(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2017-516839
(P2017-516839A)
(43)公表日　平成29年6月22日(2017.6.22)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	ZNA	4C076
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	L	4C084
A61K 47/50	(2017.01)	A61K	39/395	C	4C085
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	47/48		4C086
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	45/00		4C206

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 218 頁）　最終頁に続く

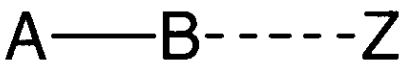
(21)出願番号　特願2016-575635 (P2016-575635)
(86)(22)出願日　平成27年3月13日 (2015.3.13)
(85)翻訳文提出日　平成28年11月9日 (2016.11.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/020458
(87)国際公開番号　WO2015/138907
(87)国際公開日　平成27年9月17日 (2015.9.17)
(31)優先権主張番号　61/953,650
(32)優先日　平成26年3月14日 (2014.3.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　515257357
カポン、ダニエル・ジェイ.
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９４０１０、ヒルズボロー、ウッドリッジ・ロード　９０
(74)代理人　100108855
弁理士　蔵田　昌俊
(74)代理人　100103034
弁理士　野河　信久
(74)代理人　100153051
弁理士　河野　直樹
(74)代理人　100179062
弁理士　井上　正
(74)代理人　100189913
弁理士　鵜飼　健

最終頁に続く

(54)【発明の名称】非ペプチジル結合を含むハイブリッド免疫グロブリン

(57)【要約】
本発明は、以下の構造の化合物
【化１】



（式中、Ａは、化合物の生物学的に活性な構造であり、Ｚは、化合物のタンパク質成分であり、そのタンパク質成分は、１つ以上のポリペプチドを含み、１つ以上のポリペプチドの少なくとも１つは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸は、（ｉ）抗体のＦｃドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）Ｆｃ受容体に結合し、（ｉｉｉ）システイン又はセレノシステインからなる群から選択される配列をＮ末端に有し、
ＢＺ間の点線は、ペプチジル結合を表し、
ＡＢ間の実線は、非ペプチジル結合を表す）
、及びその中間体ダイマー、並びに本発明の化合物を生

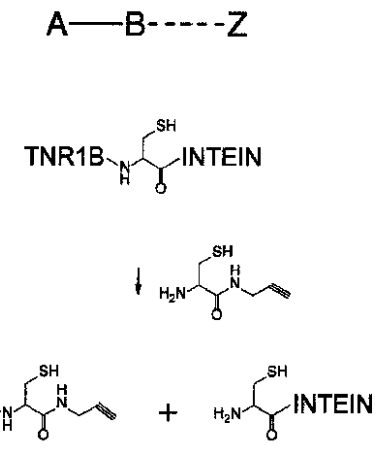
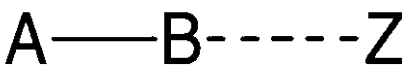
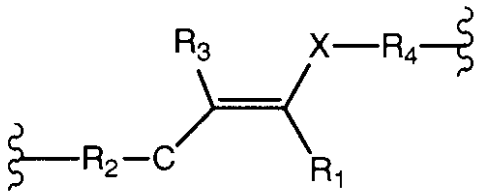


Figure 1

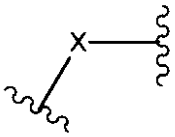
【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の構造を有する化合物
【化１】



（式中、Ａは、前記化合物の生物学的に活性な構造であり、
Ｚは、前記化合物のタンパク質成分であり、そのタンパク質成分は、１つ以上のポリペプチドを含み、前記１つ以上のポリペプチドの少なくとも１つは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸は、（ｉ）抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）Ｆ$_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）システイン又はセレノシステインをＮ末端に有し、
Ｂは、ＡとＺを連結させる化学構造であり、
ＢＺ間の点線は、ペプチジル結合を表し、
ＡＢ間の実線は、非ペプチジル結合を表す）。
【請求項２】
前記ＡＢ間の実線が、以下の構造
【化２】

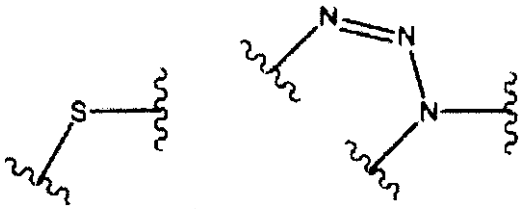


を含む非ペプチジル結合を表し、
ここで、
【化３】

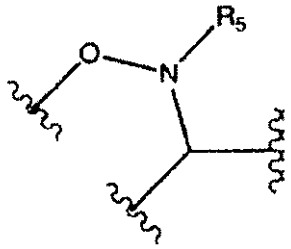


は、

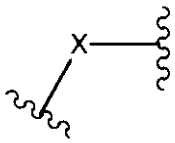
【化４】



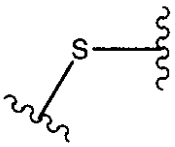
または



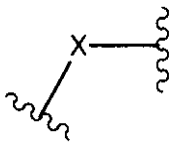
（ここで、R_5は、アルキル基又はアリール基である）
であり、
R_1は、Ｈ、又は、環状構造である付加的構造の一部であり、ここで、前記付加的環状構造は、R_1又はR_1の一部を含み、R_2又はR_2の一部、及びR_2とアルケン二重結合との間の炭素も含んでいてもよく、
ただし、
【化５】



が、
【化６】

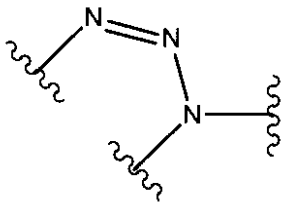


である場合、R_3は、Ｈであり、
【化７】



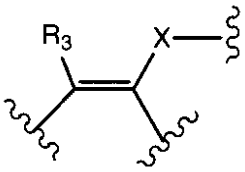
が、

【化８】



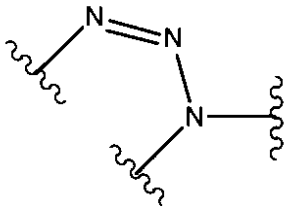
である場合、

【化９】



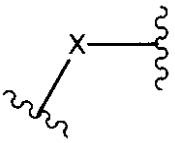
は、

【化１０】



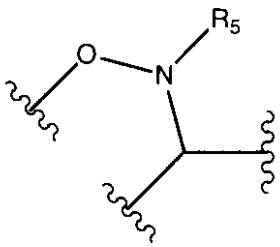
を含むトリアゾール環であり、

【化１１】



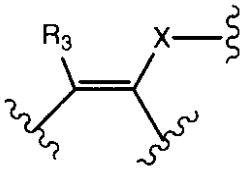
が、

【化１２】

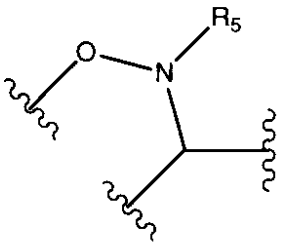


である場合、

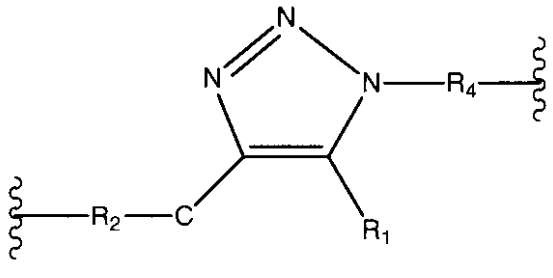
【化１３】



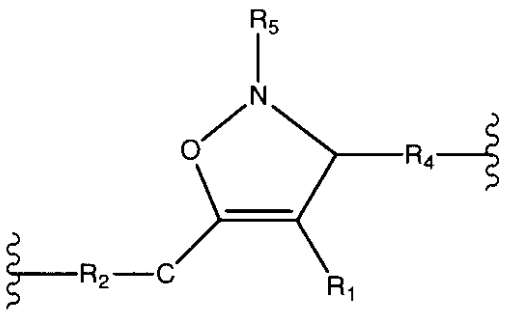
は、
【化１４】



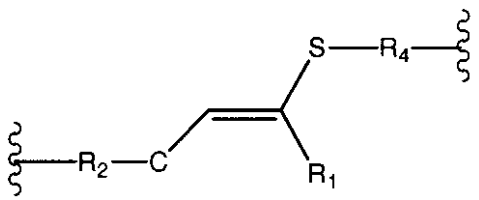
を含むＮ－アルキル又はアリール置換イソキサゾリン環であり、R_2は、Ａ又はＢの一方と
接続する有機構造を表し、R_4は、Ａ又はＢのもう一方と接続する有機構造を表す、
請求項１に記載の化合物。
【請求項３】
前記ＡＢ間の実線が、以下の構造
【化１５】



,

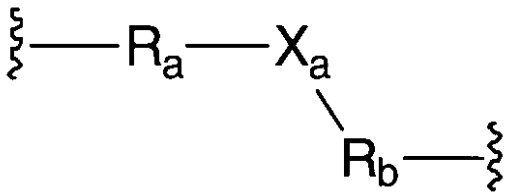


, または

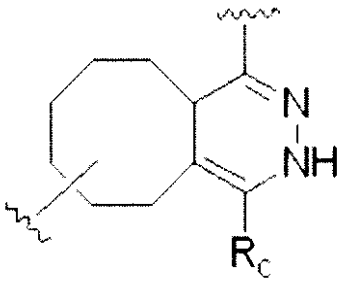


を含む非ペプチジル結合を表し、
ここで、R_1は、Ｈ、又は、環状構造である付加的構造の一部であり、ここで、前記付加的環状構造は、R_1又はR_1の一部を含み、R_2又はR_2の一部、及びR_2とアルケン二重結合との間の炭素も含んでいてもよい、
請求項２に記載の化合物。
【請求項４】
R_2が、
ｉ）炭素－窒素結合又は炭素－硫黄結合によってＡに結合している、
ｉｉ）炭素－窒素結合によってＡに結合している、

ｉｉｉ）アミド結合である炭素－窒素結合によってＡに結合している、
ｉｖ）生物学的に不安定な結合によってＡに結合している、
ｖ）ＡのＣ末端アミノ酸とＢにおけるアミノ基との間のアミド結合によってＡに結合している、
ｖｉ）ＡのＣ末端アミノ酸とＢにおけるアミノ基との間のアミド結合によってＡに結合しており、末端アミノ酸がシステインである、
ｖｉｉ）炭素－硫黄結合によってＡに結合している、
ｖｉｉｉ）R_2と遊離チオールとの間で形成される炭素－硫黄結合によってＡに結合している、又は
ｉｘ）スクシンイミド－硫黄結合によってＡに結合している、
請求項２又は３に記載の化合物。
【請求項５】
Ｂが、分枝残基を含み、それぞれ前記分枝残基による非ペプチジル結合によって２つ以上のＡに連結している、請求項２～４の何れか１項に記載の化合物。
【請求項６】
前記ＡＢ間の実線が、以下の構造
【化１６】

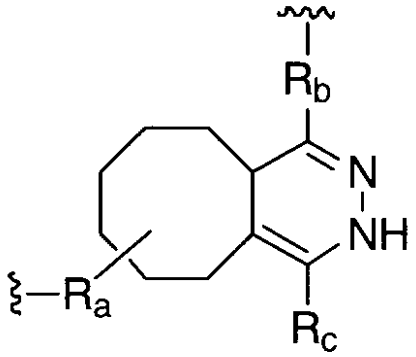


を含む非ペプチジル結合を表し、
ここで、X_aは、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造であり、R_aは、Ａ又はＢの一方と接続する有機構造を表し、R_bは、Ａ又はＢのもう一方と接続する有機構造を表す、
請求項１に記載の化合物。
【請求項７】
X_aが、以下の構造
【化１７】



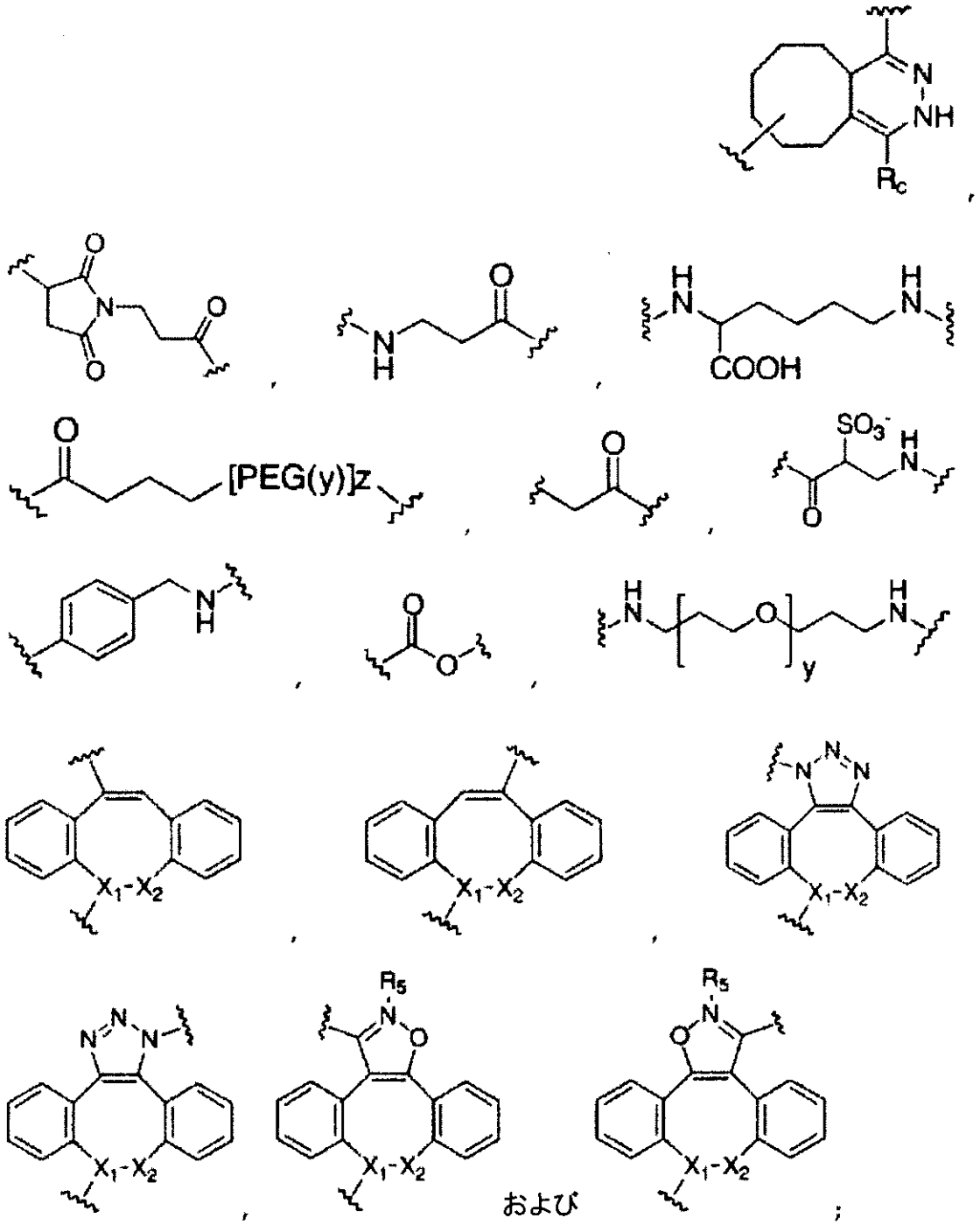
（ここで、R_cは、Ｈ、アルキル若しくはアリールである）
又はその互変異性体を有する、
請求項６に記載の化合物。
【請求項８】
R_aが、前記シクロオクタンに接続し、R_bが、前記ジヒドロピリダジンに接続している、
請求項６又は７に記載の化合物。
【請求項９】
前記ＡＢ間の実線が、以下の構造

【化１８】



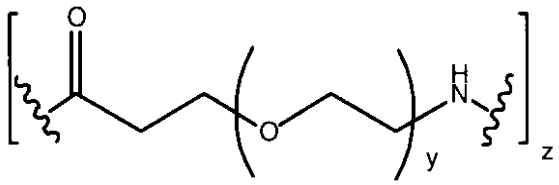
（ここで、R_cは、Ｈ、アルキル又はアリールである）
又はその互変異性体を含む非ペプチジル結合を表す、
請求項６～８の何れか１項に記載の化合物。
【請求項１０】
R_a及びR_bが独立に、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

【化１９】



（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）
からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の

【化２０】



である、
請求項６～９の何れか１項に記載の化合物。
【請求項１１】
R_a又はR_bが、
ｉ）炭素－窒素結合又は炭素－硫黄結合によってＡに結合している、
ｉｉ）炭素－窒素結合によってＡに結合している、
ｉｉｉ）アミド結合である炭素－窒素結合によってＡに結合している、
ｉｖ）生物学的に不安定な結合によってＡに結合している、
ｖ）ＡのＣ末端アミノ酸とＢにおけるアミノ基との間のアミド結合によってＡに結合している、
ｖｉ）ＡのＣ末端アミノ酸とＢにおけるアミノ基との間のアミド結合によってＡに結合しており、前記末端アミノ酸がシステインである、
ｖｉｉ）炭素－硫黄結合によってＡに結合している、
ｖｉｉｉ）R_2と遊離チオールとの間で形成される炭素－硫黄結合によってＡに結合している、
ｉｘ）スクシンイミド－硫黄結合によってＡに結合している、
ｘ）分枝残基を含む、又は
ｘｉ）分枝残基によって２つ以上のＡに結合している、
請求項６～１０の何れか１項に記載の化合物。
【請求項１２】
Ａが、
ｉ）ある疾患を患う対象の治療に承認された薬である化合物の構造を含む、
ｉｉ）１０００ダルトン未満の分子量を有する有機化合物の構造、ＤＮＡアプタマー、ＲＮＡアプタマー、オリゴヌクレオチド、若しくは生物学的に活性であるタンパク質を含む、
ｉｉｉ）第１級若しくは第２級アミンを含む、
ｉｖ）第１級若しくは第２級アミンによってＢに連結している、
ｖ）アリピプラゾール若しくはオセルタミビルである、
ｖｉ）第２級アミンを含む、
ｖｉｉ）呼吸器薬、抗喘息薬、鎮痛薬、抗うつ薬、抗狭心症薬、抗不整脈薬、抗高血圧症薬、抗糖尿病薬、抗ヒスタミン薬、抗感染症薬、抗生物質、抗炎症薬、抗パーキンソン病薬、抗精神病薬、解熱薬、抗潰瘍薬、注意欠陥多動性障害（ＡＤＨＤ）薬、中枢神経興奮薬、充血除去薬、若しくは精神刺激薬である、
ｖｉｉｉ）アルプレノロール、アセブトロール、アミデフリン、アミネプチン、アモスラロール、アモキサピン、アンフェタミニル、アテノロール、アトモキセチン、バロフロキサシン、バメタン、ベフノロール、ベナゼプリル、ベンフルオレクス、ベンゾクタミン、ベタヒスチン、ベタキソロール、ベバントロール、ビフェメラン、ビソプロロール、ブリンゾラミド、ブフェニオド、ブテタミン、カミロフィン、カラゾロール、カルチカイン、カルベジロール、セファエリン、シプロフロキサシン、クロザピン、クロベンゾレクス、クロルプレナリン、シクロペンタミン、デラプリル、デメキシプチリン、デノパミン、デシプラミン、デスロラタジン、ジクロフェナク、ジメトフリン、ジオキサドロール、ドブタミン、ドペキサミン、ドリペネム、ドルゾラミド、ドロプレニルアミン、デュロキセチ

ン、エルトプラジン、エナラプリル、エノキサシン、エピネフリン、エルタペネム、エサプラゾール、エスモロール、エトキサドロール、ファスジル、フェンジリン、フェネチリン、フェンフルラミン、フェノルドパム、フェノテロール、フェンプロポレクス、フレカイニド、フルオキセチン、フォルモテロール、フロバトリプタン、ガボキサドール、ガレノキサシン、ガチフロキサシン、グレパフロキサシン、ヘキソプレナリン、イミダプリル、インダルピン、インデカイニド、塩酸インデロキサジン、イソクスプリン、イスプロニクリン、ラベタロール、ランジオロール、ラパチニブ、レボファセトペラン、リシノプリル、ロメフロキサシン、ロトラフィバン、マプロチリン、メカミラミン、メフロキン、メピンドロール、メロペネム、メタプラミン、メタプロテレノール、メトキシフェナミン、右旋性メチルフェニデート、メチルフェニデート、メチプラノロール、メトプロロール、ミトキサントロン、ミバゼロール、モエキシプリル、モプロロール、モキシフロキサシン、ネビボロール、ニフェナロール、ニプラジロール、ノルフロキサシン、ノルトリプチリン、ニリドリン、オランザピン、オキサムニキン、オクスプレノロール、オキシフェドリン、パロキセチン、ペルヘキシリン、フェンメトラジン、フェニレフリン、フェニルプロピルメチラミン、フォレドリン、ピシロレクス、ピメチリン（pimethylline）、ピンドロール、ピペミド酸、ピリドカイン、プラクトロール、プラドフロキサシン、プラミペキソール、プラミベリン、プレナルテロール、プレニラミン、プリロカイン、プロカテロール、プロネタロール、プロパフェノン、プロプラノロール、プロピルヘキセドリン、プロトキロール、プロトリプチリン、プソイドエフェドリン、レボキセチン、ラサギリン、（ｒ）－ラサギリン、レピノタン、レプロテロール、リミテロール、リトドリン、サフィナミド、サルブタモール／アルブテロール、サルメテロール、サリゾタン、セルトラリン、シロドシン、ソタロール、ソテレノール、スパルフロキサシン、スピラプリル、スルフィナロール、シネフリン、タムスロシン、テバニクリン（tebanicline）、チアネプチン、チロフィバン、トレトキノール、トリメタジジン、トロキシピド、バレニクリン、ビルダグリプチン、ビロキサジン、ビキジル、若しくはキサモテロールである、

ｉｘ）生物学的に活性であるタンパク質を含む、

ｘ）分泌タンパク質を含む、

ｘｉ）タンパク質の細胞外ドメインを含む、

ｘｉｉ）標的結合活性を有する程度に生物学的に活性である、

ｘｉｉｉ）独立にフォールディングするタンパク質又はその一部である、

ｘｉｖ）グリコシル化タンパク質である、

ｘｖ）鎖内ジスルフィド結合を含む、

ｘｖｉ）サイトカインを結合している、

ｘｖｉｉ）ＴＮＦαであるサイトカインに結合している、

ｘｖｉｉｉ）心房性ナトリウム利尿ペプチド（ＡＮＰ）、カルシトニン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（ＣＲＨ）、エンドセリン、エクセナチド、胃抑制ペプチド（ＧＩＰ）、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）、グルカゴン様ペプチド－２（ＧＬＰ－２）、ＧＬＰ－１若しくはＧＬＰ－２の類似体、グルカゴン血管作動性腸管ペプチド（ＧＶＩＰ）、グレリン、ペプチドＹＹ若しくはセクレチン、又はそれらの一部分を含む、

ｉｘｘ）ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＥＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧという配列における、ある一連の連続アミノ酸を含む、

ｘｘ）抗体のＦａｂ若しくはＦａｂ’の重鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である、少なくとも１つの一連の連続アミノ酸を含む、

ｘｘｉ）抗体のＦａｂ若しくはＦａｂ’の軽鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である、少なくとも１つの一連の連続アミノ酸を含む、

ｘｘｉｉ）抗体の少なくとも１つのＦａｂ若しくはＦａｂ’、又は少なくとも１つのＦａｂ若しくはＦａｂ’の一部分を含む、

ｘｘｉｉｉ）抗体のＦａｂ－１若しくはＦａｂ’１又はその一部分を含む、

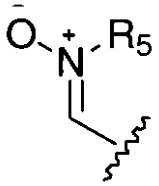
ｘｘｉｖ）抗体のＦａｂ－２若しくはＦａｂ’２又はその一部分を含む、

ｘｘｖ）抗体の２つのＦａｂ又はＦａｂ’の手を含む、

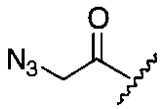
ｘｘｖｉ）単鎖抗体に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である、少なくとも１つの一連の連続アミノ酸を含む、或いは
ｘｘｖｉｉ）ＴＮＦα受容体に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である、少なくとも１つの一連の連続アミノ酸を含む、
請求項１～１１の何れか１項に記載の化合物。
【請求項１３】
以下の構造を有する化合物
【化２１】



［式中、Ｚは、前記化合物のタンパク質成分であり、そのタンパク質成分は、１つ以上のポリペプチドを含み、前記１つ以上のポリペプチドの少なくとも１つは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸は、（ｉ）抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）Ｆ$_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）システイン又はセレノシステインをＮ末端に有し、
Ｂは、Ｒ$_a$とＣを連結させる化学構造であり、
ＢＺ間の点線は、ペプチジル結合を表し、
Ｌは、－Ｎ$_3$、アルキン、
【化２２】

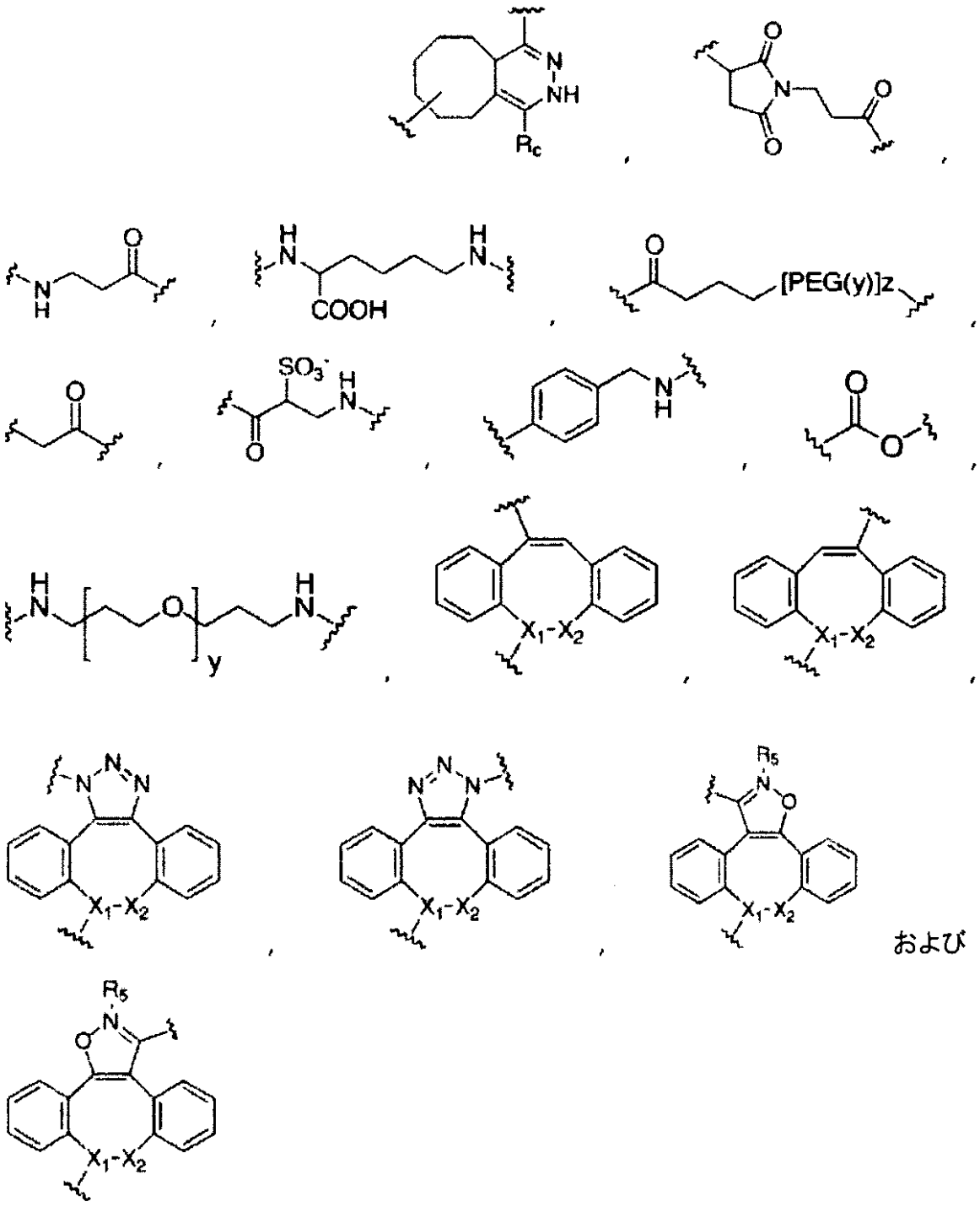


基（ここで、Ｒ$_5$は、アルキル基又はアリール基である）、
【化２３】



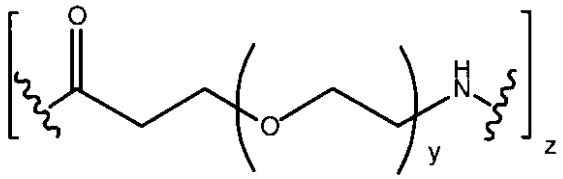
基、テトラジン、及びｔｒａｎｓ－シクロオクテンからなる群から選択され、
Ｒ$_a$は、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$アルキル、Ｃ$_3$～Ｃ$_{10}$シクロアルカン、Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$アルケン、Ｃ$_5$～Ｃ$_{10}$シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、Ｃ$_2$～Ｃ$_5$アシル、Ｃ$_2$～Ｃ$_5$アシルアミノ、Ｃ$_2$～Ｃ$_5$アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

【化２４】



（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）
からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の

【化２５】

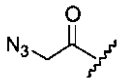


である］。

【請求項１４】

Ｌが、－Ｎ$_3$、

【化２６】

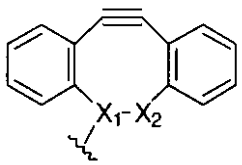


アルキン、テトラジン、又はｔｒａｎｓ－シクロオクテンである、
請求項１３に記載の化合物。

【請求項１５】

Ｌが、アルキンであり、前記アルキンが、プロパルギル基若しくはシクロオクチン基である、又は以下の構造

【化２７】

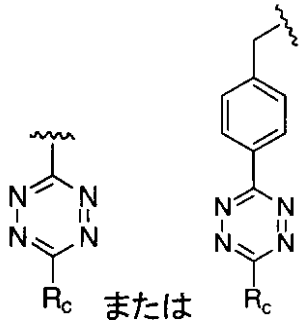


（ここで、Ｘ$_1$は、ＣＨ若しくはＮであり、Ｘ$_2$は、ＣＨ$_2$若しくはカルボニル基であり、Ｒ５は、アリール基若しくはアルキル基である）
を有する、
請求項１４に記載の化合物。

