫醇(thiol)(半胱氨酸)的蛋白质(例如除抗体以外的蛋白质)和不会含游离的硫醇的蛋白质(例如抗体)。不会含游离的硫醇的蛋白质中,硫醇可起到生物正交性官能团的作用。因此,作为亲和性物质的目标的可溶性蛋白质为不会含游离的硫醇的蛋白质(例如抗体)的情况下,较好是生物正交性官能团中含硫醇。此外,可溶性蛋白质为可含游离的硫醇的蛋白质(例如除抗体以外的蛋白质)的情况下,较好是生物正交性官能团中不含硫醇。可以是1种或2种以上(例如2种、3种、4种)生物正交性官能团包含于二价基团,较好是1种生物正交性官能团包含于二价基团。

[1844] 一个实施方式中,包含生物正交性官能团的二价基团可以是在主链中包含选自叠氮残基、醛基、硫醇残基、炔烃残基、烯炔残基、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、二硫残基、硫酯基、 $\alpha$ -卤化羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基中的生物正交性官能团的二价基团。

[1845] 另一个实施方式中,包含生物正交性官能团的二价基团可以是在侧链中包含选自叠氮残基、醛残基、硫醇残基、炔烃残基、烯炔残基、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、二硫残基、 $\alpha$ -卤化羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基中的生物正交性官能团的二价基团。

[1846] 更具体来说,生物正交性官能团可对应于选自下述组中的任一化学结构;

[1847] [化学式34]



[1849] 式中，

[1850]  $R_{1f}$ 、一个或多个 $R_{1g}$ 和一个或多个 $R_{1h}$ 相同或不同，为选自所述(i)~(vii)中的原子或基团、或者吸电子基团，

[1851] • 表示键。

[1852] 作为吸电子基团，可例举例如上述的例子，较好是卤素原子、硼酸残基、甲磺酰基、甲苯磺酰基、三氟甲磺酸盐或酯。

[1853] 一个实施方式中，B可以是(a)包含生物正交性官能团的二价基团。二价基团所含的生物正交性官能团的数量为一个或多个，例如为1~5个，较好是1~3个，更好是1或2个，进一步更好是1个。二价基团所含的生物正交性官能团的数量为多个的情况下，多个生物正交性官能团可以为同种，也可以为不同，但从采用简单的结构的观点来看，较好是同种。

[1854] 特定的实施方式中，B可以是(a1)主链中包含生物正交性官能团的二价基团。主链中包含生物正交性官能团的二价基团为，将选自叠氮残基、醛基、硫醇残基、炔烃残基、烯烃残基、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、二硫残基、硫酸基、 $\alpha$ -卤化羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基中的生物正交性官能团作为二价基团的基团，或者在这样的二价生物正交性官能团的任一侧的末端或两端连接有上述的二价基团的基团。所连接的二价基团的定义、例子和优选例与上述的二价基团相同。

[1855] 另一特定的实施方式中，B可以是(a2)侧链中包含生物正交性官能团的二价基团。侧链中包含生物正交性官能团的二价基团为，被选自叠氮残基、醛残基、硫醇残基、炔烃残基、烯烃残基、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、二硫残基、 $\alpha$ -卤化羰基残基、异腈残基、斯德酮残基、硒残基中的生物正交性官能团或者包含其的基团取代的二价基团。所取代的二价基团的定义、例子和优选例与上述的二价基团相同。

[1856] 另一个实施方式中，B可以是(b)不含生物正交性官能团的二价基团。这样的二价基团可以是可取代的亚烷基、可取代的亚环烷基、可取代的芳基、可取代的二价杂环基、-

NR<sub>a</sub>- (R<sub>a</sub>表示氢原子或取代基)、-O-及由这些基团中的2个以上(例如2~8个、较好是2~6个、更好是2~4个)组合而形成的基团。可取代的情况下的取代基及R<sub>a</sub>的取代基为除生物正交性官能团以外的取代基。作为这样的取代基,可例举例如烷基、环烷基、芳烷基、一价杂环基、羟基、氨基、烷基氧基(烷氧基)、环烷氧基、芳烷氧基。这样的取代基的数量例如为1~5个,较好是1~3个,更好是1或2个,进一步更好是1个。

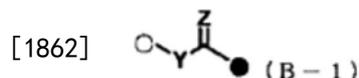
[1857] 对于除生物正交性官能团以外的取代基,烷基、环烷基、芳烷基、一价杂环基的定义、例子和优选例如上所述。

[1858] 对于除生物正交性官能团以外的取代基,烷基氧基(烷氧基)中的烷基、环烷氧基中的环烷基和芳烷氧基中的芳烷基的定义、例子和优选例如上所述。更具体来说,作为烷氧基,可例举例如甲氧基、乙氧基、丙氧基(例如正丙氧基、异丙氧基)、丁氧基(例如正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基)、戊氧基(例如正戊氧基)、己氧基(例如正己氧基)。作为环烷氧基,可例举例如环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基。作为芳烷氧基,可例举例如苯甲酰氧基、苯乙氧基、萘甲氧基、萘乙氧基。

[1859] 不含生物正交性官能团的二价基团还可以是对反应高度惰性的基团。因此,这样的二价基团可以是仅由碳原子和氢原子构成的基团。这样的二价基团是亚烷基、亚环烷基或芳基以及这些基团中的2个以上(例如2或3个)组合而形成的基团。不含生物正交性官能团的二价基团为对反应高度惰性的基团的情况下,这样的二价基团,作为对反应高度惰性的取代基可具有选自亚烷基、亚环烷基和芳基中的取代基。对反应高度惰性的取代基的数量例如为1~5个,较好是1~3个,更好是1或2个。

[1860] 特定的实施方式中,B可以下述式(B-1)表示;

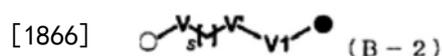
[1861] [化学式35]



[1863] 式中,

[1864] Y为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或下述式(B-2),

[1865] [化学式36]



[1867] (式中,

[1868] V和V'相同或不同,为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或单键,

[1869] V1为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[1870] s为0~10的任意整数,

[1871] 式(B-2)中的○和●的取向分别为与式(B-1)中的○和●的取向相同),

[1872] Z为氧原子、硫原子或氢原子(Z为氢原子的情况下,-C(=Z)-表示-CH<sub>2</sub>-),

[1873] 式(B-1)中的○(白色圆)表示与L侧的部分结合的键,●(黑色圆)表示与R侧的部分结合的键。

[1874] Y为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或以上述式(B-2)表示的基团。从结构简化等观点来看,Y可以是-NH-、-O-或-CH<sub>2</sub>-。或者,从以碳原子为基调的结构的设计等观点来看,Y可以是-CH<sub>2</sub>-或以上述式(B-2)表示的基团。

[1875] Z为氧原子、硫原子或氢原子,较好是氧原子或硫原子。

[1876] V和V'为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或单键,较好是-CH<sub>2</sub>-或单键。

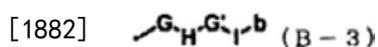
[1877] V1为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团。这样的二价基团与上述的基团相同。

[1878] 较好是V1中的二价基团为可取代的二价烃基或者可取代的二价杂环基。二价烃基的定义、例子及优选例与上述相同,V1的情况下,较好是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、亚芳基。例如,未被含有生物正交性官能团的部分取代的情况下,较好是亚烯基、亚炔基、亚环烯基、亚环炔基。另一方面,被含有生物正交性官能团的部分取代的情况下,较好是亚烷基、亚环烷基、亚芳基。这些基团的例子和优选例如上所述。二价杂环基的定义、例子及优选例与上述相同,V1的情况下,较好是5元或6元的杂环基。5元或6元的杂环基的例子及优选例与上述相同。取代基的定义、例子和优选例如上所述。V1可具有例如1~5个、较好是1~3个、更好是1或2个、进一步更好是1个的(a)生物正交性官能团。二价基团所含的生物正交性官能团的数量为多个的情况下,多个生物正交性官能团可以为同种,也可以不同。从采用简单的结构和提高反应性等观点来看,较好是同种。从确保差异化的反应等观点来看,较好是不同。V1还可具有1~5个、较好是1~3个、更好是1或2个的(b)取代基。

[1879] s为0~10的任意整数,较好是0~8的整数,更好是0~6的整数,进一步更好是0~4的整数,特别好是0、1或2。

[1880] 另外,特定的实施方式中,V1可以是具有以下述式(B-3)表示的基团作为侧链的二价基团;

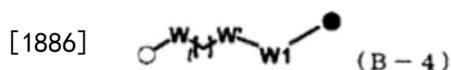
[1881] [化学式37]



[1883] 式中,

[1884] G和G'相同或不同,为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-、单键或以下述式(B-4)表示的基团,

[1885] [化学式38]



[1887] (式(B-4)中,

[1888] W和W'相同或不同,为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或单键,

[1889] W1为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[1890] t为0~10的任意整数,

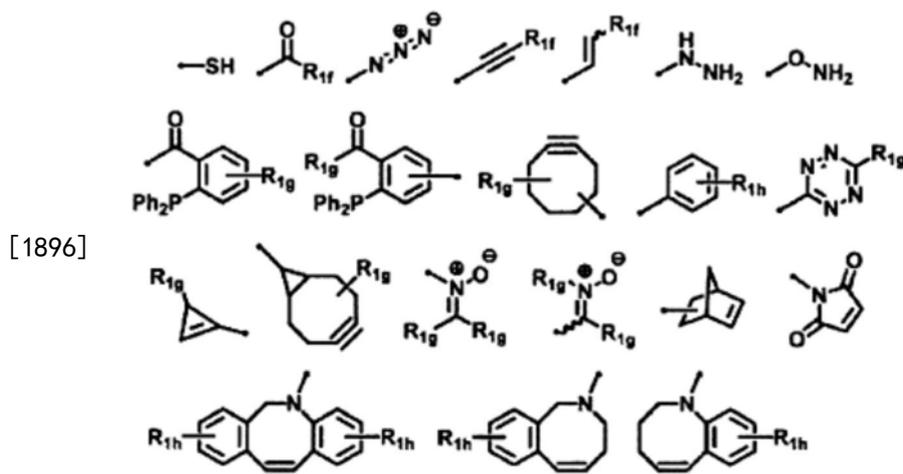
[1891] 式(B-4)中的○(白色圆)表示对于式(B-3)中键(•)的方向的键,●(黑色圆)表示对于b侧的方向的键;)

[1892] H为-CH<sub>2</sub>-、-C=O-、-C=S-、-NH-或单键;

[1893] I为二价烃基、二价杂环或单键;

[1894] b为下述所示的任一基团,

[1895] [化学式39]



[1897] (式中,

[1898] R<sub>1f</sub>、一个或多个R<sub>1g</sub>和一个或多个R<sub>1h</sub>相同或不同,为选自所述(i)~(vii)中的原子或基团、或者吸电子基团,

[1899] • 表示键)。这样的二价基团是二价烃基或二价杂环基,较好是可取代的二价烃基,更好是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基或亚芳基,进一步更好是亚烷基、亚环烷基或亚芳基,特别好是亚烷基。这些基团的例子和优选例如上所述。这些基团可被除上述侧链以外的取代基取代。这样的取代基的数量为1~5个,较好是1~3个,更好是1或2个。取代基的例子和优选例如上所述。

[1900] G和G'相同或不同,为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-、单键或以上述式(B-4)表示的基团。从结构简化等观点来看,G和G'可以是-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或单键。或者,从以碳原子为基调的结构的设计等观点来看,G和G'可以是-CH<sub>2</sub>-、单键或者以上述式(B-4)表示的基团。

[1901] H为-CH<sub>2</sub>-、-C=O-、-C=S-、-NH-或单键。较好是H为-CH<sub>2</sub>-或单键。

[1902] I为二价烃基、二价杂环或单键。二价烃基和二价杂环可被取代基取代,也可未被取代。二价烃基、二价杂环和取代基的定义、例子及优选例与以上的V1中记载的相同。

[1903] W和W'相同或不同,为-NH-、-O-、-CH<sub>2</sub>-或单键,较好是-CH<sub>2</sub>-或单键。

[1904] W1为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团。这样的二价基团与上述的基团相同。

[1905] t为0~10的任意整数,较好是0~8的整数,更好是0~6的整数,进一步更好是0~4的整数,特别好是0、1或2。

[1906] 1-5. 反应性基团(R)

[1907] 式(I)中,R为针对可溶性蛋白质的反应性基团。这样的反应性基团在该技术领域是技术常识。

[1908] 反应性基团是与生物正交性官能团同种或不同的基团。

[1909] 例如,B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团的情况下,反应性基团可以是与该生物正交性官能团不同的基团。这是因为如果反应性基团是与生物正交性官能团同种的基团,则无法确保针对可溶性蛋白质的反应性基团的反应特异性。此外,其原因是,原本生物正交性官能团就是不与构成可溶性蛋白质的天然的20种氨基酸残基的侧链反应的基团。

[1910] 更具体来说,构成蛋白质的如上所述的天然的20种氨基酸中,无侧链的甘氨酸以及侧链为烃基的丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸及缬氨酸对于通常的反应为惰性。因



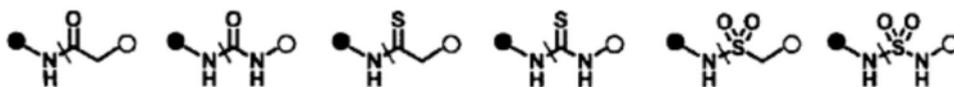
[1926]  $R_{5b}$ 为吸电子基团。作为这样的吸电子基团,可例举例如上述的基团,较好是卤素原子、硼酸残基、甲磺酰基、甲苯磺酰基、三氟甲磺酸盐或酯。

[1927]  $j$ 为1~5的任意整数,较好是1~3的整数,更好是1或2。

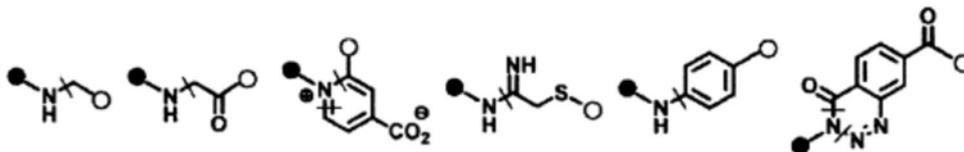
[1928]  $k$ 为1~4的任意整数,较好是1~3的整数,更好是1或2。

[1929] 通过“作为对于赖氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团的上述化学结构”与“存在于赖氨酸残基的侧链中的氨基( $NH_2$ )”之间的反应而生成的连接部分,可对应于选自下述组中的任一化学结构;

[1930] [化学式41]



[1931]

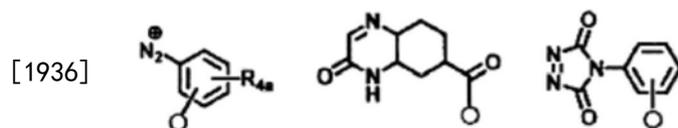


[1932] 在此,●(黑色圆)表示与T侧的部分结合的键,○(白色圆)表示与B侧的部分结合的键,与键正交的直线表示通过反应而生成的键。

[1933] 对于酪氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团是可与存在于酪氨酸残基的侧链中的酚式羟基(OH)的邻位原子特异性反应的基团,可例举例如重氮残基、偶氮二甲酸酯残基、2,3-二氢-1H-吡嗪-6-酮残基。

[1934] 更具体来说,对于酪氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团可对应于选自下述组中的任一化学结构;

[1935] [化学式42]

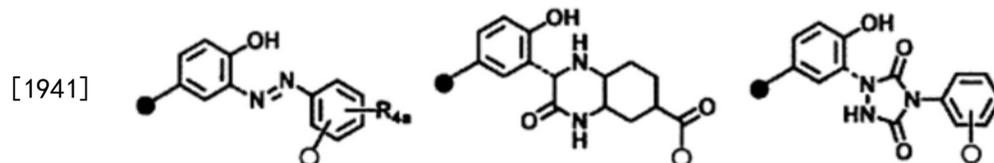


[1937] 在此, $R_{4a}$ 为氢原子或上述的取代基,○表示与B结合的键。

[1938]  $R_{4a}$ 为氢原子或上述的取代基。取代基的定义、例子和优选例与上述相同。

[1939] 通过“作为对于酪氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团的上述化学结构”与“存在于酪氨酸残基的侧链中的酚式羟基(OH)的邻位原子”之间的反应而生成的连接部分,可对应于选自下述组中的任一化学结构;

[1940] [化学式43]



[1942] 在此, $R_{4a}$ 为氢原子或上述的取代基,●表示与T结合的键,○表示与B结合的键。

[1943]  $R_{4a}$ 为氢原子或上述的取代基。取代基的定义、例子和优选例与上述相同。

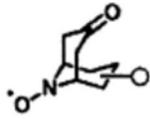
[1944] 对于色氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团是可与存在于色氨酸残基的侧链中的吲哚基的3位的成环原子特异性反应的基团,可例举例如9-氮杂双环[3.3.1]壬-3-

酮-N-氧基自由基残基。

[1945] 更具体来说,对于色氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团可对应于选自下述组中的任一化学结构;

[1946] [化学式44]

[1947]

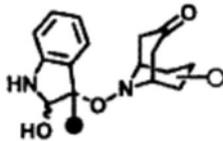


[1948] 在此,○表示与B结合的键。

[1949] 通过“作为对于色氨酸残基的侧链具有特异性的反应性基团的上述化学结构”与“存在于色氨酸残基的侧链中的吲哚基的3位的成环原子”之间的反应而生成的连接部分,可对应于选自下述组中的任一化学结构;

[1950] [化学式45]

[1951]



[1952] 在此,●表示与T结合的键,○表示与B结合的键。

[1953] 特别好地,反应性基团可以是对于赖氨酸的侧链具有特异性的反应性基团。

[1954] 1-6. 部分结构“L-B”

[1955] 1-6-1. 连接A和R的部分结构“L-B”中的主链的长度

[1956] 式(I)中,连接A(亲和性物质)和R(反应性基团)的主链(L-B中的直链部分)的长度,可根据可溶性蛋白质和亲和性物质的种类及可溶性蛋白质中的亲和性物质的目标部位与R欲反应结合的如上所述的靶区(例如特定位置)中的特定氨基酸残基的位置及数量的关系等各种因素而适当进行设计。关于以式(I)表示的化合物,亲和性物质与可溶性蛋白质缔合,接着,介以L-B与亲和性物质共价结合的反应性基团通过与存在于上述目标部位附近的特定氨基酸残基的侧链中的基团(例如赖氨酸残基的侧链中的氨基)反应,从而与可溶性蛋白质共价结合。这时,R欲反应结合的特定氨基酸残基的附近区域、上述目标部位的附近区域、及该特定氨基酸残基与上述目标部位之间的区域中不另外存在该特定氨基酸残基的情况下,即使不严格控制主链的长度,反应性基团也可与该特定氨基酸侧链区域选择性地结合。当然,即使是这样的区域中另外存在该特定氨基酸残基的情况下,通过控制主链的长度,反应性基团也可与该特定氨基酸残基区域选择性地结合。

[1957] 连接A和R的主链的长度可根据可溶性蛋白质及针对其的亲和性物质的种类、以及可溶性蛋白质中的目标部位中的特定氨基酸残基的位置及数量的关系等各种因素而改变,但可以是约5Å以上,较好是约7.5Å以上,更好是约10.5Å以上。这样的主链的长度例如为约30Å以下,较好是约23Å以下,更好是约16.5Å以下。更具体来说,这样的主链的长度例如为约5.0~30Å,较好是约7.5~23Å,更好是约10.5~16.5Å。

[1958] 另外,关于原子间的长度(距离)的关系,如下表所示的内容为该技术领域中的技术常识。因此,如果是本领域技术人员,可将下表的原子间的长度作为参考,适当设计具有与如上所述的主链的长度(Å)对应的个数的原子的主链。

[1959] [表1]

[1960] 表1. 直链亚烷基中的两末端的碳原子间的长度(距离)的关系

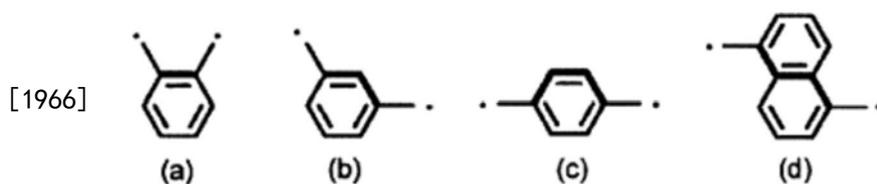
	长度 (Å)
直链亚烷基	
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> (C 2)	约 1.5
CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> (C 3)	约 3.0
C 4	约 4.5
C 5	约 6.0
[1961] C 6	约 7.5
C 7	约 9.0
C 8	约 10.5
C 9	约 12.0
C 10	约 13.5
直链亚烯基	
CH=CH	约 1.5

[1962] 更具体来说,连接A和R的主链的长度也可作为构成主链(除氢原子及取代基外)的原子数规定。构成主链的原子数例如可以是4个(约5.0Å)以上,较好是6个(约7.5Å)以上,更好是8个(约10.5Å)以上。此外,主链的原子数例如可以是20个(约30Å)以下,较好是16个(约23Å)以下,更好是12个(约16.5Å)以下。更具体来说,主链的原子数例如可以是4~20个,较好是6~16个,更好是8~12个。

[1963] 主链为不含环结构的结构的情况下,主链的原子数可通过计数链状结构中的原子数来决定。

[1964] 另一方面,主链为含环结构的结构的情况下,主链的原子数与上述的长度并不一定对应,存在可根据主链的原子数规定的长度比上述的长度短的倾向。即使是这样的情况下,从规定主链的长度的观点来看,可简便地计数主链的原子数。具体来说,这样的情况下的主链的原子数可通过在主链中不含二价环结构的链状结构中的原子数的基础上,再计数连通环结构中的2个键的最短路径的原子数来决定(参照例如以下的(a)~(d)中的粗体路径)。

[1965] [化学式46]



[1967] • 表示键。

[1968] (a)的情况下,最短路径为粗体(粗体字)路径,因此作为主链的原子数计数的二价环结构中的原子数为2。

[1969] (b)的情况下,最短路径为粗体路径,因此作为主链的原子数计数的二价环结构中的原子数为3。

[1970] (c)的情况下,所有路径均为最短路径(等距离),因此作为主链的原子数计数的二价环结构中的原子数为4。

[1971] (d)的情况下,耦合部位的路径为最短路径,因此作为主链的原子数计数的二价环结构中的原子数为4。

[1972] 优选地,以L-B表示的A与R的连接部分(不包括侧链)可以是不含二价环结构的链状结构。该情况下,可按照以L-B表示的A与R的连接链部分中不含二价环基的条件适当设计L和B。

[1973] 1-6-2. 部分结构“L-B”的具体结构

[1974] 上述式(I)中,L和B为可相互关联的结构。因此,上述式(I)中,L和B可作为以“L-B”表示的部分结构规定。

[1975] 一个实施方式中,切割性连接体可以是(i)作为包含具有通过切割在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力的切割性部分的二价基团的切割性连接体、或者(ii)作为包含不具有通过切割在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力的切割性部分的二价基团的切割性连接体。

[1976] 特定的实施方式中,L为上述(i)的切割性连接体的情况下,B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团。

[1977] 优选地,L为上述(i)的切割性连接体的情况下,B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团。该情况下,(i)中所生成的生物正交性官能团与(a)中的生物正交性官能团可以为同种,也可以不同。从采用更简单的结构和/或提高对于单一的功能性物质的反应性等观点来看,(i)中所生成的生物正交性官能团可与(a)中的生物正交性官能团同种。另一方面,从确保对于2种以上的功能性物质的差别化的反应性和不使用反应中的部分生物正交性官能团等观点来看,(i)中所生成的生物正交性官能团可与(a)中的生物正交性官能团不同。

[1978] 或者,L为上述(i)的切割性连接体的情况下,B可以是(b)不含生物正交性官能团的二价基团。该情况下,以式(I)表示的化合物或其盐具有更简单的结构,所以合成容易。

[1979] 在另一特定的实施方式中,L为上述(ii)的切割性连接体的情况下,B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团。

[1980] 特定的实施方式中,以L-B表示的部分结构较好是不含肽部分。该情况下,使用本发明的化合物得到的本发明的具有功能性物质的可溶性蛋白质(例如抗体药物复合物)具有不会包含可具有免疫原性的肽部分作为连接体的优点。

[1981] 特定的实施方式中,以“L-B”表示的部分结构,可将存在于连接A和R的主链(L-B中的直链部分)的中心位置的原子(例如构成主链的原子数为奇数的情况)、或者存在于该主链的中心位置的结合部位(例如构成主链的原子数为偶数的情况)作为基准,具有对称结构[例如顺式(即,Z)、反式(即,E)]。例如,也可将存在于中心位置的结合部位设计为如上所述的切割连接体中的切割性部分。以“L-B”表示的部分结构具有对称结构的情况下,以“L-B”表示的部分结构可容易地合成。例如,可通过使在一侧末端具有能够反应而形成切割性部分的官能团的同样的二价基团(例如在一侧末端具有SH基的链状二价基团)相互反应,从而实现在主链的中心位置包含切割性部分的对称结构(链状的二价基团-S-S-链状的二价基团)。

[1982] 因此,以“L-B”表示的部分结构可以是以“B2-L'-B1”表示的部分结构(即,L为以B2-L'表示的二价基团,B为B1)。该情况下,以上述式(I)表示的化合物可规定为以下述式(I')表示的化合物;

[1983]  $A-B2-L'-B1-R$  (I')

[1984] 式中,

[1985] A和R与所述式(I)的A和R相同,

[1986] L'为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[1987] B1和B2相同或不同,为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[1988] B1和B2可具有以L'为中心的对称结构。

[1989] B1和B2相同或不同,与B的定义、例子和优选例相同。

[1990] 特定的实施方式中,L'可以下述式(L1')~(L3')中的任一个表示;

[1991]  $La'-C'-Lb'$  (L1')

[1992]  $La'-C'$  (L2')

[1993]  $C'-Lb'$  (L3')

[1994] 式中,

[1995]  $La'$ 和 $Lb'$ 分别为二价基团,

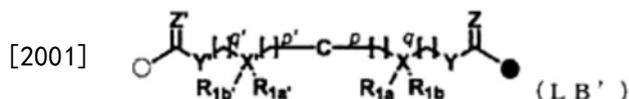
[1996]  $C'$ 为切割性部分。

[1997] 以 $La'$ 和 $Lb'$ 表示的二价基团分别与以 $La'$ 和 $Lb'$ 表示的二价基团的定义、例子和优选例相同。

[1998] 以 $C'$ 表示的切割性部分与以 $C$ 表示的切割性部分的定义、例子和优选例相同。

[1999] 另一特定的实施方式中,以L-B表示的结构单元可以下述式(LB')表示;

[2000] [化学式47]



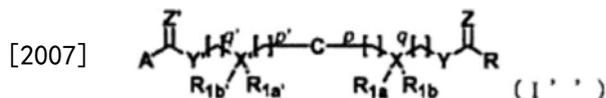
[2002] 式中,

[2003]  $C$ 、 $p$ 、 $p'$ 、 $q$ 、 $q'$ 、 $X$ 、 $X'$ 、 $R_{1a}$ 、 $R_{1a}'$ 、 $R_{1b}$ 、 $R_{1b}'$ 、 $Y$ 、 $Y'$ 、 $Z$ 和 $Z'$ 的定义、例子和优选例与上述相同,

[2004] ○(白色圆)表示与A结合的键,●(黑色圆)表示与R结合的键。

[2005] 因此,上述式(I)可规定为下述式(I'');

[2006] [化学式48]



[2008] 式中,

[2009]  $A$ 、 $R$ 、 $C$ 、 $p$ 、 $p'$ 、 $q$ 、 $q'$ 、 $X$ 、 $X'$ 、 $R_{1a}$ 、 $R_{1b}$ 、 $R_{1a}'$ 、 $R_{1b}'$ 、 $Y$ 、 $Y'$ 、 $Z$ 和 $Z'$ 的定义、例子和优选例与上述相同。

[2010] 上述式(LB')和(I'')中,从 $C=Z$ 中的C(碳原子)至 $C=Z'$ 中的C(碳原子)的长度与连接A和R的主链的长度相同。这些式中,从 $C=Z$ 中的C至 $C=Z'$ 中的C的长度也可按照构成连接 $C=Z$ 中的C至 $C=Z'$ 中的C的部分结构的连接链(除氢原子及取代基外)的原子数规定。这样的原子数与构成连接A和R的主链的原子数相同。连接 $C=Z$ 中的C至 $C=Z'$ 中的C的部分结构的连接链(除氢原子及取代基外)可包含环结构,也可不包含环结构,但较好是不包含环结构。该连接链(除氢原子及取代基外)可优选不含肽部分。

[2011] 1-8. 制造方法

[2012] 包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐可适当地进行制备。包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物以式(I)、较好是式(I')、更好是式(I'')表示。

[2013] 作为亲和性物质,可适当选择具有任意的官能团的物质。因此,通过利用可与该官能团反应的反应性基团,使亲和性物质与以L-B-R表示的结构单元、或者以R-L-B-R表示的结构单元(2个反应性基团相同或不同)反应,可制备以A-L-B-R表示的结构单元。例如,这样的反应可在适当的反应体系、例如有机溶剂体系或水溶液体系中,在适当温度(例如约15~200℃)下进行。反应体系可包含适当的催化剂。反应时间例如为1分钟~20小时,较好是10分钟~15小时,更好是20分钟~10小时,进一步更好是30分钟~8小时。

[2014] 反应体系中,以L-B-R表示的结构单元、或者以R-L-B-R表示的结构单元(Y)相对于亲和性物质(X)的摩尔比(Y/X),根据该结构单元及亲和性物质的种类、要通过该结构单元修饰的亲和性物质中的部位的数量等而变动,所以无特别限定,例如为0.1~50,较好是0.5~40,更好是1~35,进一步更好是2~25,特别好是3~15。

[2015] 包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质和切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的生成的确认,虽也依赖于其具体的原料及产物的分子量,但可通过例如电泳法、色谱法(例如凝胶过滤层析法、离子交换色谱法、反相柱色谱法、HPLC)或质谱分析进行,较好是通过质谱分析进行。包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐可通过色谱法(例如上述的色谱法及亲和色谱法)等任意的适当纯化。

[2016] 1-9.其他

[2017] 后述的发明[例如式(II)~(v)及其下位概念的式以及部分结构式(例如(L1)~

[2018] (L3)、(La')、(Lb')、(B-1)~(B-4))表示的发明]中,任意的符号(例如A、L、B、R)、以该符号表示的术语及它们的详细说明(例如定义、例子及优选例)与以上述式(I)表示的化合物或其盐的发明共通。此外,对于可规定后述发明的特定部分(例如切割性部分、具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力的部分)、特定基团(例如生物正交性官能团、二价基团、烷基、取代基、吸电子基团)及特定数值、以及盐等的任意的技术要素(例如定义、例子及优选例),也可与上文中说明的内容共通。因此,在无特别说明的情况下,这些事项可在后述的发明中适当援引。同样地,后述的发明中记述的特定的发明的技术要素可作为本发明及其他发明的技术要素适当援引。

[2019] 2.包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐

[2020] 2-1.概要

[2021] 本发明提供以式(II)表示的包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐;

[2022] A-L-B-R'-T (II)

[2023] 式中,

[2024] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[2025] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[2026] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[2027] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[2028] T为可溶性蛋白质。

[2029] 2-2. 通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分(R')

[2030] 通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分中,可溶性蛋白质及反应性基团的定义、例子及优选例如上所述。通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分在该技术领域为技术常识,可根据可溶性蛋白质及反应性基团的种类适当决定。

[2031] 优选地,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分是通过可溶性蛋白质所含的14种氨基酸(天冬酰胺、谷氨酰胺、甲硫氨酸、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、组氨酸及赖氨酸)中的任意1种氨基酸的侧链与针对其的反应性基团之间的反应而生成的部分。

[2032] 更优选地,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,可以是赖氨酸、酪氨酸、色氨酸或半胱氨酸中的任意1种氨基酸的侧链与对其具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分。

[2033] 进一步更优选地,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,可以是赖氨酸、酪氨酸或色氨酸中的任意1种氨基酸的侧链与对其具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分。作为通过赖氨酸、酪氨酸或色氨酸中的任意1种氨基酸的侧链与对其具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分,可例举例如上述“1-5. 反应性基团(R)”中记述的连接部分和/或化学结构。

[2034] 再进一步更优选地,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,可以是赖氨酸或酪氨酸的侧链与对其具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分(特别是可溶性蛋白质为人IgG1等人IgG的情况)。作为通过赖氨酸或酪氨酸的侧链与对其具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分,可例举例如上述“1-5. 反应性基团(R)”中记述的连接部分和/或化学结构。

[2035] 特别优选地,通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分可以是赖氨酸的侧链与对其具有特异性的反应性基团之间的反应而生成的部分。

[2036] 2-3. 部分结构“L-B”

[2037] 部分结构“L-B”的详细内容如上述“1-6. 部分结构‘L-B’”所述。

[2038] 特定的实施方式中,以“L-B”表示的部分结构可以是以“B2-L'-B1”表示的部分结构(即,L为以B2-L'表示的二价基团,B为B1)。该情况下,以上述式(II)表示的包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐可以下述式(II')表示;

[2039]  $A-B2-L'-B1-R'-T$  (II')

[2040] 式中,

[2041] A、R'和T与所述式(II)中相应符号的含义相同,

[2042] L'为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

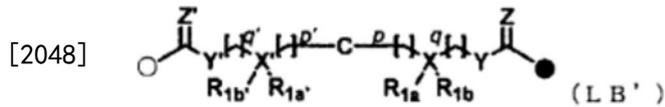
[2043] B1和B2相同或不同,为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[2044] B1和B2可具有以L'为中心的对称结构。

[2045] 上述式(II')中,L'可以上述的式(L1')~(L3')中的任一个表示。

[2046] 另一特定的实施方式中,以L-B表示的结构单元可以下述式(LB')表示;

[2047] [化学式49]



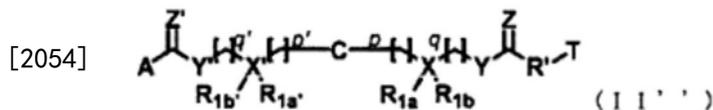
[2049] 式中,

[2050] C、p、p'、q、q'、X、X'、R<sub>1a</sub>、R<sub>1a'</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1b'</sub>、Y、Y'、Z和Z'的定义、例子和优选例与上述相同,

[2051] ○(白色圆)表示与A结合的键,●(黑色圆)表示与R'结合的键。

[2052] 因此,上述式(II)可规定为下述式(II'');

[2053] [化学式50]



[2055] 式中,

[2056] A、R'、T、C、p、p'、q、q'、X、X'、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a'</sub>、R<sub>1b'</sub>、Y、Y'、Z和Z'的定义、例子和优选例与上述相同。

[2057] 上述式(LB')和(II'')中,从C=Z中的C(碳原子)至C=Z'中的C(碳原子)的长度与如上所述的连接A和R的主链的长度相同。这些式中,从C=Z中的C至C=Z'中的C的长度也可按照构成连接C=Z中的C至C=Z'中的C的部分结构的连接链(除氢原子及取代基外)的原子数规定。这样的原子数与构成连接A和R的主链的原子数相同。连接C=Z中的C至C=Z'中的C的部分结构的连接链(除氢原子及取代基外)可包含环结构,也可不含环结构,但较好是不含环结构。该连接链(除氢原子及取代基外)可优选不含肽部分。

[2058] 2-4.可溶性蛋白质所具有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的结合部位(区域选择性)

[2059] 除可溶性蛋白质以外的部分结构(例如A-L-B-R')可区域选择性地与可溶性蛋白质(T)中的如上所述的靶区结合。

[2060] 本说明书中,“区域选择性地”或“区域选择性”是指,尽管可溶性蛋白质中特定氨基酸残基未集中存在于特定区域,可与可溶性蛋白质中的特定氨基酸残基结合的规定的结构单元集中存在于可溶性蛋白质中的特定区域。因此,“区域选择性地具有”、“区域选择性的结合”、“基于区域选择性的结合”等与区域选择性相关的表述是指,“包含1个以上的特定氨基酸残基的靶区中的规定的结构单元的保有率或结合率”以显著的水平高于“包含与靶区中的该特定氨基酸残基同种的多个氨基酸残基的非靶区中的该结构单元的保有率或结合率”。这样的区域选择性的结合或保有,可通过能够使规定的结构单元不随机与可溶性蛋白质中的特定氨基酸残基反应,而使规定的结构单元优先与可溶性蛋白质中的靶区中的特定氨基酸残基反应的本发明来实现。

[2061] 具体来说,T在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基的情况下,除可溶性蛋白质以外的部分结构可按照30%以上的区域选择性与该靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基结合。靶区及区域选择性的定义、例子和优选例如上所述。

[2062] 2-5.可溶性蛋白质所具有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数

[2063] 可溶性蛋白质(T)所保有的除可溶性蛋白质以外的部分结构(例如A-L-B-R')的个数可变化。例如,T为包含多个单体蛋白质的多聚体蛋白质的情况下,T可在多个单体蛋白质中对应的多个靶区中具有除T以外的部分结构。因而,T可具有多个除T以外的部分结构。因此,以式(II)、(II')或(II'')表示的结构表示T可具有1个或多个除T以外的部分结构。T所具有的除T以外的部分结构的个数可通过适当设定可溶性蛋白质的种类及可溶性蛋白质与其引入的结构单元的反应比例等条件来进行调节。这样的个数也根据可溶性蛋白质的种类而不同,例如可以是1~8个,较好是1~4个,更好是1或2个。

[2064] 特定的实施方式中,可溶性蛋白质所保有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数,在可溶性蛋白质为由多个单体蛋白质构成的多聚体蛋白质的情况下,可以是多个。如果采用本发明,可对于多个单体蛋白质的同一靶区引入多个除可溶性蛋白质以外的部分结构。

[2065] 优选的实施方式中,可溶性蛋白质可以是包含多个重链的抗体。抗体的定义、例子和优选例如上所述。重链的个数根据抗体的种类而不同。例如,IgG、IgE和IgD可具有2个重链。IgA可具有2个或4个重链。IgM可具有8个重链。抗体(可溶性蛋白质)所保有的除抗体以外的部分结构的个数,可作为与DAR同义的参数进行考虑。本发明中,抗体所保有的除抗体以外的部分结构的个数,对于IgG、IgE和IgD可以是1个或2个(较好是2个),对于IgA可以是1~4个(较好是4个),对于IgM可以是1~8个(较好是8个)。

[2066] 2-6. 制造方法

[2067] 本发明提供包括以下工序的包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的制造方法:

[2068] (A1) 使包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应,生成包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序。

[2069] 包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物以式(I)、较好是式(I')、更好是式(I'')表示。包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质以式(II)、较好是式(II')、更好是式(II'')表示。

[2070] 包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐具有反应性基团,因此可与可溶性蛋白质反应。这样的反应可在不会引发蛋白质的变性、分解(例如酰胺键的断裂)的条件(温和条件)下适当进行。例如,这样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℃)下进行。缓冲液的pH例如为5~9,较好是5.5~8.5,更好是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,较好是10分钟~15小时,更好是20分钟~10小时,进一步更好是30分钟~8小时。关于这样的反应的详细内容,参照例如G. J. L. Bernardes等, Chem. Rev., 115, 2174 (2015); G. J. L. Bernardes等, Chem. Asian. J., 4, 630 (2009); B. G. Davies等, Nat. Commun., 5, 4740 (2014); A. Wagner等, Bioconjugate. Chem., 25, 825 (2014)。

[2071] 反应体系中,包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐(Y)相对于可溶性蛋白质(X)的摩尔比(Y/X),根据包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物和可溶性蛋白质(例如抗体)的种类、欲通过包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物进行修饰的可

溶性蛋白质中的位点的数量(例如DAR)等而变动,无特别限定,例如为0.1~100,较好是0.5~80,更好是1~70、进一步更好是2~50,特别好是3~30。

[2072] 包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质和切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的生成的确认,虽也依赖于其具体的原料及产物的分子量,但可通过例如电泳法、色谱法(例如凝胶过滤层析法、离子交换色谱法、反相柱色谱法、HPLC)或质谱分析进行,较好是通过质谱分析进行。区域选择性的确认例如可通过肽谱(peptide mapping)进行。关于肽谱,例如可通过蛋白酶(例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶)处理和质谱分析进行。作为蛋白酶,较好是胞内蛋白酶。作为这样的胞内蛋白酶,可例举例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、Glu-C、Lys-N、Lys-C、Asp-N。可溶性蛋白质所具有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数的确认可通过例如电泳法、色谱法或质谱分析进行,较好是通过质谱分析进行。包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐可通过色谱法(例如上述的色谱法及亲和色谱法)等任意的适当纯化。

[2073] 3. 具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐

[2074] 3-1. 概要

[2075] 本发明提供以式(III)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐。

[2076] 以式(III)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐;

[2077]  $A-L-B'(-F)-R'-T$  (III)

[2078] 式中,

[2079] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[2080] L为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[2081] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[2082] F为功能性物质,

[2083] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[2084] T为可溶性蛋白质。

[2085] 式(III)或其他式中,R'不为F,与B'共价结合。

[2086] 3-2. 功能性物质(F)

[2087] 作为功能性物质,只要是赋予可溶性蛋白质以任意功能的物质,则无特别限定,可例举例如药物、标记物质、稳定剂,较好是药物或标记物质。此外,功能性物质可以是单一的功能性物质,或者也可以是2个以上的功能性物质连接而成的物质。

[2088] 作为药物,可以是针对任意疾病的药物。作为这样的疾病,可例举例如癌症(例如肺癌、胃癌、大肠癌、胰腺癌、肾脏癌、肝癌、甲状腺癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫癌、骨癌、皮肤癌、脑肿瘤、黑色素瘤)、自身免疫疾病及炎症疾病(例如过敏性疾病、风湿性关节炎、全身性红斑狼疮)、脑神经疾病(例如脑梗塞、阿尔茨海默氏症、帕金森氏症、肌肉萎缩性侧索硬化症)、感染症(例如细菌感染症、病毒感染症)、遗传性疾病及罕见疾病(例如遗传性球形红细胞增多症、非营养不良性肌强直综合征)、眼部疾病(例如老年性黄斑变性、糖尿病

性视网膜病变、视网膜色素变性)、骨科及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、紫斑症)、其他疾病(例如糖尿病、高脂血症等代谢异常疾病、肝脏疾病、肾脏疾病、肺疾病、循环系统疾病、消化系统疾病)。可溶性蛋白质为针对规定疾病的目标蛋白质的抗体的情况下,药物可以是与该规定疾病相关的药物(例如治疗该规定疾病的药物、缓和伴随针对该规定疾病的目标蛋白质的抗体的使用的副作用的药物)。

[2089] 更具体来说,药物为抗癌剂。作为抗癌剂,可例举例如化疗剂、毒素、放射性同位素或包含其的物质。作为化疗剂,可例举例如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,可例举例如细菌毒素(例如白喉毒素)、植物毒素(例如蓖麻毒素)。作为放射性同位素,可例举例如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 $^{35}\text{S}$ )、钷的放射性同位素(例如 $^{90}\text{Y}$ )、铊的放射性同位素(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 $^{186}\text{Re}$ )、砒的放射性同位素(例如 $^{211}\text{At}$ )、铋的放射性同位素(例如 $^{212}\text{Bi}$ )。

[2090] 作为标记物质,可例举例如酶(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(例如荧光素、水母发光蛋白(aequorin)、吖啶酯(Acridium ester)、三(2,2'-联吡啶)钌、鲁米诺)、放射性同位素(例如上述的放射性同位素)或含其的物质。

[2091] 此外,功能性物质为高分子化合物、中分子化合物或低分子化合物,较好是低分子化合物。低分子化合物是指分子量1500以下的化合物。低分子化合物为天然化合物或合成化合物。低分子化合物的分子量可以是1200以下、1000以下、900以下、800以下、700以下、600以下、500以下、400以下或300以下。此外,低分子化合物的分子量可以是30以上、40以上或50以上。低分子化合物可以是如上所述的药物或标记物质。此外,作为低分子化合物,可例举例如氨基酸、寡肽、维生素、核苷、核苷酸、低聚核苷酸、单糖、寡糖、脂质、脂肪酸及它们的盐。

[2092] 3-3. 包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团(B')

[2093] B'除了(a)的生物正交性官能团与功能性物质反应以外,与上述的B中的(a)包含生物正交性官能团的二价基团相同。因此,B'中的二价基团及正交性官能团的定义、例子及优选例与B中相同。

[2094] 功能性物质具有与其结构相应的各种官能团。功能性物质具有易与生物正交性官能团反应的官能团的情况下,可使功能性物质的该官能团与生物正交性官能团适当反应。易与生物正交性官能团反应的官能团可根据生物正交性官能团的具体种类而不同。如果是本领域技术人员,可适当选择适当的官能团作为易与生物正交性官能团反应的官能团。作为易与生物正交性官能团反应的官能团,例如生物正交性官能团为硫醇基的情况下可例举马来酰亚胺及二硫醚,生物正交性官能团为炔烃的情况下可例举叠氮,生物正交性官能团为醛或酮的情况下可例举肼,但并不仅限于这些。

[2095] 另一方面,功能性物质不具有易与生物正交性官能团反应的官能团的情况下,作

为功能性物质,可使用通过衍生物化而具有所期望的官能团的物质。例如,功能性物质为可溶性蛋白质的情况下,可使用通过衍生物化而具有可溶性蛋白质天然不具有的官能团的物质。该情况下,可溶性蛋白质的衍生物化可通过本发明的方法进行。该情况下,可将通过衍生物化而区域选择性地具有所期望的生物正交性官能团的可溶性蛋白质用作功能性物质。

[2096] 衍生物化为该领域中的技术常识(例如国际公开第2004/010957号、美国专利申请公开第2006/0074008号说明书、美国专利申请公开第2005/0238649号说明书)。例如,衍生物化可使用如上所述的交联剂进行。或者,衍生物化可使用具有所期望的官能团的特定连接体进行。例如,这样的连接体可以是能在适当的环境(例如细胞内或细胞外)通过连接体的切割而将功能性物质与可溶性蛋白质分离的基团。作为这样的连接体,可例举例如通过特定的蛋白酶[例如,细胞内蛋白酶(例如溶酶体或者核内体中存在的蛋白酶)、细胞外蛋白酶(例如分泌性蛋白酶)]分解的肽基连接体(例如美国专利第6214345号;Dubowchik等, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123(1999))、可在存在于生物体内的局部酸性部位被切割的连接体(例如美国专利第5622929号、美国专利第5122368号、美国专利第5824805号)。连接体可以是自解构的(self-immolative)(例如国际公开第02/083180号、国际公开第04/043493号、国际公开第05/112919号)。本发明中,衍生物化的功能性物质也可简称为“功能性物质”。

[2097] 包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团中,功能性物质及生物正交性官能团的定义、例子及优选例如上所述。通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分在该技术领域为技术常识,可根据功能性物质(功能性物质被衍生物化的情况下为其衍生物化部分)和生物正交性官能团的种类适当决定。

[2098] 包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团无特别限定,例如可以是包含选自二硫残基、缩醛残基、缩酮残基、酯残基、氨甲酰基残基、烷氧基烷基残基、亚胺残基、叔烷基氧基氨基甲酸酯残基、硅烷残基、含有腈的残基、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、含有具有吸电子基团的芳环的残基、含有香豆素的残基、含有砷的残基、含有不饱和键的链残基、糖基残基中的残基的二价基团。

[2099] 此外,包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团并非特别限定,可以是包含与选自下述组的任一化学结构对应的残基的二价基团;

[2100] [化学式51]



[2114] 式中,

[2115] A、R'和T与所述式(III)中的相应符号含义相同,

[2116] L'为切割性连接体,该切割性连接体为包含切割性部分的二价基团,

[2117] B1'和B2'相同或不同,为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[2118] F1和F2相同或不同,为功能性物质,

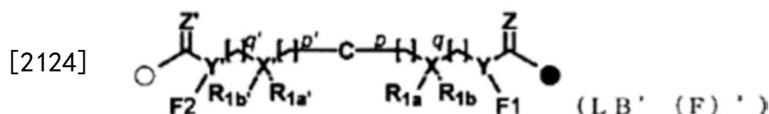
[2119] B1'(-F1)和B2'(-F2)可具有以L'为中心的对称结构。

[2120] B1'和B2'相同或不同,与B'的定义、例子和优选例相同。

[2121] 上述式(III')中,L'可以上述的式(L1')~(L3')中的任一个表示。

[2122] 另一特定的实施方式中,以L-B'(-F)表示的结构单元可以下述式(LB'(F)')表示;

[2123] [化学式52]



[2125] 式中,

[2126] C、F1、F2、p、p'、q、q'、X、X'、R1a、R1a'、R1b、R1b'、Z和Z'的定义、例子和优选例与上述相同,

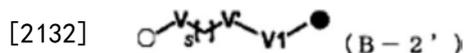
[2127] Y和Y'相同或不同,为从所述式(B-1)的Y除去1个氢原子而得的残基,

[2128] ○(白色圆)表示与A结合的键,●(黑色圆)表示与R'结合的键。

[2129] 更具体来说,Y和Y'中的从所述式(B-1)的Y除去1个氢原子而得的残基为-N(-)-、-CH(-)-或从上述式(B-2)除去1个氢原子而得的基团。从结构简化等观点来看,Y可以是-N(-)-或-CH(-)-。或者,从以碳原子为基调的结构的设计等观点来看,Y可以是-CH(-)-或从上述式(B-2)除去1个氢原子而得的基团。

[2130] 从上述式(B-2)除去1个氢原子而得的基团是从下述式(B-2')除去1个氢原子而得的基团;

[2131] [化学式53]



[2133] 式中,

[2134] V和V'相同或不同,为-NH-、-O-、-CH2-或单键,

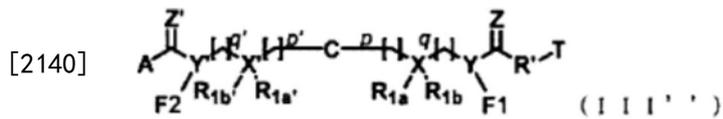
[2135] V1为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[2136] s为0~10的任意整数,

[2137] 式(B-2')中的○和●的取向分别为与式(B-1)中的○和●的取向相同。式(B-2')中的s的定义、例子和优选例与式(B-2)相同。因此,式(B-2')中,V和V'中的一方可以是-N(-)-或-CH(-)-。或者,式(B-2')中,V1可以从上述(a)或(b)的二价基团除去1个氢原子而得的3价基团。或者,式(B-2')中,s个-CH2-中的1个可以是-CH(-)-。

[2138] 该情况下,上述式(III)可规定为下述式(III'');

[2139] [化学式54]



[2141] 式中,

[2142] A、R、C、F1、F2、p、p'、q、q'、X、X'、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、R<sub>1a'</sub>、R<sub>1b'</sub>、Y、Y'、Z和Z'的定义、例子和优选例与上述相同。

[2143] 上述式(LB'(F'))和(III'')中,从C=Z中的C(碳原子)至C=Z'中的C(碳原子)的长度与如上所述的连接A和R的主链的长度相同。这些式中,从C=Z中的C至C=Z'中的C的长度也可按照构成连接C=Z中的C至C=Z'中的C的部分结构的连接链(除氢原子及取代基外)的原子数规定。这样的原子数与构成连接A和R的主链的原子数相同。连接C=Z中的C至C=Z'中的C的部分结构的连接链(除氢原子及取代基外)可包含环结构,也可不含环结构,但较好是不含环结构。该连接链(除氢原子及取代基外)可优选不含肽部分。

[2144] 3-5.可溶性蛋白质所具有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的结合部位(区域选择性)

[2145] 除可溶性蛋白质以外的部分结构(例如A-L-B'(-F)-R')可区域选择性地与可溶性蛋白质(T)中的如上所述的靶区结合。具体来说,T在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基的情况下,除可溶性蛋白质以外的部分结构可按照30%以上的区域选择性与该靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基结合。靶区及区域选择性的定义、例子和优选例如上所述。

[2146] 3-6.可溶性蛋白质所具有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数

[2147] 可溶性蛋白质(T)所保有的除可溶性蛋白质以外的部分结构(例如A-L-B'(-F)-R')的个数可变化。例如,T为包含多个单体蛋白质的多聚体蛋白质的情况下,T可在多个单体蛋白质中的对应的多个靶区中具有除T以外的部分结构。因而,T可具有多个除T以外的部分结构。因此,以式(III)、(III')或(III'')表示的结构,表示T可具有1个或多个除T以外的部分结构。T所具有的除T以外的部分结构的个数可通过适当设定可溶性蛋白质的种类及可溶性蛋白质与其引入的结构单元的反应比例等条件来进行调节。这样的个数也根据可溶性蛋白质的种类而不同,例如可以是1~8个,较好是1~4个,更好是1或2个。

[2148] 特定的实施方式中,可溶性蛋白质所保有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数,在可溶性蛋白质为由多个单体蛋白质构成的多聚体蛋白质的情况下,可以是多个。如果采用本发明,可对于多个单体蛋白质的同一靶区引入多个除可溶性蛋白质以外的部分结构。

[2149] 优选的实施方式中,可溶性蛋白质可以是包含多个重链的抗体。抗体的定义、例子和优选例如上所述。本发明中,抗体所保有的除抗体以外的部分结构的个数,对于IgG、IgE和IgD可以是1个或2个(较好是2个),对于IgA可以是1~4个(较好是4个),对于IgM可以是1~8个(较好是8个)。

[2150] 3-7.制造方法

[2151] 本发明提供包括以下工序的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的制造方法:

[2152] (B1) 使包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序。

[2153] 包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质以式(II)、较好是式(II')、更好是式(II'')表示。包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物以式(III)、较好是式(III')、更好是式(III'')表示。

[2154] 包括针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐具有可与功能性物质反应的生物正交性官能团,因此可与功能性物质反应。这样的反应可在如上述“2-6. 制造方法”中所述的不会引发蛋白质的变性、分解(例如酰胺键的断裂)的条件(温和条件)下适当进行。

[2155] 反应体系中,功能性物质(Y)相对于包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐(X)的摩尔比(Y/X),根据可溶性蛋白质(例如抗体)及功能性物质的种类、欲通过功能性物质进行修饰的可溶性蛋白质中的部位的数量(例如DAR)等而变动,无特别限定,例如为0.1~100,较好是0.5~80,更好是1~70、进一步更好是2~50,特别好是3~30。

[2156] 包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的生成的确认,虽也依赖于其具体的原料及产物的分子量,但可通过例如电泳法、色谱法(例如凝胶过滤层析法、离子交换色谱法、反相柱色谱法、HPLC)或质谱分析进行,较好是通过质谱分析进行。区域选择性的确认、除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数的确认及纯化,可通过上述“2-6. 制造方法”中所述的方法适当进行。

[2157] 此外,本发明还提供包括以下工序的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的制造方法:

[2158] (B2) 使包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应,生成包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序;以及

[2159] (B3) 使包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序。

[2160] 上述(B2)的工序可与上述“2-6. 制造方法”中所述的上述(A1)的工序同样地进行。上述(B3)的工序可与上述(B1)的工序同样地进行。上述(B2)和(B3)的工序可分别进行。或者,上述(B2)和(B3)的工序可根据作为可溶性蛋白质中的反应目标的特定氨基酸残基与反应性基团的反应对、以及功能性物质中的官能团与生物正交性官能团的反应对的组合而同时进行。

[2161] 4. 具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐

[2162] 4-1. 制造方法的概要

[2163] 本发明提供以式(IV)表示的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法;

[2164] L1-B-R'-T (IV)

[2165] 式中,

[2166] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团，

[2167] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团，

[2168] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分，

[2169] T为可溶性蛋白质。

[2170] 4-2. (i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团(L1)

[2171] 式(IV)中,L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团。这样的一价基团是可通过作为如上所述的包含切割性部分的二价基团的切割性连接体的切割而生成的一价基团。因此,L1可以是可通过如上所述的切割性部分的残基或化学结构的切割而生成的一价基团。更具体来说,(i')包含生物正交性官能团的一价基团可以是能通过上述的“(i)作为包含具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力的切割性部分的二价基团的切割性连接体”的切割而生成的一价基团,(ii')不含生物正交性官能团的一价基团可以是能通过“(ii)作为包含不具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力的切割性部分的二价基团的切割性连接体”的切割而生成的一价基团。

[2172] 特定的实施方式中,L1可以下述式(L1-1)或(L1-2)中的任一个表示；

[2173] C1-Lb (L1-1)

[2174] C1 (L1-2)

[2175] 式中，

[2176] Lb为二价基团，

[2177] C1为生物正交性官能团、或者除生物正交性官能团以外的基团。

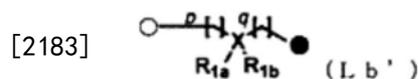
[2178] 作为二价基团,可例举例如可具有取代基的二价烃基、可具有取代基的二价杂环基、-C(=O)-、-NR<sub>a</sub>-、-O-、-S-、-C(=S)-、及这些基团中的2个以上(例如2~8、较好是2~6、更好是2~4)组合而成的基团,R<sub>a</sub>表示氢原子或取代基。二价烃基、二价杂环基和取代基的定义、例子及优选例与如上所述。

[2179] 生物正交性官能团的定义、例子和优选例如上所述。

[2180] 作为除生物正交性官能团以外的基团,可例举例如与上述的取代基中除生物正交性官能团以外的基团。作为除生物正交性官能团以外的这样的基团,可例举例如烷基、环烷基、芳烷基、一价杂环基、羟基、氨基、烷基氧基(烷氧基)、环烷氧基、芳烷氧基。对于这些基团及这些基团的构成要素(例如烷基氧基(烷氧基)中的烷基、环烷氧基中的环烷基和芳烷氧基中的芳烷基)的定义、例子和优选例,与上述相同。

[2181] 特定的实施方式中,Lb可以下述式(Lb')表示；

[2182] [化学式55]



[2184] 式中，

[2185] p为0~10的任意整数，

- [2186]  $q$ 为0~10的任意整数,
- [2187]  $X$ 为碳原子、氮原子或单键,在此, $X$ 为氮原子的情况下, $R_{1b}$ 不存在, $X$ 为单键的情况下, $R_{1a}$ 和 $R_{1b}$ 不存在,
- [2188]  $R_{1a}$ 和 $R_{1b}$ 相同或不同,选自氢原子或者上述的取代基,
- [2189] ○(白色圆)表示与C1结合的键,●(黑色圆)表示与B结合的键。
- [2190]  $p$ 、 $q$ 和 $X$ 以及 $R_{1a}$ 和 $R_{1b}$ (取代基)的定义、例子和优选例如上所述。
- [2191] 4-3. 部分结构“L1-B”
- [2192] 4-3-1. 连接L1末端部分和R'的部分结构“L1-B”的长度
- [2193] 式(IV)中,连接通过切割生成的L1末端部分(或C1末端部分)和R'的部分结构(“L1-B”中的直链部分)的长度(或者,不仅限于式(IV)等特定式的、区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐中的、连接生物正交性官能团和特定氨基酸残基的侧链的主链的原子数。下同),可根据如上述“1-6-1. 连接A和R的部分结构‘L-B’中的主链的长度”所述的各种因素而适当地进行设计。
- [2194] 连接通过切割生成的L1末端部分(或C1末端部分)和R'的部分结构的长度例如为约2.5Å以上,较好是约4Å以上,更好是约5Å以上。此外,部分结构的长度例如为约15Å以下,较好是约12Å以下,更好是约8Å以下。更具体来说,部分结构的长度例如为约2.5~15Å,较好是约4~12Å,更好是约5~8Å。
- [2195] 更具体来说,连接通过切割生成的L1末端部分(或C1末端部分)和R'的部分结构的长度也可按照构成部分结构的连接链(除氢原子及取代基外)的原子数规定。构成连接链的原子数例如可以是2个(约2.5Å)以上,较好是3个(约4Å)以上,更好是4个(约5Å)以上。构成连接链的原子数例如可以是10个(约15Å)以下,较好是8个(约12Å)以下,更好是6个(约8Å)以下。更具体来说,构成连接链的原子数例如可以是2~10个,较好是3~8个,更好是4~6个。
- [2196] 连接通过切割生成的L1末端部分(或C1末端部分)和R'的部分结构的连接链为不含二价环结构的链状结构的情况下,连接链的原子数可通过计数连接链中的原子数来决定。
- [2197] 另一方面,连接通过切割生成的L1末端部分(或C1末端部分)和R'的部分结构的连接链为含二价环结构的结构的情况下,连接链的原子数与上述的长度并不一定对应,存在可根据连接链的原子数规定的长度比上述的长度短的倾向。即使是这样的情况下,从通过原子数规定连接链的长度的观点来看,可简便地计数连接链的原子数。具体来说,这样的情况下的连接链的原子数可如上所述通过在连接链中不含二价环结构的链状结构中的原子数的基础上,再计数连通二价环结构中的2个键的最短路径的原子数来决定。
- [2198] 优选地,连接通过切割生成的L1末端部分(或C1末端部分)和R'的部分结构的连接链可以是不含二价环结构的链状结构。该情况下,可按照连接通过切割生成的末端部分和R'的部分结构的连接链中不含二价环基的条件适当设计L1-B。
- [2199] 特定的实施方式中,以L1-B表示的部分结构较好是不含肽部分。该情况下,使用本发明的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质而得到的本发明的具有功能性物质的可溶性蛋白质(例如抗体药物复合物)具有不会包含可具有免疫原性的肽部分作为连接体的优

点。

[2200] 4-3-2. 部分结构“L1-B”的具体结构

[2201] 上述式 (IV) 中, L1和B为可相互关联的结构。因此, 上述式 (IV) 中, L1和B可作为以“L1-B”表示的部分结构规定。

[2202] 特定的实施方式中, L1为(i') 包含生物正交性官能团的一价基团的情况下, B为(a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b) 不含生物正交性官能团的二价基团。

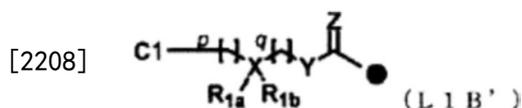
[2203] 优选地, L1为(i') 包含生物正交性官能团的一价基团的情况下, B为(a) 包含生物正交性官能团的二价基团。该情况下, (i') 中的生物正交性官能团与(a) 中的生物正交性官能团可以为同种, 也可以不同。从采用更简单的结构和/或提高对于单一的功能性物质的反应性等观点来看, (i') 中的生物正交性官能团可与(a) 中的生物正交性官能团为同种。另一方面, 从确保对于2种以上的功能性物质的差别化的反应性等和不使用反应中的部分生物正交性官能团的观点来看, (i') 中的生物正交性官能团可与(a) 中的生物正交性官能团不同。

[2204] 或者, L1为(i') 包含生物正交性官能团的一价基团的情况下, B可以是(b) 不含生物正交性官能团的二价基团。该情况下, 以式 (IV) 表示的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐具有更简单的结构, 所以合成容易。

[2205] 另一特定的实施方式中, L1为(ii') 不含生物正交性官能团的一价基团的情况下, B为(a) 包含生物正交性官能团的二价基团。

[2206] 特定的实施方式中, 以L1-B表示的结构单元可以下述式 (L1B') 表示;

[2207] [化学式56]



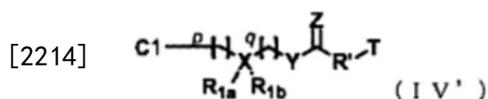
[2209] 式中,

[2210] C1、p、q、X、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、Y和Z的定义、例子和优选例与上述相同,

[2211] ● (黑色圆) 表示与R'结合的键。

[2212] 因此, 上述式 (IV) 可规定为下述式 (IV') ;

[2213] [化学式57]



[2215] 式中,

[2216] C1、p、q、X、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、Y、Z、R'和T的定义、例子和优选例与上述相同。

[2217] 上述式 (L1B') 和 (IV') 中, 从C=Z的C至C1的长度与连接通过切割生成的L1末端部分(或C1末端部分) 和R'的部分结构的长度相同。这些式中, 从C=Z中的C至C1的长度也可按照构成C=Z中的C至C1的部分结构的连接链(除氢原子及取代基外) 的原子数规定。这样的原子数与构成连接通过切割生成的L1末端部分(或C1末端部分) 和R'的部分结构(除氢原子及取代基外) 的原子数相同。连接C=Z中的C至C1的部分结构的连接链(除氢原子及取代基外) 可包含环结构, 也可不含环结构, 但较好是不含环结构。该连接链(除氢原子及取代基外) 可优选不含肽部分。

[2218] 4-4. 可溶性蛋白质所具有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的结合部位(区域选择性)

[2219] 除可溶性蛋白质以外的部分结构(例如L1-B-R')可区域选择性地与可溶性蛋白质(T)中的如上所述的靶区结合。具体来说,T在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基的情况下,除可溶性蛋白质以外的部分结构可按照30%以上的区域选择性与该靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基结合。靶区及区域选择性的定义、例子和优选例如上所述。

[2220] 4-5. 可溶性蛋白质所具有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数

[2221] 可溶性蛋白质(T)所保有的除可溶性蛋白质以外的部分结构(例如L1-B-R')的个数可变化。例如,T为包含多个单体蛋白质的多聚体蛋白质的情况下,T可在多个单体蛋白质中的对应的多个靶区中具有除T以外的部分结构。因而,T可具有多个除T以外的部分结构。因此,以式(IV)、(IV')或(IV'')表示的结构,表示T可具有1个或多个除T以外的部分结构。T所具有的除T以外的部分结构的个数可通过适当设定可溶性蛋白质的种类及可溶性蛋白质与其引入的结构单元的反应比例等条件来进行调节。这样的个数也根据可溶性蛋白质的种类而不同,例如可以是1~8个,较好是1~4个,更好是1或2个。

[2222] 特定的实施方式中,可溶性蛋白质所保有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数,在可溶性蛋白质为由多个单体蛋白质构成的多聚体蛋白质的情况下,可以是多个。如果采用本发明,可对于多个单体蛋白质的同一靶区引入多个除可溶性蛋白质以外的部分结构。

[2223] 优选的实施方式中,可溶性蛋白质可以是包含多个重链的抗体。抗体的定义、例子和优选例如上所述。本发明中,抗体所保有的除抗体以外的部分结构的个数,对于IgG、IgE和IgD可以是1个或2个(较好是2个),对于IgA可以是1~4个(较好是4个),对于IgM可以是1~8个(较好是8个)。

[2224] 4-6. 制造方法

[2225] 本发明提供包括以下工序的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法:

[2226] (C1) 对包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割,生成具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序。

[2227] 包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质以式(II)、较好是式(II')、更好是式(II'')表示。具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质以式(IV)、较好是式(IV')、更好是式(IV'')表示。

[2228] 包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐具有可通过如上所述的切割处理进行切割的切割性部分,因此可以进行切割。这样的切割反应可在如上述“2-6. 制造方法”中所述的不会引发蛋白质的变性、分解(例如酰胺键的断裂)的条件(温和条件)下适当进行。

[2229] 作为切割处理,可例举例如(a)采用选自酸性物质、碱性物质、还原剂、氧化剂、酶中的1种以上的物质的处理,(b)采用选自光的物理化学刺激的处理,或者(c)使用包含自体分解性的切割性部分的切割性连接体的情况下的放置。这样的切割处理的条件是该领域的

技术常识(例如G.Leriche,L.Chisholm,A.Wagner,Bioorganic&Medicinal Chemistry.20, 571(2012);Feng P.等,Journal of American Chemical Society.132,1500(2010).; Bessodes M.等,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))。

[2230] 具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的生成的确认,虽也依赖于其具体的原料及产物的分子量,但可通过例如电泳法、色谱法(例如凝胶过滤层析法、离子交换色谱法、反相柱色谱法、HPLC)或质谱分析进行,较好是通过质谱分析进行。区域选择性的确认、除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数的确认、及纯化可通过上述“2-6.制造方法”中所述的方法适当进行。

[2231] 此外,本发明还提供包括以下工序的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法:

[2232] (C2)使包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应,生成包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序;以及

[2233] (C3)对包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割,生成具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序。

[2234] 上述(C2)的工序可与上述“2-6.制造方法”中所述的上述(A1)的工序同样地进行。上述(C3)的工序可与上述(C1)的工序同样地进行。上述(C2)和(C3)的工序可分别进行。或者,上述(C2)和(C3)的工序可根据反应性基团与可通过切割生成的生物正交性官能团的组合(非反应性)等因素而同时进行。

[2235] 5.具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法

[2236] 5-1.概要

[2237] 本发明提供以式(V)表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法;

[2238]  $F-(L1-B)'-R'-T$  (V)

[2239] 式中,

[2240] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团,

[2241] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[2242] 以(L1-B)'表示的结构单元为包含通过功能性物质与(i')和(a)中的生物正交性官能团中的任一方或两方之间的反应而生成的部分的二价结构单元,

[2243] F为功能性物质,

[2244] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[2245] T为可溶性蛋白质。

[2246] 5-2.部分结构“F-(L1-B)'"

[2247] 5-2-1.连接F和R'的部分结构“L1-B”的长度

[2248] 式(V)中,连接F和R'的部分结构“L1-B”(“L1-B”中的直链部分)的长度(或者,不仅

限于式(V)等特定式的、区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐中的、连接功能性物质和特定氨基酸残基的侧链的主链的原子数,或功能性物质介以生物正交性官能团与可溶性蛋白质结合的情况下,为连接生物正交性官能团和特定氨基酸残基的侧链的主链的原子数。下同),可根据如上述“1-6-1.连接A和R的部分结构‘L-B’中的主链的长度”所述的各种因素而适当地进行设计。

[2249] 连接F和R'的部分结构的长度例如为约2.5Å以上,较好是约4Å以上,更好是约5Å以上。此外,部分结构的长度例如为约15Å以下,较好是约12Å以下,更好是约8Å以下。更具体来说,部分结构的长度例如为约2.5~15Å,较好是约4~12Å,更好是约5~8Å。

[2250] 更具体来说,连接F和R'的部分结构的长度也可按照构成部分结构的连接链(除氢原子及取代基外)的原子数规定。构成连接链的原子数例如可以是2个(约2.5Å)以上,较好是3个(约4Å)以上,更好是4个(约5Å)以上。此外,构成连接链的原子数例如可以是10个(约15Å)以下,较好是8个(约12Å)以下,更好是6个(约8Å)以下。更具体来说,构成连接链的原子数例如可以是2~10个,较好是3~8个,更好是4~6个。

[2251] 连接F和R'的部分结构的连接链为不含二价环结构的链状结构的情况下,连接链的原子数可通过计数连接链中的原子数来决定。

[2252] 另一方面,连接F和R'的部分结构的连接链为含二价环结构的结构的情况下,连接链的原子数与上述的长度并不一定对应,存在可根据连接链的原子数规定的长度比上述的长度短的倾向。即使是这样的情况下,从通过原子数规定连接链的长度的观点来看,可简便地计数连接链的原子数。具体来说,这样的情况下的连接链的原子数可如上所述通过在连接链中不含二价环结构的链状结构中的原子数的基础上,再计数连通二价环结构中的2个键的最短路径的原子数来决定。

[2253] 优选地,连接F和R'的部分结构的连接链可以是不含二价环结构的链状结构。该情况下,可按照连接F和R'的部分结构的连接链中不含二价环基的条件适当设计L1-B。

[2254] 特定的实施方式中,以L1-B表示的部分结构较好是不含肽部分。该情况下,使用本发明的具有功能性物质的可溶性蛋白质(例如抗体药物复合物)具有不含可具有免疫原性的肽部分作为连接体的优点。

[2255] 5-2-2.部分结构“F-(L1-B)”的具体结构

[2256] 式(V)中,F-(L1-B)'中的L1和B为可相互关联的结构。因此,上述式(V)中,L1和B可作为以“L1-B”表示的部分结构规定。

[2257] 此外,以F-(L1-B)'表示的结构单元为通过功能性物质与(i')和(a)中的生物正交性官能团中的任一方或两方之间的反应而生成的部分。供于反应的生物正交性官能团在式(V)中不存在。因此,式(V)中,不存在(i')和(a)中的生物正交性官能团中的任一方或两方。通过功能性物质与(i')和(a)中的生物正交性官能团中的任一方或两方之间的反应而生成的部分与通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分相同。因此,本说明书中,通过功能性物质与(i')和(a)中的生物正交性官能团中的任一方或两方之间的反应而生成的部分的例子(残基的名称)和具体例子(化学结构式),与上文中关于通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分所述的内容相同。

[2258] 一个实施方式中,L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团的情况下,B为(a)

包含生物正交性官能团的二价基团、或者 (b) 不含生物正交性官能团的二价基团。

[2259] 优选的实施方式中, L1为(i') 包含生物正交性官能团的一价基团的情况下, B为(a) 包含生物正交性官能团的二价基团。该情况下, (i') 中的生物正交性官能团与(a) 中的生物正交性官能团可以为同种, 也可以不同。从采用更简单的结构和/或提高对于单一的功能性物质的反应性等观点来看, (i') 中的生物正交性官能团可与(a) 中的生物正交性官能团为同种。另一方面, 从确保对于2种以上的功能性物质的差别化的反应性和不使用反应中的部分生物正交性官能团等观点来看, (i') 中的生物正交性官能团可与(a) 中的生物正交性官能团不同。

[2260] 另一优选的实施方式中, L1为(i') 包含生物正交性官能团的一价基团的情况下, B可以是(b) 不含生物正交性官能团的二价基团。该情况下, 以式(IV) 表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐具有更简单的结构, 所以合成容易。