【請求項１６】

Ｌが、テトラジンであり、前記テトラジンが、以下の構造

【化２８】

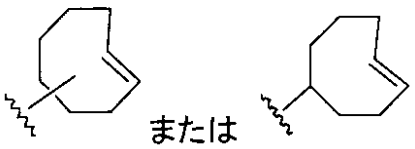


（ここで、Ｒｃは、Ｈ、アルキル又はアリールである）
を有する、請求項１４に記載の化合物。

【請求項１７】

Ｌが、ｔｒａｎｓ－シクロオクテンであり、前記ｔｒａｎｓ－シクロオクテンが、以下の構造

【化２９】



を有する、請求項１４に記載の化合物。

【請求項１８】

ＲａまたはＲｂが、

ｉ）［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基を含む有機構造である、

ｉｉ）ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、若しくは多糖基を含む有機構造である、

ｉｉｉ）C_1～C_4アルキル基を含む有機構造である、

ｉｖ）スクシンイミドを含む有機構造である、

ｖ）アミンを含む有機構造である、

ｖｉ）スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、若しくはアジポイルを含む有機構造である、

ｖｉｉ）マロニルを含む有機構造である、

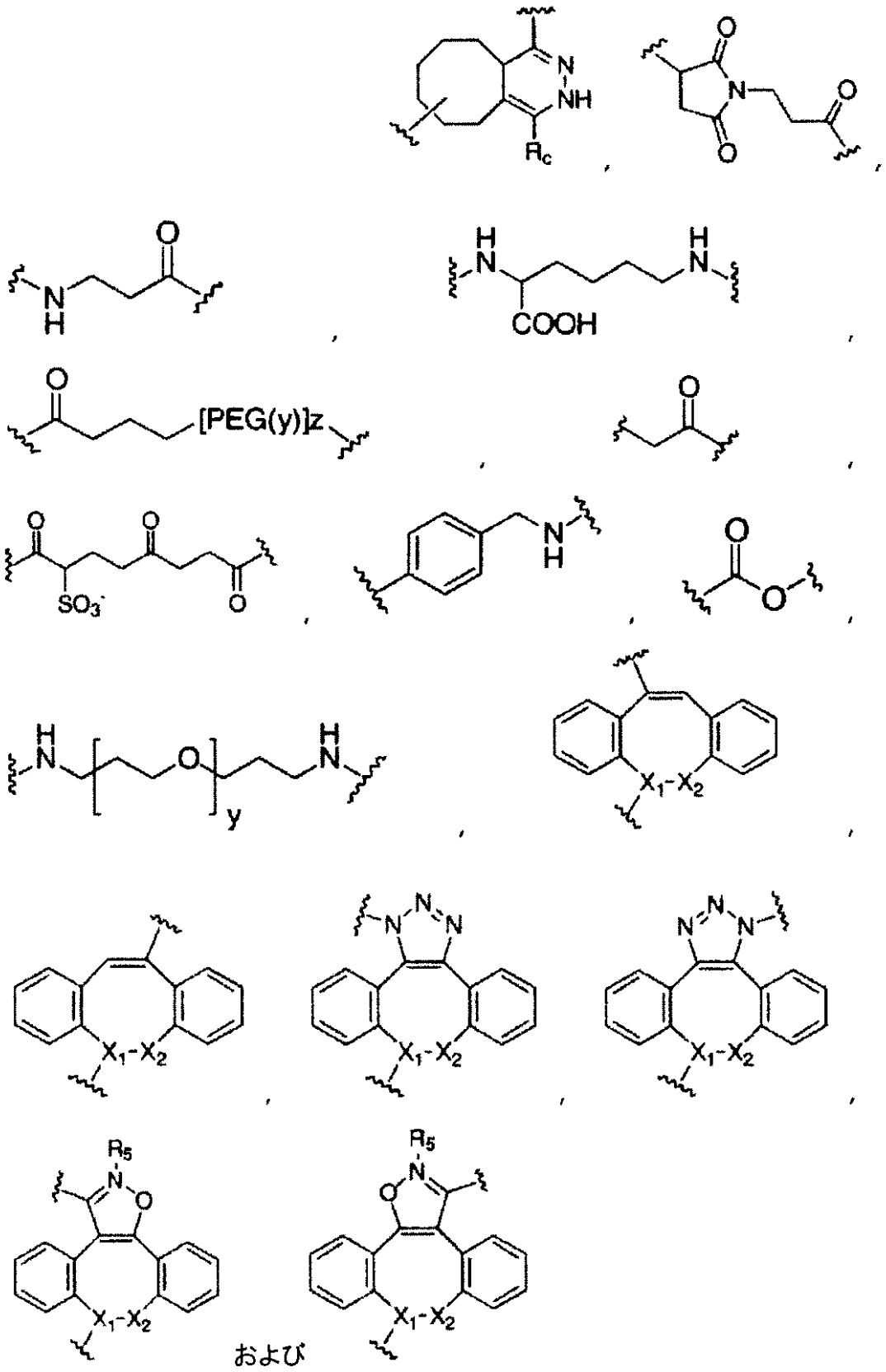
ｖｉｉｉ）アミノ酸を含む有機構造である、

ｉｘ）システインを含む有機構造である、

ｘ）リシンを含む有機構造である、

ｘｉ）［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

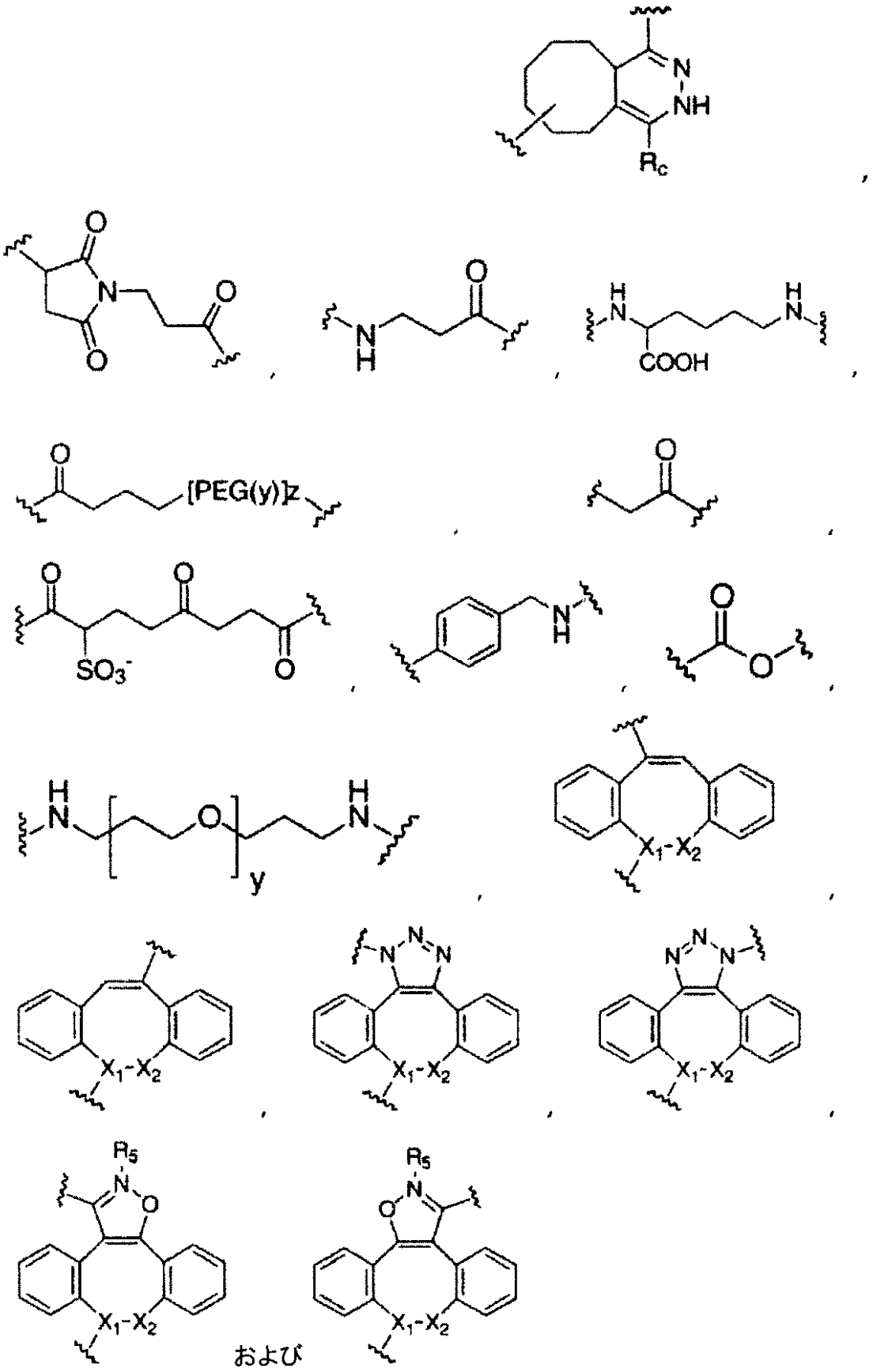
【化３０】



からなる群から選択される３個の部分の鎖からなる有機構造である、
ｘｉｉ）［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸

－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

【化３１】



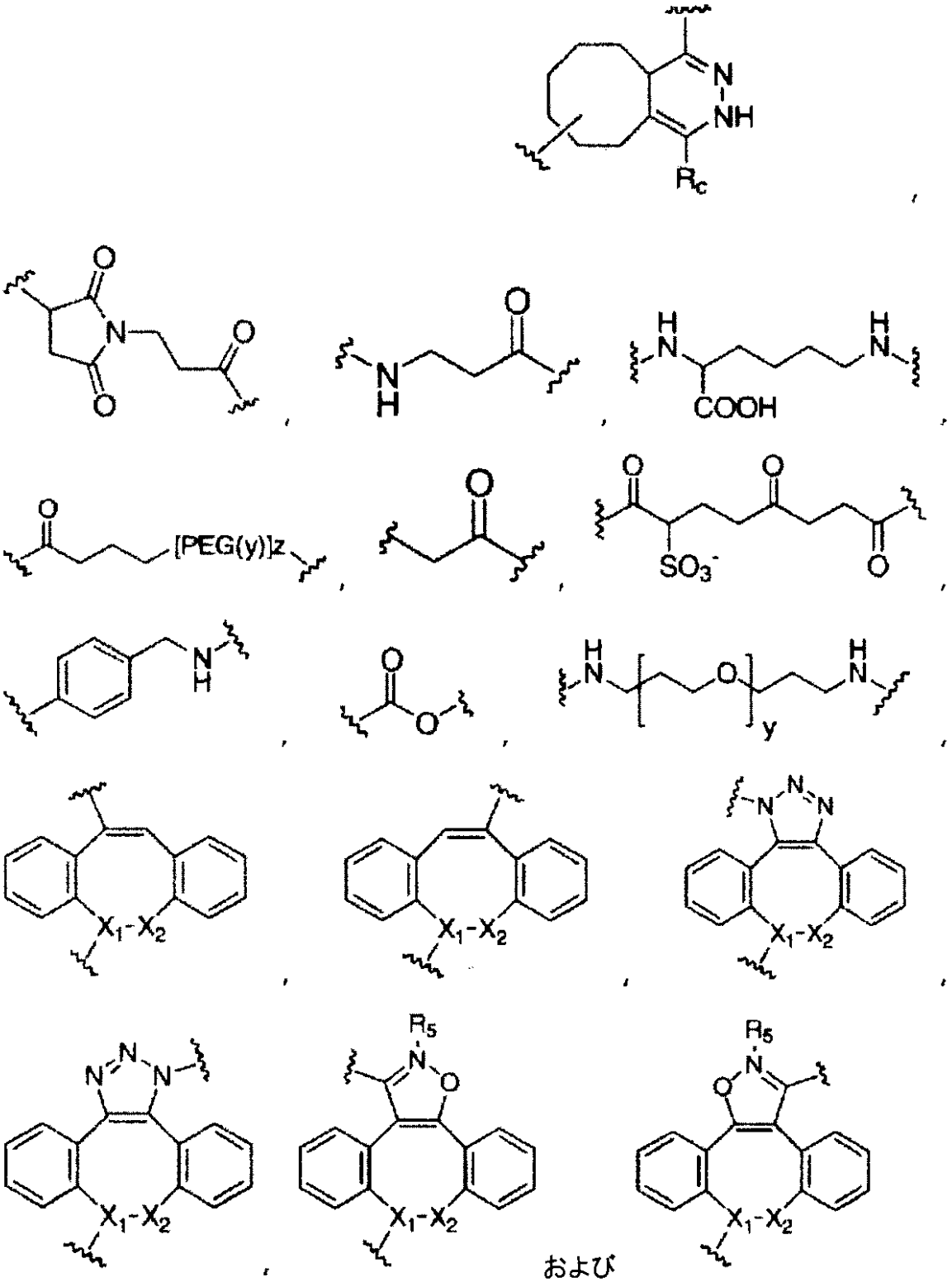
および

からなる群から選択される４個の部分の鎖からなる有機構造である、

ｘｉｉｉ）［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリ

オール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

【化３２】

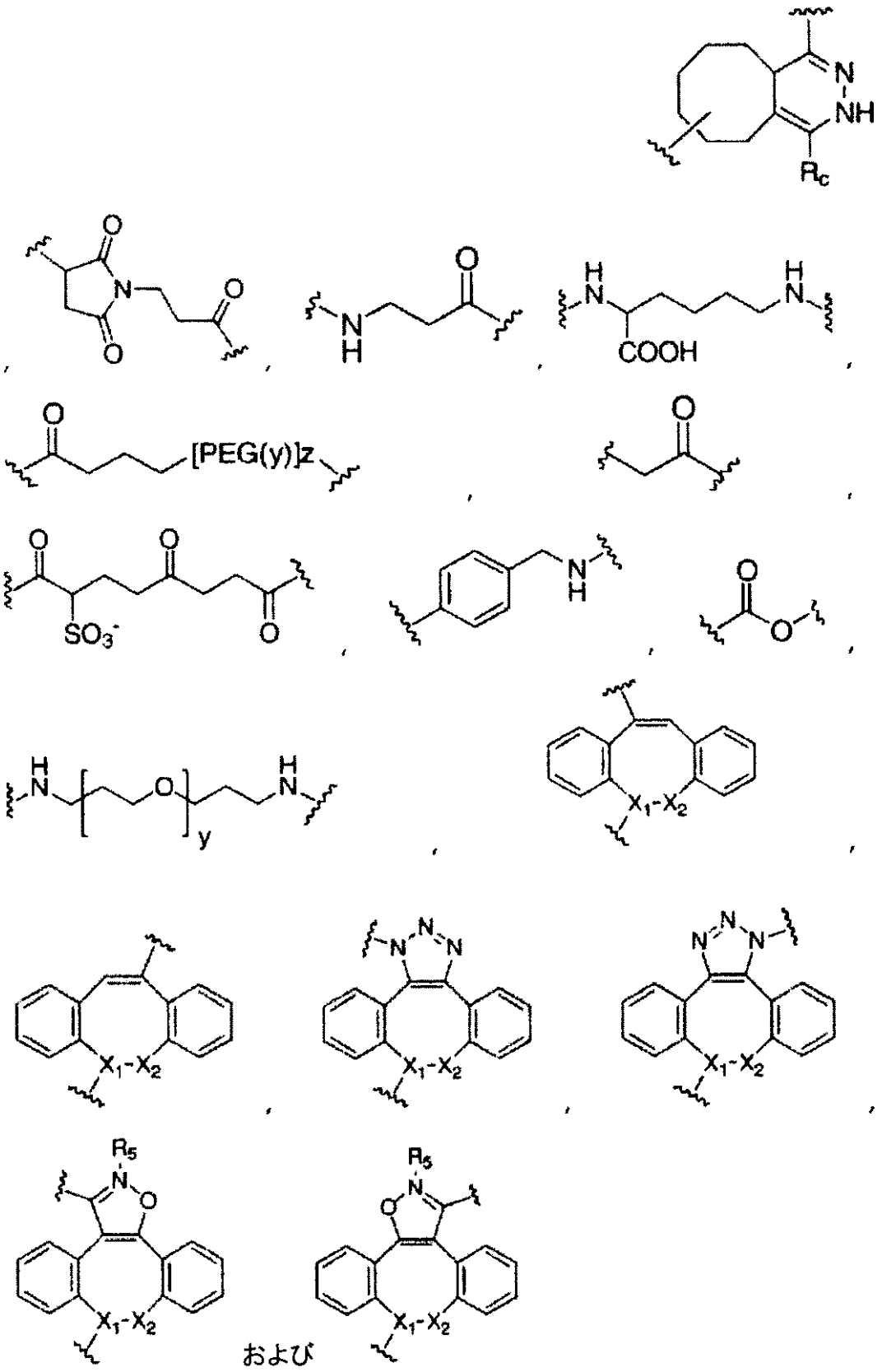


および

からなる群から選択される５個の部分の鎖からなる有機構造である、
ｘｉｖ）リシンに結合している［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基を含む、
ｘｖ）スクシンイミド基に結合しているC_1～C_4アシル基を含む、
ｘｖｉ）C_1～C_4アシルに結合しているリシンを含む、
ｘｖｉｉ）グルタリルに結合している［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基を含む、
ｘｖｉｉｉ）［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、C_2～C_5アシル、スクシニル、マロニル、グルタリル

、アミノ酸、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

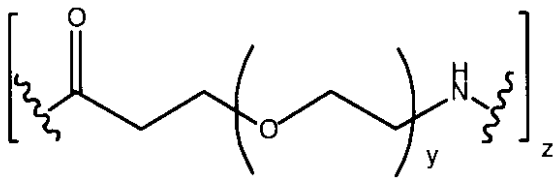
【化３３】



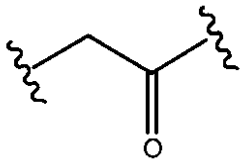
および

（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、

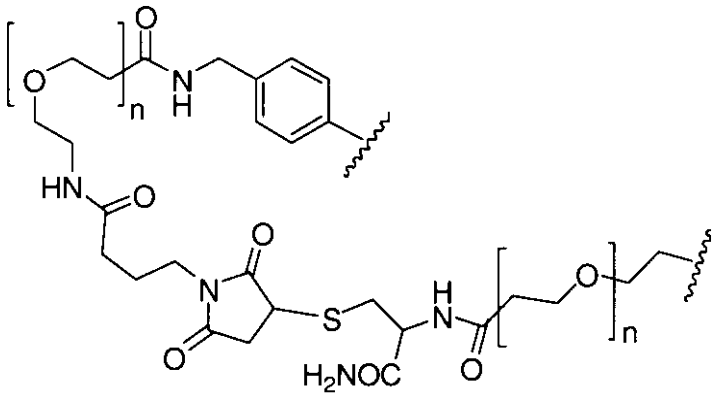
R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）
からなる群から選択される３個、４個若しくは５個の部分の鎖からなる有機構造であり、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚが、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の
【化３４】



である、
ｉｘｘ）結合である、
ｘｘ）システインである、
ｘｘｉ）直鎖状構造を有する、
若しくは
ｘｘｉｉ）分枝構造を有する、
ｘｘｉｉｉ）以下の構造
【化３５】

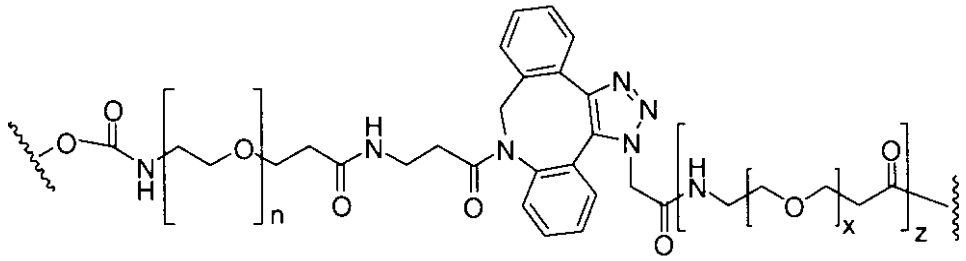


を有する、
ｘｘｉｖ）
【化３６】



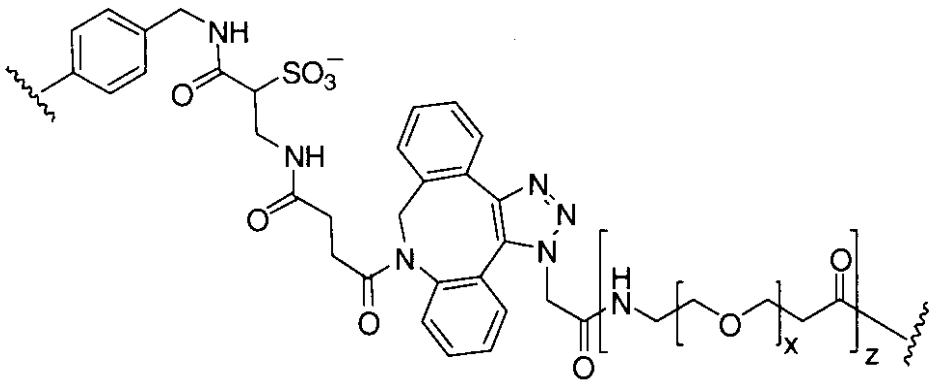
（ここで、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、若しくは１～５０である）
である、
ｘｘｖ）

【化３７】



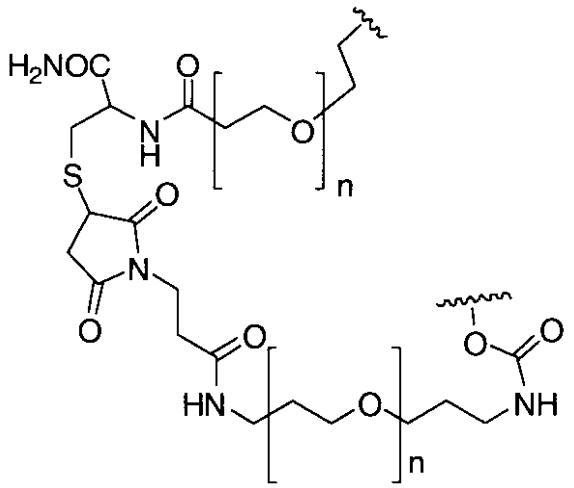
（ここで、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、若しくは１～５０であり、ｘは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、若しくは１～５０であり、ｚは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、若しくは１～５０である）
である、
ｘｘｖｉ）

【化３８】



（ここで、ｘは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、若しくは１～５０であり、ｚは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、若しくは１～５０である）
である、又は
ｘｘｖｉｉ）

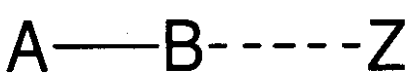
【化３９】



（ここで、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、若しくは１～５０である）
である、
請求項６～１７の何れか１項に記載の化合物。
【請求項１９】
Ｚが、１つのＣを含み、Ｃが、化合物の第１のポリペプチドであり、その第１のポリペプチドが、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、（ｉ）抗体の$Ｆ_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）$Ｆ_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）システイン、セレノシステイン、ＣＰ、ＣＰＸＣＰ（ここで、Ｘ＝Ｐ、Ｒ又はＳ）、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、ＣＶＥＣＰＰＣＰ、ＣＣＶＥＣＰＰＣＰ、及びＣＤＴＰＰＰＣＰＲＣＰからなる群から選択される配列をＮ末端に有する、請求項１～１８の何れか１項に記載の化合物。
【請求項２０】
Ｃが、
ｉ）連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、（ｉ）抗体の$Ｆ_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）$Ｆ_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）ＣＰ、ＣＰＸＣＰ（ここで、Ｘ＝Ｐ、Ｒ又はＳ）、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、ＣＶＥＣＰＰＣＰ、ＣＣＶＥＣＰＰＣＰ、及びＣＤＴＰＰＰＣＰＲＣＰからなる群から選択される、天然に存在するシステインを含む配列をＮ末端に有する、
ｉｉ）前記化合物のポリペプチド成分であり、そのポリペプチド成分が、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、（ｉ）抗体の$Ｆ_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）$Ｆ_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）天然に存在しないシステイン若しくはセレノシステインを含む配列をＮ末端に有する、
ｉｉｉ）連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、及びＩｇＥからなる群から選択される抗体のＦｃドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である、
ｉｖ）連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、抗体のＦｃ６ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である、
ｖ）連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、抗体のＦｃドメイン鎖以外の鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である、
ｖｉ）連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、抗体のＦａｂ若しくはＦａｂ’の重鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である、又は
ｖｉｉ）連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、抗体のＦａｂ若しくはＦａｂ’の軽

鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である、
請求項１９に記載の化合物。
【請求項２１】
Ｚが、第２のポリペプチドをさらに含み、その第２のポリペプチドが、抗体のＦｃドメイン鎖以外の抗体の鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である連続アミノ酸を含む、請求項１９又は２０に記載の化合物。
【請求項２２】
前記第２のポリペプチドが、
ｉ）抗体のＦａｂ若しくはＦａｂ’の重鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である連続アミノ酸、又は
ｉｉ）抗体のＦａｂ若しくはＦａｂ’の軽鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である連続アミノ酸
を含む、請求項２１に記載の化合物。
【請求項２３】
Ｚが、
ｉ）抗体又はその一部分を含む、
ｉｉ）抗体の少なくとも１つのＦａｂ若しくはＦａｂ’、又は前記少なくとも１つのＦａｂ若しくはＦａｂ’の一部分を含む、
ｉｉｉ）抗体のＦａｂ－１若しくはＦａｂ’１又はその一部分を含む、
ｉｖ）抗体のＦａｂ－２若しくはＦａｂ’２又はその一部分を含む、
ｖ）抗体の２つのＦａｂ又はＦａｂ’の手を含む、
ｖｉ）単鎖抗体に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である、少なくとも１つの一連の連続アミノ酸を含む、或いは
ｖｉｉ）第２のポリペプチドを含み、Ｂが、Ｚの前記第２のポリペプチドのＮ末端システイン又はセレノシステインと、Ｂのアミノ酸残基又は有機酸残基との間のペプチジル結合によってＺに連結している、
請求項１～２２の何れか１項に記載の化合物。
【請求項２４】
Ｃの前記Ｃ末端が、
ｉ）修飾されている抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸を含む、或いは
ｉｉ）システイン、セレノシステイン、ホモシステイン若しくはホモセレノシステイン、又はシステイン、セレノシステイン、ホモシステイン若しくはホモセレノシステインの誘導体である、
請求項１９～２３の何れか１項に記載の化合物。
【請求項２５】
Ｂが、
ｉ）ＺのポリペプチドのＮ末端システイン若しくはセレノシステインと、Ｂのアミノ酸残基若しくは有機酸残基との間のペプチジル結合によってＺに連結している、又は
ｉｉ）Ｃの前記Ｎ末端システイン若しくはセレノシステインと、Ｂのアミノ酸残基若しくは有機酸残基との間のペプチジル結合によってＣに連結している、
請求項１～２４の何れか１項に記載の化合物。
【請求項２６】
請求項１～２５の何れか１項に記載の化合物を含む、ホモダイマー又はヘテロダイマー。
【請求項２７】
ホモダイマー又はヘテロダイマーの各化合物が、
ｉ）少なくとも１つのジスルフィド結合によって、他方に結合することができる、
ｉｉ）各化合物の前記Ｃ又は前記第２のポリペプチドの間の少なくとも１つのジスルフィド結合によって、他方に結合することができる、

ｉｉｉ）少なくとも１つのジスルフィド結合によって、他方に結合する、
ｉｖ）各化合物の前記Ｃ又は前記第２のポリペプチドの間の少なくとも１つのジスルフィド結合によって、他方に結合する、
請求項２６に記載のホモダイマー又はヘテロダイマー。
【請求項２８】
以下の構造を有する化合物
【化４０】



（式中、Ａは、前記化合物の生物学的に活性な構造であり、
Ｚは、前記化合物のタンパク質成分であり、そのタンパク質成分は、１つ以上のポリペプチドを含み、前記１つ以上のポリペプチドの少なくとも１つは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸は、（ｉ）抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）Ｆ$_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）システイン又はセレノシステインをＮ末端に有し、
Ｂは、ＡとＺを連結させる化学構造であり、
ＢＺ間の点線は、ペプチジル結合を表し、
ＡＢ間の実線は、非ペプチジル結合を表す）
を生成するための方法であって、
ａ）Ａ又はＡの誘導体と、第１の末端反応性基とを含むＡ’を得る工程と、
ｂ）Ｂ又はＢの誘導体と、第２の末端反応性基と、第３の末端反応性基とを含み、前記第２の末端反応性基が、前記第１の末端反応性基と反応して、非ペプチジル結合を形成することができるＢ’を得る工程と、
ｃ）Ｚ又はＺの誘導体と、第４の末端反応性基とを含み、前記第４の末端反応性基が、前記第３の末端反応性基と反応して、ペプチジル結合を形成することができるＺ’を得る工程と、
ｄ）Ａ’、Ｂ’及びＺ’を任意の順序で反応させて、前記化合物を生成する工程
とを含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０１４年３月１４日に出願した米国仮特許出願第６１／９５３，６５０の優先権を主張するものであり、その内容全体が、参照によりここに組み込まれる。
【０００２】
本出願は、ファイル名「150313_0893_86150_PCT_Sequence_Listing_REB.txt」に存在する、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列を参照により組み込んでおり、そのファイルは、サイズが４９９キロバイトであり、２０１５年３月１３日に、ＭＳ－Ｗｉｎｄｏｗｓとのオペレーティングシステム互換性を有するＩＢＭ－ＰＣフォーマットで作成されたものであり、本出願の一部として２０１５年３月１３日に提出したテキストファイルに含まれている。
【０００３】
本出願全体を通して、様々な文献が参照される。本発明に関連する従来技術をより十分に説明するために、すべての参考文献の開示全体が、参照により本出願に組み込まれる。
【発明の背景】
【０００４】
タンパク質は、溶媒へのその曝露を最小限にする、コンパクトな球状又は繊維状の構造を形成しやすい。この傾向は、水素結合による二次構造をとる傾向があるポリペプチド骨格と、三次フォールディングを促進する側鎖相互作用の両方に固有である。したがって、

ペプチドを使用して、抗体に「フレキシビリティー」を導入するこれまでの取り組みは、大部分は不十分であった。例えば、溶媒と相互作用しやすいアミノ酸（例えば、セリン）と、らせん構造を壊すアミノ酸（例えば、グリシン）との組み合わせを用いることがよくある。この手法は、融合タンパク質、例えば、単鎖抗体フラグメント（ｓｃＦｖ）を作るのに有用であるが、得られた構造は、実際に、かなりコンパクトであり、伸張性の証拠がない（例えば、Ｒｏｂｅｒｔら（２００９）、Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｉｎｔｅｒｖｅｎｔｉｏｎ ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ’ｓ ｄｉｓｅａｓｅ ａｎｄ ｒｅｌａｔｅｄ ｄｅｍｅｎｔｉａｓ ｂｙ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ａｍｙｌｏｉｄ ａｎｄ ｔｏｘｉｃ ｏｌｉｇｏｍｅｒｓ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．Ｄｅｓ．Ｓｅｌ．２２、１９９～２０８を参照されたい）。更に、そのような配列は、内因性の免疫原性、及びタンパク質分解に対する感受性を理由に、さらなる問題を引き起こす可能性がある。

【０００５】

フレキシブルで伸張可能である、非タンパク質鎖を組み込んだ新規のタンパク質化合物、及びそのような化合物を生成するための方法の必要性が存在する。

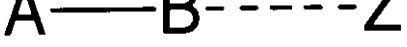
【発明の概要】

【０００６】

本発明は、以下の構造を有する化合物

【０００７】

【化１】



【０００８】

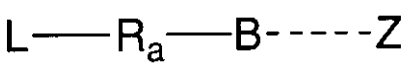
（式中、Ａは、化合物の生物学的に活性な構造であり、
Ｚは、化合物のタンパク質成分であり、そのタンパク質成分は、１つ以上のポリペプチドを含み、１つ以上のポリペプチドの少なくとも１つは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸は、（ｉ）抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）Ｆ$_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）システイン又はセレノシステインをＮ末端に有し、
Ｂは、ＡとＺを連結させる化学構造であり、
ＢＺ間の点線は、ペプチジル結合を表し、
ＡＢ間の実線は、非ペプチジル結合を表す）を提供する。

【０００９】

本発明はまた、以下の構造を有する化合物

【００１０】

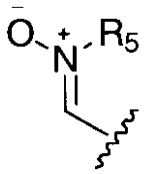
【化２】



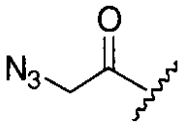
【００１１】

［式中、Ｚは、化合物のタンパク質成分であり、そのタンパク質成分は、１つ以上のポリペプチドを含み、１つ以上のポリペプチドの少なくとも１つは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸は、（ｉ）抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）Ｆ$_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）システイン又はセレノシステインをＮ末端に有し、
Ｂは、Ｒ$_a$とＣを連結させる化学構造であり、
ＢＺ間の点線は、ペプチジル結合を表し、
Ｌは、－Ｎ$_3$、アルキン、

【００１２】
【化３】

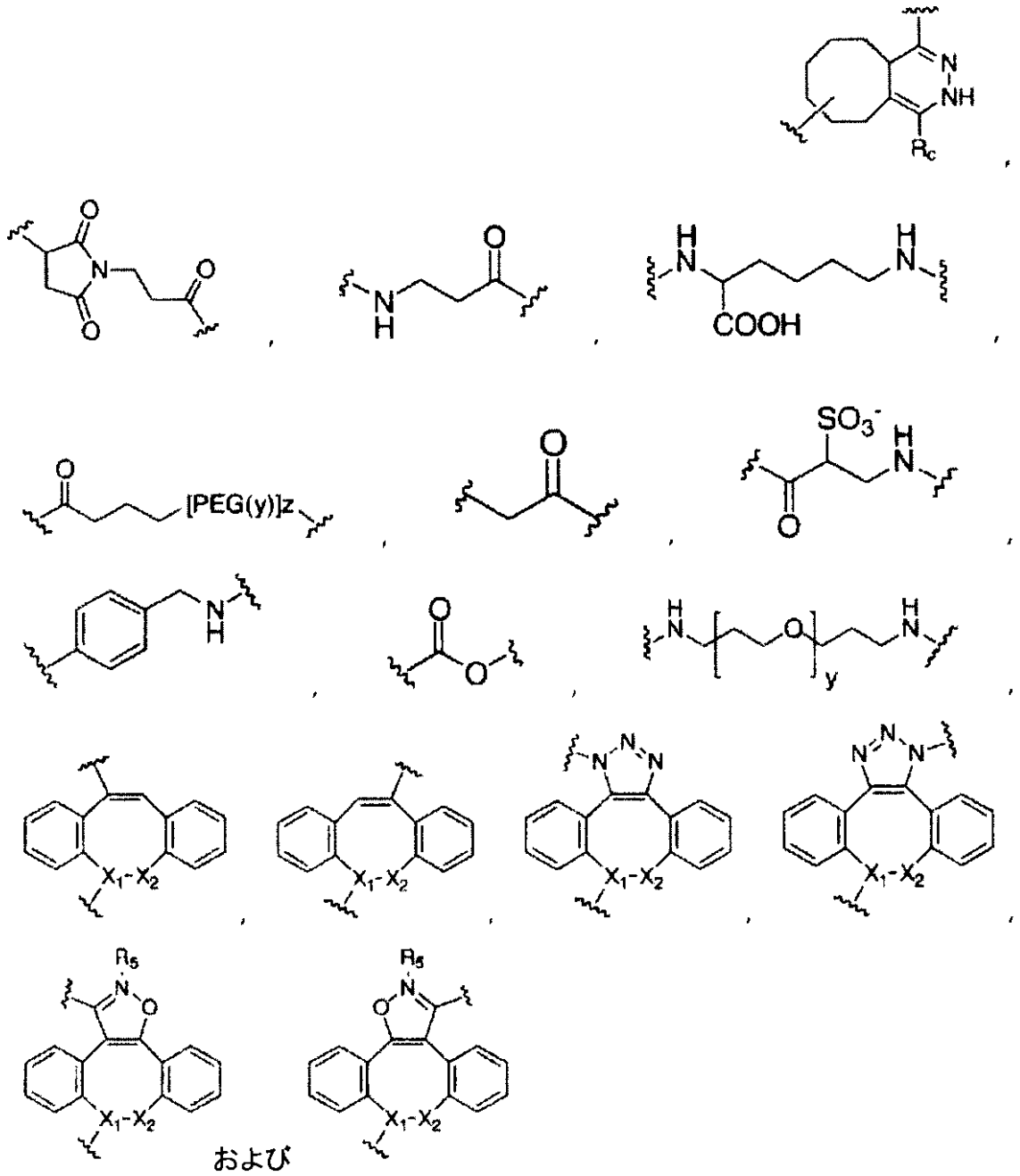


【００１３】
基（ここで、R_5は、アルキル基又はアリール基である）、
【００１４】
【化４】



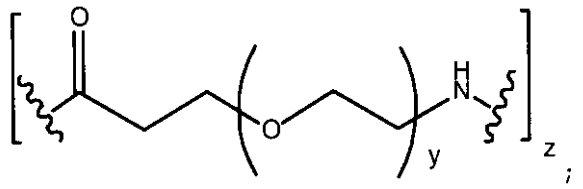
【００１５】
基、テトラジン、及びｔｒａｎｓ－シクロオクテンからなる群から選択され、
R_aは、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、
【００１６】

【化５】

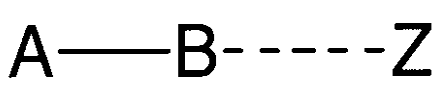


【００１７】
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）
からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の
【００１８】

【化６】



【００１９】
である］を提供する。
【００２０】
本発明はまた、以下の構造を有する化合物
【００２１】
【化７】



【００２２】
（式中、Ａは、化合物の生物学的に活性な構造であり、
Ｚは、化合物のタンパク質成分であり、そのタンパク質成分は、１つ以上のポリペプチドを含み、１つ以上のポリペプチドの少なくとも１つは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸は、（ｉ）抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）Ｆ$_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）システイン又はセレノシステインをＮ末端に有し、
Ｂは、ＡとＺを連結させる化学構造であり、
ＢＺ間の点線は、ペプチジル結合を表し、
ＡＢ間の実線は、非ペプチジル結合を表す）
を生成するための方法であって、
ａ）Ａ又はＡの誘導体と、第１の末端反応性基とを含むＡ’を得る工程と、
ｂ）Ｂ又はＢの誘導体と、第２の末端反応性基と、第３の末端反応性基とを含み、第２の末端反応性基が、第１の末端反応性基と反応して、非ペプチジル結合を形成することができるＢ’を得る工程と、
ｃ）Ｚ又はＺの誘導体と、第４の末端反応性基とを含み、第４の末端反応性基が、第３の末端反応性基と反応して、ペプチジル結合を形成することができるＺ’を得る工程と、
ｄ）Ａ’、Ｂ’及びＺ’を任意の順序で反応させて、化合物を生成する工程
とを含む、方法を提供する。
【図面の簡単な説明】
【００２３】
【図１】図１は、ＴＮＲ１Ｂ－インテイン融合タンパク質をシスチル－プロパルギルアミドで切断することによるアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂの調製を示す。インテイン副生成物は、キチンクロマトグラフィーにより除去される。アジド修飾ＴＮＲ１Ｂ及びシクロアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂは、シスチル－３－アジドプロピルアミド、及びシステインの様々なシクロオクチン（たとえば、ＤＩＢＡＣ）誘導体をそれぞれ用いて同様に調製される。
【図２】図２は、（１）システイン、（２）システイン＋メルカプトエタンスルホネート（ＭＥＳＮＡ）、（３）シスチル－プロパルギルアミド、（４）シスチル－プロパルギルアミド＋ＭＥＳＮＡ、及び（５）ＭＥＳＮＡによるＴＮＲ１Ｂの切断を示す。すべての化合物を５０ｍＭ濃度で用いた。
【図３】図３は、Ｆｃ６二量体及びアジド－ＤＫＴＨＴ－チオエステルの連結（ペプチジル）によるアジド修飾Ｆｃ６の調製を示す（表１）。

【図４】図４は、Ｆｃ６二量体及びアジド－ＰＥＧ$_n$－ＤＫＴＨＴ－チオエステルの連結（ペプチジル）によるアジド修飾Ｆｃ６の調製を示す（表１）。シクロアルキン修飾Ｆｃは、ＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ$_{12}$－チオエステルを用いることにより同様に調製される。
【図５】図５は、（１）未修飾Ｆｃ６、（２）図３のＡｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６反応生成物、及び（３）図４のＡｚ－ＰＥＧ$_4$－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６反応生成物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析（還元条件）を示す。
【図６】図６は、アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ及びＡｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６の連結（非ペプチジル）によるＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６の合成を示す。
【図７】図７は、アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ及びアジド－ＰＥＧ$_n$－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６の連結（非ペプチジル）によるＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－ＰＥＧ$_n$－Ｆｃ６の合成を示す。この例では、ｎ＝４。
【図８】図８は、（１）アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ単独、（２）触媒の非存在下のアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ＋Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（３）図６の生成物をもたらすアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ＋Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６＋触媒、及び（４）図６の生成物の形成を増加させる透析されたアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ＋Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６＋触媒、（５）触媒の非存在下のアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ＋Ａｚ－ＰＥＧ$_4$－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（６）図７の生成物をもたらすアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ＋Ａｚ－ＰＥＧ$_4$－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６＋触媒、及び（７）図７の生成物の形成を増加させる透析されたアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ＋Ａｚ－ＰＥＧ$_4$－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６＋触媒のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析（還元条件）を示す。矢印は、（ａ）Ｍｒ約７５，０００、（ｂ）Ｍｒ約６５，０００、（ｃ）Ｍｒ約４３，０００、及び（ｄ）Ｍｒ約２８，０００に相当する。
【図９】図９は、（１）ＴＮＦ１Ｂ－Ｆｃ融合タンパク質（エタネルセプト）単独、（２）図６の生成物をもたらすアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ＋Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６＋触媒、（３）ＴＮＦ１Ｂ－Ｆｃ融合タンパク質（エタネルセプト）、及び（４）図７の生成物をもたらすアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ＋Ａｚ－ＰＥＧ$_4$－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析（還元条件）を示す。矢印は、（ａ）Ｍｒ約７５，０００、（ｂ）Ｍｒ約６５，０００、（ｃ）Ｍｒ約４３，０００、及び（ｄ）Ｍｒ約２８，０００に相当する。
【図１０】図１０は、（１）未修飾Ｆｃ６＋触媒、（２）アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ＋未修飾Ｆｃ６＋触媒（３）Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６＋触媒、（４）図６の生成物をもたらすアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ＋Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６＋触媒、及び（５）アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ単独のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析（還元条件）を示す。矢印は、（ａ）Ｍｒ約７５，０００、（ｂ）Ｍｒ約６５，０００、（ｃ）Ｍｒ約４３，０００、（ｄ）Ｍｒ約２８，０００、及び（ｅ）Ｍｒ約２７，０００に相当する。
【図１１】図１１は、ＬＣ／ＭＳにより図１０のＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６生成物（Ｍｒ約７５，０００）でトリプシンペプチド化（tryptic peptided）を示す。下線のあるペプチド配列は、親ＴＮＲ１Ｂ（上部）及びＦｃ６（下部）配列に由来し、ＬＣ／ＭＳにより同定されたものである。
【図１２】図１２は、図９のＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６（左のパネル）及びＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－ＰＥＧ$_4$－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６（右のパネル）反応生成物によるＴＮＦ－　結合のＳＰＲ分析を示す。キネティック結合データを表２にまとめて示す。
【図１３】図１３は、３工程プロセス、すなわち、１）Ｆａｂ’２＋Ｆｃ’フラグメントへのＩｄｅＳ切断、２）Ｆｃ’フラグメントを除去するためのプロテインＡクロマトグラフィー、及び３）２－メルカプトエチルアミン（ＭＥＡ）を用いた、Ｆａｂ’２フラグメントのＦａｂ’フラグメントへの穏やかな還元におけるアダリムマブＦａｂ’の調製を示す。
【図１４】図１４は、（１）アダリムマブ、（２）ＩｄｅＳ切断後のアダリムマブ、（３）プロテインＡ精製後のアダリムマブＦａｂ’２、（４）プロテインＡによって精製されたＦａｂ’２のＭＥＡ処置後のアダリムマブＦａｂ’、（５）プロテインＡ精製後のアダリムマブＦａｂ’２、及び（６）プロテインＡによって精製されたＦａｂ’２のＭＥＡ処

置後のアダリムマブＦａｂ’のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。レーン１、２、５及び６におけるサンプルを、還元条件下で分析し；レーン３及び４におけるサンプルを、非還元条件下で分析した。矢印は、（ａ）重鎖、（ｂ）重鎖Ｆｃ’フラグメント、（ｃ）重鎖Ｆｄ’（可変領域－含有）フラグメント、及び（ｄ）軽鎖に相当する。

【図１５】図１５は、アダリムマブＦａｂ’のＤＩＢＡＣ－PEG_y－Ｌｙｓ（Ｍａｌ）との反応によるシクロアルキン修飾Ｆａｂ’の調製を示す。この例では、ＰＥＧｙ＝PEG_{12}。

【図１６】図１６は、シクロアルキン修飾アダリムマブＦａｂ’の合成及び精製のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析（非還元条件）を示す。上のパネルは、（１～６）ｐＨ７.４及び（７～１２）ｐＨ７.０における反応を示す。Ｆａｂ’割当量（ration）に対するＤＩＢＡＣ－PEG_y－Ｌｙｓ（Ｍａｌ）は、（１）０、（２）１０：１、（３）５：１、（４）２.５：１、（５）１.２：１、（６）０.６：１、（７）０、（８）１０、（９）５、（１０）２.５、（１１）１.２、及び（１２）０.６：１であった。下のパネルは、（１）未反応のＦａｂ’、（２）から（１２）シクロアルキン修飾Ｆａｂ’のみを含有するプロテインＬフロースルー画分を示す。

【図１７】図１７は、（１）Ｆｃ６、（２）Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（３）Ａｚ－PEG_{12}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（４）Ａｚ－PEG_{24}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、及び（５）Ａｚ－PEG_{36}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析（還元条件）を示す。

【図１８】図１８は、（ａ）Ａｚ－PEG_{36}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（ｂ）Ａｚ－PEG_{24}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（ｃ）Ａｚ－PEG_{12}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（ｄ）Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、及び（ｅ）Ｆｃ６のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図１９】図１９は、シクロアルキン修飾アダリムマブＦａｂ’及びアジド修飾Ｆｃ６の連結（非ペプチジル）によるＦａｂ’－ＰＥＧｙ－アルキン－アジド－ＰＥＧｘ－Ｆｃ６の合成を示す。

【図２０】図２０は、Ｆａｂ’－ＰＥＧｙ－アルキン－アジド－ＰＥＧｘ－Ｆｃ６生成物シリーズを示す。

【図２１】図２１は、（１）アダリムマブ全抗体、（２）アダリムマブＦａｂ’、（３）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン、（４）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン＋Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（５）Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（６）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン＋Ａｚ－PEG_{12}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（７）Ａｚ－PEG_{12}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（８）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン＋Ａｚ－PEG_{24}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（９）Ａｚ－PEG_{24}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６単独、（１０）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン＋Ａｚ－PEG_{36}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（１１）Ａｚ－PEG_{36}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、及び（１２）Ｆｃ６のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。サンプルを、還元条件（上のパネル）及び非還元条件（下のパネル）下で操作した。上のパネルにおいて、矢印は、（ａ）Ｆａｂ’－ＰＥＧｙ－アルキン－アジド－ＰＥＧｘ－Ｆｃ６重鎖を示す。下のパネルにおいて、矢印は、（ａ）両手のＦａｂ’－ＰＥＧｙ－アルキン－アジド－ＰＥＧｘ－Ｆｃ６分子、及び（ｂ）片手のＦａｂ’－ＰＥＧｙ－アルキン－アジド－ＰＥＧｘ－Ｆｃ６分子を示す。

【図２２】図２２は、両手の反応生成物、すなわち、（ａ）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン－アジド－PEG_{36}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（ｂ）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン－アジド－PEG_{24}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（ｃ）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン－アジド－PEG_{12}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、（ｄ）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン－アジド－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、及び（ｅ）全アダリムマブのサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）を示す。

【図２３】図２３は、反応生成物によるＷＥＨＩ細胞におけるＴＮＦ－α細胞毒性の抑制を示す。上のパネルは、（ａ）Ｆｃ６対照、（ｂ）シクロアルキン修飾Ｆａｂ’、（ｃ）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン－アジド－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、及び（ｄ）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン－アジド－PEG_{12}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６を示す。下のパネルは、（ａ）Ｆｃ６対照、（ｂ）シクロアルキン修飾Ｆａｂ’、（ｃ）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン－アジド－PEG_{24}－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６、及び（ｄ）Ｆａｂ’－PEG_{12}－アルキン

－アジド－ＰＥＧ$_{36}$－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６を示す。
【図２４】図２４は、還元条件（左）及び非還元条件（右）下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、精製されたＮ３－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を示す：Ｆｃ６対照（レーンａ）、Ｎ３－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｂ）、Ｎ３－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｃ）、Ｎ３－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｄ）、Ｎ３－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｅ）、及びＮ３－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｆ）。
【図２５】図２５は、シクロオクチン修飾ＧＬＰ－１類似体（ＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＢＣＯ）の構造及び合成を示す。
【図２６】図２６は、ＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＢＣＯとＮ３－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質との反応を示す。
【図２７】図２７は、ＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンの構造を示す。
【図２８】図２８は、還元条件（左）及び非還元条件（右）下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、精製されたＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンを示す：Ｆｃ６対照（レーンａ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｂ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｃ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｄ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｅ）、及びＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｆ）。
【図２９】図２９は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、ＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン及びＮ３－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を直接比較する：Ｆｃ６対照（レーンａ）、Ｎ３－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｂ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｃ）、Ｎ３－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｄ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｅ）、Ｎ３－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｆ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｇ）、Ｎ３－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｈ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｉ）、Ｎ３－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｊ）、及びＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｋ）。
【図３０】図３０は、ＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン及びＧＬＰ－１による、ＧＬＰ－１受容体発現細胞におけるｃＡＭＰ合成の誘導を比較する。
【図３１】図３１は、ＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ１１－ＤＩＢＡＣとＮ３－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質との間の反応を示す。
【図３２】図３２は、シクロオクチン－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質の構造を示す。
【図３３】図３３は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによるＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃ反応生成物を示す：Ｆｃ６対照（レーンｂ）、未精製の反応生成物（レーンｃ～ｅ）、精製されたＮ３－Ｐ０－Ｆｃタンパク質（レーンｆ）、及び精製されたＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃタンパク質（レーンｇ）。
【図３４】図３４は、アジド修飾ＤＮＡとシクロオクチン－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質との反応を示す。
【図３５】図３５は、ＤＮＡ－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンの構造を示す。
【図３６】図３６は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによるＤＮＡ－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン反応生成物を示す。５ＡｚＤ－ｌｅｔ７ｄオリゴヌクレオチド濃度（ｍｇ／ｍｌ）は、以下の通りであった：マーカー（レーンａ）、０（レーンｂ）、２．５（レーンｃ）、１．２５（レーンｄ）、０．０６３（レーンｅ）、０．０３１（レーンｆ）、０．０１６（レーンｇ）、０．０８（レーンｈ）。
【図３７】図３７は、トラスツズマブ変異体、ｃｙｓ１Ｈ－ＩｇＧ１、及びアジド修飾トラスツズマブ重鎖（Ｎ$_3$－Ｐｘ－Ｈｃ）の構造及び合成を示す。
【図３８】図３８は、トラスツズマブ変異体、ｃｙｓ１Ｈ－ＩｇＧ１、及びアジド修飾トラスツズマブ軽鎖（Ｎ$_3$－Ｐｘ－Ｌｃ）の構造及び合成を示す。
【図３９】図３９は、シクロオクチン修飾ＤＭ－１（ＤＭ１－Ｐ４－ＤＢＣＯ）の構造及び合成を示す。
【図４０】図４０は、シクロオクチン修飾ＤＭ－１とＮ$_3$－Ｐｘ－Ｈｃタンパク質との間

の反応を示す。
【図４１】図４１は、ＤＭ１－Ｐ４－トリアゾール－Ｐｘ－Ｈｃハイブリッド免疫グロブリンの構造を示す。
【図４２】図４２は、シクロオクチン修飾ＤＭ－１とN_3－Ｐｘ－Ｌｃタンパク質との間の反応を示す。
【図４３】図４３は、ＤＭ１－Ｐ４－トリアゾール－Ｐｘ－Ｌｃハイブリッド免疫グロブリンの構造を示す。
【図４４】図４４は、テトラジン－ＤＢＣＯとN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質との間の反応を示す。
【図４５】図４５は、テトラジン修飾Ｆｃタンパク質（Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃ）の構造を示す。
【図４６】図４６は、還元条件（左）及び非還元条件（右）下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、精製されたＴｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を示す：Ｆｃ６対照（レーンａ）、Ｔｅｔ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｂ）、Ｔｅｔ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｃ）、Ｔｅｔ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｄ）、Ｔｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｅ）、及びＴｅｔ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｆ）。
【図４７】図４７は、ＴＣＯ－ＰＥＧ１２－ＤＢＣＯとN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質との間の反応を示す。
【図４８】図４８は、ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾Ｆｃタンパク質（Ｔｃｏ－Ｐｘ－Ｆｃ）の構造を示す。
【図４９】図４９は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによるＴｃｏ－Ｐ１２－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を示す。Ｔｃｏ－Ｐ１２－ＤＭＣＯリンカー濃度（ｍｇ／ｍｌ）は、以下の通りであった：３２（レーンａ）、１６（レーンｂ）、８（レーンｃ）、４（レーンｄ）、２（レーンｅ）、１（レーンｆ）、０．５（レーンｇ）、０．２５（レーンｈ）、０．１２５（レーンｉ）、及び０（レーンｊ）。
【図５０】図５０は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、ＮＨ２－ＰＥＧ２３－Ｎ３とＤＢＣＯ－ＴＴ－Ｐ１２－Ｐ３６－Ｆｃタンパク質との反応生成物を示す。ＮＨ２－ＰＥＧ２３－Ｎ３リンカー濃度（ｍｇ／ｍｌ）は、以下の通りであった：０．１２（レーンａ）、０．０６（レーンｂ）、０．０３（レーンｃ）、０．０１５（レーンｄ）、０．００７５（レーンｅ）、０．００３８（レーンｆ）、０．００２（レーンｇ）、０．００１（レーンｈ）、０（レーンｉ）。
【図５１】図５１は、ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾ＧＬＰ－１類似体（ＧＬＰ１－Ｐ６－Ｔｃｏ）の構造及び合成を示す。
【図５２】図５２は、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴｃｏペプチドとＴｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質との間の反応を示す。
【図５３】図５３は、ＧＬＰ１－ジヒドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンの構造を示す。
【図５４】図５４は、テトラジン修飾ＧＬＰ－１類似体（ＧＬＰ１－Ｐ６－Ｔｅｔ）の構造及び合成を示す。
【図５５】図５５は、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴｅｔペプチドとＴｃｏ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質との間の反応を示す。
【図５６】図５６は、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐｘ－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンの構造を示す。
【図５７】図５７は、還元条件（左）及び非還元条件（右）下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、精製されたＧＬＰ１－ジドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンを示す：Ｆｃ６対照（レーンａ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｂ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｃ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｄ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｅ）、及びＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ０４８－Ｆｃ（レーンｆ）。
【図５８】図５８は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、Ｎ３－Ｐｘ－Ｆｃ（Ｉ）タ

ンパク質、Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃ（ＩＩ）タンパク質、及びＧＬＰ１－ジヒドロピリジジン－Ｆｃ（ＩＩＩ）ハイブリッド免疫グロブリンを直接比較する：Ｆｃ６対照（レーンａ）、Ｎ３－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｂ）、Ｔｅｔ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｃ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｄ）、Ｎ３－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｅ）、Ｔｅｔ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｆ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｇ）、Ｎ３－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｈ）、Ｔｅｔ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｉ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｊ）、Ｎ３－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｋ）、Ｔｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｌ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｍ）、Ｎ３－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｎ）、Ｔｅｔ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｏ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｐ）。

【図５９】図５９は、ＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＢＣＯとＮ３－Ｐ３６－Ｆｃとの反応の時間的経過、及びＧＬＰ１－Ｐ６－ＴｃｏとＴｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃとの反応の時間的経過を示す。

【図６０】図６０は、ＧＬＰ１－ジドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン及びＧＬＰ－１による、ＧＬＰ－１受容体発現細胞におけるｃＡＭＰ合成の誘導を比較する。

【図６１】図６１は、ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾アダリムマブＦａｂ（Ｆａｂ－Ｐ３－Ｔｃｏ）の構造及び合成を示す。

【図６２】図６２は、Ｆａｂ－Ｐ３－ＴｃｏタンパクとＴｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質との間の反応を示す。

【図６３】図６３は、Ｆａｂ－ジヒドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンの構造を示す。

【図６４】図６４は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、Ｆａｂ－ジヒドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンを示す：マーカー（レーンａ）、アダリムマブ（レーンｂ）、Ｆａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｃ）、Ｆａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｄ）、Ｆａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｅ）、Ｆａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｆ）、Ｆａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｇ）、Ｆａｂ－Ｐ３－Ｔｃｏ（レーンｈ）、Ｔｅｔ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｉ）、Ｔｅｔ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｊ）、Ｔｅｔ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｋ）、Ｔｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｌ）、Ｔｅｔ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｍ）。

【図６５】図６５は、アジド修飾及びｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾オランザピン（Ｏｌａ－Ｐ１２－Ｔｃｏ）の構造及び合成を示す。

【図６６】図６６は、Ｏｌａ－Ｐ１２－ＴｃｏとＴｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質との間の反応を示す。

【図６７】図６７は、オランザピン－ジヒドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンの構造を示す。

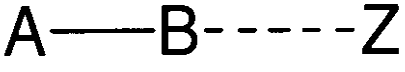
【発明の詳細な説明】

【００２４】

本発明は、以下の構造を有する化合物

【００２５】

【化８】



【００２６】

（式中、Ａは、化合物の生物学的に活性な構造であり、

Ｚは、化合物のタンパク質成分であり、そのタンパク質成分は、１つ以上のポリペプチドを含み、１つ以上のポリペプチドの少なくとも１つは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸は、（ｉ）抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり

、（ｉｉ）F_c受容体に結合し、（ｉｉｉ）システイン又はセレノシステインをＮ末端に有し、
Ｂは、ＡとＺを連結させる化学構造であり、
ＢＺ間の点線は、ペプチジル結合を表し、
ＡＢ間の実線は、非ペプチジル結合を表す）を提供する。

【００２７】

いくつかの態様において、システイン又はセレノシステインは、一連の連続アミノ酸に天然に存在する。いくつかの態様において、システイン及びセレノシステインは、一連の連続アミノ酸に天然に存在しない。

【００２８】

いくつかの態様において、連続アミノ酸は、システイン、セレノシステイン、ＣＰ、ＣＰＸＣＰ（ここで、Ｘ＝Ｐ、Ｒ又はＳ）、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、ＣＶＥＣＰＰＣＰ、ＣＣＶＥＣＰＰＣＰ、及びＣＤＴＰＰＰＣＰＲＣＰからなる群から選択される配列をＮ末端に有する。

【００２９】

いくつかの態様において、抗体のF_cドメインは、天然に存在する、抗体のF_cドメインである。

【００３０】

いくつかの態様において、抗体のF_cドメインは、抗体の変異型F_cドメインである。

【００３１】

いくつかの態様において、抗体の変異型F_cドメインは、抗体の変異したF_cドメインである。

【００３２】

いくつかの態様において、変異したF_cドメインは、置換変異体である。

【００３３】

いくつかの態様において、置換変異体は、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＮ末端若しくはＣ末端以外のF_cドメインのある位置にアミノ酸置換を有する。

【００３４】

いくつかの態様において、置換変異体は、その一連の連続アミノ酸中に、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１０～１５、１５～２０、１０～２０、又は２０～５０個のアミノ酸置換を有する。

【００３５】

いくつかの態様において、置換は、保存的アミノ酸置換である。

【００３６】

いくつかの態様において、変異したF_cドメインは、アミノ酸付加変異体である。

【００３７】

いくつかの態様において、アミノ酸付加変異体は、その一連の連続アミノ酸中に、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１０～１５、１５～２０、１０～２０、又は２０～５０個の付加アミノ酸を有する。

【００３８】

いくつかの態様において、変異したF_cドメインは、アミノ酸欠失変異体である。

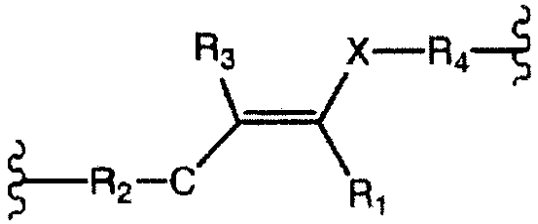
【００３９】

いくつかの態様において、アミノ酸欠失変異体は、その一連の連続アミノ酸中に、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１０～１５、１５～２０、１０～２０、又は２０～５０個の欠失アミノ酸を有する。

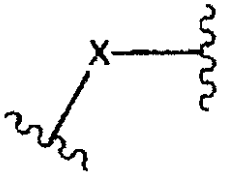
【００４０】

いくつかの態様において、連続アミノ酸は、抗体のF_cドメイン鎖に存在する、ある一連の少なくとも０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０又は１９０個の連続アミノ酸と同一である。

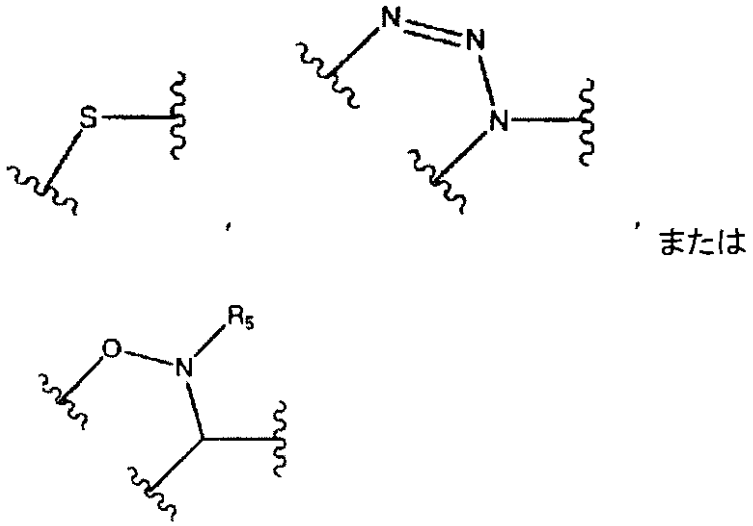
【００４１】
いくつかの態様において、連続アミノ酸は、Ｆｃドメインのヒンジ領域、ＣＨ２領域若しくはＣＨ３領域、又はその一部における、一連のアミノ酸と同一である。
【００４２】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造
【００４３】
【化９】



【００４４】
を含む非ペプチジル結合を表し、
ここで、
【００４５】
【化１０】

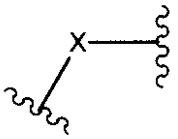


【００４６】
は、
【００４７】
【化１１】

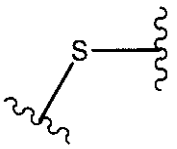


【００４８】
（ここで、R_5は、アルキル基又はアリール基である）
であり、
R_1は、Ｈ、又は、環状構造である付加的構造の一部であり、ここで、付加的環状構造は、R_1又はR_1の一部を含み、R_2又はR_2の一部、及びR_2とアルケン二重結合との間の炭