[2261] 另一实施方式中, L1为(ii') 不含生物正交性官能团的一价基团的情况下, B为(a) 包含生物正交性官能团的二价基团。

[2262] 特定的实施方式中, (i') 和(a) 中的生物正交性官能团不同的情况下, 以式(V) 表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐可以式(V1) 或(V2) 表示;

[2263]  $L1-B'(-F)-R'-T$  (V1)

[2264] 式中,

[2265] L1为(i') 包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii') 不含生物正交性官能团的一价基团,

[2266] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[2267] F为功能性物质,

[2268] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[2269] T为可溶性蛋白质。

[2270]  $F-L1'-B-R'-T$  (V2)

[2271] 式中,

[2272] L1'为包含通过功能性物质与(i') 包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[2273] B为(a) 包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b) 不含生物正交性官能团的二价基团,

[2274] F为功能性物质,

[2275] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[2276] T为可溶性蛋白质。

[2277] L1'为包含通过功能性物质与(i') 包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团。通过功能性物质与(i') 包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分与通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分相同。因此, 本说明书中, 通过功能性物质与(i') 包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的例子(残基的名称) 和具体例子(化学结构式) 与上文中关于通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分所述的相同。因此, 功能性物质与生物

正交性官能团反应,所以包含通过功能性物质与(i')包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团(L1'),也可表述为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团(下同)。L1'中的包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团的定义、例子及优选例,可以与B'中的包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团的相应内容相同。

[2278] 另一特定的实施方式中,(i')和(a)中的生物正交性官能团为同种或不同的情况下,以式(V)表示的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐可以式(V3)表示;

[2279]  $Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T$  (V3)

[2280] 式中,

[2281] L1'为包含通过功能性物质与(i')包含生物正交性官能团的一价基团之间的反应而生成的部分的二价基团,

[2282] B'为包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团,

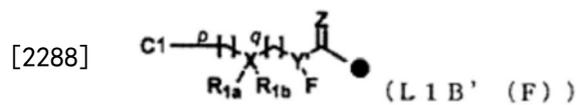
[2283] Fa和Fb分别为相同或不同的功能性物质,

[2284] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[2285] T为可溶性蛋白质。

[2286] 特定的实施方式中,上述式(V1)中,以L1-B'(-F)表示的结构单元可以下述式(FL1'B)表示;

[2287] [化学式58]



[2289] 式中,

[2290] F、C1、p、q、X、R1a、R1b、和Z的定义、例子和优选例与上述相同,

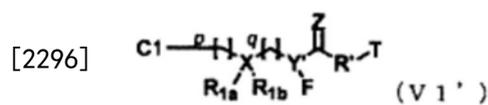
[2291] Y'为从所述式(B-1)的Y除去1个氢原子而得的残基,

[2292] ●(黑色圆)表示与R'结合的键。

[2293] 从所述式(B-1)的Y除去1个氢原子而得的残基的定义、例子和优选例与上述相同。

[2294] 因此,上述式(V1)可规定为下述式(V1');

[2295] [化学式59]



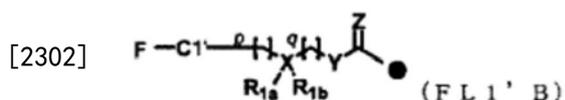
[2297] 式中,

[2298] F、C1、p、q、X、R1a、R1b、Z、R'和T的定义、例子和优选例与上述相同,

[2299] Y'为从所述式(B-1)的Y除去1个氢原子而得的残基。

[2300] 特定的实施方式中,上述式(V2)中,以F-L1'-B表示的结构单元可以下述式(FL1'B)表示;

[2301] [化学式60]



[2303] 式中,

[2304] F、p、q、X、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、Y和Z的定义、例子和优选例与上述相同,

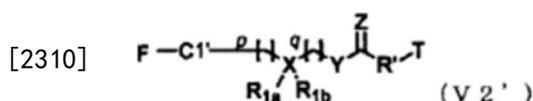
[2305] C1'为通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分,

[2306] ●(黑色圆)表示与R'结合的键。

[2307] C1'为通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分。C1'中的通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的定义、例子及优选例与上述“3-3.包含通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分的二价基团(B')”所述的内容相同。

[2308] 因此,上述式(V2)可规定为下述式(V2');

[2309] [化学式61]



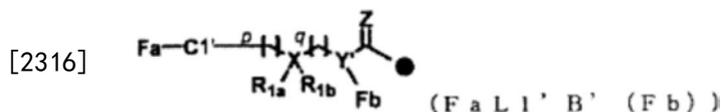
[2311] 式中,

[2312] F、p、q、X、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、Y、Z、R'和T的定义、例子和优选例与上述相同,

[2313] C1'为通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分。

[2314] 特定的实施方式中,上述式(V3)中,以Fa-L1'-B'(-Fb)表示的结构单元可以下述式(FaL1'B'(Fb))表示;

[2315] [化学式62]



[2317] 式中,

[2318] Fa、Fb、p、q、X、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、和Z的定义、例子和优选例与上述相同,

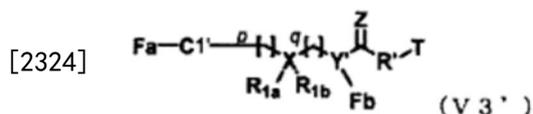
[2319] C1'为通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分,

[2320] Y'为从所述式(B-1)的Y除去1个氢原子而得的残基,

[2321] ●(黑色圆)表示与R'结合的键。

[2322] 因此,上述式(V3)可规定为下述式(V3');

[2323] [化学式63]



[2325] 式中,

[2326] Fa、Fb、p、q、X、R<sub>1a</sub>、R<sub>1b</sub>、Z、R'和T的定义、例子和优选例与上述相同,

[2327] C1'为通过功能性物质与生物正交性官能团之间的反应而生成的部分,

[2328] Y'为从所述式(B-1)的Y除去1个氢原子而得的残基。

[2329] 上述式(L1B'(F))、(FL1'B)和(FaL1'B'(F2))、以及(V1')、(V2')或(V3')中,从C=Z的C至C1的长度与连接通过切割生成的L1末端部分(或C1末端部分)和R'的部分结构的长

度相同。这些式中,从C=Z中的C至C1的长度也可按照构成C=Z中的C至C1的部分结构的连接链(除氢原子及取代基外)的原子数规定。这样的原子数与构成连接通过切割生成的L1末端部分(或C1末端部分)和R'的部分结构(除氢原子及取代基外)的原子数相同。连接C=Z中的C至C1的部分结构的连接链(除氢原子及取代基外)可包含环结构,也可不含环结构,但较好是不含环结构。该连接链(除氢原子及取代基外)可优选不含肽部分。

[2330] 5-3. 可溶性蛋白质所具有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的结合部位(区域选择性)

[2331] 除可溶性蛋白质以外的部分结构(例如F-(L1-B)'-R')可区域选择性地与可溶性蛋白质(T)中的如上所述的靶区结合。具体来说,T在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基的情况下,除可溶性蛋白质以外的部分结构可按照30%以上的区域选择性与该靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基结合。靶区及区域选择性的定义、例子和优选例如上所述。

[2332] 5-4. 可溶性蛋白质所具有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数

[2333] 可溶性蛋白质(T)所保有的除可溶性蛋白质以外的部分结构(例如F-(L1-B)'-R')的个数可变化。例如,T为包含多个单体蛋白质的多聚体蛋白质的情况下,T可在多个单体蛋白质中的对应的多个靶区中具有除T以外的部分结构。因而,T可具有多个除T以外的部分结构。因此,以式(V)、(V1)、(V2)、(V3)、(V1')、(V2')或(V3')表示的结构,表示T可具有1个或多个除T以外的部分结构。T所具有的除T以外的部分结构的个数可通过适当设定可溶性蛋白质的种类及可溶性蛋白质与对其引入的结构单元的反应比例等条件来进行调节。这样的个数也根据可溶性蛋白质的种类而不同,例如可以是1~8个,较好是1~4个,更好是1或2个。

[2334] 特定的实施方式中,可溶性蛋白质所保有的除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数,在可溶性蛋白质为由多个单体蛋白质构成的多聚体蛋白质的情况下,可以是多个。如果采用本发明,可对于多个单体蛋白质的同一靶区引入多个除可溶性蛋白质以外的部分结构。

[2335] 优选的实施方式中,可溶性蛋白质可以是包含多个重链的抗体。抗体的定义、例子和优选例如上所述。本发明中,抗体所保有的除抗体以外的部分结构的个数,对于IgG、IgE和IgD可以是1个或2个(较好是2个),对于IgA可以是1~4个(较好是4个),对于IgM可以是1~8个(较好是8个)。

[2336] 5-5. 制造方法

[2337] 本发明提供具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法。本制造方法可分为:(D)使用具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐作为原料的方法(参照图2的反应(3))、以及(E)使用具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐作为原料的方法(参照图2的反应(5))。

[2338] (D)使用具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐作为原料的方法包括以下工序:

[2339] (D1)对具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割,生成具有功能性物质的可溶性蛋白质或其

盐的工序。

[2340] 包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物以式(III)、较好是式(III')、更好是式(III'')表示。具有功能性物质的可溶性蛋白质以式(V)表示,较好是以式(V1)、(V2)或(V3)表示,更好是以式(V1')、(V2')或(V3')表示。

[2341] 具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐,具有可通过如上所述的切割处理进行切割的切割性部分,因此可以进行切割。这样的切割反应可在如上述“4-6. 制造方法”中所述的方式下进行。

[2342] 具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的生成的确认,虽也依赖于其具体的原料及产物的分子量,但可通过例如电泳法、色谱法(例如凝胶过滤层析法、离子交换色谱法、反相柱色谱法、HPLC)或质谱分析进行,较好是通过质谱分析进行。区域选择性的确认、除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数的确认、及纯化可通过上述“2-6. 制造方法”中所述的方法适当进行。

[2343] 此外,本发明还提供包括以下工序的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法:

[2344] (D2)使包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序;以及

[2345] (D3)对具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割,生成具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序。

[2346] 上述(D2)的工序可与上述“3-7. 制造方法”中所述的上述(B1)的工序同样地进行。上述(D3)的工序可与上述(D1)的工序同样地进行。上述(D2)和(D3)的工序可分别进行。或者,上述(D2)和(D3)的工序可根据与切割性部分、功能性物质及生物正交性官能团的组合等因素而同时进行。

[2347] 另外,本发明还提供包括以下工序的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法:

[2348] (D4)使包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应,生成包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[2349] (D5)使包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应,生成具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的工序;以及

[2350] (D6)对具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的复合物或其盐的切割性部分进行切割,生成具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序。

[2351] 上述(D4)的工序可与上述“2-6. 制造方法”中所述的上述(A1)的工序同样地进行。上述(D5)和(D6)的工序可与上述(D2)和(D3)的工序同样地进行。上述(D5)的工序可与上述“3-7. 制造方法”中所述的上述(B1)的工序同样地进行。上述(D6)的工序可与上述(D1)的工

序同样地进行。上述 (D4) ~ (D6) 的工序可分别进行。或者, 上述 (D4) ~ (D6) 的工序中的至少一部分可根据与反应性基团、切割性部分、功能性物质及生物正交性官能团的组合等因素而同时进行。

[2352] (E) 使用具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐作为原料的方法包括以下工序:

[2353] (E1) 使具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应, 生成具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序。

[2354] 具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质以式 (IV)、较好是式 (IV') 表示。具有功能性物质的可溶性蛋白质以式 (V) 表示, 较好是以式 (V1)、(V2) 或 (V3) 表示, 更好是以式 (V1')、(V2') 或 (V3') 表示。

[2355] 具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐具有生物正交性官能团, 因此可与功能性物质反应。这样的反应可在如上述“3-7. 制造方法”中所述的方式下进行。

[2356] 具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的生成的确认可通过如上所述的方法进行。区域选择性的确认、除可溶性蛋白质以外的部分结构的个数的确认及纯化可通过上述“2-6. 制造方法”中所述的方法适当进行。

[2357] 此外, 本发明还提供包括以下工序的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法:

[2358] (E2) 对包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割, 生成具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序; 以及

[2359] (E3) 使具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应, 生成具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序。

[2360] 上述 (E2) 的工序可与上述“4-6. 制造方法”中所述的上述 (C1) 的工序同样地进行。上述 (E3) 的工序可与上述 (E1) 的工序同样地进行。上述 (E2) 和 (E3) 的工序可分别进行。或者, 上述 (E2) 和 (E3) 的工序可根据与切割性部分、功能性物质及生物正交性官能团的组合等因素而同时进行。

[2361] 另外, 本发明还提供包括以下工序的具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法:

[2362] (E4) 使包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐与可溶性蛋白质反应, 生成包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的工序;

[2363] (E5) 对包含针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的可溶性蛋白质或其盐的切割性部分进行切割, 生成具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的工序; 以及

[2364] (E6) 使具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐与功能性物质反应, 生成具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的工序。

[2365] 上述 (E4) 的工序可与上述“2-6. 制造方法”中所述的上述 (A1) 的工序同样地进行。上述 (E5) 和 (E6) 的工序可与上述 (E2) 和 (E3) 的工序同样地进行。上述 (E4) ~ (E6) 的工序可分别进行。或者, 上述 (E4) ~ (E6) 的工序中的至少一部分可根据与反应性基团、切割性部

分、功能性物质及生物正交性官能团的组合等因素而同时进行。

[2366] 6. 位置特异性地具有生物正交性官能团的特定的可溶性蛋白质或其盐及其制造方法

[2367] 此外,本发明还提供区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐。区域选择性地具有生物正交性官能团的本发明的可溶性蛋白质或其盐是,可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基,且生物正交性官能团介以不含肽部分的连接体以30%以上的区域选择性与所述靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基结合的区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐。

[2368] 特定的实施方式中,区域选择性地具有生物正交性官能团的本发明的可溶性蛋白质或其盐可以是以下述式(IV)表示,且以L1-B-R'表示的结构单元以30%以上的区域选择性与所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基结合的区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐;

[2369] L1-B-R'-T (IV)

[2370] 式中,

[2371] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团,

[2372] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[2373] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[2374] T为可溶性蛋白质,

[2375] 所述可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基。

[2376] 此外,本发明还提供区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法。

[2377] 通过以往的方法,无法制造如上所述的区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐,但如果采用本发明人开发的方法,可制造这样的区域选择性地具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐。生物正交性官能团、区域选择性、可溶性蛋白质、靶区、连接体等要件以及L1中的(i')和(ii')、B中的(a)和(b)、R'和T以及这些要件的部分技术要素的定义、例子及优选例与上述相同。此外,除了将区域选择性及与其相关的技术要素(例如靶区)作为必需要件之外,制造方法的工序的详细内容与“4. 具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质或其盐的制造方法”中所述的内容相同。

[2378] 7. 区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐及其制造方法

[2379] 此外,本发明还提供区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐。区域选择性地具有功能性物质的本发明的可溶性蛋白质或其盐是,可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基,且功能性物质介以不含肽部分的连接体以30%以上的区域选择性与所述靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐。

[2380] 特定的实施方式中,区域选择性地具有功能性物质的本发明的可溶性蛋白质或其盐可以是以下述式(V)表示,且以F-(L1-B)'-R'表示的结构单元以30%以上的区域选择性与所述可溶性蛋白质的靶区中所含的1个以上的特定氨基酸残基结合的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐;

[2381]  $F-(L1-B)'-R'-T$  (V)

[2382] 式中,

[2383] L1为(i')包含生物正交性官能团的一价基团、或者(ii')不含生物正交性官能团的一价基团,

[2384] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[2385] 以(L1-B)'表示的结构单元为包含通过功能性物质与(i')和(a)中的生物正交性官能团中的任一方或两方之间的反应而生成的部分的二价结构单元,

[2386] F为功能性物质,

[2387] R'为通过可溶性蛋白质与反应性基团之间的反应而生成的部分,

[2388] T为可溶性蛋白质,

[2389] 所述可溶性蛋白质在由连续的1~50个氨基酸残基形成的靶区中包含1个以上的特定氨基酸残基,且在除所述靶区以外的非靶区中包含5个以上的所述特定氨基酸残基。

[2390] 此外,本发明还提供区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法。

[2391] 通过以往的方法,无法制造如上所述的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐,但如果采用本发明人开发的方法,可制造这样的区域选择性地具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐。功能性物质、区域选择性、可溶性蛋白质、靶区、连接体等要件以及L1中的(i')和(ii')、B中的(a)和(b)、(L1-B)'、F、R'和T以及这些要件的部分技术要素的定义、例子及优选例与上述相同。此外,除了将区域选择性及其相关的技术要素(例如靶区)作为必需要件之外,制造方法的工序的详细内容与“5.具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的制造方法”中所述的内容相同。

[2392] 8. 盐

[2393] 本发明中,作为盐,可例举例如与无机酸的盐、与有机酸的盐、与无机碱的盐、与有机碱的盐、及与氨基酸的盐。作为与无机酸的盐,可例举例如与盐酸、溴化氢、磷酸、硫酸、硝酸的盐。作为与有机酸的盐,可例举例如与甲酸、乙酸、三氟乙酸、乳酸、酒石酸、富马酸、乙二酸、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,可例举例如与碱金属(例如钠、钾)、碱土金属(例如钙、镁)及锌、铝等其他金属以及铵的盐。作为与有机碱的盐,可例举例如与三甲胺、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,可例举例如与碱性氨基酸(例如精氨酸、组氨酸、赖氨酸、鸟氨酸)及酸性氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)的盐。盐较好是与无机酸(例如盐酸)的盐或有机酸(例如三氟乙酸)的盐。

[2394] 9. 用途

[2395] 具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的本发明的化合物或其盐可用于例如可溶性蛋白质的区域选择性修饰。因此,本发明提供包含具有针对可

溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物或其盐的可溶性蛋白质的区域选择性修饰试剂。

[2396] 本发明的区域选择性修饰试剂可以进一步包含其他成分的组合物的形态提供。作为这样的其他成分,可例举例如溶液、稳定剂(例如抗氧化剂、防腐剂)。作为溶液,较好是水溶液。作为水溶液,可例举例如水(例如蒸馏水、灭菌蒸馏水、纯化水、生理盐水)、缓冲液(例如磷酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、碳酸盐-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),较好是缓冲液。溶液的pH例如为5.0~9.0,较好是5.5~8.5。本发明的区域选择性修饰试剂可以液状或粉末状(例如冷冻干燥粉末)提供。

[2397] (区域选择性地)具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质及切割性部分的本发明的可溶性蛋白质或其盐、(区域选择性地)具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分、功能性物质及可溶性蛋白质的本发明的复合物或其盐、以及(区域选择性地)具有生物正交性官能团的本发明的可溶性蛋白质或其盐,可用作例如用于制备(区域选择性地)具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐的中间体。

[2398] (区域选择性地)具有功能性物质的本发明的可溶性蛋白质或其盐可用作例如药物或者试剂(例如诊断药物、研究用试剂)。特别是可溶性蛋白质为抗体的情况下,(区域选择性地)具有功能性物质的本发明的抗体或其盐适合于这些用途。

[2399] 特别是(区域选择性地)具有功能性物质的本发明的抗体或其盐可用作药物。如上所述,有报道称,如果改变抗体药物复合物(ADC)的药物的结合数和结合位置,则体内动力学和药物的释放速度、效果会发生变化。基于这些情况,对于下一代的ADC,要求控制偶联药物的个数和位置。一般认为如果个数和位置确定,则符合期待的功效、偶联药剂的多样性、批次差异即标准化(regulation)的问题得到解决。具有功能性物质的本发明的抗体或其盐可解决这样的标准化的问题。因此,具有功能性物质的本发明的抗体或其盐可以药物组合物的形态提供。除具有功能性物质的可溶性蛋白质或其盐之外,这样的药物组合物还可包含药学上可允许的载体。作为药学上可允许的载体,可例举例如蔗糖、淀粉、甘露糖醇、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、聚丙基吡咯烷酮、明胶、阿拉伯胶、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、二氧化硅气凝胶(Aerosil)、滑石、十二烷基硫酸钠等润滑剂,柠檬酸、甲醇、双甘氨酸铵盐、甘氨酸、甜橙粉等芳香剂,苯甲酸钠、亚硫酸氢钠、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯等防腐剂,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、硬脂酸铝等悬浮剂,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、白煤油等基质蜡(base wax)等,但并不仅限于这些例子。此外,具有功能性物质的本发明的抗体或其盐还可具有实现稳定性的任意的修饰(例如PEG化)。

[2400] 适合于口服给药的制剂为:使有效量的配体溶解于水、生理盐水、橙汁等稀释液而得的液体制剂,作为固体或颗粒包含有效量的配体的胶囊剂、药囊(sachet)或片剂,使有效量的有效成分悬浮于适当的分散介质中的悬浮液剂,使溶解了有效量的有效成分的溶液分散于适当的分散介质并乳化的乳剂等。

[2401] 药物组合物适合于非口服给药(胃肠外给药)(例如静脉注射、皮下注射、肌肉注射、局部注入、腹腔内给药)。作为这样的适合于非口服给药的药物组合物,有水性和非水性

的等渗无菌注射液剂,其中可含抗氧化剂、缓冲液、抗菌剂、等渗剂等。此外,可例举水性和非水性的无菌悬浮液剂,其中可含悬浮剂、助溶剂、增粘剂、稳定剂、防腐剂等。

[2402] 药物组合物的给药量根据有效成分的种类及活性、疾病的严重程度、作为给药对象的动物种类以及给药对象的药物耐受性、体重、年龄等而不同,可适当设定。

[2403] 实施例

[2404] 以下,示出实施例对本发明进行更详细的说明,但本发明并不限于以下的实施例。

[2405] [实施例1:IgG1 Fc结合性肽的合成]

[2406] (1) IgG1 Fc结合性肽的合成

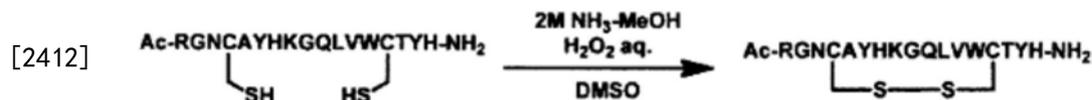
[2407] (1-1) 针对可溶性蛋白质的亲和性物质 (Ac-RGNCA<sub>1</sub>YHKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 39) 的肽) 的合成

[2408] 利用Fmoc固相合成法合成了作为针对可溶性蛋白质的亲和性物质的Ac-RGNCA<sub>1</sub>YHKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 39) 的肽。肽合成装置使用拜泰齐公司 (Biotage) 制 Syro wave。试剂全部使用渡边化学工业公司制的试剂。树脂 (Resin) 为Fmoc-NH-SAL-PEG Resin, HL, 精氨酸 (R)、半胱氨酸 (C)、组氨酸 (H) 进行了双偶合 (double coupling)。从树脂的切出在于三氟乙酸:水:三异丙基硅烷:乙二硫醇=94:2.5:1.0:2.5的溶液中搅拌3小时的条件进行。切出后,将树脂通过过滤除去,除去三氟乙酸。向生成的结晶中加入二乙醚进行醚沉淀,通过过滤回收生成的白色结晶。将其溶解于0.1%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.1%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而仅除去乙腈后,进行冷冻干燥。

[2409] MS (ESI) m/z: z=3 693 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 520 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2410] (1-2) Ac-RGNCA<sub>1</sub>YHKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 39) 的肽中的第4位和第14的Cys处的分子内二硫键的形成

[2411] [化学式64]



[2413] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO: 39。

[2414] 将(1-1)中合成的肽溶解于DMSO调整为100mM后,加入2当量的2M NH<sub>3</sub>-MeOH、1当量的过氧化氢水溶液,在室温下搅拌12小时。向反应溶液中加入0.1%三氟乙酸水溶液,使反应停止,用反相制备色谱洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而仅除去乙腈后,进行冷冻干燥。5mg~100mg的规模下收率均在90%以上。

[2415] MS (ESI) m/z: z=3 692 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 519 [M+4H]<sup>4+</sup>

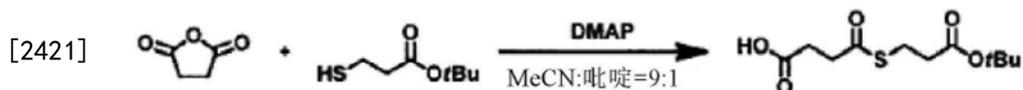
[2416] [实施例2:切割性连接体的合成和与IgG1 Fc结合性肽的连接]

[2417] (2) 切割性连接体的合成和与肽的连接

[2418] (2-1) 硫酯连接体的合成和与肽的连接

[2419] (2-1-1) 硫酯连接体的合成

[2420] [化学式65]

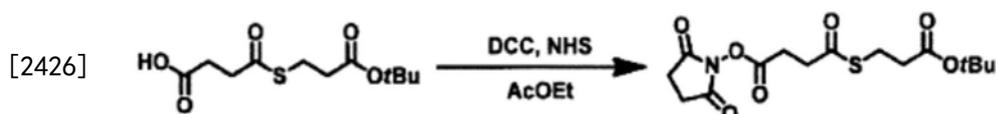


[2422] 使琥珀酸酐(0.2g, 2mmol)和N,N'-二甲基氨基吡啶(12.2mg, 0.1mmol)溶解于乙腈:吡啶=9:1的溶剂中,用氩气置换。加入3-巯基丙酸叔丁酯(0.3g, 2.2mmol),在室温下搅拌16小时。将反应液用乙酸乙酯稀释,用0.1M盐酸水溶液、水、食盐水清洗后,加入无水硫酸镁静置5分钟。通过过滤除去硫酸镁,减压浓缩,从而获得4-(3-叔丁氧基-3-氧代丙基)硫基-4-氧代丁酸(0.47g, 1.8mmol)。

[2423]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, 氘代氯仿)  $\delta$  3.12 (t, J=7.0Hz, 2H), 2.91 (t, J=6.9Hz, 2H), 2.72 (t, J=6.9Hz, 2H), 2.55 (t, J=7.0Hz, 2H), 1.46 (s, 9H)。

[2424] MS (ESI) m/z: 263 [M+H]<sup>+</sup>

[2425] [化学式66]

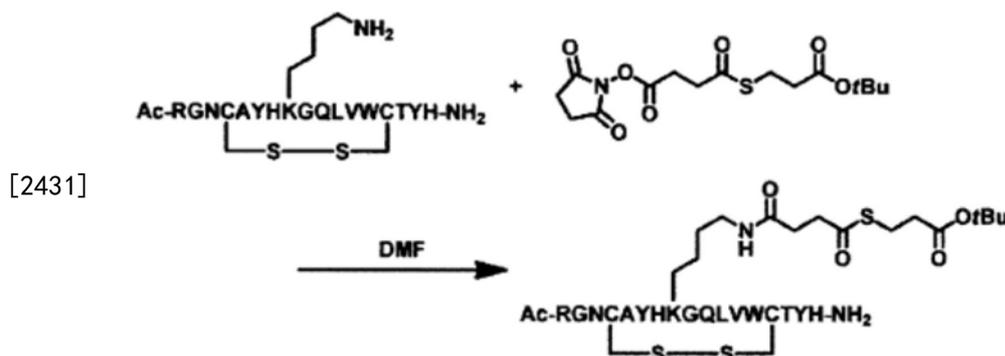


[2427] 向4-(3-叔丁氧基-3-氧代丙基)硫基-4-氧代丁酸(0.47g, 1.8mmol)中加入5mL乙酸乙酯溶解。然后,加入N,N'-二环己基碳二亚胺(0.39g, 1.9mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(0.22g, 1.9mmol)搅拌1小时。过滤生成的白色结晶,将母液减压浓缩,从而获得4-(3-叔丁氧基-3-氧代丙基)硫基-4-氧代丁酸-2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(0.61g, 1.7mmol)。

[2428] MS (ESI) m/z: 360 [M+H]<sup>+</sup>

[2429] (2-1-2) 硫酯连接体与肽的连接

[2430] [化学式67]

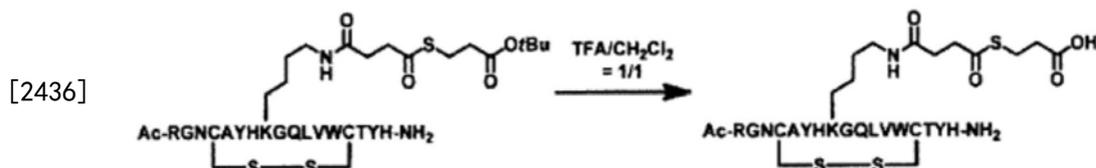


[2432] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

[2433] 将实施例1-2中合成的Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:39)的肽(42mg, 20.3 $\mu$ mol, 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1mL的N,N'-二甲基甲酰胺,加入将4-(3-叔丁氧基-3-氧代丙基)硫基-4-氧代丁酸-2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(0.61g, 1.7mmol)溶解于1mL乙腈而得的溶液中。在室温下搅拌12小时后,加入0.1%三氟乙酸水溶液,用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分,通过减压浓缩而仅除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽连接体连接-tBu体(41.7mg, 18 $\mu$ mol)。

[2434] MS (ESI) m/z: z=3 773 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 580 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2435] [化学式68]

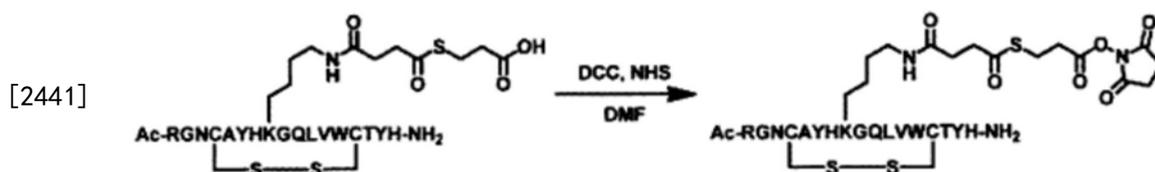


[2437] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

[2438] 将上述肽连接体连接物 (41.7mg, 18 $\mu$ mol) 溶解于1.0mL二氯甲烷中, 加入1.0mL三氟乙酸, 在室温中搅拌1小时。进行减压浓缩后, 加入0.1%三氟乙酸水溶液, 用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而仅除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得上述肽连接体连接物-羧酸体 (40.7mg, 18 $\mu$ mol)。

[2439] MS (ESI) m/z: z=3 755 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 566 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2440] [化学式69]



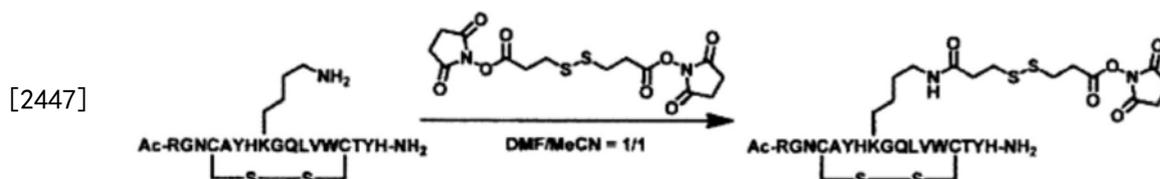
[2442] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

[2443] 将上述肽连接体连接物-羧酸体 (40.7mg, 18 $\mu$ mol) 溶解于1mL的N,N'-二甲基甲酰胺, 加入N,N'-环己基碳二亚胺 (37.1mg, 0.18mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺 (20.7mg, 0.18mmol) 搅拌1小时。过滤生成的白色结晶, 向母液中加入0.1%三氟乙酸水溶液, 用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而仅除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得上述肽硫酯连接体连接物-NHS活化体 (5.2mg, 2.24 $\mu$ mol)。

[2444] MS (ESI) m/z: z=3 787 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 590 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2445] (2-2) 二硫连接体与肽的连接

[2446] [化学式70]



[2448] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

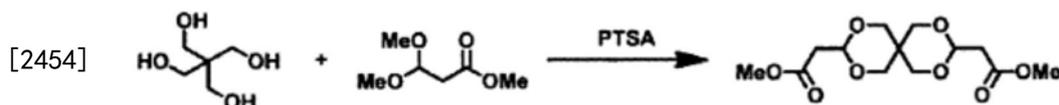
[2449] 将实施例1-2中合成的Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:39) 的肽 (10mg, 4.8 $\mu$ mol, 其中, 第4位和第14位的2个半胱氨酸分别在分子内形成二硫键) 溶解于1mL的N,N'-二甲基甲酰胺, 加入将3,3'-二硫代二丙酸二(N-羟基琥珀酰亚胺酯) (0.2g, 0.48mmol) 溶解于1mL乙腈而得的溶液中, 在室温下搅拌12小时。加入0.5%三氟乙酸水溶液, 用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而仅除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体 (8.6mg, 3.63 $\mu$ mol)。

[2450] MS (ESI) m/z: z=3 789 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 592 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2451] (2-3) 缩醛连接体的合成和肽的连接

[2452] (2-3-1) 缩醛连接体的合成

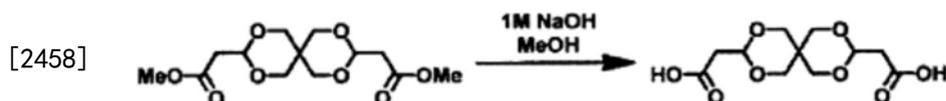
[2453] [化学式71]



[2455] 将季戊四醇 (1.98g, 14.3mmol)、二甲氧基丙酸甲酯 (6.0g, 31.7mmol) 和对甲苯磺酸一水合物 (33.0mg, 0.143mmol) 混合, 在130℃搅拌16小时。16小时后恢复至室温, 通过过滤回收析出的结晶, 获得2-[9-(2-甲氧基-2-氧代乙基)-2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷-3-基]乙酸甲酯 (3.04g, 10mmol)。

[2456] MS (ESI) m/z: 305 [M+H]<sup>+</sup>

[2457] [化学式72]



[2459] 将2-[9-(2-甲氧基-2-氧代乙基)-2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷-3-基]乙酸甲酯 (50mg, 0.164mmol) 溶解于1mL甲醇, 在冰冷下加入0.49mL的1M NaOH水溶液, 升温至室温后搅拌2小时。添加阳离子交换树脂调节至中性后, 通过过滤除去树脂, 获得2-[9-(2-甲氧基-2-氧代乙基)-2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷-3-基]乙酸 (32mg, 0.116mmol)。

[2460] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.85 (t, J=5.4Hz, 2H), 4.26 (dd, J=11.3, 2.4Hz, 2H), 3.67-3.61 (m, 2H), 3.60 (s, 8H), 3.42 (d, J=11.6Hz, 2H), 2.69-2.56 (m, 4H)。

[2461] MS (ESI) m/z: 277 [M+H]<sup>+</sup>

[2462] [化学式73]



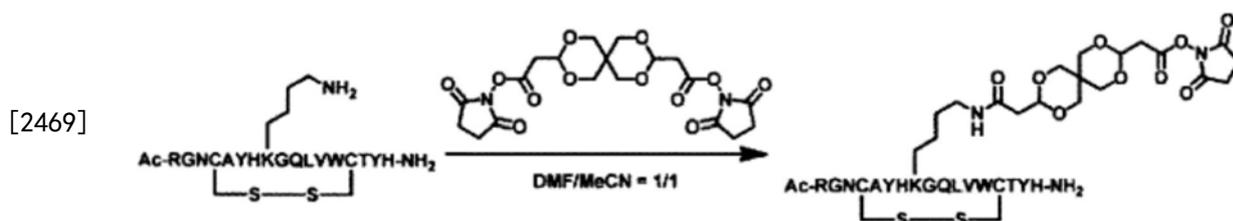
[2464] 将2-[9-(2-甲氧基-2-氧代乙基)-2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷-3-基]乙酸 (32mg, 0.116mmol) 溶解于1mL乙酸乙酯, 加入N,N'-二环己基碳二亚胺 (37.1mg, 0.18mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺 (20.7mg, 0.18mmol) 搅拌1小时。过滤生成的白色结晶, 将母液减压浓缩后, 加水, 将中性的乙腈和水作为溶剂, 用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而仅除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得2-[9-(2-甲氧基-2-氧代乙基)-2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷-3-基]乙酸-2,5-二氧化吡咯烷-1-基酯 (13mg, 27.6μmol)。

[2465] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 4.79 (t, J=5.3Hz, 2H), 4.24 (dd, J=11.2, 2.3Hz, 2H), 3.60-3.48 (m, 4H), 3.34 (d, J=11.5Hz, 2H), 2.33 (d, J=5.3Hz, 4H)。

[2466] MS (ESI) m/z: 471 [M+H]<sup>+</sup>

[2467] (2-3-2) 缩醛连接体与肽的连接

[2468] [化学式74]



[2470] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

[2471] 将实施例1-2中合成的Ac-RGNCA YHKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:39)的肽(10mg, 4.8μmol, 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1mL的N,N'-二甲基甲酰胺,加入将2-[9-(2-甲氧基-2-氧代乙基)-2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷-3-基]乙酸-2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(13mg, 27.6μmol)溶解于1mL而得的溶液中,在室温下搅拌12小时。加水,将中性的乙腈和水作为溶剂,用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分,通过减压浓缩而仅除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽缩醛连接体连接物-NHS活化体(8.6mg, 3.63μmol)。

[2472] MS (ESI) m/z: z=3 810 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 608 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2473] [实施例3:采用IgG1 Fc结合性肽试剂的IgG1 Fc的特异性修饰和基于MALDI-TOFMS的分析]

[2474] (3-1) 采用硫酯连接体结合性肽试剂的IgG1 Fc的特异性修饰和基于MALDI-TOFMS的分析

[2475] IgG1 Fc使用R&D公司制的IgG1 Fc, Human, Recombinant, Carrier-free (产品编号:110-HG-100)。实施例2的(2-1)中合成的肽硫酯连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为0.4mM。将15μg的IgG1 Fc溶解于15μL的0.1M乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入7μL的0.4mM的肽试剂(相对于IgG1 Fc为5当量),室温下搅拌1小时。将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH7.4),停止反应。利用MALDI-TOFMS测定了质量,原料的IgG1 Fc在m/z 28270观测到峰,产物在引入了一个结合性肽(结合性肽)的m/z 30532观测到峰。

[2476] (3-2) 采用二硫连接体结合性肽试剂的IgG1 Fc的特异性修饰和基于MALDI-TOFMS的分析

[2477] IgG1 Fc使用R&D公司制的IgG1 Fc, Human, Recombinant, Carrier-free (产品编号:110-HG-100)。实施例2的(2-2)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为0.4mM。将20μg的IgG1 Fc溶解于40μL的0.1M乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入10.7μL的0.4mM的肽试剂(相对于IgG1 Fc为6当量),室温下搅拌1小时。将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH7.4),停止反应。利用MALDI-TOFMS测定了质量,原料的IgG1 Fc在m/z 28183观测到峰,产物在引入了一个结合性肽的m/z 30418观测到峰。

[2478] (3-3) 采用缩醛连接体结合性肽试剂的IgG1 Fc的特异性修饰和基于MALDI-TOFMS的分析

[2479] IgG1 Fc使用R&D公司制的IgG1 Fc, Human, Recombinant, Carrier-free (产品编号:110-HG-100)。实施例2的(2-3)中合成的肽缩醛连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为0.4mM。将20μg的IgG1 Fc溶解于40μL的0.1M乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入10.7μL的0.4mM的肽试剂(相对于IgG1 Fc为6当量),室温下搅拌1小时。将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH 7.4),停止反应。利用MALDI-TOFMS测定了质量,原料的IgG1 Fc在m/z 28183观测到峰,产物在引入了一个结合性肽的m/z 30541观测到峰。

[2480] [实施例4: IgG1 Fc-肽复合物的连接体切割和基于MALDI-TOFMS的分析]

[2481] (4-1) 硫酯连接体的切割和基于MALDI-TOFMS的分析

[2482] 在40 $\mu$ L的0.2M的PBS缓冲液(pH 7.0)、25mM的半胱氨酸溶液中溶解实施例3的(3-1)中合成的IgG1 Fc-肽硫酯连接体复合物,室温下搅拌16小时。将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH 7.0),停止反应。利用MALDI-TOFMS测定了质量,原料的引入了一个结合性肽的复合物在m/z 30541观测到峰,反应后在m/z 28397观测到峰。

[2483] (4-2) 硫酯连接体的切割和基于MALDI-TOFMS的分析

[2484] 在40 $\mu$ L的0.2M的PBS缓冲液(pH 7.0)中溶解实施例3的(3-2)中合成的IgG1 Fc-肽二硫连接体复合物,添加12.5 $\mu$ L的10mM的D,L-二硫苏糖醇(相对于Fc为10当量),室温下搅拌16小时。将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH 7.0),停止反应。利用MALDI-TOFMS测定了质量,原料的引入了一个结合性肽的复合物在m/z 30418观测到峰,反应后在m/z 28183观测到峰。

[2485] (4-3) 缩醛连接体的切割和基于MALDI-TOFMS的分析

[2486] 在任意的缓冲液(pH 3.0~pH 6.0)中溶解实施例3的(3-3)中合成的IgG1 Fc-肽缩醛连接体复合物,室温下搅拌,从而缩醛结构分解,醛残留于IgG1 Fc上。可利用MALDI-TOFMS对其测定质量。

[2487] [实施例5:抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗及抗CD20抗体利妥昔单抗的特异性修饰和基于MALDI-TOFMS及HIC-HPLC的分析]

[2488] (5-1) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于MALDI-TOFMS的分析

[2489] 将实施例2的(2-2)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为0.4mM。使500 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于200 $\mu$ L的50mM的乙酸钠缓冲液(pH 5.5),加入50.7 $\mu$ L的0.4mM的肽试剂(相对于抗体为6当量),室温下搅拌1小时。将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH 7.4),停止反应。利用MALDI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗在m/z 147569观测到峰,产物在引入了两个结合性肽的m/z151848观测到峰。

[2490] (5-2) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[2491] 利用HIC对(5-1)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社(TOSOH))4.6 $\times$ 350mm,2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为1.0mL/分钟,梯度设为B 0 $\rightarrow$ 100%,12分钟(数据采集20分钟),柱温为25 $^{\circ}$ C,温控器(thermostat)温度为RT,检测器以UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[2492] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[2493] a:曲妥珠单抗+肽试剂12当量(反应后用Amicon10K进行溶剂置换);

[2494] b:曲妥珠单抗+肽试剂12当量;

[2495] c:曲妥珠单抗+肽试剂6当量;

[2496] d:曲妥珠单抗原料;

[2497] e:仅肽试剂;

[2498] f:仅DMF。

[2499] 可知保留时间9.417分钟是曲妥珠单抗原料,10.943分钟和13.063分钟是来源于肽试剂的峰,0.44分钟是DMF(图3、4)。使6当量的肽试剂与曲妥珠单抗反应后,9.417分钟的峰消失,出现了9.99分钟和10.237分钟的峰(图3、4)。此外,加入12当量的肽试剂后,9.99分

钟的峰消失,因此认为9.99分钟的峰是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物(图3、4)。利用MALDI-TOFMS对a进行了分析,结果如(5-1)中所示,观测到显示m/z 151848的MS峰的对于曲妥珠单抗引入了2个肽试剂的峰(图3、4)。

[2500] (5-3) 抗CD20抗体利妥昔单抗的特异性修饰和基于MALDI-TOFMS的分析

[2501] 将实施例2的(2-2)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为0.4mM。使500 $\mu$ g的抗CD20抗体利妥昔单抗溶解于200 $\mu$ L的50mM的乙酸钠缓冲液(pH 5.5),加入50.7 $\mu$ L的0.4mM的肽试剂(相对于抗体为6当量),室温下搅拌1小时。将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH 7.4),停止反应。利用MALDI-TOFMS测定了质量,原料的利妥昔单抗在m/z 144002观测到峰,产物在引入了两个结合性肽的m/z 148169观测到峰。

[2502] (5-4) 抗CD20抗体利妥昔单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[2503] 利用HIC对(5-3)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)4.6 $\times$ 350mm,2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa、2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、pH7.0,B缓冲液:0.1M PiNa、pH7.0,流速为1.0mL/分钟,梯度设为B 0 $\rightarrow$ 100%、12分钟(数据采集20分钟),柱温为25 $^{\circ}$ C,温控器温度为RT,检测器以UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[2504] 对于a~f的样品,按照以下的条件进行反应。

[2505] a:利妥昔单抗+肽试剂12当量(反应后用Amicon10K进行溶剂置换);

[2506] b:利妥昔单抗+肽试剂12当量;

[2507] c:利妥昔单抗+肽试剂6当量;

[2508] d:利妥昔单抗原料;

[2509] e:仅肽试剂;

[2510] f:仅DMF。

[2511] 可知保留时间9.417分钟是利妥昔单抗原料,10.94分钟和13.02分钟是来源于肽试剂的峰,0.44分钟是DMF(图5、6)。使6当量的肽试剂与利妥昔单抗反应后,10.36分钟的峰消失,出现了10.763分钟和10.94分钟的峰(图5、6)。此外,加入12当量的肽试剂后,10.763分钟的峰消失,因此认为10.763分钟的峰是利妥昔单抗中引入了一个肽的化合物(图5、6)。利用MALDI-TOFMS对a进行了分析,结果如(5-1)中所示,观测到m/z 148169的对于利妥昔单抗引入了2个肽试剂的峰(图5、6)。

[2512] [实施例6:曲妥珠单抗-肽复合物及利妥昔单抗-肽复合物的切割及再氧化、以及它们的产物的基于MALDI-TOFMS和RP-HPLC的分析]

[2513] (6-1) 曲妥珠单抗-肽复合物的连接体的切割及再氧化、以及它们的产物的基于MALDI-TOFMS的分析

[2514] 首先,将400 $\mu$ g的实施例5的(5-1)中合成的曲妥珠单抗-肽复合物溶解于60mM的磷酸缓冲液(pH 8.0),调整为72 $\mu$ M后,添加10.0 $\mu$ L的20mM的D,L-二硫苏糖醇(相对于曲妥珠单抗-肽复合物为60当量),室温下搅拌16小时,将连接体中的二硫键切割。

[2515] 接着,为了使与连接体中的二硫键一起被切割的抗体中的二硫键再次结合,进行了再氧化的工序(Jagath R Junutula等,NATURE BIOTECHNOLOGY,26(8),925-932(2008))。具体来说,将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH 7.0),将曲妥珠单

抗-肽复合物的浓度调整为18 $\mu$ M后,加入6.4 $\mu$ L的10mM的脱氢抗坏血酸(相对于曲妥珠单抗-肽复合物为20当量)并搅拌3小时,由此进行了再氧化。利用MALDI-TOFMS测定了质量,产物在引入2个硫代丙酰基的m/z 145329观测到峰。

[2516] (6-2)通过曲妥珠单抗-肽复合物的连接体的切割和再氧化得到的产物的基于RP-HPLC的分析

[2517] 利用RP-HPLC对(6-1)的反应进行了分析。柱使用TSK gel、Protein C4-300(东曹株式会社)4.6 $\times$ 150mm,3.0 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1%TFA,B缓冲液:0.1%TFA、80%ACN,流速为1.0mL/分钟,梯度设为B 20 $\rightarrow$ 60%、20分钟(数据采集30分钟),柱温为60 $^{\circ}$ C,温控器温度为10 $^{\circ}$ C,检测器以UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[2518] 对于a~f的样品,按照以下的条件进行反应。

[2519] a:曲妥珠单抗;

[2520] b:曲妥珠单抗+肽试剂6当量;

[2521] c:将曲妥珠单抗利用DTT还原;

[2522] d:缓冲液pH8.0,抗体浓度72 $\mu$ M下利用D,L-二硫苏糖醇还原;

[2523] e:将d利用脱氢抗坏血酸再氧化3小时后;

[2524] f:将d利用脱氢抗坏血酸再氧化24小时后。

[2525] 按照b、d和e或f的顺序反应,分解为轻链和重链后(d),用脱氢抗坏血酸再氧化而形成e或f(图7)。此外,根据峰的保留时间可知,曲妥珠单抗的轻链和修饰体的轻链形成于同一位置,重链的保留时间偏移,所以重链被修饰(图7)。

[2526] (6-3)利妥昔单抗-肽复合物的连接体切割和基于MALDI-TOFMS的分析

[2527] 将400 $\mu$ g的实施例5的(5-3)中合成的利妥昔单抗-肽复合物溶解于60mM的磷酸缓冲液(pH 8.0),调整至72 $\mu$ M后,添加10.0 $\mu$ L的20mM的D,L-二硫苏糖醇(相对于利妥昔单抗-肽复合物为60当量),室温下搅拌16小时。将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH 7.0),将浓度调整为18 $\mu$ M后,加入6.4 $\mu$ L的10mM的脱氢抗坏血酸(相对于利妥昔单抗-肽复合物为20当量)并搅拌3小时,将连接体中的二硫键切割。利用MALDI-TOFMS测定了质量,产物在引入2个硫代丙酰基的m/z 144783观测到峰。

[2528] [实施例7:对曲妥珠单抗及利妥昔单抗的硫醇引入体的荧光标记和荧光标记率的计算]

[2529] (7-1)对曲妥珠单抗的硫醇引入体的荧光标记和荧光标记率的计算

[2530] 将实施例6的(6-1)中合成的曲妥珠单抗的硫醇引入体溶解于20mM的PBS缓冲液并调节为0.3mM后,添加20 $\mu$ L的赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher)制的DyLight 550(0.94mM,溶解于DMF),室温下搅拌12小时。反应后,用染料清除柱(Dy Removal Column)除去荧光染料。利用贝克曼库尔特公司(BECKMAN COULTER)制的DU 800分光光度计测定了280nm和557nm的吸光度。根据吸光度算出荧光标记率,结果为2。

[2531] (7-2)对利妥昔单抗的硫醇引入体的荧光标记和荧光标记率的计算

[2532] 将实施例6的(6-3)中合成的利妥昔单抗的硫醇引入体溶解于20mM的PBS缓冲液并调节为0.3mM后,添加20 $\mu$ L的赛默飞世尔科技公司制的DyLight 550(0.94mM,溶解于DMF),室温下搅拌12小时。反应后,用染料清除柱除去荧光染料。利用贝克曼库尔特公司制的DU 800分光光度计测定了280nm和557nm的吸光度。根据吸光度算出荧光标记率,结果为2。

- [2533] [实施例8: IgG1 Fc及曲妥珠单抗的硫醇引入体的肽谱]
- [2534] (8-1) IgG1 Fc及曲妥珠单抗、利妥昔单抗的硫醇引入体的胰蛋白酶处理
- [2535] 向1.5mL低吸附微型试管中分注40 $\mu$ L含8M尿素的100mM碳酸氢铵缓冲液,加入12 $\mu$ L样品溶液、2 $\mu$ L的溶解于100mM碳酸氢铵缓冲液的2%的ProteaseMAX (蛋白酶消化促进剂ProteaseMAX™表面活性剂),搅拌混合。然后,加入20 $\mu$ L的20mM二硫苏糖醇水溶液,在65 $^{\circ}$ C加热15分钟后,添加42 $\mu$ L的30mM碘乙酸水溶液,避光下于室温反应30分钟。反应后,加入150 $\mu$ L的100mM碳酸氢铵缓冲液进行搅拌,加入1.4 $\mu$ L的溶解于100mM碳酸氢铵缓冲液的2%的ProteaseMAX,添加10 $\mu$ L的100 $\mu$ g/mL的胰蛋白酶水溶液(蛋白质组学级(Proteomics Grade),编号T6567-5 $\times$ 20 $\mu$ g(西格玛公司(SIGMA))),于37 $^{\circ}$ C酶消化18小时。消化后,加入15 $\mu$ L的10%三氟乙酸水溶液,4.6 $\mu$ L的含2%乙腈的0.01%三氟乙酸水溶液,用于LC-MS/MS测定。
- [2536] (8-2) IgG1 Fc及曲妥珠单抗的硫醇引入体的Glu-C处理
- [2537] 向1.5mL低吸附微型试管中分注20 $\mu$ L的含8M尿素的100mM碳酸氢铵缓冲液,加入8 $\mu$ L样品溶液,搅拌混合。然后,加入5 $\mu$ L的100mM的二硫苏糖醇水溶液,在65 $^{\circ}$ C加热15分钟后,添加6 $\mu$ L的200mM碘乙酸水溶液,避光下于室温反应30分钟。反应后,加入2 $\mu$ L的100mM的二硫苏糖醇水溶液,进而加入3 $\mu$ L的100mM碳酸氢铵缓冲液并搅拌,添加5 $\mu$ L的200 $\mu$ g/mL的Glu-C蛋白酶水溶液(Pierce™ Glu-C蛋白酶,MS级,产品编号:90054),在37 $^{\circ}$ C酶消化18小时。消化后,加入4 $\mu$ L的10%三氟乙酸水溶液,用于LC-MS/MS测定。
- [2538] (8-3) IgG1 Fc及曲妥珠单抗的LC-MS/MS测定条件
- [2539] (分析装置)
- [2540] 纳米HPLC:EASY-nLC 1000(赛默飞世尔科技公司)
- [2541] 质谱仪:Tribid质谱仪Orbitrap Fusion(赛默飞世尔科技公司)
- [2542] (HPLC分析条件)
- [2543] 捕获柱:Acclaim PepMap(注册商标)100,75 $\mu$ m $\times$ 2cm,nano Viper(赛默飞世尔科技公司)
- [2544] 分析柱:ESI-柱(NTCC-360/75-3-125,75 $\mu$ m $\times$ 12.5cm,3 $\mu$ m(日京Technos株式会社))
- [2545] 流动相A:0.1%甲酸水溶液
- [2546] 流动相B:0.1%甲酸,乙腈溶液
- [2547] 加载(loading)溶液:0.1%三氟乙酸水溶液
- [2548] 流速:300nL/分钟
- [2549] 样品注入量:2 $\mu$ L(IgG1 Fc)、3 $\mu$ L(曲妥珠单抗)
- [2550] 梯度条件(B%):2%(0.0-0.5分钟)、2% $\rightarrow$ 45%(0.5-33.5分钟)、45% $\rightarrow$ 75%(33.5-35.5分钟)、75%(35.5-45.0分钟)
- [2551] (质谱仪的分析条件)
- [2552] 离子化方法:ESI,正离子(Positive)模式
- [2553] 扫描类型:数据依赖性获取(Data Dependent Acquisition)
- [2554] 活化类型:碰撞诱导离解(Collision Induced Dissociation,CID)
- [2555] 数据的获取使用作为附带软件的Xcalibur 3.0(赛默飞世尔科技公司)及Thermo

Orbitrap Fusion Tune Application 2.0(赛默飞世尔科技公司)进行。

[2556] (8-4) IgG1 Fc及曲妥珠单抗的修饰位点的分析条件

[2557] 关于对LC-MS/MS测定结果的修饰位点分析,使用Proteome Discoverer version 1.4(赛默飞世尔科技公司)进行。

[2558] 关于采用Proteome Discoverer的分析,使用Sequest HT作为搜索引擎,前体离子的范围设为350~5000Da。此外,关于消化酶,根据样品,将胰蛋白酶或Glu-c设定为消化酶,最大漏切位点(Maximum Missed Cleavage Site)设为0。此外,前体和碎片离子的质量容差(Mass Tolerance)分别设为10ppm和0.5Da。关于静态修饰(Static Modification),作为采用碘乙酸的半胱氨酸残基的修饰,设定了羧甲基(Carboxymethyl) (+58.005Da)。关于动态修饰(Dynamic Modification),设定了甲硫氨酸的氧化(+15.995Da)和对赖氨酸残基的修饰体(接受了采用碘乙酸的羧甲基化的硫醇引入体(+146.004Da))。

[2559] 此外,作为修饰位点的检索对象的氨基酸序列的数据,使用图8所示的(1)~(3)。

[2560] (8-5) IgG1 Fc及曲妥珠单抗的基于LC-MS/MS的修饰位点的分析结果

[2561] 作为使用LC/MS/MS的分析的结果,观测了曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酸的羧甲基化的硫醇引入体(+146.004Da))的由氨基酸26个残基形成的肽、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK (SEQ ID NO:5)的肽片段的MS谱(实测值:m/z 998.14874,理论值:998.14859,3价)(图9),根据CID谱确认了表示重链的EU numbering中的第246位的赖氨酸残基的修饰的相当于2价的b24的m/z 1375.59(理论值:1375.1)的产物离子(图10)。此外,观测了曲妥珠单抗的采用Glu-C蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酸的羧甲基化的硫醇引入体(+146.004Da))的由氨基酸的16个残基形成的肽、LLGGPSVFLFPPKPKD (SEQ ID NO:6)的肽片段的MS谱(实测值:m/z 929.49573,理论值:929.49527,2价)(图11),根据CID谱确认了表示重链的EU numbering中的第248位的赖氨酸残基的修饰的相当于2价的y3的m/z 505.22(理论值:505.20)的产物离子(图12)。

[2562] 另外,观测了IgG1 Fc的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酸的羧甲基化的硫醇引入体(+146.004Da))的由氨基酸的26个残基形成的肽、THTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK (SEQ ID NO:7)的肽片段的MS谱(实测值:m/z 994.12885,理论值:994.12433,3价)(图13),根据CID谱确认了表示重链的EU numbering中的第246位的赖氨酸残基的修饰的相当于2价的b24的m/z 1369.16(理论值:1369.10)的产物离子(图14)。此外,观测了IgG1 Fc的采用Glu-C蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酸的羧甲基化的硫醇引入体(+146.004Da))的由氨基酸的23个残基形成的肽、GAPSVFLFPPKPKDLTMISRTPE (SEQ ID NO:8)的肽片段的MS谱(实测值:m/z 892.12604,理论值:892.12611,3价)(图15),根据CID谱确认了表示重链的EU numbering中的第248位的赖氨酸残基的修饰的相当于2价的b12的m/z 620.27(理论值:619.85)的产物离子(图16)。

[2563] 根据以上的结果,确认了对包含EU numbering中的第246位和248位的赖氨酸残基的肽片段的修饰。

[2564] [实施例9:区域选择性曲妥珠单抗DM1偶联物的合成以及平均DAR的分析]

[2565] (9-1) 区域选择性T-DM1\*(曲妥珠单抗DM1)偶联物的合成

[2566] 使0.35mg的实施例6的(6-1)中合成的引入了2个生物正交性官能团的化合物溶解

于200 $\mu$ L的100mM PBS、10mM EDTA缓冲液,调整为1.75mg/mL后,添加10 $\mu$ L的N,N'-二甲基甲酰胺和将DM-1 (Abzena公司制) 溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为5mM的溶液4.8 $\mu$ L,在20 $^{\circ}$ C搅拌2小时。2小时后,添加使N-乙酰半胱氨酸溶解于100mM PBS、10mM EDTA缓冲液并调节为50mM的溶液1 $\mu$ L,再在20 $^{\circ}$ C搅拌1小时。反应后,利用NAP-5柱提取,去除DM-1。

[2567] (9-2) 采用SoloVPE的反应后的抗体浓度测定

[2568] 以280nm的波长测定吸光度,根据摩尔吸光系数算出抗体浓度,结果为0.48mg/mL。溶液量为0.7mL,所以可算出收量为0.336mg。

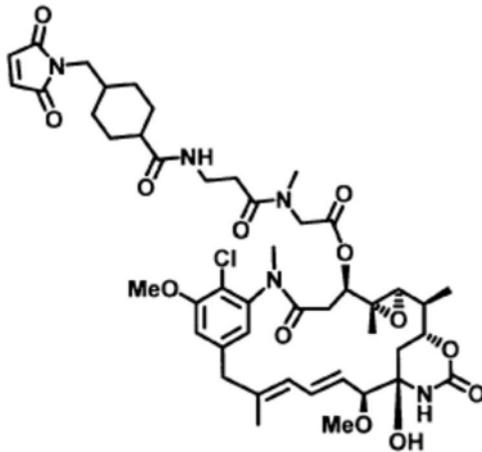
[2569] (9-3) 基于Q-TOFMS的DAR的计算

[2570] Q-TOFMS使用安捷伦科技有限公司制的Agilent 6550 coupled to Agilent 1290 UPLC with DAD detector, Autosampler cooling and Thermostatted column compartment。软件使用MassHunter,算出DAR。产物在引入2个DM-1的149945观测到峰,平均DAR算出为2(图23)。

[2571] 本实施例中使用的DM1\*如下。

[2572] [化学式75]

[2573]



[2574] 化学式: $C_{46}H_{60}ClN_5O_{13}$

[2575] 精确质量(Exact Mass):925.3876

[2576] [实施例10:基于Biacore的结合性评价]

[2577] (10-1) 基于ELISA的对抗原HER2的结合性评价

[2578] 利用ELISA对实施例9的(9-1)中合成的区域选择性T-DM1(曲妥珠单抗DM1)偶联物的对抗原HER2的结合性进行了评价。作为对照,还对Kadcyla(T-DM1)进行了评价。其结果是,Kadcyla的解离常数(KD值)为 $6.372 \pm 0.76$ pM,区域选择性T-DM1(曲妥珠单抗DM1)偶联物为 $6.684 \pm 0.17$ pM。因此,认为通过本方法合成的ADC维持了抗原结合性。

[2579] (10-2) 基于Biacore的对FcRn的结合性评价

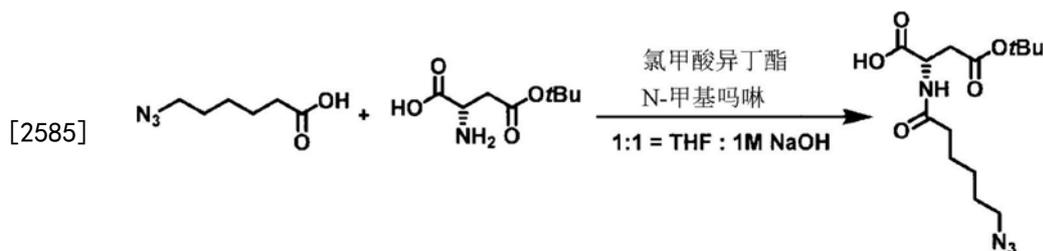
[2580] 利用ELISA对实施例9的(9-1)中合成的区域选择性T-DM1(曲妥珠单抗DM1)偶联物的对新生儿Fc受体(neonatal Fc receptor, FcRn)的结合性进行了评价。已知抗体对FcRn的结合性越高,则抗体具有越长的血中半衰期。作为对照,还对Kadcyla(T-DM1)进行了评价。其结果是,Kadcyla的解离常数(KD值)为 $1.65 \pm 0.05$  $\mu$ M,区域选择性T-DM1(曲妥珠单抗DM1)偶联物为 $0.258 \pm 0.001$  $\mu$ M。因此,认为通过本方法合成的ADC维持FcRn结合性,可知对FcRn的亲合性比作为已有的ADC的Kadcyla提高了6倍左右。

[2581] [实施例11: (1) 各种切割性连接体的合成、以及 (2) 基于合成的连接体与IgG1 Fc 结合性肽的连接的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽-叠氮修饰硫酯连接体连接物-NHS活化体、肽-马来酰亚胺修饰硫酯连接体连接物-NHS活化体、肽-叠氮修饰酯连接体连接物-NHS活化体及肽缩醛连接体连接物-NHS活化体)的合成]

[2582] (11-1) 硫酯连接体的合成和与肽的连接

[2583] (11-1-1) 硫酯连接体的合成

[2584] [化学式76]



[2586] 使6-叠氮己酸(300mg, 1.91mmol)溶解于THF溶剂(20mL),在0℃下加入氯甲酸异丁酯(284μL, 2.10mmol)、N-甲基吗啉(273μL, 2.48mmol)并搅拌30分钟,制备6-叠氮己酸的混合酸酐。室温下使4-(叔丁氧基羰基)-2-氨基丁酸(362mg, 2.10mmol)溶解于1M氢氧化钠水溶液(2.10mL)后,室温下滴加上述的6-叠氮己酸的混合酸酐的THF溶液。室温下搅拌16小时后,加入6M盐酸水溶液,将体系内的pH调整至3.0。将反应液用乙酸乙酯稀释,用水、食盐水清洗后,加入无水硫酸镁静置5分钟。通过过滤除去硫酸镁,减压浓缩,从而获得粗产物后,通过柱色谱(二氯甲烷:甲醇=10:1)纯化。回收含产物的级分,通过减压浓缩,获得4-(叔丁氧基羰基)-2-(6-叠氮-1-氧代己基)氨基丁酸(352mg, 1.07mmol)。

[2587]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, 氘代氯仿)  $\delta$  6.56 (d,  $J=7.6\text{Hz}$ , 1H), 4.76 (ddd,  $J=7.6, 5.2, 4.8\text{Hz}$ , 1H), 3.22 (t,  $3.6\text{Hz}$ , 2H), 2.90 (dd,  $J=17.2, 4.8\text{Hz}$ , 1H), 2.70 (dd,  $J=17.2, 5.2\text{Hz}$ , 1H), 2.22 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 1.53-1.65 (m, 4H), 1.37 (s, 9H), 1.36-1.31 (m, 2H) .

[2588] MS (ESI)  $m/z$ : 351  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

[2589] [化学式77]



[2591] 使4-(叔丁氧基-氧代)-2-(6-叠氮-1-氧代己基)氨基丁酸(50.0mg, 0.152mmol)溶解于THF(1.5mL),在0℃下加入氯甲酸异丁酯(30.9μL, 0.228mmol)、N-甲基吗啉(28.5μL, 0.258mmol)并搅拌30分钟,制备对应的混合酸酐。室温下使巯基丙酸(32.3mg, 0.456mmol)溶解于THF(mL)后,室温下滴加上述的混合酸酐的THF溶液。室温下搅拌16小时后,加入1M氢氧化钠水溶液,将体系内的pH调整至9.0。将反应液用水和乙酸乙酯清洗,回收水相。向水相中加入6M盐酸水溶液,将体系内的pH调整至3.0后,进行采用乙酸乙酯的分液萃取后,用食

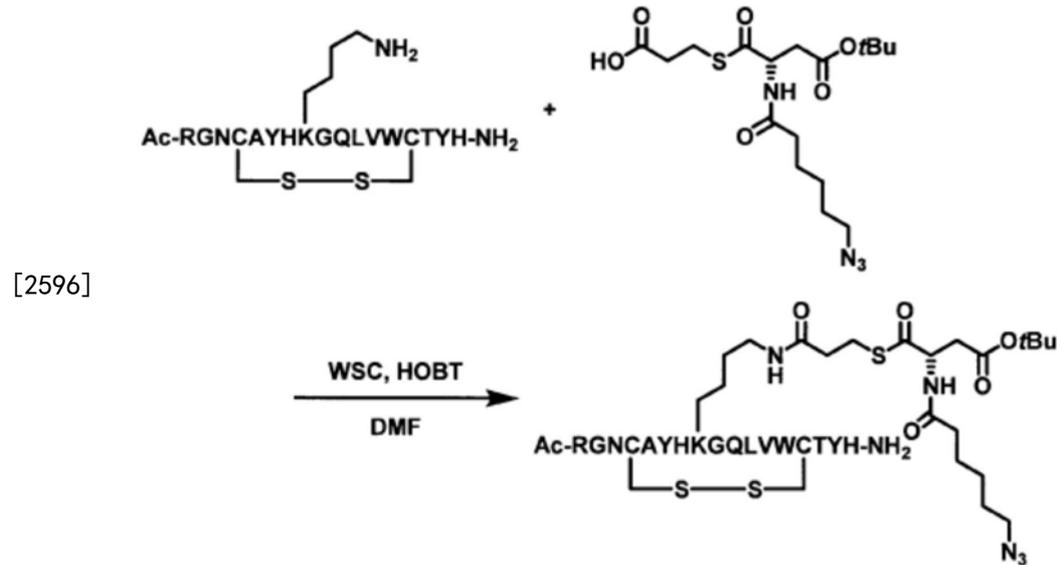
盐水清洗有机相后,加入无水硫酸镁静置5分钟。通过过滤除去硫酸镁,减压浓缩,从而获得3-[4-(叔丁氧基-氧代)-2-(6-叠氮-1-氧代己基)氨基-1-氧代]硫基丙酸(60.1mg, 0.144mmol)。

[2592]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氘代氯仿)  $\delta$ 6.69 (d,  $J=9.6\text{Hz}$ , 1H), 4.89 (dt,  $J=9.6, 4.4\text{Hz}$ , 1H), 3.22 (t, 8.5Hz, 2H), 3.07 (t, 7.2Hz, 2H), 2.82-2.60 (m, 3H), 2.29-2.22 (m, 3H), 1.70-1.52 (m, 4H), 1.42-1.39 (m, 2H), 1.40 (s, 9H)。

[2593] MS (ESI)  $m/z$ : 439  $[\text{M}+\text{H}]^+$

[2594] (11-1-2) 硫酯连接体与肽的连接

[2595] [化学式78]

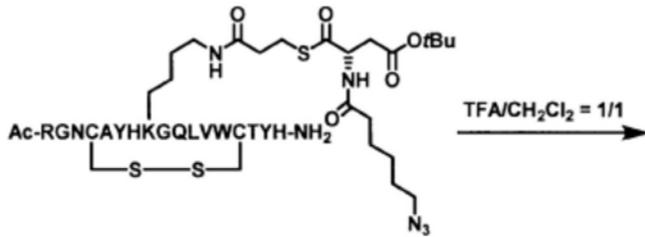


[2597] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

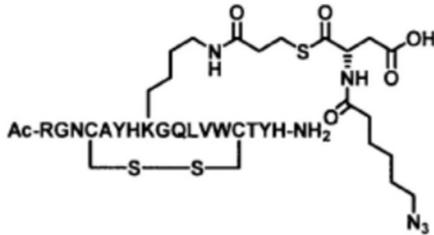
[2598] 将实施例1-2中合成的Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:39)的肽(20.0mg, 9.64 $\mu\text{mol}$ , 其中,第4位和第14位的2个半胱氨酸分别在分子内形成二硫键)溶解于1mL的N,N'-二甲基甲酰胺,使3-[4-(叔丁氧基-氧代)-2-(6-叠氮-1-氧代己基)氨基-1-氧代]硫基丙酸(60.1mg, 0.144mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(25.9mg, 0.135mmol)、1-羟基苯并三唑(18.2mg, 0.135mmol)溶解于1mL的DMF,加入体系中。在室温下搅拌12小时后,加入0.1%三氟乙酸水溶液,用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分,通过减压浓缩而仅除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽连接体连接-tBu体(15mg, 7.23 $\mu\text{mol}$ )。

[2599] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  1237  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ,  $z=3$  824  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$

[2600] [化学式79]



[2601]

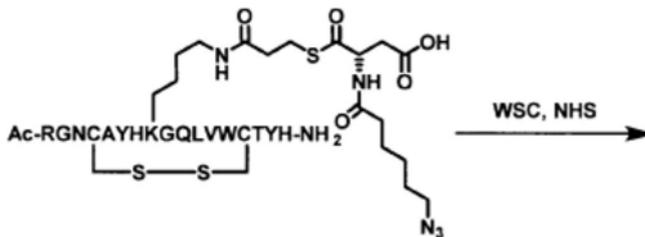


[2602] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

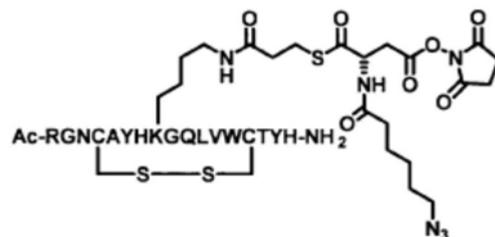
[2603] 将上述肽连接体连接物 (10.0mg, 4.82 $\mu$ mol) 溶解于0.250mL二氯甲烷中, 加入0.250mL三氟乙酸, 在室温中搅拌1小时。进行减压浓缩后, 加入0.1%三氟乙酸水溶液, 用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而仅除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得上述肽连接体连接物-羧酸体 (6.2mg, 2.57 $\mu$ mol)。

[2604] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  1208  $[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$  806  $[M+3H]^{3+}$

[2605] [化学式80]



[2606]

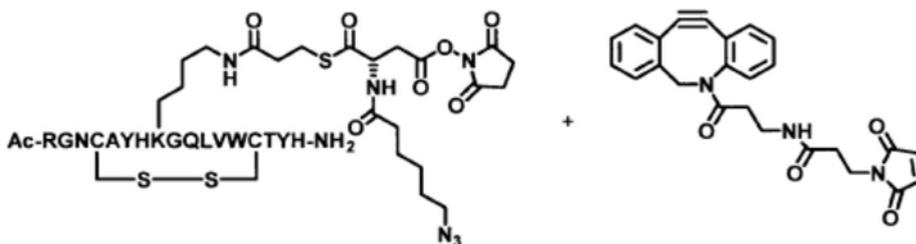


[2607] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

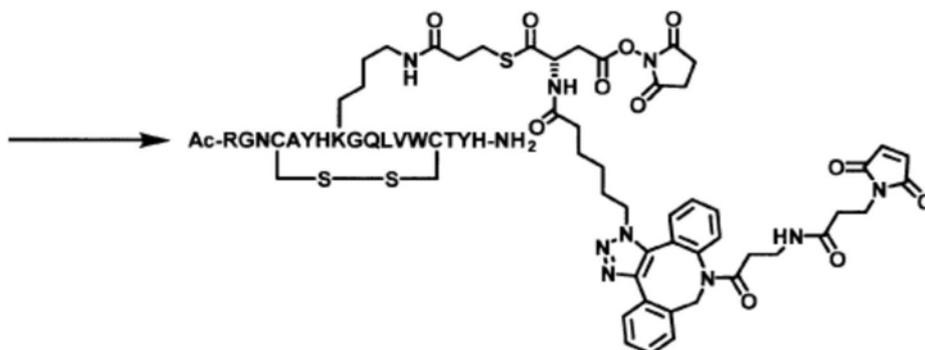
[2608] 将上述肽连接体连接物-羧酸体 (5.7mg, 2.36 $\mu$ mol) 溶解于0.5mL的N,N'-二甲基甲酰胺, 加入1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (9.1mg, 47.2 $\mu$ mol)、N-羟基琥珀酰亚胺 (8.1mg, 70.8 $\mu$ mol) 并搅拌16小时。向反应液中加入0.1%三氟乙酸水溶液, 用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而仅除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得上述肽-叠氮修饰硫酯连接体连接物-NHS活化体 (3.0mg, 1.19 $\mu$ mol)。

[2609] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  1257  $[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$  838  $[M+3H]^{3+}$

[2610] [化学式81]



[2611]



[2612] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

[2613] 将上述肽-叠氮修饰硫酯连接体连接物-NHS活化体 (3.0mg, 1.20 $\mu$ mol) 溶解于 0.5mL 的 N,N'-二甲基甲酰胺, 加入上述二苯并环辛炔-马来酰亚胺 (0.6mg, 1.2 $\mu$ mol) 并搅拌 16 小时。向反应液中加入 0.1% 三氟乙酸水溶液, 用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而仅除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得上述肽-马来酰亚胺修饰硫酯连接体连接物-NHS活化体 (2.8mg, 0.95 $\mu$ mol)。

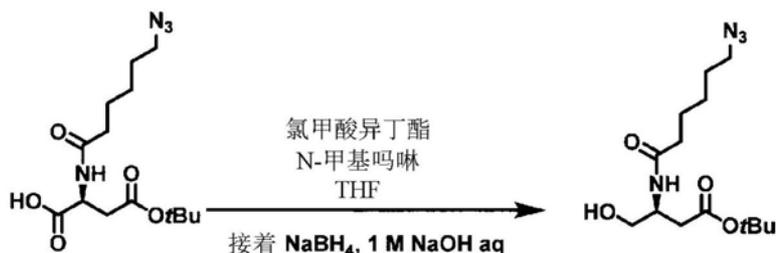
[2614] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  1471  $[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$  981  $[M+3H]^{3+}$ 

[2615] (11-2) 酯连接体的合成和与肽的连接

[2616] (11-2-1) 酯连接体的合成

[2617] [化学式82]

[2618]



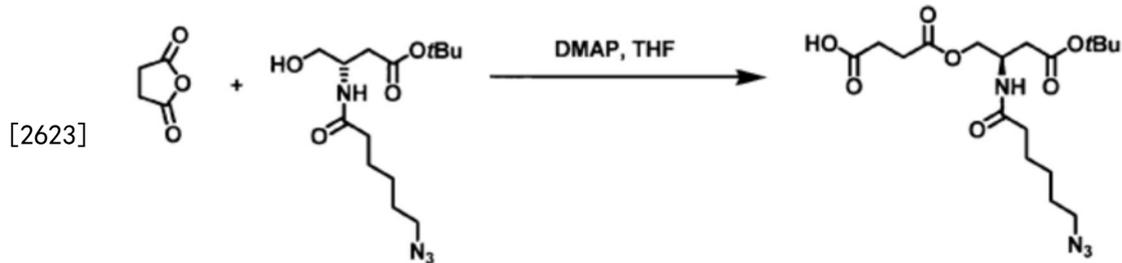
[2619] 使 4-(叔丁氧基-氧代)-2-[(6-叠氮-1-氧代己基)氨基]丁酸 (50mg, 0.152mmol) 溶解于 THF (1.5mL), 在 0 $^{\circ}$ C 下加入氯甲酸异丁酯 (22.7 $\mu$ L, 0.167mmol)、N-甲基吗啉 (21.7 $\mu$ L, 0.198mmol) 并搅拌 30 分钟, 制备对应的混合酸酐。室温下使硼氢化钠 (28.7mg, 0.76mmol) 溶解于 1M 氢氧化钠水溶液 (1.0mL) 后, 室温下滴加上述的混合酸酐的 THF 溶液。室温下搅拌 16 小时后, 向体系内加入乙酸乙酯, 用水、食盐水清洗后, 回收有机相, 加入无水硫酸镁静置 5 分钟。通过过滤除去硫酸镁, 减压浓缩, 从而获得粗产物后, 通过柱色谱 (二氯甲烷: 甲醇 = 10:1) 纯化。回收含产物的级分, 通过减压浓缩, 获得 4-羟基-3-[(6-叠氮-1-氧代己基)氨基]丁酸叔丁酯 (38.1mg, 0.121mmol)。

[2620]  $^1H$  NMR (400MHz, 氘代氯仿)  $\delta$  6.36 (d,  $J=7.2$ Hz, 1H), 4.20 (m, 1H), 3.69 (dt, 12.4,

4.4Hz, 2H), 3.27 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.50 (d, J=6.0Hz, 2H), 2.22 (t, J=7.2Hz, 2H), 1.53-1.72 (m, 4H), 1.41 (s, 9H), 1.40-1.38 (m, 2H).