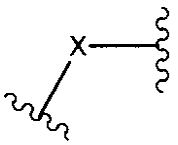
素も含んでいてもよく、
ただし、
【００４９】
【化１２】



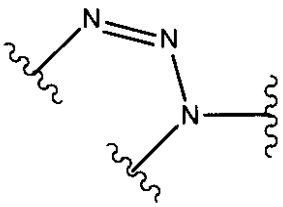
【００５０】
が、
【００５１】
【化１３】



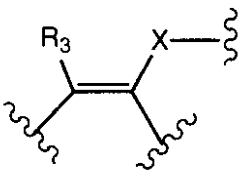
【００５２】
である場合、R_3は、Ｈであり、
【００５３】
【化１４】



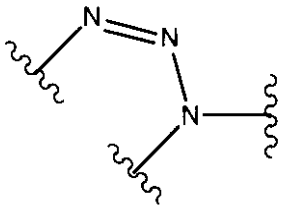
【００５４】
が、
【００５５】
【化１５】



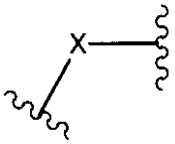
【００５６】
である場合、
【００５７】
【化１６】



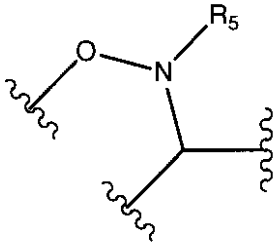
【００５８】
は、
【００５９】
【化１７】



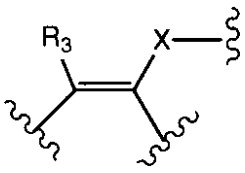
【００６０】
を含むトリアゾール環であり、
【００６１】
【化１８】



【００６２】
が、
【００６３】
【化１９】

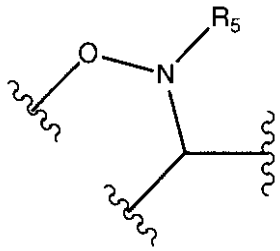


【００６４】
である場合、
【００６５】
【化２０】



【００６６】
は、
【００６７】

【化２１】



【００６８】

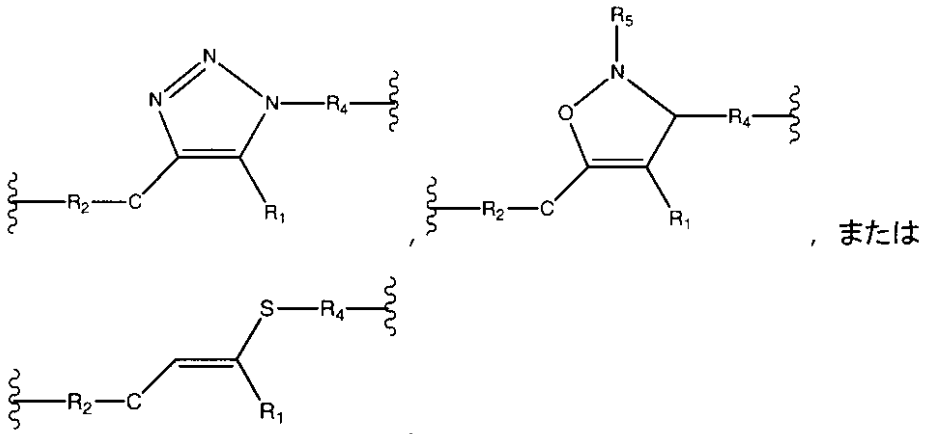
を含むＮ－アルキル又はアリール置換イソキサゾリン環であり、
R_2は、Ａ又はＢの一方と接続する有機構造を表し、R_4は、Ａ又はＢのもう一方と接続する有機構造を表す。

【００６９】

いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造

【００７０】

【化２２】



【００７１】

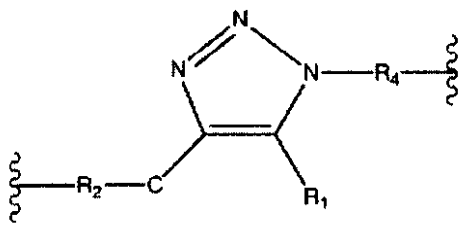
を含む非ペプチジル結合を表し、
ここで、R_1は、Ｈ、又は、環状構造である付加的構造の一部であり、ここで、付加的環状構造は、R_1又はR_1の一部を含み、R_2又はR_2の一部、及びR_2とアルケン二重結合との間の炭素も含んでいてもよい。

【００７２】

いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造

【００７３】

【化２３】



【００７４】

を含む非ペプチジル結合を表し、

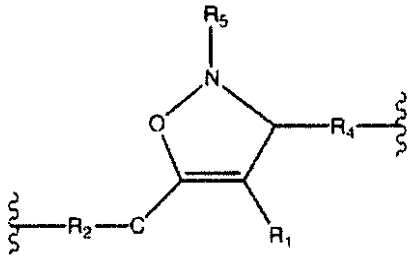
ここで、R_1は、H、又は、環状構造である付加的構造の一部であり、ここで、付加的環状構造は、R_1又はR_1の一部を含み、R_2又はR_2の一部、及びR_2とアルケン二重結合との間の炭素も含んでいてもよい。

【００７５】

いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造

【００７６】

【化２４】



【００７７】

を含む非ペプチジル結合を表し、

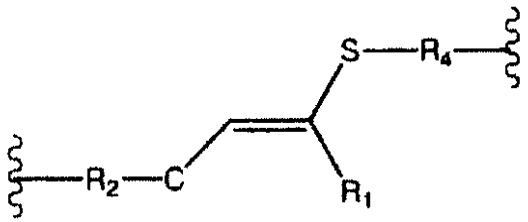
ここで、R_1は、環状構造である付加的構造の一部であり、ここで、付加的環状構造は、R_1又はR_1の一部を含み、R_2又はR_2の一部、及びR_2とアルケン二重結合との間の炭素も含んでいてもよい。

【００７８】

いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造

【００７９】

【化２５】



【００８０】

を含む非ペプチジル結合を表し、

ここで、R_1は、環状構造である付加的構造の一部であり、ここで、付加的環状構造は、R_1又はR_1の一部を含み、R_2又はR_2の一部、及びR_2とアルケン二重結合との間の炭素も含んでいてもよい。

【００８１】

いくつかの態様において、R_1及びR_2は、少なくとも１つの直接結合によって連結して、

ｉ）R_1の一部と、

ｉｉ）R_2の一部と、

ｉｉｉ）R_2とアルケン二重結合との間の炭素と、

ｉｖ）アルケン二重結合と

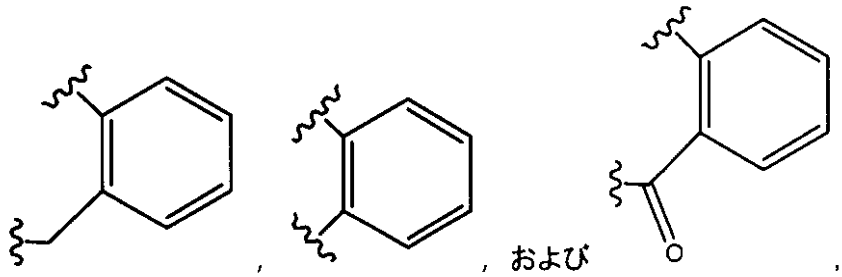
を含む環状構造を形成する。

【００８２】

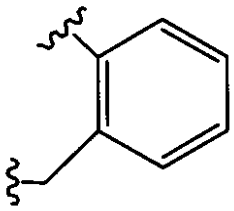
いくつかの態様において、R_1は、任意の位置で任意に置換されていてもよい、

【００８３】

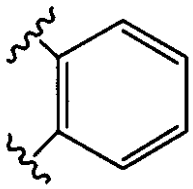
【化２６】



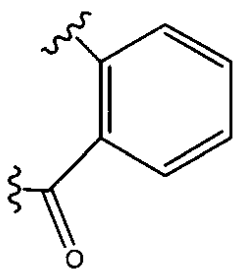
【００８４】
からなる群から選択される。
【００８５】
いくつかの態様において、R_1は、任意の位置で任意に置換されていてもよい
【００８６】
【化２７】



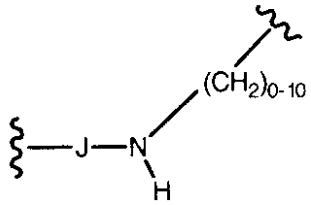
【００８７】
である。
【００８８】
いくつかの態様において、R_1は、任意の位置で任意に置換されていてもよい
【００８９】
【化２８】



【００９０】
である。
【００９１】
いくつかの態様において、R_1は、任意の位置で任意に置換されていてもよい
【００９２】
【化２９】

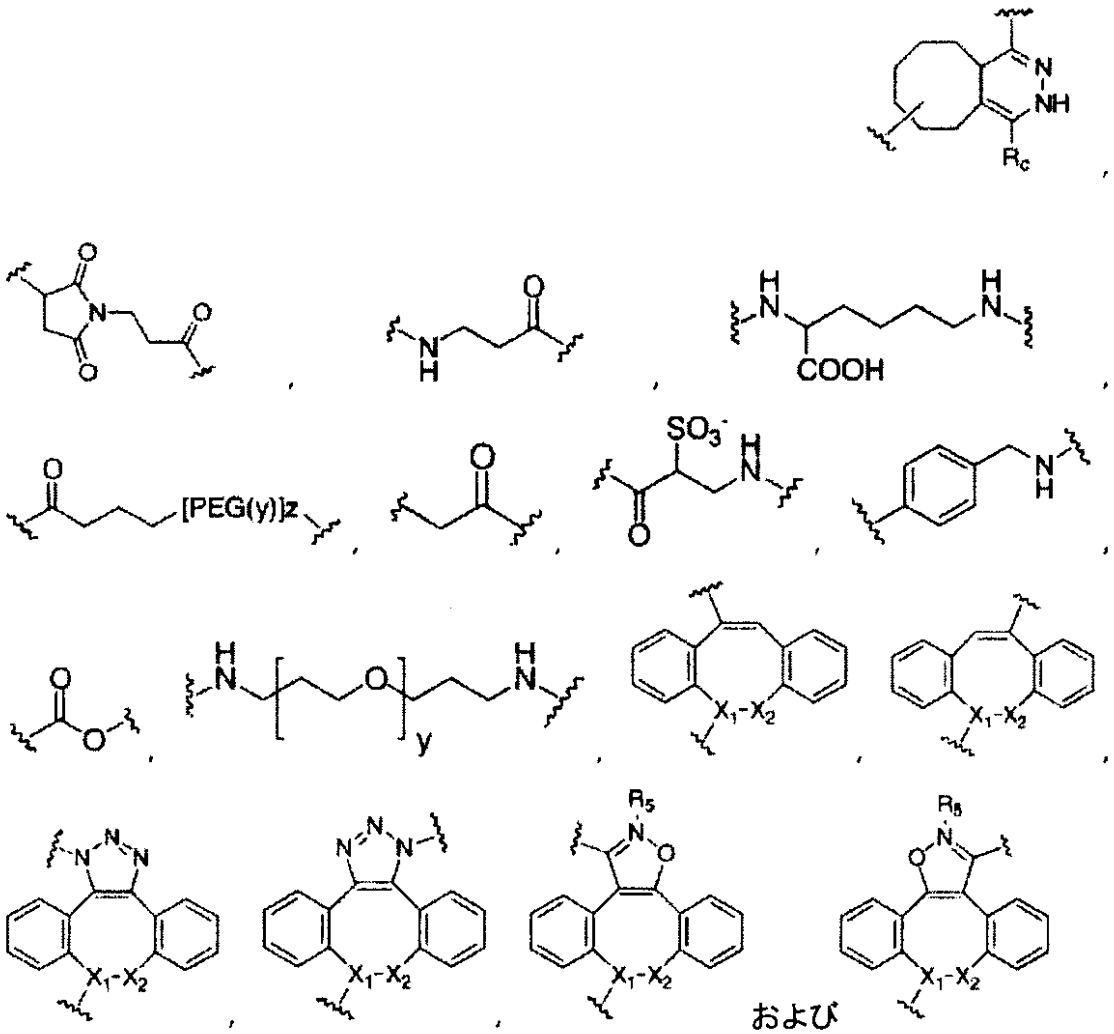


【００９３】
である。
【００９４】
いくつかの態様において、R_2とアルケン二重結合との間の炭素は、
ｉ）単結合でR_2に直接結合し、水素、ハロゲン、任意に置換されていてもよいベンジル、任意に置換されていてもよいアルキル、若しくは任意に置換されていてもよいアルコキシからなる群から独立に選択される２つの置換基で置換されている、又は
ｉｉ）二重結合及び単結合によってR_2に直接結合している。
【００９５】
いくつかの態様において、R_2とアルケン二重結合との間の炭素は、２つの水素で置換されており、単結合でR_2に直接結合している。
【００９６】
いくつかの態様において、R_2とアルケン二重結合との間の炭素は、二重結合及び単結合によってR_2に直接結合している。
【００９７】
いくつかの態様において、R_2とアルケン二重結合との間の炭素は、二重結合及び単結合によってR_2に直接結合して、任意の位置で任意に置換されていてもよいフェニル環を形成する。
【００９８】
いくつかの態様において、R_2は、
【００９９】
【化３０】

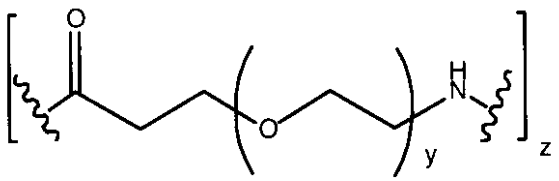


【０１００】
であり、R_2は、ＪによってＡ又はＢに結合しており、
Ｊは、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、
【０１０１】

【化３１】

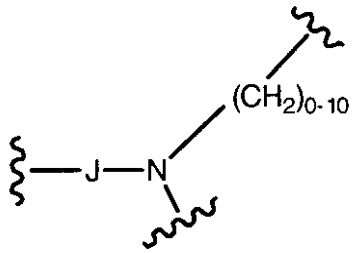


【０１０２】
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）
からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の
【０１０３】
【化３２】



【０１０４】
である。
【０１０５】
いくつかの態様において、R_2は、
【０１０６】

【化３３】



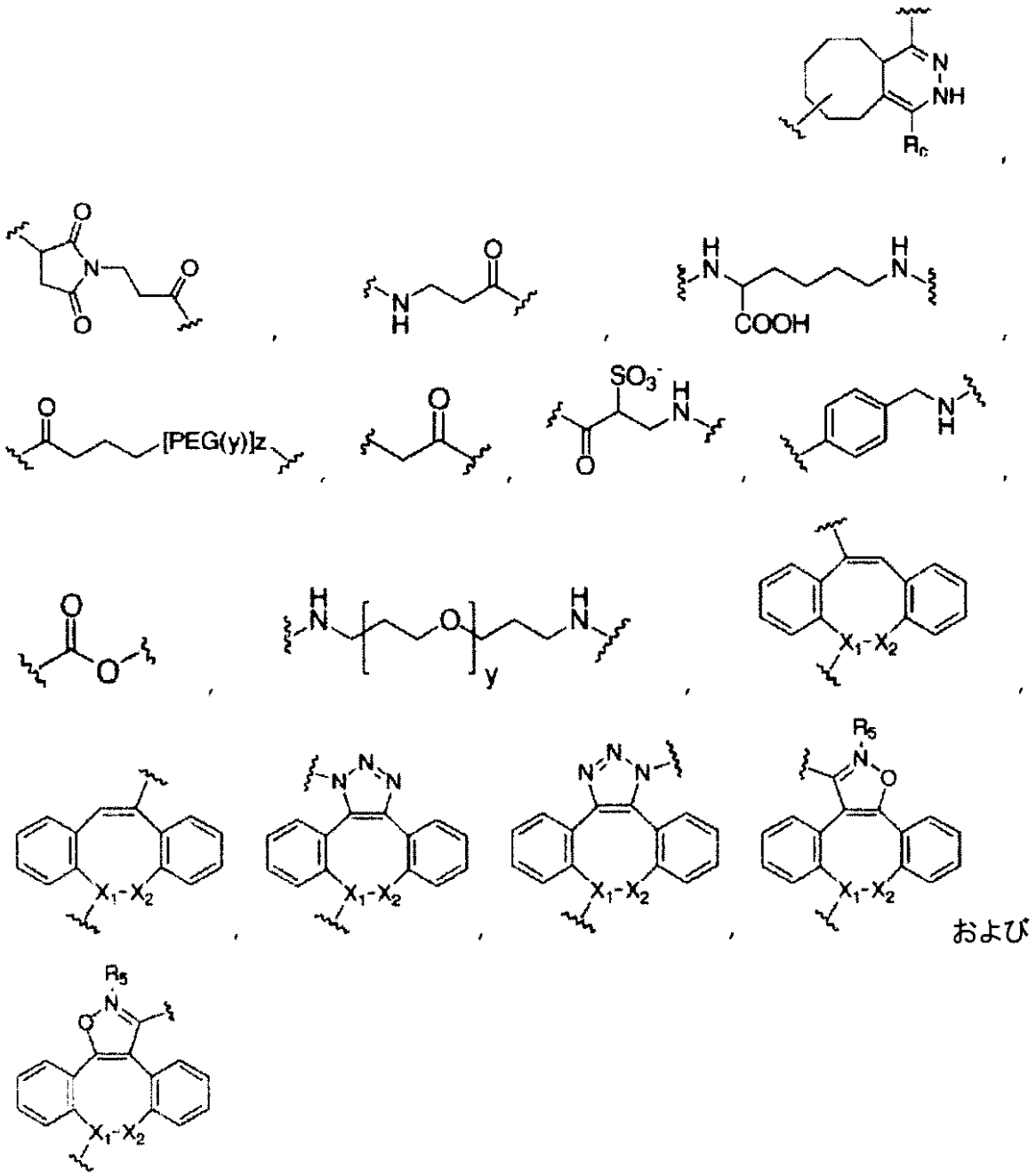
【０１０７】

であり、R_2は、ＪによってＡ又はＢに結合し、R_2の窒素原子によってR_1に結合しており、

Ｊは、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

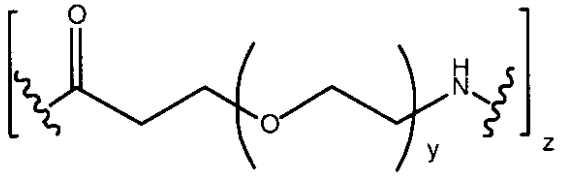
【０１０８】

【化３４】

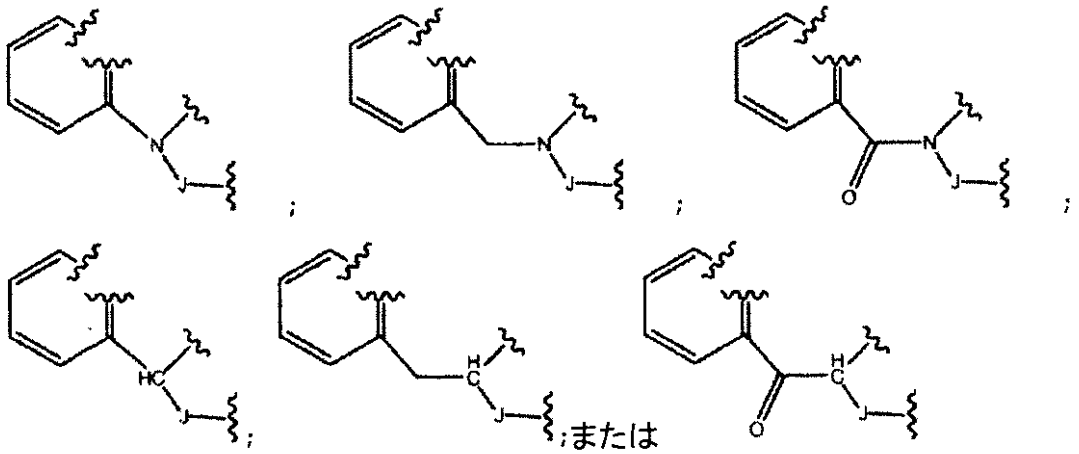


【０１０９】
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）
からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の
【０１１０】

【化３５】

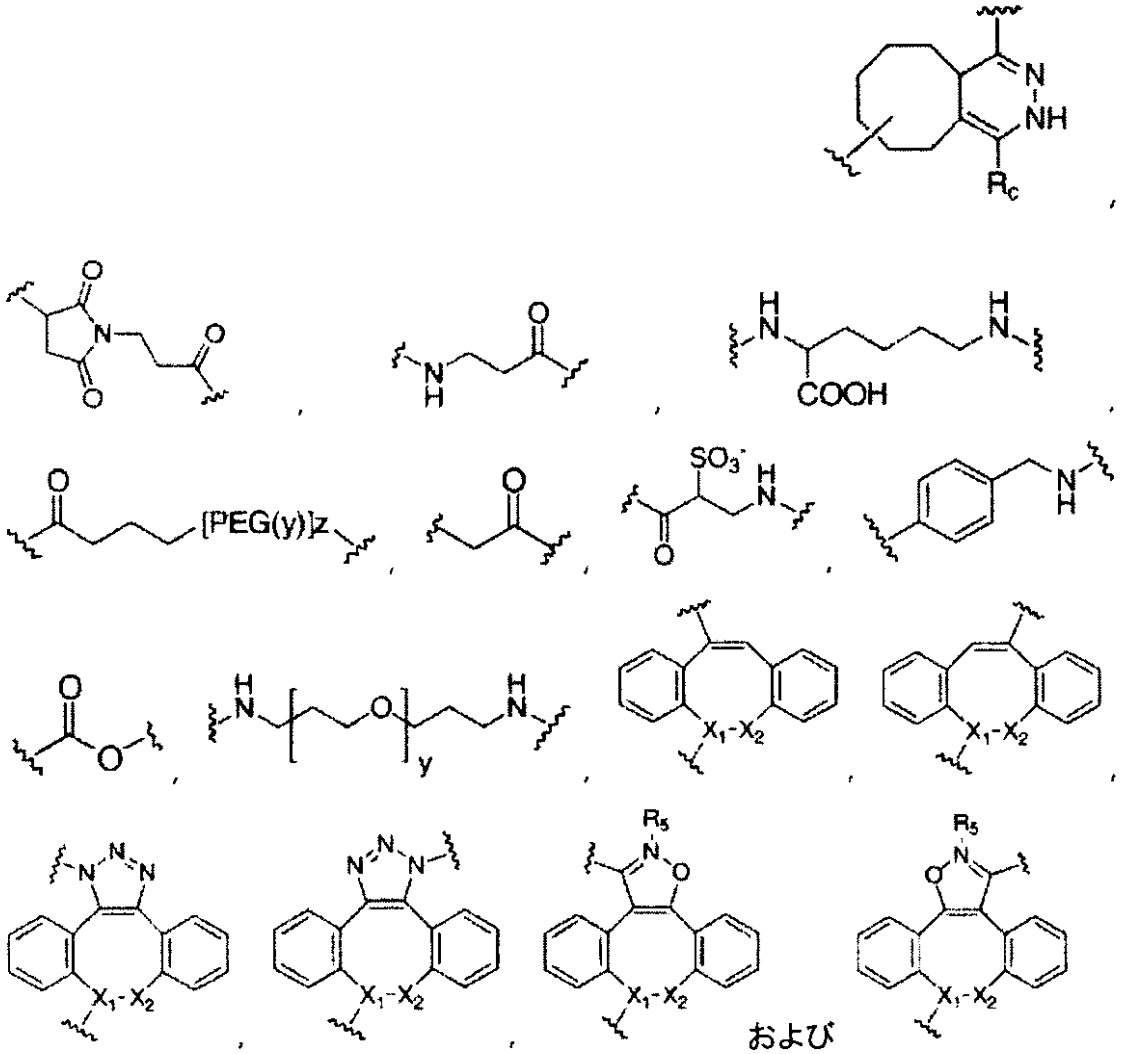


【０１１１】
である。
【０１１２】
いくつかの態様において、R_2は、任意の位置で任意に置換されていてもよい、
【０１１３】
【化３６】

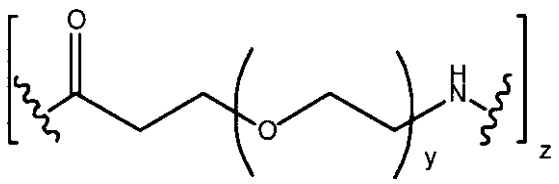


【０１１４】
であり、R_2の窒素原子又は炭素原子によってR_1に結合しており、
R_2は、Ｊによって Ａ又はＢに結合しており、
Ｊは、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、
【０１１５】

【化３７】

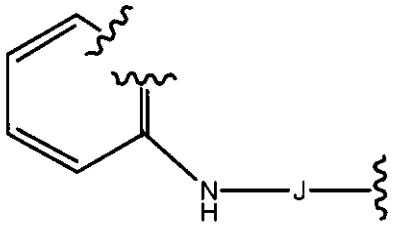


【０１１６】
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）
からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の
【０１１７】
【化３８】

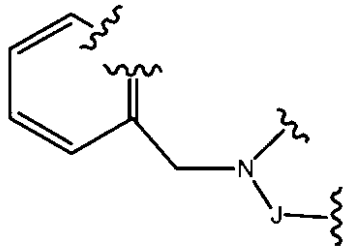


【０１１８】
である。
【０１１９】
いくつかの態様において、R_2は、任意の位置で任意に置換されていてもよい

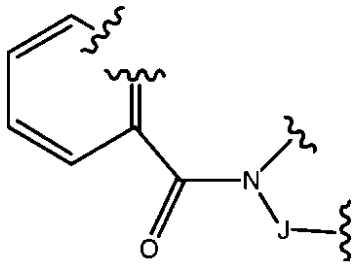
【０１２０】
【化３９】



【０１２１】
である。
【０１２２】
いくつかの態様において、R_2は、任意の位置で任意に置換されていてもよい
【０１２３】
【化４０】

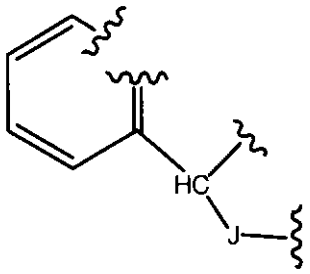


【０１２４】
である。
【０１２５】
いくつかの態様において、R_2は、任意の位置で任意に置換されていてもよい
【０１２６】
【化４１】

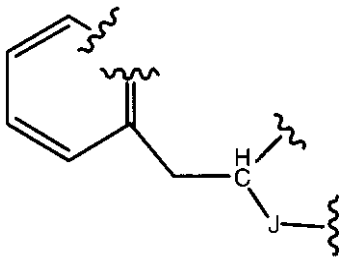


【０１２７】
である。
【０１２８】
いくつかの態様において、R_2は、任意の位置で任意に置換されていてもよい
【０１２９】

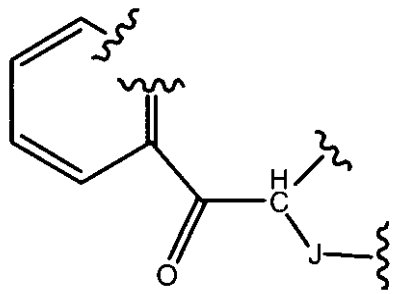
【化４２】



【０１３０】
である。
【０１３１】
いくつかの態様において、R_2は、任意の位置で任意に置換されていてもよい
【０１３２】
【化４３】

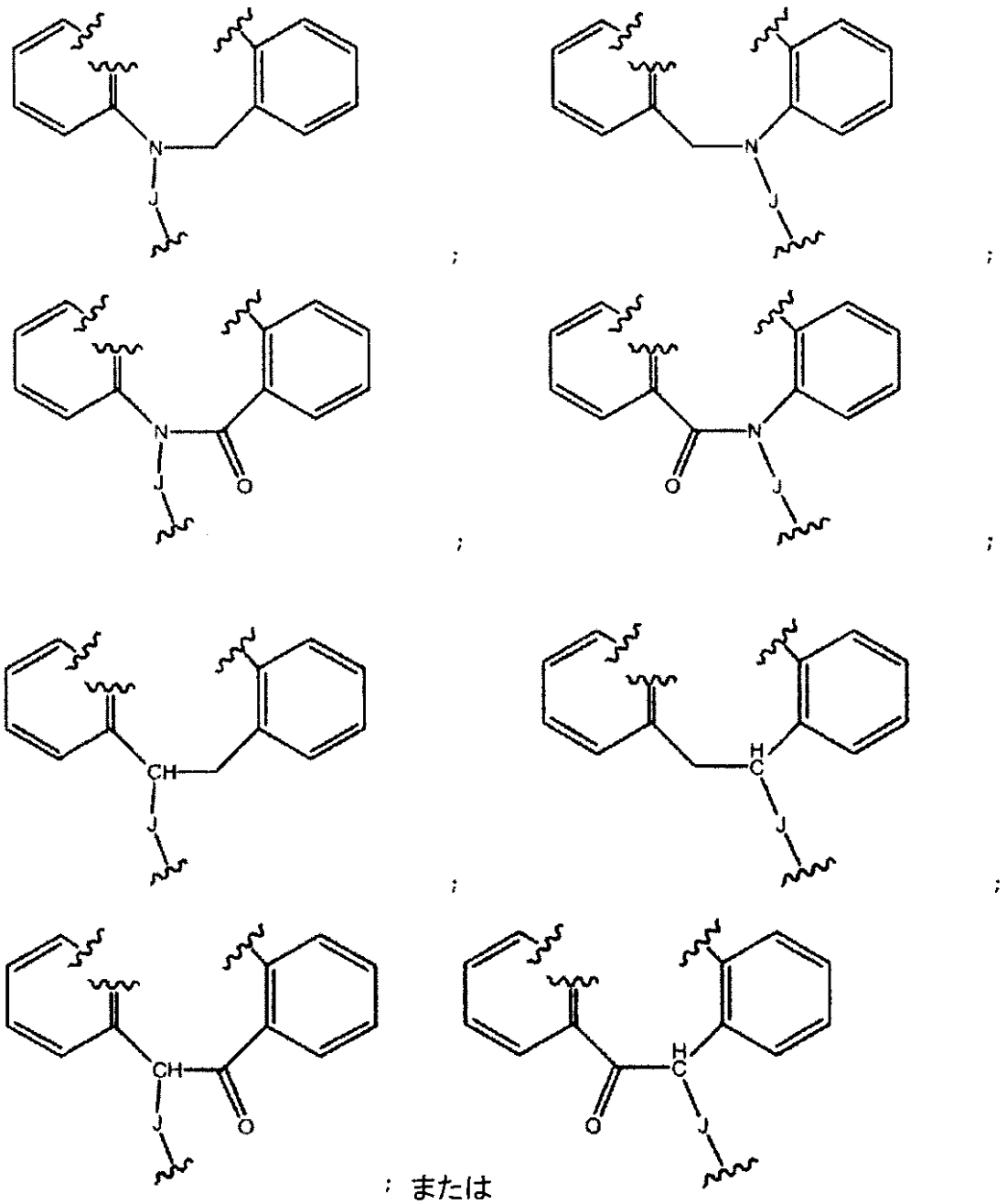


【０１３３】
である。
【０１３４】
いくつかの態様において、R_2は、任意の位置で任意に置換されていてもよい
【０１３５】
【化４４】



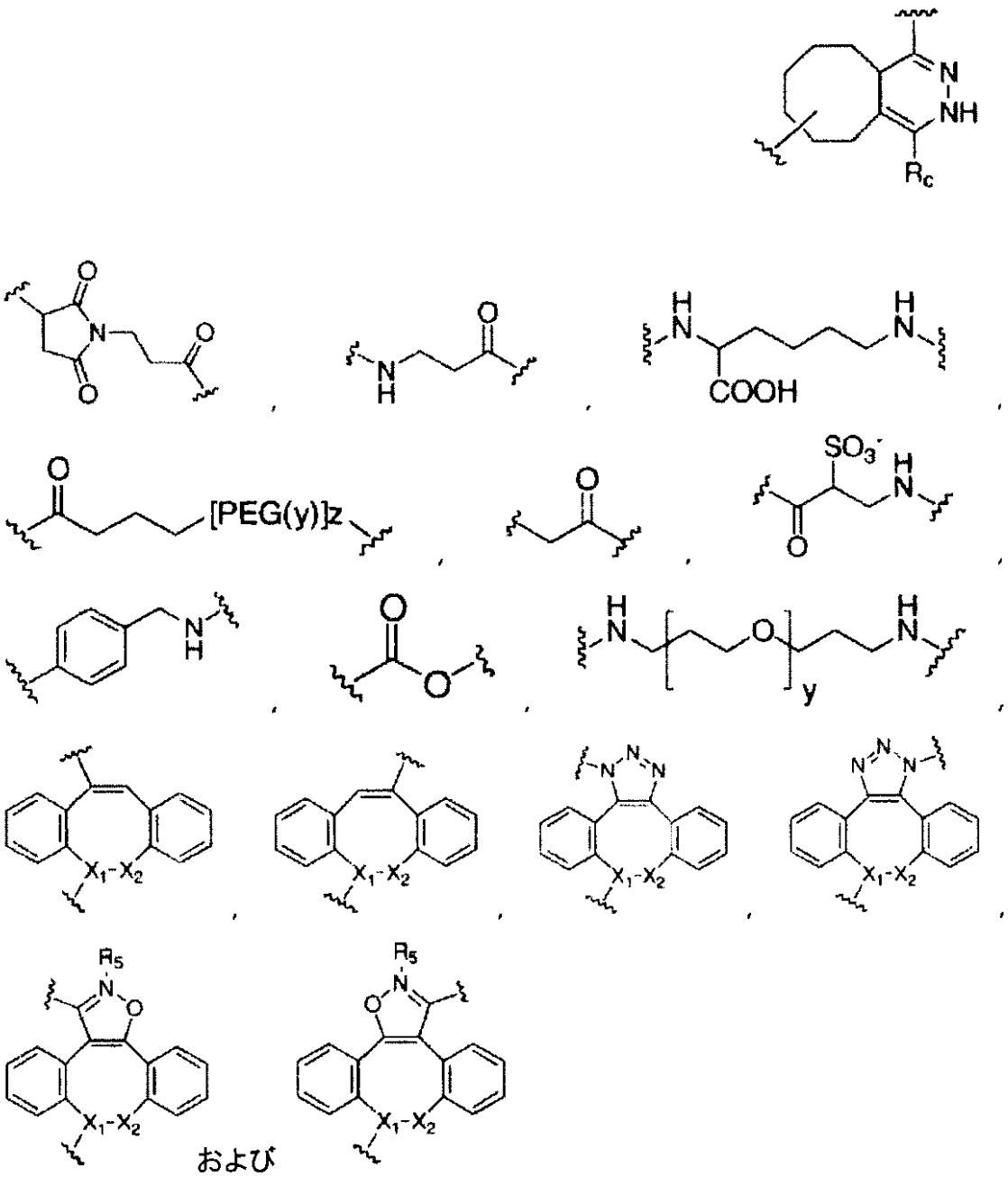
【０１３６】
である。
【０１３７】
いくつかの態様において、１つにまとまったR_1及びR_2は、任意の位置で任意に置換されていてもよい、
【０１３８】

【化４５】



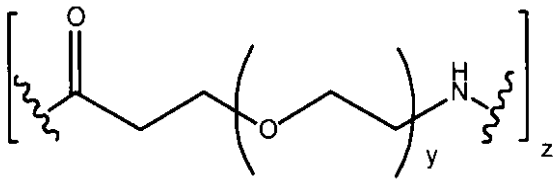
【０１３９】
であり、
Ｊは、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、
【０１４０】

【化４６】

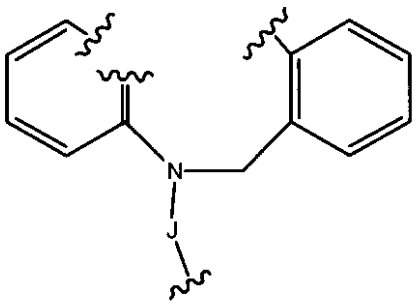


【０１４１】
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）
からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の
【０１４２】

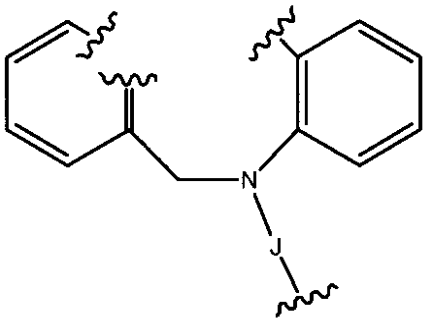
【化４７】



【０１４３】
である。
【０１４４】
いくつかの態様において、１つにまとまったＲ$_1$及びＲ$_2$は、任意の位置で任意に置換されていてもよい
【０１４５】
【化４８】

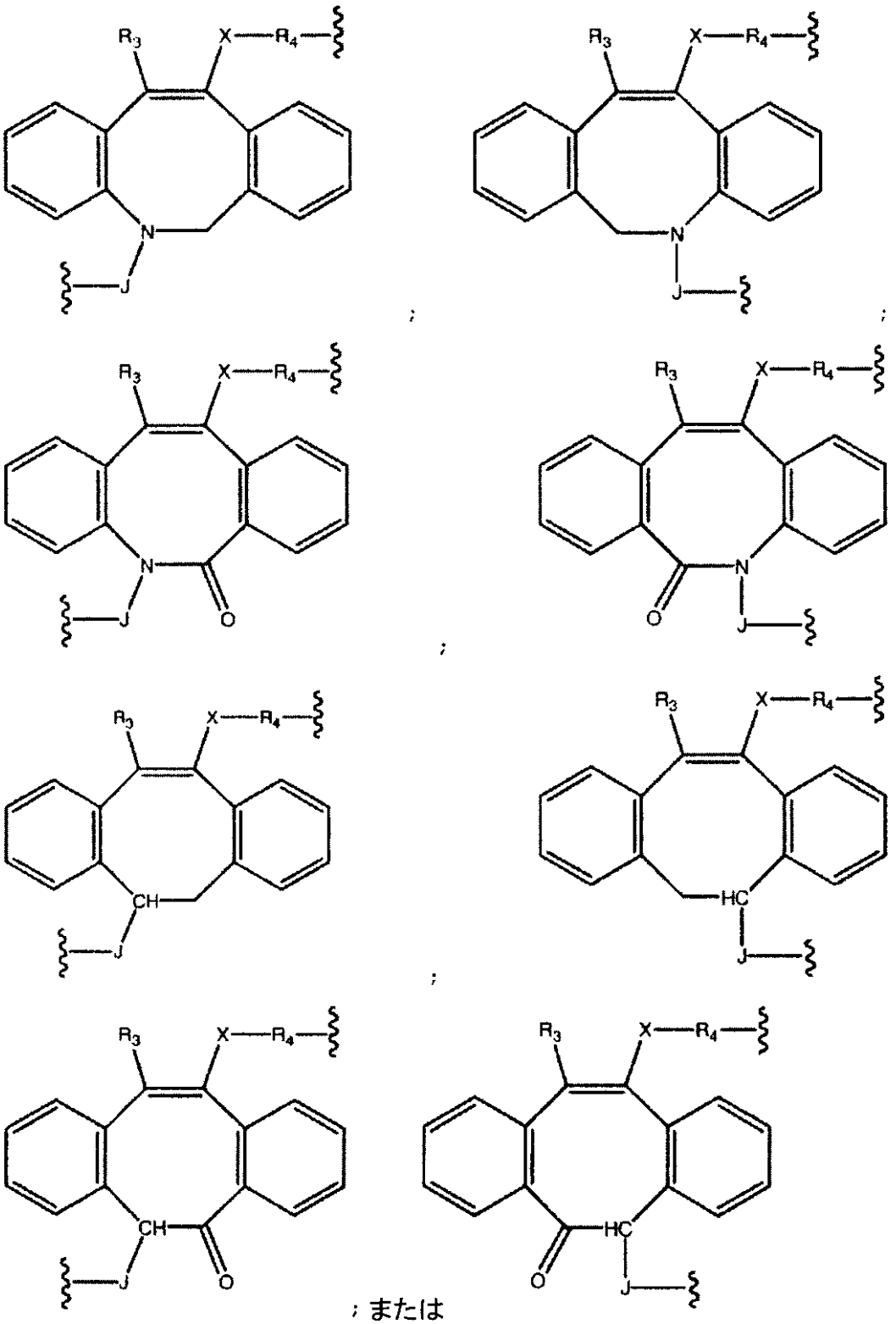


【０１４６】
である。
【０１４７】
いくつかの態様において、１つにまとまったＲ$_1$及びＲ$_2$は、任意の位置で任意に置換されていてもよい
【０１４８】
【化４９】



【０１４９】
である。
【０１５０】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、任意の位置で任意に置換されていてもよい以下の構造
【０１５１】

【化５０】



；または

【０１５２】

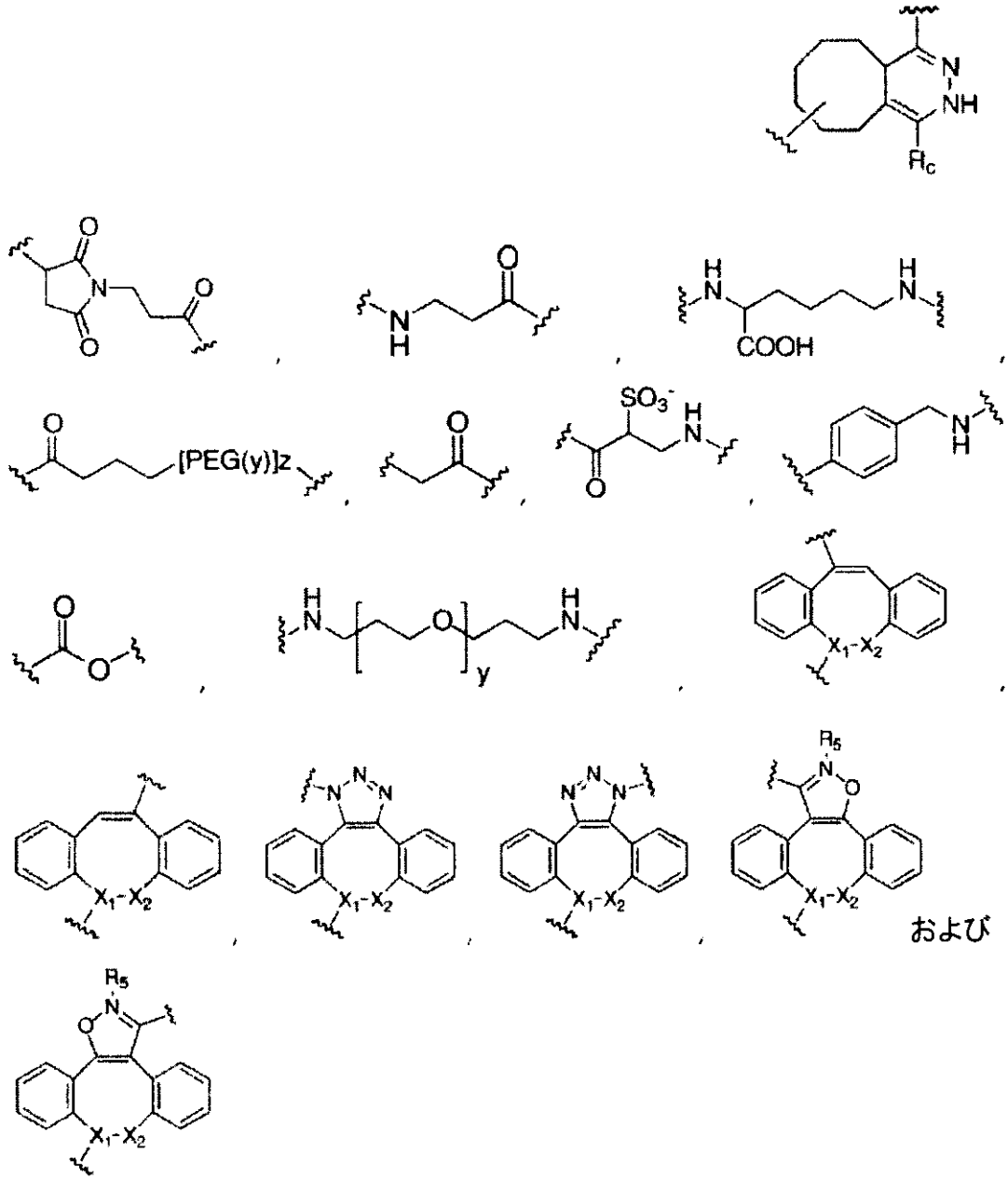
を含む非ペプチジル結合を表し、

Ｊは、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸

素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

【０１５３】

【化５１】



【０１５４】

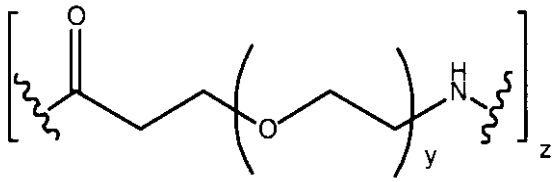
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）

からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、

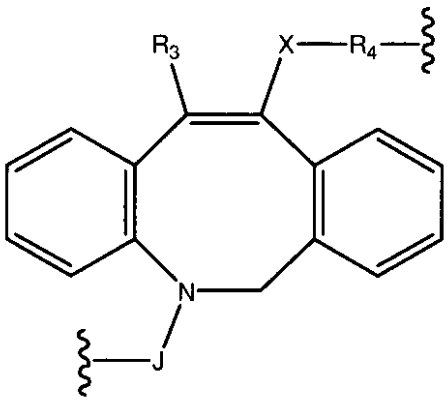
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の

【０１５５】

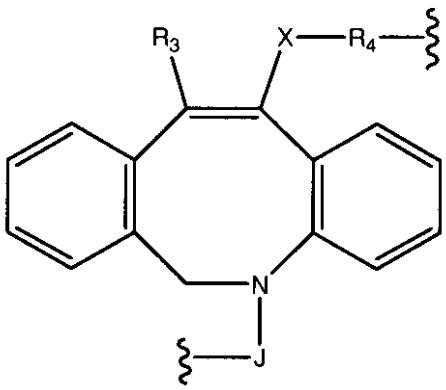
【化５２】



【０１５６】
である。
【０１５７】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、任意の位置で任意に置換されていてもよい以下の構造
【０１５８】
【化５３】

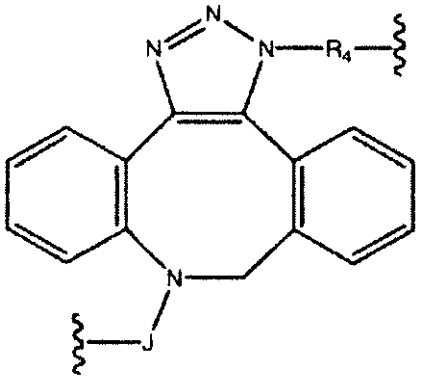
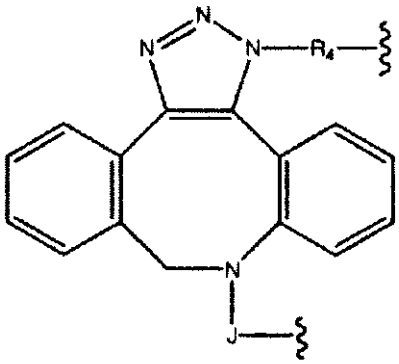
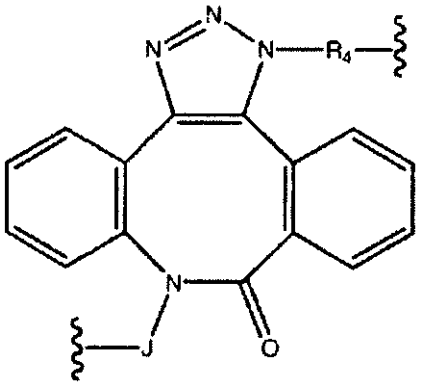
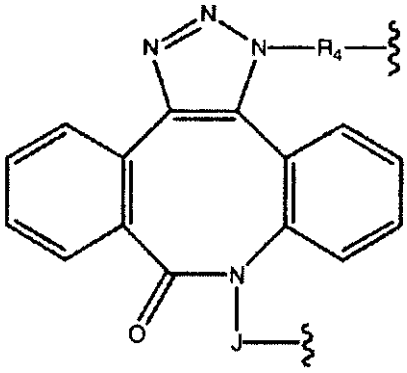
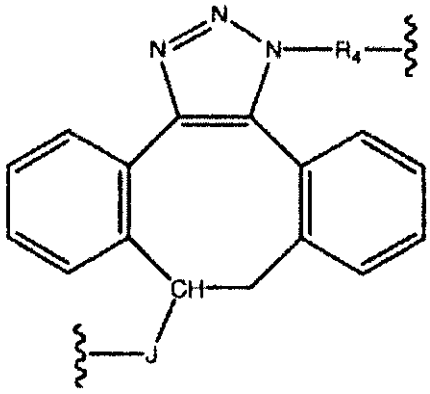
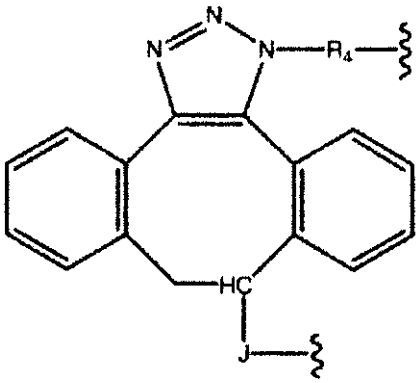
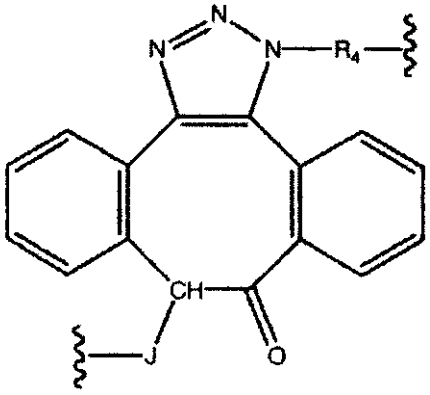
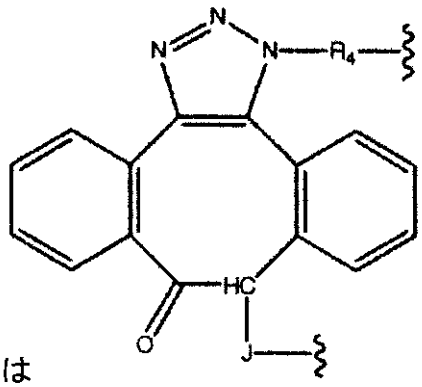


【０１５９】
を含む非ペプチジル結合を表す。
【０１６０】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、任意の位置で任意に置換されていてもよい以下の構造
【０１６１】
【化５４】



【０１６２】
を含む非ペプチジル結合を表す。
【０１６３】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、任意の位置で任意に置換されていてもよい以下の構造

【０１６４】
【化５５】

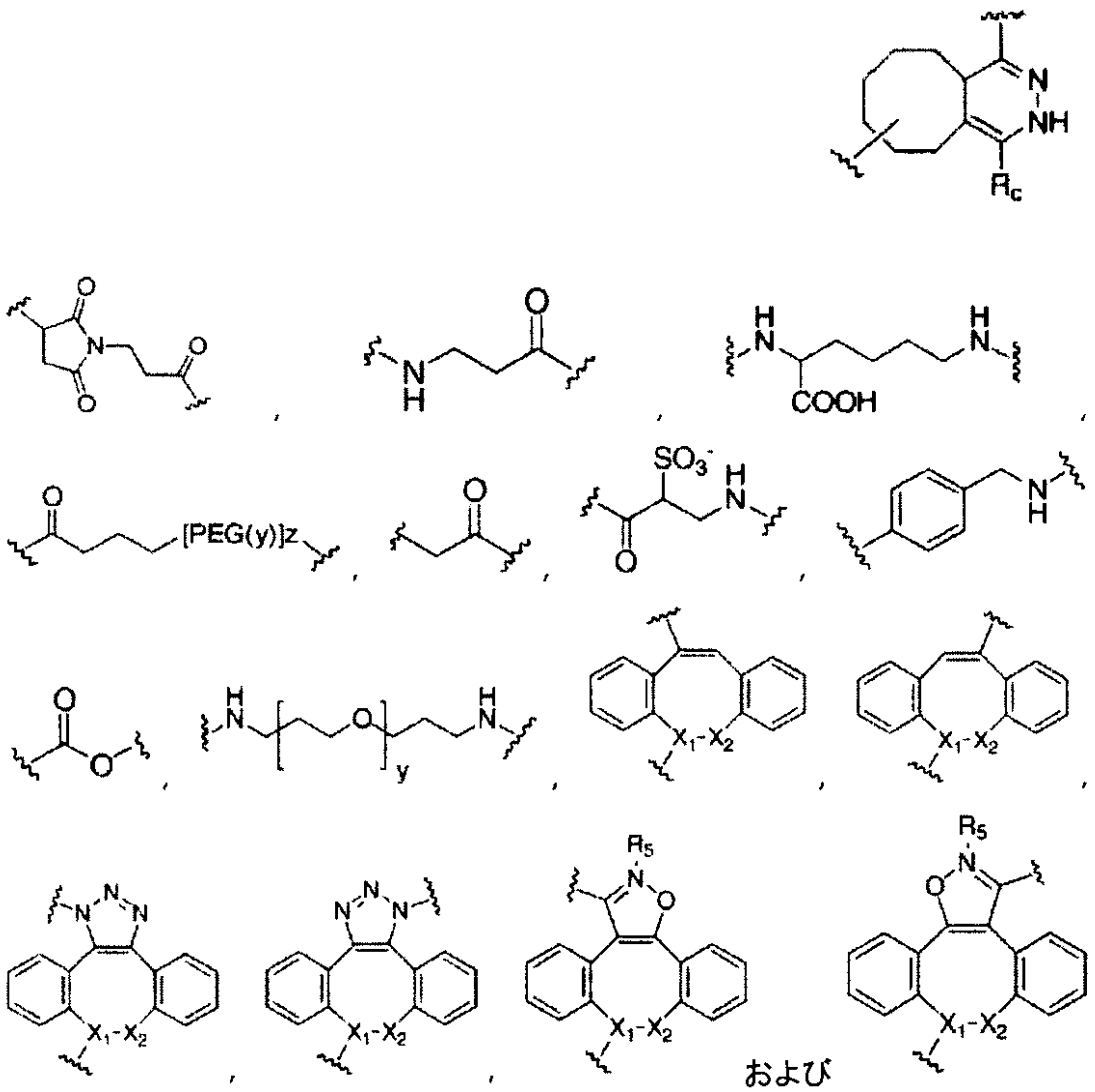

;

;

;

;

;

;

;

;または

【０１６５】
を含む非ペプチジル結合を表し、
Ｊは、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリ

オキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

【０１６６】

【化５６】



および

【０１６７】

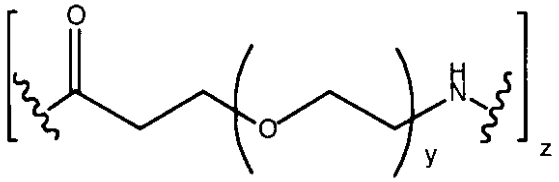
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）

からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、

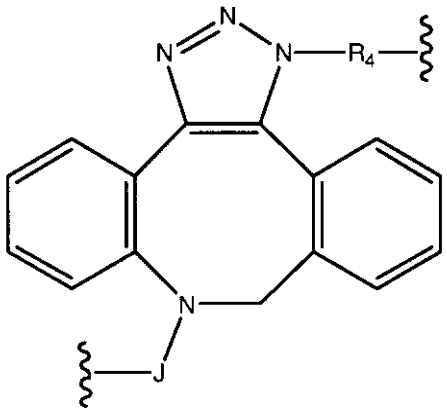
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の

【０１６８】

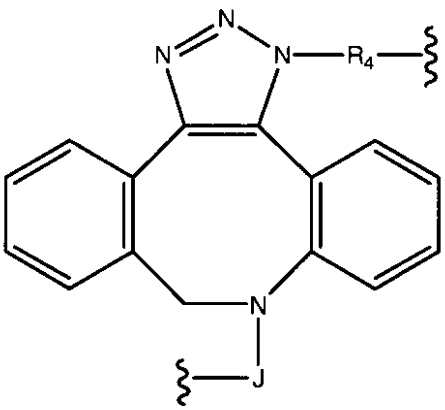
【化５７】



【０１６９】
である。
【０１７０】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、任意の位置で任意に置換されていてもよい以下の構造
【０１７１】
【化５８】



【０１７２】
を含む非ペプチジル結合を表す。
【０１７３】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、任意の位置で任意に置換されていてもよい以下の構造
【０１７４】
【化５９】

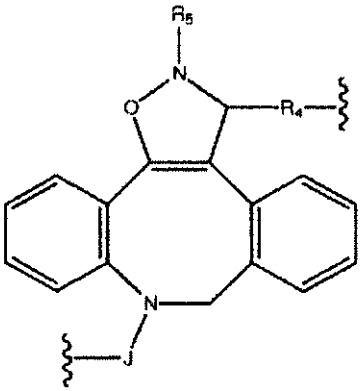


【０１７５】
を含む非ペプチジル結合を表す。
【０１７６】

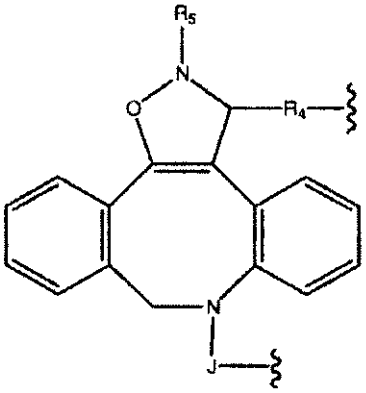
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、任意の位置で任意に置換されていてもよい以下の構造

【０１７７】

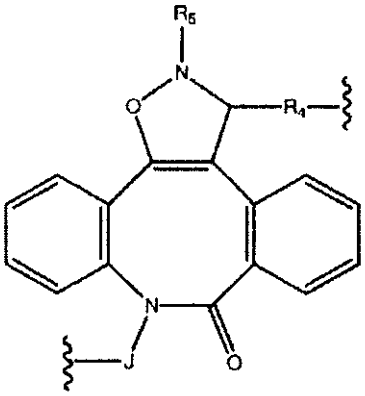
【化６０】



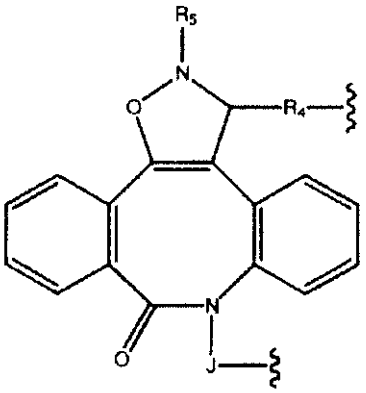
;



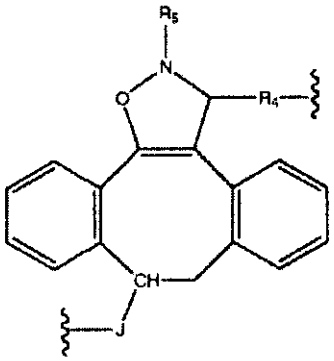
;

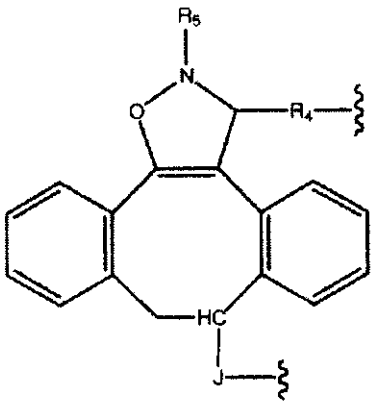


;

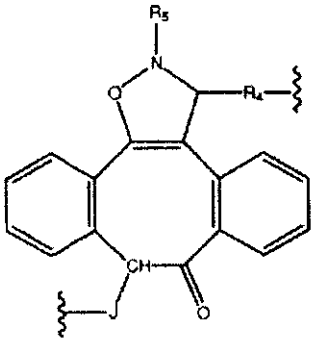


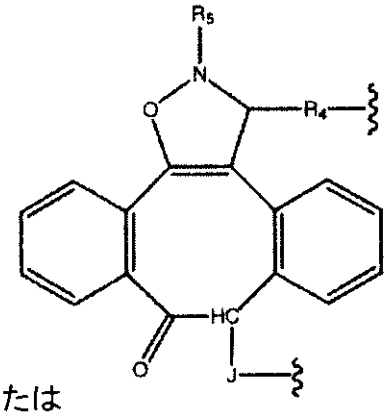
;





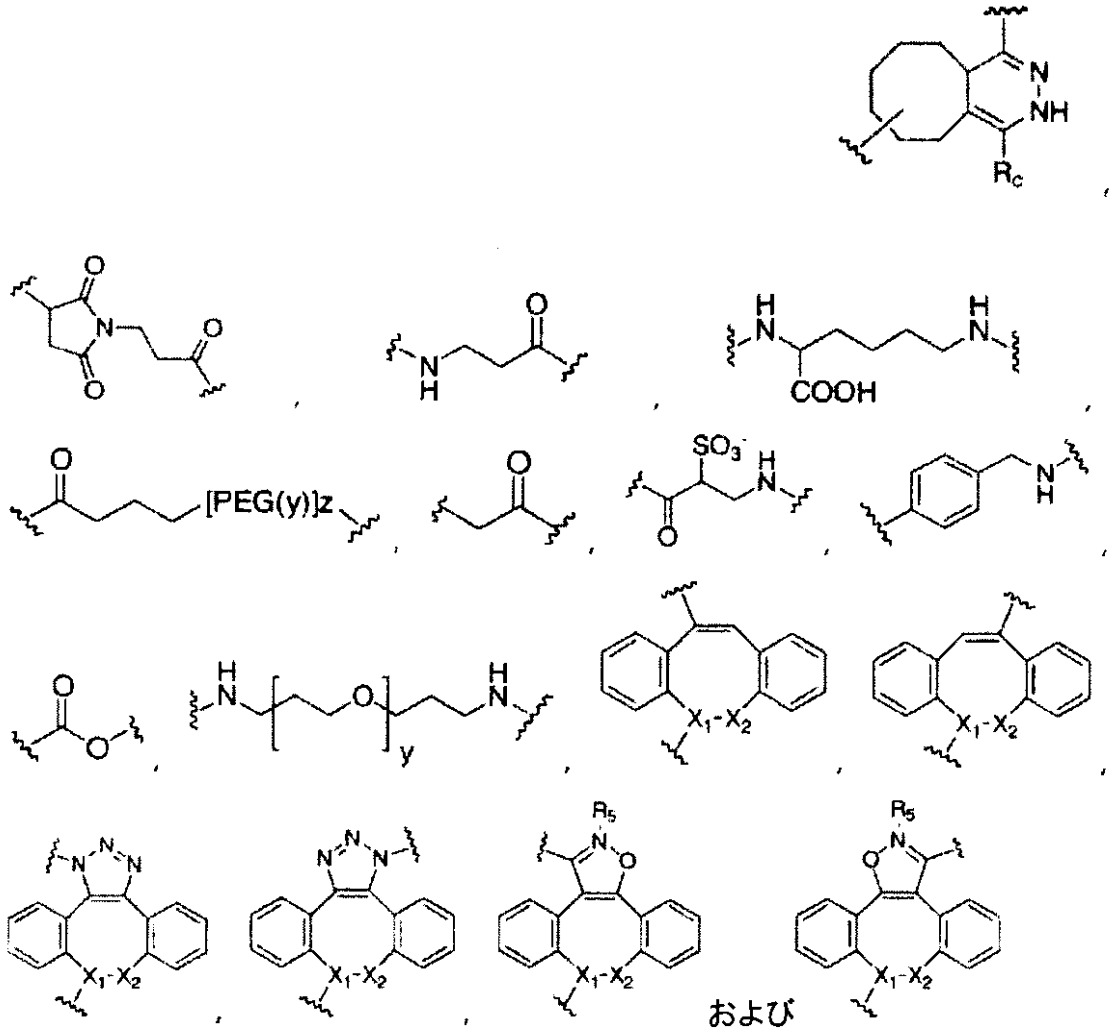
;





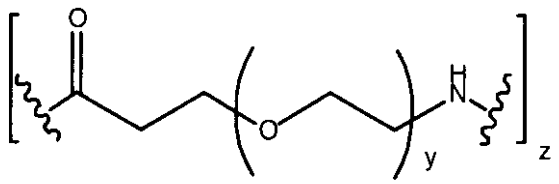
；または

【０１７８】
を含む非ペプチジル結合を表し、
Ｊは、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、
【０１７９】
【化６１】

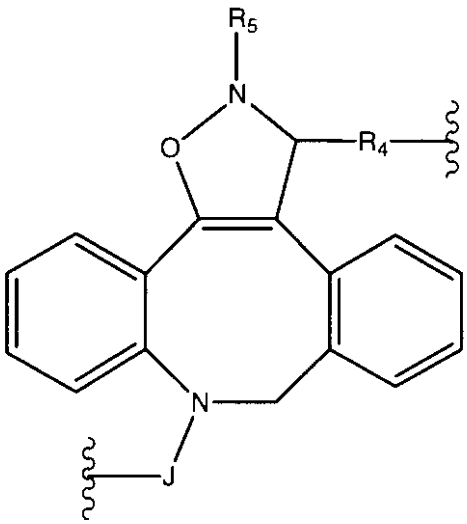


【０１８０】
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）
からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の
【０１８１】