[2621] MS (ESI) m/z: 337 [M+Na]<sup>+</sup>

[2622] [化学式83]



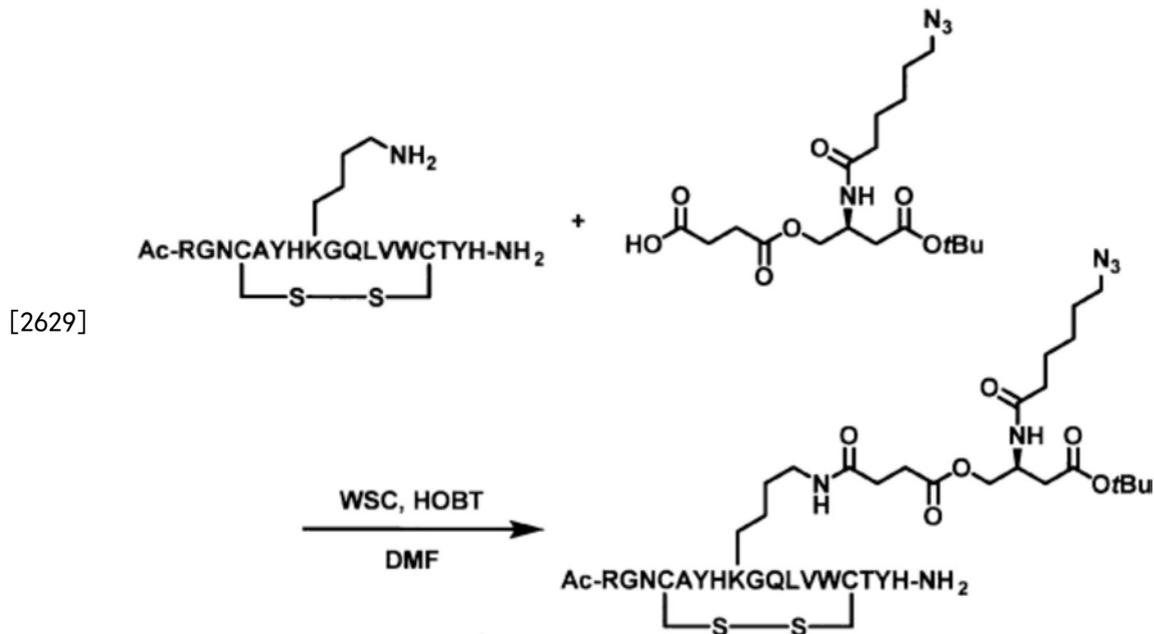
[2624] 使4-羟基-3-[(6-叠氮-1-氧代己基)氨基]丁酸叔丁酯(70.4mg, 0.224mmol)溶解于THF(2.2mL), 在室温下加入琥珀酸酐(67.3mg, 0.673mmol)、N,N-二甲基氨基吡啶(82.2mg, 0.673mmol), 室温下搅拌16小时后, 加入1M氢氧化钠水溶液, 将体系内的pH调整至9.0。向反应液中加入水和乙酸乙酯并进行分液操作后, 回收水相。向水相中加入6M盐酸水溶液, 将体系内的pH调整至3.0后, 进行采用乙酸乙酯的分液萃取后, 用食盐水清洗有机相后, 加入无水硫酸镁并静置5分钟。通过过滤除去硫酸镁, 减压浓缩, 从而获得4-[4-(叔丁氧基-氧代)-2-(6-叠氮-1-氧代己基)氨基]氧基-4-氧代丙酸(78.9mg, 0.190mmol)。

[2625] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氘代氯仿) δ6.28 (d, J=8.0Hz, 2H), 4.52 (m, 1H), 4.29 (dd, J=11.2, 4.4, 1H), 4.15 (dd, J=11.2, 5.6), 3.28 (m, 2H), 2.66 (m, 4H), 2.49 (d, J=6.4Hz, 2H), 2.18 (t, J=7.2, 2H), 1.72-1.50 (m, 4H), 1.42 (s, 9H), 1.41-1.38 (m, 2H)。

[2626] MS (ESI) m/z: 415 [M+H]<sup>+</sup>

[2627] (11-2-2) 酯连接体与肽的连接

[2628] [化学式84]



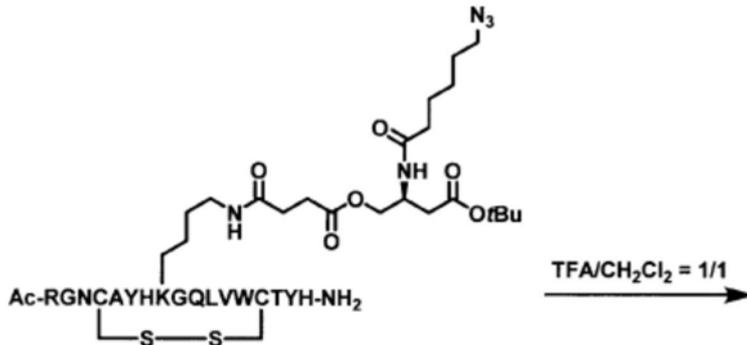
[2630] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

[2631] 将实施例1-2中合成的Ac-RGNCA YHKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:39) 的肽(20mg,

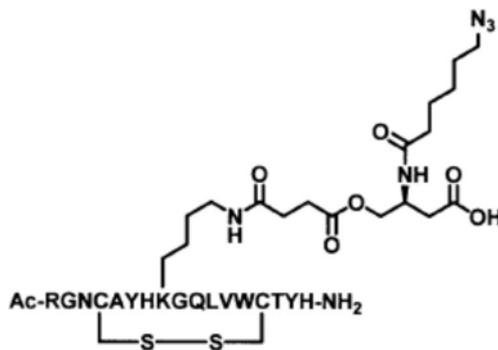
9.63 $\mu\text{mol}$ ,其中第4位和第14位的2个半胱氨酸分别在分子内形成二硫键)溶解于1mL的N,N'-二甲基甲酰胺,使4-[4-(叔丁氧基-氧代)-2-(6-叠氮-1-氧代己基)氨基]氧基-4-氧代丙酸(39.9mg,96.3 $\mu\text{mol}$ )、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(25.8mg,0.135mmol)、1-羟基苯并三唑(18.2mg,0.135mmol)溶解于1mL的DMF,加入体系中。在室温下搅拌12小时后,加入0.1%三氟乙酸水溶液,用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分,通过减压浓缩而仅除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽连接体连接-tBu体(18.2mg,7.36 $\mu\text{mol}$ )。

[2632] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  1236  $[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$  824  $[M+3H]^{3+}$

[2633] [化学式85]



[2634]

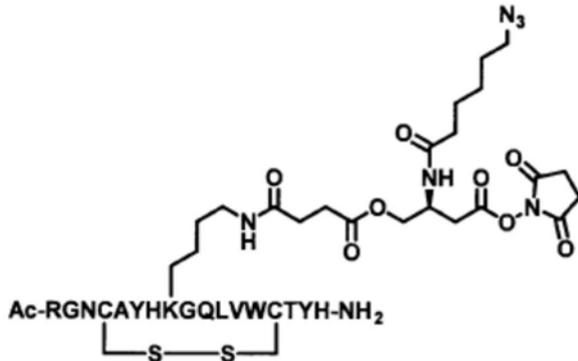
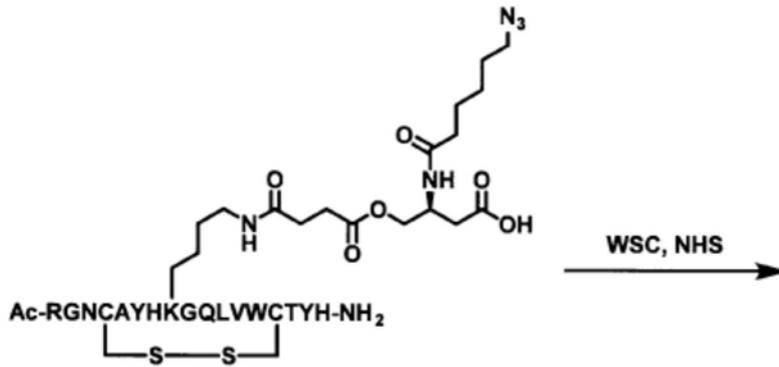


[2635] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

[2636] 将上述肽连接体连接物(16.5mg,6.67 $\mu\text{mol}$ )溶解于1.0mL二氯甲烷中,加入1.0mL三氟乙酸,在室温中搅拌1小时。进行减压浓缩后,加入0.1%三氟乙酸水溶液,用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分,通过减压浓缩而仅除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽连接体连接物-羧酸体(15.2mg,6.29 $\mu\text{mol}$ )。

[2637] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  1208  $[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$  805  $[M+3H]^{3+}$

[2638] [化学式86]



[2640] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

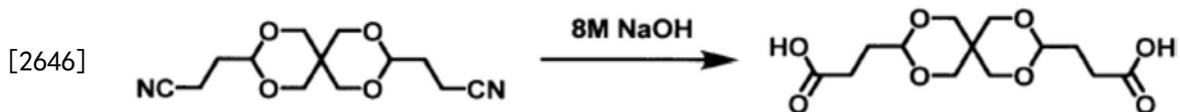
[2641] 将上述肽连接体连接物-羧酸体 (3.0mg, 1.21 $\mu$ mol) 溶解于1mL的N,N'-二甲基甲酰胺, 加入1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (4.7mg, 24.3 $\mu$ mol)、N-羟基琥珀酰亚胺 (4.2mg, 36.4 $\mu$ mol) 搅拌16小时。反应液中加入0.1%三氟乙酸水溶液, 用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而仅除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得上述肽-叠氮修饰酯连接体连接物-NHS活化体 (3.0mg, 1.19 $\mu$ mol)。

[2642] MS (ESI) m/z: z=2 1257 [M+2H]<sup>2+</sup>, z=3 837 [M+3H]<sup>3+</sup>

[2643] (11-3) 缩醛连接体的合成和肽的连接

[2644] (11-3-1) 缩醛连接体的合成

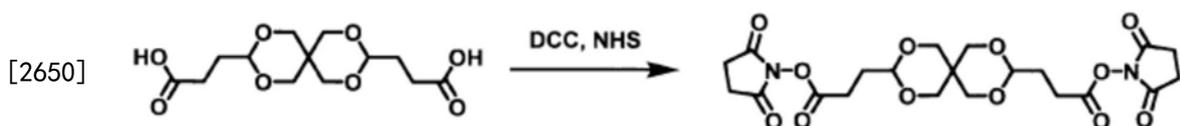
[2645] [化学式87]



[2647] 将3,9-双(2-氰基乙基)-2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷 (200mg, 0.752mmol) 溶解于20mL的8M氢氧化钠水溶液, 在100 $^{\circ}$ C下搅拌16小时。16小时后, 恢复至室温, 向水相中加入6M盐酸水溶液, 将体系内的pH调整至7.0后, 依次加入乙腈、食盐水并进行分液操作。回收乙腈相后, 加入无水硫酸钠并静置5分钟。通过过滤除去硫酸钠, 减压浓缩, 从而获得2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷-3,9-二丙酸 (151mg, 0.497mmol)。

[2648] MS (ESI) m/z: 327 [M+Na]<sup>+</sup>

[2649] [化学式88]

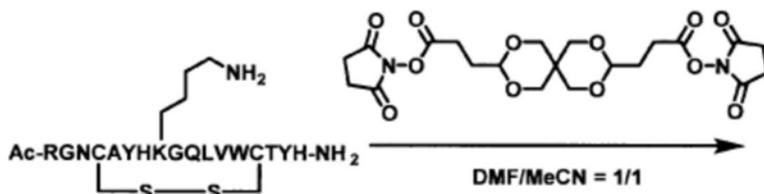


[2651] 将2-[9-(2-甲氧基-2-氧代乙基)-2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷-3-基]乙酸(30.0mg, 0.099mmol) 溶解于0.5mL乙酸乙酯,加入N,N'-二环己基碳二亚胺(22.4mg, 0.109mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(31.2mg, 0.271mmol), 搅拌2小时。过滤生成的白色结晶, 将母液减压浓缩, 获得2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷-3,9-二丙酸双(2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯)(15mg, 31.8 $\mu$ mol)。

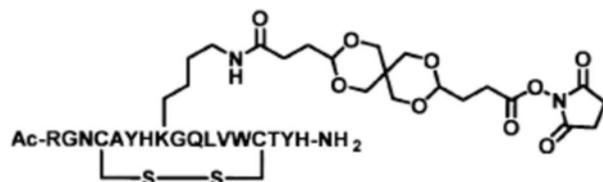
[2652] MS (ESI) m/z: 521 [M+Na]<sup>+</sup>

[2653] (11-3-2) 缩醛连接体与肽的连接

[2654] [化学式89]



[2655]



[2656] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

[2657] 将实施例1-2中合成的Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:39) 的肽(3.0mg, 1.45 $\mu$ mol, 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0.3mL的N,N'-二甲基甲酰胺, 加入2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]十一烷-3,9-二丙酸双(2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯)(14.4mg, 28.9 $\mu$ mol), 在室温下搅拌12小时。加水, 将中性的乙腈和水作为溶剂, 用反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而仅除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得上述肽缩醛连接体连接物-NHS活化体(2.8mg, 1.14 $\mu$ mol)。

[2658] MS (ESI) m/z: z=2 1729 [M+2H]<sup>2+</sup>, z=3 819 [M+3H]<sup>3+</sup>

[2659] [实施例12: 采用各种化合物的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的修饰以及基于ESI-TOFMS的分析]

[2660] (12-1) 采用叠氮修饰硫酯连接体结合性肽试剂的IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2661] 将实施例11的(11-1-2)中合成的肽-叠氮修饰硫酯连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。使120 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社) 溶解于39.8 $\mu$ L的50mM的乙酸钠缓冲液(pH 5.5), 加入2.4 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为12当量), 室温下搅拌1小时。将反应液用Amicon10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH 7.4), 停止反应。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗在148225观测到峰, 产物在引入了两个结合性肽的153018观测到峰。

[2662] (12-2) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2663] 向(12-1)中生成的抗体-肽复合物的PBS溶液中加入2.0 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙

基) 膦酸盐溶液(相对于抗体为100当量), 室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗在50595、50757观测到重链峰, 在23440观测到轻链峰, 产物在重链中引入了结合性肽的52995和53156观察到峰, 与原料同样在23440观测到轻链峰。

[2664] (12-3) 采用马来酰亚胺修饰硫酯连接体结合性肽试剂的IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2665] 将实施例11的(11-1-2)中合成的肽-马来酰亚胺修饰硫酯连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。使120 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于39.8 $\mu$ L的50mM的乙酸钠缓冲液(pH 5.5), 加入2.4 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为12当量), 室温下搅拌1小时。将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH 7.4), 停止反应。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗在148225观测到峰, 产物在引入了两个结合性肽的153901观测到峰。

[2666] (12-4) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2667] 向(12-3)中生成的抗体-肽复合物的PBS溶液中加入2.0 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦酸盐溶液(相对于抗体为100当量), 室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗在50594、50757观测到重链峰, 在23440观测到轻链峰, 产物在重链中引入了结合性肽的53421和53600观察到峰, 与原料同样在23440观测到轻链峰。

[2668] (12-5) 采用叠氮修饰酯连接体结合性肽试剂的IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2669] 将实施例11的(11-2-2)中合成的肽-叠氮修饰酯连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。使120 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于39.8 $\mu$ L的50mM的乙酸钠缓冲液(pH 5.5), 加入2.4 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为12当量), 室温下搅拌1小时。将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH 7.4), 停止反应。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗在148225观测到峰, 产物在引入了两个结合性肽的153028观测到峰。

[2670] (12-6) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2671] 向(12-5)中生成的抗体-肽复合物的PBS溶液中加入2.0 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦酸盐溶液(相对于抗体为100当量), 室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗在50594和50757观测到重链峰, 在23440观测到轻链峰, 产物在重链中引入了结合性肽的52994和53154确认到峰, 与原料同样在23440观测到轻链峰。

[2672] (12-7) 采用缩醛连接体结合性肽试剂的IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2673] 将实施例11的(11-3-2)中合成的肽缩醛连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。使120 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于39.8 $\mu$ L的50mM的乙酸钠缓冲液(pH 5.5), 加入2.4 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为12当量), 室温下搅拌1小时。将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH 7.4), 停止反应。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗在148238观测到峰, 产物在引入了两个结合性肽的153522观测到峰。

[2674] (12-8) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2675] 向(12-7)中生成的抗体-肽复合物的PBS溶液中加入2.0 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦酸盐溶液(相对于抗体为100当量),室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗在50595、50757观测到重链峰,在23440观测到轻链峰,产物在重链中引入了结合性肽的52940和53103观察到峰,与原料同样在23440观测到轻链峰。

[2676] [实施例13:曲妥珠单抗-肽复合物的切割、以及它们的产物的基于ESI-TOFMS的分析]

[2677] (13-1) 曲妥珠单抗-肽复合物的连接体切割以及产物的基于ESI-TOFMS的分析

[2678] 首先,将40 $\mu$ g实施例12的(12-1)中合成的曲妥珠单抗-肽复合物溶解于100mM的Tris-盐酸缓冲液(pH 8.5),调整至2.0 $\mu$ M后,室温下搅拌48小时,将连接体中的硫酸酯键切割。利用ESI-TOFMS测定了质量,曲妥珠单抗-肽复合物在153018观测到峰,产物在引入了2个叠氮的148729观测到峰。

[2679] (13-2) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2680] 向(13-1)中生成的抗体-肽复合物中加入2.0 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦酸盐溶液(相对于抗体为100当量),室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗-肽复合物在52995和53155观测到重链峰,在23440观测到轻链峰,产物在重链中引入了叠氮的50850和51010观察到峰,与原料同样在23440观测到轻链峰。

[2681] (13-3) 曲妥珠单抗-肽复合物的连接体切割以及产物的基于ESI-TOFMS的分析

[2682] 首先,将20 $\mu$ g实施例12的(12-3)中合成的曲妥珠单抗-肽复合物溶解于100mM的Tris-盐酸缓冲液(pH 8.5),调整至2.0 $\mu$ M后,室温下搅拌48小时,将连接体中的硫酸酯键切割。利用ESI-TOFMS测定了质量,曲妥珠单抗-肽复合物在153901观测到峰,产物在引入2个马来酰亚胺的149476观测到峰。

[2683] (13-4) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2684] 向(13-3)中生成的抗体-肽复合物中加入2.0 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦酸盐溶液(相对于抗体为等量),室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,曲妥珠单抗-肽复合物在53421和53600观测到重链峰,在23440观测到轻链峰,产物在重链中引入了马来酰亚胺的51278和51439观察到峰,与原料同样在23440观测到轻链峰。

[2685] (13-5) 酯连接体的切割和基于ESI-TOFMS的分析

[2686] 在任意的缓冲液(pH 4.5~pH 9.0)中溶解实施例12的(12-5)中合成的抗体-肽酯连接体复合物,加入酯酶类酶并在室温下搅拌,从而酯结构水解,抗体上残留叠氮基。可对其利用ESI-TOFMS测定质量。

[2687] (13-6) 曲妥珠单抗-肽复合物的连接体切割以及产物的基于ESI-TOFMS的分析

[2688] 首先,将20 $\mu$ g实施例12的(12-7)中合成的曲妥珠单抗-肽复合物溶解于100mM的甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 2.0),调整至2.0 $\mu$ M后,室温下搅拌,将连接体中的缩醛键切割。利用ESI-TOFMS测定了质量,曲妥珠单抗-肽复合物在1535223观测到峰,产物在引入2个醛的的148452观测到峰。

[2689] (13-7) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2690] 向(13-1)中生成的抗体-肽复合物中加入2.0 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦酸盐溶液(相对于抗体为100当量),室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的抗体-肽复合物在52940和53103观测到重链峰,在23440观测到轻链峰,产物在重链中引入了醛的50683和50845观察到峰,与原料同样在23440观测到轻链峰。

[2691] [实施例14:曲妥珠单抗-叠氮引入体与低分子化合物的偶联]

[2692] (14-1) 曲妥珠单抗-叠氮引入体与低分子化合物的偶联

[2693] 将实施例13的(13-1)中合成的曲妥珠单抗的叠氮引入体溶解于20mM的PBS缓冲液并调节为0.3mM后,添加20 $\mu$ L的Sigma Aldrich公司制的二苯并环辛炔-Cy3(0.94mM,溶解于DMF),室温下搅拌12小时。将反应液用Amicon 10K溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH 7.4),停止反应。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗的叠氮引入体在148706观测到峰,产物在引入2个低分子的150688观测到峰。

[2694] (14-2) 曲妥珠单抗-低分子化合物复合物的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2695] 向(14-1)中生成的抗体-低分子复合物的PBS溶液中加入2 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦酸盐溶液(相对于抗体为100当量),室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗的叠氮引入体在50850和51010观测到重链峰,在23440观测到轻链峰,产物在重链中引入了低分子的51834和51990观察到峰,与原料同样在23440观测到轻链峰。

[2696] [实施例15:曲妥珠单抗的叠氮引入体的肽谱]

[2697] (15-1) 曲妥珠单抗的叠氮引入体(实施例14)的胰蛋白酶处理

[2698] 向1.5mL低吸附微型试管中加入10 $\mu$ L样品溶液、溶解于50mM碳酸氢铵缓冲液、20%三氟乙醇中的20mM的二硫苏糖醇水溶液10 $\mu$ L,在65 $^{\circ}$ C加热1分钟后,添加10 $\mu$ L的50mM的碘乙酰胺水溶液,避光下于室温以300rpm振荡反应30分钟。反应后,加入40 $\mu$ L的50mM碳酸氢铵缓冲液并搅拌,添加10 $\mu$ L的20ng/ $\mu$ L的胰蛋白酶水溶液(蛋白质组学级,编号T6567-5 $\times$ 20 $\mu$ g(SIGMA)),于37 $^{\circ}$ C酶消化18小时。消化后,加入2 $\mu$ L的20%三氟乙酸水溶液,停止反应。然后,稀释2倍而形成最终浓度0.25%三氟乙酸水溶液,用于LC-MS/MS测定。

[2699] (15-2) 曲妥珠单抗的LC-MS/MS测定条件

[2700] (分析装置)

[2701] 纳米HPLC:EASY-nLC 1000(赛默飞世尔科技公司)

[2702] 质谱仪:Tribid质谱仪Orbitrap Fusion(赛默飞世尔科技公司)

[2703] (HPLC分析条件)

[2704] 捕获柱:Acclaim PepMap(注册商标)100,75 $\mu$ m $\times$ 2cm(赛默飞世尔科技公司)

[2705] 分析柱:ESI-柱(NTCC-360/75-3-125,75 $\mu$ m $\times$ 12.5cm,3 $\mu$ m(日京Technos株式会社))

[2706] 流动相A:0.1%甲酸水溶液

[2707] 流动相B:0.1%甲酸,乙腈溶液

[2708] 加载溶液:0.1%三氟乙酸水溶液

- [2709] 流速:300nL/分钟
- [2710] 样品注入量:1 $\mu$ L
- [2711] 梯度条件(B%):2%(0.0-0.5分钟)、2% $\rightarrow$ 30%(0.5-23.5分钟)、30% $\rightarrow$ 75%(23.5-25.5分钟)、75%(25.5-35.0分钟)
- [2712] (质谱仪的分析条件)
- [2713] 离子化方法:ESI,正离子模式
- [2714] 扫描类型:数据依赖性获取
- [2715] 活化类型:碰撞诱导离解(CID)
- [2716] 数据的获取使用作为附带软件的Xcalibur 3.0(赛默飞世尔科技公司)及Thermo Orbitrap Fusion Tune Application 2.0(赛默飞世尔科技公司)进行。
- [2717] (15-3)曲妥珠单抗的修饰位点的分析条件
- [2718] 关于对LC-MS/MS测定结果的修饰位点分析,使用Proteome Discoverer version 1.4(赛默飞世尔科技公司)进行。
- [2719] 采用Proteome Discoverer的分析,使用Sequest HT作为搜索引擎,前体离子的范围设为350~5000Da,总强度阈值(Total Intensity Threshold)设为50000。此外,将胰蛋白酶设定为消化酶,最大漏切位点(Maximum Missed Cleavage Site)设为3。此外,前体和碎片离子的质量容差(Mass Tolerance)分别设为5ppm和0.5Da。关于静态修饰,作为采用碘乙酰胺的半胱氨酸残基的修饰,设定了脲甲基(+57.021Da)。关于动态修饰,设定了甲硫氨酸的氧化(+15.995Da)和对赖氨酸残基的修饰体(叠氮引入体(+254.102Da)、胺引入体(+228.111Da))。另外,应用滤波器(filter)使得肽置信度(Peptide Confidence)仅为高。
- [2720] 此外,作为修饰位点的检索对象的氨基酸序列的数据,使用图24所示的(1)~(3)。
- [2721] (15-4)曲妥珠单抗的基于LC-MS/MS的修饰位点的分析结果
- [2722] 作为使用LC-MS/MS的分析的结果,观测了曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(叠氮引入体(+254.102Da))的由氨基酸的33个残基形成的肽、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(SEQ ID NO:40)的肽片段的MS谱(实测值:m/z 979.49982,理论值:979.49975,4价)(图25),根据CID谱确认了表示重链的EU numbering中的第246位的赖氨酸残基的修饰的相当于2价的y19的m/z 1192.87(理论值:1192.64)的产物离子(图26)。
- [2723] [实施例16:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用该化合物的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]
- [2724] (16-1) IgG1 Fc结合性肽的合成
- [2725] 利用Fmoc固相合成法合成了Ac-RGNCKYHRGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:42)的序列。肽合成装置使用CEM公司制的Liberty Blue。试剂全部使用渡边化学工业公司制的试剂。树脂为Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL,精氨酸(R)、半胱氨酸(C)、组氨酸(H)进行了双偶联。从树脂的切出以在三氟乙酸:水:三异丙基硅烷:乙二硫醇=94:2.5:1.0:2.5的溶液中搅拌3小时的条件进行。切出后,将树脂通过过滤除去,除去三氟乙酸。向生成的结晶中加入二乙醚进行醚沉淀,通过过滤回收生成的白色结晶。将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈

的混合溶液洗脱,通过LC-MS确认各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得目标物(36.4mg,16.8 $\mu$ mol)。

[2726] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=3$  721.80  $[M+3H]^{3+}$ ,  $z=4$  541.60  $[M+4H]^{4+}$

[2727] (16-2) Ac-RGNCKYHRGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:42) 的第4位和第14位的Cys的分子内二硫键的形成

[2728] [化学式90]



[2729]



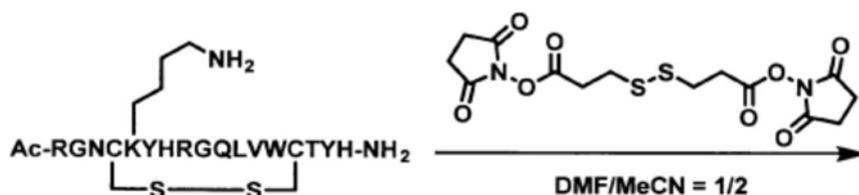
[2730] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:42。

[2731] 将(16-1)中合成的肽(36.4mg,16.8 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(17.0 $\mu$ L,33.6 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(34.0 $\mu$ L,0.336mmol),在室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,停止反应,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而仅除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽(20.3mg,9.40 $\mu$ mol)。

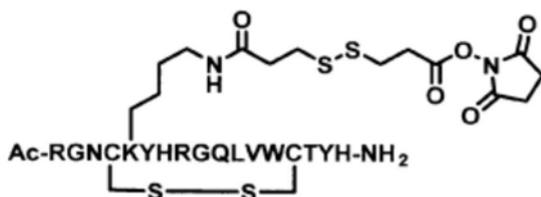
[2732] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=3$  721.25  $[M+3H]^{3+}$ ,  $z=4$  541.20  $[M+4H]^{4+}$

[2733] (16-3) 二硫连接体与肽的连接

[2734] [化学式91]



[2735]



[2736] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:42。

[2737] 将(16-2)中合成的Ac-RGNCKYHRGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:42) (20.3mg,9.40 $\mu$ mol,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N,N'-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸二(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(228mg,0.563mmol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液,室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱

谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(6.80mg,2.78 $\mu$ mol)。

[2738] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=3$  817.60  $[M+3H]^{3+}$ ,  $z=4$  613.45  $[M+4H]^{4+}$

[2739] HPLC纯度:100%

[2740] (16-4) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于MALDI-TOFMS的分析

[2741] 将(16-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使500 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于46.9 $\mu$ L的60mM的乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用MALDI-TOFMS测定了质量,未确认到来源于原料的曲妥珠单抗的峰,引入了一个结合性肽的产物在152639观测到峰。

[2742] (16-5) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[2743] 利用HIC-HPLC对(16-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)4.6 $\times$ 350mm,2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M  $(NH_4)_2SO_4$ , pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa, pH7.0,流速为1.0mL/分钟,梯度设为B 0 $\rightarrow$ 100%,12分钟(数据采集20分钟),柱温为25 $^{\circ}C$ ,温控器温度为RT,检测器以UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[2744] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[2745] a:曲妥珠单抗原料;

[2746] b:曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量。

[2747] UV225nm的情况下,认为保留时间9.454分钟是曲妥珠单抗原料,9.845分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物,10.173分钟是曲妥珠单抗中引入了两个肽的化合物。UV280nm的情况下,认为保留时间9.541分钟是曲妥珠单抗原料,9.936分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物,10.254分钟是曲妥珠单抗中引入了两个肽的化合物(图27)。

[2748] [实施例17:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成以及使用该化合物的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[2749] (17-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[2750] 利用Fmoc固相合成法合成了Ac-RGNCAWHRGKLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:43)的序列。肽合成装置使用CEM公司制的Liberty Blue。试剂全部使用渡边化学工业公司制的试剂。树脂为Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL,精氨酸(R)、半胱氨酸(C)、组氨酸(H)进行了双偶联。从树脂的切出以在三氟乙酸:水:三异丙基硅烷:乙二硫醇=94:2.5:1.0:2.5的溶液中搅拌3小时的条件进行。切出后,将树脂通过过滤除去,除去三氟乙酸。向生成的结晶中加入二乙醚进行醚沉淀,通过过滤回收生成的白色结晶。将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得目标物(64.8mg,30.5 $\mu$ mol)。

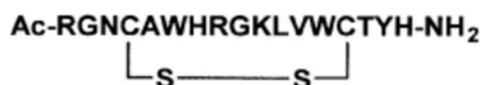
[2751] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=3$  710.45  $[M+3H]^{3+}$

[2752] (17-2) Ac-RGNCAWHRGKLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:43) 的第4位和第14位的Cys处的分子内二硫键的形成

[2753] [化学式92]



[2754]



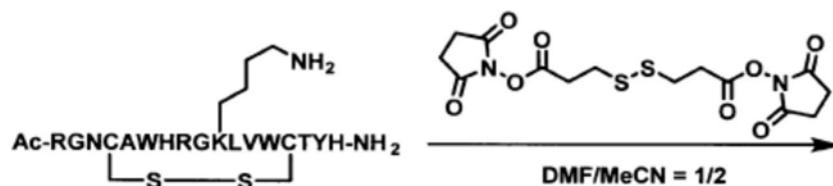
[2755] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:43。

[2756] 将(17-2)中合成的肽(64.8mg, 30.5 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL), 加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(31.0 $\mu$ L, 61.0 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(62.0 $\mu$ L, 610 $\mu$ mol), 在室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液, 停止反应, 将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液, 供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱, 用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱, 利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得目标物(35.3mg, 16.6 $\mu$ mol)。

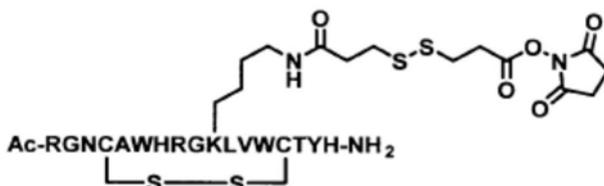
[2757] MS (ESI) m/z: z=3 709.75 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 532.55 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2758] (17-3) 二硫连接体与肽的连接

[2759] [化学式93]



[2760]



[2761] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:43。

[2762] 将(17-2)中合成的Ac-RGNCAWHRGKLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:43) (35.3mg, 16.6 $\mu$ mol, 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N,N'-二甲基甲酰胺(1.00mL), 加入将3,3'-二硫代二丙酸二(N-羟基琥珀酰亚胺酯) (269mg, 0.664mmol) 溶解于乙腈(2.00mL) 而得的溶液, 室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后, 将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液, 供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱, 用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱, 利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(17.5mg, 7.25 $\mu$ mol)。

[2763] MS (ESI) m/z: z=3 806.20 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 604.90 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2764] HPLC纯度:100%

[2765] (17-4) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2766] 将(17-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使500 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于46.9 $\mu$ L的60mM的乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗在148235观测到峰,未观测到来源于引入了结合性肽的产物的峰。

[2767] (17-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2768] 向(17-4)中生成的抗体-肽复合物中加入5 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦盐酸盐溶液(相对于抗体为等量),室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50594、50753观测到峰,以及与原料同样在23435观测到轻链峰。

[2769] (17-6) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[2770] 利用HIC对(17-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)4.6 $\times$ 350mm,2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为1.0mL/分钟,梯度设为B 0 $\rightarrow$ 100%,12分钟(数据采集20分钟),柱温为25 $^{\circ}$ C,温控器温度为RT,检测器用UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[2771] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[2772] a:曲妥珠单抗原料;

[2773] b:曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量。

[2774] UV225nm的情况下,认为保留时间9.469分钟是曲妥珠单抗原料,10.180分钟是来源于肽的峰。UV280nm的情况下,认为保留时间9.563分钟是曲妥珠单抗原料,10.270分钟是来源于肽的峰(图28)。

[2775] [实施例18:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成以及使用该化合物的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[2776] (18-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[2777] 利用Fmoc固相合成法合成了Ac-RGNCKWHRGELVWCTYH-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:44)的序列。肽合成装置使用CEM公司制的Liberty Blue。试剂全部使用渡边化学工业公司制的试剂。树脂为Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL,精氨酸(R)、半胱氨酸(C)、组氨酸(H)进行了双偶联。从树脂的切出以在三氟乙酸:水:三异丙基硅烷:乙二硫醇=94:2.5:1.0:2.5的溶液中搅拌3小时的条件进行。切出后,将树脂通过过滤除去,除去三氟乙酸。向生成的结晶中加入二乙醚进行醚沉淀,通过过滤回收生成的白色结晶。将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得目标物(77.8mg,35.6 $\mu$ mol)。

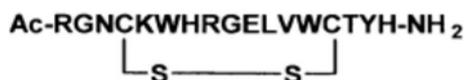
[2778] MS(ESI) m/z: z=3 729.70[M+H]<sup>+</sup>, z=4 547.60[M+H]<sup>+</sup>

[2779] (18-2) Ac-RGNCKWHRGELVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:44) 的第4位和第14位的Cys处的分子内二硫键的形成

[2780] [化学式94]



[2781]



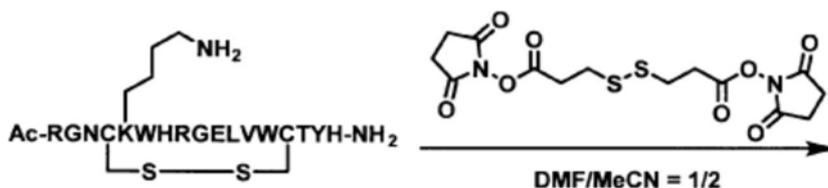
[2782] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:44。

[2783] 将(18-1)中合成的肽(77.8mg, 35.6 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(71.0 $\mu$ L, 142 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(145 $\mu$ L, 1.42mmol),在室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,停止反应,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得目标物(40.0mg, 18.3 $\mu$ mol)。

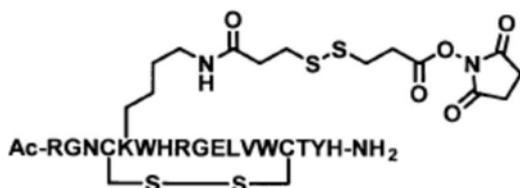
[2784] MS (ESI) m/z: z=3 729.00 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 547.05 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2785] (18-3) 二硫连接体与肽的连接

[2786] [化学式95]



[2787]



[2788] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:44。

[2789] 将(18-2)中合成的Ac-RGNCKWHRGELVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:44) (40.0mg, 18.3 $\mu$ mol, 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N,N'-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸二(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(296mg, 0.733mmol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液,室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶剂洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(20.0mg, 8.09 $\mu$ mol)。

[2790] MS (ESI) m/z: z=3 825.55 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 619.45 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2791] HPLC纯度:31%

[2792] (18-4) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2793] 将(18-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使500 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于46.9 $\mu$ L的60mM的乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗在148222观测到峰,引入了一个结合性肽的产物在150583观测到峰。

[2794] (18-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2795] 向(18-4)中生成的抗体-肽复合物中加入5 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦盐酸盐溶液(相对于抗体为等量),室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50680、50719观测到峰,与原料同样在23438观测到轻链峰。

[2796] (18-6) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[2797] 利用HIC-HPLC对(18-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)4.6 $\times$ 350mm,2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为1.0mL/分钟,梯度设为B 0 $\rightarrow$ 100%,12分钟(数据采集20分钟),柱温为25 $^{\circ}$ C,温控器温度为RT,检测器用UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[2798] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[2799] a:曲妥珠单抗原料;

[2800] b:曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量。

[2801] UV225nm的情况下,认为保留时间9.462分钟是曲妥珠单抗原料,10.142分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物。UV280nm的情况下,认为保留时间9.554分钟是曲妥珠单抗原料,10.230分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物(图29)。

[2802] [实施例19:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用该化合物的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

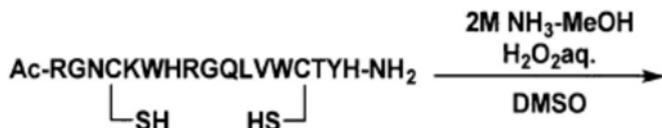
[2803] (19-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[2804] 利用Fmoc固相合成法合成了Ac-RGNCKWHRGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:45)的序列。肽合成装置使用CEM公司制的Liberty Blue。试剂全部使用渡边化学工业公司制的试剂。树脂为Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL,精氨酸(R)、半胱氨酸(C)、组氨酸(H)进行了双偶联。从树脂的切出以在三氟乙酸:水:三异丙基硅烷:乙二硫醇=94:2.5:1.0:2.5的溶液中搅拌3小时的条件进行。切出后,将树脂通过过滤除去,除去三氟乙酸。向生成的结晶中加入二乙醚进行醚沉淀,通过过滤回收生成的白色结晶。将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得目标物(74.1mg,34.0 $\mu$ mol)。

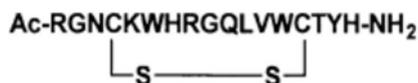
[2805] MS(ESI) m/z: z=3 729.40[M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 547.35[M+4H]<sup>4+</sup>

[2806] (19-2) Ac-RGNCKWHRGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:45) 的第4位和第14位的Cys处的分子内二硫键的形成

[2807] [化学式96]



[2808]



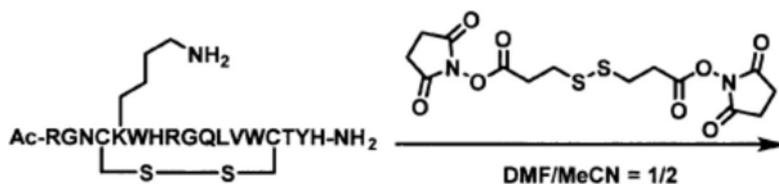
[2809] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:45。

[2810] 将(19-2)中合成的肽(74.1mg, 34.0 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(67.8 $\mu$ L, 0.136mmol)、过氧化氢水溶液(139 $\mu$ L, 1.36mmol),在室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,停止反应,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得目标物(38.2mg, 17.5 $\mu$ mol)。

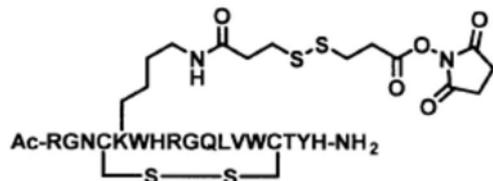
[2811] MS (ESI) m/z: z=3 728.80 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 546.85 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2812] (19-3) 二硫连接体与肽的连接

[2813] [化学式97]



[2814]



[2815] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:45。

[2816] 将(19-2)中合成的Ac-RGNCKWHRGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:45) (38.2mg, 17.5 $\mu$ mol, 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N,N'-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸二(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(283mg, 0.70mmol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液,室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(16.5mg, 6.68 $\mu$ mol)。

[2817] MS (ESI) m/z: z=3 825.25 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 619.25 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2818] HPLC纯度:100%

[2819] (19-4) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2820] 将(19-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使500 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于46.9 $\mu$ L的60mM的乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗在148064观测到峰,引入了一个结合性肽的产物在150600观测到峰。

[2821] (19-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2822] 向(19-4)中生成的抗体-肽复合物中加入5 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦盐酸盐溶液(相对于抗体为等量),室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50683、50717观测到峰,与原料同样在23440观测到轻链峰。

[2823] (19-6) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[2824] 利用HIC-HPLC对(19-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)4.6 $\times$ 350mm,2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为1.0mL/分钟,梯度设为B 0 $\rightarrow$ 100%,12分钟(数据采集20分钟),柱温为25 $^{\circ}$ C,温控器温度为RT,检测器用UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[2825] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[2826] a:曲妥珠单抗原料;

[2827] b:曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量。

[2828] UV225nm的情况下,认为保留时间9.458分钟是曲妥珠单抗原料,10.137分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物。UV280nm的情况下,认为保留时间9.550分钟是曲妥珠单抗原料,10.225分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物(图30)。

[2829] [实施例20:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成以及使用该化合物的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

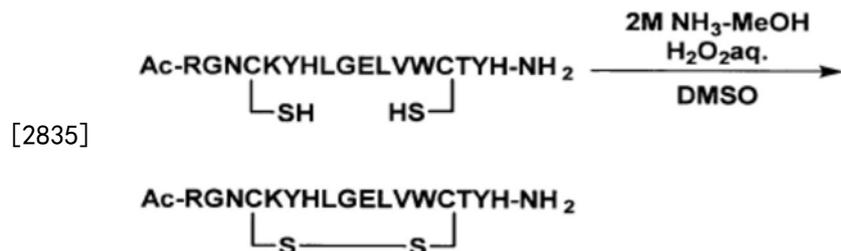
[2830] (20-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[2831] 利用Fmoc固相合成法合成了Ac-RGNCKYHLGELVWCTYH-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:46)的序列。肽合成装置使用CEM公司制的Liberty Blue。试剂全部使用渡边化学工业公司制的试剂。树脂为Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL,精氨酸(R)、半胱氨酸(C)、组氨酸(H)进行了双偶联。从树脂的切出以在三氟乙酸:水:三异丙基硅烷:乙二硫醇=94:2.5:1.0:2.5的溶液中搅拌3小时的条件进行。切出后,将树脂通过过滤除去,除去三氟乙酸。向生成的结晶中加入二乙醚进行醚沉淀,通过过滤回收生成的白色结晶。将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得目标物(34.5mg,16.3 $\mu$ mol)。

[2832] MS(ESI) m/z: z=3 707.80[M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 531.10[M+4H]<sup>4+</sup>

[2833] (20-2) Ac-RGNCKYHLGELVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:46) 的第4位和第14位的Cys处的分子内二硫键的形成

[2834] [化学式98]



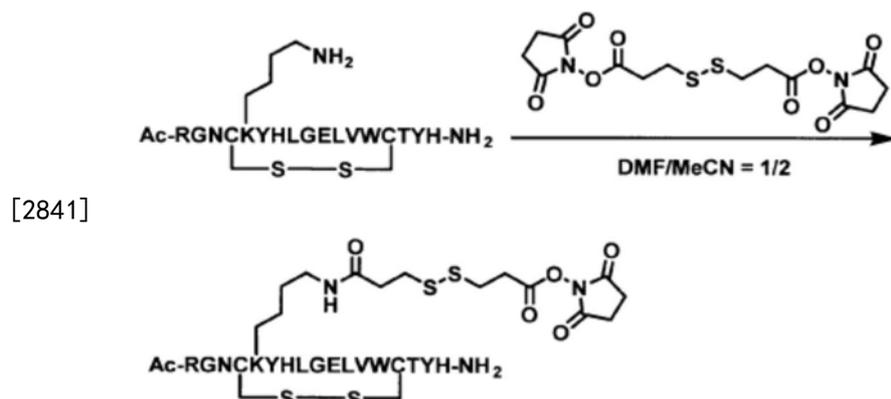
[2836] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:46。

[2837] 将(20-1)中合成的肽(34.5mg, 16.3 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(17.0 $\mu$ L, 32.6 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(33.0 $\mu$ L, 0.326mmol),在室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,停止反应,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得目标物(15.6mg, 7.37 $\mu$ mol)。

[2838] MS (ESI) m/z: z=3 707.10 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 530.60 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2839] (20-3) 二硫连接体与肽的连接

[2840] [化学式99]



[2842] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:46。

[2843] 将(20-2)中合成的Ac-RGNCKYHLGELVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:46) (15.6mg, 7.37 $\mu$ mol, 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N,N'-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸二(N-羟基琥珀酰亚胺酯) (119mg, 0.295mmol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液,室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(5.00mg, 2.08 $\mu$ mol)。

[2844] MS (ESI) m/z: z=2 1204.85 [M+2H]<sup>2+</sup>, z=3 803.50 [M+3H]<sup>3+</sup>

[2845] HPLC纯度:70%

[2846] (20-4) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2847] 将(20-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使500 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于46.9 $\mu$ L的60mM的乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。

[2848] (20-5) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[2849] 利用HIC-HPLC对(20-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)4.6 $\times$ 350mm,2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为1.0mL/分钟,梯度设为B 0 $\rightarrow$ 100%,12分钟(数据采集20分钟),柱温为25 $^{\circ}$ C,温控器温度为RT,检测器用UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[2850] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[2851] a: 曲妥珠单抗原料;

[2852] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量。

[2853] UV225nm的情况下,认为在保留时间9.581分钟观测到曲妥珠单抗原料的峰,在10.089分钟观测到峰。UV280nm的情况下,认为在保留时间9.663分钟观测到曲妥珠单抗原料的峰,在10.307分钟观测到峰(图31)。

[2854] [实施例21:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成以及使用该化合物的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[2855] (21-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[2856] 利用Fmoc固相合成法合成了Ac-RGNCKYHLGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:47)的序列。肽合成装置使用CEM公司制的Liberty Blue。试剂全部使用渡边化学工业公司制的试剂。树脂为Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL,精氨酸(R)、半胱氨酸(C)、组氨酸(H)进行了双偶联。从树脂的切出以在三氟乙酸:水:三异丙基硅烷:乙二硫醇=94:2.5:1.0:2.5的溶液中搅拌3小时的条件进行。切出后,将树脂通过过滤除去,除去三氟乙酸。向生成的结晶中加入二乙醚进行醚沉淀,通过过滤回收生成的白色结晶。将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得目标物(53.0mg,25.0 $\mu$ mol)。

[2857] MS(ESI) m/z: z=3 707.40[M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 530.80[M+4H]<sup>4+</sup>

[2858] (21-2) Ac-RGNCKYHLGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:47)的第4位和第14位的Cys处的分子内二硫键的形成

[2859] [化学式100]



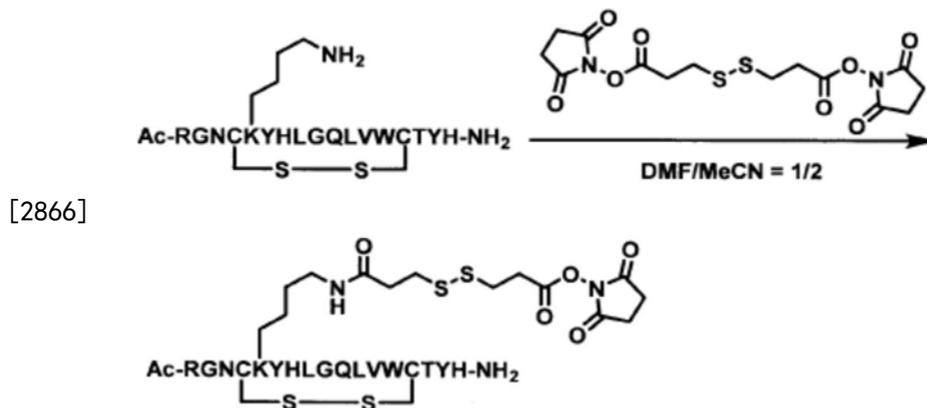
[2861] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:47。

[2862] 将(21-1)中合成的肽(53.0mg, 25.0 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(25.0 $\mu$ L, 50.0 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(51.0 $\mu$ L, 0.500mmol),在室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,停止反应,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得目标物(23.2mg, 10.9 $\mu$ mol)。

[2863] MS (ESI) m/z: z=3 706.75 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 530.35 [M+4H]<sup>4+</sup>

[2864] (21-3) 二硫连接体与肽的连接

[2865] [化学式101]



[2867] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:47。

[2868] 将(21-2)中合成的Ac-RGNCKYHLGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:47)(23.2mg, 10.9 $\mu$ mol,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N,N'-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸二(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(176mg, 0.436mmol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液,室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(6.40mg, 2.66 $\mu$ mol)。

[2869] MS (ESI) m/z: z=2 1204.30 [M+2H]<sup>2+</sup>, z=3 803.15 [M+3H]<sup>3+</sup>

[2870] HPLC纯度:61%

[2871] (21-4) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2872] 将(21-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使500 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于46.9 $\mu$ L

的60mM的乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗在148069观测到峰,引入了一个结合性肽的产物在150515观测到峰,引入了两个结合性肽的产物在152972观测到峰。

[2873] (21-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2874] 向(21-4)中生成的抗体-肽复合物中加入5 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦酸盐溶液(相对于抗体为等量),室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50683、50844观测到峰,与原料同样在23439观测到轻链峰。

[2875] (21-6) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[2876] 利用HIC-HPLC对(21-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)4.6 $\times$ 350mm,2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为1.0mL/分钟,梯度设为B 0 $\rightarrow$ 100%,12分钟(数据采集20分钟),柱温为25 $^{\circ}$ C,温控器温度为RT,检测器用UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[2877] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[2878] a: 曲妥珠单抗原料;

[2879] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量。

[2880] UV225nm的情况下,认为保留时间9.454分钟是曲妥珠单抗原料,9.877分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物,10.230分钟是引入了两个肽的化合物。UV280nm的情况下,认为保留时间9.540分钟是曲妥珠单抗原料,9.966分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物,10.317分钟是引入了两个肽的化合物(图32)。

[2881] [实施例22:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成以及使用该化合物的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

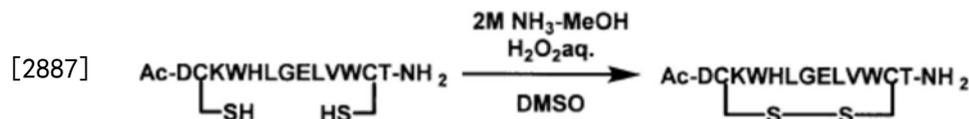
[2882] (22-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[2883] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成了Ac-DCKWHLGELVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:48)的序列。获得目标物(71.1mg,43.6 $\mu$ mol)。

[2884] MS(ESI) m/z: z=2 816.350[M+2H]<sup>2+</sup>

[2885] (22-2) Ac-DCKWHLGELVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:48)的第2位和第12位的Cys处的分子内二硫键的形成

[2886] [化学式102]



[2888] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:48。

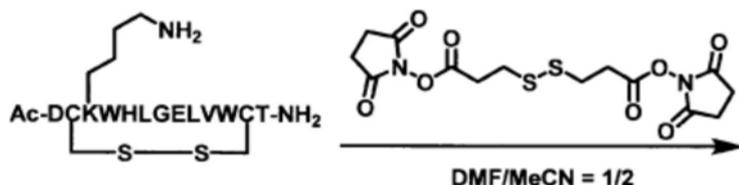
[2889] 将(22-1)中合成的肽(71.1mg,43.6 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(43.6 $\mu$ L,87.2 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(88.8 $\mu$ L,87.2 $\mu$ mol),在室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,停止反应,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷

基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽(31.6mg,19.4 $\mu$ mol)。

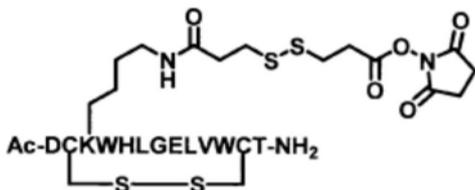
[2890] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  815.350  $[M+2H]^{2+}$

[2891] (22-3) 二硫连接体与肽的连接

[2892] [化学式103]



[2893]



[2894] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:48。

[2895] 将(22-2)中合成的Ac-DCKWHLGELVWCT-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:48) (31.6mg,19.4 $\mu$ mol,其中第2位和第12位的2个半胱氨酸分别在分子内形成二硫键)溶解于N,N'-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸二(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(312mg,776 $\mu$ mol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液,室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(14.2mg,7.40 $\mu$ mol)。

[2896] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  960.05  $[M+2H]^{2+}$

[2897] HPLC纯度:70%

[2898] (22-4) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2899] 将(22-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使500 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于46.9 $\mu$ L的60mM的乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。

[2900] (22-5) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[2901] 利用HIC-HPLC对(22-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)4.6 $\times$ 350mm,2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为1.0mL/分钟,梯度设为B 0 $\rightarrow$ 100%,12分钟(数据采集20分钟),柱温为25 $^{\circ}$ C,温控器温度为RT,检测器用UV225nm (Ch1)、280nm (Ch2) 这2个波长进行了检测。

[2902] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[2903] a: 曲妥珠单抗原料;

[2904] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量。

[2905] UV225nm的情况下,在保留时间11.193分钟、11.981分钟观测到峰。UV280nm的情况下,在保留时间11.257分钟、12.057分钟观测到峰(图33)。

[2906] [实施例23:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成以及使用该化合物的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

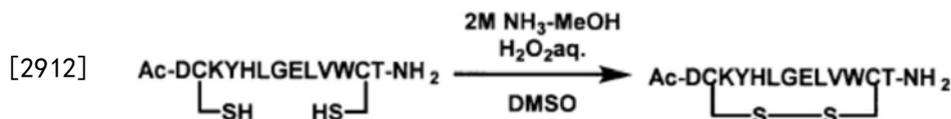
[2907] (23-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[2908] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成了Ac-DCKYHLGELVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:49)的序列。获得目标物(28.0mg,17.4μmol)。

[2909] MS (ESI) m/z: z=2 804.80 [M+2H]<sup>2+</sup>

[2910] (23-2) Ac-DCKYHLGELVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:49)的第2位和第12位的Cys处的分子内二硫键的形成

[2911] [化学式104]



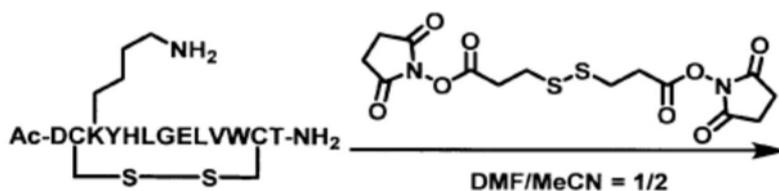
[2913] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:49。

[2914] 将(23-1)中合成的肽(28.0mg,17.4μmol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(17.4μL,34.8μmol)、过氧化氢水溶液(35.4μL,348μmol),在室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,停止反应,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽(18.0mg,11.2μmol)。

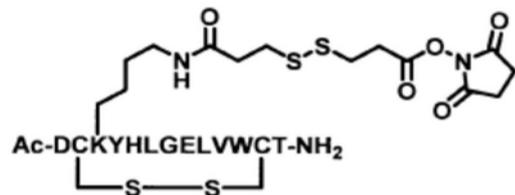
[2915] MS (ESI) m/z: z=2 803.90 [M+2H]<sup>2+</sup>

[2916] (23-3) 二硫连接体与肽的连接

[2917] [化学式105]



[2918]



[2919] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:49。

[2920] 将(23-2)中合成的Ac-DCKYHLGELVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:49)(18.0mg,11.2μmol,其中第2位和第12位的2个半胱氨酸分别在分子内形成二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸二(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(181mg,448μmol)溶解于乙

腈(2.00mL)而得的溶液,室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(2.75mg,1.45 $\mu$ mol)。

[2921] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  948.55  $[M+2H]^{2+}$

[2922] HPLC纯度:75%

[2923] (23-4) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2924] 将(23-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使500 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于46.9 $\mu$ L的60mM的乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,引入了一个结合性肽的产物在150001观测到峰,引入了两个结合性肽的产物在151618观测到峰。

[2925] (23-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2926] 向(23-4)中生成的抗体-肽复合物中加入5 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦盐酸盐溶液(相对于抗体为等量),室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50682、50845观测到峰,以及与原料同样在23439观测到轻链峰。

[2927] (23-6) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[2928] 利用HIC-HPLC对(23-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)4.6 $\times$ 350mm,2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M  $(NH_4)_2SO_4$ , pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa, pH7.0,流速为1.0mL/分钟,梯度设为B 0 $\rightarrow$ 100%,12分钟(数据采集20分钟),柱温为25 $^{\circ}C$ ,温控器温度为RT,检测器用UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[2929] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[2930] a: 曲妥珠单抗原料;

[2931] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量。

[2932] UV225nm的情况下,认为保留时间10.347分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物,11.015分钟是曲妥珠单抗中引入了两个肽的化合物。UV280nm的情况下,认为保留时间10.434分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物,11.100分钟是曲妥珠单抗中引入了两个肽的化合物(图34)。

[2933] [实施例24:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成以及使用该化合物的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

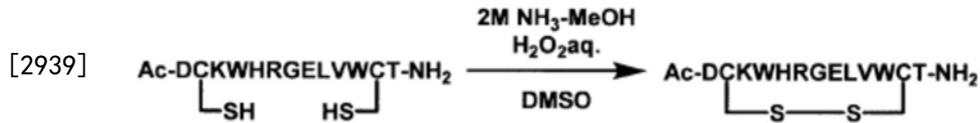
[2934] (24-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[2935] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成了Ac-DCKWHRGELVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:50)的序列。获得目标物(52.8mg,31.5 $\mu$ mol)。

[2936] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  837.85  $[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$  558.90  $[M+3H]^{3+}$

[2937] (24-2) Ac-DCKWHRGELVWCT-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:50) 的第2位和第12位的Cys处的分子内二硫键的形成

[2938] [化学式106]



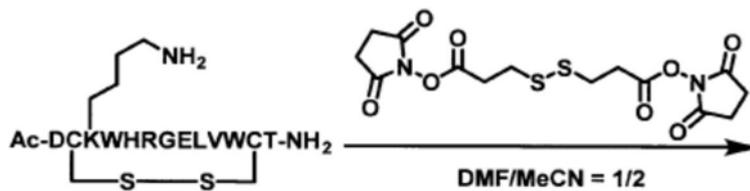
[2940] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:50。

[2941] 将(24-1)中合成的肽(52.8mg, 31.5 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(31.5 $\mu$ L, 63.0 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(64.0 $\mu$ L, 630 $\mu$ mol),在室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,停止反应,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽(26.9mg, 16.1 $\mu$ mol)。

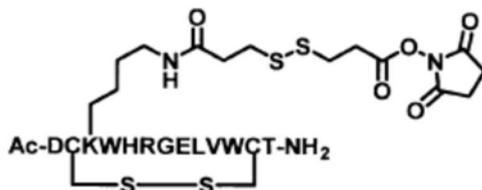
[2942] MS (ESI) m/z: z=2 836.75 [M+2H]<sup>2+</sup>, z=3 558.25 [M+3H]<sup>3+</sup>

[2943] (24-3) 二硫连接体与肽的连接

[2944] [化学式107]



[2945]



[2946] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:50。

[2947] 将(24-2)中合成的Ac-DCKWHRGELVWCT-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:50) (26.9mg, 16.1 $\mu$ mol, 其中第2位和第12位的2个半胱氨酸分别在分子内形成二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸二(N-羟基琥珀酰亚胺酯) (260mg, 644 $\mu$ mol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液,室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(8.40mg, 4.28 $\mu$ mol)。

[2948] MS (ESI) m/z: z=2 981.50 [M+2H]<sup>2+</sup>, z=3 654.70 [M+3H]<sup>3+</sup>

[2949] HPLC纯度:78%

[2950] (24-4) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2951] 将(24-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并

调节为21.6mM。使500 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于46.9 $\mu$ L的60mM的乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,引入了一个结合性肽的产物在150268观测到峰,引入了两个结合性肽的产物在152295观测到峰。

[2952] (24-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2953] 向(24-4)中生成的抗体-肽复合物中加入5 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦酸盐溶液(相对于抗体为等量),室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50682、50841观测到峰,以及与原料同样在23438观测到轻链峰。

[2954] (24-6) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[2955] 利用HIC-HPLC对(24-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)4.6 $\times$ 350mm,2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为1.0mL/分钟,梯度设为B 0 $\rightarrow$ 100%,12分钟(数据采集20分钟),柱温为25 $^{\circ}$ C,温控器温度为RT,检测器用UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[2956] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[2957] a:曲妥珠单抗原料;

[2958] b:曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量。

[2959] UV225nm的情况下,认为保留时间10.749分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物,11.679分钟是曲妥珠单抗中引入了两个肽的化合物。UV280nm的情况下,认为保留时间10.849分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物,11.782分钟是曲妥珠单抗中引入了两个肽的化合物(图35)。

[2960] [实施例25:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成以及使用该化合物的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

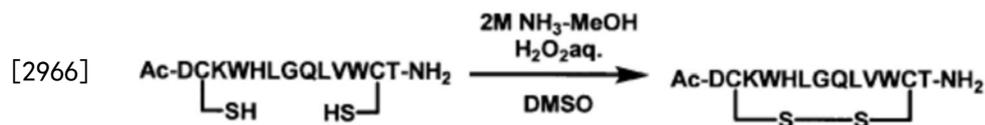
[2961] (25-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[2962] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成了Ac-DCKWHLGQLVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:51)的序列。获得目标物(68.5mg,42.0 $\mu$ mol)。

[2963] MS(ESI) m/z:z=2 815.90[M+2H]<sup>2+</sup>,z=3 544.25[M+3H]<sup>3+</sup>

[2964] (25-2) Ac-DCKWHLGQLVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:51)的第2位和第12位的Cys处的分子内二硫键的形成

[2965] [化学式108]



[2967] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:51。

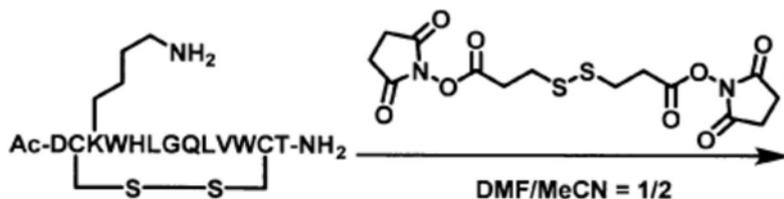
[2968] 将(25-1)中合成的肽(68.5mg,42.0 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(42.0 $\mu$ L,84.0 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(85.7 $\mu$ L,840 $\mu$ mol),在室温下搅拌20小时。向反应溶

液中加入2M三氟乙酸水溶液,停止反应,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽(30.6mg,18.8 $\mu$ mol)。

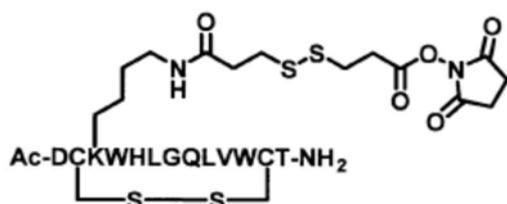
[2969] MS (ESI)  $m/z: z=2$  814.90  $[M+2H]^{2+}$

[2970] (25-3) 二硫连接体与肽的连接

[2971] [化学式109]



[2972]



[2973] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:51。

[2974] 将(25-2)中合成的Ac-DCKWHLGQLVWCT-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:51) (30.6mg,18.8 $\mu$ mol,其中第2位和第12位的2个半胱氨酸分别在分子内形成二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸二(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(304mg,752 $\mu$ mol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液,室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,获得上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(4.10mg,2.14 $\mu$ mol)。

[2975] MS (ESI)  $m/z: z=2$  959.45  $[M+2H]^{2+}$

[2976] HPLC纯度:74%

[2977] (25-4) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[2978] 将(42-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使500 $\mu$ g的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社)溶解于46.9 $\mu$ L的60mM的乙酸钠缓冲液(pH 4.7),加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,引入了一个结合性肽的产物在150025观测到峰,引入了两个结合性肽的产物在151878观测到峰。

[2979] (25-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[2980] 向(25-4)中生成的抗体-肽复合物中加入5 $\mu$ L的7mM的三(2-羧基乙基)膦酸盐溶液(相对于抗体为等量),室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引

入了硫代丙酰基的50682、50844观测到峰,以及与原料同样在23439观测到轻链峰。

[2981] (25-6) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[2982] 利用HIC-HPLC对(25-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)  $4.6 \times 350\text{mm}$ ,  $2.5\mu\text{m}$ 。使用A缓冲液:  $0.1\text{M PiNa}$ ,  $2.3\text{M}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{pH}7.0$ 、B缓冲液:  $0.1\text{M PiNa}$ ,  $\text{pH}7.0$ , 流速为  $1.0\text{mL/分钟}$ , 梯度设为B  $0 \rightarrow 100\%$ , 12分钟(数据采集20分钟), 柱温为  $25^\circ\text{C}$ , 温控器温度为RT, 检测器用UV225nm (Ch1)、280nm (Ch2) 这2个波长进行了检测。

[2983] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[2984] a: 曲妥珠单抗原料;

[2985] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量。

[2986] UV225nm的情况下,认为保留时间10.761分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物,11.722分钟是曲妥珠单抗中引入了两个肽的化合物。UV280nm的情况下,认为保留时间10.849分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物,11.807分钟是曲妥珠单抗中引入了两个肽的化合物(图36)。

[2987] [实施例26:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成以及使用该化合物的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

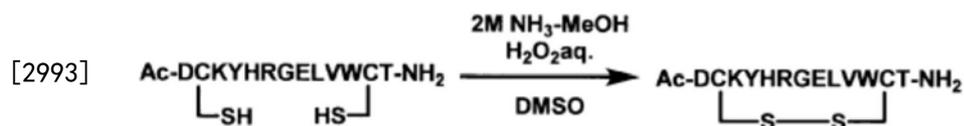
[2988] (26-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[2989] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成了Ac-DCKYHRGELVWCT-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:52)的序列。获得目标物(100mg,  $60.8\mu\text{mol}$ )。

[2990] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$   $826.35[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$   $551.25[M+3H]^{3+}$

[2991] (26-2) Ac-DCKYHRGELVWCT-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:52)的第2位和第12位的Cys处的分子内二硫键的形成

[2992] [化学式110]



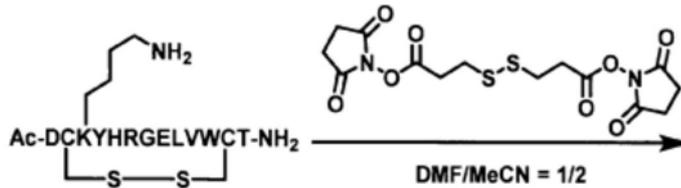
[2994] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:52。

[2995] 将(26-1)中合成的肽(100mg,  $60.8\mu\text{mol}$ )溶解于DMSO ( $5.00\text{mL}$ ), 加入  $2\text{M NH}_3\text{-MeOH}$  ( $60.8\mu\text{L}$ ,  $122\mu\text{mol}$ )、过氧化氢水溶液 ( $125\mu\text{L}$ ,  $1.22\text{mmol}$ ), 在室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入  $2\text{M}$  三氟乙酸水溶液, 停止反应, 将其溶解于  $0.05\%$  三氟乙酸水溶液, 供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱, 用含有  $0.05\%$  三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱, 利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得上述肽 ( $74.5\text{mg}$ ,  $45.2\mu\text{mol}$ )。

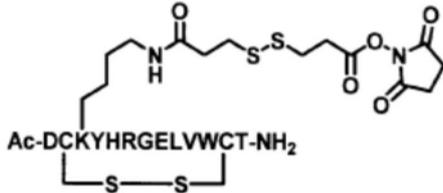
[2996] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$   $825.30[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$   $550.60[M+3H]^{3+}$

[2997] (26-3) 二硫连接体与肽的连接

[2998] [化学式111]



[2999]