【化６２】

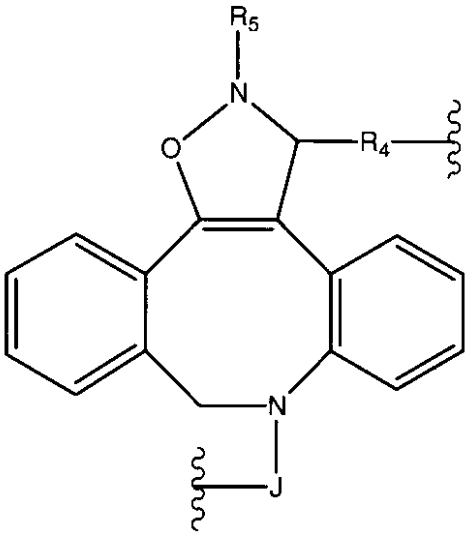


【０１８２】
である。
【０１８３】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、任意の位置で任意に置換されていてもよい以下の構造
【０１８４】
【化６３】



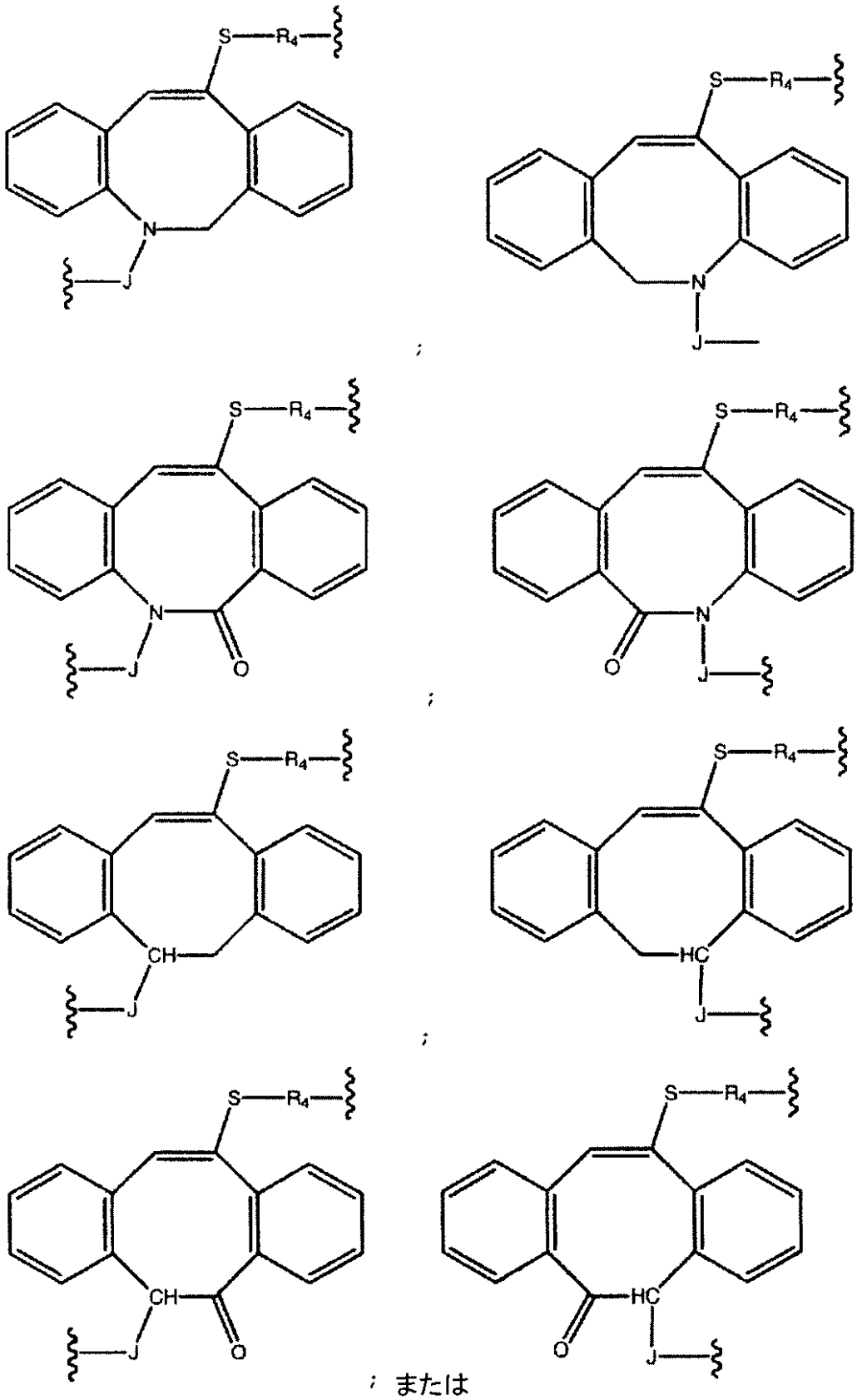
【０１８５】
を含む非ペプチジル結合を表す。
【０１８６】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、任意の位置で任意に置換されていてもよい以下の構造
【０１８７】

【化６４】



【０１８８】
を含む非ペプチジル結合を表す。
【０１８９】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、任意の位置で任意に置換されていてもよい以下の構造
【０１９０】

【化６５】



【０１９１】

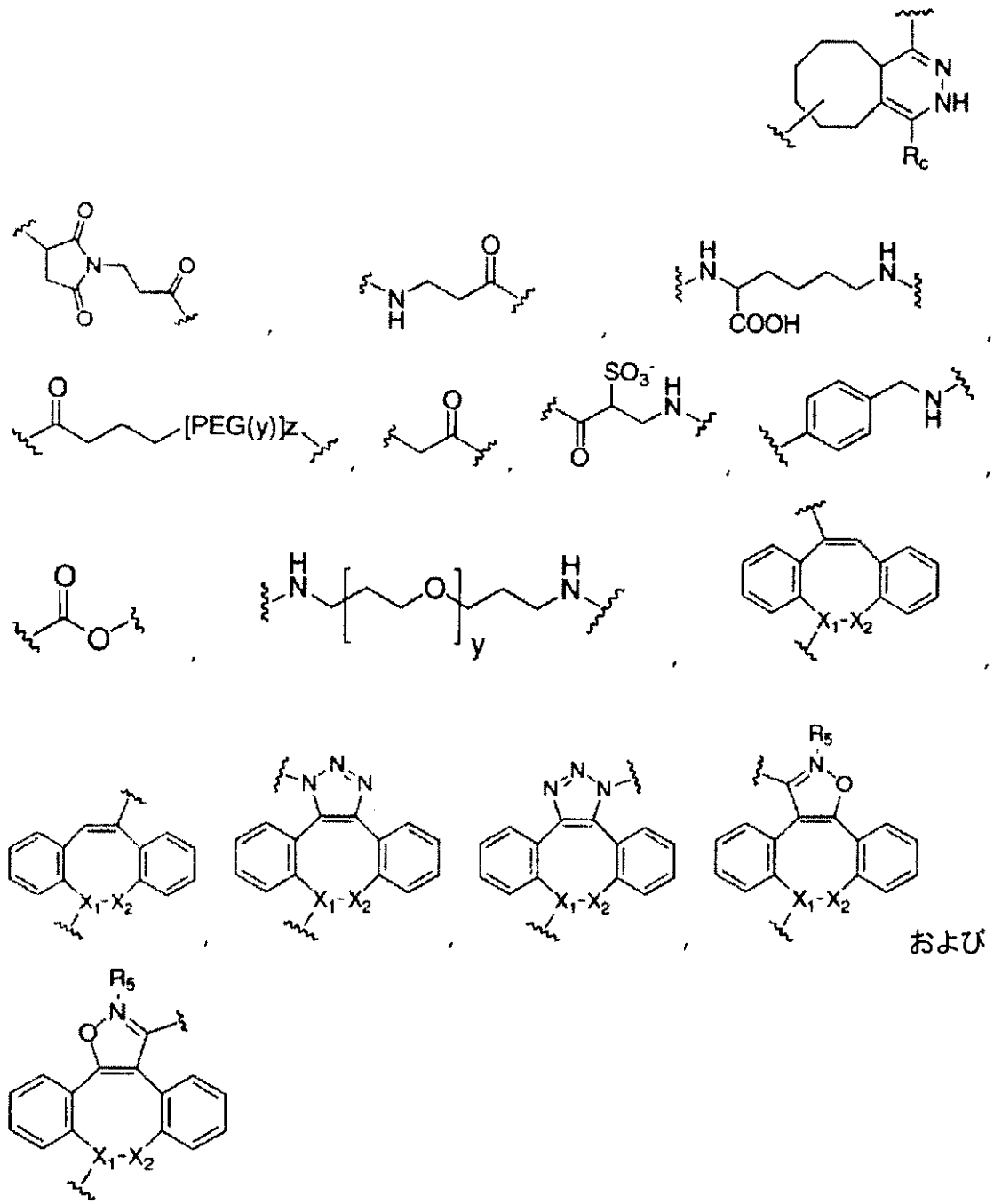
を含む非ペプチジル結合を表し、

Ｊは、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポ

リ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

【０１９２】

【化６６】

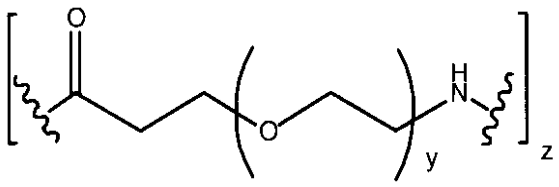


【０１９３】

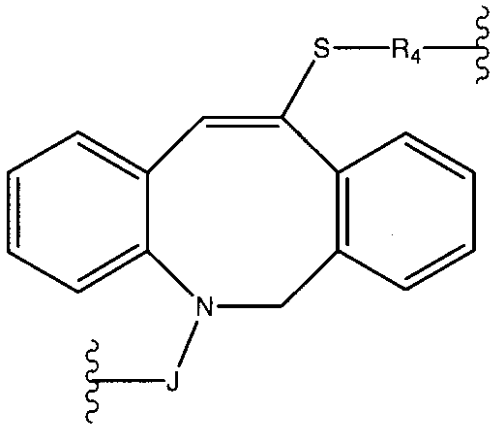
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）

からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９

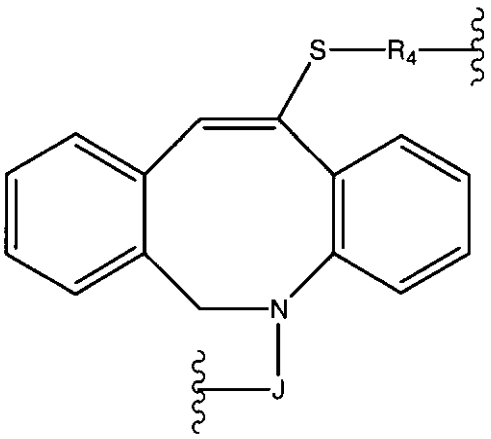
個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の
【０１９４】
【化６７】



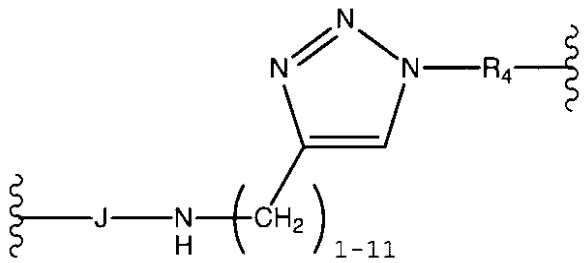
【０１９５】
である。
【０１９６】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、任意の位置で任意に置換されていてもよい以下の構造
【０１９７】
【化６８】



【０１９８】
を含む非ペプチジル結合を表す。
【０１９９】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、任意の位置で任意に置換されていてもよい以下の構造
【０２００】
【化６９】



【０２０１】
を含む非ペプチジル結合を表す。
【０２０２】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造
【０２０３】
【化７０】

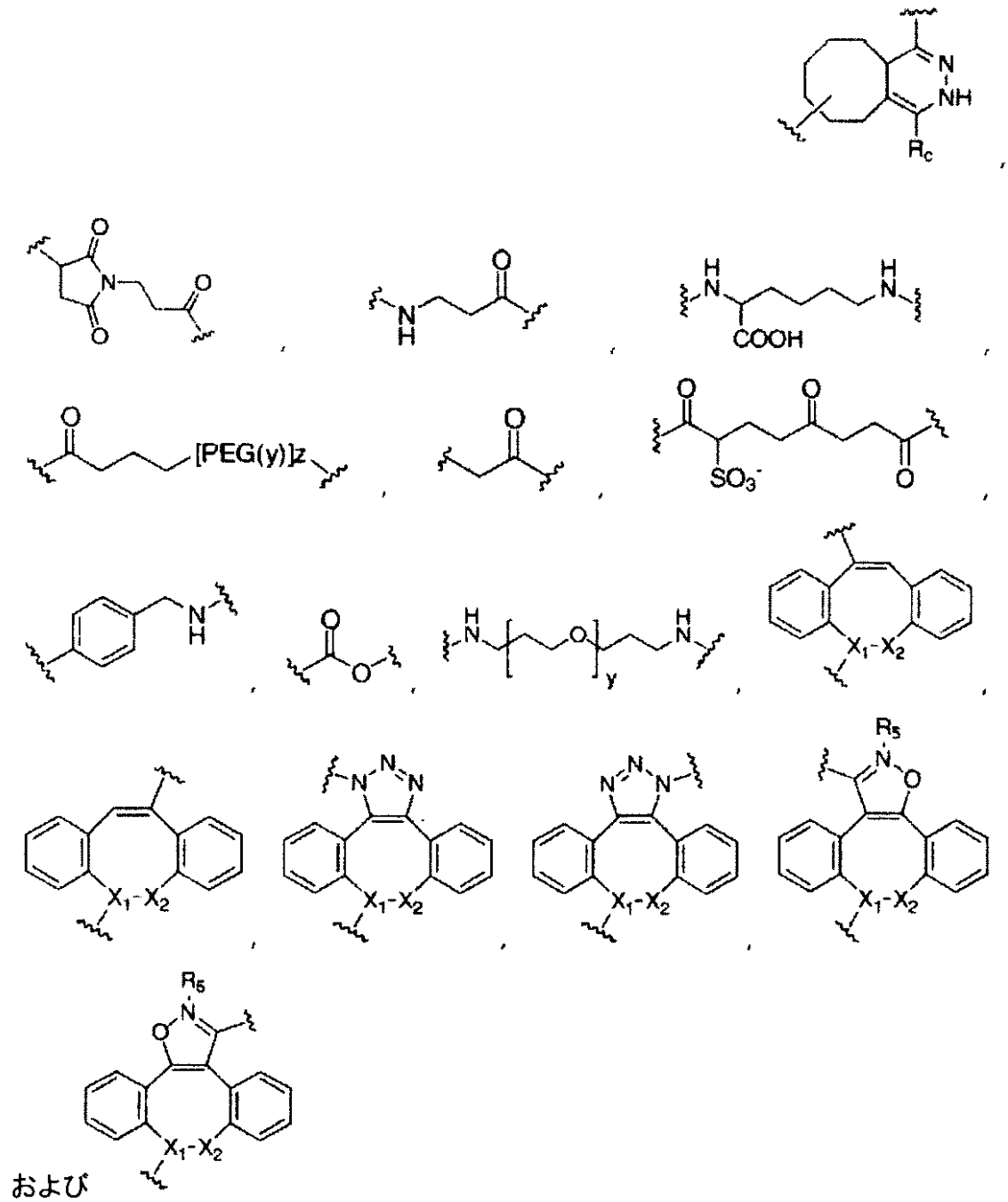


【０２０４】
を含む非ペプチジル結合を表す。
【０２０５】
いくつかの態様において、R_1は、Ｈである。
【０２０６】
いくつかの態様において、Ｊは、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基を含む有機構造である。
【０２０７】
いくつかの態様において、Ｊは、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、又は多糖基を含む有機構造である。
【０２０８】
いくつかの態様において、Ｊは、C_1～C_4アルキル基を含む有機構造である。
【０２０９】
いくつかの態様において、Ｊは、スクシンイミドを含む有機構造である。
【０２１０】
いくつかの態様において、Ｊは、アミンを含む有機構造である。
【０２１１】
いくつかの態様において、Ｊは、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、又はアジポイルを含む有機構造である。
【０２１２】
いくつかの態様において、Ｊは、マロニルを含む有機構造である。
【０２１３】
いくつかの態様において、Ｊは、アミノ酸を含む有機構造である。
【０２１４】
いくつかの態様において、Ｊは、システインを含む有機構造である。
【０２１５】
いくつかの態様において、Ｊは、リシンを含む有機構造である。
【０２１６】
いくつかの態様において、Ｊは、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾー

ルに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

【０２１７】

【化７１】



および

【０２１８】

からなる群から選択される３個種の部分の鎖からなる有機構造である。

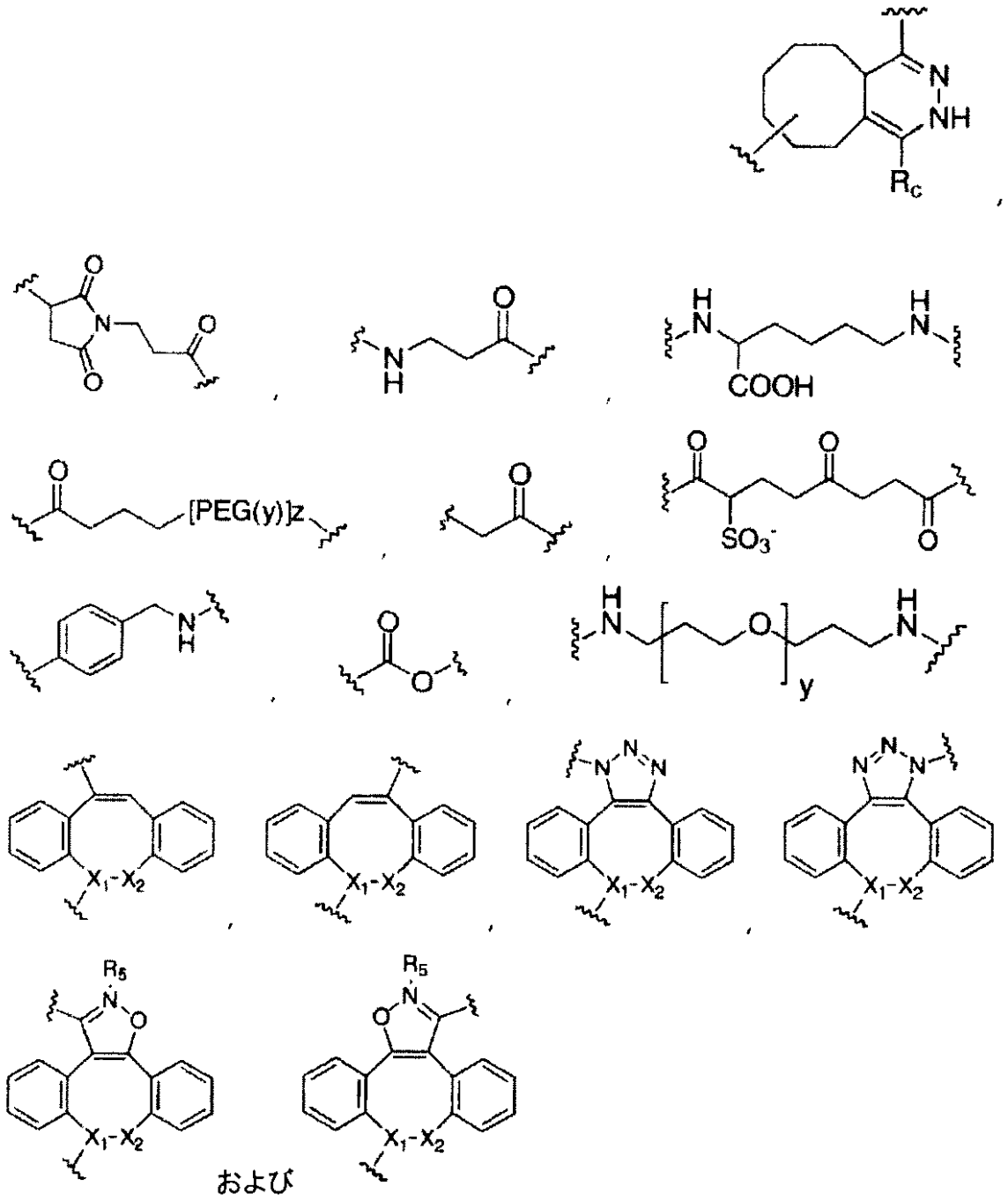
【０２１９】

いくつかの態様において、Ｊは、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニ

ル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

【０２２０】

【化７２】



および

【０２２１】

からなる群から選択される４個の部分の鎖からなる有機構造である。

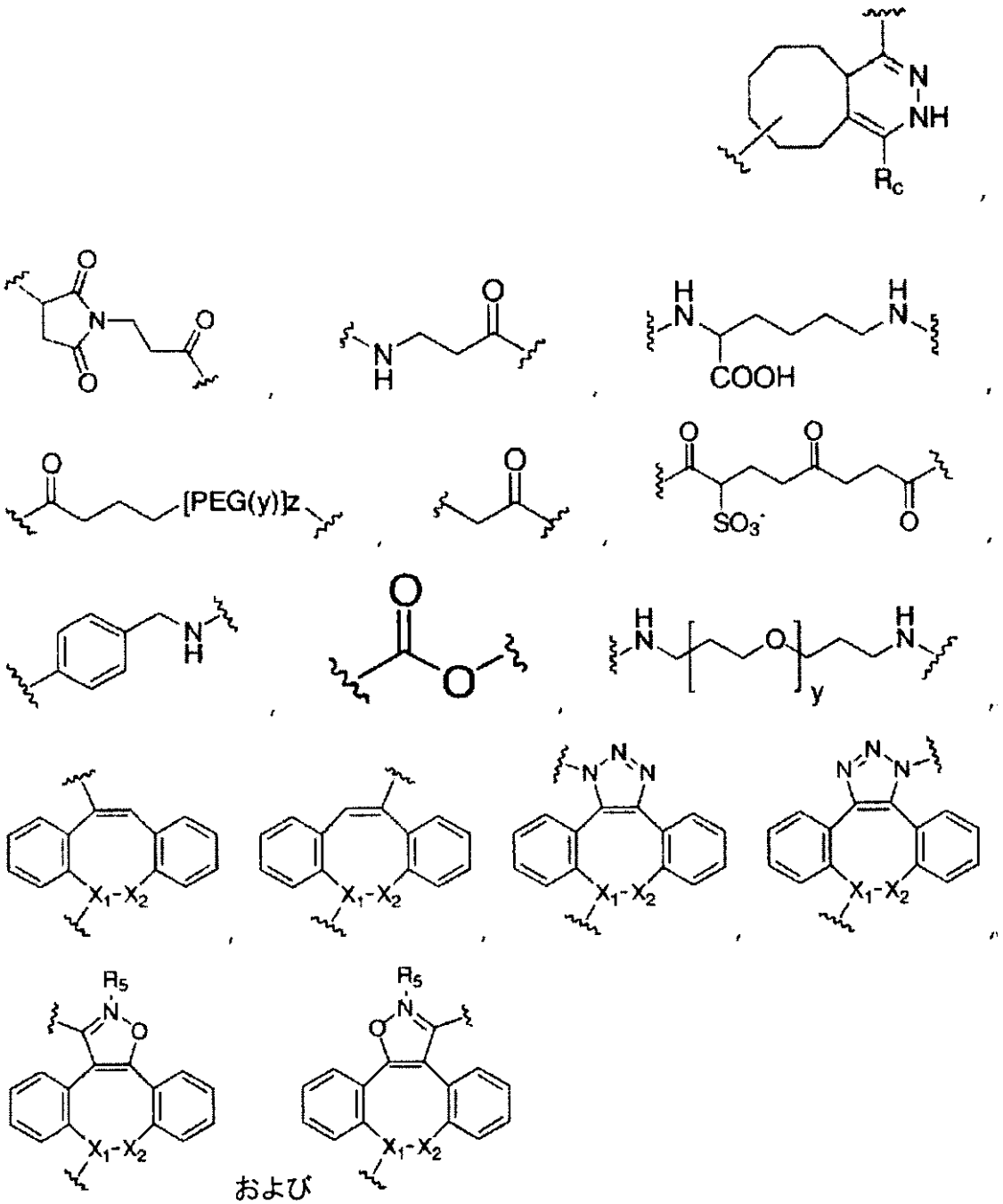
【０２２２】

いくつかの態様において、Ｊは、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、

酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

【０２２３】

【化７３】



【０２２４】

からなる群から選択される５個の部分の鎖からなる有機構造である。

【０２２５】

いくつかの態様において、Ｊは、リシンに結合している［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基を含む。

【０２２６】

いくつかの態様において、Ｊは、スクシンイミド基に結合しているC_1～C_4アシル基を含む。

【０２２７】

いくつかの態様において、Ｊは、C_1～C_4アシルに結合しているリシンを含む。

【０２２８】

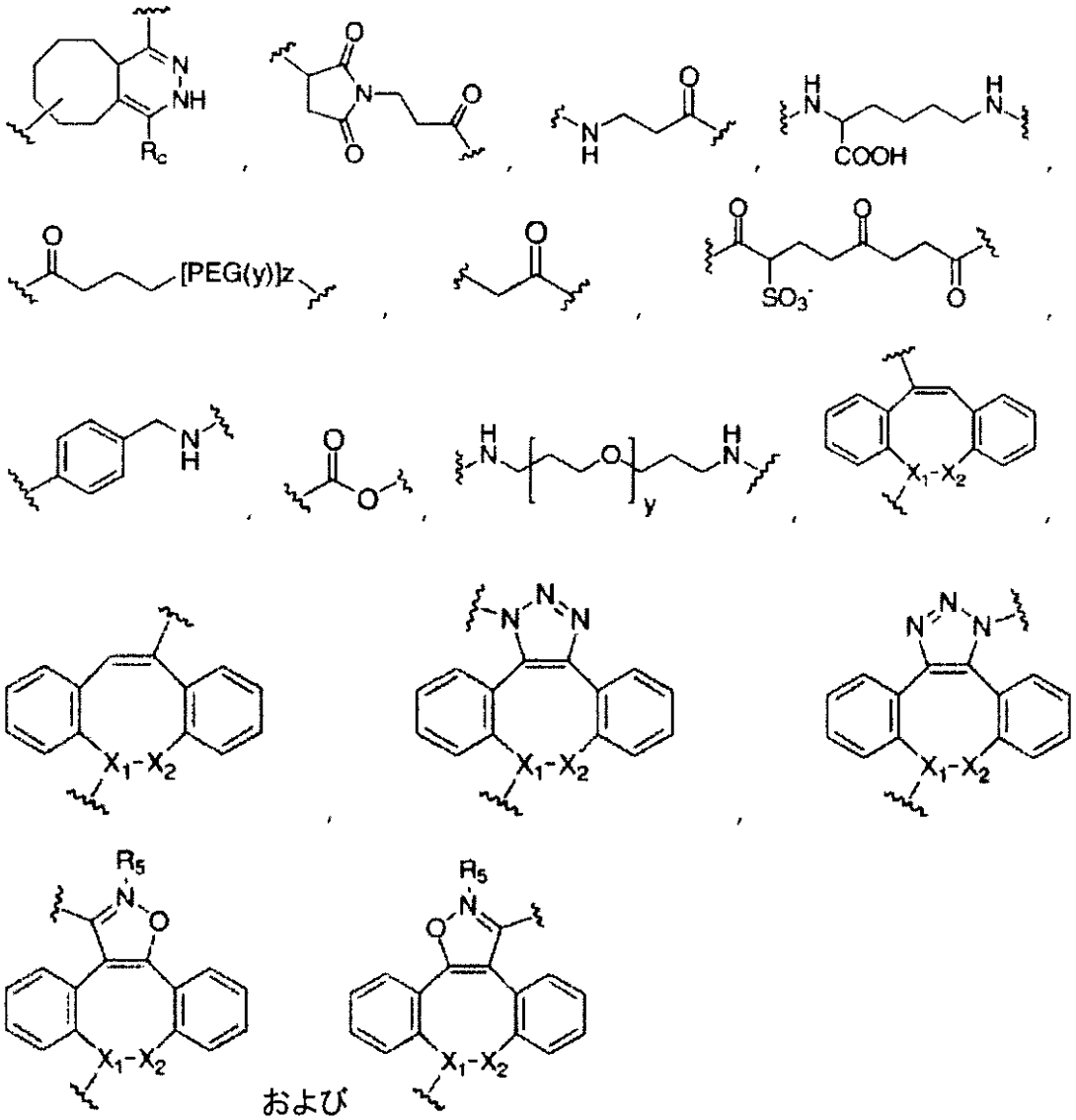
いくつかの態様において、Ｊは、グルタリルに結合している［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基を含む。

【０２２９】

いくつかの態様において、Ｊは、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、C_2～C_5アシル、スクシニル、マロニル、グルタリル、アミノ酸、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

【０２３０】

【化７４】



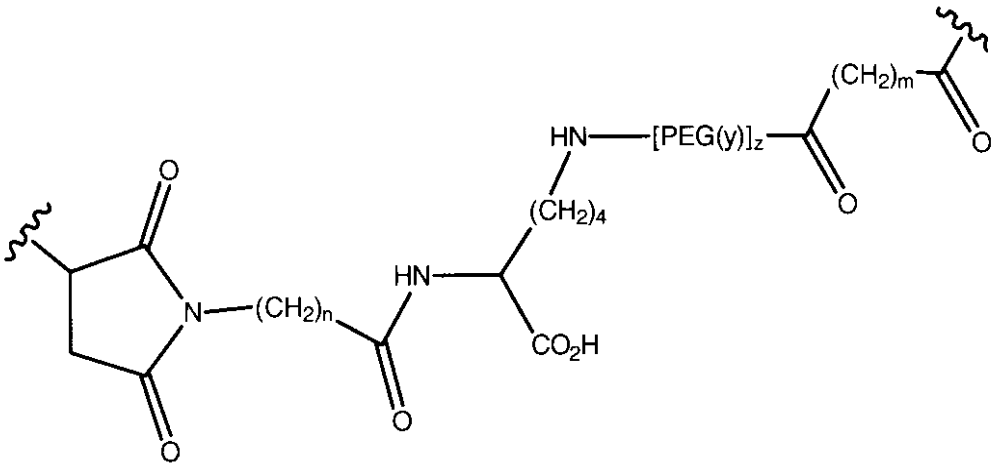
【０２３１】

からなる群から選択される５個の部分の鎖からなる有機構造である。

【０２３２】

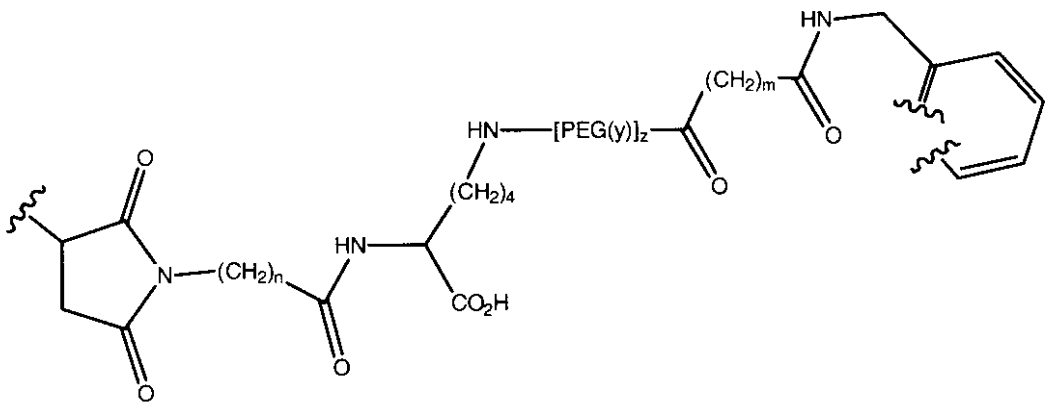
いくつかの態様において、Ｊは、結合である。

【０２３３】
いくつかの態様において、Ｊは、システインである。
【０２３４】
いくつかの態様において、Ｊは、以下の構造
【０２３５】
【化７５】

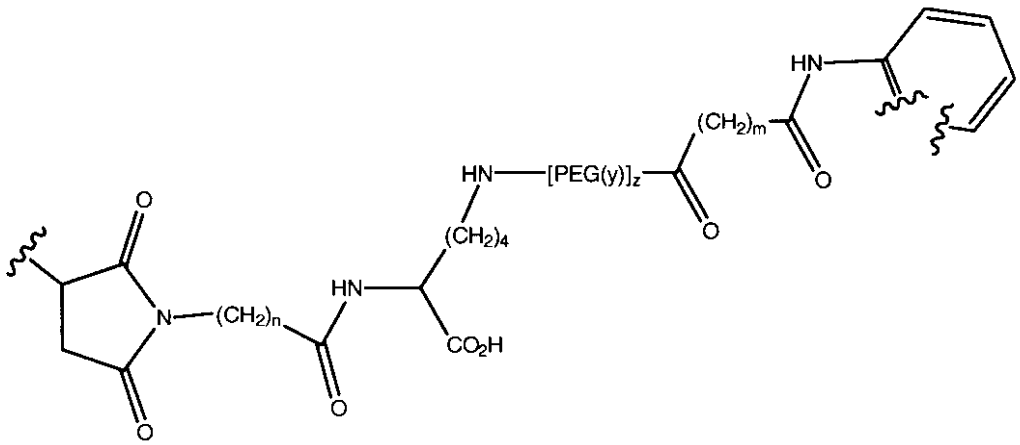


【０２３６】
（ここで、ｎは、１～３であり、ｍは、１～４であり、ｙは、１～１００であり、ｚは、１～１０である）
を有する。
【０２３７】
いくつかの態様において、Ｊは、直鎖状構造を有する。
【０２３８】
いくつかの態様において、Ｊは、分枝構造を有する。
【０２３９】
いくつかの態様において、R_2は、
【０２４０】