[3000] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:52。

[3001] 将(26-2)中合成的Ac-DCKYHRGELVWCT-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:52) (74.5mg, 45.2μmol, 其中第2位和第12位的2个半胱氨酸分别在分子内形成二硫键) 溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL), 加入将3,3'-二硫代二丙酸二(N-羟基琥珀酰亚胺酯) (731mg, 1.81mmol) 溶解于乙腈(2.00mL) 而得的溶液, 室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后, 将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液, 供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱, 用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液洗脱, 利用LC-MS确认了各级分。回收含产物的级分, 通过减压浓缩而除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 获得上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(23.0mg, 18.9μmol)。

[3002] MS (ESI) m/z: z=2 970.00 [M+2H]<sup>2+</sup>

[3003] HPLC纯度: 69%

[3004] (26-4) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰和基于ESI-TOFMS的分析

[3005] 将(26-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使500μg的抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药株式会社) 溶解于46.9μL的60mM的乙酸钠缓冲液(pH 4.7), 加入4.7μL的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量), 室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱, 使反应停止, 置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗在147074观测到峰, 引入了一个结合性肽的产物在150062观测到峰, 引入了两个结合性肽的产物在151873观测到峰。在154562观测到基于副产物的峰。

[3006] (26-5) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[3007] 利用HIC-HPLC对(26-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体进行了分析。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社) 4.6×350mm, 2.5μm。使用A缓冲液: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液: 0.1M PiNa, pH7.0, 流速为1.0mL/分钟, 梯度设为B 0→100%, 12分钟(数据采集20分钟), 柱温为25℃, 温控器温度为RT, 检测器用UV225nm (Ch1)、280nm (Ch2) 这2个波长进行了检测。

[3008] 对于样品, 按照以下的条件进行反应。

[3009] a: 曲妥珠单抗原料;

[3010] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量。

[3011] UV225nm的情况下, 认为保留时间9.464分钟是曲妥珠单抗原料, 10.309分钟是曲

妥珠单抗中引入了一个肽的化合物,10.962分钟是曲妥珠单抗中引入了两个肽的化合物。UV280nm的情况下,认为保留时间9.564分钟是曲妥珠单抗原料,10.395分钟是曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物,11.054分钟是曲妥珠单抗中引入了两个肽的化合物(图37)。

[3012] 实施例27:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

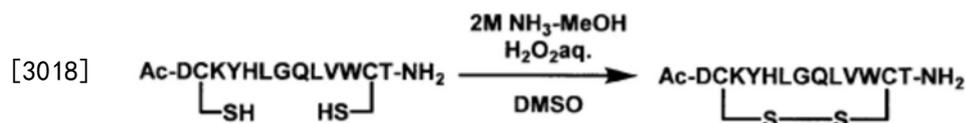
[3013] (27-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[3014] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成Ac-DCKYHLGQLVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:53)的序列。得到目标物(85.6mg,53.3μmol)。

[3015] MS (ESI) m/z: z=2 804.45 [M+2H]<sup>2+</sup>, z=3 536.60 [M+3H]<sup>3+</sup>

[3016] (27-2) 在Ac-DCKYHLGQLVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:53)的第2位和第12位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3017] [化学式112]



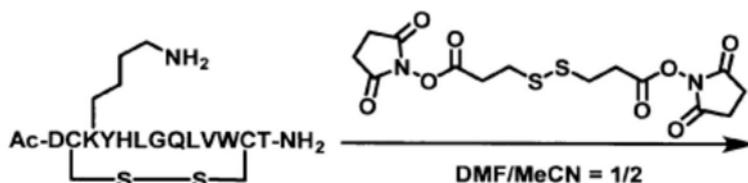
[3019] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:53。

[3020] 将(27-1)中合成的肽(85.6mg,53.3μmol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(53.5μL,107μmol)、过氧化氢水溶液(109μL,1.07mmol)并于室温下进行20小时搅拌。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽(34.2mg,21.3μmol)。

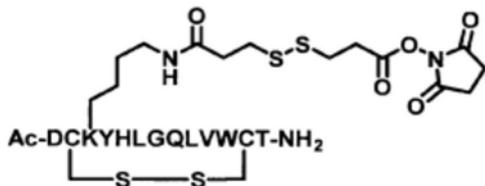
[3021] MS (ESI) m/z: z=2 803.40 [M+2H]<sup>2+</sup>

[3022] (27-3) 二硫连接体与肽的连接

[3023] [化学式113]



[3024]



[3025] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:53。

[3026] 将(27-2)中合成的Ac-DCKYHLGQLVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:53)(34.2mg,21.3μmol,其中第2位和第12位的2个半胱氨酸分别在分子内形成了二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(345mg,852μmol)溶解于乙

腈(2.00mL)而得的溶液,于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(12.0mg,6.34 $\mu$ mol)。

[3027] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  948.00  $[M+2H]^{2+}$

[3028] HPLC纯度:80%

[3029] (27-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3030] 将(27-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。将抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药)500 $\mu$ g溶解于60mM乙酸钠缓冲液(pH 4.7)46.9 $\mu$ L,加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),于室温下搅拌1小时。将反应液添加至NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗于147285观测到峰,引入了一个结合性肽的产物于150031观测到峰,引入了两个结合性肽的产物于151947观测到峰。于154885观测到基于副产物的峰。

[3031] (27-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3032] 向(27-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液5 $\mu$ L(相对于抗体为等量),于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50685、50847观测到峰。

[3033] (27-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[3034] 利用HIC-HPLC分析(27-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)4.6x350mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M  $(NH_4)_2SO_4$ ,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为1.0ml/min,梯度为B 0 $\rightarrow$ 100%,12min(数据采集20min),柱温为25 $^{\circ}C$ ,温控器温度为RT,检测器以UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[3035] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3036] a: 曲妥珠单抗原料

[3037] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量;

[3038] UV225nm的情况下,认为保留时间9.468分钟为曲妥珠单抗原料、10.360分钟为在曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物、11.045分钟为引入了两个肽的化合物。UV280nm的情况下,认为保留时间9.575分钟为曲妥珠单抗原料、10.449分钟为在曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物、11.137分钟为引入了两个肽的化合物(图38)。

[3039] [实施例28:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[3040] (28-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

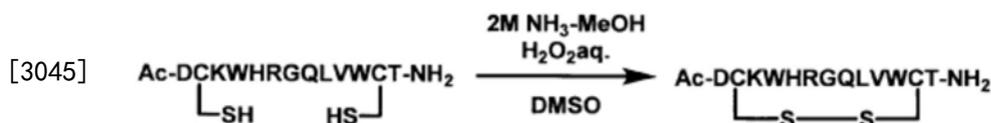
[3041] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成Ac-DCKWHRGQLVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:54)的序列。得到目标物(89.4mg,57.4 $\mu$ mol)。

[3042] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  837.30  $[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$  558.60  $[M+3H]^{3+}$

[3043] (28-2) Ac-DCKWHRGQLVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:54)的第2位和第12位的Cys处的分子

内二硫键的形成

[3044] [化学式114]



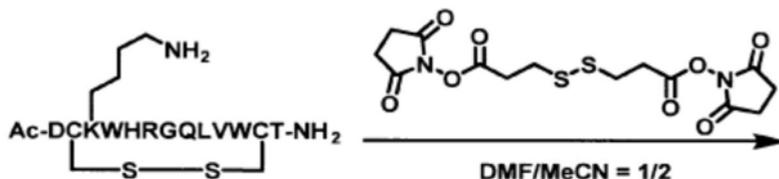
[3046] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:54。

[3047] 将(28-1)中合成的肽(89.4mg, 57.4 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL), 加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(53.5 $\mu$ L, 107 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(109 $\mu$ L, 1.07mmol)并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液, 使反应停止, 将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液, 供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱, 用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱, 利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分, 通过减压浓缩而除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 得到上述肽(64.4mg, 38.5 $\mu$ mol)。

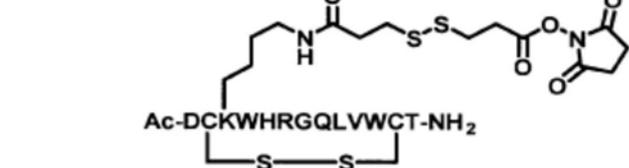
[3048] MS (ESI) m/z: z=2 836.35 [M+2H]<sup>2+</sup>, z=3 558.00 [M+3H]<sup>3+</sup>

[3049] (28-3) 二硫连接体与肽的连接

[3050] [化学式115]



[3052] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:54。



[3054] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:54。

[3053] 将(28-2)中合成的Ac-DCKWHRGQLVWCT-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:54) (64.4mg, 38.5 $\mu$ mol, 其中第2位和第12位的2个半胱氨酸分别在分子内形成了二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL), 加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯) (623mg, 1.54mmol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液, 于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后, 将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液, 供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱, 用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱, 利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分, 通过减压浓缩而除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(21.8mg, 11.1 $\mu$ mol)。

[3054] MS (ESI) m/z: z=2 981.05 [M+2H]<sup>2+</sup>, z=3 654.25 [M+3H]<sup>3+</sup>

[3055] HPLC纯度: 82%

[3056] (28-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3057] 将(28-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药) 500 $\mu$ g溶解于60mM乙酸钠缓冲液(pH 4.7) 46.9 $\mu$ L, 加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量), 于室温下搅拌1小

时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗于147548观测到峰,引入了一个结合性肽的产物于150261观测到峰,引入了两个结合性肽的产物于152112观测到峰。于154824观测到基于副产物的峰。

[3058] (28-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3059] 向(28-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦酸盐溶液5 $\mu$ L(相对于抗体为等量),于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50684、50845观测到峰。

[3060] (28-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[3061] 利用HIC-HPLC分析(28-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社)4.6x350mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为1.0ml/min、梯度为B 0→100%,12min(数据采集20min)、柱温为25 $^{\circ}$ C、温控器温度为RT、检测器以UV225nm(Ch1)、280nm(Ch2)这2个波长进行了检测。

[3062] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3063] a: 曲妥珠单抗原料

[3064] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量;

[3065] UV225nm的情况下,认为保留时间9.477分钟为曲妥珠单抗原料、10.714分钟为在曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物、11.650分钟为副产物。UV280nm的情况下,认为保留时间9.573分钟为曲妥珠单抗原料、10.812分钟为在曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物、11.742分钟为副产物(图39)。

[3066] [实施例29:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

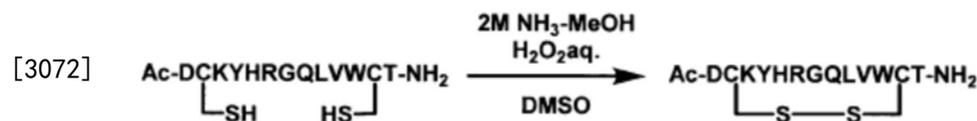
[3067] (29-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[3068] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成Ac-DCKYHRGQLVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:55)的序列。得到目标物(93.6mg,56.7 $\mu$ mol)。

[3069] MS(ESI) m/z: z=2 825.80[M+2H]<sup>2+</sup>, z=3 550.90[M+3H]<sup>3+</sup>

[3070] (29-2) Ac-DCKYHRGQLVWCT-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:55)的第2位和第12位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3071] [化学式116]



[3073] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:55。

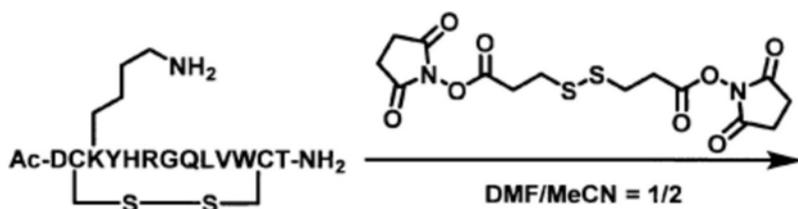
[3074] 将(29-1)中合成的肽(93.6mg,56.7 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(56.5 $\mu$ L,113 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(115 $\mu$ L,1.13mmol)并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去

乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽(71.6mg,46.2 $\mu$ mol)。

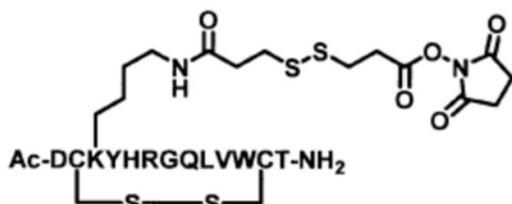
[3075] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  824.85  $[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$  550.25  $[M+3H]^{3+}$

[3076] (29-3) 二硫连接体与肽的连接

[3077] [化学式117]



[3078]



[3079] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:55。

[3080] 将(29-2)中合成的Ac-DCKYHRGQLVWCT-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:55) (71.6mg,46.2 $\mu$ mol,其中第2位和第12位的2个半胱氨酸分别在分子内形成了二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(747mg,1.85mmol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液,于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(25.5mg,13.2 $\mu$ mol)。

[3081] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  969.45  $[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$  646.75  $[M+3H]^{3+}$

[3082] HPLC纯度:82%

[3083] (29-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3084] 将(29-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药)500 $\mu$ g溶解于60mM乙酸钠缓冲液(pH 4.7)46.9 $\mu$ L,加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),于室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,引入了一个结合性肽的产物于149884观测到峰,引入了两个结合性肽的产物于151873观测到峰。

[3085] (29-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3086] 向(29-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液5 $\mu$ L(相对于抗体为等量),于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50682、50844观测到峰。

[3087] (29-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[3088] 利用HIC-HPLC分析(29-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Butyl-NPR

(东曹株式会社) 4.6x350mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa, pH7.0, 流速为1.0ml/min、梯度为B 0→100%, 12min (数据采集20min)、柱温为25℃、温控器温度为RT、检测器以UV225nm (Ch1)、280nm (Ch2) 这2个波长进行了检测。

[3089] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3090] a: 曲妥珠单抗原料

[3091] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量;

[3092] UV225nm的情况下,认为保留时间10.292分钟为在曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物、10.949分钟为引入了两个肽的化合物。UV280nm的情况下,认为保留时间10.381分钟为在曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物、11.038分钟为引入了两个肽的化合物(图40)。

[3093] [实施例30:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[3094] (30-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

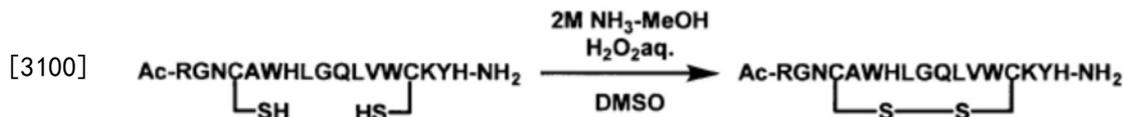
[3095] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成

[3096] Ac-RGNCAWHLGQLVWCKYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:56) 的序列。得到目标物 (54.2mg, 25.7 $\mu$ mol)。

[3097] MS (ESI) m/z: z=3 705.05 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 529.10 [M+4H]<sup>4+</sup>

[3098] (30-2) Ac-RGNCAWHLGQLVWCKYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:56) 的第4位和第14位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3099] [化学式118]



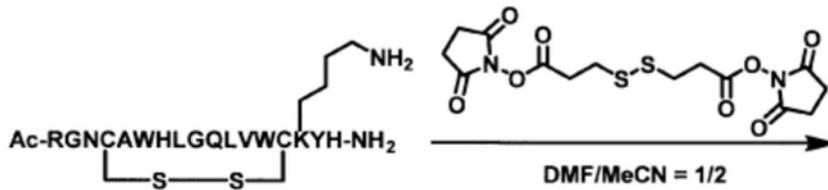
[3101] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:56。

[3102] 将(30-1)中合成的肽(54.2mg, 25.7 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(25.7 $\mu$ L, 51.4 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(52.5 $\mu$ L, 514 $\mu$ mol)并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽(13.3mg, 5.54 $\mu$ mol)。

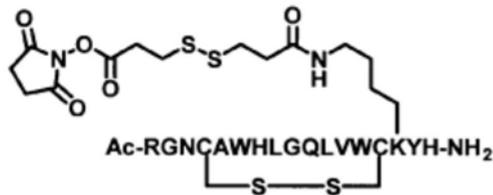
[3103] MS (ESI) m/z: z=3 704.45 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 528.60 [M+4H]<sup>4+</sup>

[3104] (30-3) 二硫连接体与肽的连接

[3105] [化学式119]



[3106]



[3107] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:56。

[3108] 将(30-2)中合成的Ac-RGNCAWHLGQLVWCKYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:56) (13.3mg, 5.54μmol), 其中第4位和第14位的2个半胱氨酸分别在分子内形成了二硫键) 溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL), 加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯) (89.6mg, 222μmol) 溶解于乙腈(2.00mL) 而得的溶液, 于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后, 将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液, 供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱, 用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱, 利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分, 通过减压浓缩而除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(7.00mg, 2.92μmol)。

[3109] MS (ESI) m/z: z=3 800.90 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 600.80 [M+4H]<sup>4+</sup>

[3110] HPLC纯度: 69%

[3111] (30-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3112] 将(30-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药) 500μg溶解于60mM乙酸钠缓冲液(pH 4.7) 46.9μL, 加入4.7μL的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量), 于室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱, 使反应停止, 置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗于148788观测到峰, 引入了一个结合性肽的产物于151375观测到峰。

[3113] (30-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3114] 向(30-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基) 膦酸盐溶液5μL(相对于抗体为等量), 于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量, 产物在重链中引入了硫代丙酰基的50593、50756观测到峰, 以及与原料同样在23337观测到轻链峰。

[3115] (30-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-HPLC分析

[3116] 利用HIC分析了(30-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Butyl-NPR(东曹株式会社) 4.6x350mm 2.5μm。使用A缓冲液: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液: 0.1M PiNa, pH7.0, 流速为1.0ml/min、梯度为B 0→100%, 12min(数据采集20min)、柱温为25°C、温控器温度为RT、检测器以UV225nm (Ch1)、280nm (Ch2) 这2个波长进行了检测。

[3117] 对于样品, 按照以下的条件进行反应。

[3118] a: 曲妥珠单抗原料

[3119] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量;

[3120] UV225nm的情况下,认为保留时间9.556分钟为曲妥珠单抗原料、10.259分钟为来自在曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物的峰。UV280nm的情况下,认为保留时间9.549分钟为曲妥珠单抗原料、10.382分钟为来自在曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物的峰(图41)。

[3121] [实施例31:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[3122] (31-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

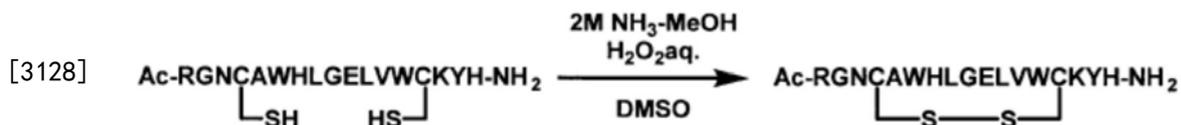
[3123] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成

[3124] Ac-RGNCAWHLGELVWCKYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:57) 的序列。得到目标物(34.0mg, 16.1μmol)。

[3125] MS (ESI) m/z: z=3 705.40 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 529.30 [M+4H]<sup>4+</sup>

[3126] (31-2) Ac-RGNCAWHLGELVWCKYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:57) 的第4位和第14位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3127] [化学式120]



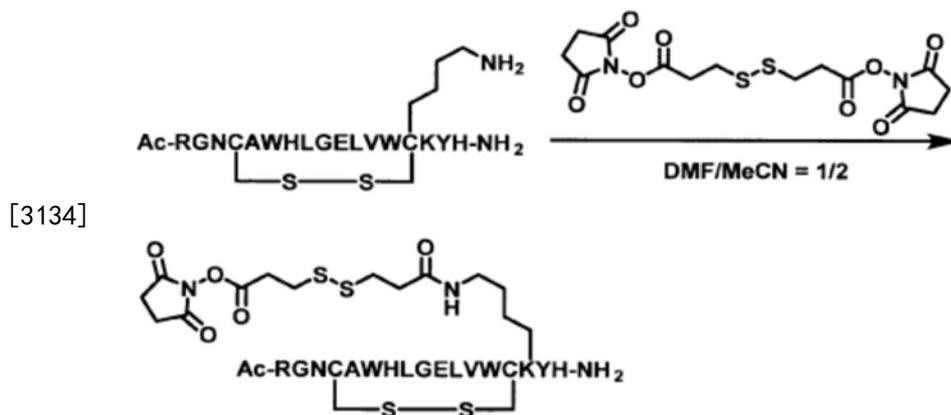
[3129] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:57。

[3130] 将(31-1)中合成的肽(34.0mg, 16.1μmol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(16.1μL, 32.2μmol)、过氧化氢水溶液(32.9μL, 322μmol)并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽(13.6mg, 6.40μmol)。

[3131] MS (ESI) m/z: z=3 704.85 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 528.80 [M+4H]<sup>4+</sup>

[3132] (31-3) 二硫连接体与肽的连接

[3133] [化学式121]



[3135] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:57。

[3136] 将(31-2)中合成的Ac-RGNCAWHLGELVWCKYH-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:57)(13.6mg, 6.40μmol, 其中第4位和第14位的2个半胱氨酸分别在分子内形成了二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL), 加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(104mg, 256μmol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液, 于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后, 将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液, 供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱, 用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱, 利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分, 通过减压浓缩而除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(1.5mg, 0.63μmol)。

[3137] MS (ESI) m/z: z=3 801.45 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 601.50 [M+4H]<sup>4+</sup>

[3138] HPLC纯度: 77%

[3139] (31-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3140] 将(31-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药) 500μg溶解于60mM乙酸钠缓冲液(pH 4.7) 46.9μL, 加入4.7μL的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量), 于室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱, 使反应停止, 置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗于148219观测到峰, 未观测到来自引入了结合性肽的产物的峰。

[3141] (31-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3142] 向(31-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液5μL(相对于抗体为等量), 于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量, 产物在重链中引入了硫代丙酰基的50592、50762观测到峰, 以及与原料同样在23338观测到轻链峰。

[3143] (31-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3144] 利用HIC分析(31-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5μm。使用A缓冲液: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液: 0.1M PiNa, pH7.0, 流速为0.6ml/min、梯度为A50%B50%→A0%B100%, 12min(数据采集15min)、柱温为室温、温控器温度为室温、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3145] 对于样品, 按照以下的条件进行反应。

[3146] a: 曲妥珠单抗原料

[3147] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量;

[3148] 认为保留时间6.8590分钟为曲妥珠单抗原料、8.0655分钟为来自肽的峰(图42)。

[3149] [实施例32: 具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析)]

[3150] (32-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

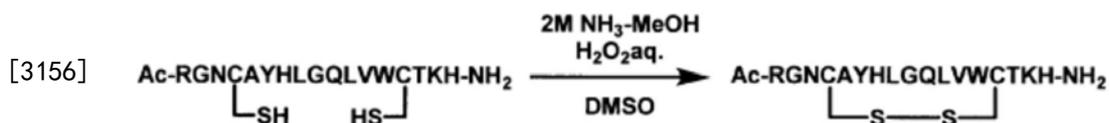
[3151] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成

[3152] Ac-RGNCAWHLGQLVWCTKH-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:58)的序列。得到目标物(36.7mg, 18.1μmol)。

[3153] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=3$  676.75  $[M+3H]^{3+}$ ,  $z=4$  507.80  $[M+4H]^{4+}$

[3154] (32-2) Ac-RGNCA<sup>4</sup>YHLGQLVWCTKH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:58) 的第4位和第14位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3155] [化学式122]



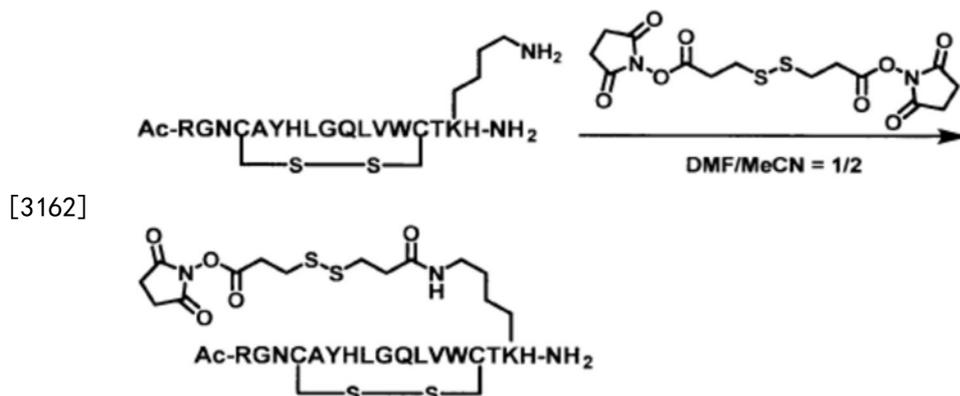
[3157] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:58。

[3158] 将(32-1)中合成的肽(36.7mg, 18.1 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(18.1 $\mu$ L, 36.2 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(37.0 $\mu$ L, 362 $\mu$ mol)并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽(18.2mg, 8.99 $\mu$ mol)。

[3159] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=3$  676.00  $[M+3H]^{3+}$ ,  $z=4$  507.30  $[M+4H]^{4+}$

[3160] (32-3) 二硫连接体与肽的连接

[3161] [化学式123]



[3163] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:58。

[3164] 将(32-2)中合成的Ac-RGNCA<sup>4</sup>YHLGQLVWCTKH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:58) (18.2mg, 8.99 $\mu$ mol, 其中第4位和第14位的2个半胱氨酸分别在分子内形成了二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(145mg, 360 $\mu$ mol)溶解于乙腈(1.50mL)而得的溶液,于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(3.00mg, 1.30 $\mu$ mol)。

[3165] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=3$  772.45  $[M+3H]^{3+}$

[3166] HPLC纯度:90%

[3167] (32-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3168] 将(32-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并

调节为21.6mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药)500 $\mu$ g溶解于60mM乙酸钠缓冲液(pH 4.7)46.9 $\mu$ L,加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),于室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗于148077观测到峰,引入了一个结合性肽的产物于150281观测到峰。

[3169] (32-5) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3170] 利用HIC分析(32-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40%→A0%B100%,16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}$ C、温控器温度为40 $^{\circ}$ C、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3171] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3172] a: 曲妥珠单抗原料

[3173] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量;

[3174] 认为保留时间11.1800分钟为曲妥珠单抗原料、11.8682分钟为在曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物(图43)。

[3175] [实施例33:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[3176] (33-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

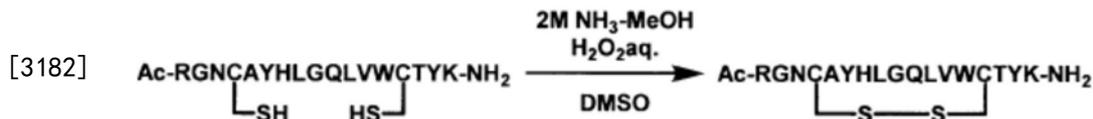
[3177] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成

[3178] Ac-RGNCA<sub>Y</sub>HLGQLVWCTYK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:59)的序列。得到目标物(52.1mg,25.4 $\mu$ mol)。

[3179] MS(ESI)m/z:z=2 1027.3[M+2H]<sup>2+</sup>,z=3 685.45[M+3H]<sup>3+</sup>

[3180] (33-2) Ac-RGNCA<sub>Y</sub>HLGQLVWCTYK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:59)的第4位和第14位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3181] [化学式124]



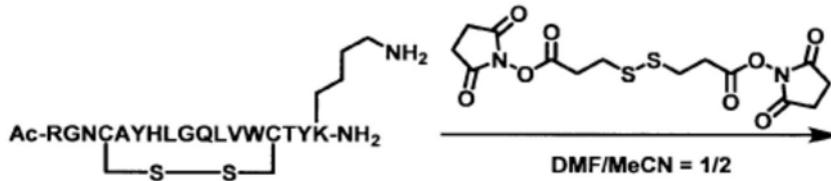
[3183] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:59。

[3184] 将(33-1)中合成的肽(52.1mg,25.4 $\mu$ mol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(25.4 $\mu$ L,50.8 $\mu$ mol)、过氧化氢水溶液(51.9 $\mu$ L,508 $\mu$ mol)并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽(4.70mg,2.29 $\mu$ mol)。

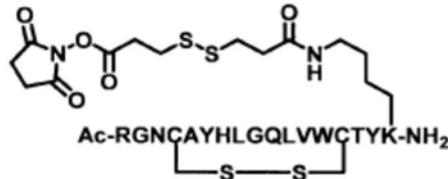
[3185] MS(ESI)m/z:z=2 1026.5[M+2H]<sup>2+</sup>,z=3 684.75[M+3H]<sup>3+</sup>

[3186] (33-3) 二硫连接体与肽的连接

[3187] [化学式125]



[3188]



[3189] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:59。

[3190] 使(33-2)中合成的Ac-RGNCA YHLGQLVWCTYK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:59) (4.70mg, 2.29 $\mu$ mol), 其中第4位和第14位的2个半胱氨酸分别在分子内形成了二硫键) 溶解于N,N-二甲基甲酰胺(0.50mL), 加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯) (37.0mg, 91.6 $\mu$ mol) 溶解于乙腈(1.00mL) 而得的溶液, 于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后, 将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液, 供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱, 用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱, 利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分, 通过减压浓缩而除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(5.00mg, 2.14 $\mu$ mol)。

[3191] MS (ESI) m/z: z=3 781.20 [M+3H]<sup>3+</sup>

[3192] HPLC纯度: 79%

[3193] (33-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3194] 将(33-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药) 500 $\mu$ g溶解于60mM乙酸钠缓冲液(pH 4.7) 46.9 $\mu$ L, 加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量), 于室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱, 使反应停止, 置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗于148223观测到峰, 引入了一个结合性肽的产物于150488观测到峰。

[3195] (33-5) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3196] 利用HIC分析(33-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液: 0.1M PiNa, pH7.0, 流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40%→A0%B100%, 16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}$ C、温控器温度为40 $^{\circ}$ C、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3197] 对于样品, 按照以下的条件进行反应。

[3198] a: 曲妥珠单抗原料

[3199] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量;

[3200] 认为保留时间11.1867分钟为曲妥珠单抗原料、12.2550分钟为在曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物(图44)。

[3201] [实施例34 (肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[3202] (34-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

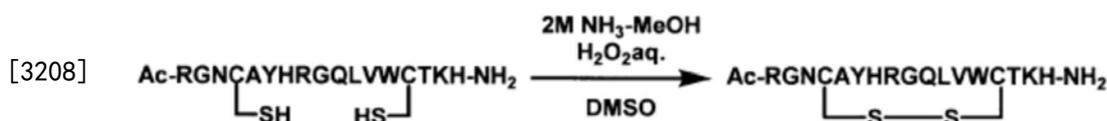
[3203] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成

[3204] Ac-RGNCA<sup>4</sup>YHRGQLVWCTKH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:60)的序列。得到目标物(66.3mg, 32.0μmol)。

[3205] MS (ESI) m/z: z=3 691.10 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 518.55 [M+4H]<sup>4+</sup>

[3206] (34-2) Ac-RGNCA<sup>4</sup>YHRGQLVWCTKH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:60)的第4位和第14位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3207] [化学式126]



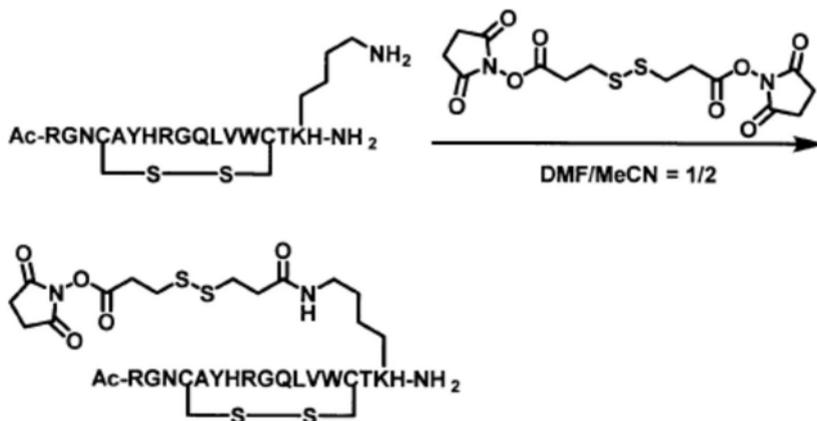
[3209] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:60。

[3210] 将(34-1)中合成的肽(66.3mg, 32.0μmol)溶解于DMSO(5.00mL),加入2M NH<sub>3</sub>-MeOH(32.0μL, 64.0μmol)、过氧化氢水溶液(65.4μL, 640μmol)并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽(40.0mg, 19.3μmol)。

[3211] MS (ESI) m/z: z=3 690.40 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 518.05 [M+4H]<sup>4+</sup>

[3212] (34-3) 二硫连接体与肽的连接

[3213] [化学式127]



[3215] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:60。

[3216] 将(34-2)中合成的Ac-RGNCA<sup>4</sup>YHRGQLVWCTKH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:60) (40.0mg, 19.3μmol, 其中第4位和第14位的2个半胱氨酸分别在分子内形成了二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(312mg, 772μmol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液,于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回

收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(4.50mg,1.91 $\mu$ mol)。

[3217] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=3$  786.85  $[M+3H]^{3+}$ ,  $m/z$ :  $z=4$  590.45  $[M+4H]^{4+}$

[3218] HPLC纯度:78%

[3219] (34-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3220] 将(34-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药)500 $\mu$ g溶解于60mM乙酸钠缓冲液(pH 4.7)46.9 $\mu$ L,加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量),于室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗于148081观测到峰。

[3221] (34-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3222] 向(34-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液5 $\mu$ L(相对于抗体为等量),于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50682、50844观测到峰,以及与原料同样在23439观测到轻链峰。

[3223] (34-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3224] 利用HIC分析(34-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,

[3225] 2.3M  $(NH_4)_2SO_4$ , pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa, pH7.0,流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40% $\rightarrow$ A0%B100%,16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}C$ 、温控器温度为40 $^{\circ}C$ 、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3226] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3227] a: 曲妥珠单抗原料

[3228] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量;

[3229] 认为保留时间10.0610分钟为来自曲妥珠单抗原料的化合物。此外,于11.0666分钟确认了峰(图45)。

[3230] [实施例35:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[3231] (35-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[3232] 利用Fmoc固相合成法合成

[3233] Ac-KNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:61)的序列。肽合成装置使用CEM公司制Liberty Blue。试剂全部使用渡边化学工业制的试剂。树脂为Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL,精氨酸(R)、半胱氨酸(C)组氨酸(H)进行了双偶合。从树脂的切出在于三氟乙酸:水:三异丙基硅烷:乙二硫醇=94:2.5:1.0:2.5的溶液中搅拌3小时的条件下进行。切出后,将树脂通过过滤除去,除去三氟乙酸。向生成的结晶中加入二乙醚并进行醚沉淀,通过过滤回收所生成的白色结晶。将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈

后,进行冷冻干燥,得到目标物(47.0mg,11.0 $\mu$ mol)。

[3234] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=5$  853.35  $[M+5H]^{5+}$ ,  $z=6$  711.25  $[M+6H]^{6+}$

[3235] (35-2) Ac-KNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:61) 的第5位和第34位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3236] [化学式128]



[3237]



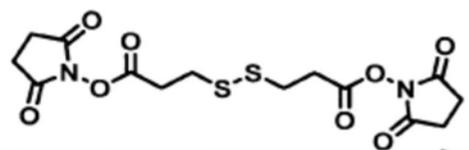
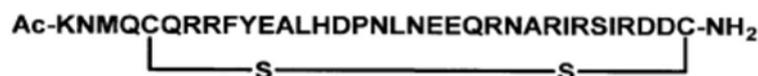
[3238] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:61。

[3239] 将(35-1)中合成的肽(47.0mg,11.0 $\mu$ mol)溶解于DMSO(1.10mL),加入0.1M Tris-HCl pH 8.0(11.0mL)。向该溶液中加入谷胱甘肽氧化型(34.0mg,55.0 $\mu$ mol)并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到目标物(18.1mg,4.25 $\mu$ mol)。

[3240] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=5$  852.95  $[M+5H]^{5+}$ ,  $z=6$  710.95  $[M+6H]^{6+}$

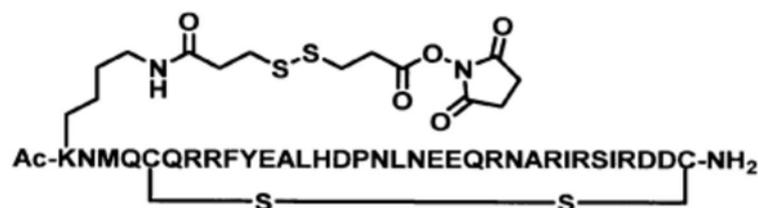
[3241] (35-3) 二硫连接体与肽的连接

[3242] [化学式129]



[3243]

DMF/MeCN = 1/2



[3244] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:61。

[3245] 将(35-2)中合成的Ac-KNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:61) (18.1mg,4.25 $\mu$ mol,其中第5位和第34位的2个半胱氨酸分别于分子内形成了二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(69.0mg,0.170mmol)溶解于乙腈(2.00mL)而得的溶液,于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利

用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(4.00mg,0.80 $\mu$ mol)。

[3246] MS (ESI) m/z: z=5 910.85 [M+5H]<sup>5+</sup>, z=6 759.20 [M+6H]<sup>6+</sup>

[3247] HPLC纯度:60%

[3248] (35-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3249] 将(35-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药)500 $\mu$ g溶解于50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5)171 $\mu$ L,加入8.5 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为10当量),于室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗于148234观测到峰,引入了一个结合性肽的产物于152672观测到峰,引入了两个结合性肽的产物于157107处确认了峰。

[3250] (35-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3251] 向(35-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液5 $\mu$ L(相对于抗体为等量),于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50684、50844观测到峰。

[3252] (35-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3253] 利用HIC分析(35-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40%→A0%B100%,16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}$ C、温控器温度为40 $^{\circ}$ C、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3254] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3255] a: 曲妥珠单抗原料

[3256] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体10当量;

[3257] 认为保留时间10.0542分钟为曲妥珠单抗原料、9.4481分钟为引入了一个肽的化合物、8.5522分钟为引入了两个肽的化合物(图46)。

[3258] [实施例36:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗

[3259] HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[3260] (36-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[3261] 利用Fmoc固相合成法合成

[3262] Ac-FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:62)的序列。肽合成装置使用CEM公司制Liberty Blue。试剂全部使用渡边化学工业制的试剂。树脂为Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL,精氨酸(R)、半胱氨酸(C)组氨酸(H)进行了双偶合。从树脂的切出在三氟乙酸:水:三异丙基硅烷:乙二硫醇=94:2.5:1.0:2.5的溶液中搅拌3小时的条件下进行。切出后,将树脂通过过滤除去,除去三氟乙酸。向生成的结晶中加入二乙醚并进行醚沉淀,通过过滤回收所生成的白色结晶。将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶

液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到目标物(76.3mg,18.0 $\mu$ mol)。

[3263] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=5$  851.45  $[M+5H]^{5+}$ ,  $z=6$  709.75  $[M+6H]^{6+}$

[3264] (36-2) Ac-FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:62) 的第5位和第34位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3265] [化学式130]



[3266]



[3267] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:62。

[3268] 将(36-1)中合成的肽(76.3mg,18.0 $\mu$ mol)溶解于DMSO(1.80mL),加入0.1M Tris-HCl pH 8.0(18.0mL)。向该溶液中加入谷胱甘肽氧化型(55.0mg,89.5 $\mu$ mol)并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到目标物(28.5mg,6.71 $\mu$ mol)。

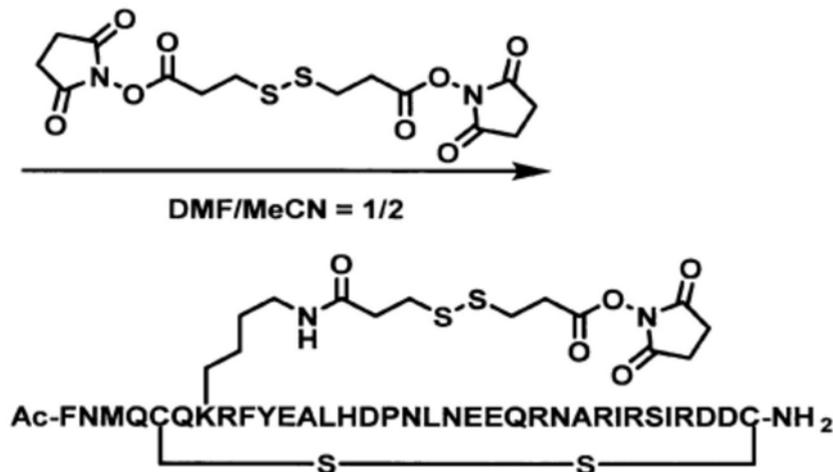
[3269] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=5$  851.05  $[M+5H]^{5+}$ ,  $z=6$  709.40  $[M+6H]^{6+}$

[3270] (36-3) 二硫连接体与肽的连接

[3271] [化学式131]



[3272]



[3273] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:62。

[3274] 将(36-2)中合成的Ac-FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:62) (28.5mg,6.71 $\mu$ mol,其中第5位和第34位的2个半胱氨酸分别于分子内形成了二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)

(108mg, 0.268mmol) 溶解于乙腈 (2.00mL) 而得的溶液, 于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后, 将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液, 供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱, 用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱, 利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分, 通过减压浓缩而除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体 (7.10mg, 1.56 $\mu$ mol)。

[3275] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=5$  909.05  $[M+5H]^{5+}$ ,  $z=6$  757.70  $[M+6H]^{6+}$

[3276] HPLC纯度: 87%

[3277] (36-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3278] 将(36-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药) 500 $\mu$ g溶解于10mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5) 46.9 $\mu$ L, 加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量), 于室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱, 使反应停止, 置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗于148232观测到峰, 引入了一个结合性肽的产物于152664观测到峰。

[3279] (36-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3280] 向(36-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液5 $\mu$ L(相对于抗体为等量), 于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量, 产物在重链中引入了硫代丙酰基的50681观测到峰。

[3281] (36-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3282] 利用HIC分析(36-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液: 0.1M PiNa, 2.3M  $(NH_4)_2SO_4$ , pH7.0、B缓冲液: 0.1M PiNa, pH7.0, 流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40% $\rightarrow$ A0%B100%, 16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}C$ 、温控器温度为40 $^{\circ}C$ 、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3283] 对于样品, 按照以下的条件进行反应。

[3284] a: 曲妥珠单抗原料

[3285] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量;

[3286] 认为保留时间9.6620分钟为曲妥珠单抗原料、10.3237分钟为引入了一个肽的化合物(图47)。

[3287] [实施例37: 具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[3288] (37-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[3289] 利用Fmoc固相合成法合成

[3290] Ac-FNMQCQRRFYEA KHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:63) 的序列。肽合成装置使用CEM公司制Liberty Blue。试剂全部使用渡边化学工业制的试剂。树脂为Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL, 精氨酸(R)、半胱氨酸(C) 组氨酸(H) 进行了双偶合。从树脂的切出在三氟乙酸:水:三异丙基硅烷:乙二硫醇=94:2.5:1.0:2.5的溶液中搅拌3小时的条件下进行。

切出后,将树脂通过过滤除去,除去三氟乙酸。向生成的结晶中加入二乙醚并进行醚沉淀,通过过滤回收所生成的白色结晶。将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到目标物(67.4mg,15.7 $\mu$ mol)。

[3291] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=5$  860.10  $[M+5H]^{5+}$ ,  $z=6$  716.95  $[M+6H]^{6+}$

[3292] (37-2) Ac-FNMQCRRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:63) 的第5位和第34位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3293] [化学式132]



[3294]



[3295] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:63。

[3296] 将(37-1)中合成的肽(67.4mg,15.7 $\mu$ mol)溶解于DMSO(1.50mL),加入0.1M Tris-HCl pH 8.0(15.0mL)。向该溶液中加入谷胱甘肽氧化型(48.0mg,78.5 $\mu$ mol)并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到目标物(16.1mg,3.75 $\mu$ mol)。

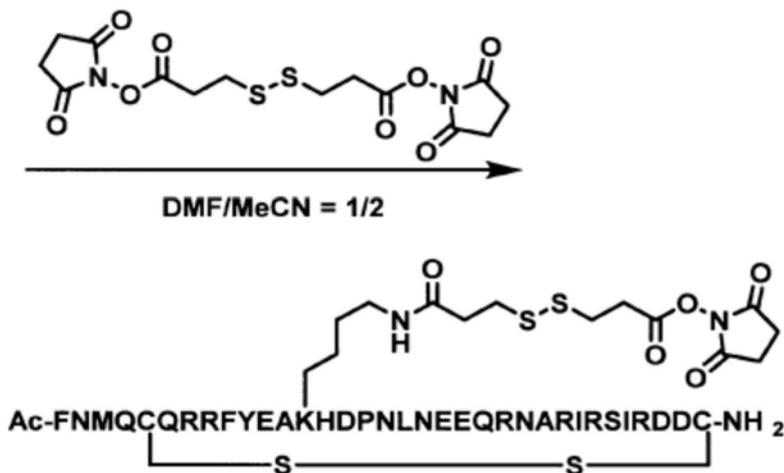
[3297] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=5$  859.75  $[M+5H]^{5+}$ ,  $z=6$  716.60  $[M+6H]^{6+}$

[3298] (37-3) 二硫连接体与肽的连接

[3299] [化学式133]



[3300]



[3301] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:63。

[3302] 将(37-2)中合成的Ac-FNMQCRRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:

63) (16.1mg, 3.75 $\mu$ mol, 其中第5位和第34位的2个半胱氨酸分别于分子内形成了二硫键) 溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL), 加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(61.0mg, 0.150mmol) 溶解于乙腈(2.00mL) 而得的溶液, 于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后, 将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液, 供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱, 用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱, 利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分, 通过减压浓缩而除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(5.30mg, 1.16 $\mu$ mol)。

[3303] MS (ESI) m/z: z=5 917.60 [M+5H]<sup>5+</sup>, z=6 764.85 [M+6H]<sup>6+</sup>

[3304] HPLC纯度: 54%

[3305] (37-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3306] 将(34-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为21.6mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药) 500 $\mu$ g溶解于10mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5) 46.9 $\mu$ L, 加入4.7 $\mu$ L的21.6mM的肽试剂(相对于抗体为30当量), 于室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱, 使反应停止, 置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量, 原料的曲妥珠单抗于148238观测到峰, 引入了一个结合性肽的产物于152703观测到峰。

[3307] (37-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3308] 向(37-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基) 膦盐酸盐溶液5 $\mu$ L(相对于抗体为等量), 于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量, 产物在重链中引入了硫代丙酰基的50682观测到峰。

[3309] (37-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3310] 利用HIC分析(37-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液: 0.1M PiNa, pH7.0, 流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40% $\rightarrow$ A0%B100%, 16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}$ C、温控器温度为40 $^{\circ}$ C、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3311] 对于样品, 按照以下的条件进行反应。

[3312] a: 曲妥珠单抗原料

[3313] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体30当量;

[3314] 认为保留时间9.5802分钟为曲妥珠单抗原料、9.1031分钟为引入了一个肽的化合物(图48)。

[3315] [实施例38: 具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[3316] (38-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[3317] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成

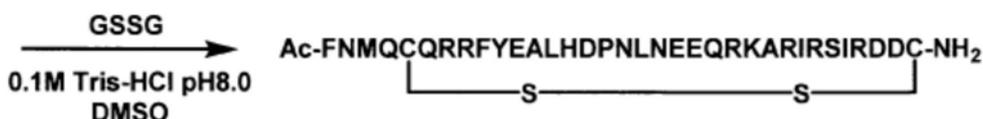
[3318] Ac-FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:64) 的序列。得到目标物。

[3319] (38-2) Ac-FNMQCQRRFYALHDPNLNNEEQRKARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:64) 的第5位和第34位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3320] [化学式134]



[3321]



[3322] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:64。

[3323] 将(38-1)中合成的肽溶解于DMSO,加入0.1M Tris-HCl pH 8.0。向该溶液中加入谷胱甘肽氧化型并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到目标物(20.0mg, 4.66μmol)。

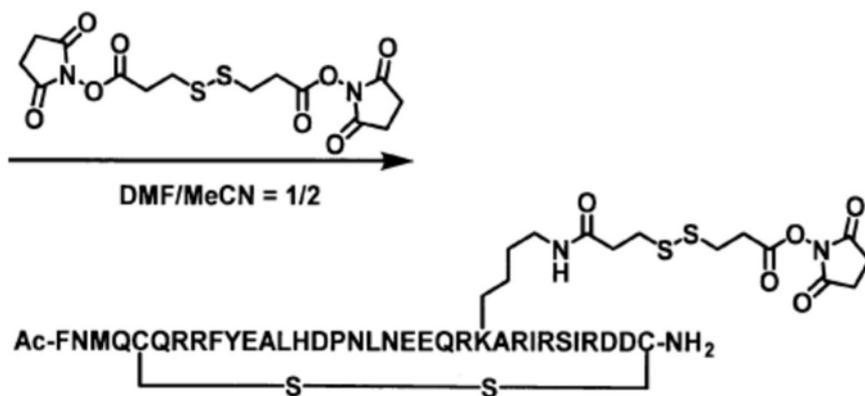
[3324] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=4$  1074.15 [M+4H]<sup>4+</sup>,  $z=5$  859.65 [M+5H]<sup>5+</sup>

[3325] (38-3) 二硫连接体与肽的连接

[3326] [化学式135]



[3327]



[3328] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:64。

[3329] 将(38-2)中合成的Ac-FNMQCQRRFYALHDPNLNNEEQRKARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:64) (20.0mg, 4.66μmol, 其中第5位和第34位的2个半胱氨酸分别于分子内形成了二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(75.4mg, 186μmol)溶解于乙腈(1.00mL)而得的溶液,于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(9.00mg, 1.96μmol)。

[3330] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=5$  917.45 [M+5H]<sup>5+</sup>,  $z=6$  764.65 [M+6H]<sup>6+</sup>

[3331] HPLC纯度:100%

[3332] (38-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3333] 将(38-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药)500 $\mu$ g溶解于50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5)171 $\mu$ L,加入8.5 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为10当量),于室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗在148070观测到峰,引入了一个结合性肽的产物在152538观测到峰,引入了两个结合性肽的产物在157165观测到峰。

[3334] (38-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3335] 向(38-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液5 $\mu$ L(相对于抗体为等量),于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50685、50847观测到峰、及与原料同样在23439观测到轻链峰。

[3336] (38-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3337] 利用HIC分析(38-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40% $\rightarrow$ A0%B100%,16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}$ C、温控器温度为40 $^{\circ}$ C、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3338] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3339] a:曲妥珠单抗原料

[3340] b:曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体10当量;

[3341] 认为保留时间9.7820分钟为曲妥珠单抗原料、9.3370分钟为引入了一个肽的化合物、8.7313分钟为引入了两个肽的化合物(图49)。

[3342] [实施例39:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

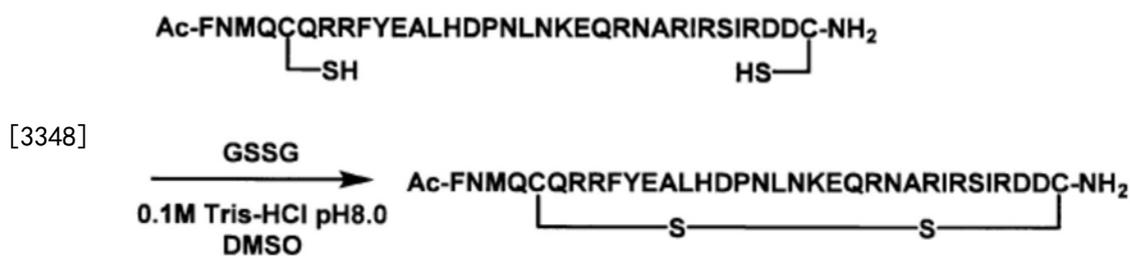
[3343] (39-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[3344] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成

[3345] Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:65)的序列。得到目标物。

[3346] (39-2) Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:65)的第5位和第34位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3347] [化学式136]



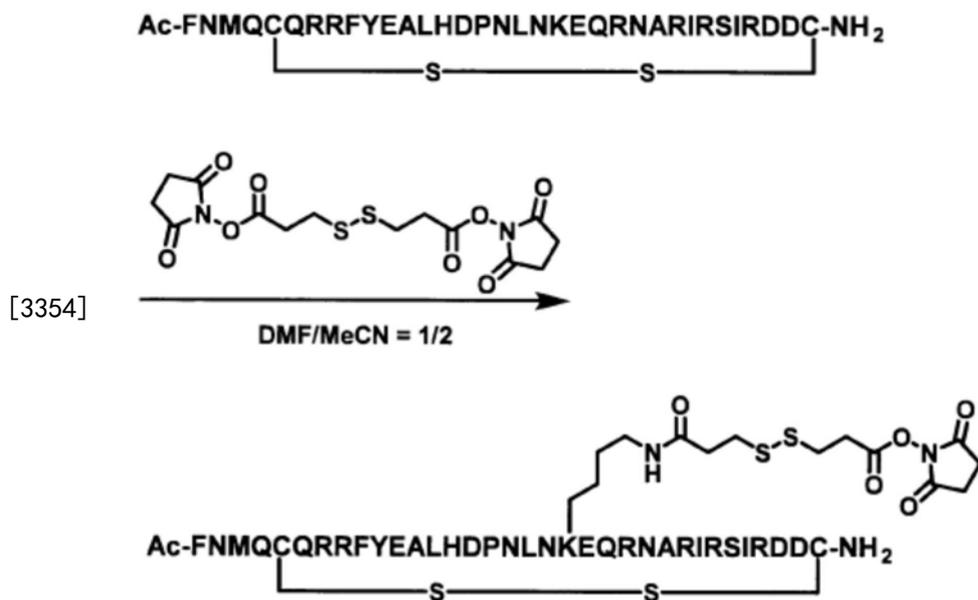
[3349] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:65。

[3350] 将(39-1)中合成的肽溶解于DMSO,加入0.1M Tris-HCl pH 8.0。向该溶液中加入谷胱甘肽氧化型并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到目标物(23.0mg, 5.38 $\mu$ mol)。

[3351] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=4$  1070.55  $[M+4H]^{4+}$ ,  $z=5$  856.55  $[M+5H]^{5+}$

[3352] (39-3) 二硫连接体与肽的连接

[3353] [化学式137]



[3355] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:65。

[3356] 将(39-2)中合成的Ac-FNMQCQRRFYALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 65) (23.0mg, 5.38 $\mu$ mol, 其中第5位和第34位的2个半胱氨酸分别于分子内形成了二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(87.0mg, 215 $\mu$ mol)溶解于乙腈(1.00mL)而得的溶液,于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶作为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(16.0mg, 3.50 $\mu$ mol)。

[3357] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=5$  914.45  $[M+5H]^{5+}$ ,  $z=6$  762.15  $[M+6H]^{6+}$

- [3358] HPLC纯度:83%
- [3359] (39-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析
- [3360] 将(39-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药)500 $\mu$ g溶解于50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5)171 $\mu$ L,加入4.2 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为5当量),于室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗于148065观测到峰,引入了一个结合性肽的产物于152525观测到峰,引入了两个结合性肽的产物于156978观测到峰。
- [3361] (39-5) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析
- [3362] 利用HIC分析(39-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40%→A0%B100%,16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}$ C、温控器温度为40 $^{\circ}$ C、检测器以280nm的波长进行了检测。
- [3363] 对于样品,按照以下的条件进行反应。
- [3364] a:曲妥珠单抗原料
- [3365] b:曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体5当量;
- [3366] 认为保留时间9.2124分钟为引入了一个肽的化合物、8.6157分钟为引入了两个肽的化合物(图50)。
- [3367] [实施例40:曲妥珠单抗的硫醇引入体的肽谱]
- [3368] (40-1) 曲妥珠单抗的硫醇引入体的胰蛋白酶处理
- [3369] 向1.5mL低吸附微型试管中加入样品溶液10 $\mu$ L、溶解于50mM碳酸氢铵缓冲液、40%三氟乙醇中的20mM的二硫苏糖醇水溶液10 $\mu$ L,于65 $^{\circ}$ C加热1小时后,添加50mM的碘乙酰胺水溶液10 $\mu$ L,避光下于室温以30分钟300rpm的条件震荡使其反应。反应后,加入50mM碳酸氢铵缓冲液40 $\mu$ L并搅拌,添加20ng/ $\mu$ L的胰蛋白酶水溶液(蛋白质组学级,Code No.T6567-5x20 $\mu$ g(SIGMA))10 $\mu$ L,并于37 $^{\circ}$ C下酶消化18小时。消化后,添加20%三氟乙酸水溶液2 $\mu$ L,使反应停止,实施LC-MS/MS测定。
- [3370] (40-2) 曲妥珠单抗的LC-MS/MS测定条件
- [3371] (分析装置)
- [3372] 纳米HPLC:EASY-nLC 1000(赛默飞世尔科技)
- [3373] 质谱仪:Tribid质谱仪Orbitrap Fusion(赛默飞世尔科技)
- [3374] (HPLC分析条件)
- [3375] 捕获柱:Acclaim PepMap(注册商标)100,75 $\mu$ m $\times$ 2cm(赛默飞世尔科技)
- [3376] 分析柱:ESI-柱(NTCC-360/75-3-125,75 $\mu$ m $\times$ 12.5cm,3 $\mu$ m(日京Technos株式会社))
- [3377] 流动相A:0.1%甲酸水溶液
- [3378] 流动相B:0.1%甲酸、乙腈溶液
- [3379] 加载溶液:0.1%三氟乙酸水溶液
- [3380] 流速:300nL/min

- [3381] 样品注入量:1 $\mu$ L
- [3382] 梯度条件(B%):2%(0.0-0.5分钟)、2% $\rightarrow$ 30%(0.5-23.5分钟)、30% $\rightarrow$ 75%(23.5-25.5分钟)、75%(25.5-35.0分钟)
- [3383] (质谱仪分析条件)
- [3384] 离子化法:ESI,正离子模式
- [3385] 扫描类型:数据依赖性获取
- [3386] 活化类型:碰撞诱导离解(CID)
- [3387] 数据的获取是使用附带的软件即Xcalibur 3.0(赛默飞世尔科技)及Thermo Orbitrap Fusion Tune Application 2.0(赛默飞世尔科技)进行。
- [3388] (40-3) 曲妥珠单抗的修饰位点的分析条件
- [3389] 关于针对LC-MS/MS测定结果的修饰位点分析,使用Proteome Discoverer version 1.4(赛默飞世尔科技)进行。
- [3390] 关于采用Proteome Discoverer的分析,使用Sequest HT作为搜索引擎,前体离子的范围设为350~5000Da、总强度阈值设为50000。此外,将胰蛋白酶设定为消化酶、最大漏切位点设为3。此外,前体及碎片离子的质量容差分别设为5ppm及0.5Da。关于静态修饰,作为基于碘乙酰胺的半胱氨酸残基的修饰,设定了脲甲基(+57.021Da)。关于动态修饰,设定了甲硫氨酸的氧化(+15.995Da)及对赖氨酸残基的修饰体(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))。进而,应用滤波器使得肽置信度仅为高。
- [3391] 此外,作为修饰位点的搜索对象的氨基酸序列的数据,使用图8所示的(1)、(3)。
- [3392] (40-4) 曲妥珠单抗的采用LC-MS/MS的修饰位点的分析结果
- [3393] 作为使用LC-MS/MS的分析的结果,观测了实施例39的用结合性肽修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的由氨基酸19个残基组成的肽、VVSVLTVLHQDWLNGKEYK(SEQ ID NO:66)的肽片段的MS谱(实测值:m/z 791.74872,理论值791.74753,3价)(图51),根据CID谱确认了表示重链的EU numbering的第317位的赖氨酸残基的修饰的相当于二价的b18的m/z 1114.35(理论值:1114.06)的产物离子(图52)。此外,观测了采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的由氨基酸28个残基组成的肽、EEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK(SEQ ID NO:67)的肽片段的MS谱(实测值:m/z 886.93408,理论值:886.93215,4价)(图53),根据CID谱确认了表示相同重链的第317位的赖氨酸残基的修饰的相当于二价的y14的m/z 938.70(理论值:938.46)的产物离子(图54)。
- [3394] [实施例41:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]
- [3395] (41-1) IgG1 Fc结合性肽的合成
- [3396] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成
- [3397] Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:68)的序列。得到目标物。
- [3398] (41-2) Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:68)的第5位

和第34位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3399] [化学式138]



[3400]



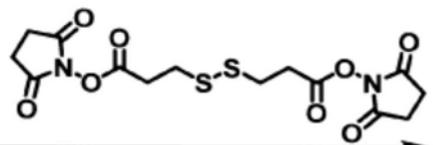
[3401] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:68。

[3402] 将(41-1)中合成的肽溶解于DMSO,加入0.1M Tris-HCl pH 8.0。向该溶液中加入谷胱甘肽氧化型并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到目标物(20.0mg,4.70 $\mu$ mol)。

[3403] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=4$  1063.65  $[M+4H]^{4+}$ ,  $z=5$  851.15  $[M+5H]^{5+}$

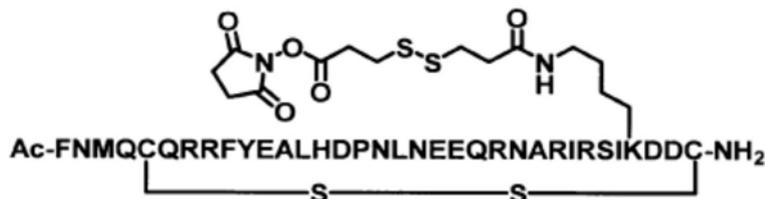
[3404] (41-3) 二硫连接体与肽的连接

[3405] [化学式139]



[3406]

DMF/MeCN = 1/2



[3407] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:68。

[3408] 将(41-2)中合成的Ac-FNMQCQRRFYALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 68) (20.0mg,4.70 $\mu$ mol,其中第5位和第34位的2个半胱氨酸分别于分子内形成了二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(76.0mg,188 $\mu$ mol)溶解于乙腈(1.00mL)而得的溶液,于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(12.0mg,2.63 $\mu$ mol)。

[3409] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=5$  908.95  $[M+5H]^{5+}$ ,  $z=6$  757.75  $[M+6H]^{6+}$

[3410] HPLC纯度:83%

[3411] (41-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3412] 将(41-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药)500 $\mu$ g溶解于50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5)171 $\mu$ L,加入8.5 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为10当量),于室温下搅拌1小时。将反应液添加于NAP-5柱,使反应停止,置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗在148234观测到峰,引入了一个结合性肽的产物在152648观测到峰,引入了两个结合性肽的产物在157083观测到峰。

[3413] (41-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3414] 向(41-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液5 $\mu$ L(相对于抗体为等量),于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50686、50847观测到峰、及与原料同样在23439观测到轻链峰。

[3415] (41-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3416] 利用HIC分析(41-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa, 2.3M  $(NH_4)_2SO_4$ , pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa, pH7.0,流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40% $\rightarrow$ A0%B100%, 16min(数据采集20min)、柱温为40 $^\circ$ C、温控器温度为40 $^\circ$ C、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3417] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3418] a: 曲妥珠单抗原料

[3419] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体10当量;

[3420] 认为保留时间9.7202分钟为曲妥珠单抗原料、9.2689分钟为引入了一个肽的化合物、8.7994分钟为引入了两个肽的化合物(图55)。

[3421] [实施例42: 曲妥珠单抗的硫醇引入体的肽谱]

[3422] (42-1) 曲妥珠单抗的硫醇引入体的胰蛋白酶处理

[3423] 进行了与(40-1)同样的处理。

[3424] (42-2) 曲妥珠单抗的LC-MS/MS测定条件

[3425] 采用与(40-2)同样的测定条件。

[3426] (42-3) 曲妥珠单抗的修饰位点的分析条件

[3427] 采用与(40-3)同样的分析条件。

[3428] (42-4) 曲妥珠单抗的基于LC-MS/MS的修饰位点的分析结果

[3429] 作为采用LC-MS/MS的分析的结果,观测了实施例41的用结合性肽修饰的曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的由氨基酸的18个残基组成的肽、FNWYVDGVEVHNAKTKPR (SEQ ID NO:69)的肽片段的MS谱(实测值: $m/z$  769.04688,理论值:769.04457,3价)(图56),根据CID谱确认了表示重链的EU numbering的第288位或第290位的赖氨酸残基的修饰的相当于2价的y12的 $m/z$ 741.15(理论值:740.89)的产物离子(图57)。

[3430] [实施例43:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[3431] (43-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[3432] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成

[3433] Ac-FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:70) 的序列。得到目标物。

[3434] (43-2) Ac-FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:70) 的第5位和第34位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3435] [化学式140]



[3436]



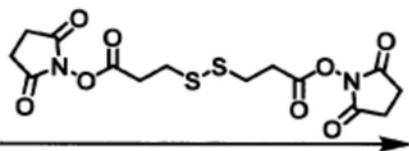
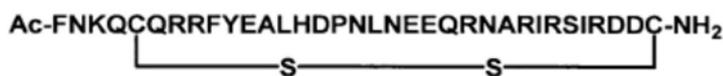
[3437] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:70。

[3438] 将(43-1)中合成的肽溶解于DMSO,加入0.1M Tris-HCl pH 8.0。向该溶液中加入谷胱甘肽氧化型并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到目标物(20.0mg,4.67μmol)。

[3439] MS (ESI) m/z: z=5 848.30 [M+5H]<sup>5+</sup>, z=6 707.10 [M+6H]<sup>6+</sup>

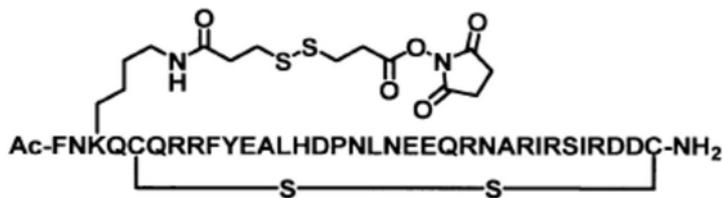
[3440] (43-3) 二硫连接体与肽的连接

[3441] [化学式141]



[3442]

DMF/MeCN = 1/2



[3443] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:70。

[3444] 将(43-2)中合成的Ac-FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:

70) (20.0mg, 4.67 $\mu$ mol, 其中第5位和第34位的2个半胱氨酸分别于分子内形成了二硫键) 溶解于N,N-二甲基甲酰胺(0.50mL), 加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(76.0mg, 188 $\mu$ mol) 溶解于乙腈(0.60mL) 而得的溶液, 于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后, 将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液, 供至以十八烷基化学键合硅胶为填充剂的反相高效液相色谱, 用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱, 利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分, 通过减压浓缩而除去乙腈后, 进行冷冻干燥, 得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(9.00mg, 1.97 $\mu$ mol)。

[3445] MS (ESI) m/z: z=6 761.85 [M+6H]<sup>6+</sup>

[3446] HPLC纯度: 85%

[3447] (43-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3448] 将(43-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。将抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗1000 $\mu$ g溶解于50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5) 342 $\mu$ L, 加入17.0 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为10当量), 于室温下搅拌1小时。将反应液置换为100mM柠檬酸钠缓冲液(pH 2.9), 使反应停止, 进而置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量, 引入了两个结合性肽的产物在156963确认了峰。

[3449] (43-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3450] 向(43-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液5 $\mu$ L(相对于抗体为等量), 于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量, 产物在重链中引入了硫代丙酰基的50686、50847观测到峰、及与原料同样在23439观测到轻链峰。

[3451] (43-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3452] 利用HIC分析(43-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液: 0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液: 0.1M PiNa, pH7.0, 流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40%→A0%B100%, 16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}$ C、温控器温度为40 $^{\circ}$ C、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3453] 对于样品, 按照以下的条件进行反应。

[3454] a: 曲妥珠单抗原料

[3455] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体10当量;

[3456] 认为保留时间8.6251分钟为引入了两个肽的化合物(图58)。

[3457] [实施例44: 曲妥珠单抗的硫醇引入体的肽谱]

[3458] (44-1) 曲妥珠单抗的硫醇引入体的胰蛋白酶处理

[3459] 向1.5mL低吸附微型试管中加入样品溶液10 $\mu$ L、溶解于50mM碳酸氢铵缓冲液、40%三氟乙醇的20mM的二硫苏糖醇水溶液10 $\mu$ L, 于65 $^{\circ}$ C加热1小时后, 添加50mM的碘乙酰胺水溶液10 $\mu$ L, 避光下于室温以30分钟300rpm的条件震荡使其反应。反应后, 加入50mM碳酸氢铵缓冲液40 $\mu$ L并进行搅拌, 添加20ng/ $\mu$ L的胰蛋白酶水溶液10 $\mu$ L并于37 $^{\circ}$ C酶消化18小时。消化后, 添加20%三氟乙酸水溶液2 $\mu$ L, 停止反应。然后, 使用50mM碳酸氢铵缓冲液、0.5%三氟乙酸以稀释10倍, 用于LC-MS/MS测定。

[3460] (44-2) 曲妥珠单抗的LC-MS/MS测定条件

- [3461] (分析装置)
- [3462] 纳米HPLC:EASY-nLC 1000(赛默飞世尔科技)
- [3463] 质谱仪:Tribid质谱仪Orbitrap Fusion(赛默飞世尔科技)
- [3464] (HPLC分析条件)
- [3465] 捕获柱:Acclaim PepMap(注册商标)100,75 $\mu$ m $\times$ 2cm(赛默飞世尔科技)
- [3466] 分析柱:ESI-column(NTCC-360/75-3-125,75 $\mu$ m $\times$ 12.5cm,3 $\mu$ m(日京Technos株式会社))
- [3467] 流动相A:0.1%甲酸水溶液
- [3468] 流动相B:0.1%甲酸、乙腈溶液
- [3469] 加载溶液:0.1%三氟乙酸水溶液
- [3470] 流速:300nL/min
- [3471] 样品注入量:1 $\mu$ L
- [3472] 梯度条件(B%):2%(0.0-0.5分钟)、2% $\rightarrow$ 30%(0.5-23.5分钟)、30% $\rightarrow$ 75%(23.5-25.5分钟)、75%(25.5-35.0分钟)
- [3473] (质谱仪分析条件)
- [3474] 离子化法:ESI,正离子模式
- [3475] 扫描类型:数据依赖性获取
- [3476] 活化类型:碰撞诱导离解(CID)
- [3477] 数据的获取使用附带的软件Xcalibur 3.0(赛默飞世尔科技)及Thermo Orbitrap Fusion Tune Application 2.0(赛默飞世尔科技)进行。
- [3478] (44-3)曲妥珠单抗的修饰位点的分析条件
- [3479] 关于针对LC-MS/MS测定结果的修饰位点分析,使用Proteome Discoverer version 1.4(赛默飞世尔科技)进行。
- [3480] 采用Proteome Discoverer的分析,使用Sequest HT作为搜索引擎,前体离子的范围设为350~5000Da。此外,将胰蛋白酶设定为消化酶,最大漏切位点设为3。此外,前体及碎片离子的质量容差分别设为5ppm及0.5Da。关于静态修饰,作为采用碘乙酰胺的半胱氨酸残基的修饰,设定了脲甲基(+57.021Da)。关于动态修饰,设定了甲硫氨酸的氧化(+15.995Da)及对赖氨酸残基的修饰体(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))。进而,应用滤波器以使肽置信度仅为高(high)。仅实施例43将总强度阈值(Total Intensity Threshold)设为32000。
- [3481] 此外,作为修饰位点的搜索对象的氨基酸序列的数据,使用图8所示的(1)、(3)。
- [3482] (44-4)曲妥珠单抗的基于LC-MS/MS的修饰位点的分析结果
- [3483] 作为使用LC-MS/MS的分析的结果,观测了曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的由氨基酸的33个残基组成的肽、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(SEQ ID NO:40)的肽片段的MS谱(实测值:m/z 952.23145,理论值:952.22900,4价)(图59),根据CID谱确认了重链的EU numbering中的第246位的赖氨酸残基的修饰的相当于2价的y15的m/z968.30(理论值:968.01)的产物离子(图60)。
- [3484] [实施例45:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化

合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[3485] (45-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[3486] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成

[3487] Ac-FNMQCKRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:71) 的序列。得到目标物。

[3488] (45-2) Ac-FNMQCKRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:71) 的第5位和第34位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3489] [化学式142]



[3490]



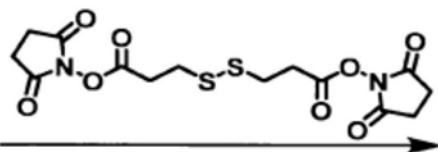
[3491] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:71。

[3492] 将(45-1)中合成的肽溶解于DMSO,加入0.1M Tris-HCl pH 8.0。向该溶液中加入谷胱甘肽氧化型并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到目标物(20.0mg, 4.67μmol)。

[3493] MS (ESI) m/z: z=3 692.70 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 519.80 [M+4H]<sup>4+</sup>

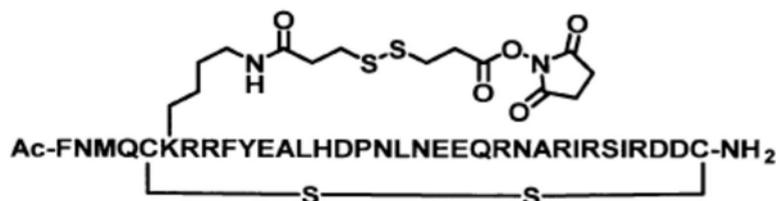
[3494] (45-3) 二硫连接体与肽的连接

[3495] [化学式143]



[3496]

DMF/MeCN = 1/2



[3497] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:71。

[3498] 将(45-2)中合成的Ac-FNMQCKRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:71) (20.0mg, 4.67μmol, 其中第5位和第34位的2个半胱氨酸分别于分子内形成了二硫键)溶

解于N,N-二甲基甲酰胺(0.50mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(76.0mg,188 $\mu$ mol)溶解于乙腈(0.60mL)而得的溶液,于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(5.50mg,1.20 $\mu$ mol)。

[3499] MS (ESI) m/z: z=6 762.40 [M+6H]<sup>6+</sup>

[3500] HPLC纯度:100%

[3501] (45-4) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3502] 将(45-2)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调解为4mM。使抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗500 $\mu$ g溶解于50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5)171 $\mu$ L,加入8.5 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为10当量),于室温下搅拌1小时。将反应液置换为100mM柠檬酸钠缓冲液(pH 2.9),使反应停止,进而置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗在148226观测到峰,引入了一个结合性肽的产物在152662确认了峰。

[3503] (45-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3504] 向(45-3)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液5 $\mu$ L(相对于抗体为等量),于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50686、50847观测到峰、及与原料同样在23439观测到轻链峰。

[3505] (45-6) 抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3506] 利用HIC分析(45-3)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40%→A0%B100%,16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}$ C、温控器温度为40 $^{\circ}$ C、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3507] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3508] a: 曲妥珠单抗原料

[3509] b: 曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体10当量;

[3510] 认为保留时间9.8954分钟为曲妥珠单抗原料、9.4892分钟为在曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物(图61)。

[3511] [实施例46: 曲妥珠单抗的硫醇引入体的肽谱]

[3512] (46-1) 曲妥珠单抗的硫醇引入体的胰蛋白酶处理

[3513] 进行了与(44-1)同样的处理。

[3514] (46-2) 曲妥珠单抗的LC-MS/MS测定条件

[3515] 使用与(44-2)同样的测定条件。

[3516] (46-3) 曲妥珠单抗的修饰位点的分析条件

[3517] 使用与(44-3)同样的分析条件。

[3518] (46-4) 曲妥珠单抗的基于LC-MS/MS的修饰位点的分析结果

[3519] 作为使用LC-MS/MS的分析的结果,观测了曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da))的由氨基酸的33个残基组成的肽、THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR (SEQ ID NO:40)的肽片段的MS谱(实测值:m/z 952.22968,理论值:952.22900,4价)(图62),根据CID谱确认了表示重链的EU numbering中的第246位的赖氨酸残基的修饰的相当于2价的y12的m/z764.60(理论值:764.40)的产物离子(图63)。

[3520] [实施例47:具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的合成、以及使用了该化合物的抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的修饰及其分析]

[3521] (47-1) IgG1 Fc结合性肽的合成

[3522] 与实施例1同样地利用Fmoc固相合成法合成

[3523] Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:72)的序列。得到目标物。

[3524] (47-2) Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:72)的第5位和第34位的Cys处的分子内二硫键的形成

[3525] [化学式144]



[3526]



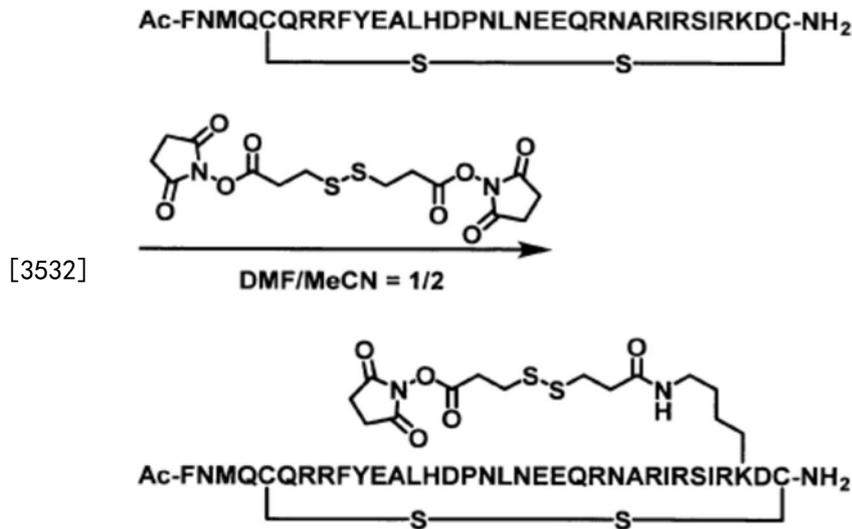
[3527] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:72。

[3528] 将(47-1)中合成的肽溶解于DMSO,加入0.1M Tris-HCl pH 8.0。向该溶液中加入谷胱甘肽氧化型并于室温下搅拌20小时。向反应溶液中加入2M三氟乙酸水溶液,使反应停止,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到目标物(24.5mg,5.71μmol)。

[3529] MS (ESI) m/z: z=3 692.70 [M+3H]<sup>3+</sup>, z=4 519.80 [M+4H]<sup>4+</sup>

[3530] (47-3) 二硫连接体与肽的连接

[3531] [化学式145]



[3533] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:72。

[3534] 将(47-2)中合成的Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 72) (24.5mg, 5.71μmol, 其中第5位和第34位的2个半胱氨酸分别于分子内形成了二硫键)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL),加入将3,3'-二硫代二丙酸双(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(92.2mg, 228μmol)溶解于乙腈(1.00mL)而得的溶液,于室温下搅拌24小时。通过减压浓缩而除去乙腈后,将其溶解于0.05%三氟乙酸水溶液,供至以十八烷基化学键合硅胶为填充剂的反相高效液相色谱,用含有0.05%三氟乙酸的水和乙腈的混合溶液进行洗脱,利用LC-MS确认了各级分。回收包含产物的级分,通过减压浓缩而除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽二硫连接体连接物-NHS活化体(7.50mg, 1.64μmol)。

[3535] MS (ESI) m/z: z=6 762.40 [M+6H]<sup>6+</sup>

[3536] HPLC纯度:84%

[3537] (47-4)抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3538] 将(47-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。将抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗500μg溶解于50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5)171μL,加入8.5μL的4mM的肽试剂(相对于抗体为10当量),于室温下搅拌1小时。将反应液置换为100mM柠檬酸钠缓冲液(pH 2.9),使反应停止,进而置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗在148087观测到峰,引入了一个结合性肽的产物在152694确认了峰,引入了两个结合性肽的产物在157160确认了峰。

[3539] (47-5)曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3540] 向(47-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液5μL(相对于抗体为等量),于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在重链中引入了硫代丙酰基的50686、50847观测到峰、及与原料同样在23439观测到轻链峰。

[3541] (47-6)抗HER2IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3542] 利用HIC分析(47-4)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column (Waters) 4.6x100mm 2.5μm。使用A缓冲液:0.1M PiNa, 2.3M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa, pH7.0, 流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40%→A0%B100%,

16min(数据采集20min)、柱温为40℃、温控器温度为40℃、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3543] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3544] a:曲妥珠单抗原料

[3545] b:曲妥珠单抗+肽二硫连接体连接物-NHS活化体10当量;

[3546] 认为保留时间9.5796分钟为曲妥珠单抗原料、9.1199分钟为在曲妥珠单抗中引入了一个肽的化合物(图64)。

[3547] [实施例48:曲妥珠单抗的硫醇引入体的肽谱]

[3548] (48-1)曲妥珠单抗的硫醇引入体的胰蛋白酶处理

[3549] 进行了与(44-1)同样的处理。

[3550] (48-2)曲妥珠单抗的LC-MS/MS测定条件

[3551] 使用与(44-2)同样的测定条件。

[3552] (48-3)曲妥珠单抗的修饰位点的分析条件

[3553] 使用与(44-3)同样的分析条件。

[3554] (48-4)曲妥珠单抗的基于LC-MS/MS的修饰位点的分析结果

[3555] 作为使用LC-MS/MS的分析的结果,观测了曲妥珠单抗的采用胰蛋白酶消化的包含对赖氨酸残基的修饰位点(接受了采用碘乙酰胺的脲甲基化的硫醇引入体(+145.019Da)的由氨基酸的33个残基组成的肽、FNWYVDGVEVHNAKTKPR(SEQ ID NO:69)的肽片段的MS谱(实测值:m/z 769.04529,理论值:769.04457,3价)(图65),根据CID谱确认了表示重链的EU numbering中的第290位的赖氨酸残基的修饰的相当于2价的y8的m/z 549.11(理论值:548.79)的产物离子(图66)。

[3556] [实施例49:使用具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的人IgG2抗体的修饰及其分析]

[3557] (49-1)人IgG2抗体的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3558] 将实施例(2-2)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。将人IgG2抗体(RayBiotech公司制)500μg溶解于50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5)171μL,加入8.5μL的4mM的肽试剂(相对于抗体为10当量),于室温下搅拌1小时。将反应液置换为100mM柠檬酸钠缓冲液(pH 2.9)并使反应停止,进而置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的IgG2抗体在153047观测到峰,引入了一个结合性肽的产物在155129确认了峰,引入了两个结合性肽的产物在157699确认了峰。

[3559] (49-2)人IgG2抗体的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3560] 利用HIC分析(49-1)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5μm。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40%→A0%B100%,16min(数据采集20min)、柱温为40℃、温控器温度为40℃、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3561] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3562] a:人IgG2抗体原料

[3563] b:人IgG2抗体+肽二硫连接体连接物-NHS活化体10当量;

[3564] 认为保留时间9.0209分钟为人IgG2抗体原料、10.2043分钟为在人IgG2抗体中引入了一个肽的化合物(图67)。

[3565] [实施例50:使用了具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的人IgG2抗体的修饰及其分析]

[3566] (50-1)人IgG2抗体的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3567] 将实施例(43-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。使人IgG2抗体(RayBiotech公司制)500 $\mu$ g溶解于50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5)171 $\mu$ L,加入8.5 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为10当量),于室温下搅拌1小时。将反应液置换为100mM柠檬酸钠缓冲液(pH 2.9)并使反应停止,进而置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的IgG2抗体在153047观测到峰,引入了一个结合性肽的产物在157652确认了峰,引入了两个结合性肽的产物在165043确认了峰。

[3568] (50-2)人IgG2抗体的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3569] 利用HIC分析(50-1)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40%→A0%B100%,16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}$ C、温控器温度为40 $^{\circ}$ C、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3570] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3571] a:人IgG2抗体原料

[3572] b:人IgG2抗体+肽二硫连接体连接物-NHS活化体10当量;

[3573] 认为保留时间9.0209分钟为人IgG2抗体原料、8.3882分钟为在人IgG2抗体中引入了一个肽的化合物(图68)。

[3574] [实施例51:使用具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的人IgG4抗体的修饰及其分析]

[3575] (51-1)人IgG4抗体的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3576] 将实施例(2-2)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。使人IgG4抗体(RayBiotech公司制)500 $\mu$ g溶解于50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5)171 $\mu$ L,加入8.5 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为10当量),于室温下搅拌1小时。将反应液置换为100mM柠檬酸钠缓冲液(pH 2.9),使反应停止,进而置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的IgG2抗体在154618观测到峰,引入了两个结合性肽的产物在159130确认了峰。

[3577] (51-2)人IgG4抗体的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3578] 利用HIC分析(51-1)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40%→A0%B100%,16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}$ C、温控器温度为40 $^{\circ}$ C、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3579] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3580] a:人IgG4抗体原料

[3581] b: 人IgG4抗体+肽二硫连接体连接物-NHS活化体10当量;

[3582] 认为保留时间10.3154分钟为人IgG4抗体原料、11.2450分钟为在人IgG4抗体中引入了一个肽的化合物(图69)。

[3583] [实施例52:使用具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽二硫连接体连接物-NHS活化体)的人IgG4抗体的修饰及其分析]

[3584] (52-1) 人IgG4抗体的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3585] 将实施例(43-3)中合成的肽二硫连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。使人IgG2抗体(RayBiotech公司制)500 $\mu$ g溶解于50mM乙酸钠缓冲液(pH 5.5)171 $\mu$ L,加入8.5 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为10当量),于室温下搅拌1小时。将反应液置换为100mM柠檬酸钠缓冲液(pH 2.9),使反应停止,进而置换为20mM的PBS缓冲液。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的IgG2抗体在154618观测到峰,引入了两个结合性肽的产物在163530确认了峰。

[3586] (52-2) 人IgG4抗体的特异性修饰的HIC-UPLC分析

[3587] 利用HIC分析(52-1)中生成的抗体-肽复合物及原料抗体。柱使用Protein-Pak Hi Res HIC Column(Waters)4.6x100mm 2.5 $\mu$ m。使用A缓冲液:0.1M PiNa,2.3M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH7.0、B缓冲液:0.1M PiNa,pH7.0,流速为0.6ml/min、梯度为A60%B40%→A0%B100%,16min(数据采集20min)、柱温为40 $^{\circ}$ C、温控器温度为40 $^{\circ}$ C、检测器以280nm的波长进行了检测。

[3588] 对于样品,按照以下的条件进行反应。

[3589] a: 人IgG4抗体原料

[3590] b: 人IgG4抗体+肽二硫连接体连接物-NHS活化体10当量;

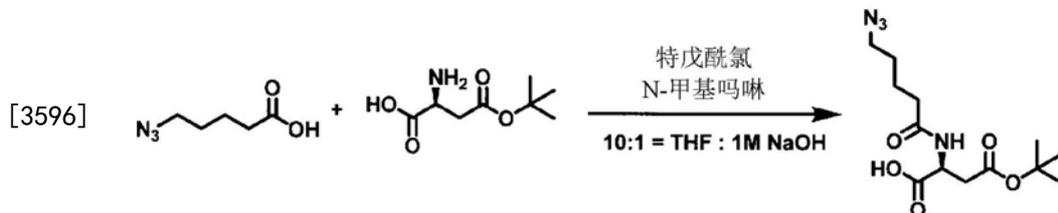
[3591] 认为保留时间10.3154分钟为人IgG4抗体原料、8.8645分钟为在人IgG4抗体中引入了一个肽的化合物(图70)。

[3592] [实施例53:通过(1)切割性连接体的合成、以及(2)合成的连接体与IgG1 Fc结合性肽的连接所进行的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物(肽-叠氮修饰硫酯连接体连接物-NHS活化体)的合成]

[3593] (53-1) 硫酯连接体的合成及与肽的连接

[3594] (53-1-1) 硫酯连接体的合成

[3595] [化学式146]

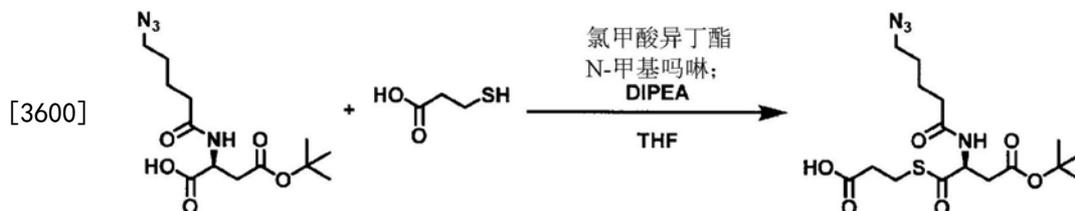


[3597] 使5-叠氮戊酸(200mg,1.40mmol)溶解于THF溶剂(12mL),在0 $^{\circ}$ C下加入特戊酰氯(206 $\mu$ L,1.68mmol)、N-甲基吗啉(230 $\mu$ L,2.10mmol)并搅拌30分钟,制备5-叠氮戊酸的混合酸酐。室温下使4-(叔丁氧基羰基)-2-氨基丁酸(344mg、1.82mmol)溶解于1M氢氧化钠水溶液(1.82mL)后,室温下滴加前述的5-叠氮戊酸的混合酸酐的THF溶液。室温下搅拌16小时后,加入6M盐酸水溶液,将体系内的pH调节至3.0。将反应液用乙酸乙酯稀释,用水、食盐水

清洗后,加入无水硫酸镁,静置5分钟。通过过滤除去硫酸镁,通过减压浓缩而得到粗产物后,通过柱层析(二氯甲烷:甲醇=10:1)纯化。回收含产物的级分,通过减压浓缩,得到4-(叔丁氧基羰基)-2-(5-叠氮-1-氧代戊基)氨基丁酸(320mg,1.02mmol)。

[3598] MS (ESI)  $m/z$ : 337  $[M+Na]^+$

[3599] [化学式147]

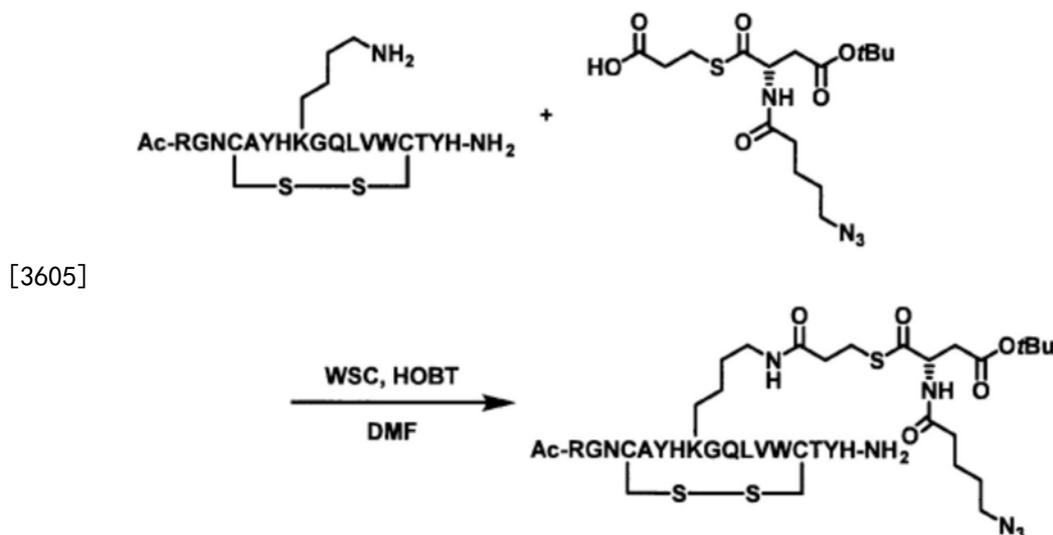


[3601] 使4-(叔丁氧基羰基)-2-(5-叠氮-1-氧代戊基)氨基丁酸(154mg,0.490mmol)溶解于THF(4.9mL),在0℃下加入氯甲酸异丁酯(83.6μL,0.637mmol)、N-甲基吗啉(108μL,0.980mmol)并搅拌30分钟,制备对应的混合酸酐。室温下使巯基丙酸(128μL,1.47mmol)、N,N-二异丙基乙基胺(253μL,1.47mmol)溶解于THF后,室温下滴加前述的混合酸酐的THF溶液。室温下搅拌16小时后,加入1M氢氧化钠水溶液,将体系内的pH调节为9.0。将反应液用水和乙酸乙酯清洗,回收水相。向水相中加入6M盐酸水溶液,将体系内的pH调节为3.0后,进行采用乙酸乙酯的分液萃取后,用食盐水清洗有机相后,加入无水硫酸镁并静置5分钟。通过过滤除去硫酸镁,通过减压浓缩,得到3-[4-(叔丁氧基羰基)-2-(5-叠氮-1-氧代戊基)氨基-1-氧代]巯基丙酸(108mg,0.268mmol)。

[3602] MS (ESI)  $m/z$ : 403  $[M+H]^+$

[3603] (53-1-2) 硫酯连接体与肽的连接

[3604] [化学式148]



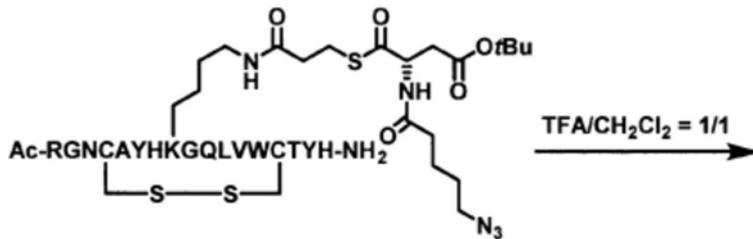
[3606] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

[3607] 将实施例1-2中合成的Ac-RGNCA YHKGQLVWCTYH-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:39)的肽(31.8mg, 15.3μmol,其中第4位和第14位的2个的高半胱氨酸分别在分子内形成了二硫键)溶解于1mL的N,N'-二甲基甲酰胺,使3-[4-(叔丁氧基羰基)-2-(5-叠氮-1-氧代戊基)氨基-1-氧代]-巯基丙酸(61.7mg,0.153mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(29.4mg,

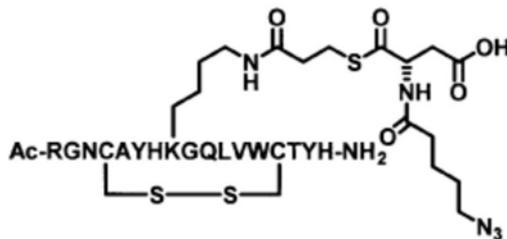
0.153mmol)、1-羟基苯并三唑(10.4mg,0.0766mmol)溶解于1mL的DMF,加入体系中。室温下搅拌2小时后,加入0.1%三氟乙酸水溶液,通过反相制备色谱洗脱。回收含产物的级分,通过减压浓缩而仅除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽连接体连接-tBu体(2.5mg,1.02 $\mu$ mol)。

[3608] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  1230  $[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$  820  $[M+3H]^{3+}$

[3609] [化学式149]



[3610]

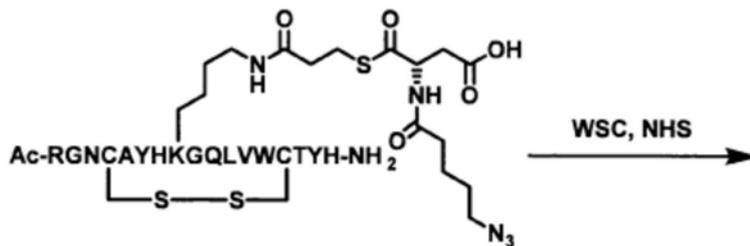


[3611] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

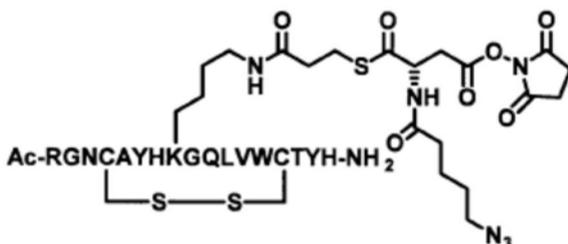
[3612] 将上述肽连接体连接物(2.5mg,1.02 $\mu$ mol)溶解于二氯甲烷0.250mL中,加入三氟乙酸0.250mL并于室温中搅拌1小时。进行减压浓缩后,加入0.1%三氟乙酸水溶液,通过反相制备色谱进行洗脱。回收含产物的级分,通过减压浓缩而仅除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽连接体连接物-羧酸体。

[3613] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  1202  $[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$  802  $[M+3H]^{3+}$

[3614] [化学式150]



[3615]



[3616] 上述氨基酸序列为SEQ ID NO:39。

[3617] 将上述肽连接体连接物-羧酸体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺0.5mL,加入1-乙基-3-

(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(2.0mg,10.2 $\mu$ mol)、N-羟基琥珀酰亚胺(1.2mg,10.2 $\mu$ mol)并搅拌16小时。向反应液中加入0.1%三氟乙酸水溶液,通过反相制备色谱进行洗脱。回收含产物的级分,通过减压浓缩而仅除去乙腈后,进行冷冻干燥,得到上述肽-叠氮修饰硫酯连接体连接物-NHS活化体(0.5mg,0.2 $\mu$ mol)。

[3618] MS (ESI)  $m/z$ :  $z=2$  1251  $[M+2H]^{2+}$ ,  $z=3$  834  $[M+3H]^{3+}$

[3619] [实施例54:抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰、以及基于ESI-TOFMS的分析]

[3620] (54-1) 采用叠氮修饰硫酯连接体结合性肽试剂的IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰及基于ESI-TOFMS的分析

[3621] 将实施例53的(53-1-2)中合成的肽-叠氮修饰硫酯连接体连接物-NHS活化体溶解于N,N'-二甲基甲酰胺并调节为4mM。使抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗(中外制药)1.48mg溶解于60mM乙酸钠缓冲液(pH4.7)555 $\mu$ L,加入50 $\mu$ L的4mM的肽试剂(相对于抗体为20当量),室温下搅拌1小时,利用100mM柠檬酸使反应停止。利用Amicon 10K将反应液溶剂置换为9.57mM的PBS缓冲液(pH7.4)。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗在148225观测到峰,产物在引入了两个结合性肽的153143观测到峰。

[3622] (54-2) 抗HER2 IgG抗体曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3623] 向(54-1)中生成的抗体-肽复合物的PBS溶液中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液2.0 $\mu$ L(相对于抗体为100当量),于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的曲妥珠单抗在50595,50757观测到重链峰、在23440观测到轻链峰,产物在重链中引入了结合性肽的52981及53143观测到峰、与原料同样在23440观测到轻链峰。

[3624] (54-3) 硫酯连接体的切割及基于ESI-TOFMS的分析

[3625] 在任意的缓冲液(pH4.5~pH9.0)中溶解(54-1)中合成的抗体-肽硫酯连接体复合物,加入羟胺水溶液,在室温下进行搅拌,从而硫酯结构水解,叠氮基残留于抗体上。对其可利用ESI-TOFMS测定质量。

[3626] (54-4) 曲妥珠单抗-肽复合物的连接体切割、及产物的基于ESI-TOFMS的分析

[3627] 首先,将(54-1)中合成的曲妥珠单抗-肽复合物120 $\mu$ g溶解于0.5M羟胺水溶液(使0.5M羟胺、9.56mM的PBS、4.8g/mL的EDTA溶解于纯水而得的水溶液(pH7.2)),室温下进行搅拌,切割连接体中的硫酯键。利用ESI-TOFMS测定了质量,产物在引入了两个叠氮的148469观测到峰。

[3628] (54-5) 曲妥珠单抗的特异性修饰体的还原条件下的基于ESI-TOFMS分析的重链选择性的确认

[3629] 向(54-4)中生成的抗体-肽复合物中加入7mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐溶液2.0 $\mu$ L(相对于抗体为100当量),于室温下搅拌20分钟。利用ESI-TOFMS测定了质量,原料的抗体-肽复合物在52981及53143观测到重链峰、在23440观测到轻链峰,产物在重链中引入了叠氮的50836及50999观测到峰、与原料同样在23440观测到轻链峰。

[3630] (小结)

[3631] 将以上的结果总结如下。

[3632] [表2]

[3633] 表2. 亲和性肽的汇总

氨基酸序列	SEQ ID NO:	实施例
RGNCAYHKGQLVWCTYH	5 1	1 ~ 1 5
RGNCKYHRGQLVWCTYH	5 4	1 6
RGNCAWHRGKLVWCTYH	5 5	1 7
RGNCKWHRGELVWCTYH	5 6	1 8
RGNCKWHRGQLVWCTYH	5 7	1 9
RGNCKYHLGELVWCTYH	5 8	2 0
RGNCKYHLGQLVWCTYH	5 9	2 1
DCKWHLGELVWCT	6 0	2 2
DCKYHLGELVWCT	6 1	2 3
DCKWHRGELVWCT	6 2	2 4
DCKWHLGQLVWCT	6 3	2 5
DCKYHRGELVWCT	6 4	2 6
DCKYHLGQLVWCT	6 5	2 7
DCKWHRGQLVWCT	6 6	2 8
DCKYHRGQLVWCT	6 7	2 9
RGNCAWHLGQLVWCKYH	6 8	3 0
RGNCAWHLGELVWCKYH	6 9	3 1
RGNCAYHLGQLVWCTKH	7 0	3 2
RGNCAYHLGQLVWCTYK	7 1	3 3
RGNCAYHRGQLVWCTKH	7 2	3 4
KNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	7 3	3 5
FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	7 4	3 6
FNMQCQRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	7 5	3 7
FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC	7 6	3 8
FNMQCQRRFYEALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC	7 7	3 9
FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC	8 0	4 1
FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	8 2	4 3
FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	8 3	4 5
FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC	8 4	4 7

[3635] 此外,对于抗体,示出了以第246位和/或第248位的赖氨酸残基(例如实施例8、15、44、46)、第288位和/或第290位的赖氨酸残基(例如实施例42、实施例48)、第317位的赖氨酸残基(例如实施例40)为代表的特定氨基酸残基的区域选择性修饰是可能的。

[3636] 进而,关于由下述式(I)表示的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的下述化合物,列举一部分实施例作为例子进行说明时,如以下的表3所述。

[3637] A-L-B-R (I)

[3638] [式中、

[3639] A为针对可溶性蛋白质的亲和性物质,

[3640] L为切割性连接体,该切割性连接体是包含切割性部分的二价基团,

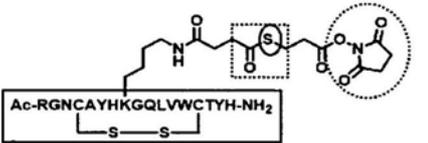
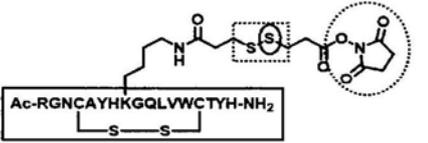
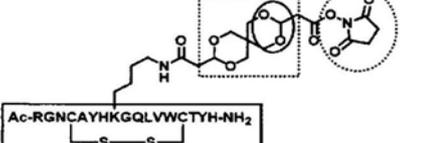
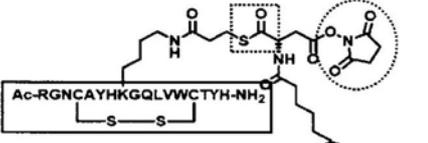
[3641] B为(a)包含生物正交性官能团的二价基团、或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团,

[3642] R为针对前述可溶性蛋白质的反应性基团。]

[3643] L为(i)作为“包含具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力的切割性部分的二价基团”的切割性连接体、或者(ii)作为“包含不具有通过切割而在反应性基团侧生成生物正交性官能团的能力的切割性部分的二价基团”的切割性连接体。

[3644] [表3]

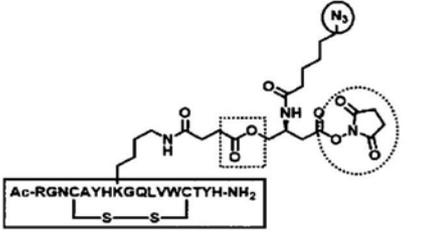
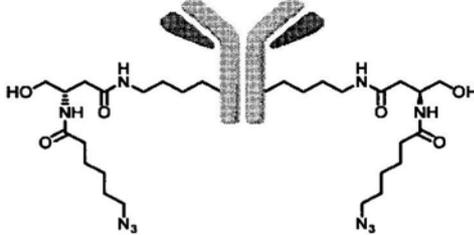
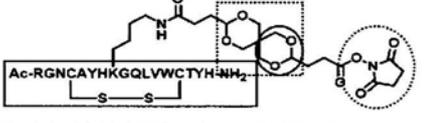
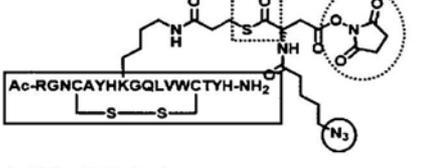
[3645] 表3. 具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物与可由其制造的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质(抗体)的关系(其一)

实施例	化合物的具体结构 <div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div><span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> :亲和性物质(A)</div> <div><span style="border: 1px dashed black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> :切割性部分(L中)</div> <div><span style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> :生物正交性官能团 B(a) 或 L(ii)</div> <div><span style="border: 1px dashed black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> :反应性基团(R)</div> </div>	可使用左侧化合物制造的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质(抗体)*
2-1	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	
2-2	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	
2-3	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	
11-1	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	

[3647] \*从抗体延伸的NH-C4烷基部分是源自抗体的赖氨酸残基侧链(下同)

[3648] [表4]

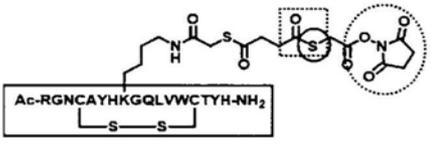
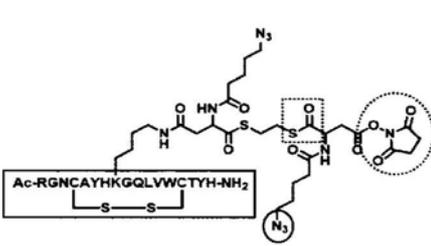
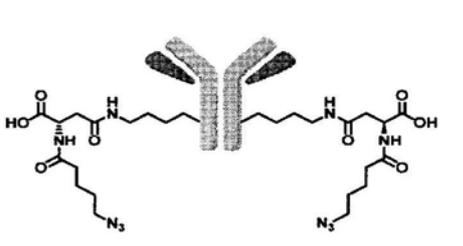
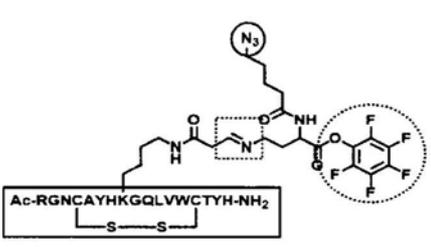
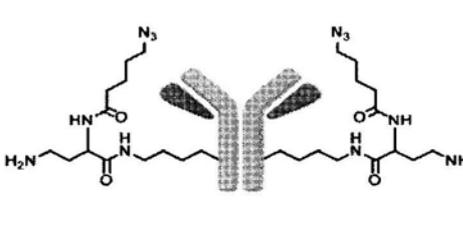
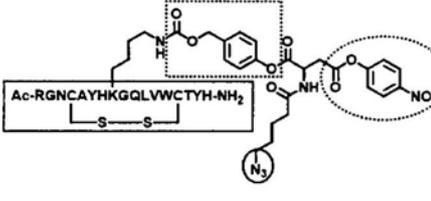
[3649] 表4. 具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物与可由其制造的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质(抗体)的关系(其二)

实施例	化合物的具体结构 □:亲和性物质(A) □:切割性部分(L中) ○:生物正交性官能团 B(a)或L(ii) ○:反应性基团(R)	可使用左侧化合物制造的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质(抗体)*
11-2	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	
11-3	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	
53	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	

[3651] 关于具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的各种化合物,如上所述,通过适当变更针对可溶性蛋白质的亲和性物质(A)、作为包含切割性部分的二价基团的切割性连接体(L)、(a)包含生物正交性官能团的二价基团或者(b)不含生物正交性官能团的二价基团(B)、针对可溶性蛋白质的反应性基团(R)的种类,从而可按照众所周知的有机合成方法而制备。本发明中可以制备的具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物的进一步的例子与可由其制造的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质(抗体)的关系如下所述。

[3652] [表5]

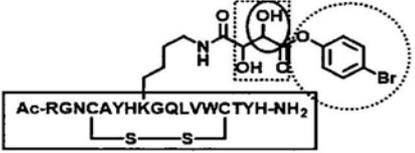
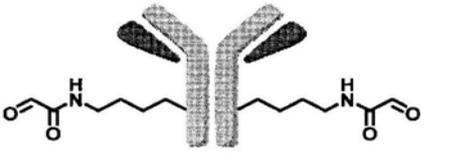
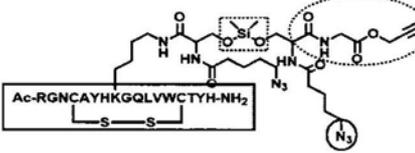
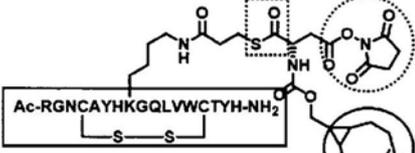
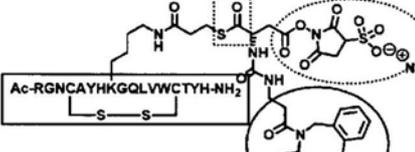
[3653] 表5.具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物的进一步的例子与可由其制造的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质(抗体)的关系(其一)

实施例	化合物的具体结构 <div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div><span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> :亲和性物质(A)</div> <div><span style="border: 1px dashed black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> :切割性部分(L 中)</div> <div><span style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> :生物正交性官能团 B(a) 或 L(ii)</div> <div><span style="border: 1px dotted black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> :反应性基团(R)</div> </div>	可使用左侧化合物制造的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质(抗体)*
55	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	
56	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	
57	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	
58	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	

[3654]

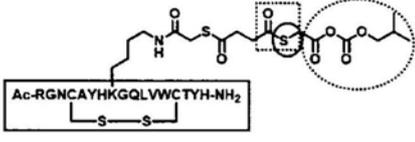
[3655] [表6]

[3656] 表6.具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物的进一步的例子与可由其制造的具有生物正交性官能团的(抗体)的关系(其二)

实施例	化合物的具体结构 <div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div><span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> : 亲和性物质(A)</div> <div><span style="border: 1px dashed black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> : 切割性部分(L 中)</div> <div><span style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> : 生物正交性官能团 B(a) 或 L(ii)</div> <div><span style="border: 1px dotted black; border-radius: 50%; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span> : 反应性基团(R)</div> </div>	可使用左侧化合物制造的具有生物正交性官能团的 可溶性蛋白质(抗体)*
59	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	
60	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	
61	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	
62	 <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	

[3657] [表7]

[3659] 表7.具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物的进一步的例子与可由其制造的具有生物正交性官能团的  
可溶性蛋白质(抗体)的关系(其三)

实施例	化合物的具体结构	可使用左侧化合物制造的具有生物正交性官能团的可溶性蛋白质(抗体)*
[3660] 63	<p> <input type="checkbox"/> :亲和性物质(A)  <input type="checkbox"/> :切割性部分(L中)  <input type="checkbox"/> :生物正交性官能团 B(a) 或 L(ii)  <input type="checkbox"/> :反应性基团(R)         </p>  <p>上述氨基酸序列: SEQ ID NO: 51</p>	

[3661] 根据以上内容显示,具有针对可溶性蛋白质的亲和性物质、切割性部分及反应性基团的化合物中,通过适当调节亲和性物质的种类、亲和性物质与反应性基团之间的连接体的长度、及连接体所引入的亲和性物质中的位置等因素,从而可以区域选择性地修饰抗体。

[3662] 产业上的可利用性

[3663] 本发明例如可用于区域选择性修饰的可溶性蛋白质的制造。



Glu Xaa Xaa Gly Xaa Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 20 25 30  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 35 40 45  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 50 55 60  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 85 90 95  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 115 120 125  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Xaa Glu Xaa Thr Lys  
 130 135 140  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 145 150 155 160  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 165 170 175  
 Xaa Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 180 185 190  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 195 200 205  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 210 215 220  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 225 230  
 <210> 2  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 曲妥珠单抗的重链 (人IgG1单克隆抗体)  
 <400> 2  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asp Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr





Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 曲妥珠单抗的肽片段

<400> 5

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 20 25

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 曲妥珠单抗的肽片段

<400> 6

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 1 5 10 15

<210> 7

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人IgG1 Fc区域的肽片段 抗体

<400> 7

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro  
 1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 20 25

- <210> 8  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人IgG1 Fc区域的肽片段 抗体  
 <400> 8  
 Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Lys Asp Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
                   20
- <210> 9  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG CH2区域具有亲和性的肽  
 <400> 9  
 Glu Pro Ile His Arg Ser Thr Leu Thr Ala Leu Leu  
 1                   5                   10
- <210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <400> 10  
 Phe Ala Arg Leu Val Ser Ser Ile Arg Tyr  
 1                   5                   10
- <210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <400> 11  
 Phe Gly Arg Leu Val Ser Ser Ile Arg Tyr  
 1                   5                   10
- <210> 12



<220>  
<223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
<400> 16  
His Phe Arg Arg His Leu  
1                    5  
<210> 17  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
<400> 17  
Asp Ala Ala Gly  
1  
<210> 18  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
<400> 18  
Asn Ala Arg Lys Phe Tyr Lys Gly  
1                    5  
<210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
<400> 19  
Asn Lys Phe Arg Gly Lys Tyr Lys  
1                    5  
<210> 20  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工  
<220>  
<223> IgG-结合性肽  
<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 20  
 Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
 1                    5                    10  
 <210> 21  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 21  
 Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe  
 1                    5                    10                    15  
 His  
 <210> 22  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 22  
 Arg Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Ser  
 1                    5                    10  
 <210> 23  
 <211> 17  
 <212> PRT

<213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 23  
 Gly Pro Arg Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Ser Phe  
 1                    5                    10                    15  
 His  
 <210> 24  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 24  
 Ser Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe  
 1                    5                    10                    15  
 His  
 <210> 25  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 25



<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
酸, 或二氨基丙酸

<400> 28

Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr His  
1                   5                   10                   15

His

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> IgG-结合性肽

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
酸, 或二氨基丙酸

<400> 29

Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe  
1                   5                   10                   15

Tyr

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> IgG-结合性肽

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
酸, 或二氨基丙酸

<400> 30

Ser Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe  
1                   5                   10                   15

Tyr

<210> 31  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 31  
 Ser Asp Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe  
 1                    5                    10                    15  
 Tyr  
 <210> 32  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 32  
 Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr  
 1                    5                    10                    15  
 His  
 <210> 33  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2) .. (2)

<223> Xaa为高丝氨酸  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (16) .. (16)  
 <223> Xaa为高丝氨酸  
 <400> 33  
 Gly Xaa Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Xaa  
 1                    5                    10                    15  
 His  
 <210> 34  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (10) .. (10)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 34  
 Arg Arg Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Phe His  
 <210> 35  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二

酸, 或二氨基丙酸

<400> 35  
 Asp Cys Thr Tyr His Xaa Gly Asn Leu Val Trp Cys Thr  
 1                   5                   10

<210> 36  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸

<400> 36  
 Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Asn Leu Val Trp Cys Thr  
 1                   5                   10

<210> 37  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸

<400> 37  
 Asp Cys Thr Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
 1                   5                   10

<210> 38  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> IgG-结合性肽  
 <220>

<221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二  
 酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 38  
 Asp Cys Ala Trp His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
 1                   5                   10  
 <210> 39  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> N末端的精氨酸残基可以被乙酰化且两个半胱氨酸  
 残基可以通过二硫键连接  
 <400> 39  
 Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Lys Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr  
 1                   5                   10                   15  
 His  
 <210> 40  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 曲妥珠单抗的肽片段 (人IgG1单克隆  
 抗体)  
 <400> 40  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
                   20                   25                   30  
 Arg  
 <210> 41  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 曲妥珠单抗的重链 (人IgG1单克隆抗体)  
 <400> 41  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr			
	20	25	30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
	115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
	130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
	180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
	210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
	290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320





残基可以通过二硫键连接

<400> 47

Arg Gly Asn Cys Lys Tyr His Leu Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr

1                    5                    10                    15

His

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的天冬氨酸残基可以被乙酰化且两个  
半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 48

Asp Cys Lys Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1                    5                    10

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的天冬氨酸残基可以被乙酰化且两个  
半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 49

Asp Cys Lys Tyr His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1                    5                    10

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的天冬氨酸残基可以被乙酰化且两个  
半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 50

Asp Cys Lys Trp His Arg Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1                    5                    10

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的天冬氨酸残基可以被乙酰化且两个  
半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 51

Asp Cys Lys Trp His Leu Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr  
1                    5                    10

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的天冬氨酸残基可以被乙酰化且两个  
半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 52

Asp Cys Lys Tyr His Arg Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1                    5                    10

<210> 53

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的天冬氨酸残基可以被乙酰化且两个  
半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 53

Asp Cys Lys Tyr His Leu Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr  
1                    5                    10

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的天冬氨酸残基可以被乙酰化且两个  
半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 54

Asp Cys Lys Trp His Arg Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr  
1                    5                    10

<210> 55

<211> 13

<212> PRT



His

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N末端的精氨酸残基可以被乙酰化且两个半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

&lt;400&gt; 59

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Leu Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr

1

5

10

15

Lys

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N末端的精氨酸残基可以被乙酰化且两个半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

&lt;400&gt; 60

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Arg Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Lys

1

5

10

15

His

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N末端的赖氨酸残基可以被乙酰化且两个半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

&lt;400&gt; 61

Lys Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro

1

5

10

15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Asp

20

25

30

Asp Cys

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的苯丙氨酸残基可以被乙酰化且两个  
半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 62

Phe	Asn	Met	Gln	Cys	Gln	Lys	Arg	Phe	Tyr	Glu	Ala	Leu	His	Asp	Pro
1				5					10					15	
Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Ile	Arg	Asp
			20					25						30	

Asp Cys

<210> 63

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的苯丙氨酸残基可以被乙酰化且两个  
半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 63

Phe	Asn	Met	Gln	Cys	Gln	Arg	Arg	Phe	Tyr	Glu	Ala	Lys	His	Asp	Pro
1				5					10					15	
Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Ile	Arg	Asp
			20					25						30	

Asp Cys

<210> 64

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的苯丙氨酸残基可以被乙酰化且两个  
半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 64

Phe	Asn	Met	Gln	Cys	Gln	Arg	Arg	Phe	Tyr	Glu	Ala	Leu	His	Asp	Pro
1				5					10					15	
Asn	Leu	Asn	Glu	Glu	Gln	Arg	Lys	Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Ile	Arg	Asp
			20					25						30	

Asp Cys

<210> 65

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的苯丙氨酸残基可以被乙酰化且两个  
半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 65

Phe	Asn	Met	Gln	Cys	Gln	Arg	Arg	Phe	Tyr	Glu	Ala	Leu	His	Asp	Pro
1				5					10					15	
Asn	Leu	Asn	Lys	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Ile	Arg	Asp
			20					25						30	

Asp Cys

<210> 66

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽片段

<400> 66

Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
1				5					10					15	

Glu Tyr Lys

<210> 67

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽片段

<400> 67

Glu	Glu	Gln	Tyr	Asp	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
1				5					10					15	
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys				
			20					25							

<210> 68

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的苯丙氨酸残基可以被乙酰化且两个  
半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 68

Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro  
 1                    5                    10                    15  
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Lys Asp  
                   20                    25                    30

Asp Cys

<210> 69

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽片段

<400> 69

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 1                    5                    10                    15

Pro Arg

<210> 70

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的苯丙氨酸残基可以被乙酰化且两个  
 半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 70

Phe Asn Lys Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro  
 1                    5                    10                    15  
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Asp  
                   20                    25                    30

Asp Cys

<210> 71

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端的苯丙氨酸残基可以被乙酰化且两个  
 半胱氨酸残基可以通过二硫键连接

<400> 71

Phe Asn Met Gln Cys Lys Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro  
 1                    5                    10                    15  
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Asp

	20	25	30
Asp Cys			
<210>	72		
<211>	34		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	N末端的苯丙氨酸残基可以被乙酰化且两个半胱氨酸残基可以通过二硫键连接		
<400>	72		
Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro			
1	5	10	15
Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Lys			
	20	25	30
Asp Cys			
<210>	73		
<211>	17		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	对人IgG Fc区域具有亲和性的肽		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(8) .. (8)		
<223>	Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸		
<400>	73		
Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr			
1	5	10	15
His			
<210>	74		
<211>	17		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	对人IgG Fc区域具有亲和性的肽		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(8) .. (8)		

<223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸

<400> 74

Arg Gly Asn Cys Ala Trp His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr  
1                   5                   10                   15

His

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸

<400> 75

Arg Gly Asn Cys Ala Trp His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Tyr  
1                   5                   10                   15

His

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸

<400> 76

Arg Gly Asn Cys Lys Trp His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr  
1                   5                   10                   15

His

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 77  
 Arg Gly Asn Cys Lys Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Tyr  
 1                    5                    10                    15  
 His  
 <210> 78  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 78  
 Arg Gly Asn Cys Lys Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr  
 1                    5                    10                    15  
 His  
 <210> 79  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 79



<223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 82  
 Asp Cys Lys Trp His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr  
 1                    5                    10  
 <210> 83  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 83  
 Asp Cys Lys Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
 1                    5                    10  
 <210> 84  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 84  
 Asp Cys Lys Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr  
 1                    5                    10  
 <210> 85  
 <211> 13



1	5	10	15
---	---	----	----

His

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸

<400> 88

Arg	Gly	Asn	Cys	Ala	Trp	His	Xaa	Gly	Glu	Leu	Val	Trp	Cys	Lys	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
---	---	----	----

His

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸

<400> 89

Arg	Gly	Asn	Cys	Ala	Tyr	His	Xaa	Gly	Gln	Leu	Val	Trp	Cys	Thr	Lys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
---	---	----	----

His

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 90  
 Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr  
 1                    5                    10                    15  
 Lys  
 <210> 91  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <400> 91  
 Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Lys  
 1                    5                    10                    15  
 His  
 <210> 92  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> N末端的苯丙氨酸残基可以被乙酰化且两个  
 半胱氨酸残基可以通过二硫键连接  
 <400> 92  
 Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro  
 1                    5                    10                    15  
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Asp  
                   20                    25                    30  
 Asp Cys  
 <210> 93  
 <211> 34  
 <212> PRT

- <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> N末端的苯丙氨酸残基可以被乙酰化且两个半胱氨酸残基可以通过二硫键连接  
 <400> 93  
 Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro  
 1                    5                    10                    15  
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Lys Ile Lys Ser Ile Arg Asp  
                   20                    25                    30  
 Asp Cys  
 <210> 94  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) .. (3)  
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5) .. (6)  
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10) .. (10)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 谷氨酰胺, 谷氨酸, 天冬酰胺, 或天冬氨酸  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15) .. (17)  
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸  
 <400> 94

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa  
 <210> 95  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) .. (3)  
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5) .. (6)  
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 半胱氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基  
 辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10) .. (10)  
 <223> Xaa为谷氨酸, 或天冬氨酸  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15) .. (17)  
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸  
 <400> 95  
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa  
 <210> 96  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>

<223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (3)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (5) .. (6)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa为精氨酸, 或亮氨酸

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa为赖氨酸, 谷氨酸, 或天冬氨酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15) .. (17)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 96

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa

1

5

10

15

Xaa

<210> 97

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (3)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 半胱氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸, 2-氨基  
 辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15) .. (17)  
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸  
 <400> 97  
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Tyr His Xaa Gly Asn Leu Val Trp Cys Xaa Xaa  
 1                    5                    10                    15  
 Xaa  
 <210> 98  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) .. (3)  
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 半胱氨酸, 天冬氨酸,  
 谷氨酸, 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15) .. (17)  
 <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸  
 <400> 98  
 Xaa Xaa Xaa Cys Ala Xaa His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Xaa Xaa  
 1                    5                    10                    15







<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16) .. (16)  
 <223> Xaa为酪氨酸, 赖氨酸, 或不存在  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (17) .. (17)  
 <223> Xaa为组氨酸, 赖氨酸, 或不存在  
 <400> 102  
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa  
 1                    5                    10                    15  
 Xaa  
 <210> 103  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> Xaa为丙氨酸, 或赖氨酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4) .. (4)  
 <223> Xaa为色氨酸, 或酪氨酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 谷氨酰胺, 谷氨酸, 天冬酰胺, 或天冬氨  
 酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13) .. (13)



- <210> 105  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 对人IgG Fc区域具有亲和性的肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> Xaa为丙氨酸, 或赖氨酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa为色氨酸, 或酪氨酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa为精氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酸,  
 2-氨基辛二酸, 或二氨基丙酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10) .. (10)  
 <223> Xaa为赖氨酸, 谷氨酰胺, 谷氨酸, 天冬酰胺, 或天冬氨  
 酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15) .. (15)  
 <223> Xaa为苏氨酸, 或赖氨酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16) .. (16)  
 <223> Xaa为酪氨酸, 赖氨酸, 或不存在  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (17) .. (17)  
 <223> Xaa为组氨酸, 赖氨酸, 或不存在  
 <400> 105  
 Arg Gly Asn Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa  
 1 5 10 15

Xaa

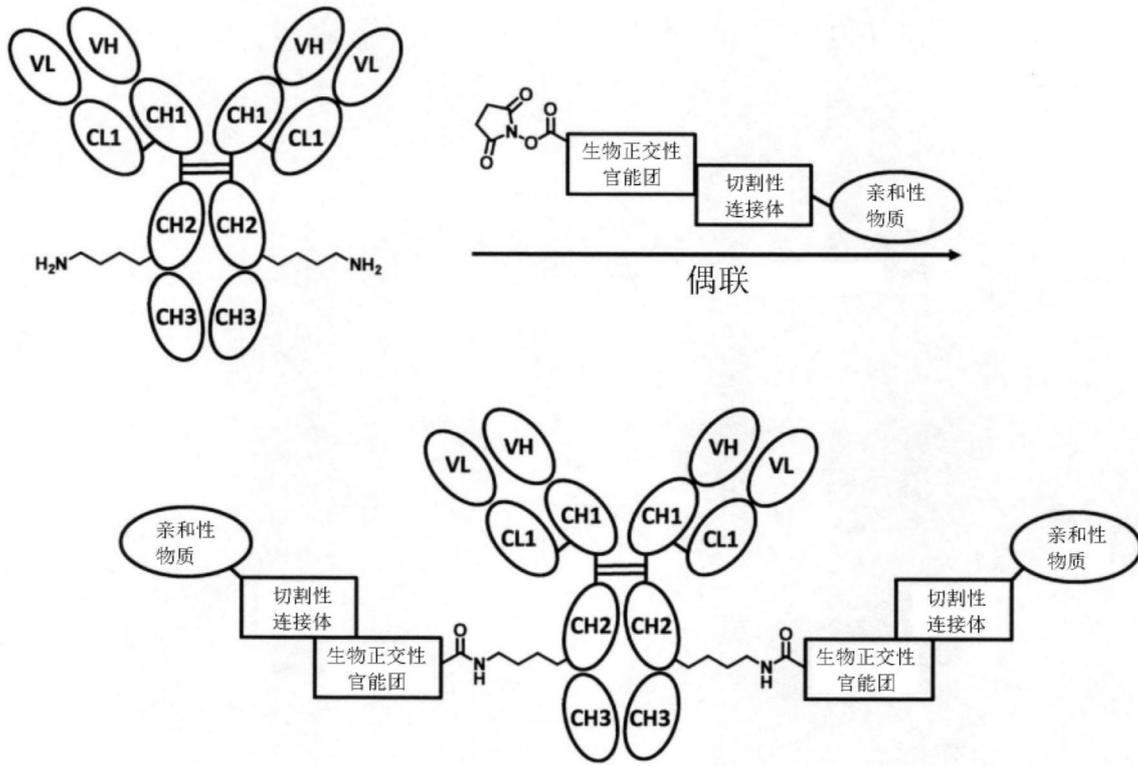


图1-1

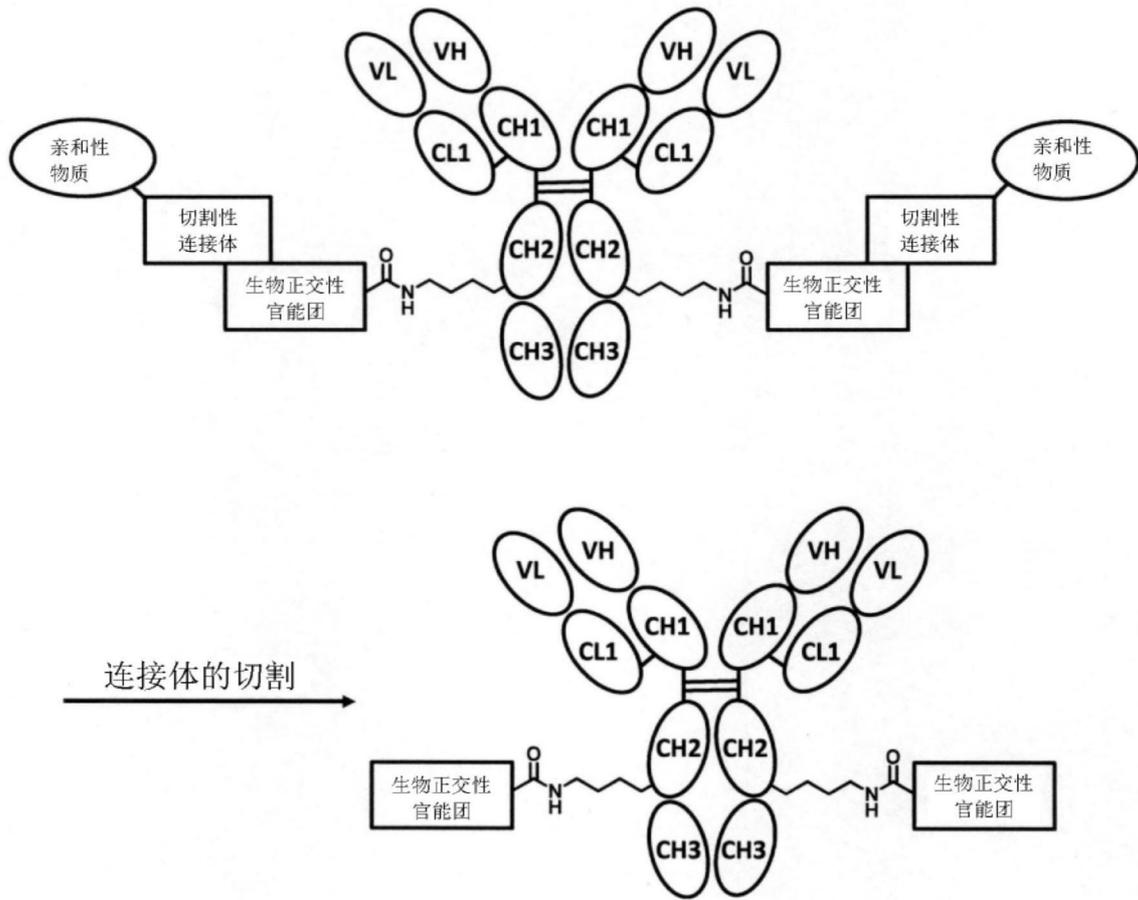


图1-2

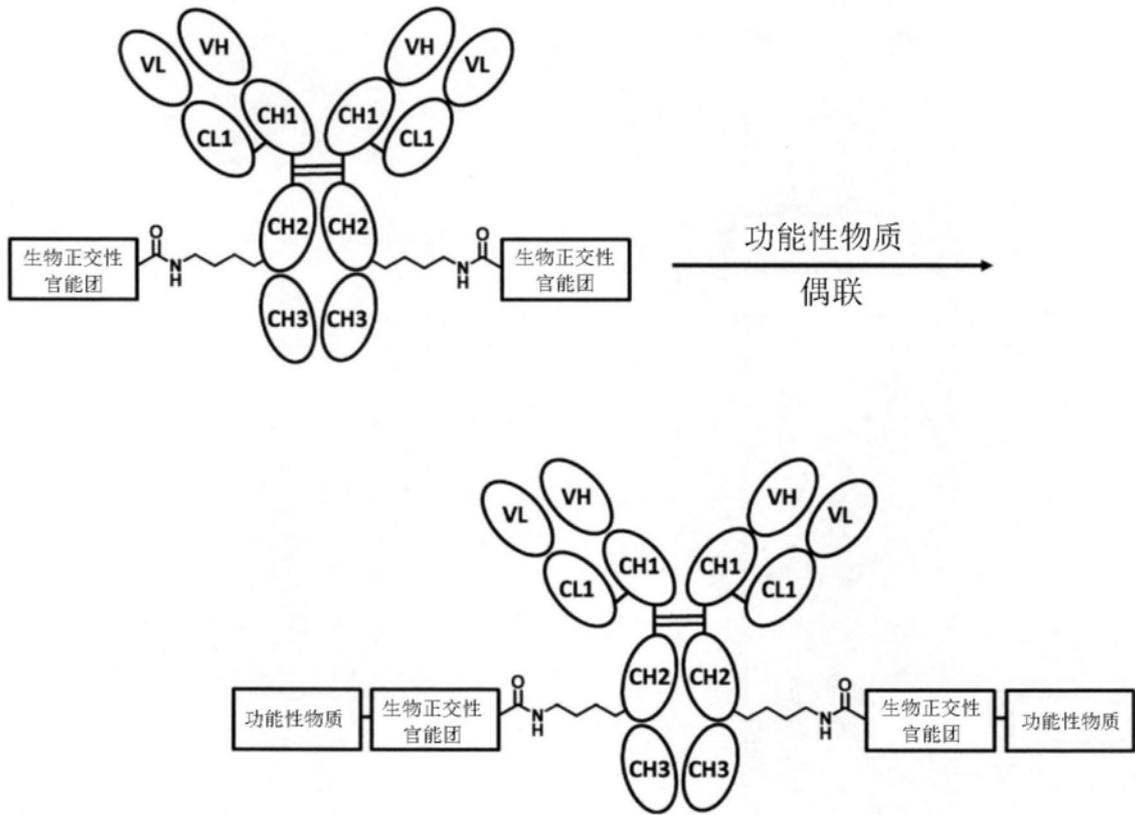


图1-3

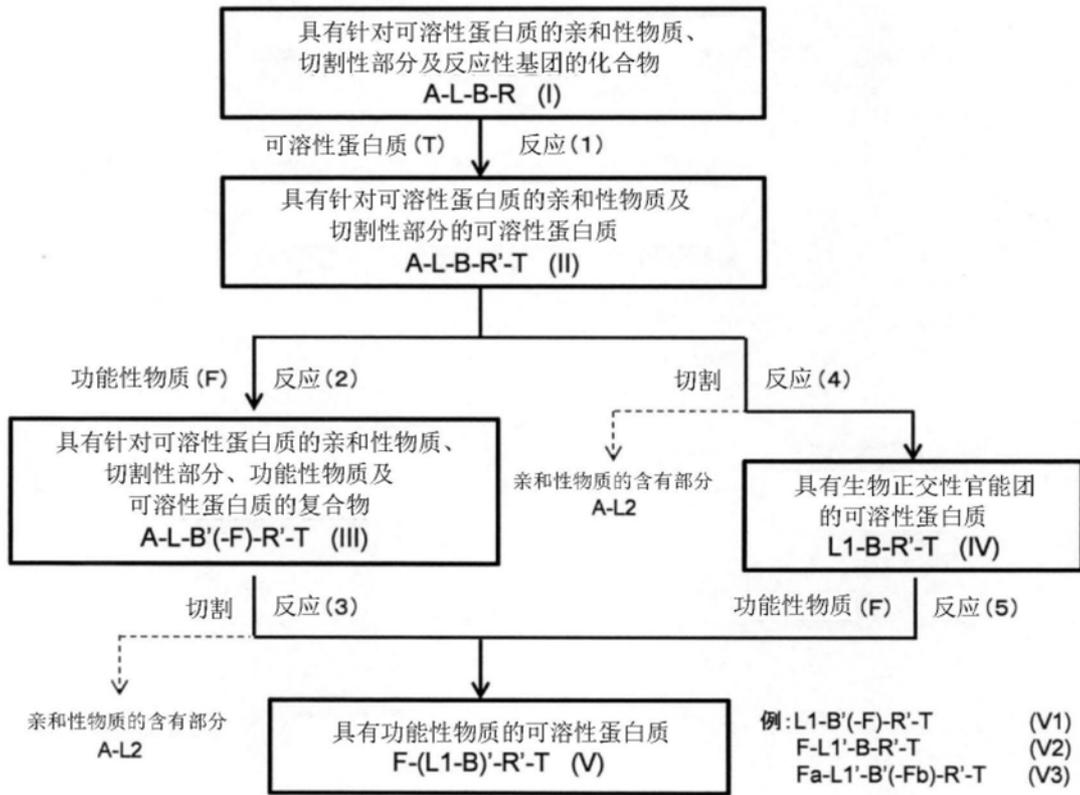


图2

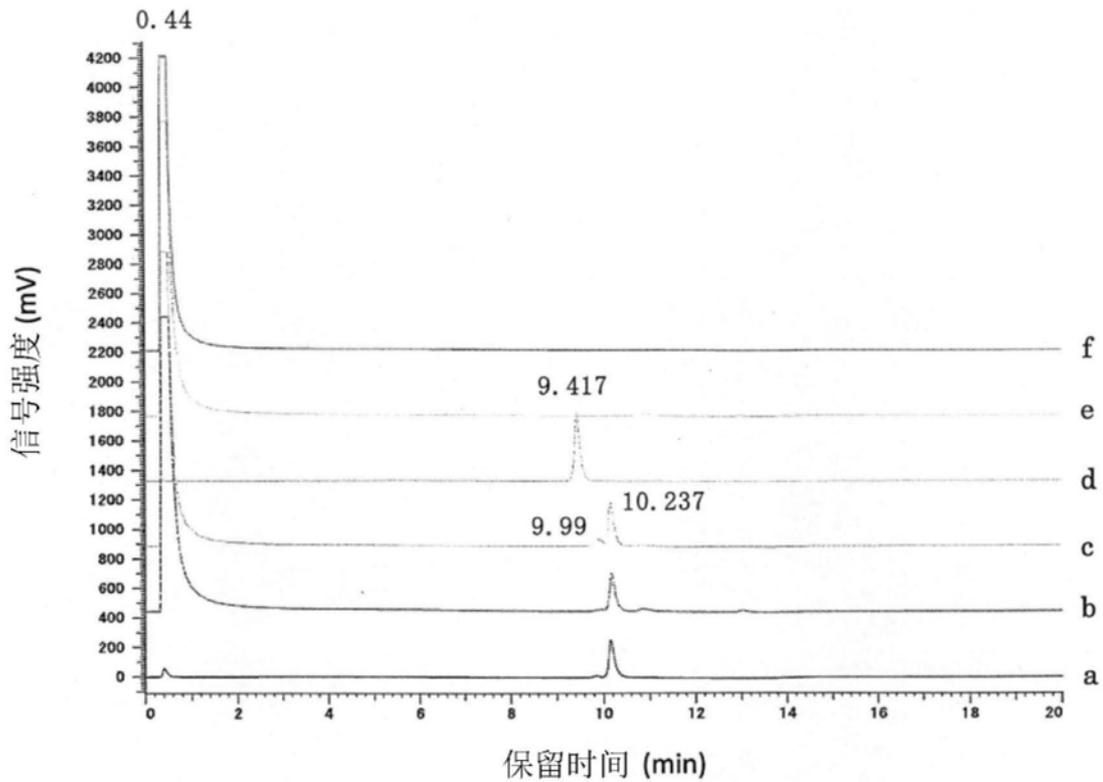


图3

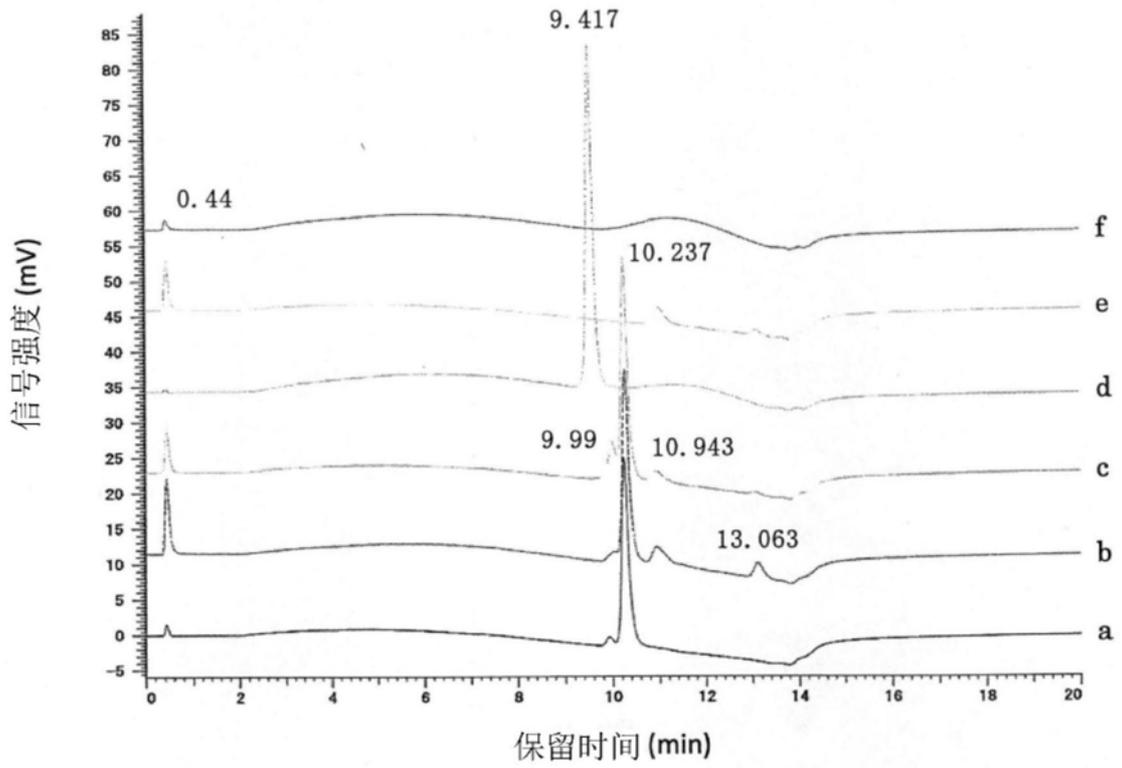


图4

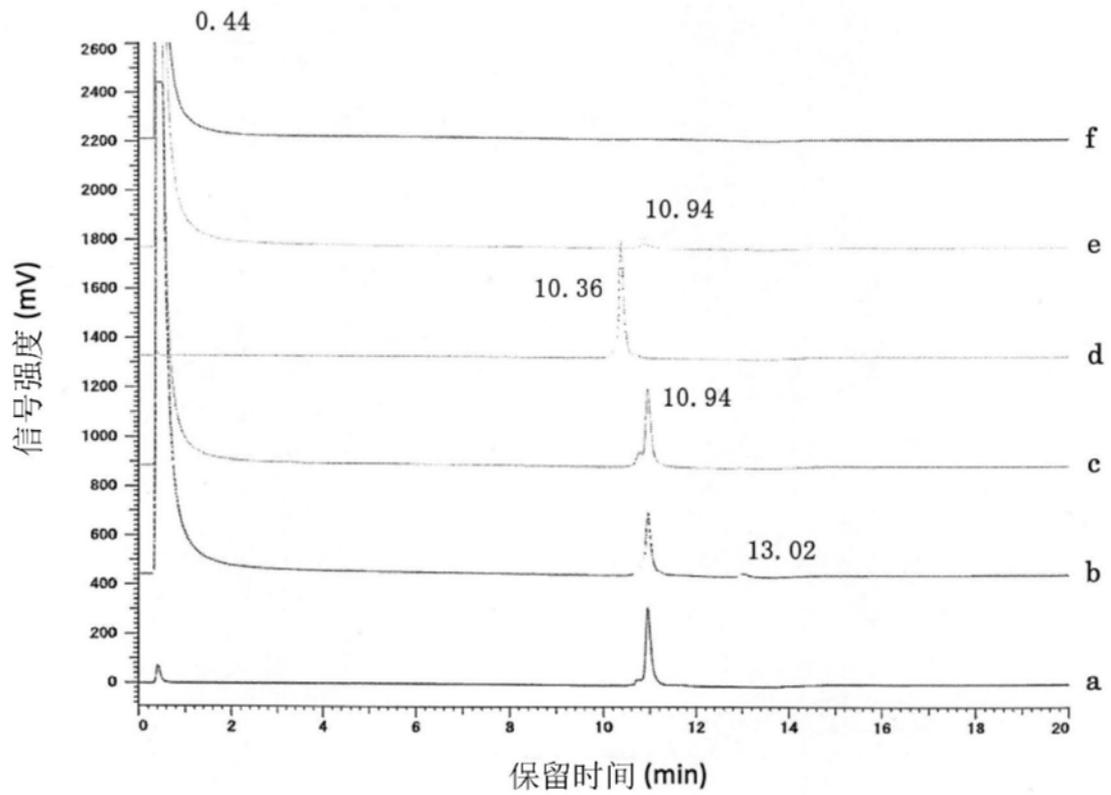


图5

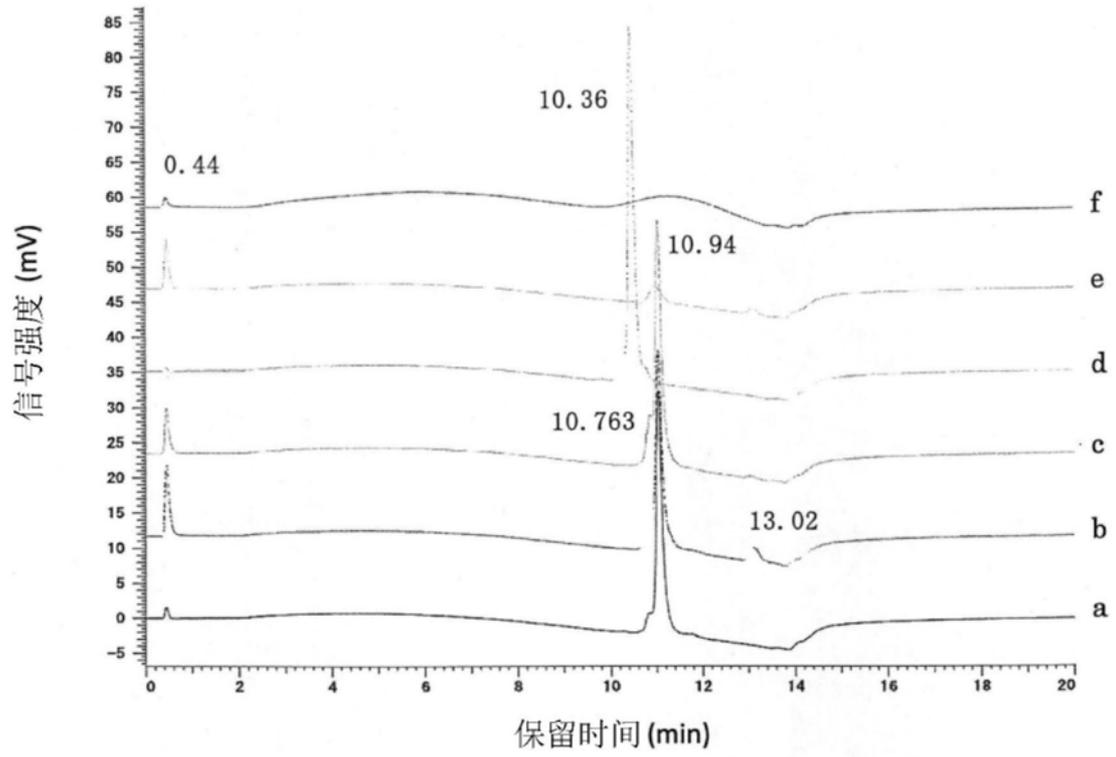


图6

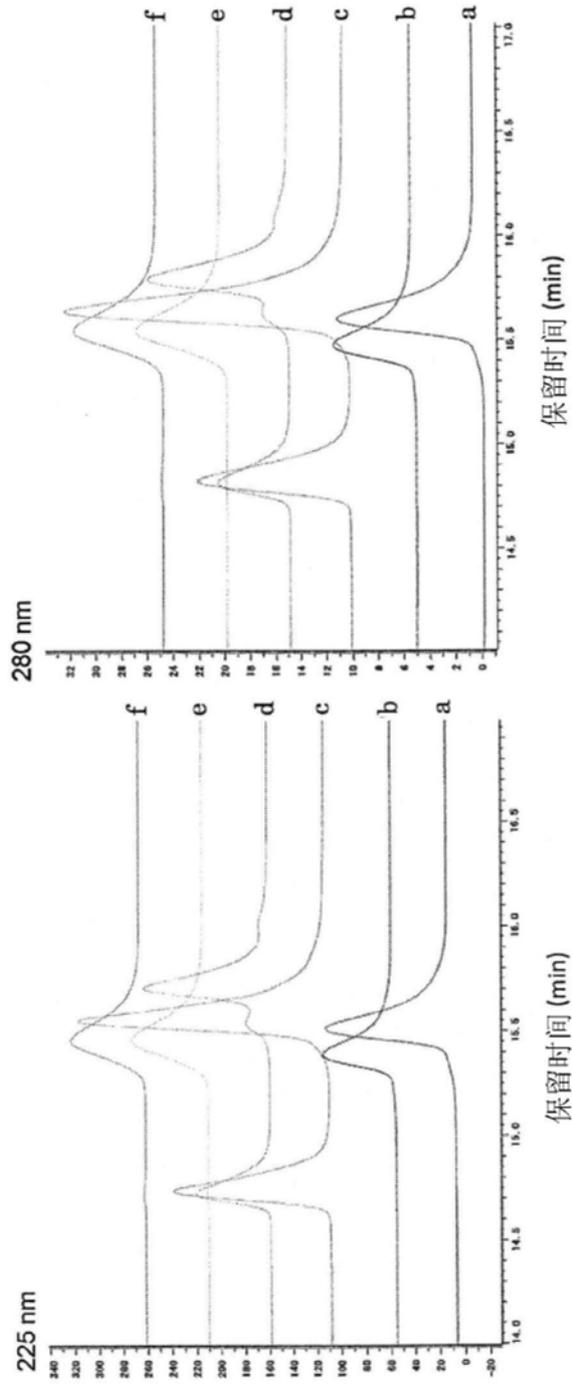


图7

(1) 以 PNGase 切割糖链而得的曲妥珠单抗的重链的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGFN I KDTY IHWVRQA  
PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY  
LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVT VSS  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT  
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT  
QKSLSLSPG (SEQ ID NO: 2)