【化７６】



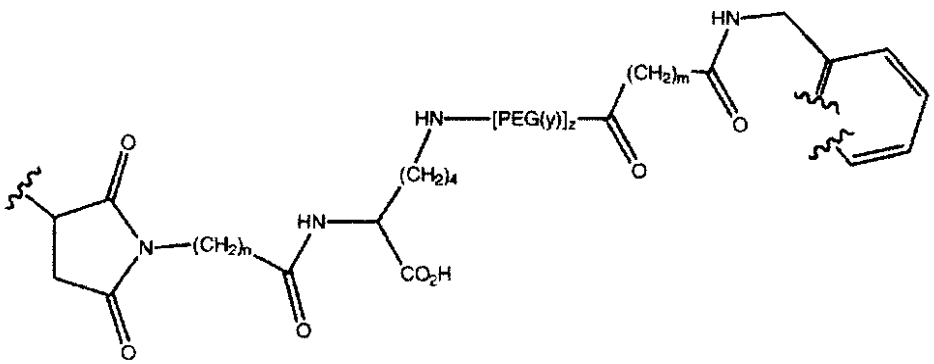
,または



【０２４１】
（ここで、ｎは、１～３であり、ｍは、１～４であり、ｙは、１～１００であり、ｚは、１～１０である）
である。

【０２４２】
いくつかの態様において、R_2は、

【０２４３】
【化７７】



【０２４４】
（ここで、ｎは、１～３であり、ｍは、１～４であり、ｙは、１～１００であり、ｚは、１～１０である）

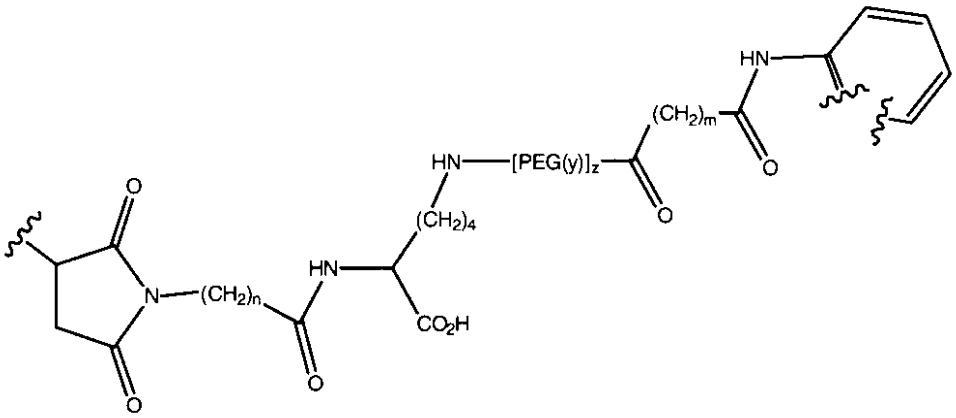
である。

【０２４５】

いくつかの態様において、R_2は、

【０２４６】

【化７８】



【０２４７】

（ここで、ｎは、１～３であり、ｍは、１～４であり、ｙは、１～１００であり、ｚは、１～１０である）

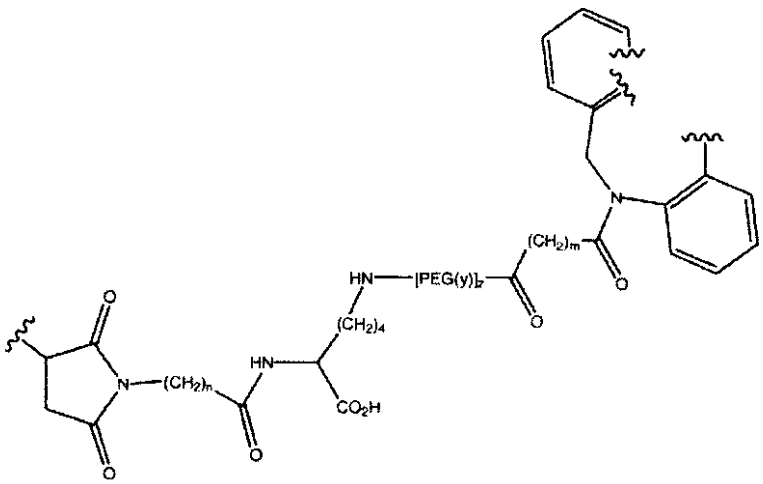
である。

【０２４８】

いくつかの態様において、１つにまとまったR_1及びR_2は、

【０２４９】

【化７９】



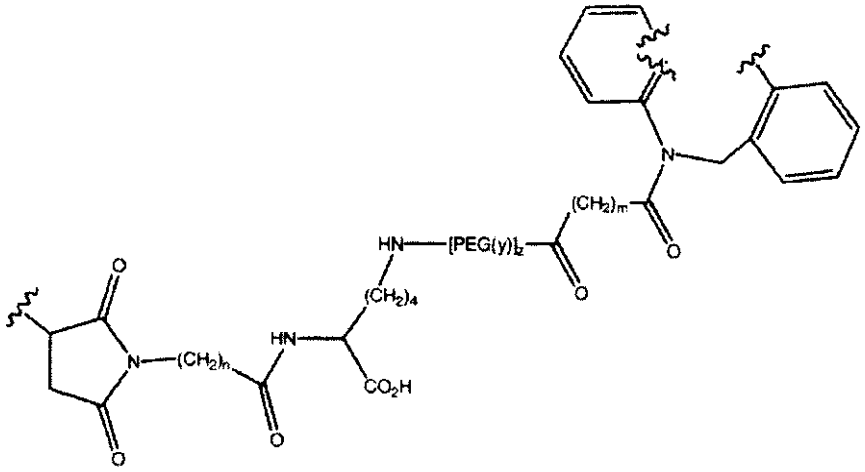
または

【０２５０】

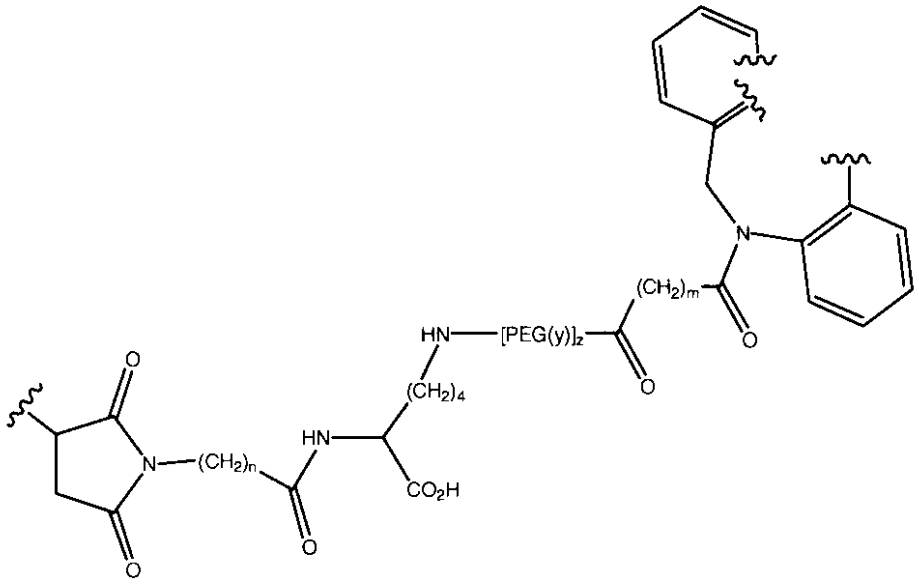
又は

【０２５１】

【化８０】

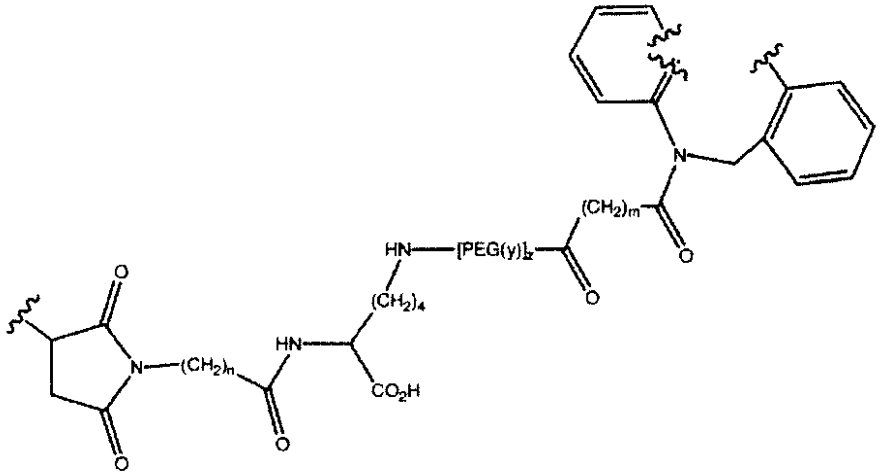


【０２５２】
（ここで、ｎは、１～３であり、ｍは、１～４であり、ｙは、１～１００であり、ｚは、１～１０である）
である。
【０２５３】
いくつかの態様において、１つにまとまったR_1及びR_2は、
【０２５４】
【化８１】



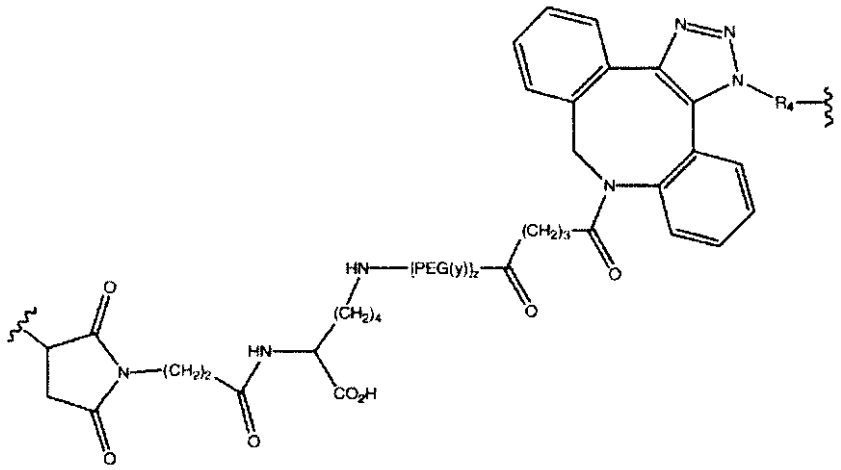
【０２５５】
（ここで、ｎは、１～３であり、ｍは、１～４であり、ｙは、１～１００であり、ｚは、１～１０である）
である。
【０２５６】
いくつかの態様において、１つにまとまったR_1及びR_2は、
【０２５７】

【化８２】

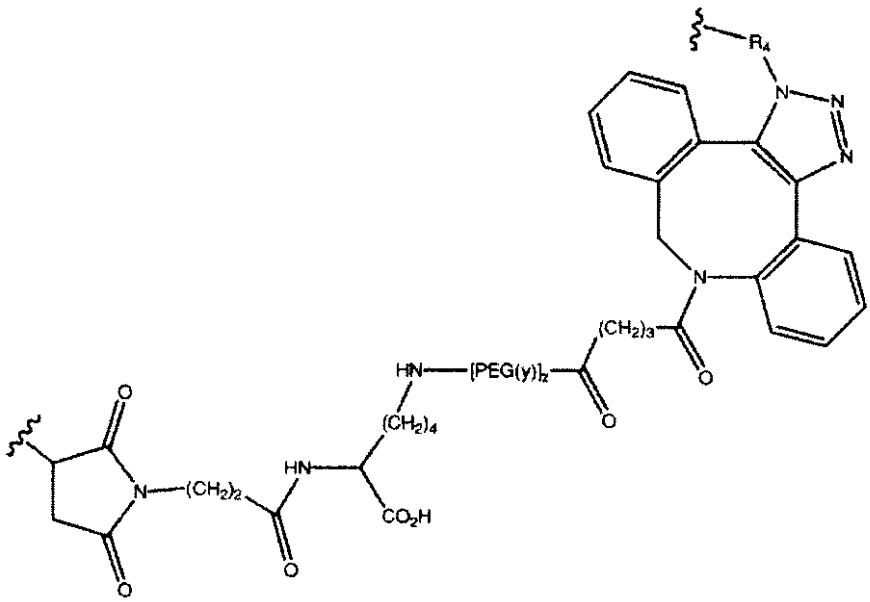


【０２５８】
（ここで、ｎは、１～３であり、ｍは、１～４であり、ｙは、１～１００であり、ｚは、１～１０である）
である。
【０２５９】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造
【０２６０】

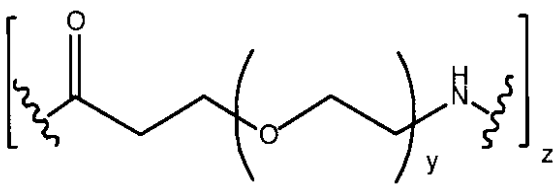
【化８３】



または

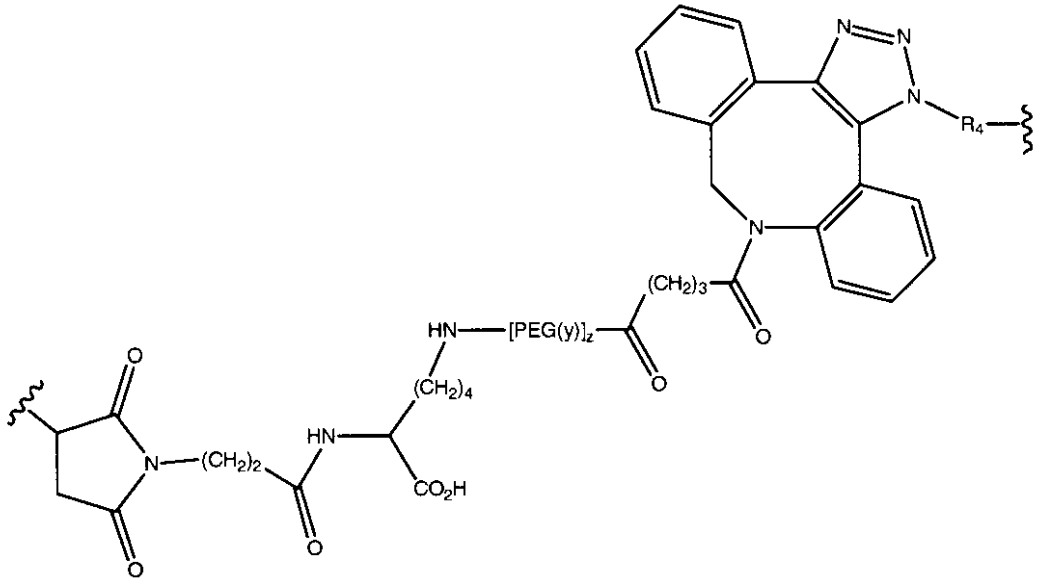


【０２６１】
を含む非ペプチジル結合を表し、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚが、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の
【０２６２】
【化８４】

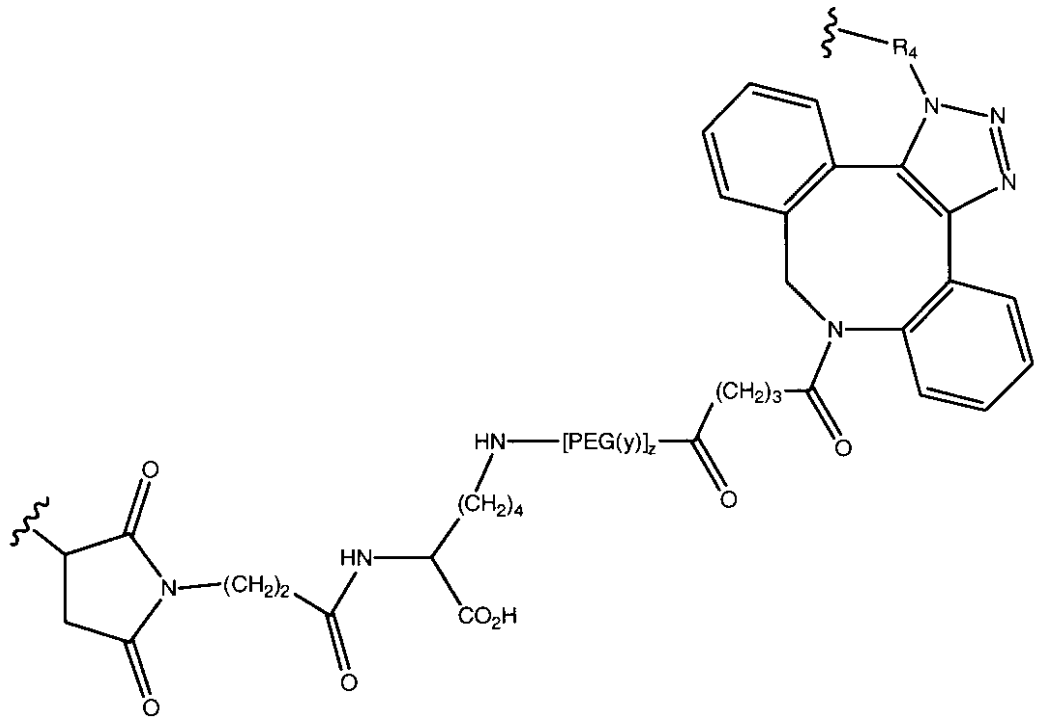


【０２６３】
である。
【０２６４】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造
【０２６５】

【化８５】

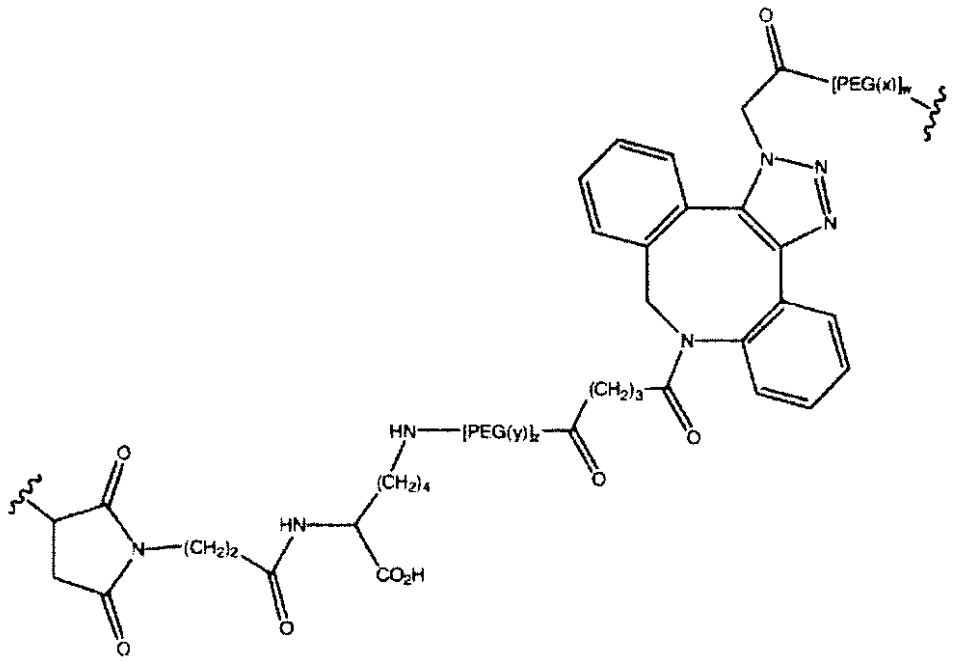


【０２６６】
を含む非ペプチジル結合を表す。
【０２６７】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造
【０２６８】
【化８６】

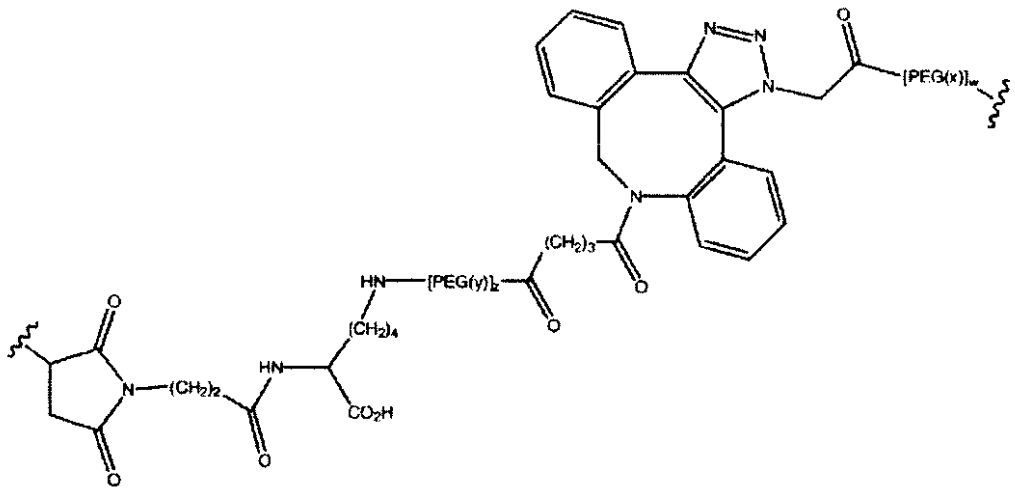


【０２６９】
を含む非ペプチジル結合を表す。
【０２７０】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造
【０２７１】

【化８７】



または



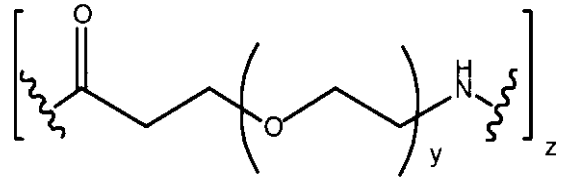
【０２７２】

を含む非ペプチジル結合を表し、

［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の

【０２７３】

【化８８】



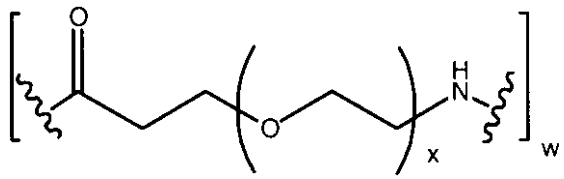
【０２７４】

であり、

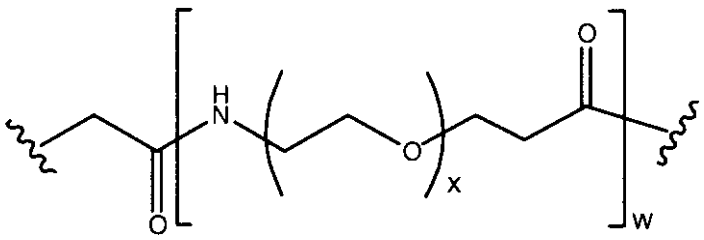
［ＰＥＧ（ｘ）］ｗは、ｘ＝１～１００及びｗ＝１～１０の

【０２７５】

【化８９】

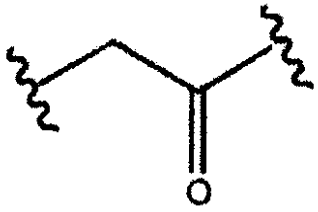


【０２７６】
である。
【０２７７】
いくつかの態様において、ｙは、１～２０である。いくつかの態様において、ｙは、２１～４０である。いくつかの態様において、ｙは、４１～６０である。いくつかの態様において、ｙは、６１～８０である。いくつかの態様において、ｙは、３０～５０である。いくつかの態様において、ｙは、１２、２４、３６又は４８である。いくつかの態様において、ｚは、１である。いくつかの態様において、ｚは、０である。
【０２７８】
いくつかの態様において、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基の末端カルボニルは、アミド結合の一部である。
【０２７９】
いくつかの態様において、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基の末端アミンは、アミド結合の一部である。
【０２８０】
いくつかの態様において、R_4は、ｘ＝１～１００及びｗ＝０～５の
【０２８１】
【化９０】

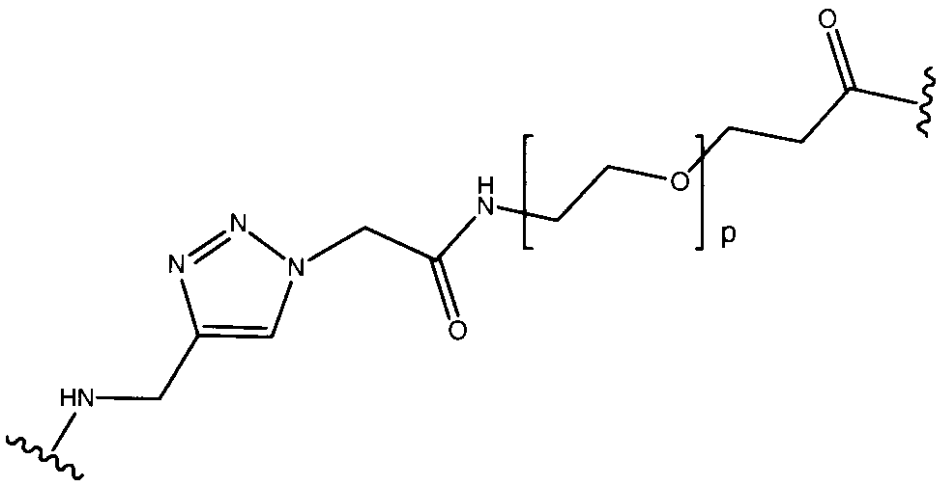


【０２８２】
である。
【０２８３】
いくつかの態様において、ｘは、１～２０である。いくつかの態様において、ｘは、２１～４０である。いくつかの態様において、ｘは、４１～６０である。いくつかの態様において、ｘは、６１～８０である。いくつかの態様において、ｘは、３０～５０である。いくつかの態様において、ｘは、１２、２４、３６又は４８である。
【０２８４】
いくつかの態様において、ｗは、１である。いくつかの態様において、ｗは、０である。
【０２８５】
いくつかの態様において、R_4は、以下の構造
【０２８６】

【化９１】

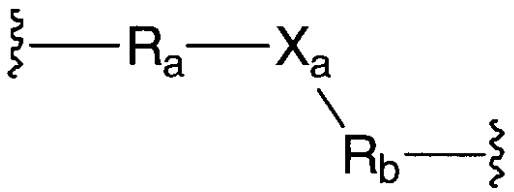


【０２８７】
を有する。
【０２８８】
いくつかの態様において、R_2は、ＪによってＡに結合し、R_4は、Ｂに結合している。
【０２８９】
いくつかの態様において、R_2は、ＪによってＢに結合し、R_4は、Ａに結合している。
【０２９０】
いくつかの態様において、R_4は、末端カルボニルの炭素によってＢに結合している。
【０２９１】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造
【０２９２】
【化９２】

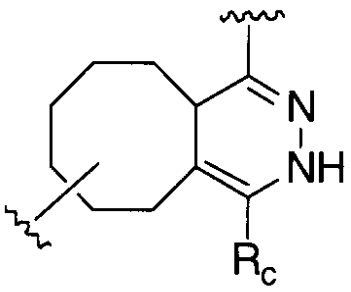


【０２９３】
（ここで、ｐ＝０～５、０～１０、０～５０、又は０～１００）
を含む非ペプチジル結合を表す。
【０２９４】
いくつかの態様において、R_2は、炭素－窒素結合又は炭素－硫黄結合によってＡに結合している。
【０２９５】
いくつかの態様において、R_2は、炭素－窒素結合によってＡに結合している。
【０２９６】
いくつかの態様において、炭素－窒素結合は、アミド結合である。
【０２９７】
いくつかの態様において、R_2は、生物学的に不安定な（biologically labile）結合によってＡに結合している。
【０２９８】
いくつかの態様において、R_2は、ＡのＣ末端アミノ酸とＢにおけるアミノ基とのアミド結合によってＡに結合している。

【０２９９】
いくつかの態様において、末端アミノ酸は、システインである。
【０３００】
いくつかの態様において、R_2は、炭素－硫黄結合によってＡに結合している。
【０３０１】
いくつかの態様において、R_2は、R_2と遊離チオールとの間で形成される炭素－硫黄結合によってＡに結合している。
【０３０２】
いくつかの態様において、R_2は、スクシンイミド－硫黄結合によってＡに結合している。
【０３０３】
いくつかの態様において、Ｊは、分枝残基を含む。
【０３０４】
いくつかの態様において、Ｊは、前記分枝残基によって２つ以上のＡに結合している。
【０３０５】
いくつかの態様において、Ｂは、分枝残基を含む。
【０３０６】
いくつかの態様において、Ｂは、それぞれ分枝残基による非ペプチジル結合によって２つ以上のＡに連結している。
【０３０７】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造
【０３０８】
【化９３】

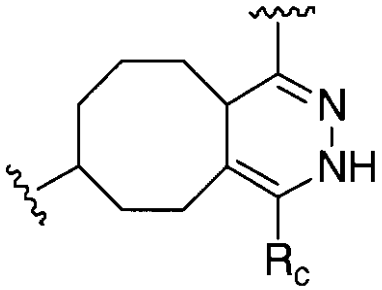


【０３０９】
を含む非ペプチジル結合を表し、
ここで、X_aは、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造であり、R_aは、Ａ又はＢの一方と接続する有機構造を表し、R_bは、Ａ又はＢのもう一方と接続する有機構造を表す。
【０３１０】
いくつかの態様において、X_aは、以下の構造
【０３１１】
【化９４】

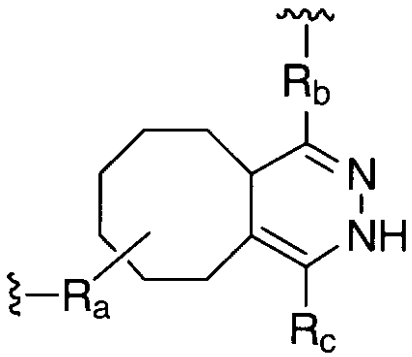


【０３１２】
（ここで、R_cは、Ｈ、アルキル若しくはアリールである）

又はその互変異性体を有する。
【０３１３】
いくつかの態様において、X_aは、以下の構造
【０３１４】
【化９５】

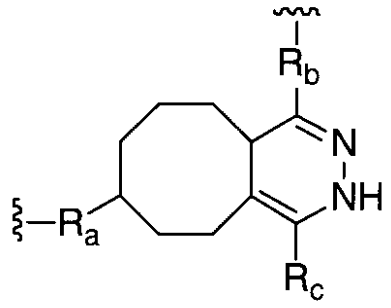


【０３１５】
（ここで、R_cは、Ｈ、アルキル若しくはアリールである）
又はその互変異性体を有する。
【０３１６】
いくつかの態様において、R_aは、シクロオクタンに接続し、R_bは、ジヒドロピリダジンに接続している。
【０３１７】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造
【０３１８】
【化９６】