(2) 以 PNGase 切割糖链而得的 IgG1 Fc 区域的氨基酸序列

I EGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDT  
LMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKL  
TVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID  
NO: 3)

(3) 曲妥珠单抗的轻链的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQK  
PKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQP  
EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 4)

图8

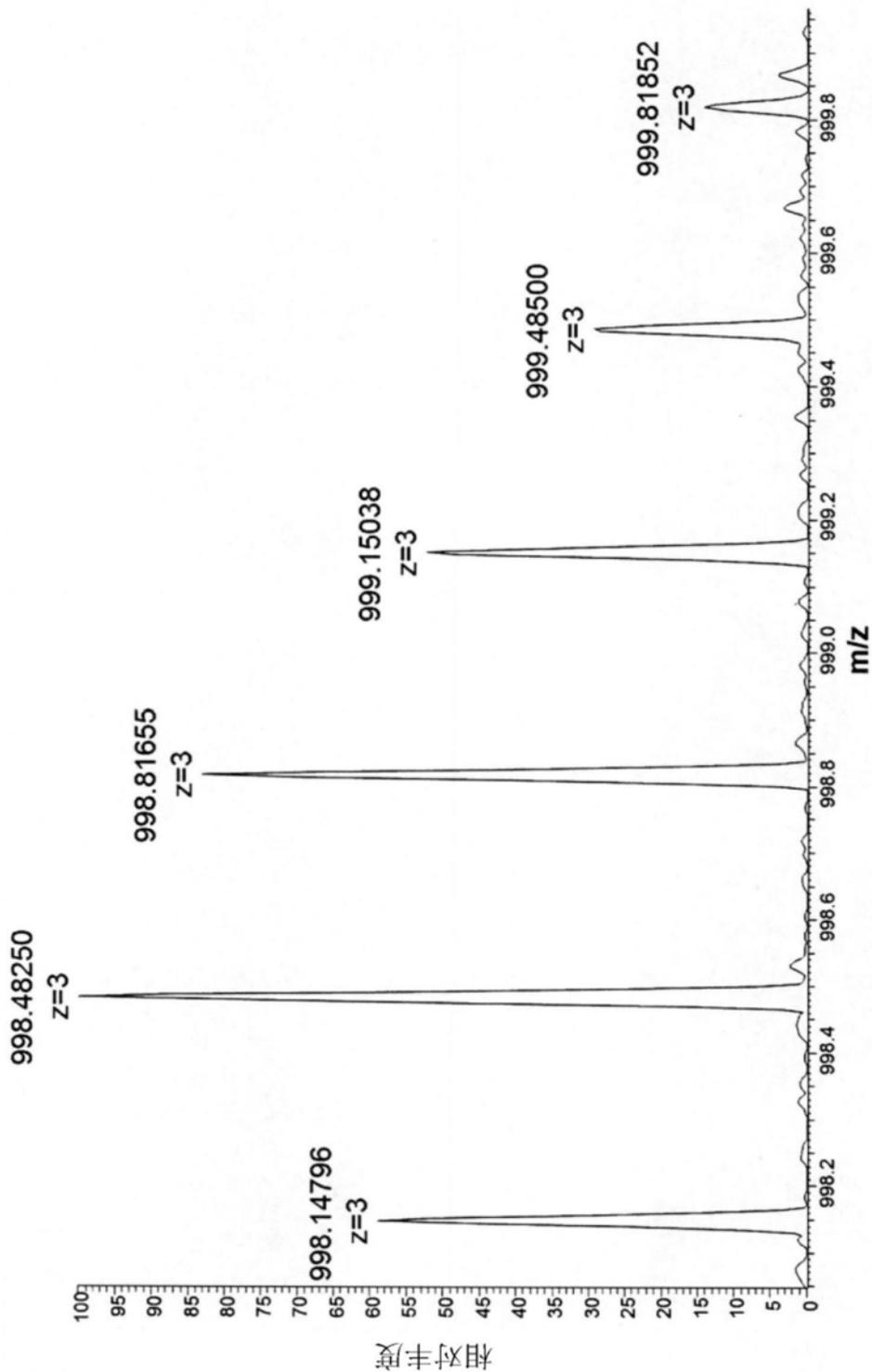


图9

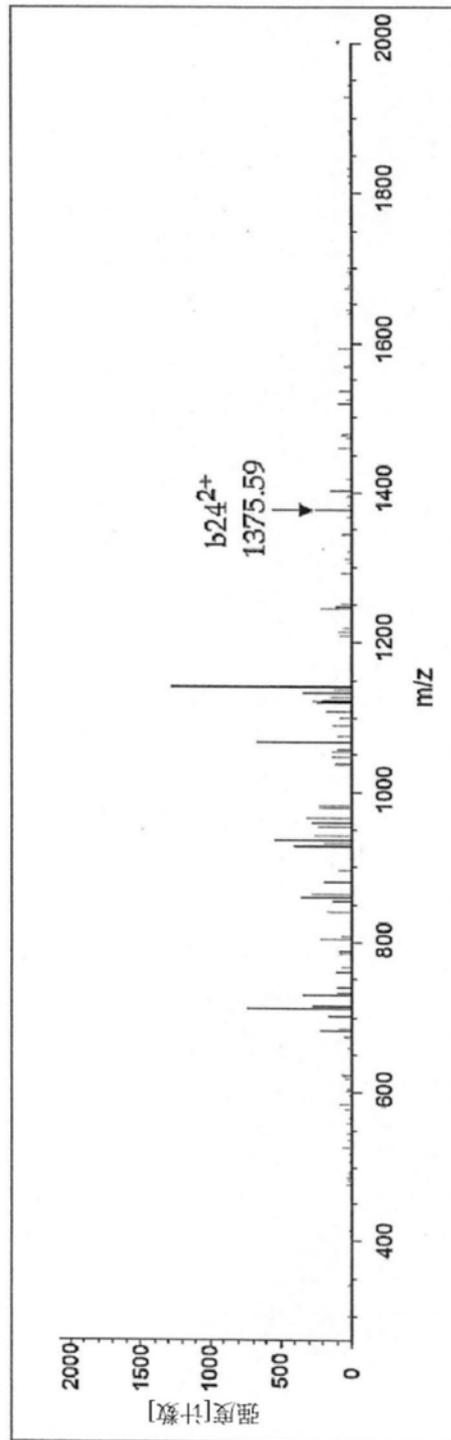


图10

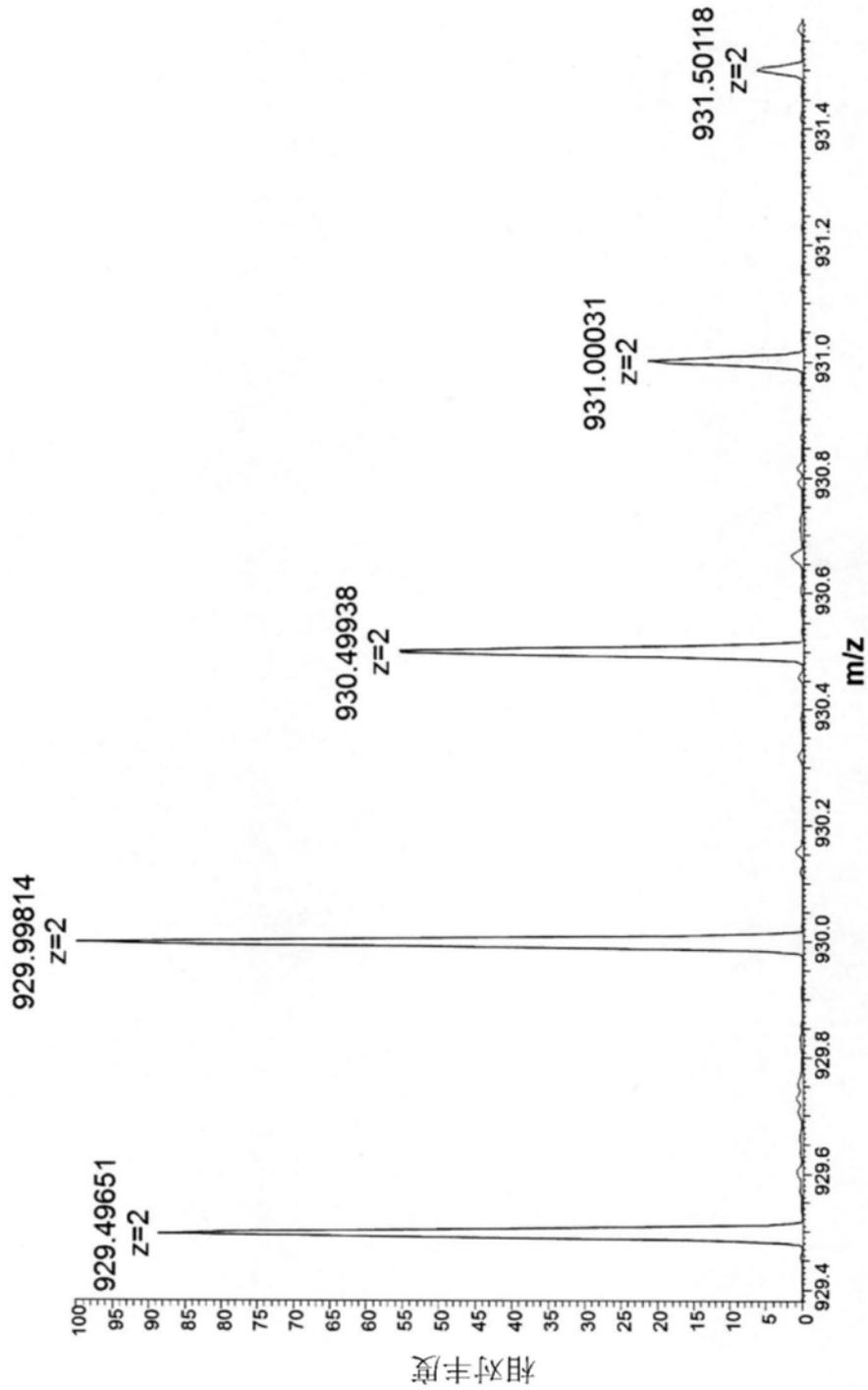


图11

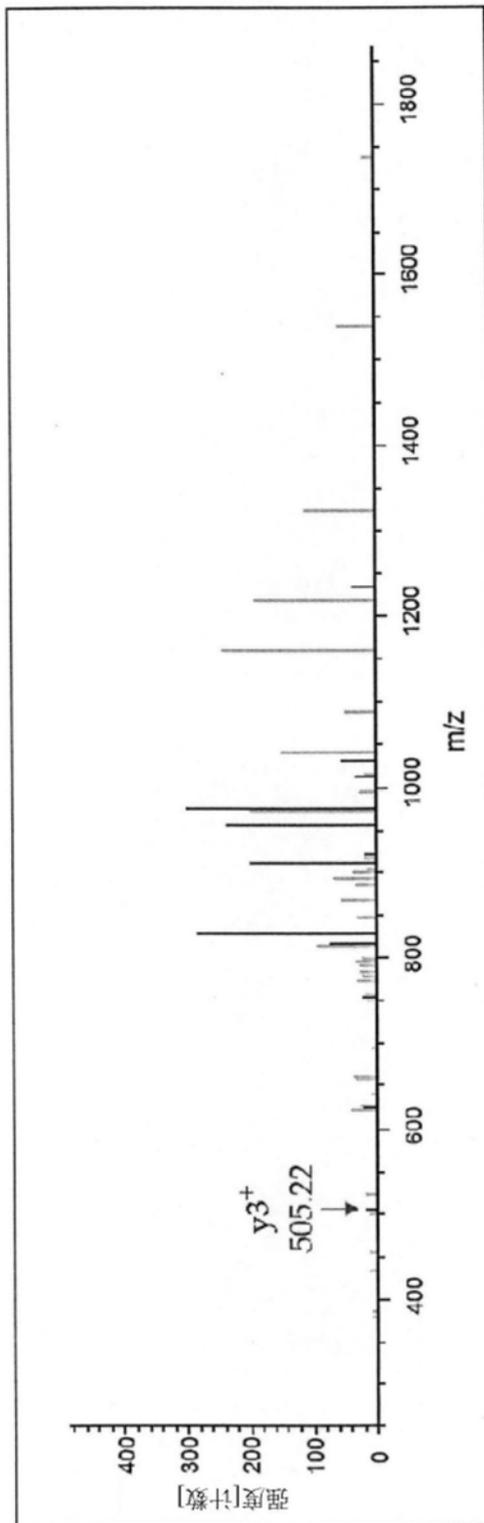


图12

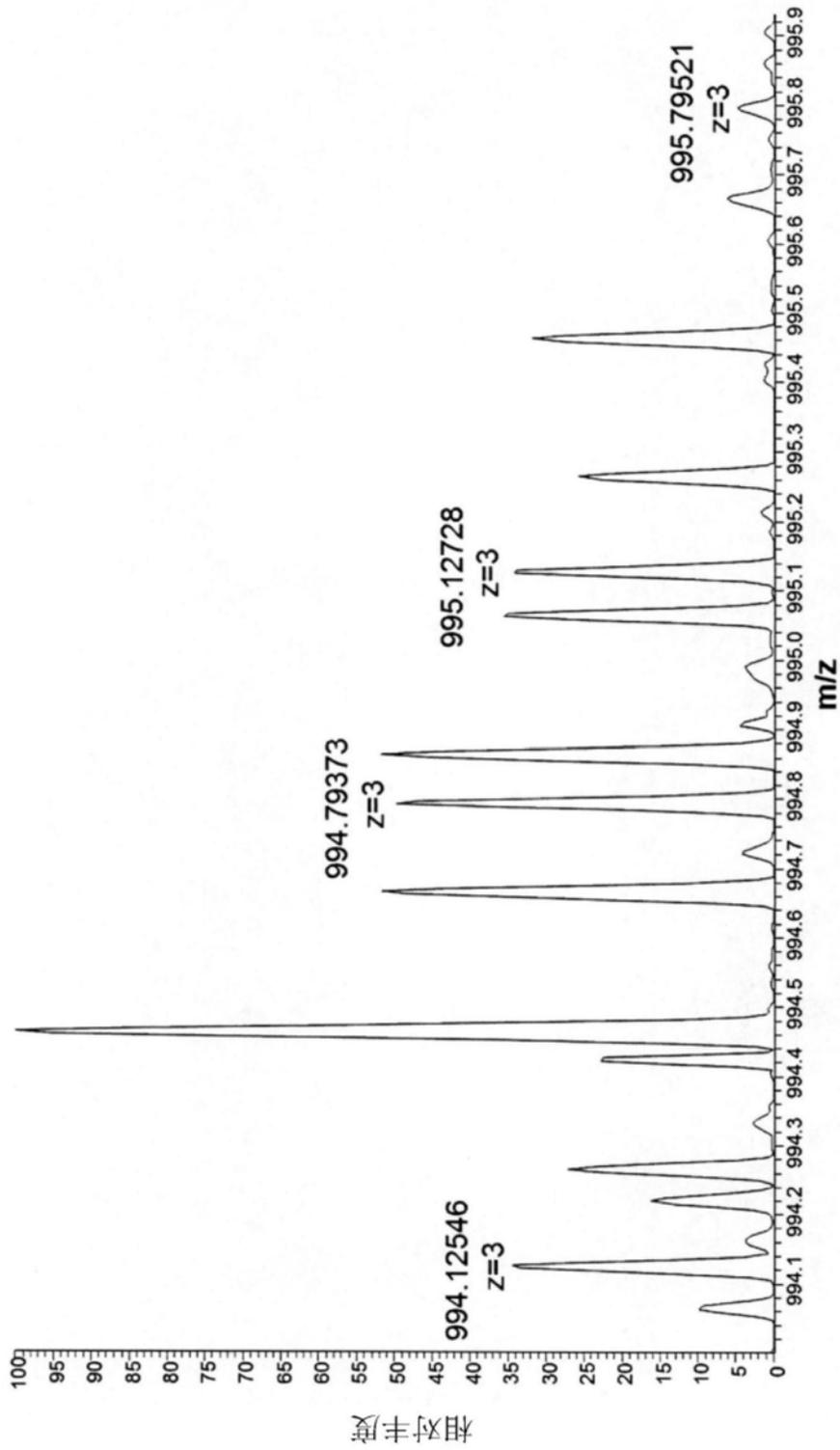


图13

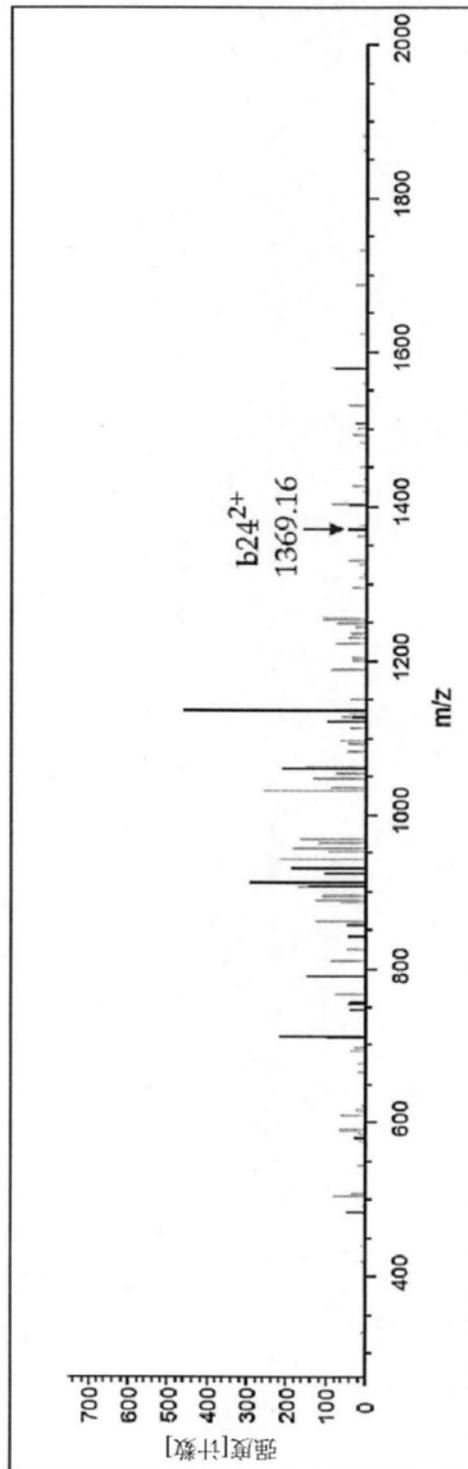


图14

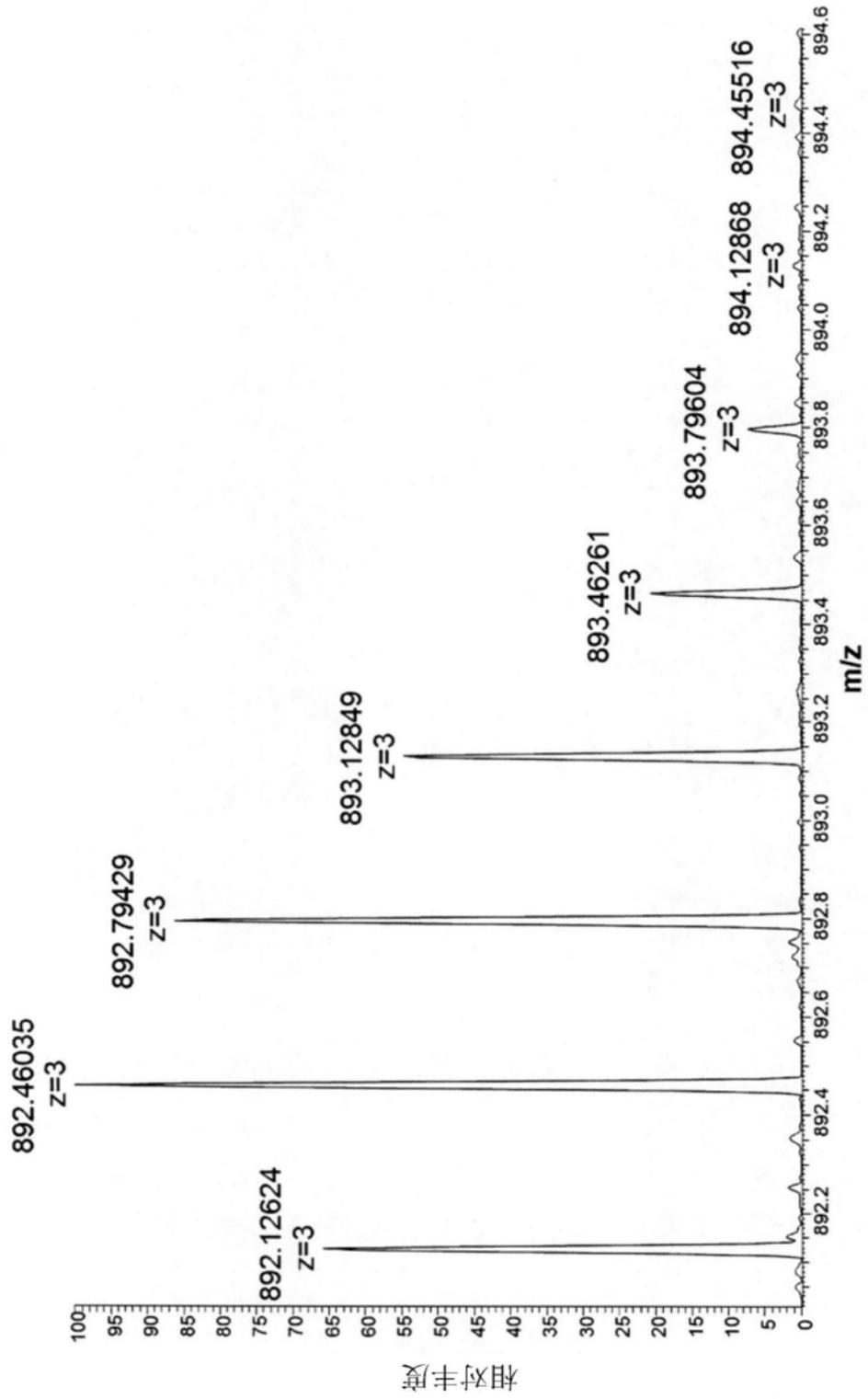


图15

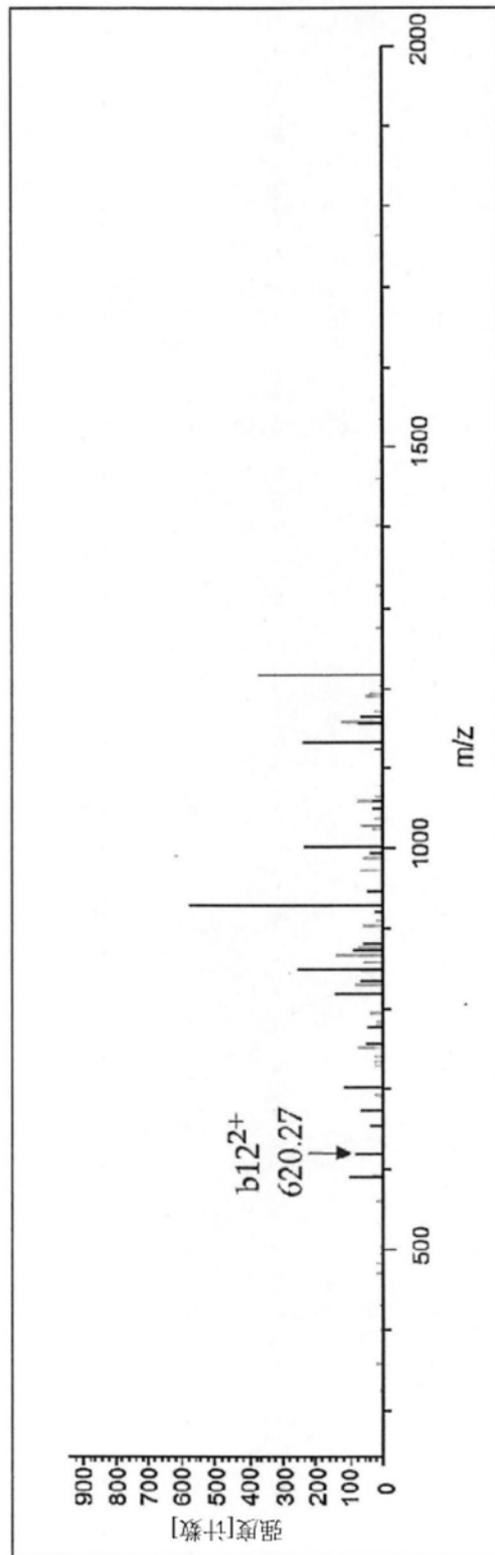


图16

PKSCDKTHTCPPCPAPEXXGXPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
DSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSRXEXTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKXTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 1)

图17

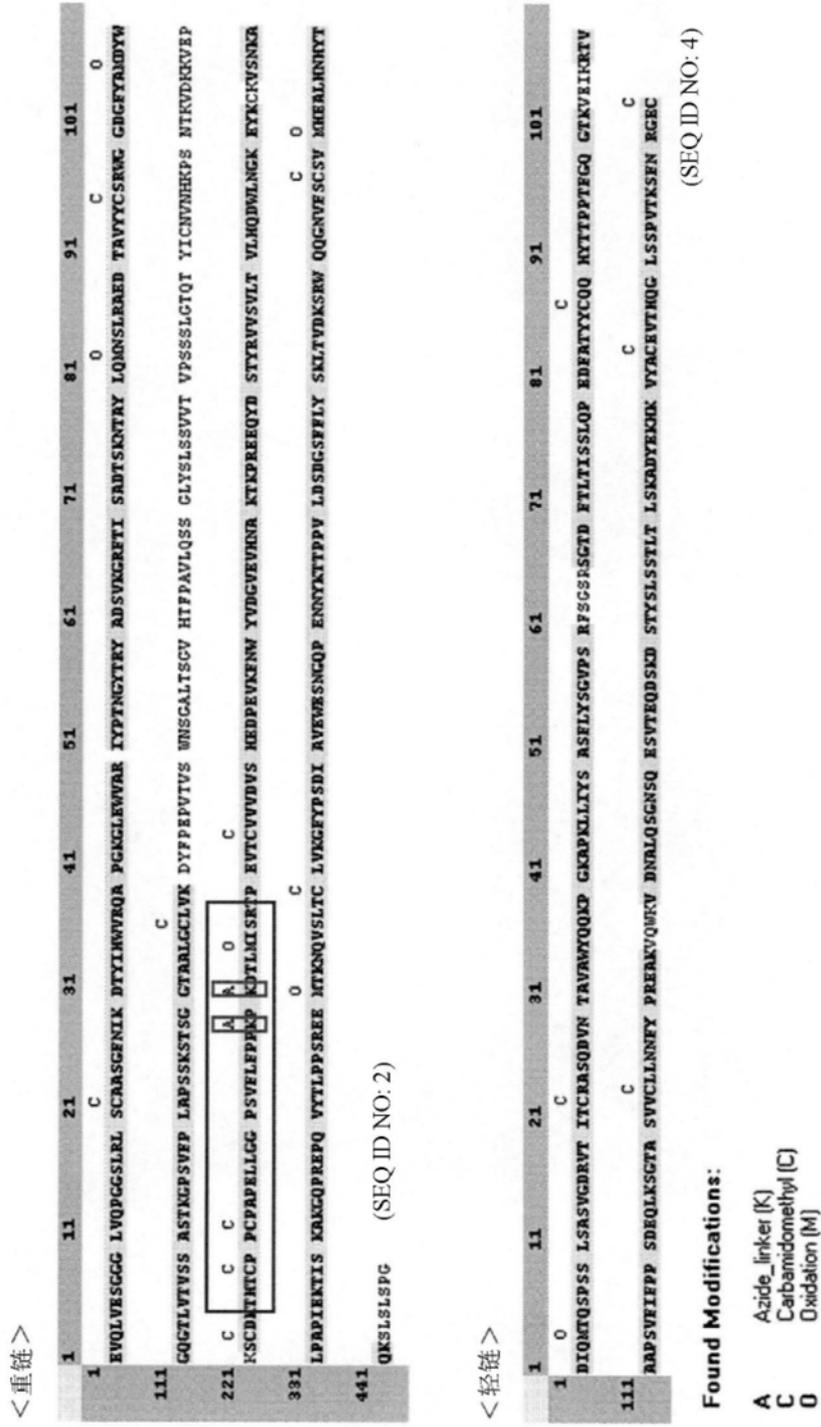
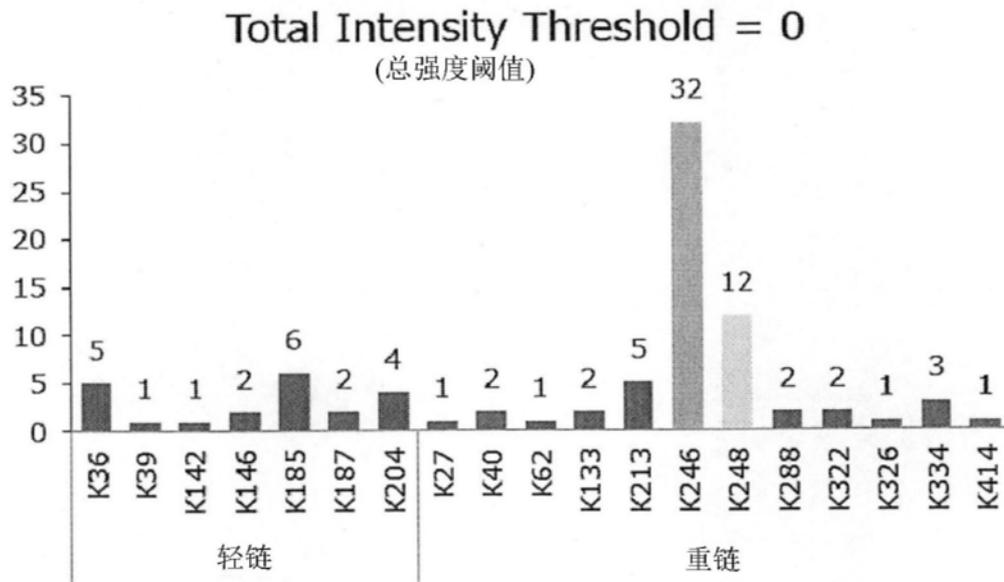


图18

(1)



(2)

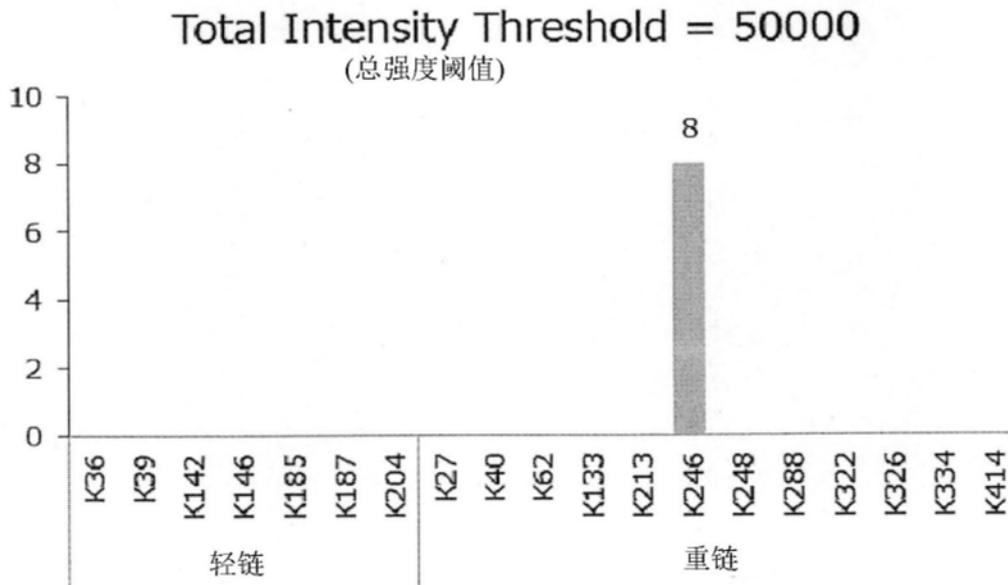


图19

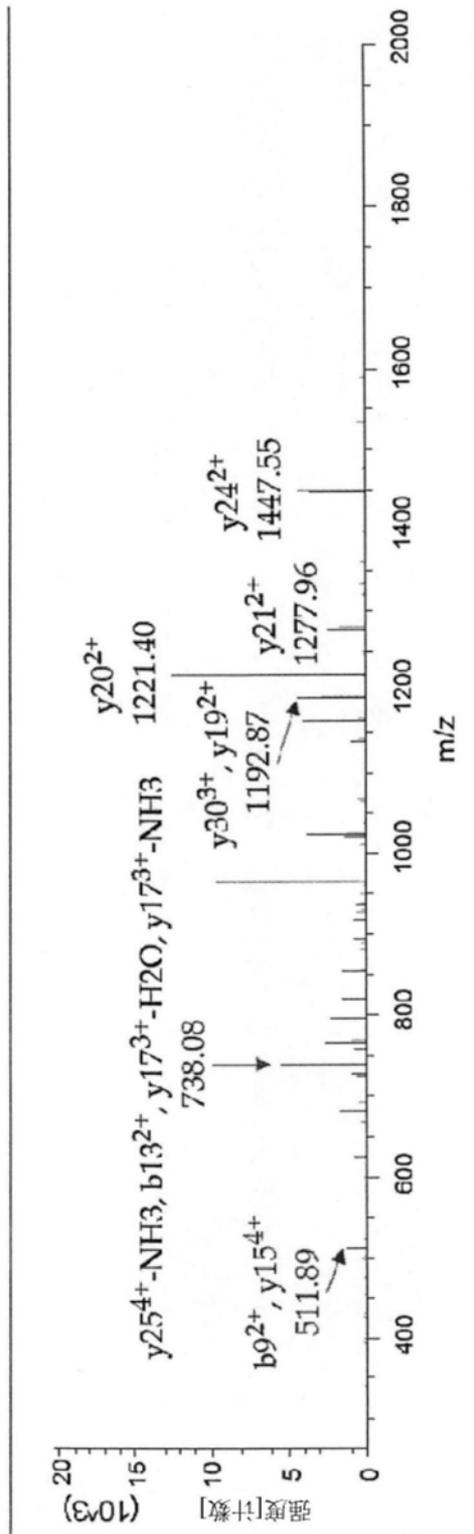


图20

#1	b*	b**	b**	b**	Seq.	y*	y**	y**	y**	#2
1	102.05496	51.53112	34.68884	26.26920	T	3813.92842	1907.46785	1271.98089	954.23756	33
2	239.11387	120.06057	80.37614	60.53392	H	3676.86951	1838.93839	1226.29469	919.97283	32
3	340.16195	170.59441	114.05870	85.79584	T	3575.82183	1788.41455	1192.61213	894.71091	31
4	500.19220	250.59974	167.40225	125.80351	C-Carbami.	3415.79118	1708.39923	1139.26858	854.70325	30
5	597.24497	299.12612	199.75317	150.06670	P	3318.73841	1659.87284	1106.91765	830.44006	29
6	694.29774	347.85251	232.10410	174.32989	P	3221.68564	1611.34646	1074.56673	806.17687	28
7	854.32839	427.66784	285.44765	214.33756	C-Carbami.	3061.65498	1531.33113	1021.22318	766.16920	27
8	951.38116	476.19422	317.79857	238.60075	P	2964.60221	1482.80474	988.87225	741.90601	26
9	1022.41828	511.71278	341.47761	256.36003	A	2893.56509	1447.28618	965.19321	724.14673	25
10	1119.47105	560.23917	373.82854	280.62322	P	2796.51232	1398.75980	932.84229	699.88354	24
11	1248.51365	624.76047	416.84274	312.88387	E	2667.46972	1334.23850	889.82809	667.62289	23
12	1361.59772	681.30250	454.53743	341.15489	L	2554.38565	1277.69646	852.13340	639.35187	22
13	1474.68179	737.84454	492.23212	369.42591	L	2441.30158	1221.15443	814.43871	611.08085	21
14	1531.70326	766.35527	511.23927	383.68127	G	2384.28011	1192.64369	795.43155	596.82549	20
15	1588.72473	794.86601	530.24643	397.93664	G	2327.25884	1164.13296	776.42440	582.57012	19
16	1685.77750	843.39239	562.59735	422.19983	P	2230.20587	1115.60657	744.07347	558.30693	18
17	1772.80953	886.90841	591.60803	443.95784	S	2143.17384	1072.09056	715.06280	536.54892	17
18	1871.87795	936.44262	624.63084	468.72495	V	2044.10542	1022.55635	682.03999	511.79181	16
19	2018.94637	1009.97683	673.65364	505.49205	F	1897.03700	949.02214	633.01718	475.01471	15
20	2132.03044	1066.51886	711.34833	533.76307	L	1783.95293	892.48010	595.32249	446.74369	14
21	2279.09886	1140.05307	760.37114	570.53017	F	1636.88451	818.94589	546.29969	409.97659	13
22	2376.15163	1188.57946	792.72206	594.79337	P	1539.83174	770.41951	513.94876	385.71339	12
23	2473.20440	1237.10584	825.07299	619.05656	P	1442.77897	721.89312	481.59784	361.45020	11
24	2855.40137	1428.20433	952.47198	714.60580	K-Azide_f.	1060.58200	530.79464	354.19885	265.90096	10
25	2952.45414	1476.73071	984.82290	738.86899	P	963.52923	482.26825	321.84793	241.63777	9
26	3080.54911	1540.77820	1027.52122	770.89274	K	835.43426	418.22077	279.14950	209.61402	8
27	3195.57606	1598.29167	1065.86354	799.64947	D	720.40731	360.70729	240.80729	180.85729	7
28	3296.62374	1648.81551	1099.54610	824.91139	T	619.35963	310.18345	207.12473	155.59537	6
29	3409.70781	1705.35755	1137.24079	853.18241	L	506.27556	253.64142	169.43004	127.32435	5
30	3540.74831	1770.87780	1180.92096	885.94254	M	375.23506	188.12117	125.74987	94.56422	4
31	3653.83238	1827.41983	1218.61565	914.21355	I	262.15099	131.57913	88.05518	66.29321	3
32	3740.86441	1870.93585	1247.62632	935.97156	S	175.11896	88.06312	59.04450	44.53520	2
33					R					1

图21

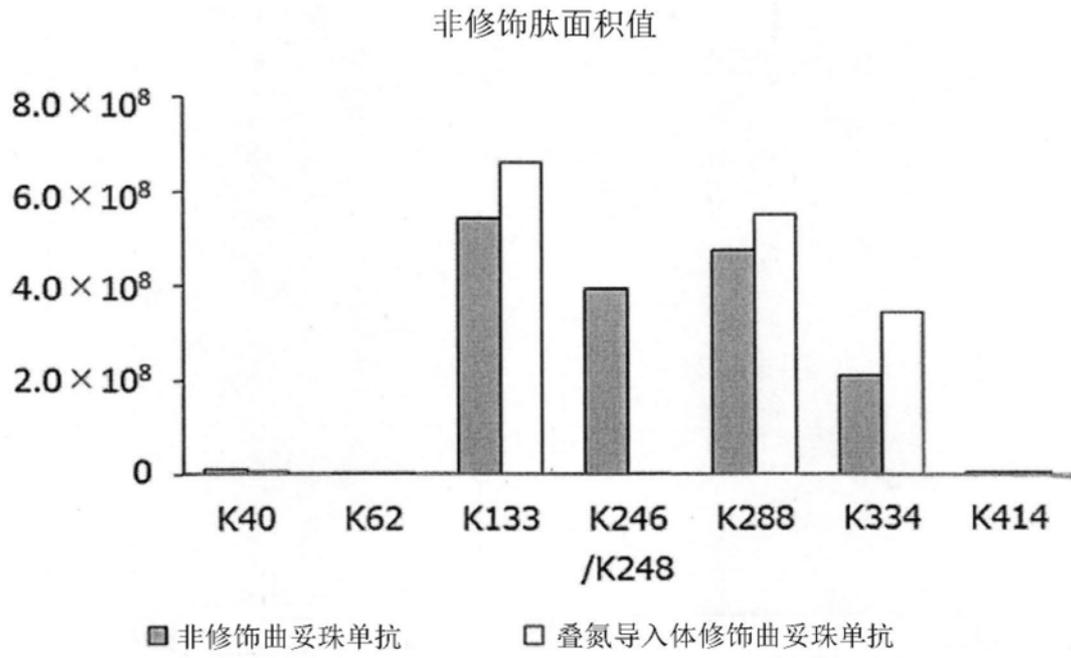


图22

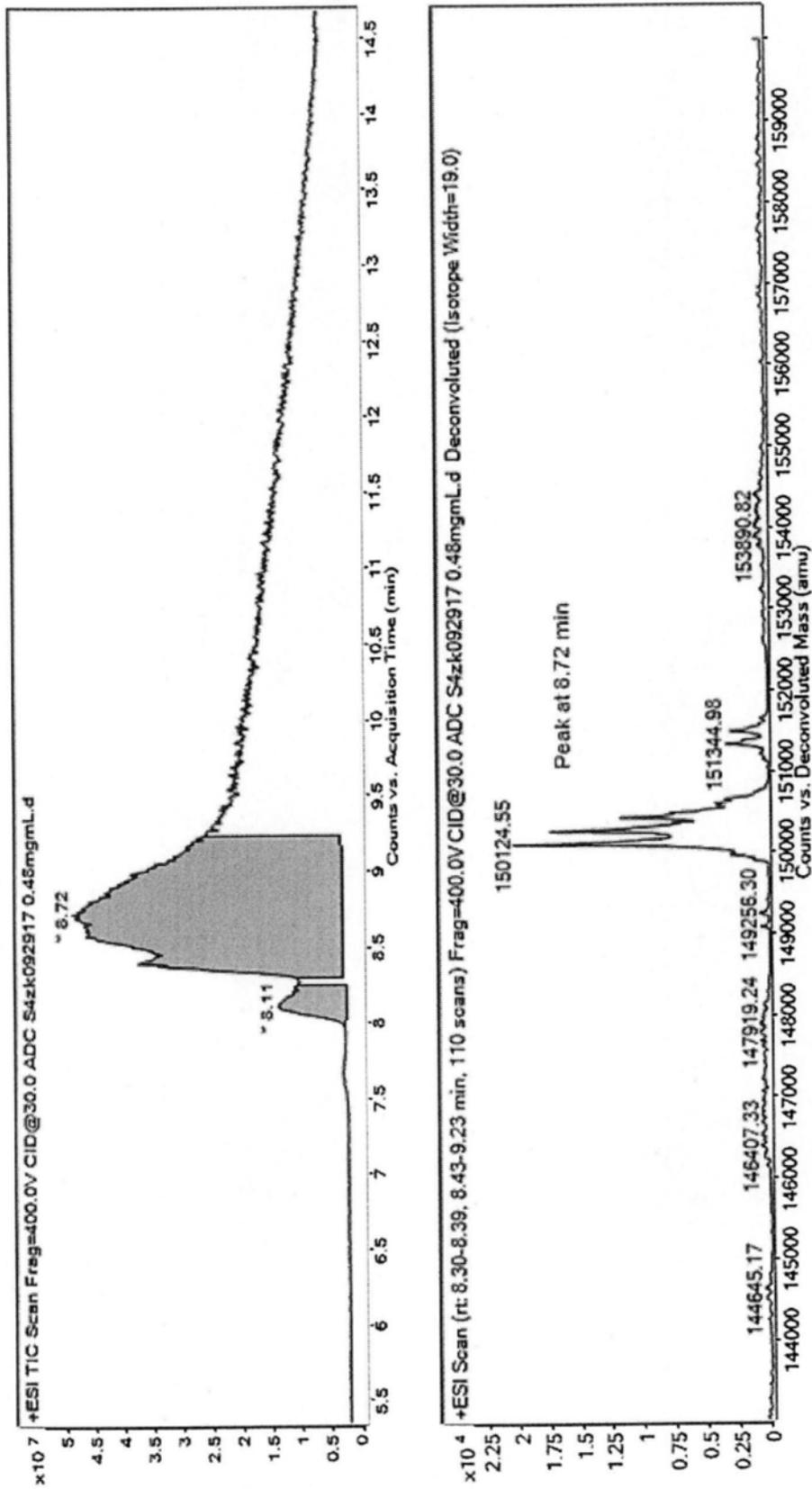


图23

- (1) > Trastuzumab Light chain (曲妥珠单抗轻链)
- DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS  
 RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP  
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT  
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK (SEQ ID NO: 4)
- (2) > Trastuzumab Heavy chain (曲妥珠单抗重链)
- EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY  
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS  
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEVP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVDVDS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN  
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG (SEQ ID NO: 53)
- (3) > Trastuzumab Heavy chain (曲妥珠单抗重链) (N300D)
- EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY  
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS  
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEVP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVDVDS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYD  
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE  
 MTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG (SEQ ID NO: 2)

图24

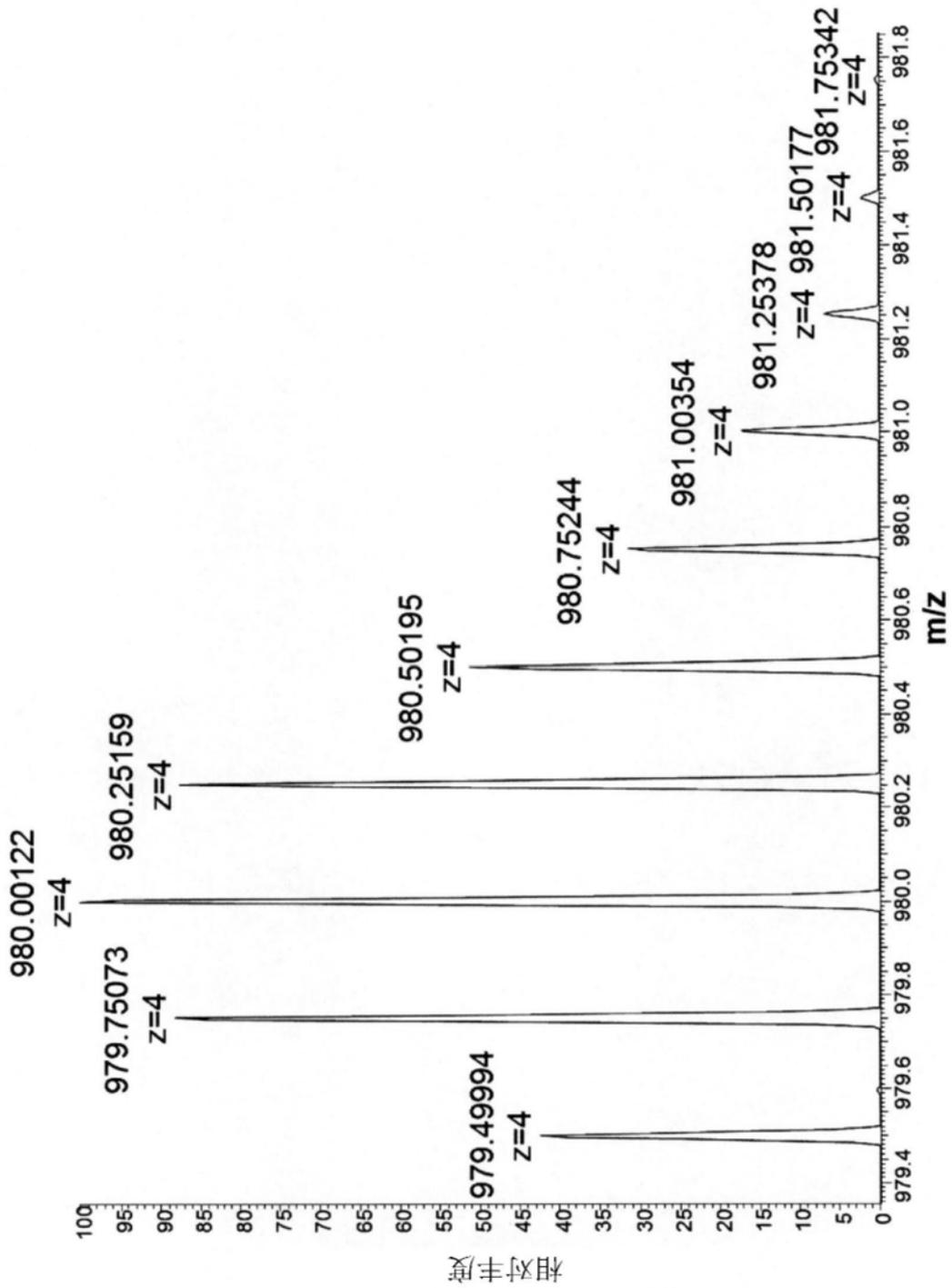


图25

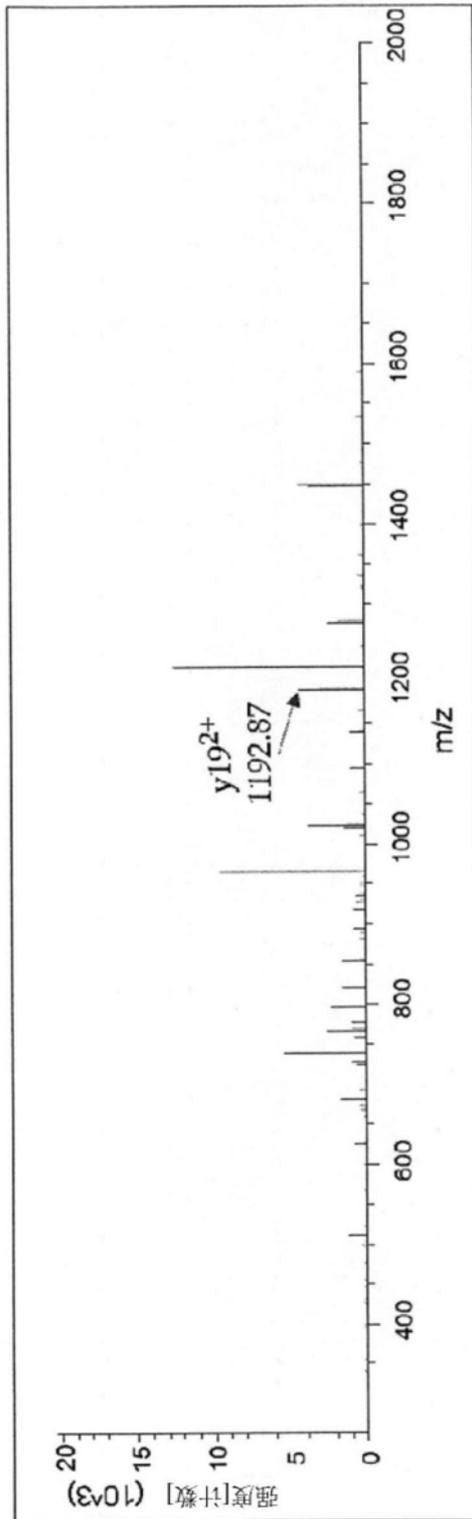
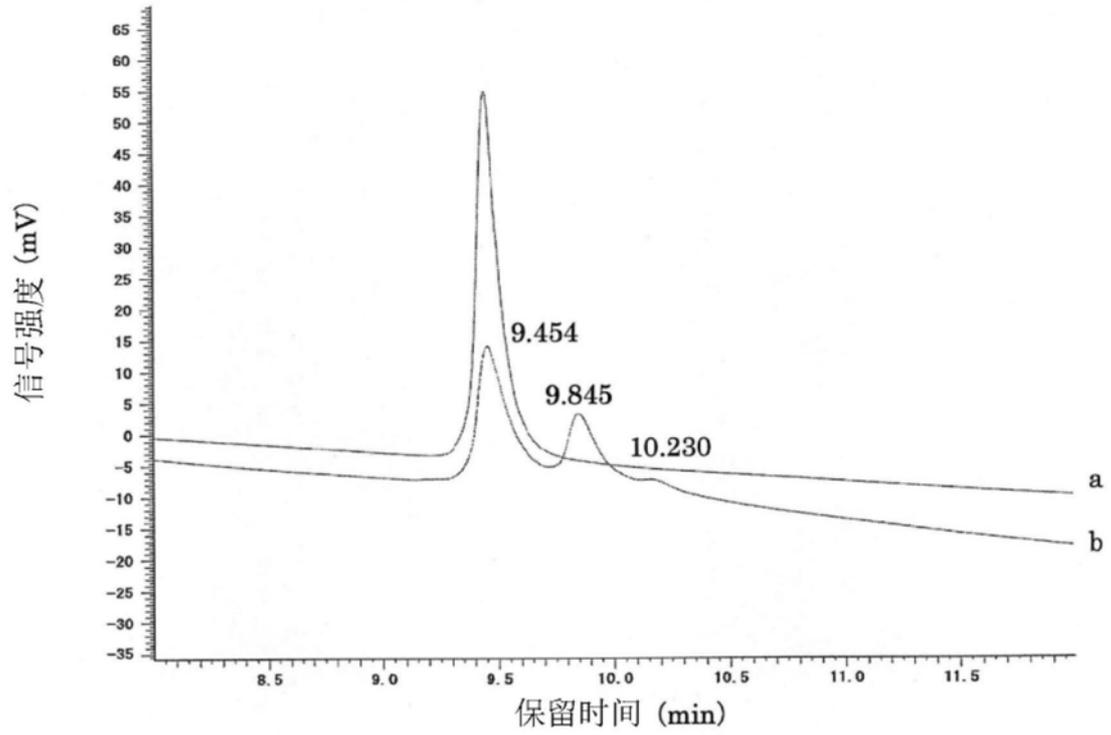


图26

UV 225 nm



UV 280 nm

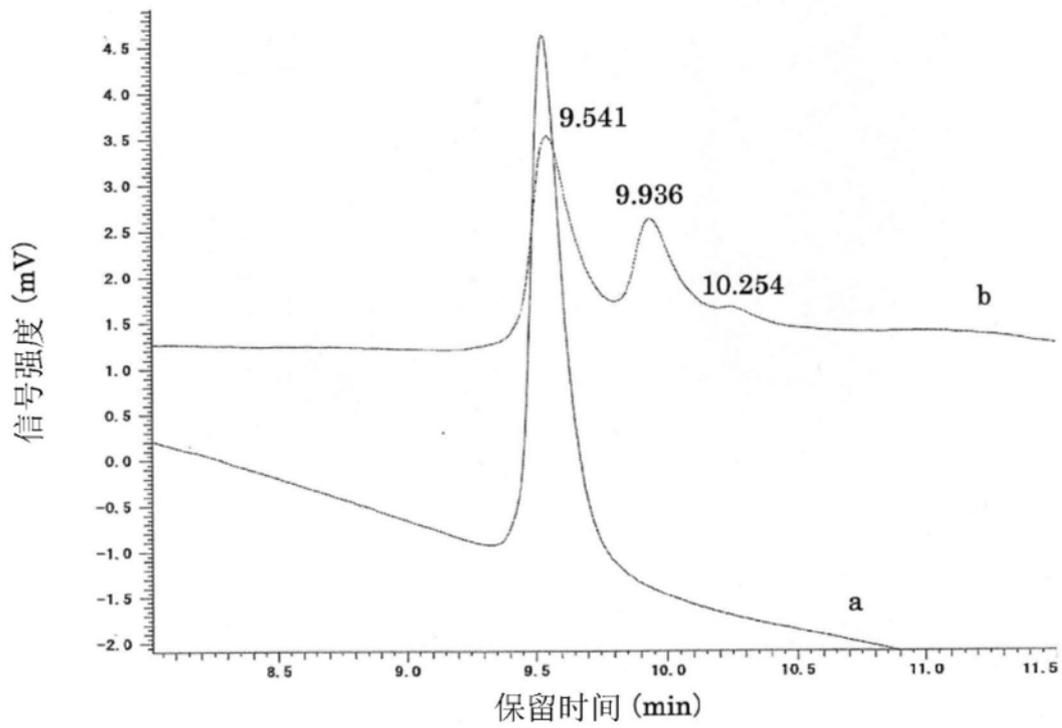
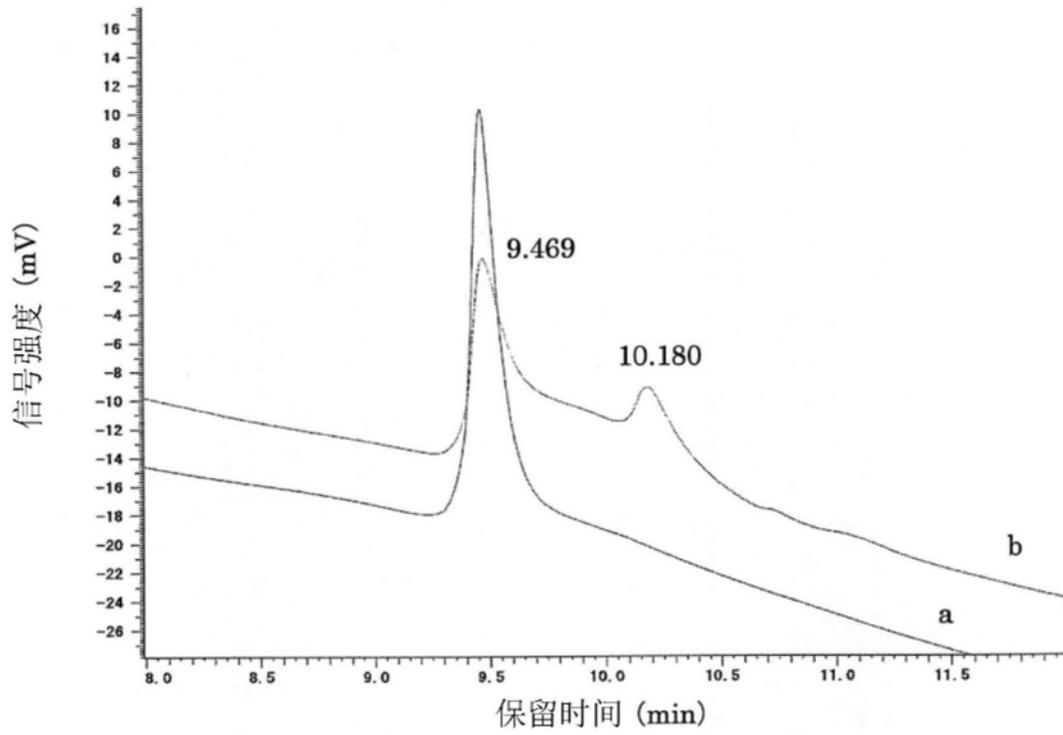


图27

UV 225 nm



UV 280 nm

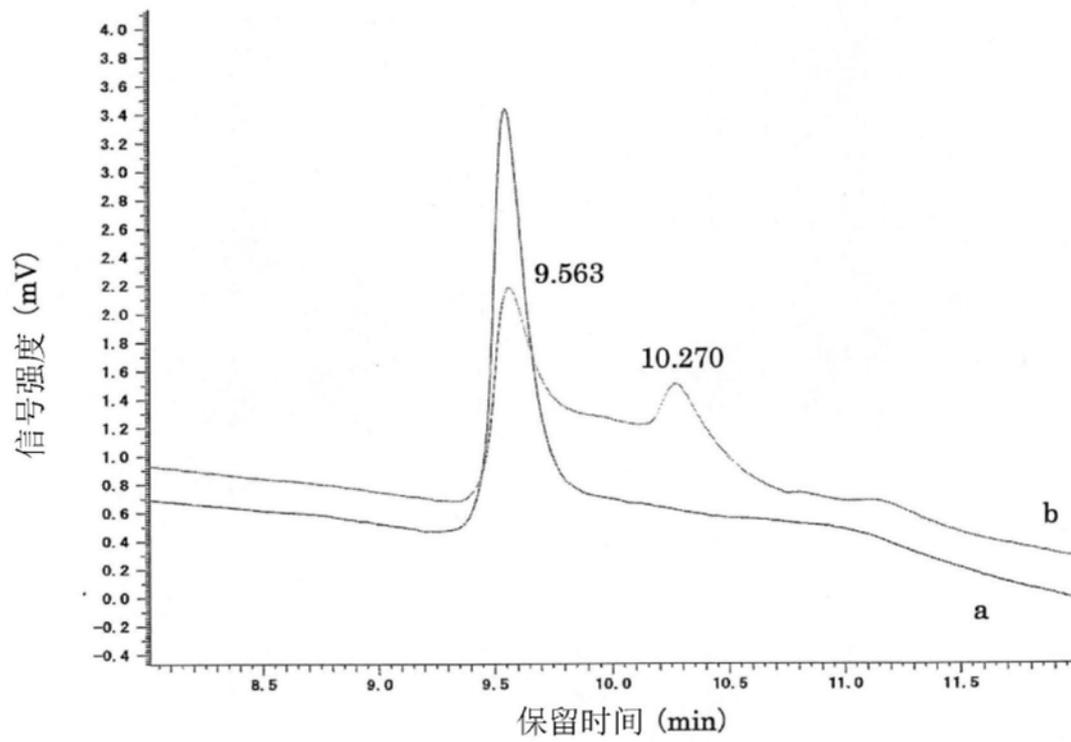
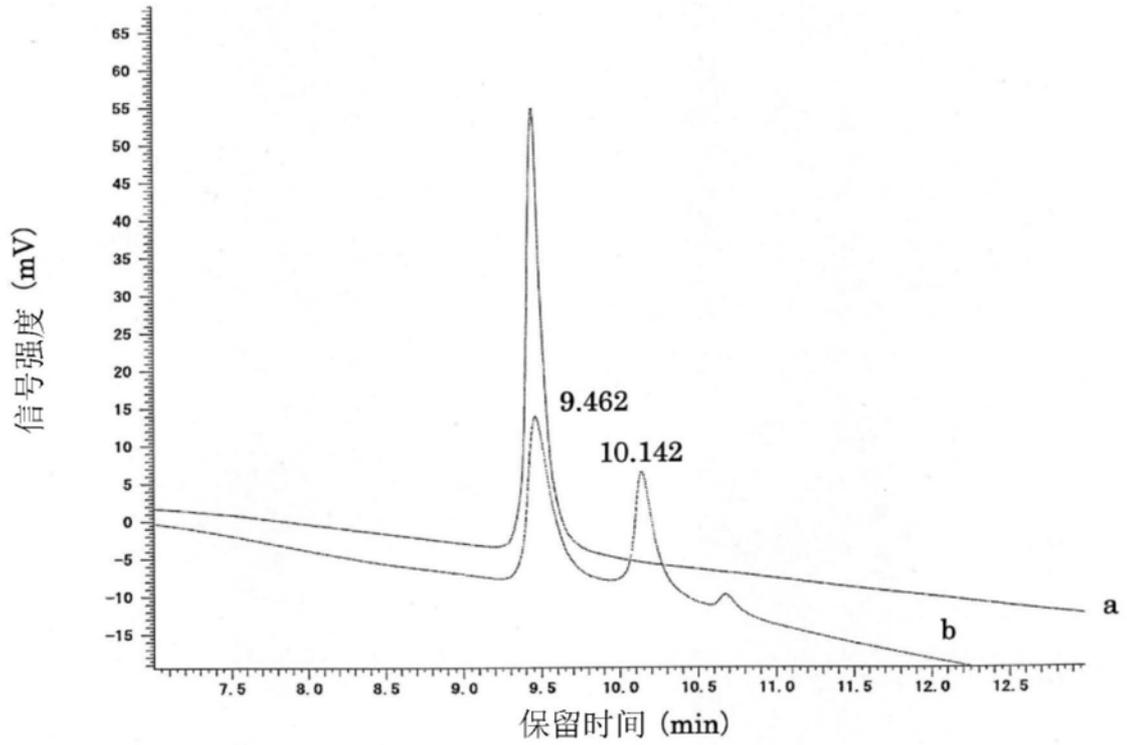


图28

UV 225 nm



UV 280 nm

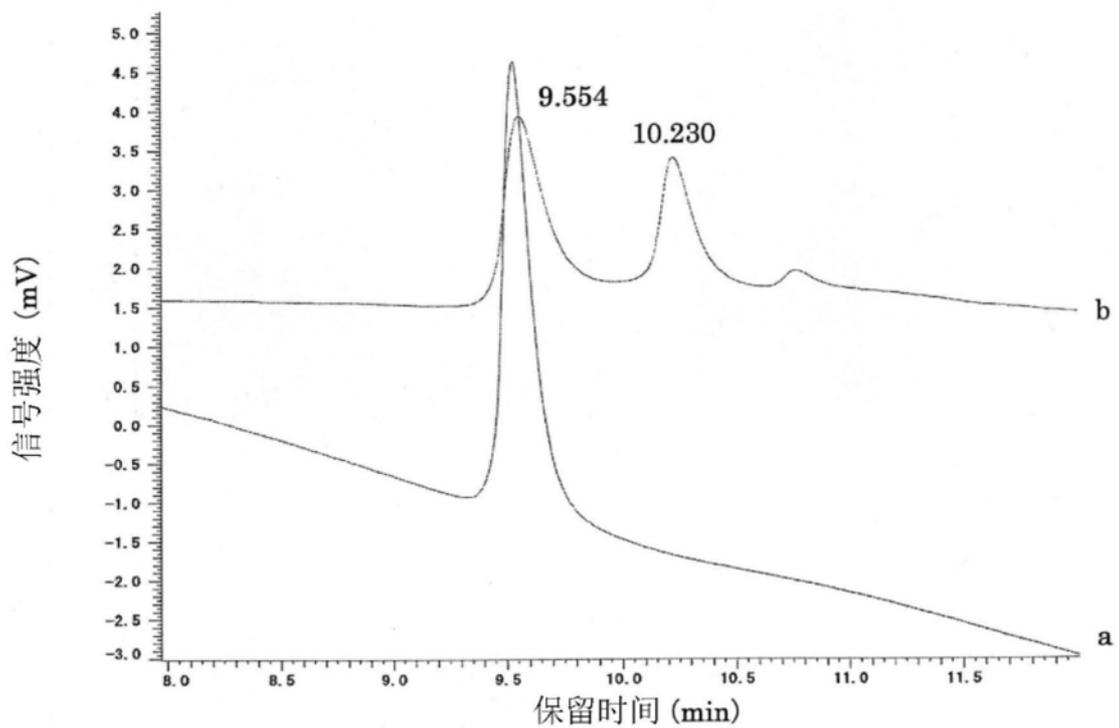
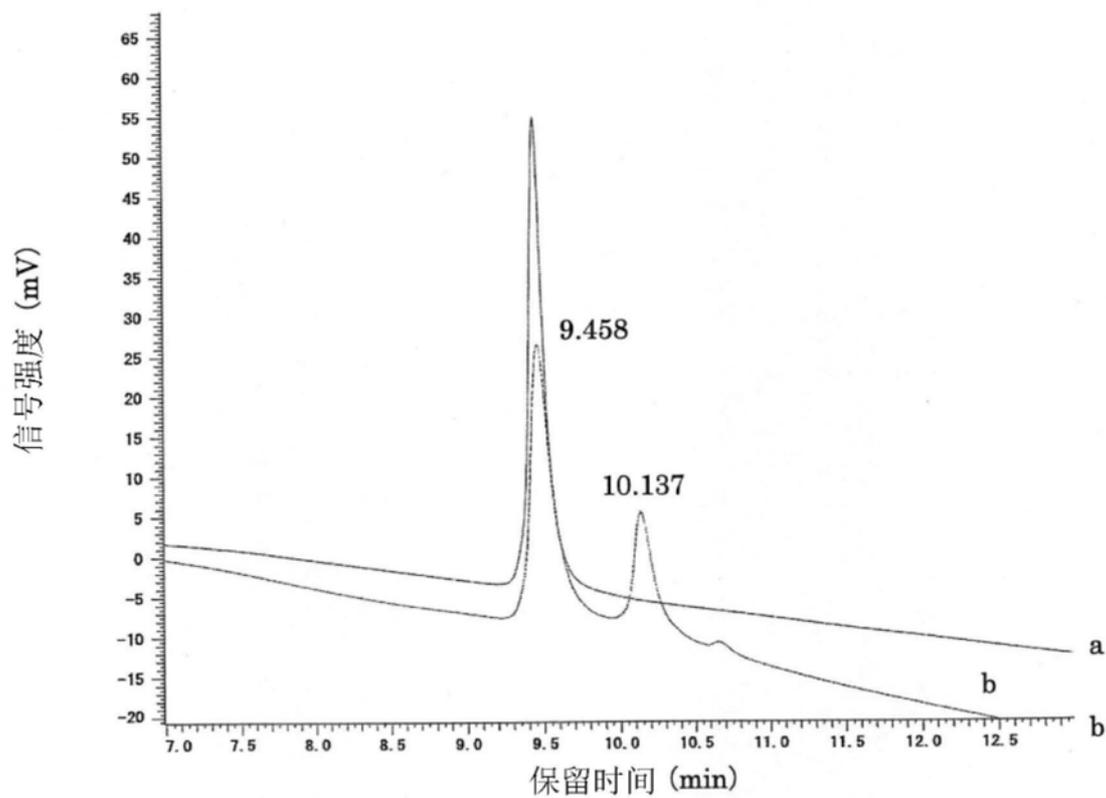


图29

UV 225 nm



UV 280 nm

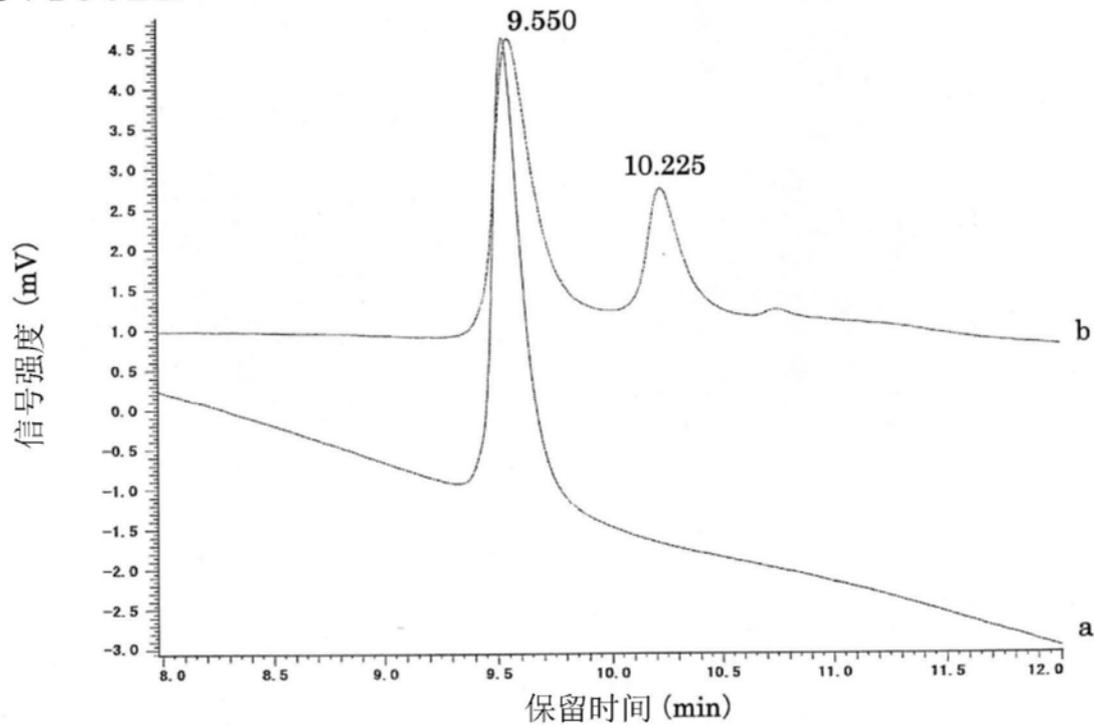
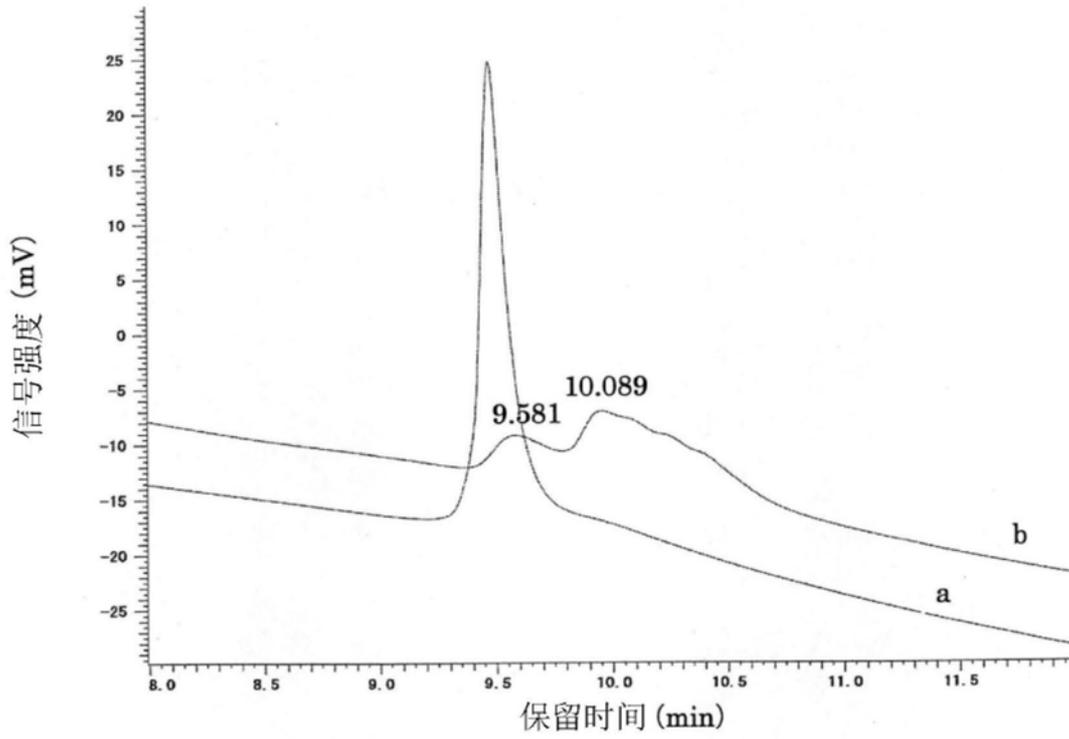


图30

UV 225 nm



UV 280 nm

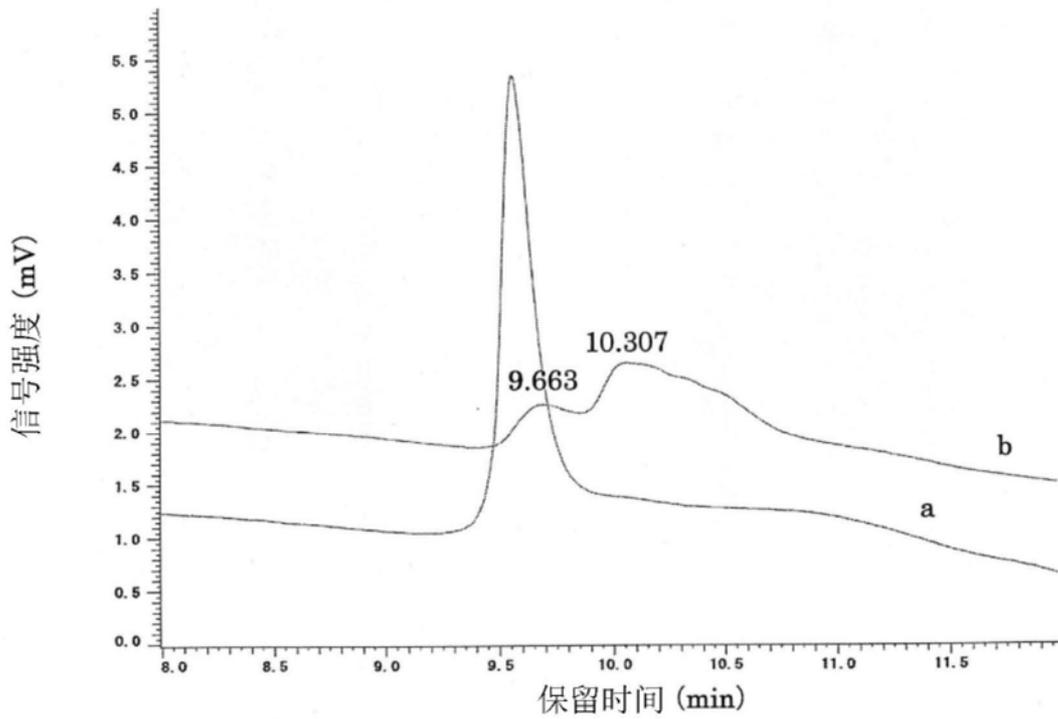
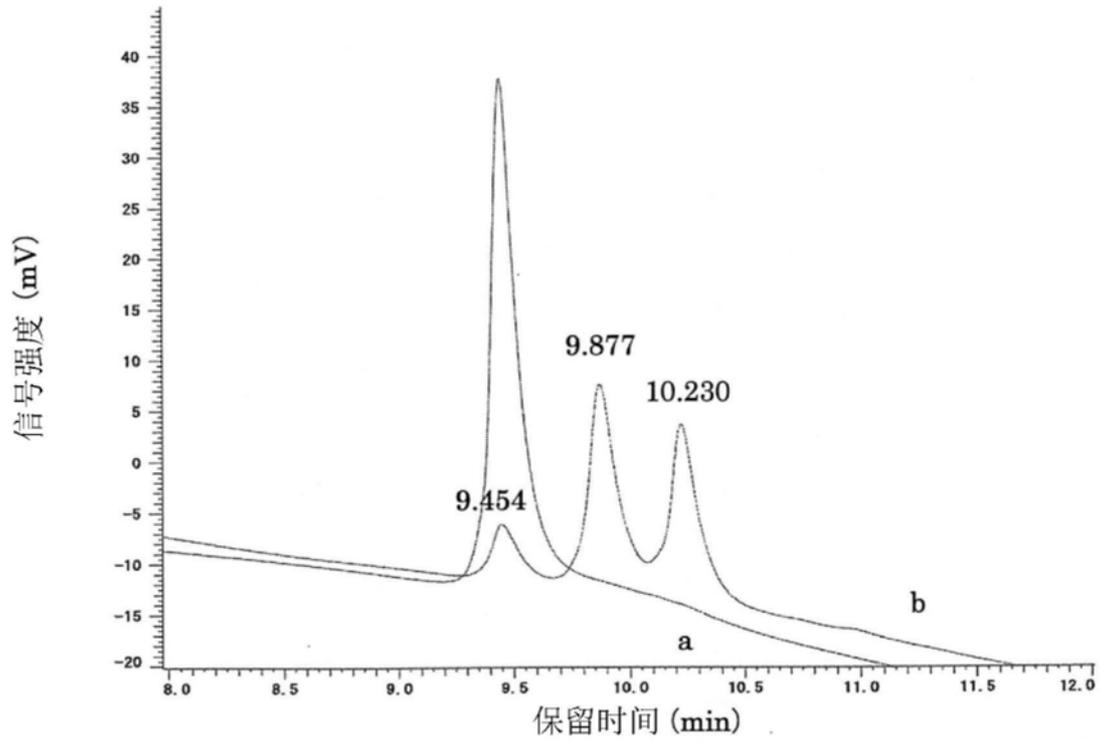


图31

UV 225 nm



UV 280 nm

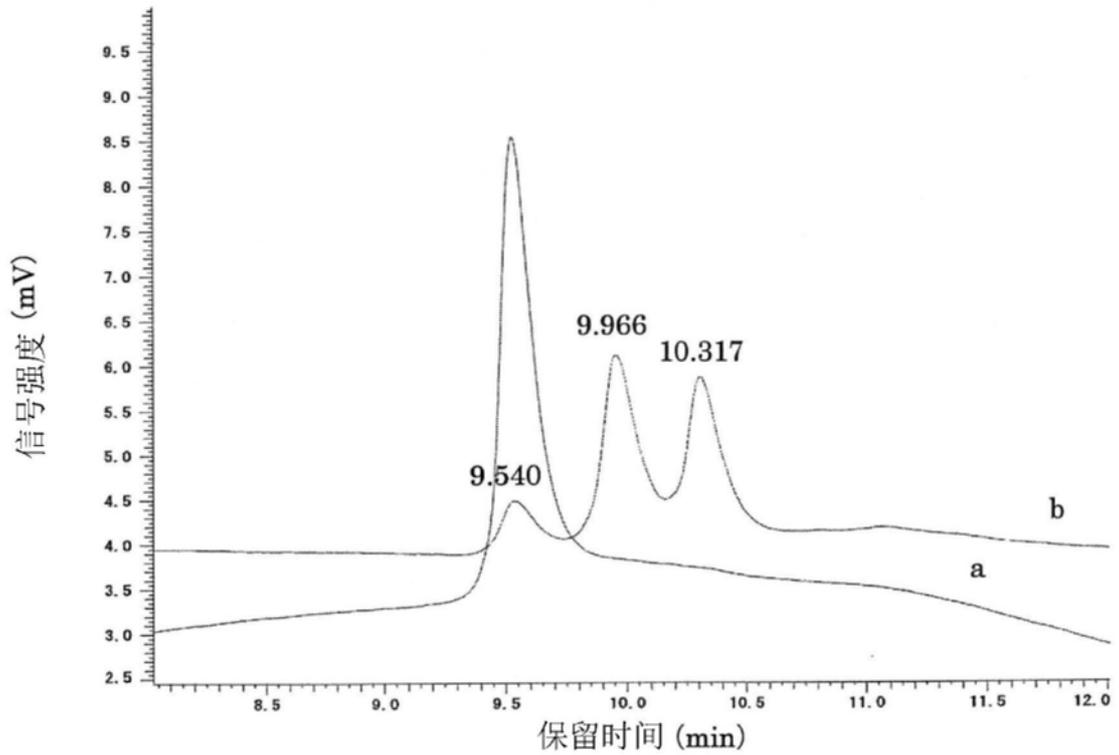
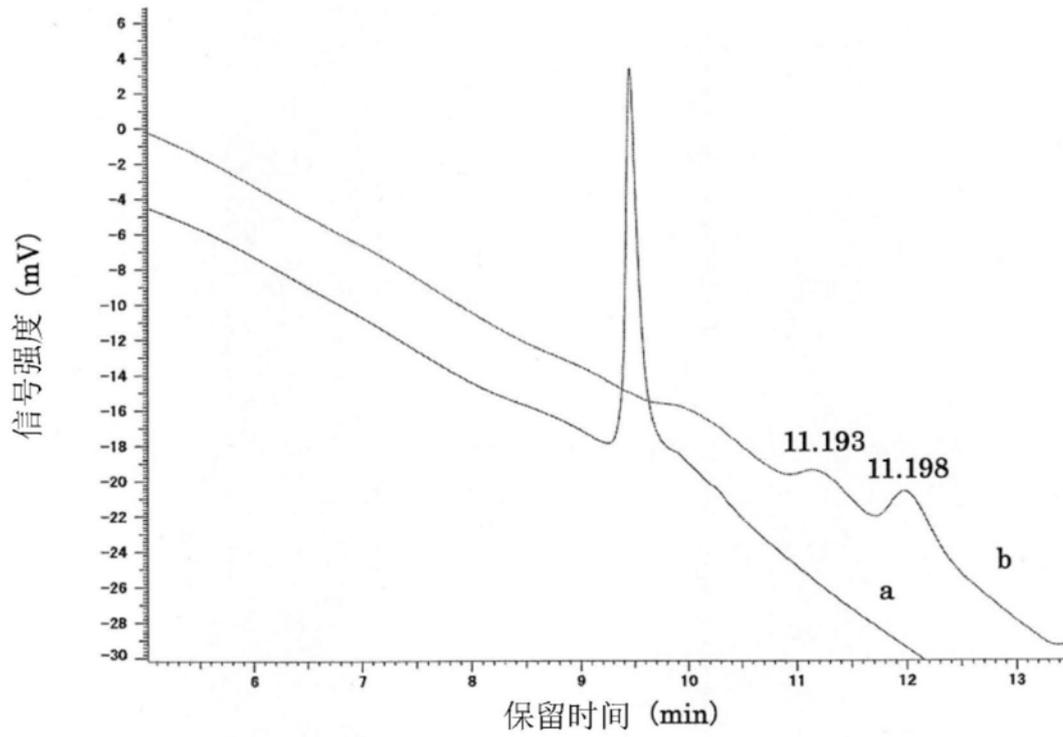


图32

UV 225 nm



UV 280 nm

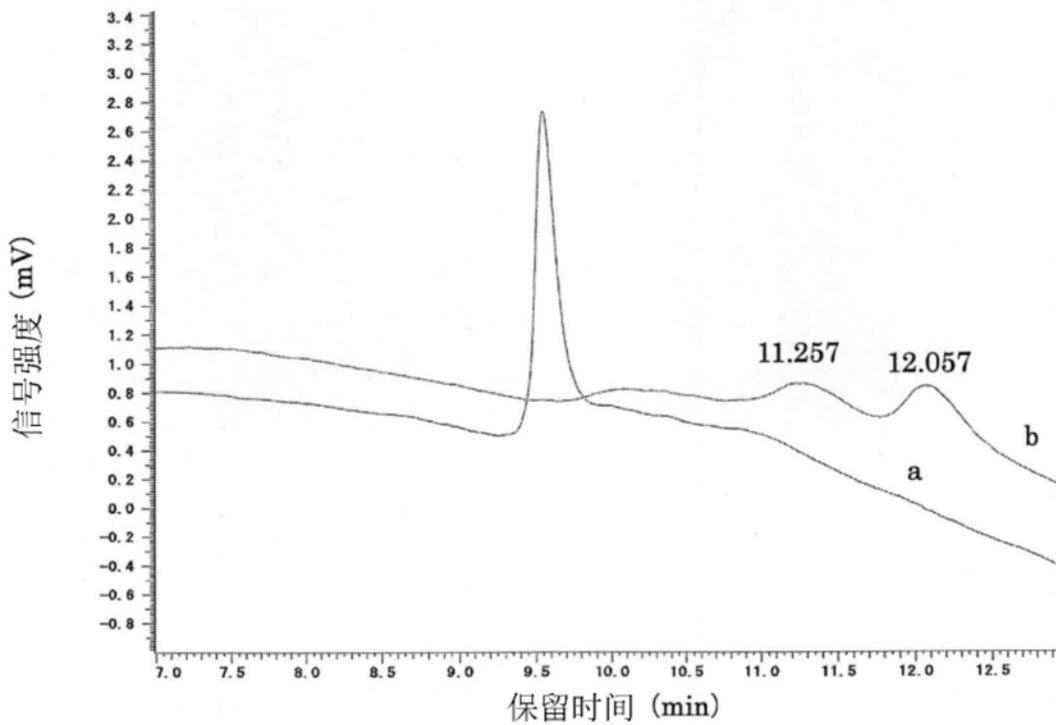
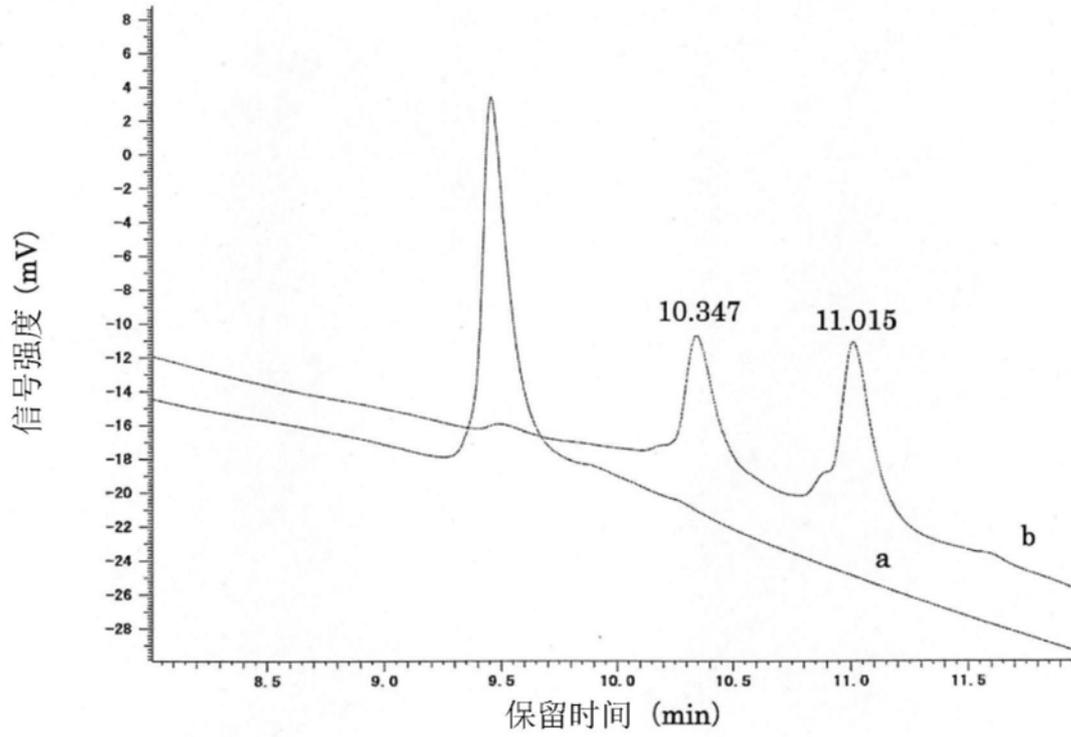


图33

UV 225 nm



UV 280 nm

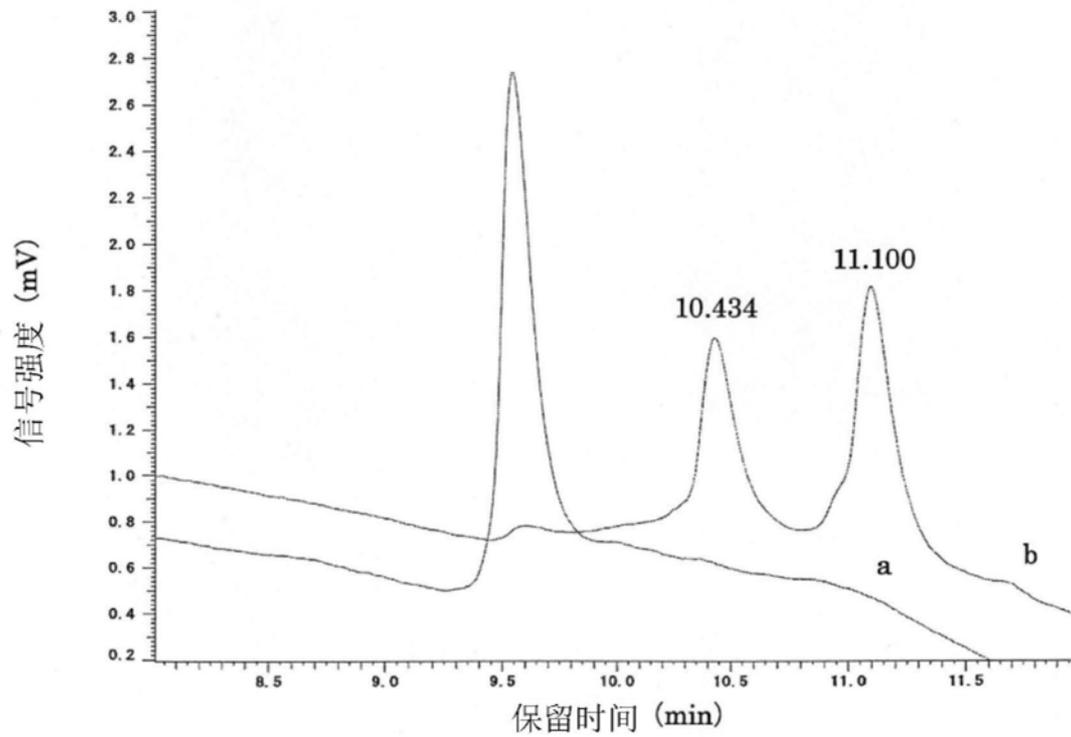
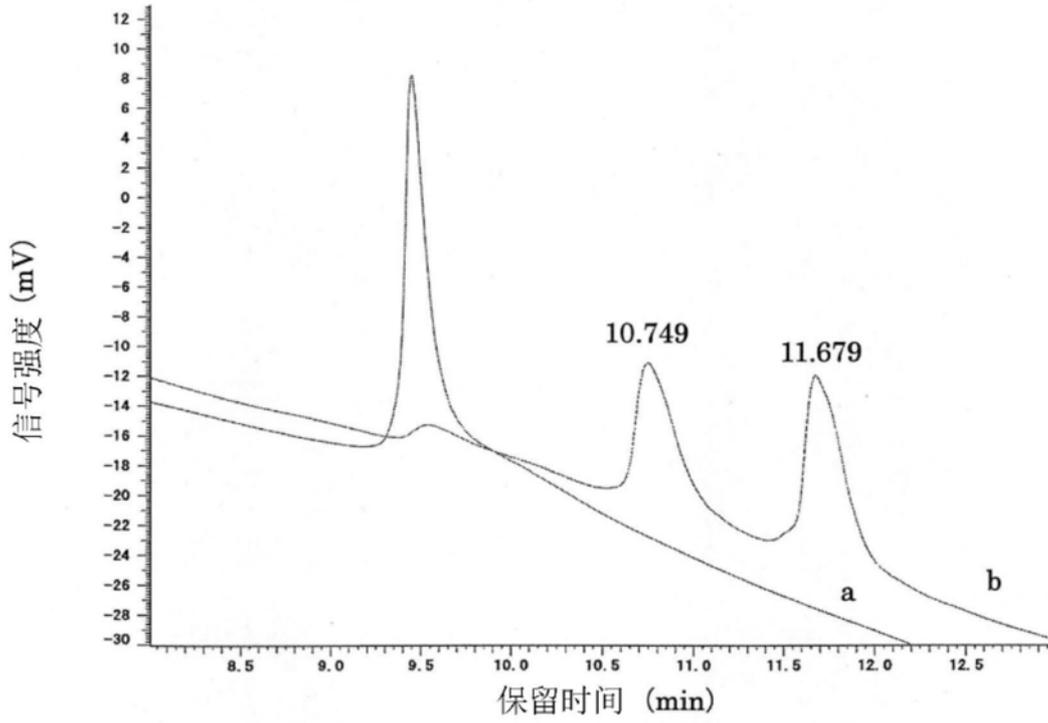


图34

UV 225 nm



UV 280 nm

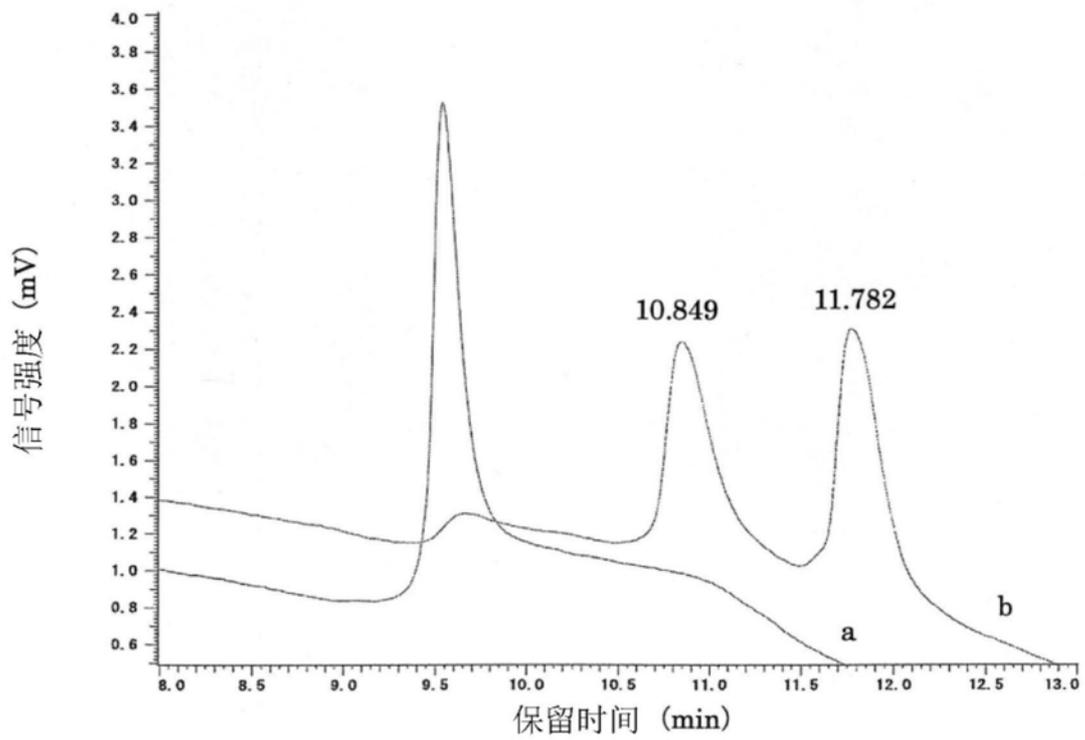


图35

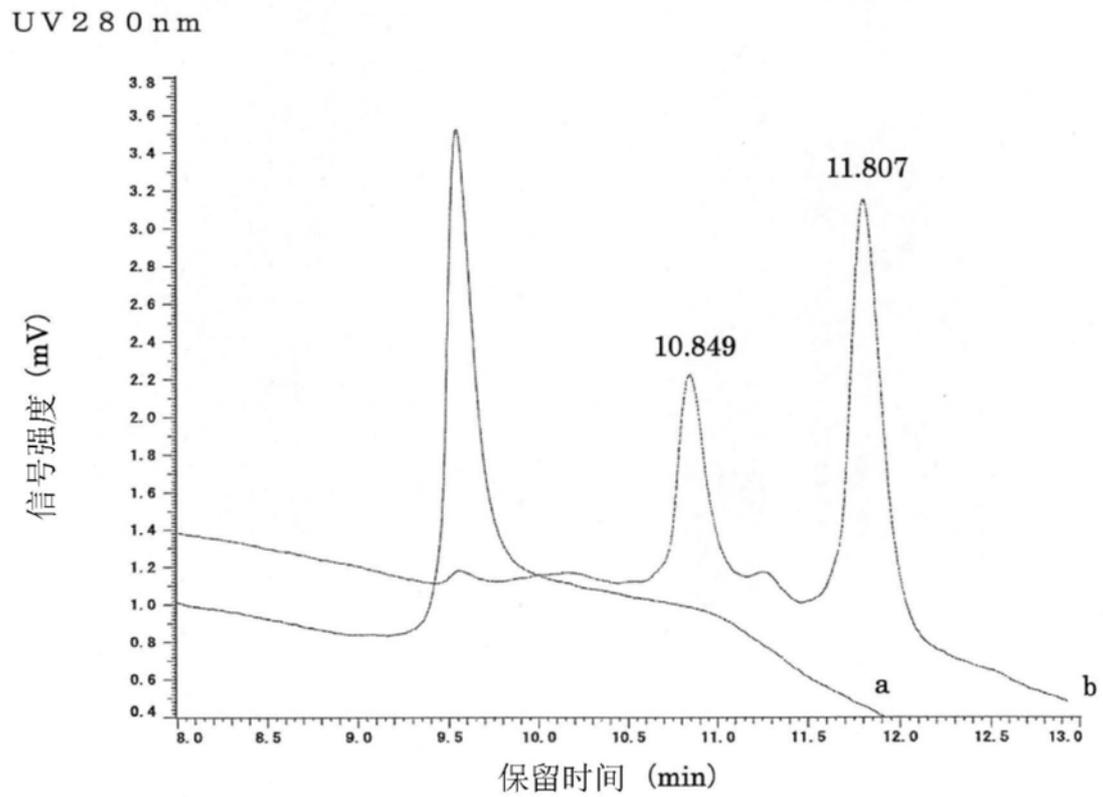
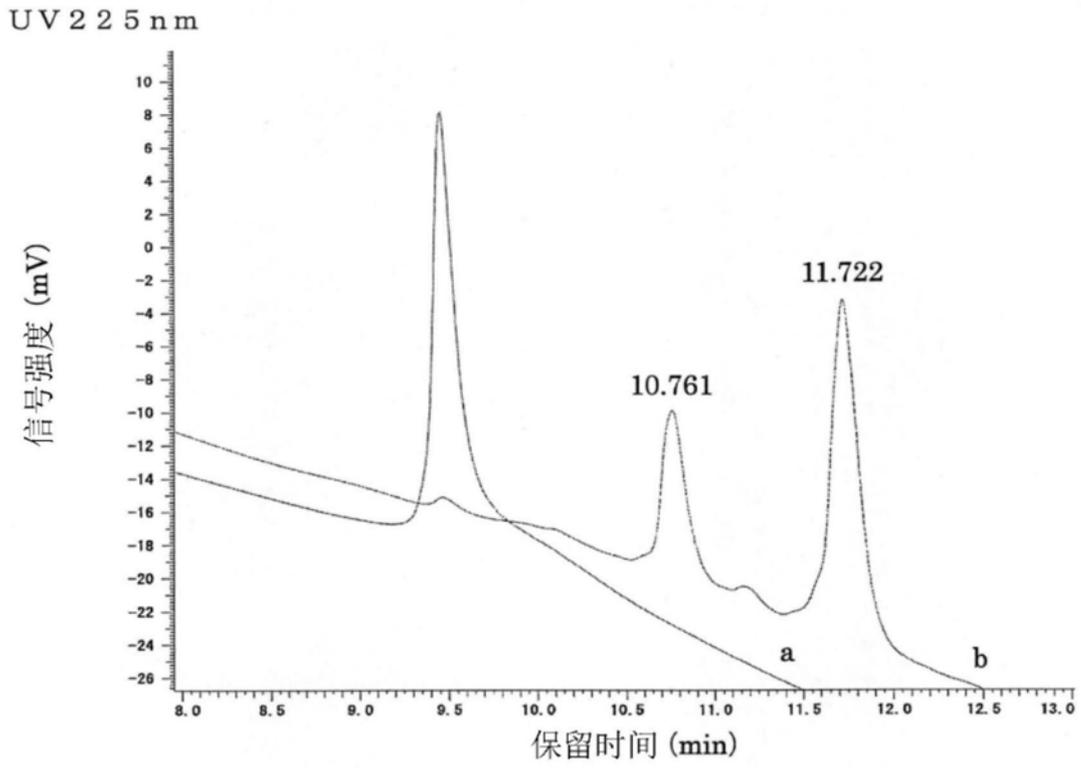
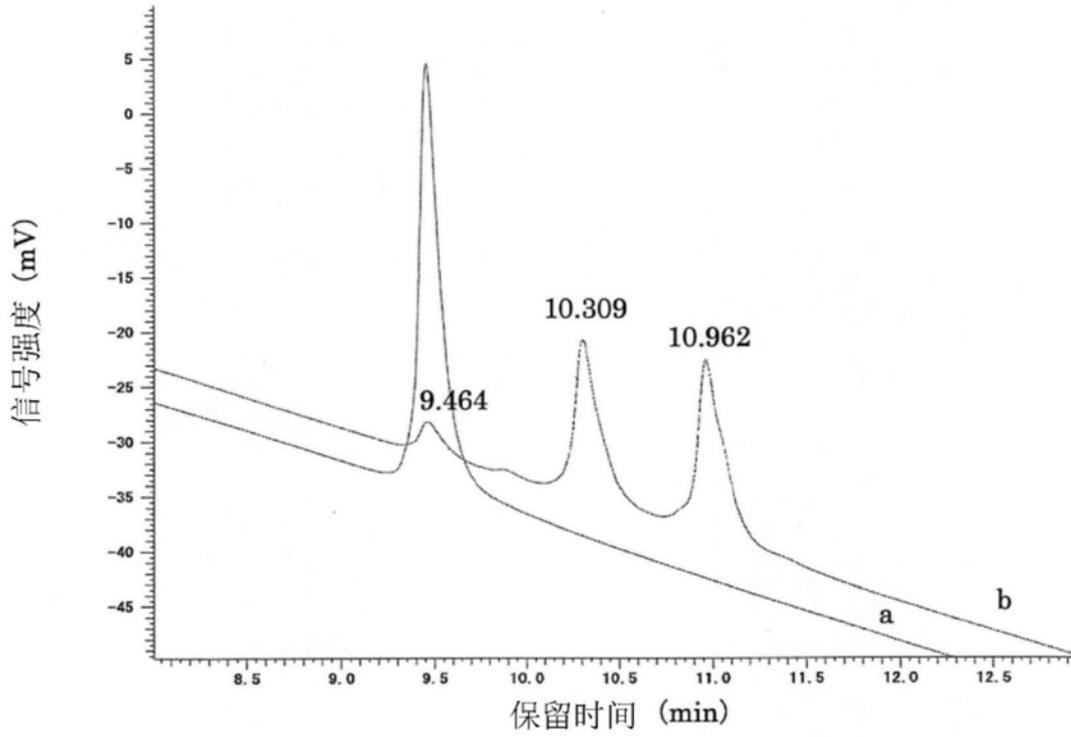


图36

UV 225 nm



UV 280 nm

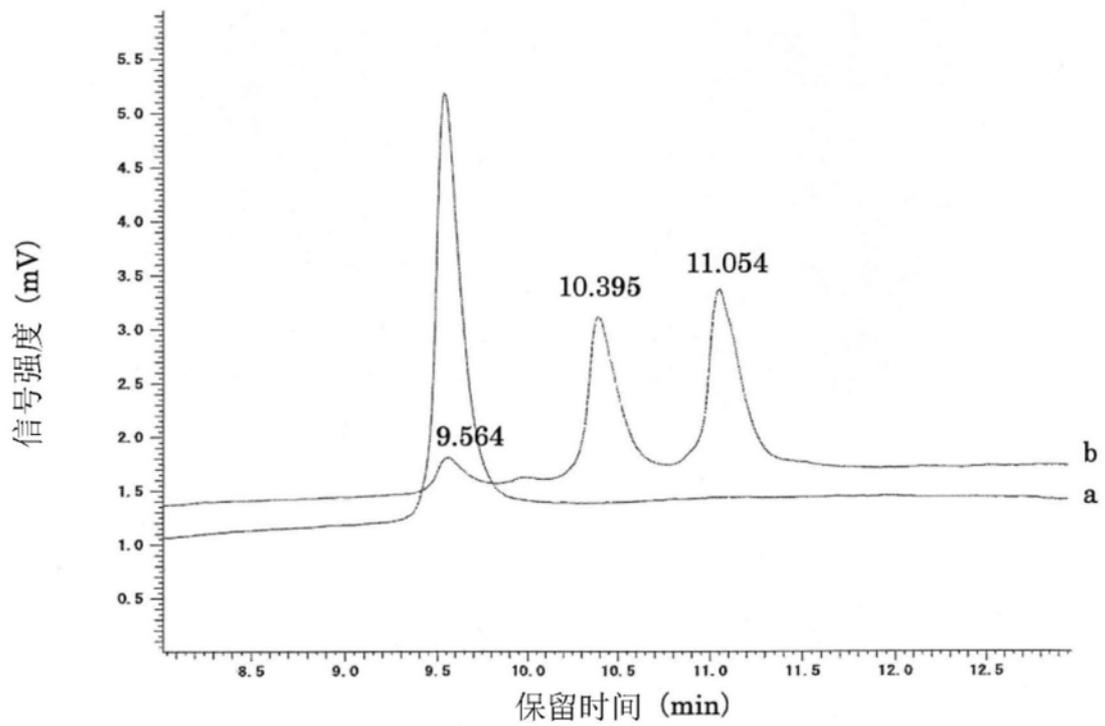
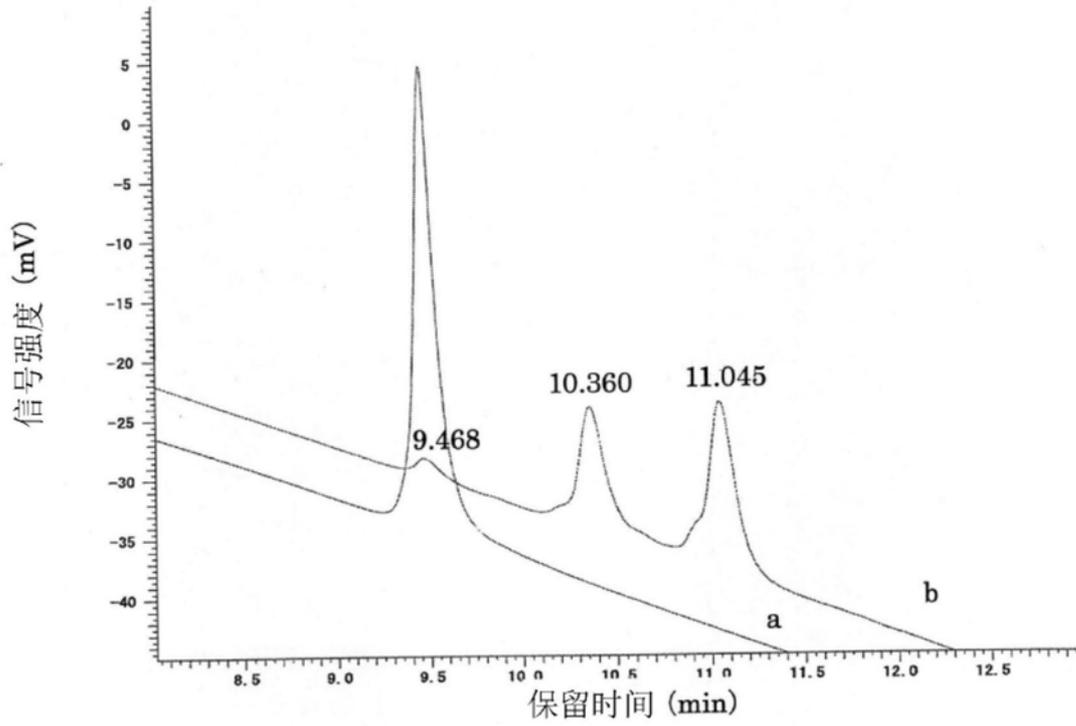


图37

UV 225 nm



UV 280 nm

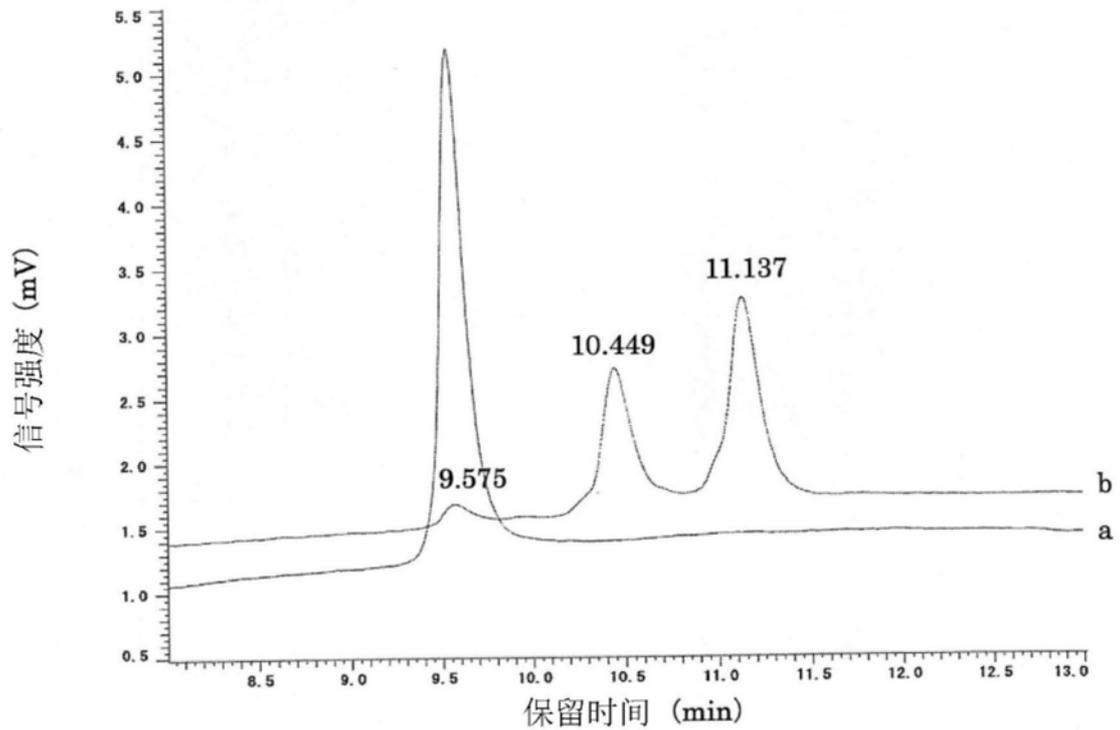
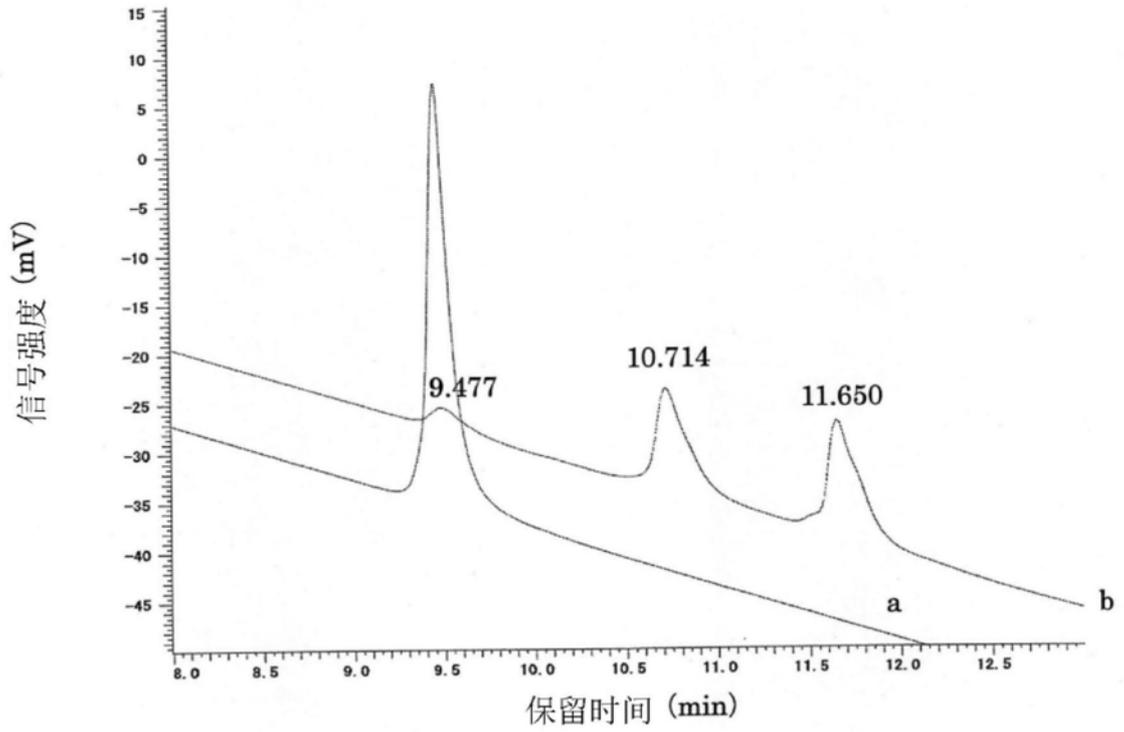


图38

UV 225 nm



UV 280 nm

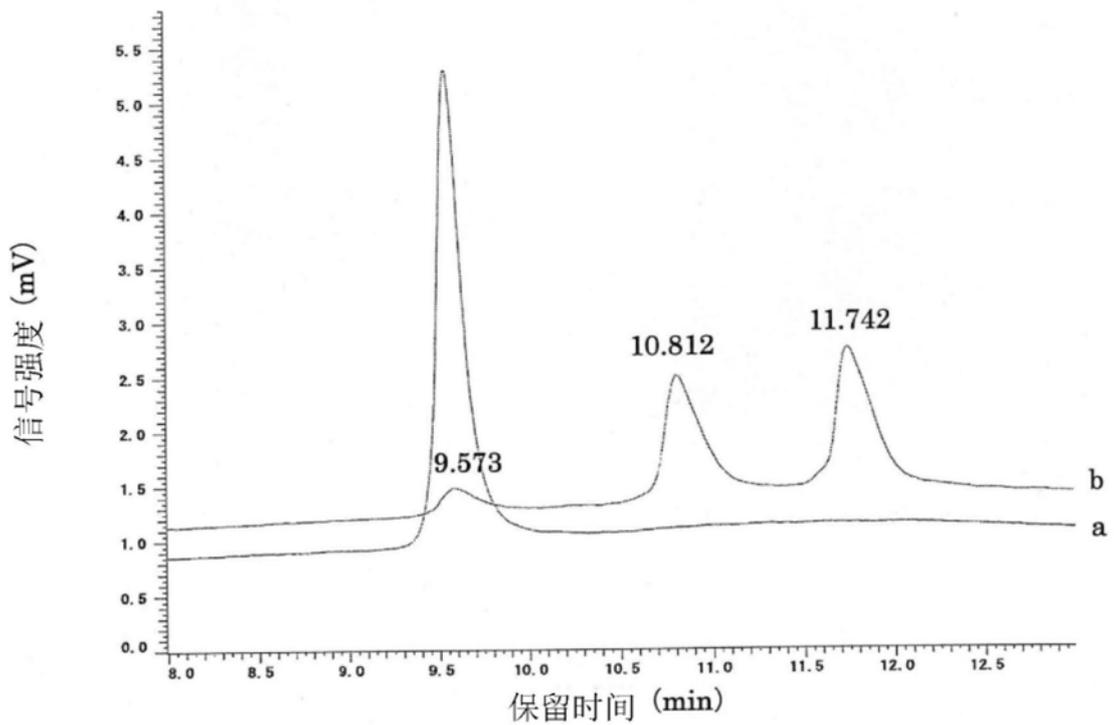
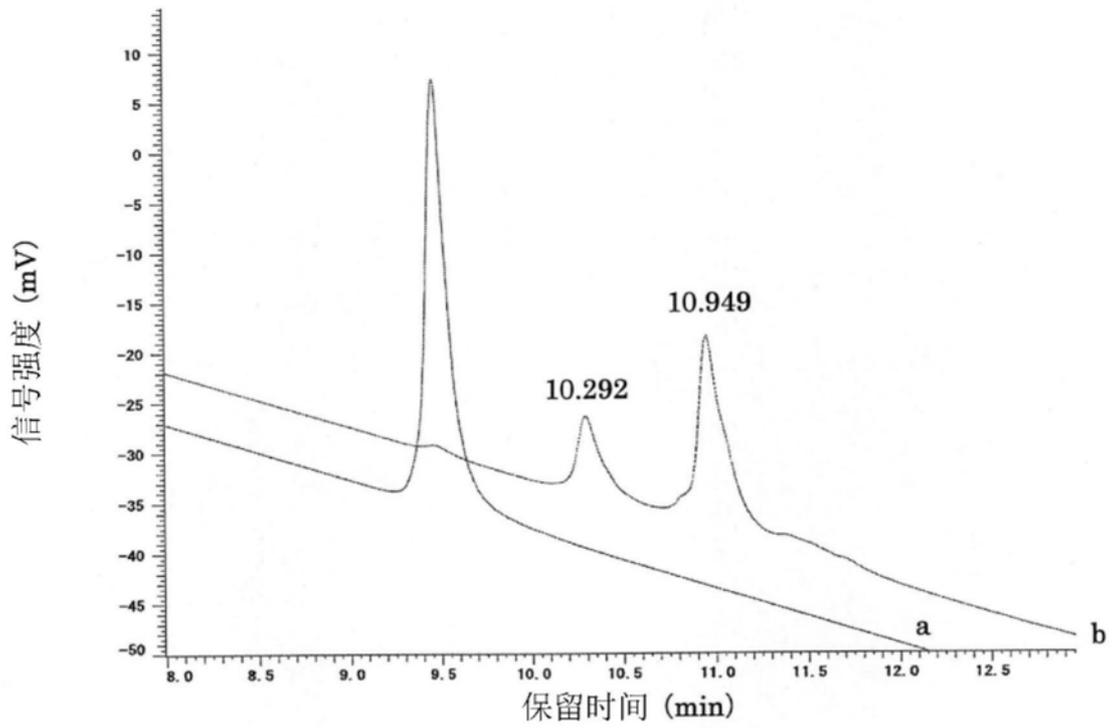


图39

UV 225 nm



UV 280 nm

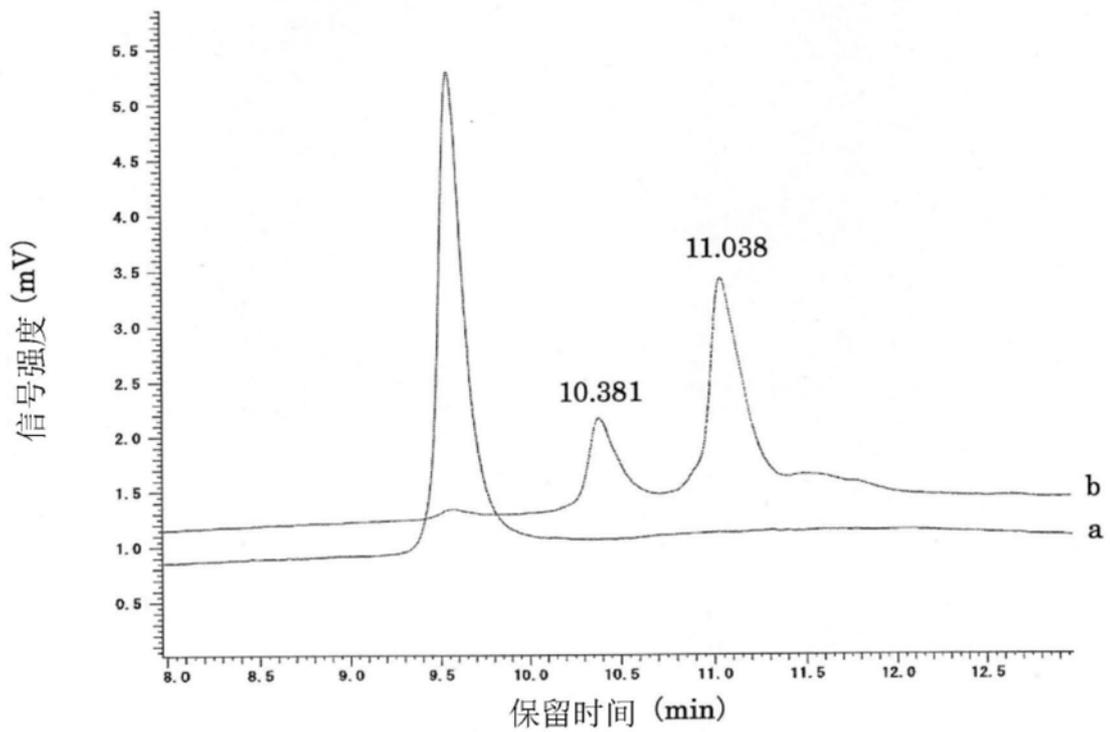
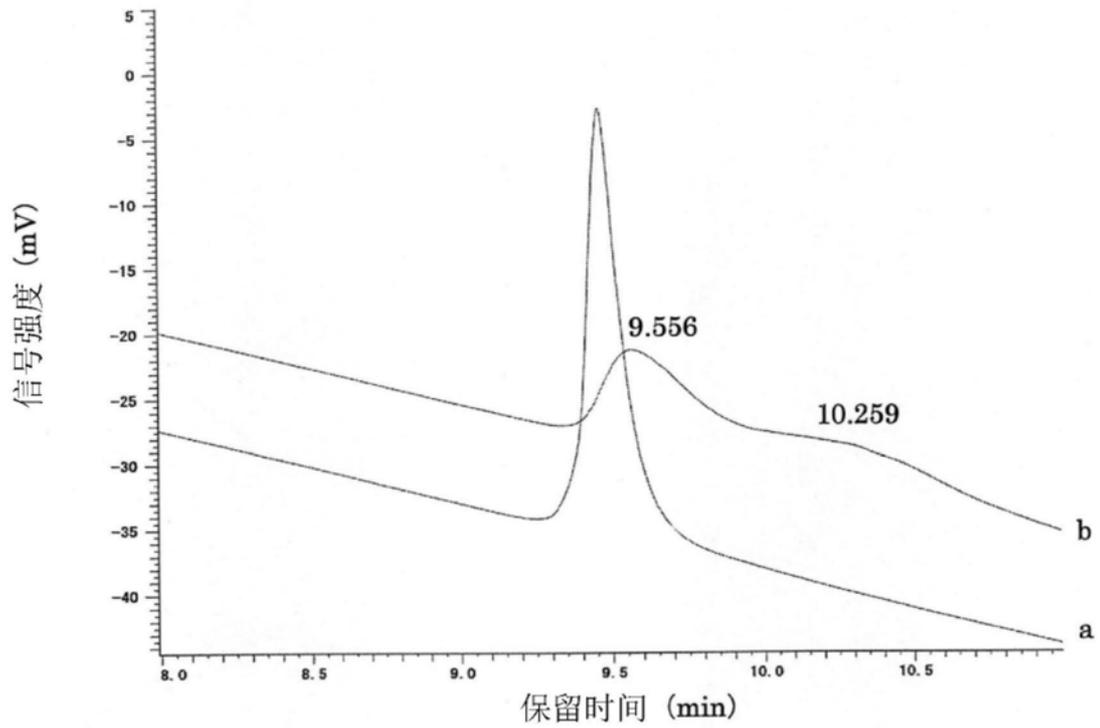


图40

UV 225 nm



UV 280 nm

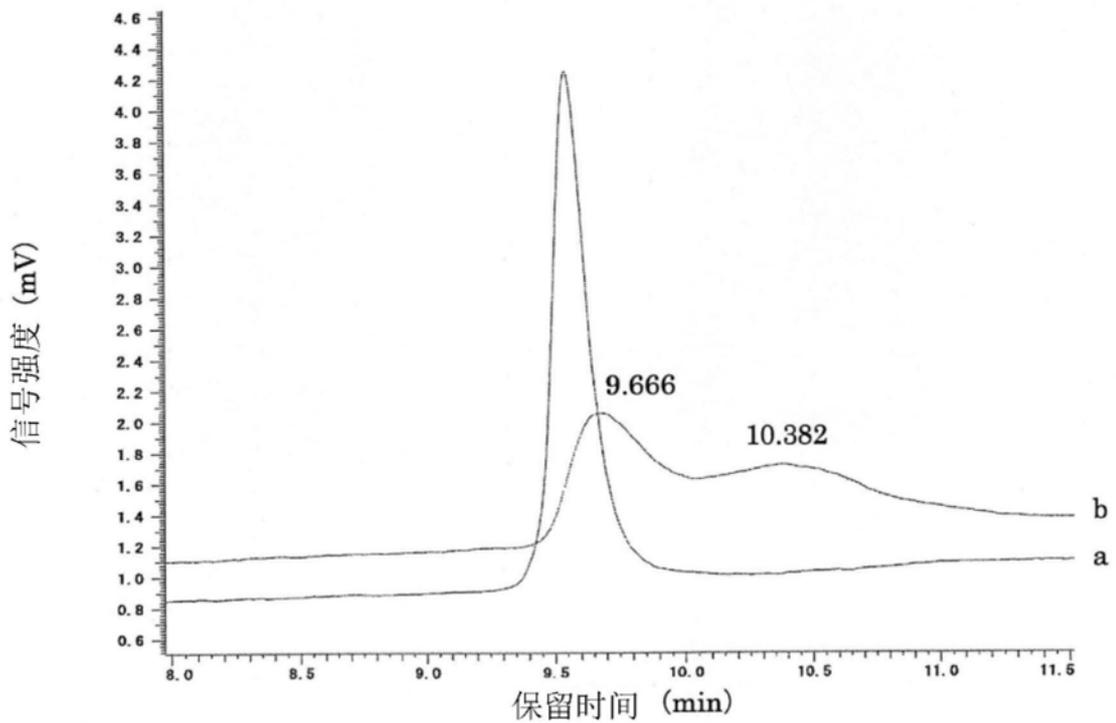


图41

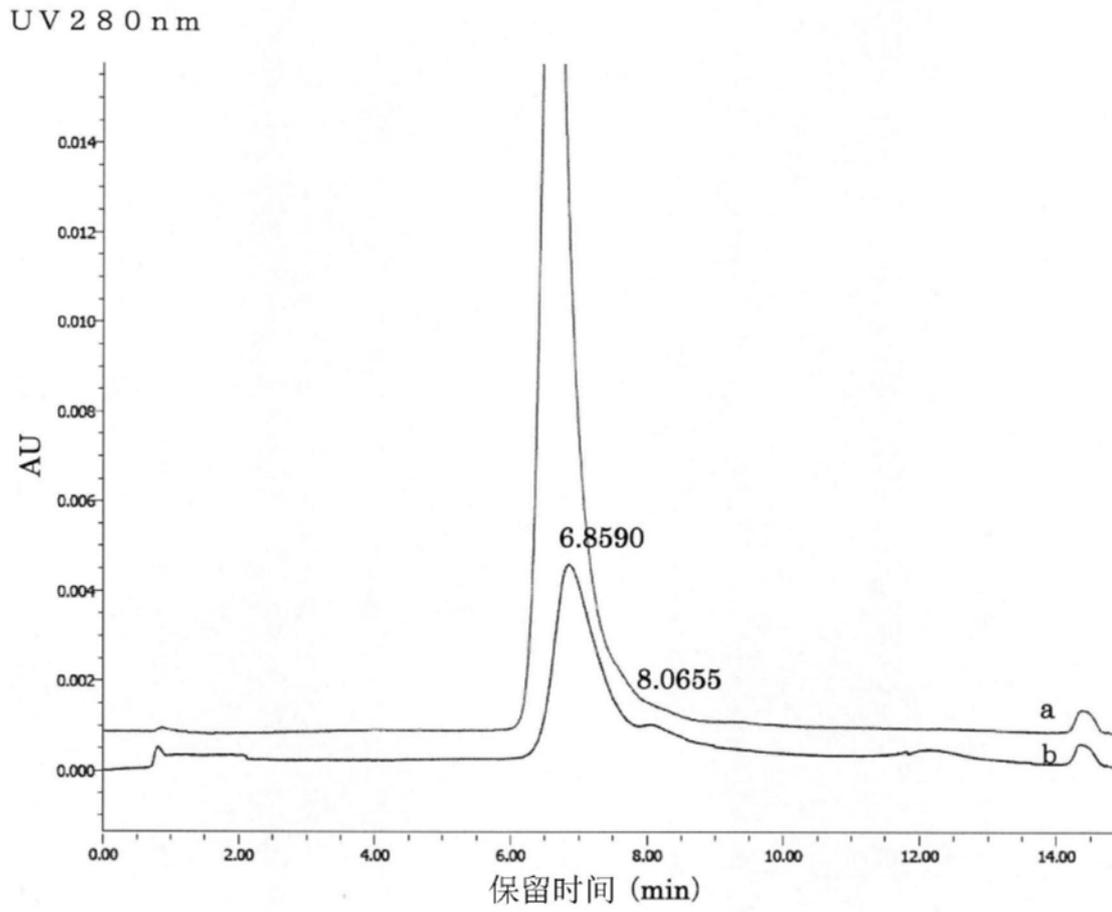


图42

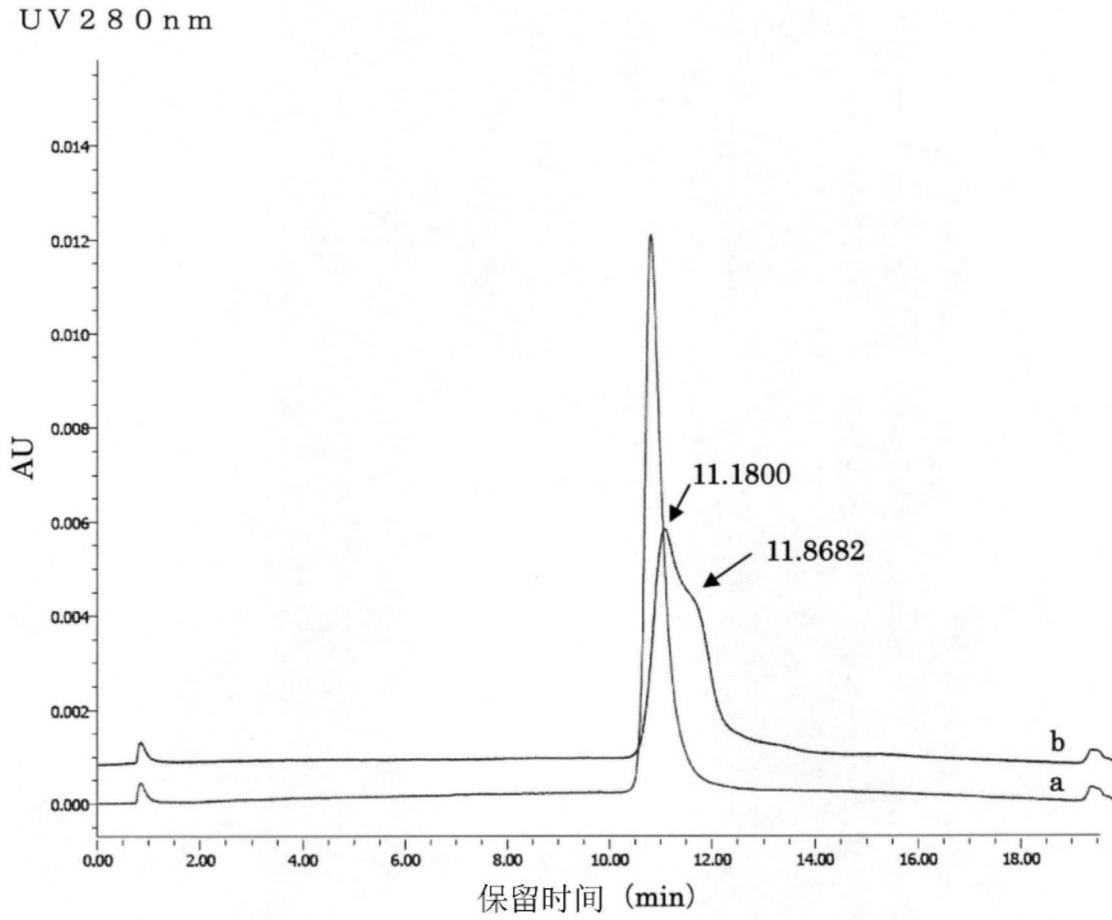


图43

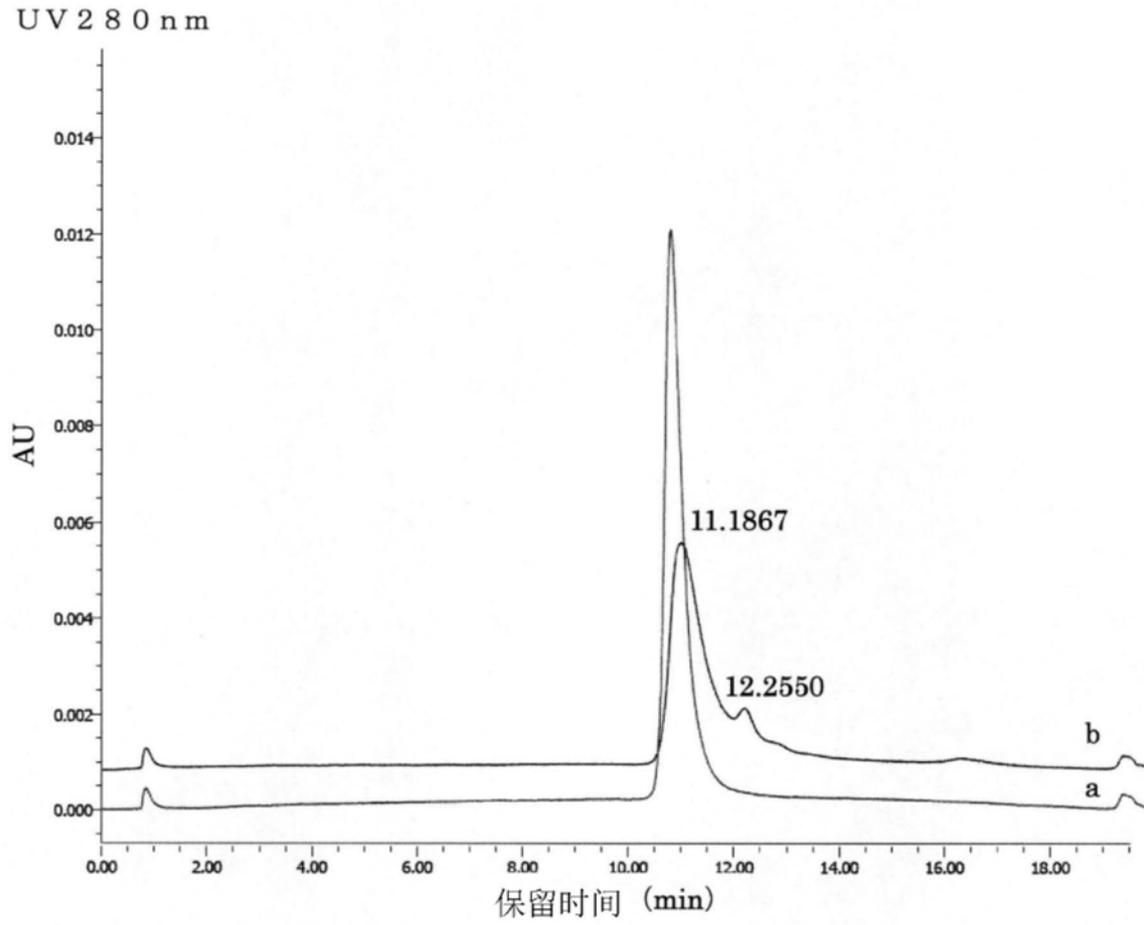


图44

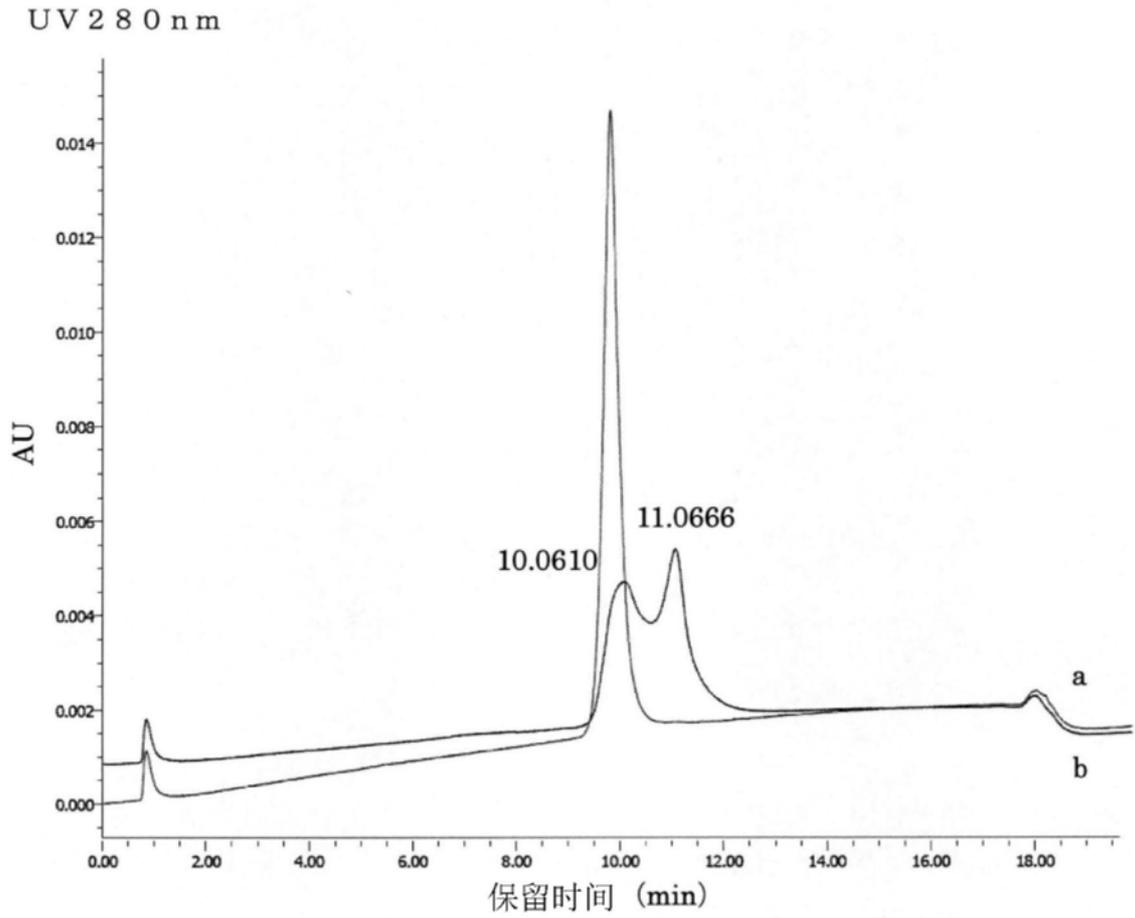


图45

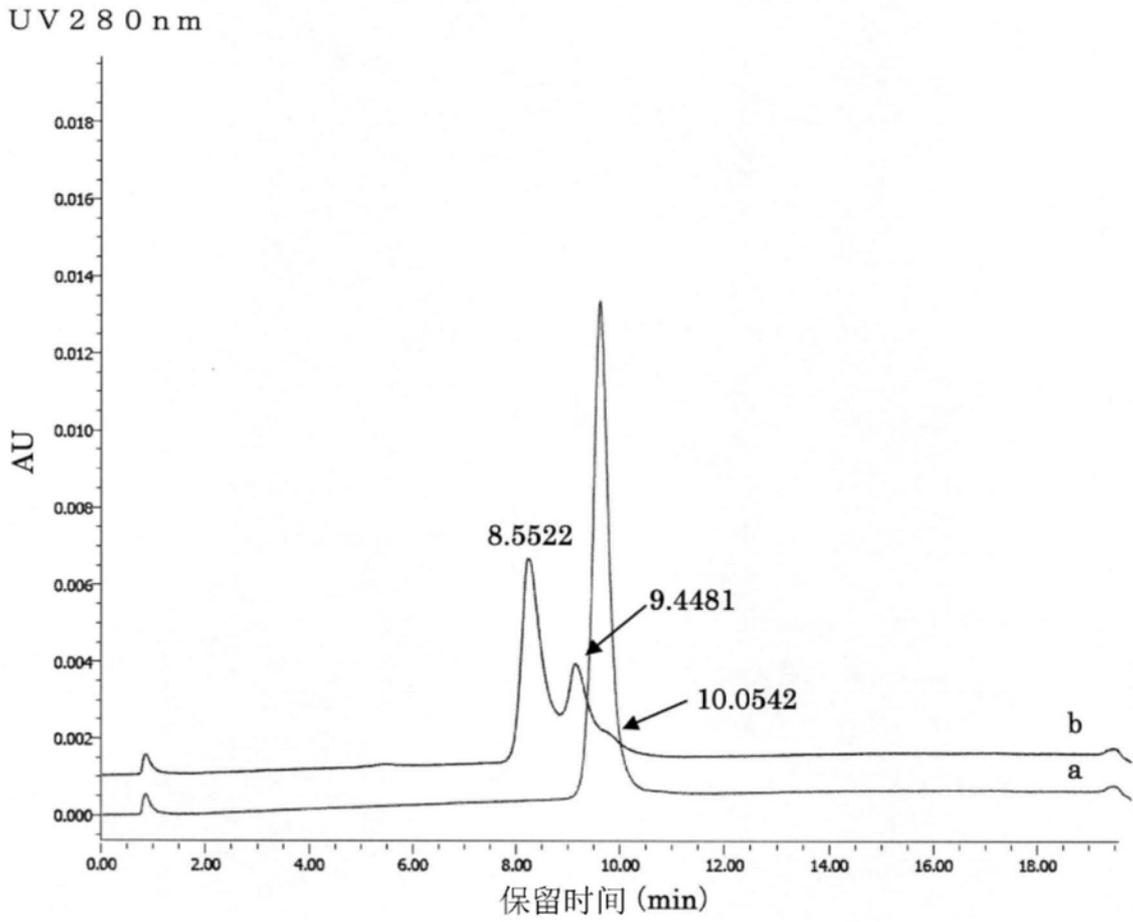


图46

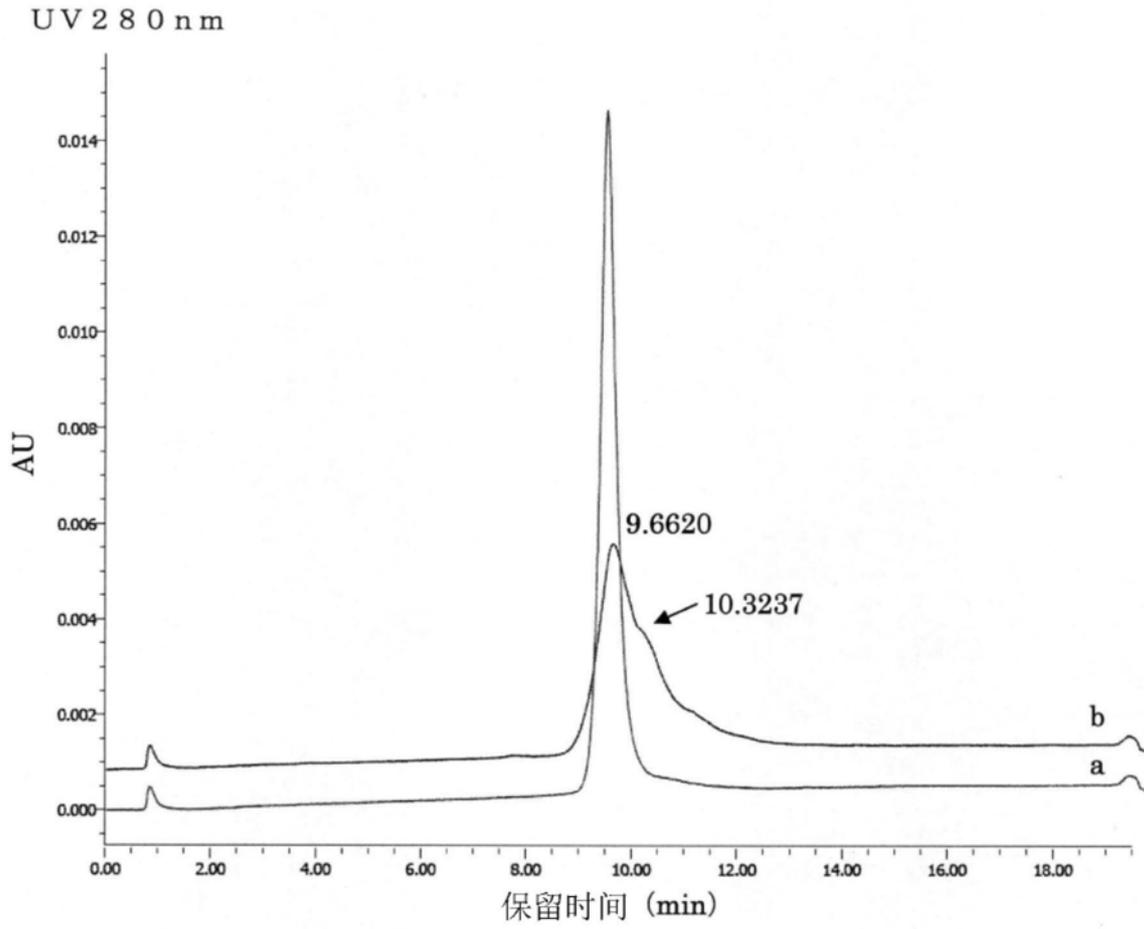


图47

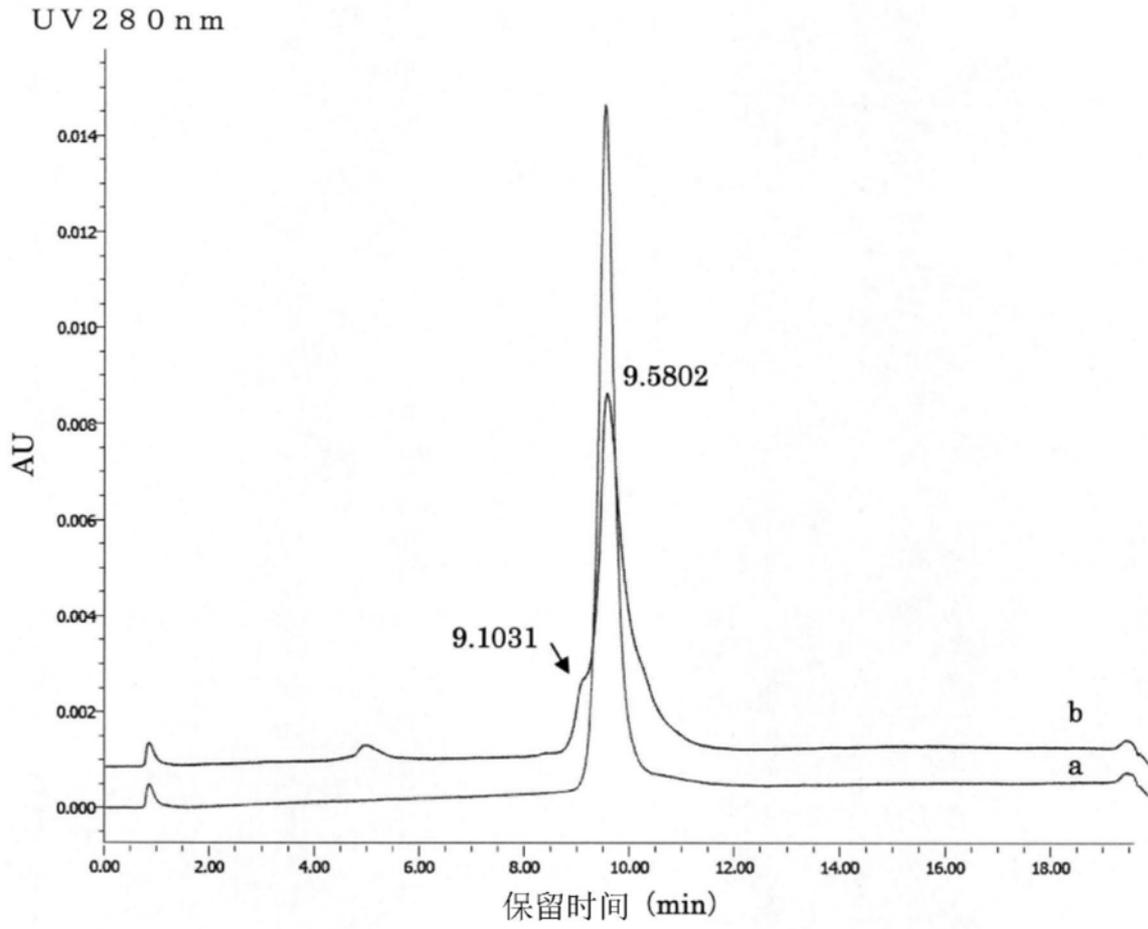


图48

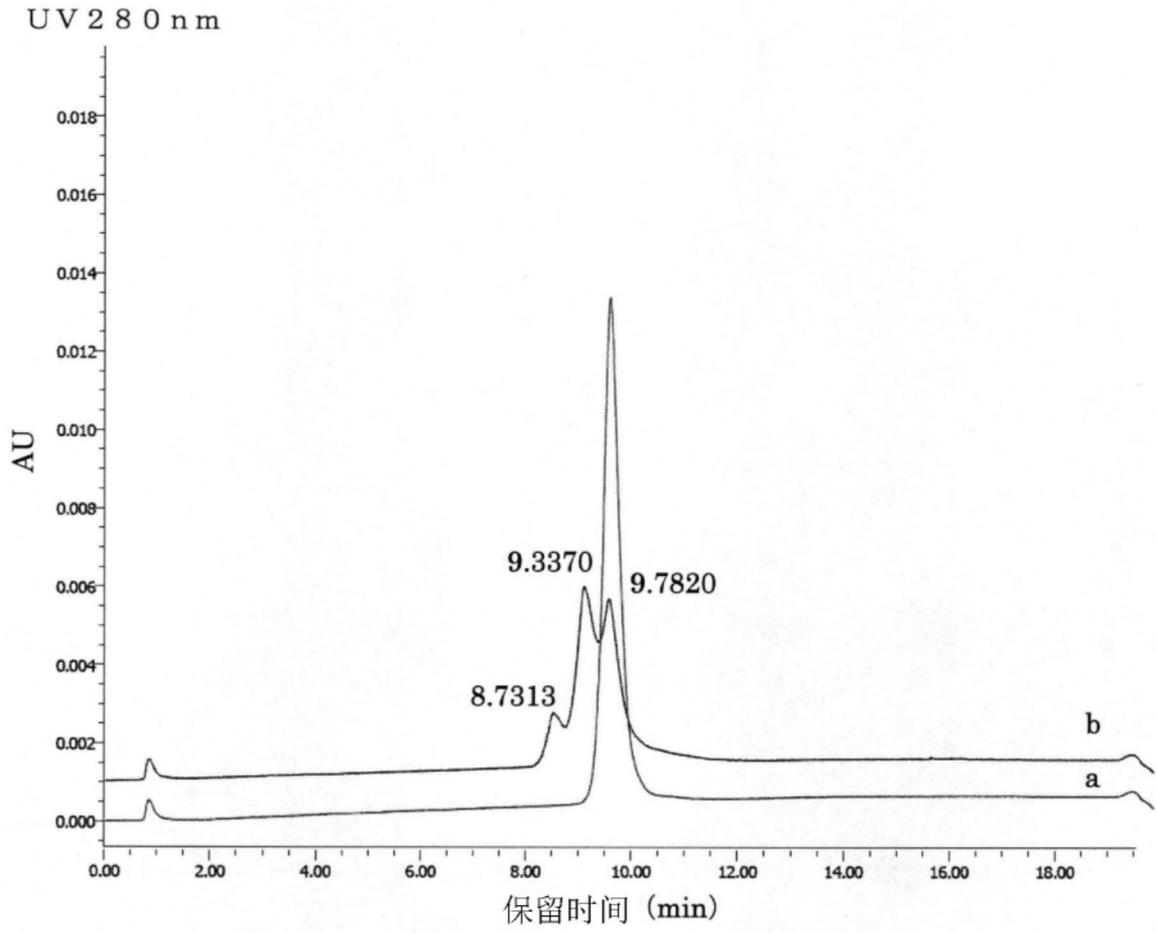


图49

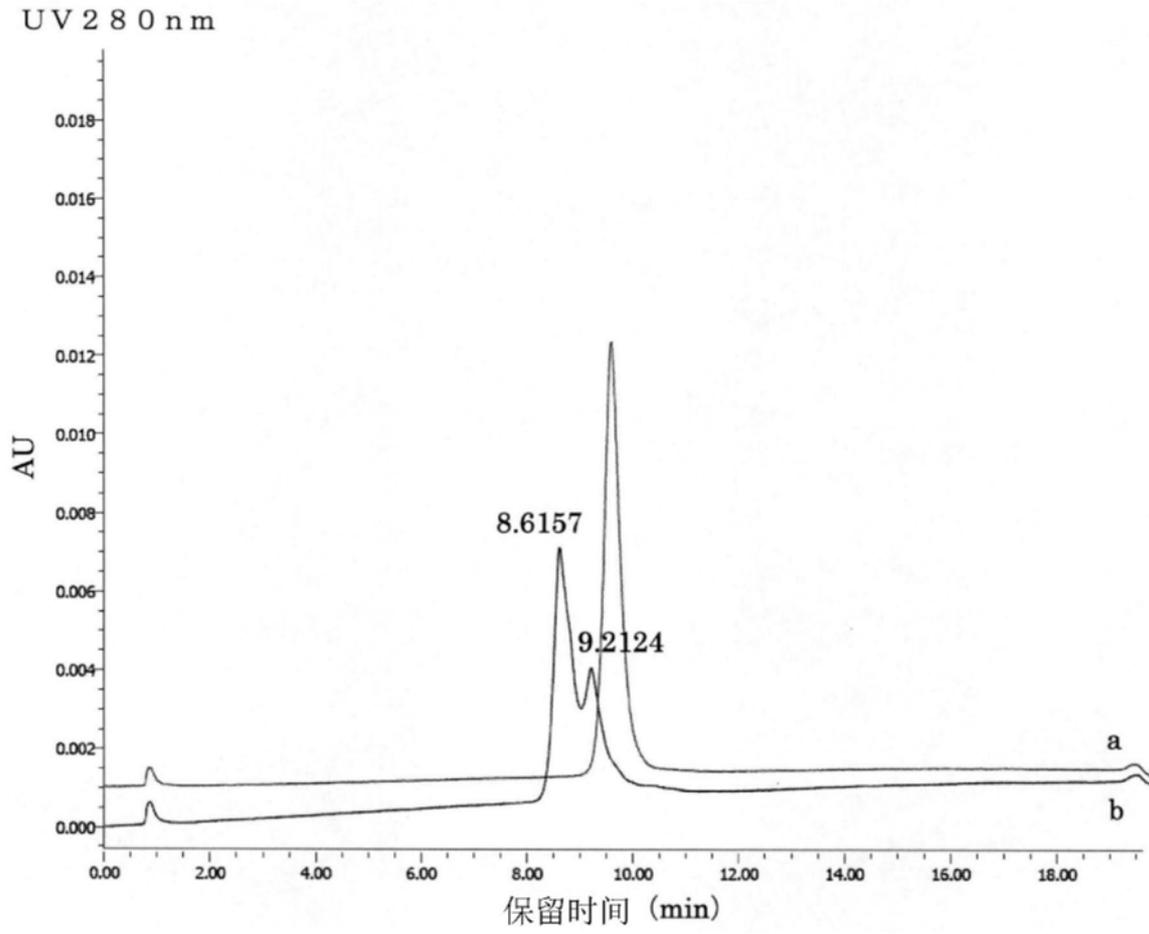


图50

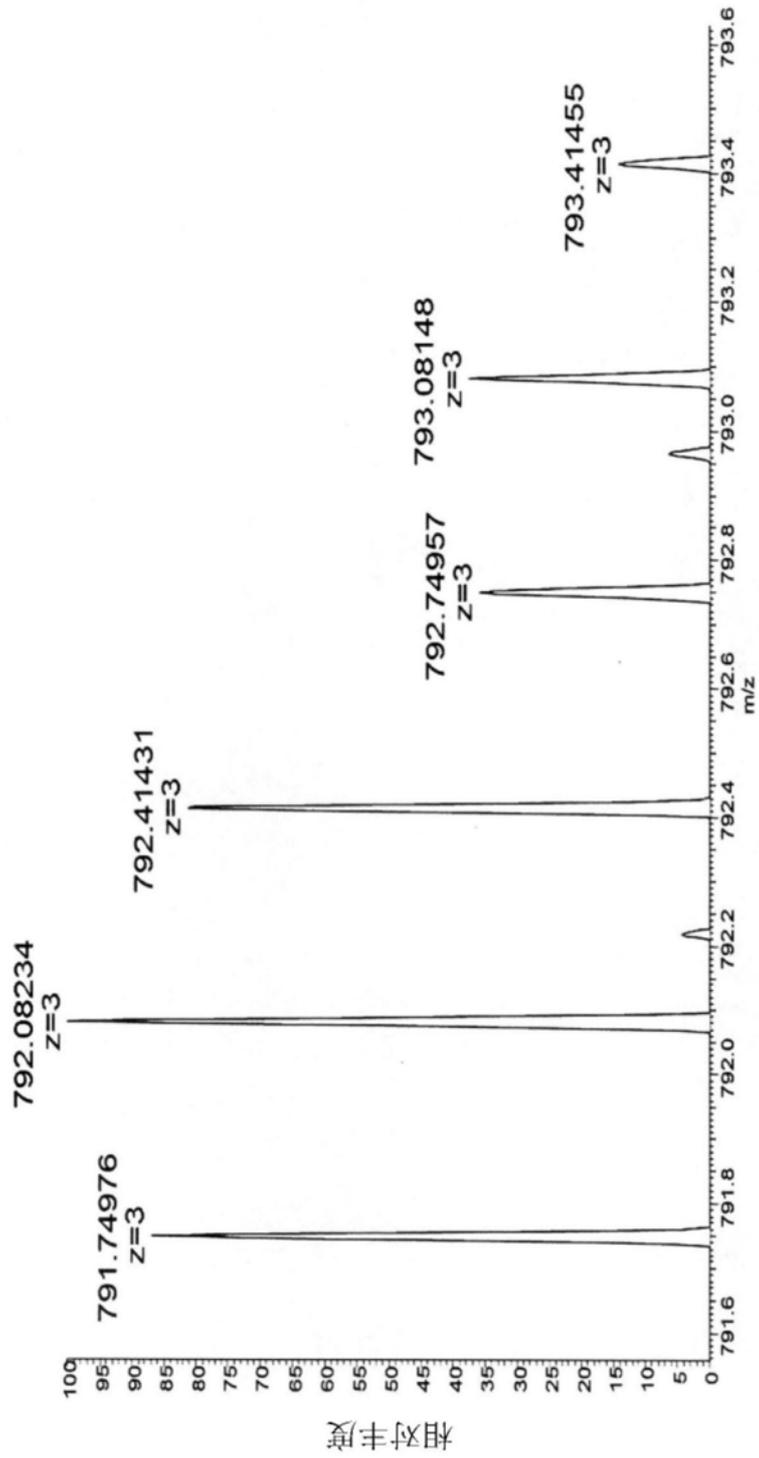


图51

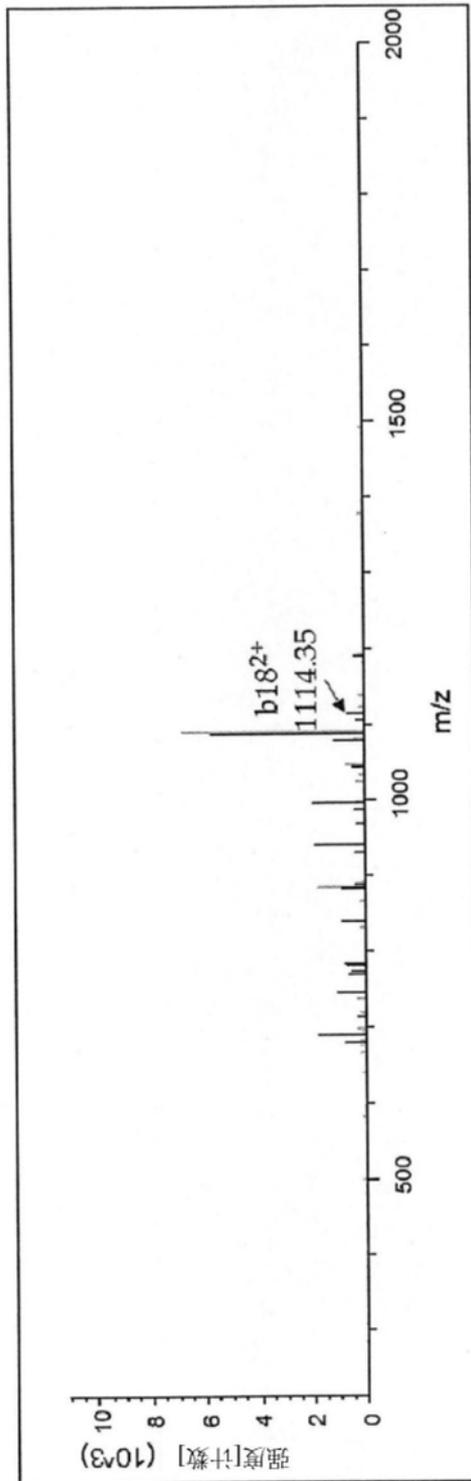


图52

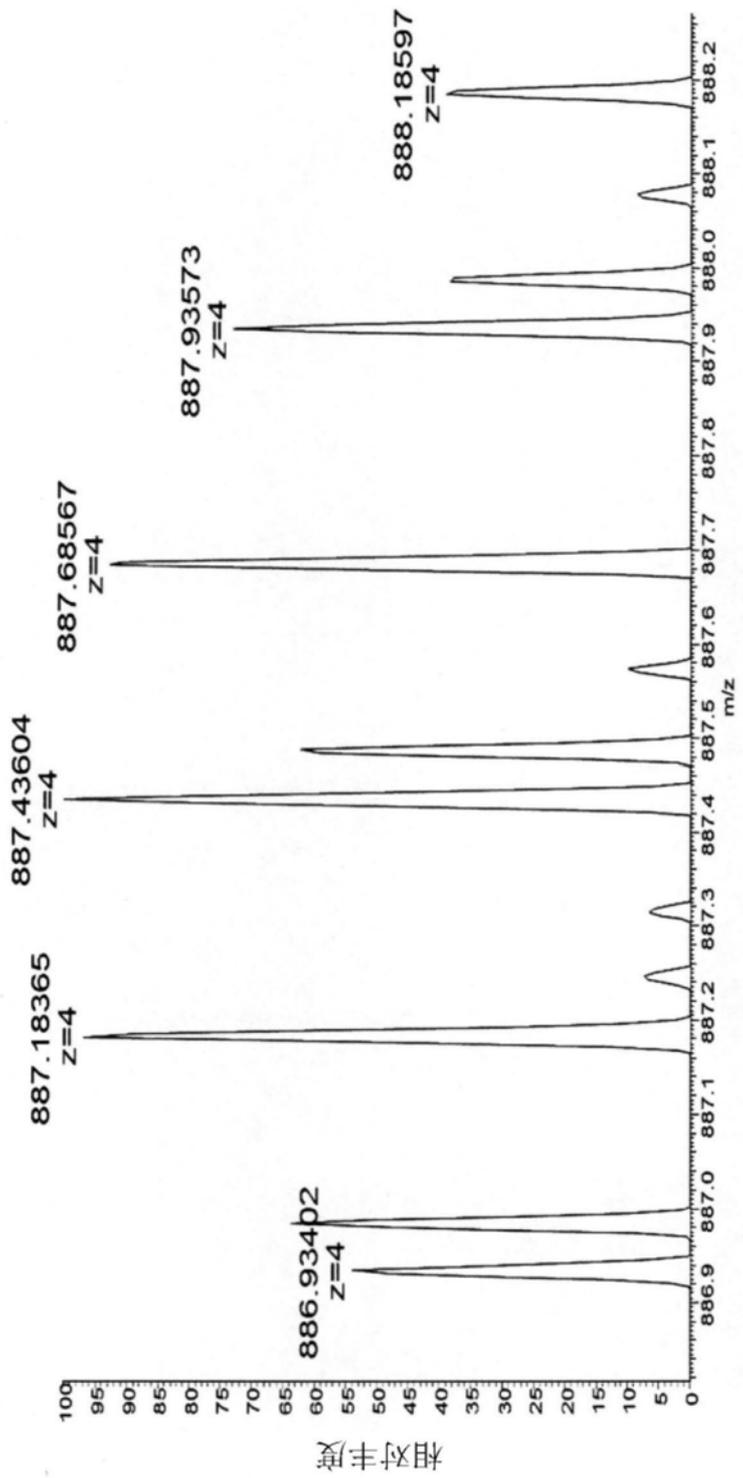


图53

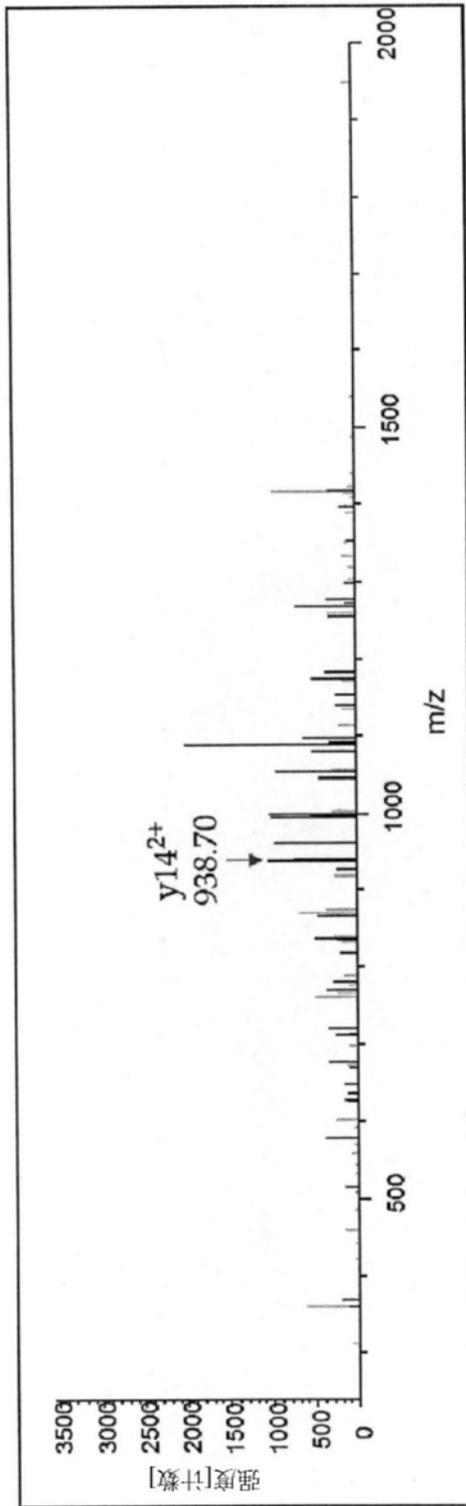


图54

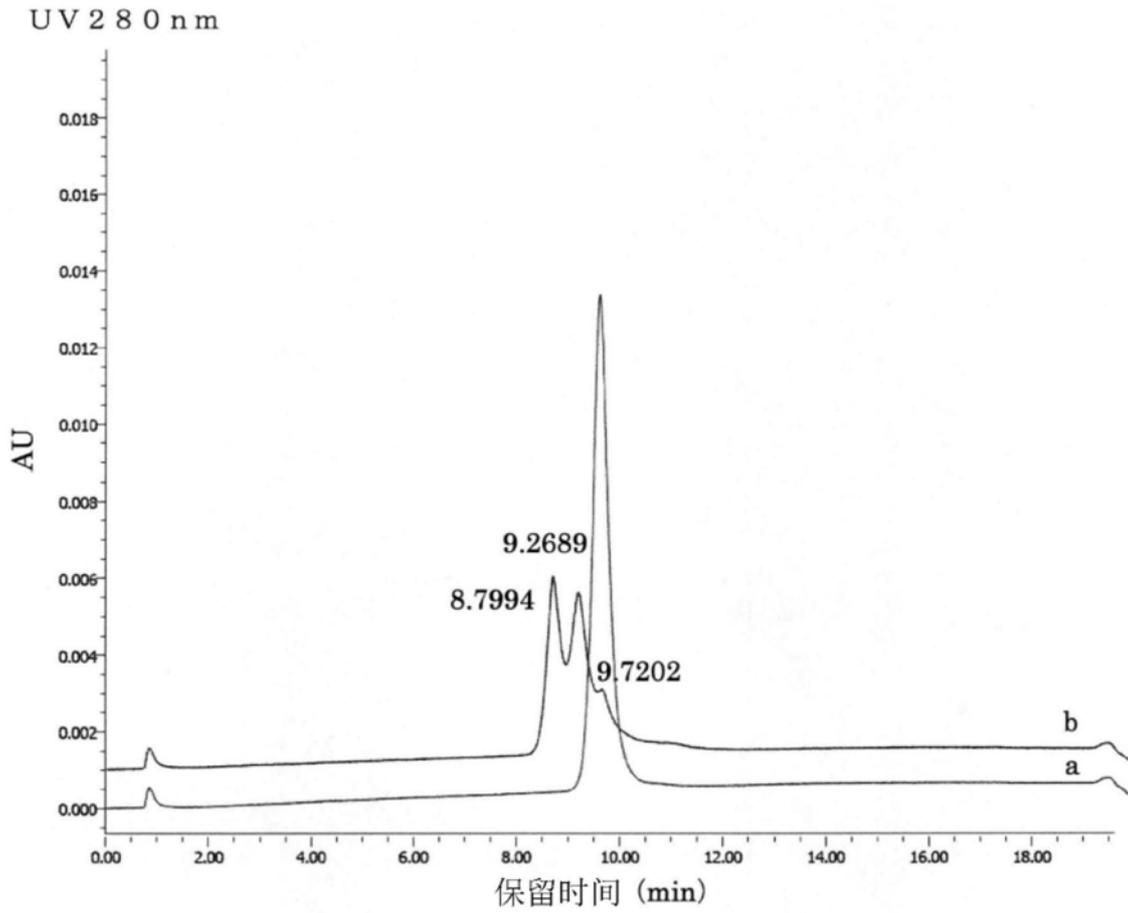


图55

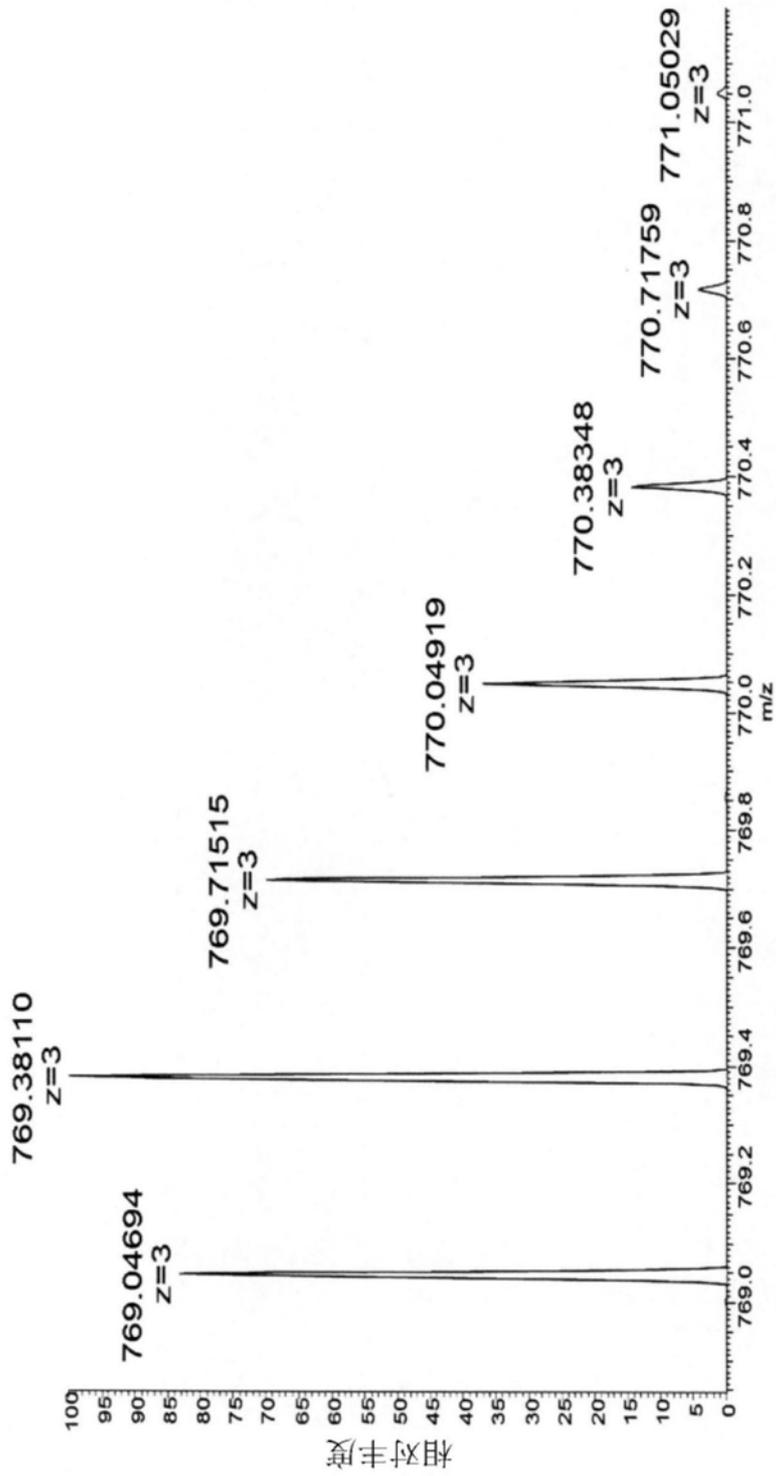


图56

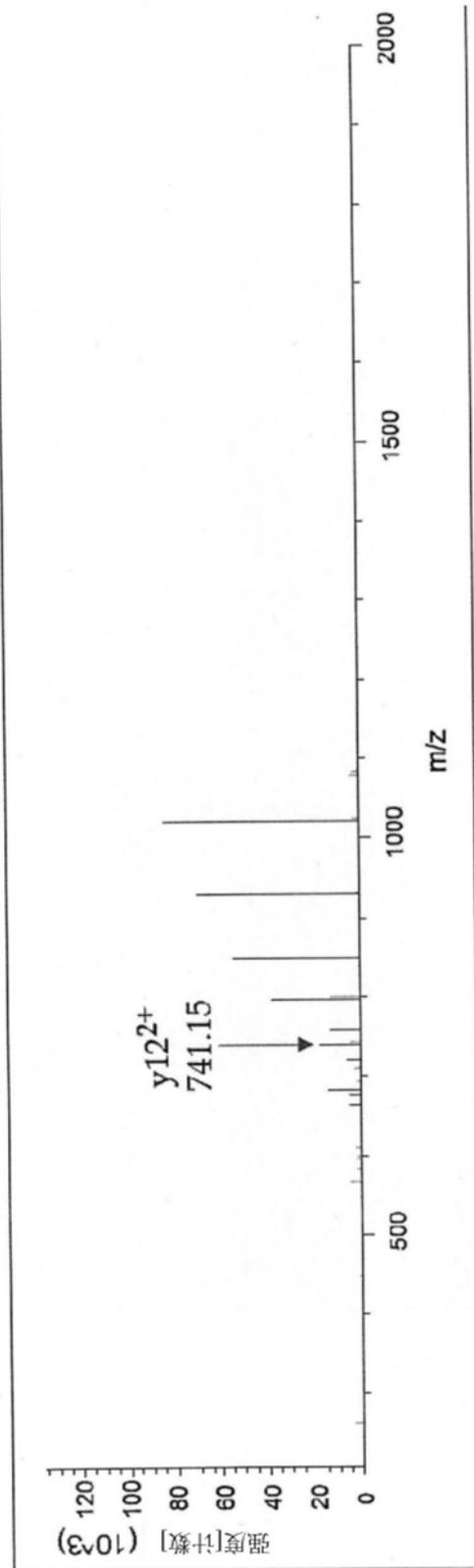


图57

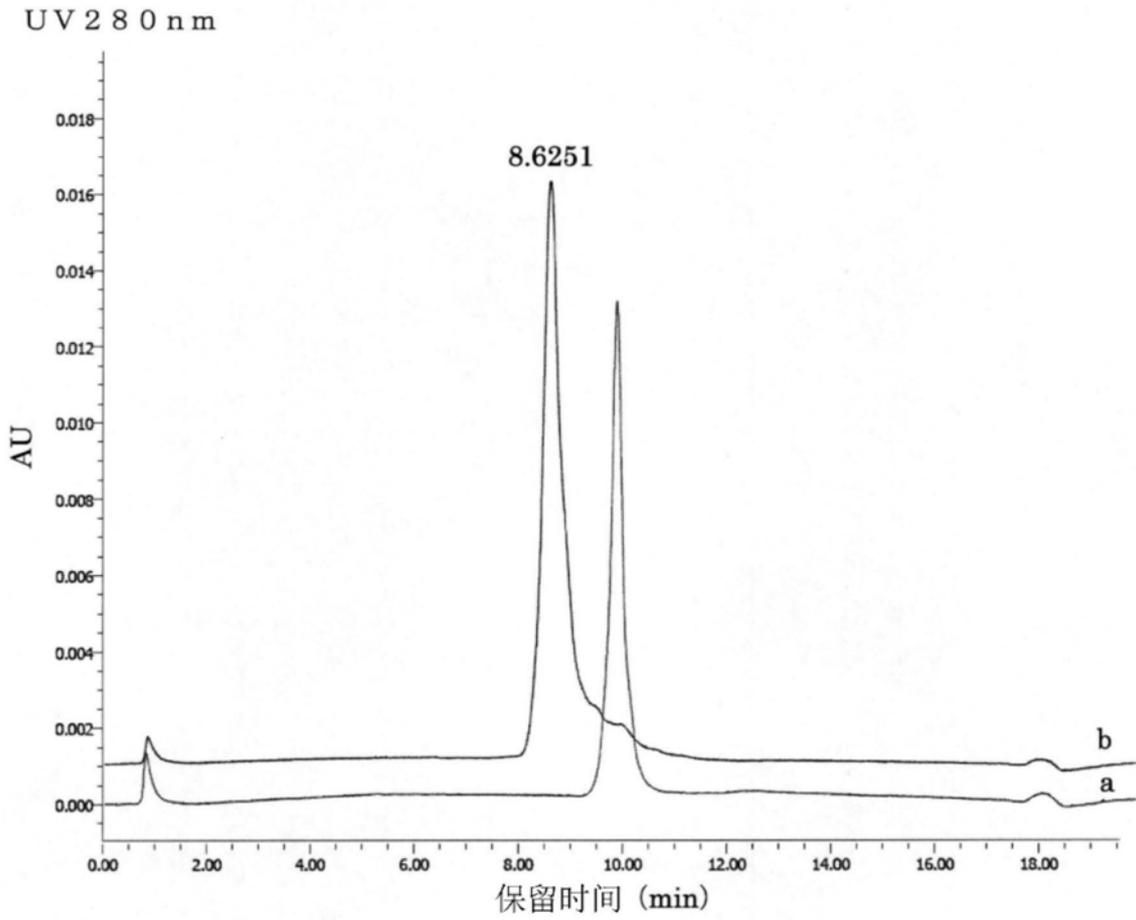


图58

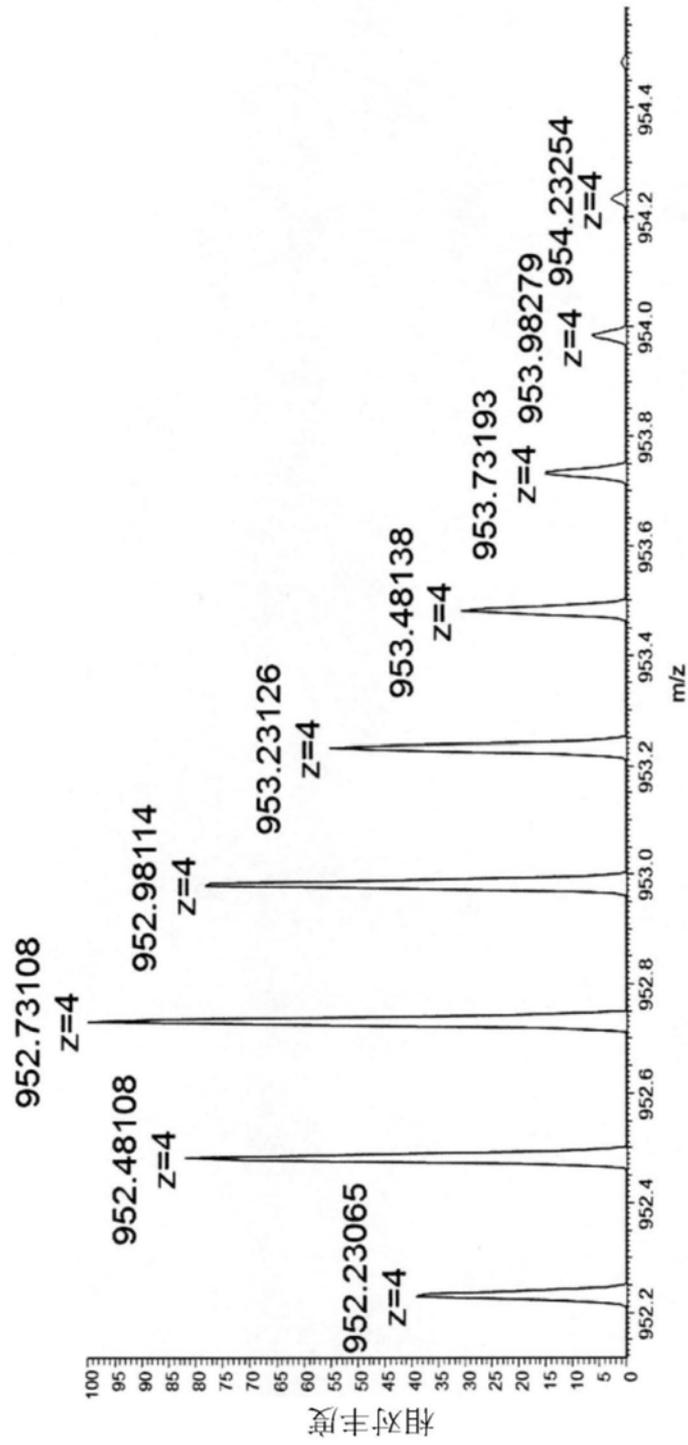


图59

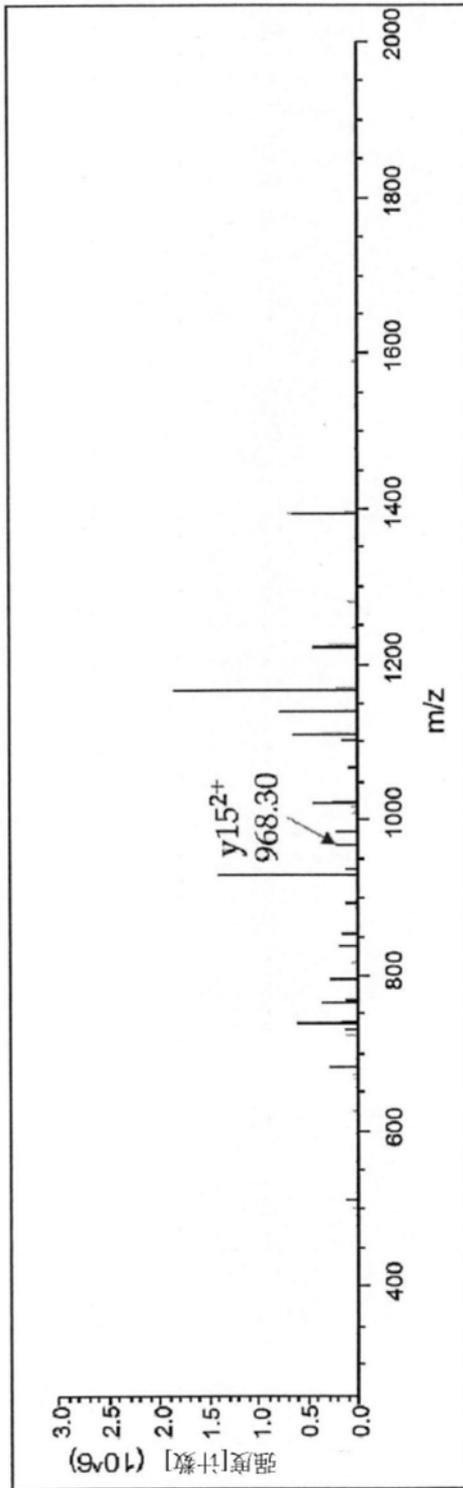


图60

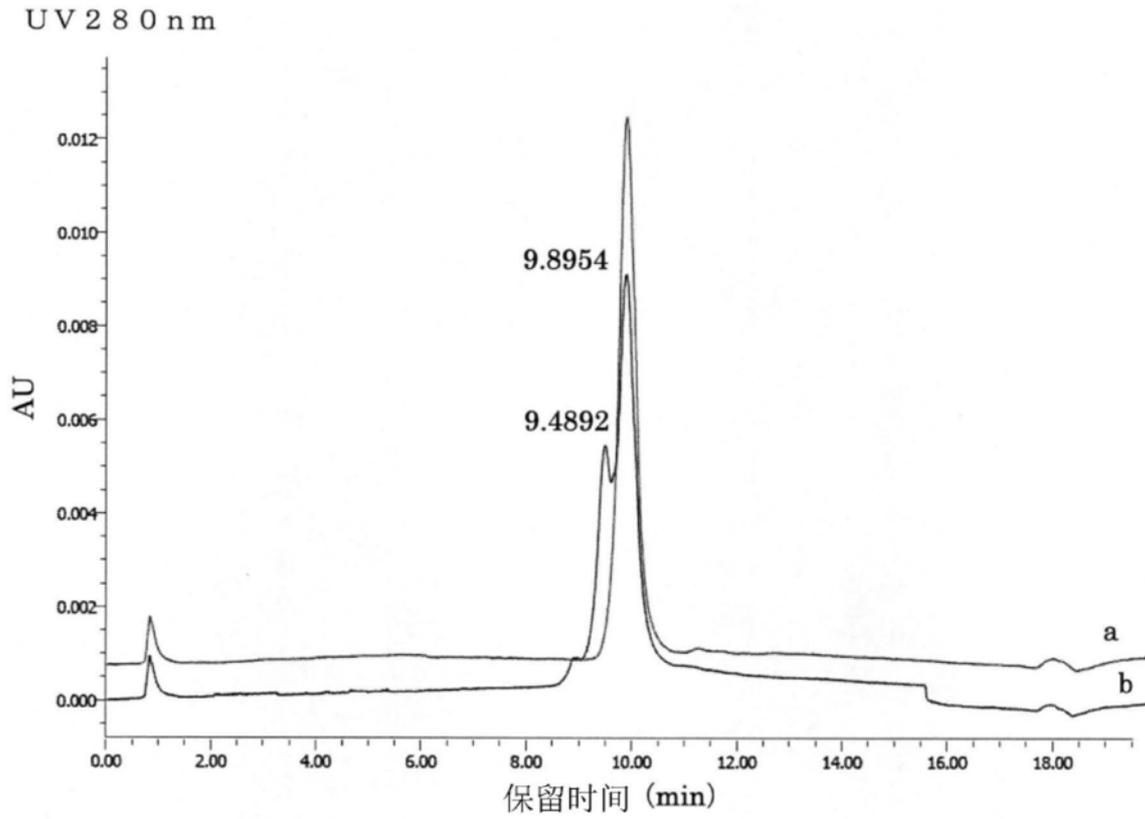


图61

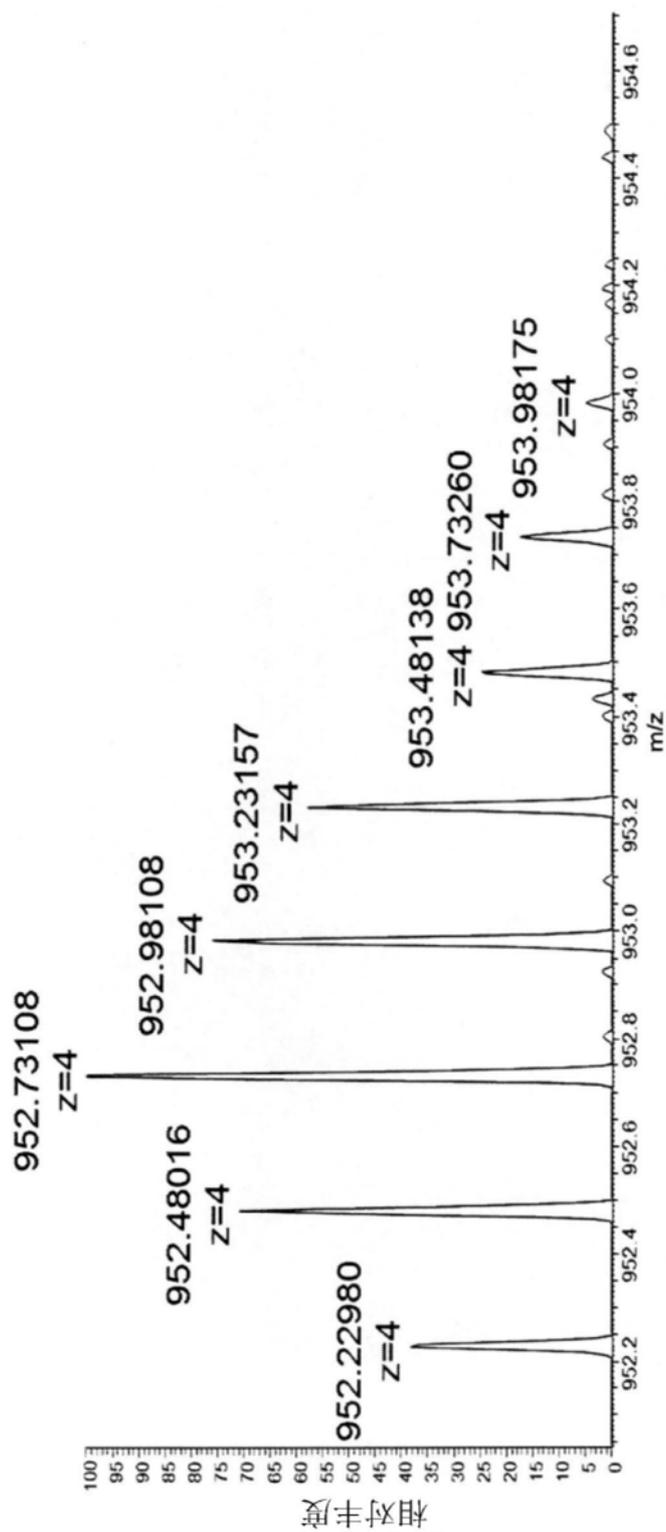


图62

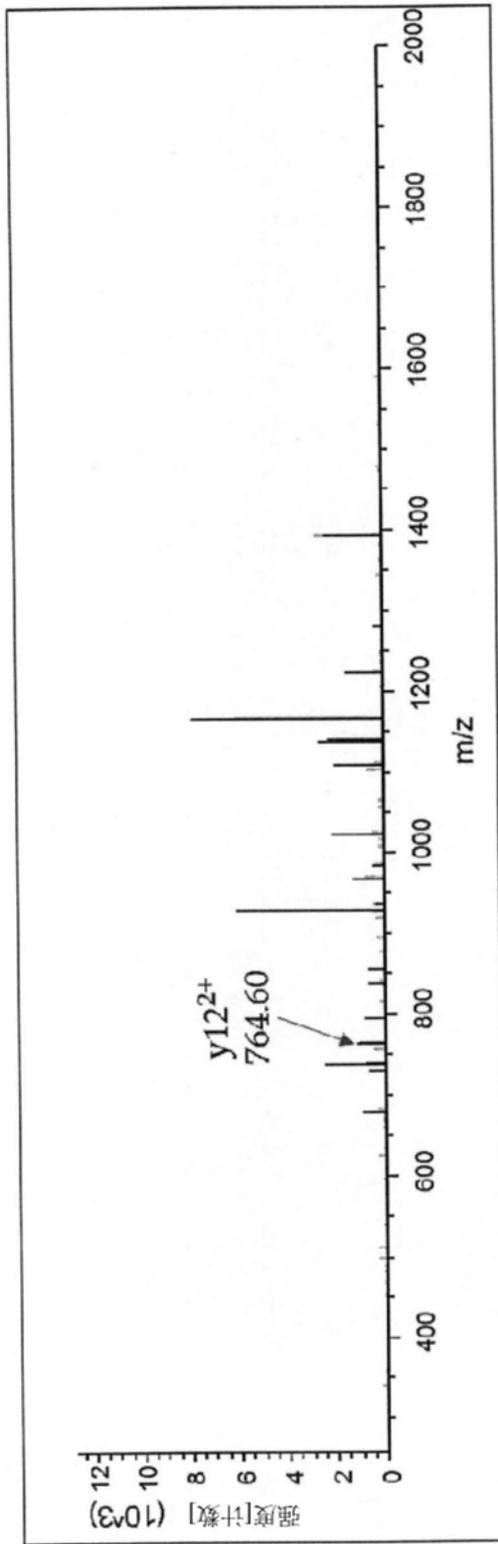


图63

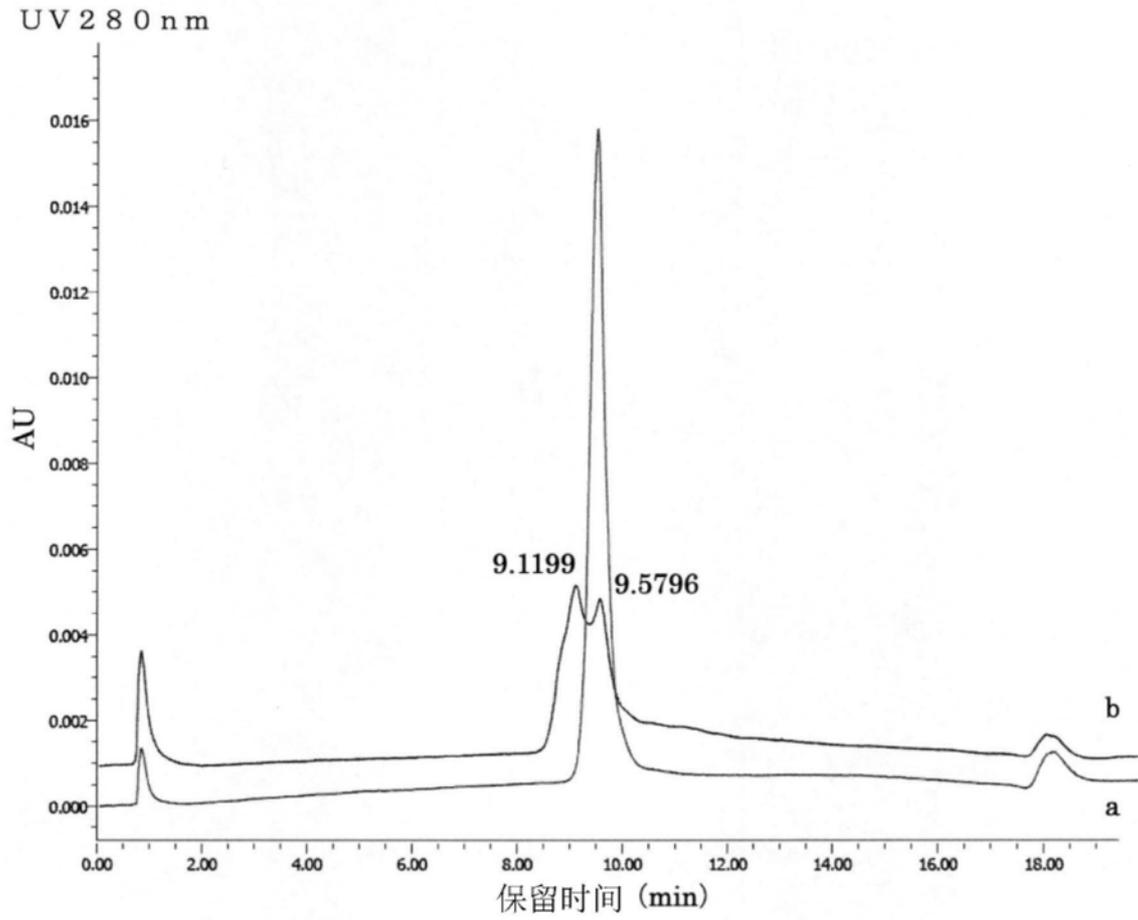


图64

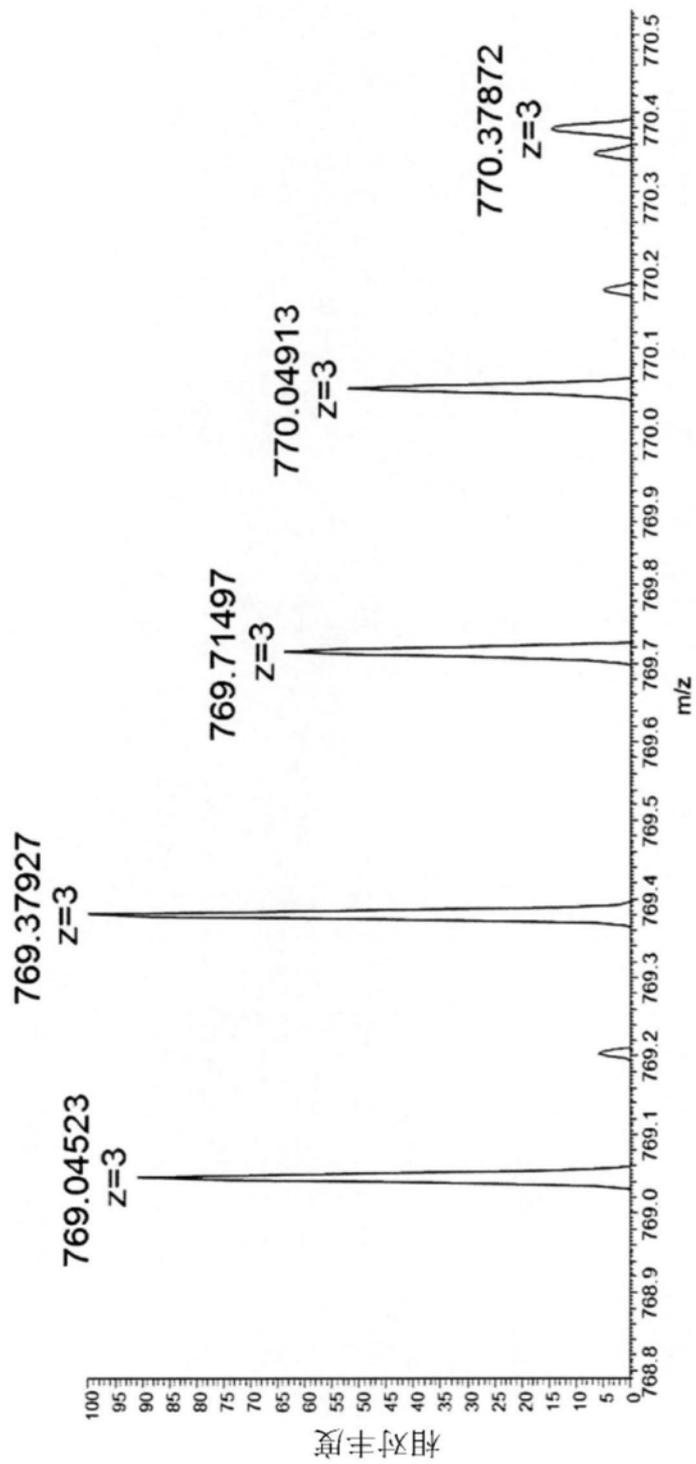


图65

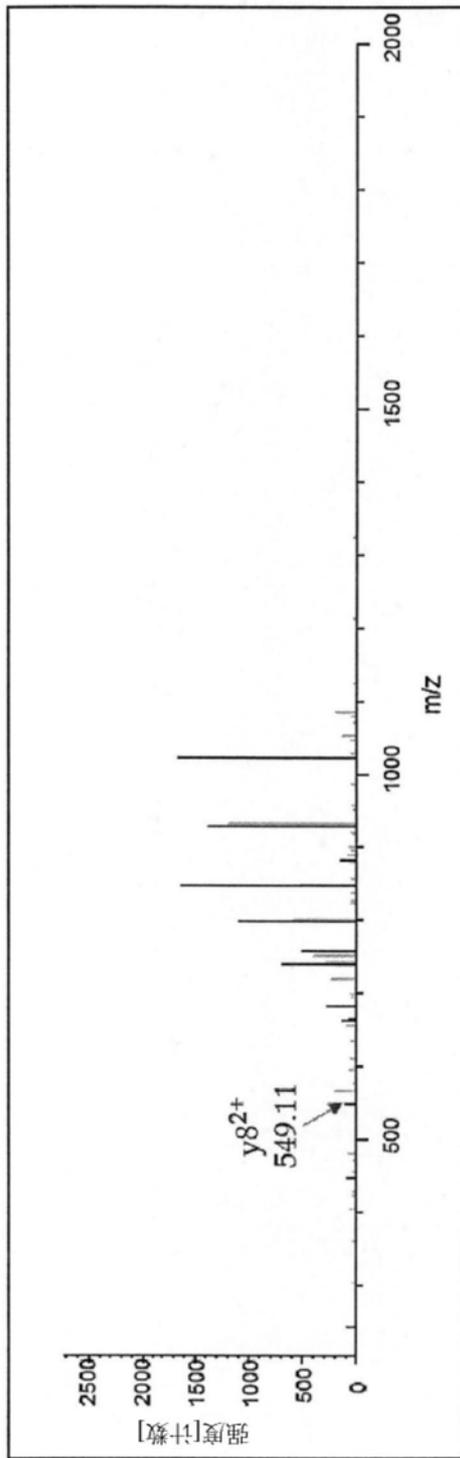


图66

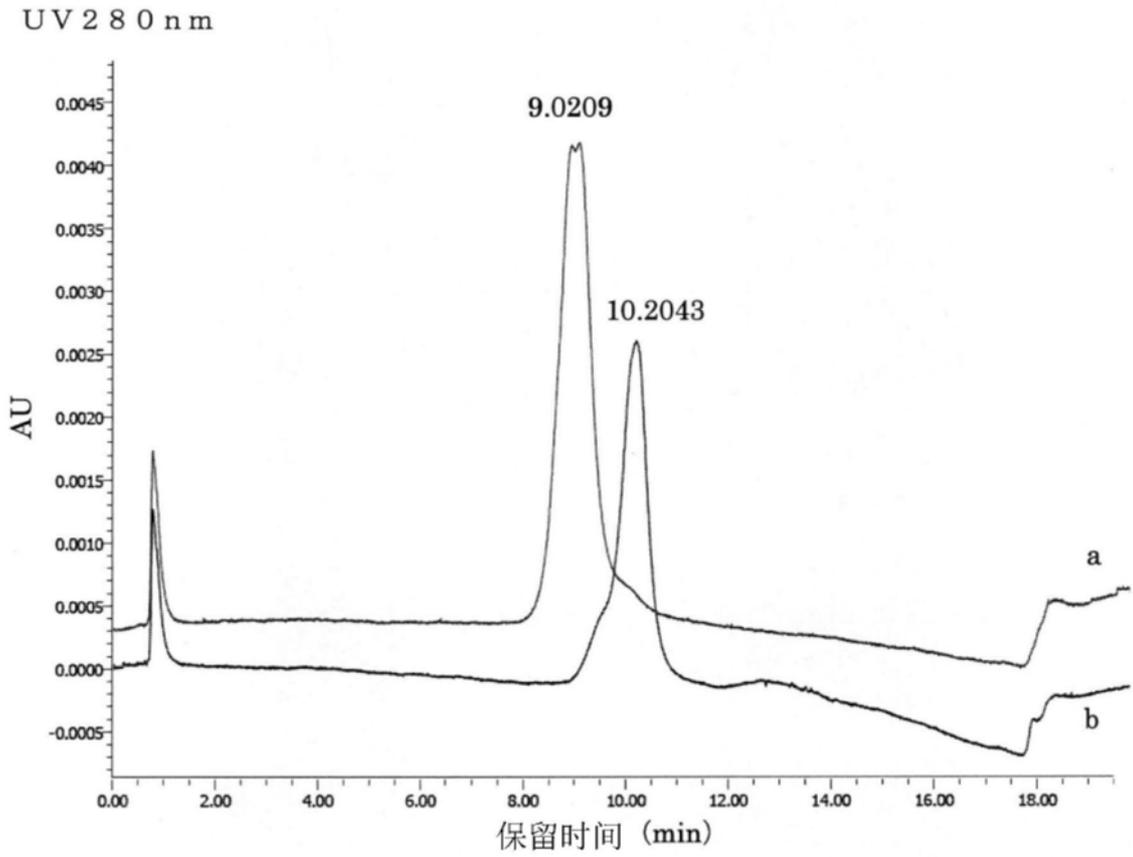


图67

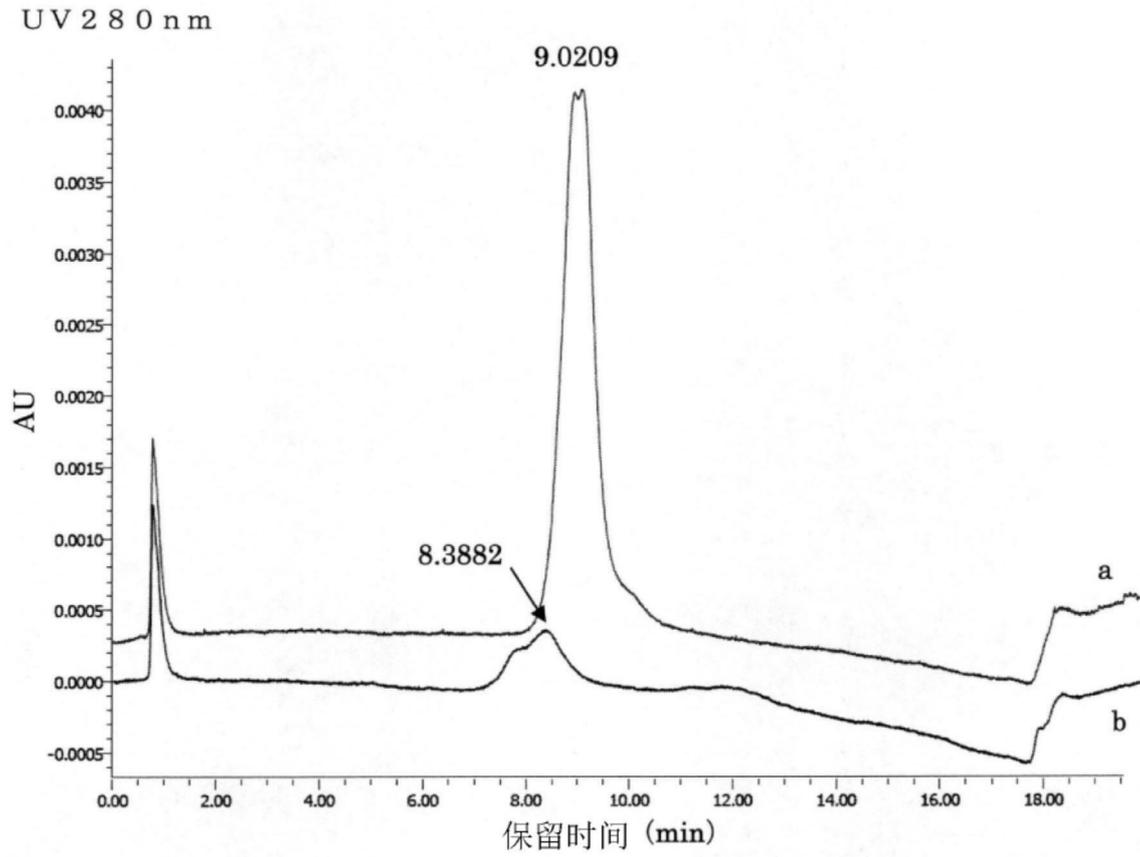


图68

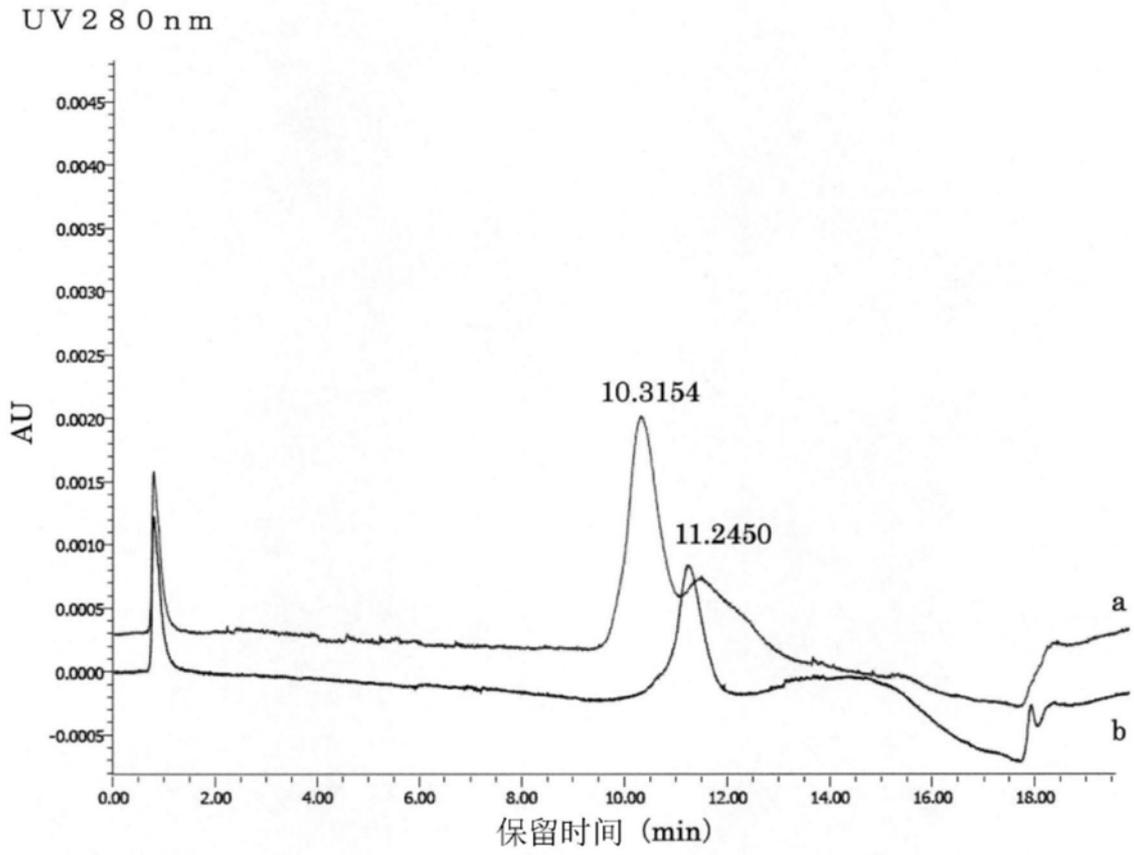


图69

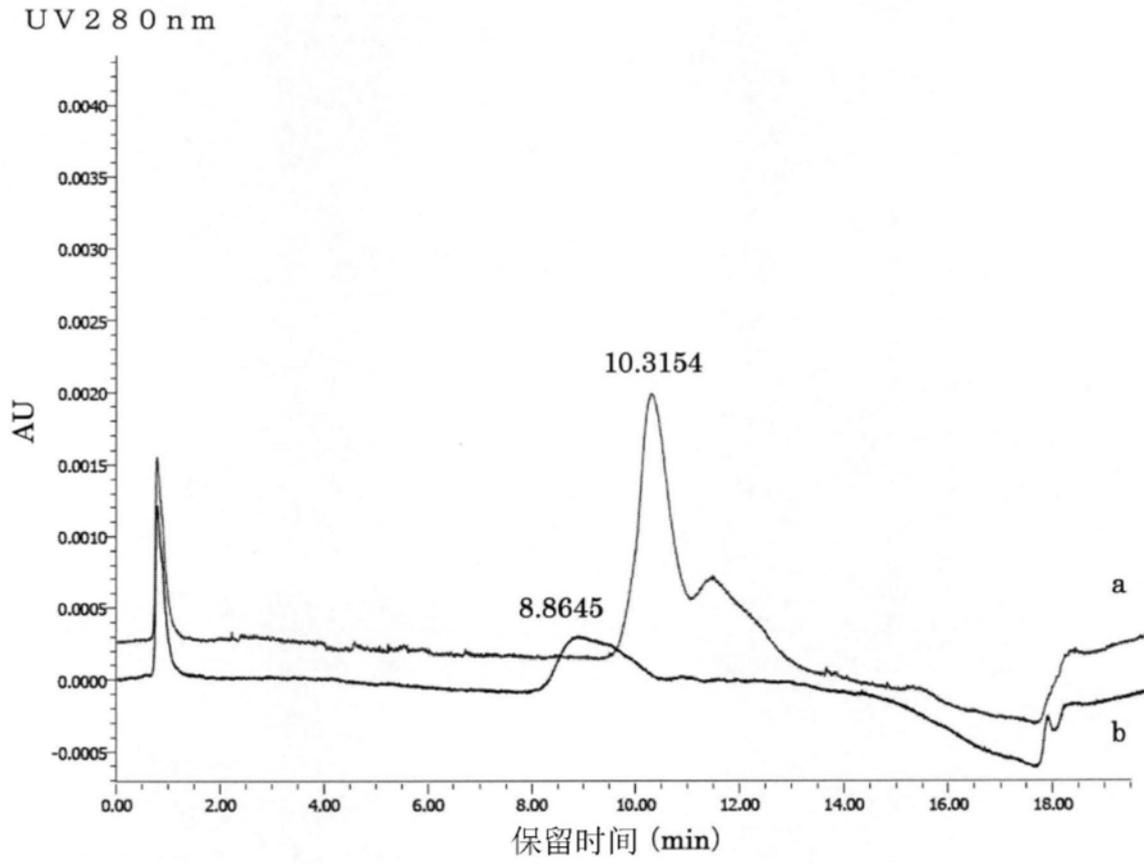


图70