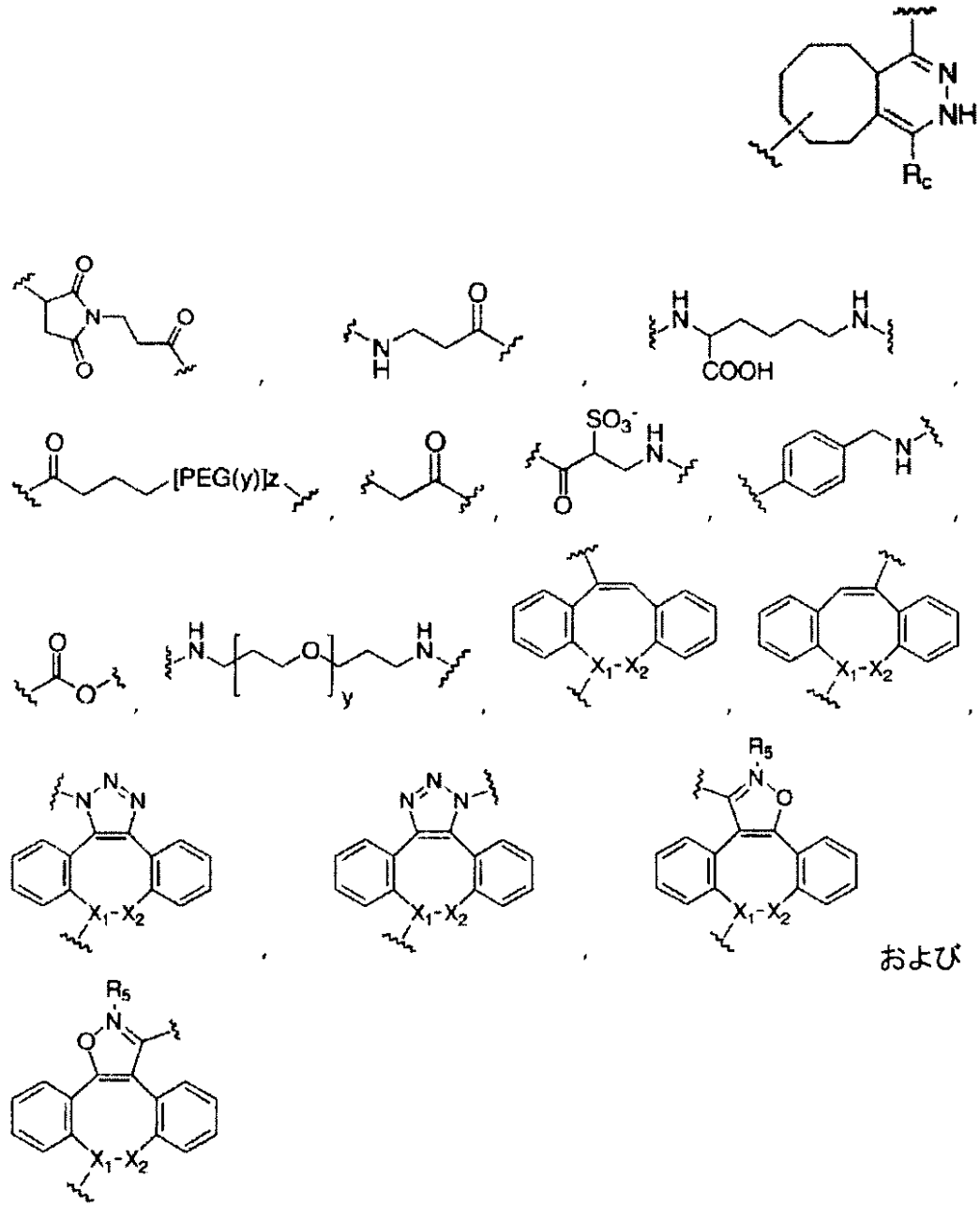
【０３１９】
（ここで、R_cは、Ｈ、アルキル又はアリールである）
又はその互変異性体を含む非ペプチジル結合を表す。
【０３２０】
いくつかの態様において、X_aは、以下の構造
【０３２１】

【化９７】

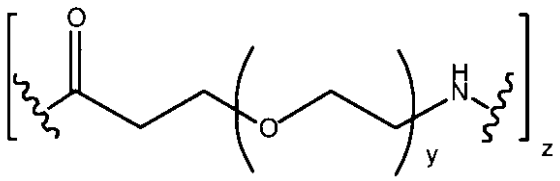


【０３２２】
（ここで、R_cは、Ｈ、アルキル若しくはアリールである）
又はその互変異性体を有する。
【０３２３】
いくつかの態様において、R_cは、メチルである。
【０３２４】
いくつかの態様において、R_a及びR_bは独立に、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、
【０３２５】

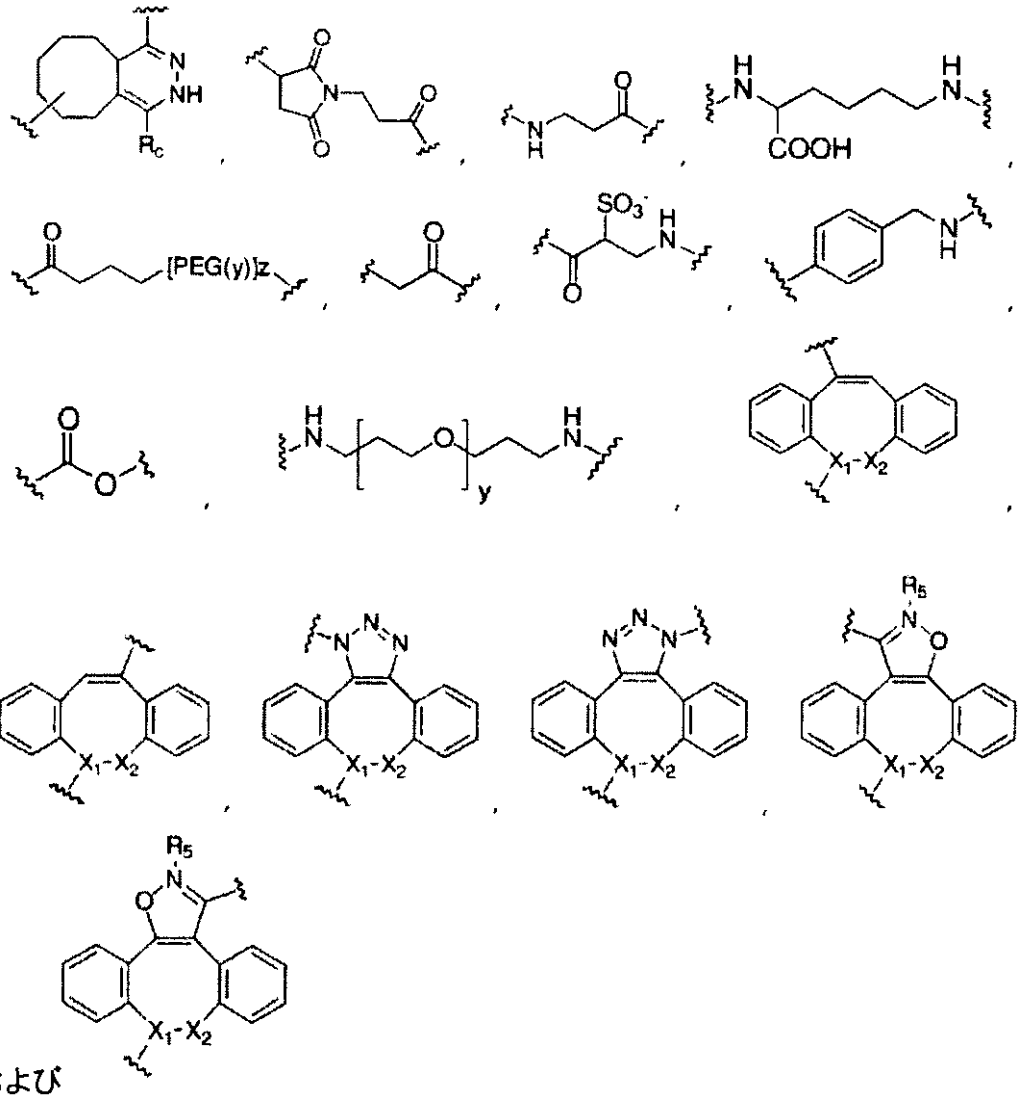
【化９８】



【０３２６】
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）
からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の
【０３２７】
【化９９】



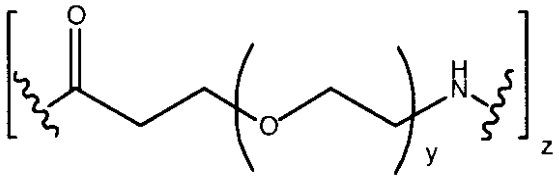
【０３２８】
である。
【０３２９】
いくつかの態様において、R_a及びR_bは独立に、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、C_2～C_5アシル、スクシニル、マロニル、グルタリル、アミノ酸、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、
【０３３０】
【化１００】



および

【０３３１】
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）
からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の
【０３３２】

【化１０１】



【０３３３】
である。
【０３３４】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、炭素－窒素結合又は炭素－硫黄結合によってＡに結合している。
【０３３５】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、炭素－窒素結合によってＡに結合している。
【０３３６】
いくつかの態様において、炭素－窒素結合は、アミド結合である。
【０３３７】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、生物学的に不安定な結合によってＡに結合している。
【０３３８】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、ＡのＣ末端アミノ酸とＢにおけるアミノ基との間のアミド結合によってＡに結合している。
【０３３９】
いくつかの態様において、末端アミノ酸は、システインである。
【０３４０】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、炭素－硫黄結合によってＡに結合している。
【０３４１】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、R_2と遊離チオールとの間で形成される炭素－硫黄結合によってＡに結合している。
【０３４２】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、スクシンイミド－硫黄結合によってＡに結合している。
【０３４３】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、分枝残基を含む。
【０３４４】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、分枝残基によって２つ以上のＡに結合している。
【０３４５】
いくつかの態様において、Ａの生物学的活性は、Ａが本発明の化合物又はダイマーの一部である場合、Ａが任意の他の構造に連結していない場合のＡの生物学的活性と比較して増大する。
【０３４６】
いくつかの態様において、Ａは、ある疾患を患う対象の治療に承認された薬である化合物の構造を含む。
【０３４７】
いくつかの態様において、対象は、哺乳類対象である。
【０３４８】

いくつかの態様において、哺乳類対象は、ヒト対象である。

【０３４９】

いくつかの態様において、Ａは、１０００ダルトン未満の分子量を有する有機化合物の構造、ＤＮＡアプタマー、ＲＮＡアプタマー、オリゴヌクレオチド、又は生物学的に活性であるタンパク質を含む。

【０３５０】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【０３５１】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ＲＮＡ干渉誘導分子である。

【０３５２】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ＲＮＡ干渉誘導分子をコードする。

【０３５３】

いくつかの態様において、Ａは、第１級又は第２級アミンを含む。

【０３５４】

いくつかの態様において、Ａは、第１級又は第２級アミンによってＢに連結している。

【０３５５】

いくつかの態様において、Ａは、第１級アミンを含む。

【０３５６】

いくつかの態様において、Ａは、アリピプラゾール又はオセルタミビルを含む。

【０３５７】

いくつかの態様において、Ａは、第２級アミンを含む。

【０３５８】

いくつかの態様において、Ａは、呼吸器薬、抗喘息薬、鎮痛薬、抗うつ薬、抗狭心症薬、抗不整脈薬、抗高血圧症薬、抗糖尿病薬、抗ヒスタミン薬、抗感染症薬、抗生物質、抗炎症薬、抗パーキンソン病薬、抗精神病薬、解熱薬、抗潰瘍薬、注意欠陥多動性障害（ＡＤＨＤ）薬、中枢神経興奮薬、充血除去薬、若しくは精神刺激薬である。

【０３５９】

いくつかの態様において、Ａは、アルプレノロール、アセブトロール、アミデフリン、アミネプチン、アモスラロール、アモキサピン、アンフェタミニル、アテノロール、アトモキセチン、バロフロキサシン、バメタン、ベフノロール、ベナゼプリル、ベンフルオレクス、ベンゾクタミン、ベタヒスチン、ベタキソロール、ベバントロール、ビフェメラン、ビソプロロール、ブリンゾラミド、ブフェニオド（bufeniode）、ブテタミン、カミロフィン、カラゾロール、カルチカイン、カルベジロール、セファエリン、シプロフロキサシン、クロザピン、クロベンゾレクス、クロルプレナリン、シクロペンタミン、デラプリル、デメキシプチリン、デノパミン、デシプラミン、デスロラタジン、ジクロフェナク、ジメトフリン、ジオキサドロール、ドブタミン、ドペキサミン、ドリペネム、ドルゾラミド、ドロプレニルアミン、デュロキセチン、エルトプラジン、エナラプリル、エノキサシン、エピネフリン、エルタペネム、エサプラゾール、エスモロール、エトキサドロール、ファスジル、フェンジリン、フェネチリン、フェンフルラミン、フェノルドパム、フェノテロール、フェンプロポレクス、フレカイニド、フルオキセチン、フォルモテロール、フロバトリプタン、ガボキサドール、ガレノキサシン、ガチフロキサシン、グレパフロキサシン、ヘキソプレナリン、イミダプリル、インダルピン、インデカイニド、塩酸インデロキサジン、イソクスプリン、イスプロニクリン、ラベタロール、ランジオロール、ラパチニブ、レボファセトペラン、リシノプリル、ロメフロキサシン、ロトラフィバン、マプロチリン、メカミラミン、メフロキン、メピンドロール、メロペネム、メタプラミン、メタプロテレノール、メトキシフェナミン、右旋性メチルフェニデート、メチルフェニデート、メチプラノロール、メトプロロール、ミトキサントロン、ミバゼロール、モエキシプリル、モプロロール、モキシフロキサシン、ネビボロール、ニフェナロール、ニプラジロール、ノルフロキサシン、ノルトリプチリン、ニリドリン、オランザピン、オキサムニキン

、オクスプレノロール、オキシフェドリン、パロキセチン、ペルヘキシリン、フェンメトラジン、フェニレフリン、フェニルプロピルメチラミン、フォレドリン、ピシロレクス、ピメチリン（pimethylline）、ピンドロール、ピペミド酸、ピリドカイン、プラクトロール、プラドフロキサシン、プラミペキソール、プラミベリン、プレナルテロール、プレニラミン、プリロカイン、プロカテロール、プロネタロール、プロパフェノン、プロプラノロール、プロピルヘキセドリン、プロトキロール、プロトリプチリン、プソイドエフェドリン、レボキセチン、ラサギリン、（ｒ）－ラサギリン、レピノタン、レプロテロール、リミテロール、リトドリン、サフィナミド、サルブタモール／アルブテロール、サルメテロール、サリゾタン、セルトラリン、シロドシン、ソタロール、ソテレノール、スパルフロキサシン、スピラプリル、スルフィナロール、シネフリン、タムスロシン、テバニクリン（tebanicline）、チアネプチン、チロフィバン、トレトキノール、トリメタジジン、トロキシピド、バレニクリン、ビルダグリプチン、ビロキサジン、ビキジル、若しくはキサモテロールである。

【０３６０】

いくつかの態様において、Ａは、生物学的に活性であるタンパク質を含む。

【０３６１】

いくつかの態様において、Ａは、分泌タンパク質を含む。

【０３６２】

いくつかの態様において、Ａは、タンパク質の細胞外ドメインを含む。

【０３６３】

いくつかの態様において、Ａは、標的結合活性を有する程度に生物学的に活性である。

【０３６４】

いくつかの態様において、Ａは、独立にフォールディングするタンパク質又はその一部である。

【０３６５】

いくつかの態様において、Ａは、グリコシル化タンパク質である。

【０３６６】

いくつかの態様において、Ａは、鎖内ジスルフィド結合を含む。

【０３６７】

いくつかの態様において、Ａは、サイトカインに結合している。

【０３６８】

いくつかの態様において、サイトカインは、ＴＮＦαである。

【０３６９】

いくつかの態様において、Ａは、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ＡＮＰ）、カルシトニン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（ＣＲＨ）、エンドセリン、胃抑制ペプチド（ＧＩＰ）、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）、グルカゴン様ペプチド－２（ＧＬＰ－２）、ＧＬＰ－１若しくはＧＬＰ－２の類似体、グルカゴン血管作動性腸管ペプチド（ＧＶＩＰ）、グレリン、ペプチドＹＹ若しくはセクレチン、又はそれらの一部分を含む。

【０３７０】

いくつかの態様において、Ａは、ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＥＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧという配列における、ある一連の連続アミノ酸を含む。

【０３７１】

いくつかの態様において、Ａは、少なくとも１つの一連の連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、抗体のＦａｂ又はＦａｂ’の重鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である。

【０３７２】

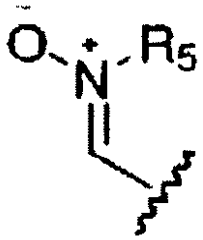
いくつかの態様において、Ａは、少なくとも１つの一連の連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、抗体のＦａｂ又はＦａｂ’の軽鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である。

【０３７３】
いくつかの態様において、Ａは、抗体の少なくとも１つのＦａｂ若しくはＦａｂ’又は少なくとも１つのＦａｂ若しくはＦａｂ’の一部分を含む。
【０３７４】
いくつかの態様において、Ａは、Ｆａｂ若しくはＦａｂ’又はその一部分の少なくとも２、３、４、５，６、７、８、９、又は１０個のコピーを含む。
【０３７５】
いくつかの態様において、Ａは、抗体のＦａｂ－１若しくはＦａｂ’１又はその一部分を含む。
【０３７６】
いくつかの態様において、Ａは、抗体のＦａｂ－２若しくはＦａｂ’２又はその一部分を含む。
【０３７７】
いくつかの態様において、Ａは、抗体の２つのＦａｂ又はＦａｂ’の手を含む。
【０３７８】
いくつかの態様において、Ｆａｂ及びＦａｂ’は、アダリムマブに存在する。
【０３７９】
いくつかの態様において、Ａは、少なくとも１つの一連の連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸は、単鎖抗体に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である。
【０３８０】
いくつかの態様において、Ａは、少なくとも１つの一連の連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸一連、ＴＮＦα受容体に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である。
【０３８１】
いくつかの態様において、ＴＮＦα受容体は、ＴＮＲ１Ｂである。
【０３８２】
いくつかの態様において、本発明の化合物は、ホモダイマーの一部を形成する。
【０３８３】
いくつかの態様において、本発明の化合物は、ヘテロダイマーの一部を形成する。
【０３８４】
本発明は、本発明の化合物を含むホモダイマーを提供する。
【０３８５】
本発明は、本発明の化合物を含むヘテロダイマーを提供する。
【０３８６】
いくつかの態様において、ダイマーの各化合物は、少なくとも１つのジスルフィド結合によって、他方に結合することができる。
【０３８７】
いくつかの態様において、ダイマーの各化合物は、各化合物のＺ間の少なくとも１つのジスルフィド結合によって、他方に結合することができる。
【０３８８】
いくつかの態様において、ダイマーの各化合物は、少なくとも１つのジスルフィド結合によって、他方に結合する。
【０３８９】
いくつかの態様において、ダイマーの各化合物は、各化合物のＺ間の少なくとも１つのジスルフィド結合によって、他方に結合する。
【０３９０】
いくつかの態様において、ダイマーの各化合物は、他方に非共有結合する。
【０３９１】
本発明は、以下の構造を有する化合物
【０３９２】

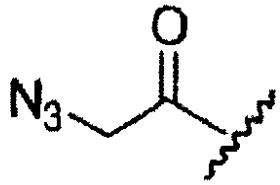
【化１０２】



【０３９３】
［式中、Ｚは、化合物のタンパク質成分であり、そのタンパク質成分は、１つ以上のポリペプチドを含み、１つ以上のポリペプチドの少なくとも１つは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸は、（ｉ）抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）Ｆ$_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）システイン又はセレノシステインをＮ末端に有し、
Ｂは、Ｒ$_a$とＣを連結させる化学構造であり、
ＢＺ間の点線は、ペプチジル結合を表し、
Ｌは、－Ｎ$_3$、アルキン、
【０３９４】
【化１０３】

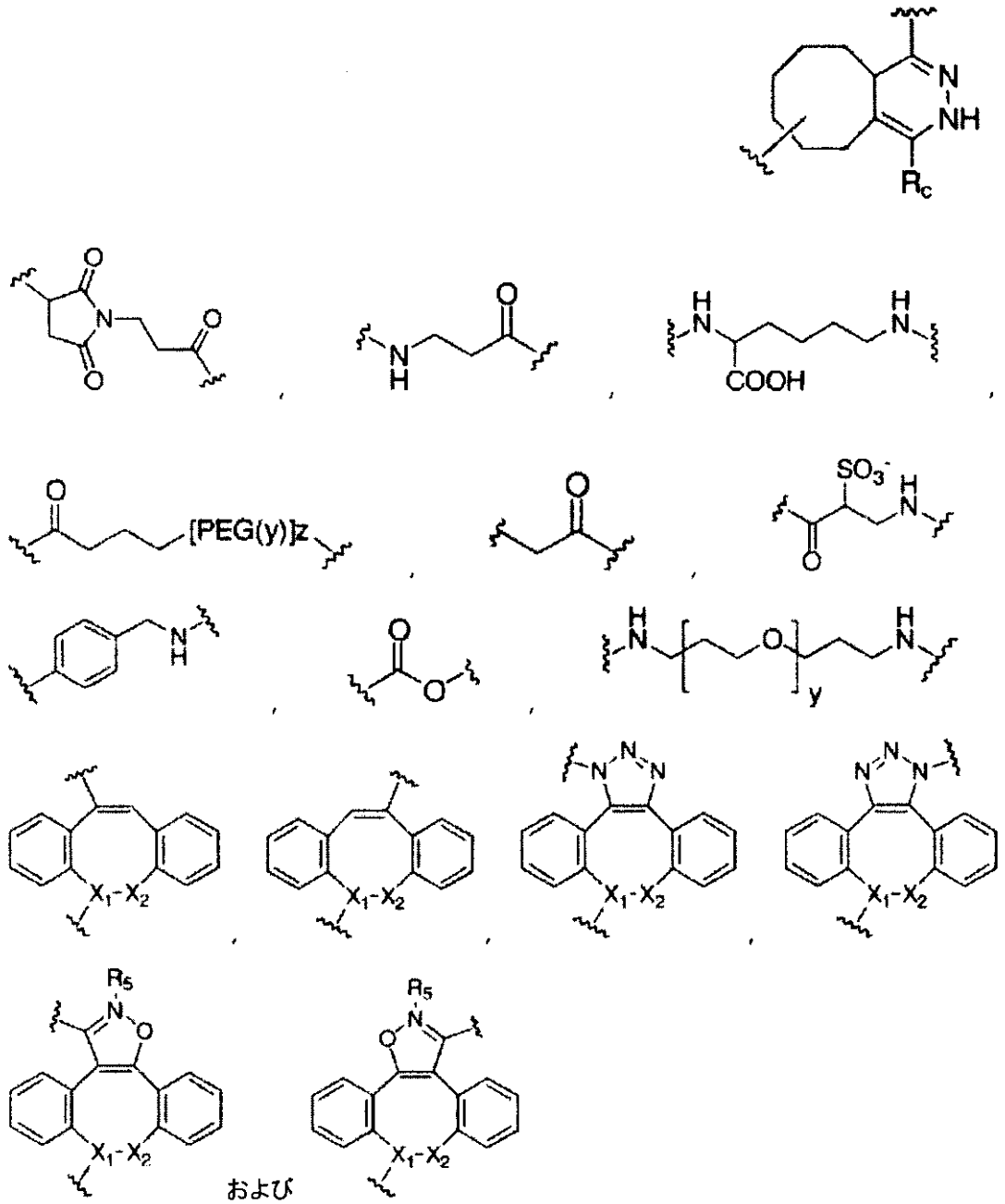


【０３９５】
基（ここで、Ｒ$_5$は、アルキル基又はアリール基である）、
【０３９６】
【化１０４】



【０３９７】
基、テトラジン、及びｔｒａｎｓ－シクロオクテンからなる群から選択され、
Ｒ$_a$は、結合であるか、各部分が［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$アルキル、Ｃ$_3$～Ｃ$_{10}$シクロアルカン、Ｃ$_2$～Ｃ$_{10}$アルケン、Ｃ$_5$～Ｃ$_{10}$シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、Ｃ$_2$～Ｃ$_5$アシル、Ｃ$_2$～Ｃ$_5$アシルアミノ、Ｃ$_2$～Ｃ$_5$アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、
【０３９８】

【化１０５】



【０３９９】

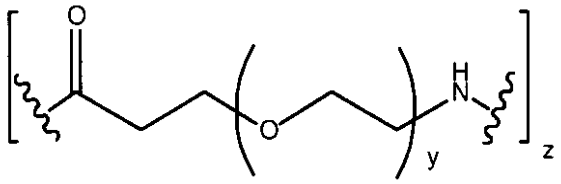
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）

からなる群から独立に選択される１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個若しくはそれ以上の部分の鎖を含む、又はからなる有機構造であり、

［ＰＥＧ（ｙ）］ｚは、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の

【０４００】

【化１０６】



【０４０１】
である］を提供する。

【０４０２】
いくつかの態様において、システイン又はセレノシステインは、一連の連続アミノ酸に天然に存在する。いくつかの態様において、システイン及びセレノシステインは、一連の連続アミノ酸に天然に存在しない。

【０４０３】
いくつかの態様において、連続アミノ酸は、システイン、セレノシステイン、ＣＰ、ＣＰＸＣＰ（ここで、Ｘ＝Ｐ、Ｒ又はＳ）、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、ＣＶＥＣＰＰＣＰ、ＣＣＶＥＣＰＰＣＰ、及びＣＤＴＰＰＰＣＰＲＣＰからなる群から選択される配列をＮ末端に有する。

【０４０４】
いくつかの態様において、抗体のＦ$_c$ドメインは、天然に存在する、抗体のＦ$_c$ドメインである。

【０４０５】
いくつかの態様において、抗体のＦ$_c$ドメインは、抗体の変異型Ｆ$_c$ドメインである。

【０４０６】
いくつかの態様において、抗体の変異型Ｆ$_c$ドメインは、抗体の変異したＦ$_c$ドメインである。

【０４０７】
いくつかの態様において、変異したＦ$_c$ドメインは、置換変異体である。

【０４０８】
いくつかの態様において、置換変異体は、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＮ末端若しくはＣ末端以外のＦ$_c$ドメインのある位置にアミノ酸置換を有する。

【０４０９】
いくつかの態様において、置換変異体は、その一連の連続アミノ酸中に、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１０～１５、１５～２０、１０～２０、又は２０～５０個のアミノ酸置換を有する。

【０４１０】
いくつかの態様において、置換は、保存的アミノ酸置換である。

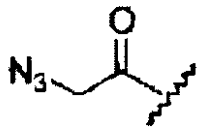
【０４１１】
いくつかの態様において、変異したＦ$_c$ドメインは、アミノ酸付加変異体である。

【０４１２】
いくつかの態様において、アミノ酸付加変異体は、その一連の連続アミノ酸中に、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１０～１５、１５～２０、１０～２０、又は２０～５０個の付加アミノ酸を有する。

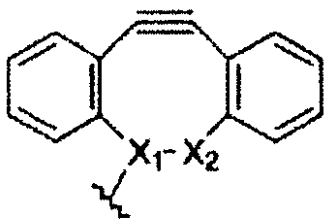
【０４１３】
いくつかの態様において、変異したＦ$_c$ドメインは、アミノ酸欠失変異体である。

【０４１４】
いくつかの態様において、アミノ酸欠失変異体は、その一連の連続アミノ酸中に、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１０～１５、１５～２０、１０～２０、又は２０～５０個の欠失アミノ酸を有する。

【０４１５】
いくつかの態様において、連続アミノ酸は、抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在する、ある一連の少なくとも０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０又は１９０個の連続アミノ酸と同一である。
【０４１６】
いくつかの態様において、連続アミノ酸は、Ｆｃドメインのヒンジ領域、ＣＨ２領域若しくはＣＨ３領域、又はその一部における、一連のアミノ酸と同一である。
【０４１７】
いくつかの態様において、Ｌは、－Ｎ$_3$である。
【０４１８】
いくつかの態様において、Ｌは、
【０４１９】
【化１０７】

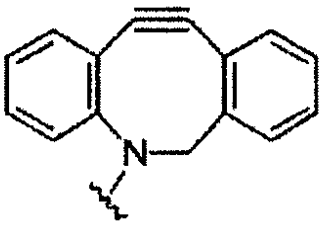


【０４２０】
である。
【０４２１】
いくつかの態様において、Ｌは、アルキンである。
【０４２２】
いくつかの態様において、アルキンは、プロパルギル基である。
【０４２３】
いくつかの態様において、アルキンは、シクロオクチン基である。
【０４２４】
いくつかの態様において、アルキンは、以下の構造
【０４２５】
【化１０８】

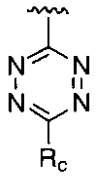


【０４２６】
（ここで、Ｘ$_1$は、ＣＨ若しくはＮであり、Ｘ$_2$は、ＣＨ$_2$若しくはカルボニル基であり、Ｒ５は、アリール基若しくはアルキル基である）
を有する。
【０４２７】
いくつかの態様において、アルキンは、以下の構造
【０４２８】

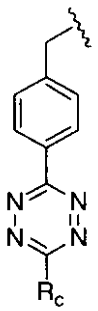
【化１０９】



【０４２９】
を有する。
【０４３０】
いくつかの態様において、Ｌは、テトラジンである。
【０４３１】
いくつかの態様において、テトラジンは、以下の構造
【０４３２】
【化１１０】

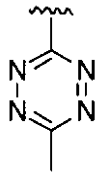


【０４３３】
（ここで、Ｒｃは、Ｈ、アルキル又はアリールである）
を有する。
【０４３４】
いくつかの態様において、テトラジンは、以下の構造
【０４３５】
【化１１１】

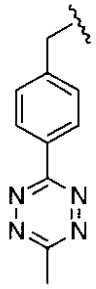


【０４３６】
（ここで、Ｒｃは、Ｈ、アルキル又はアリールである）
を有する。
【０４３７】
いくつかの態様において、テトラジンは、以下の構造
【０４３８】

【化１１２】



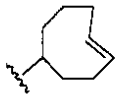
【０４３９】
を有する。
【０４４０】
いくつかの態様において、テトラジンは、以下の構造
【０４４１】
【化１１３】



【０４４２】
を有する。
【０４４３】
いくつかの態様において、Ｌは、ｔｒａｎｓ－シクロオクテンである。
【０４４４】
いくつかの態様において、ｔｒａｎｓ－シクロオクテンは、以下の構造
【０４４５】
【化１１４】



【０４４６】
を有する。
【０４４７】
いくつかの態様において、ｔｒａｎｓ－シクロオクテンは、以下の構造
【０４４８】
【化１１５】



【０４４９】
を有する。
【０４５０】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基を含む有機構造である。
【０４５１】

いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、又は多糖基を含む有機構造である。

【０４５２】

いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、C_1～C_4アルキル基を含む有機構造である。

【０４５３】

いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、スクシンイミドを含む有機構造である。

【０４５４】

いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、アミンを含む有機構造である。

【０４５５】

いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイルを含む有機構造である。

【０４５６】

いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、マロニルを含む有機構造である。

【０４５７】

いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、アミノ酸を含む有機構造である。

【０４５８】

いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、システインを含む有機構造である。

【０４５９】

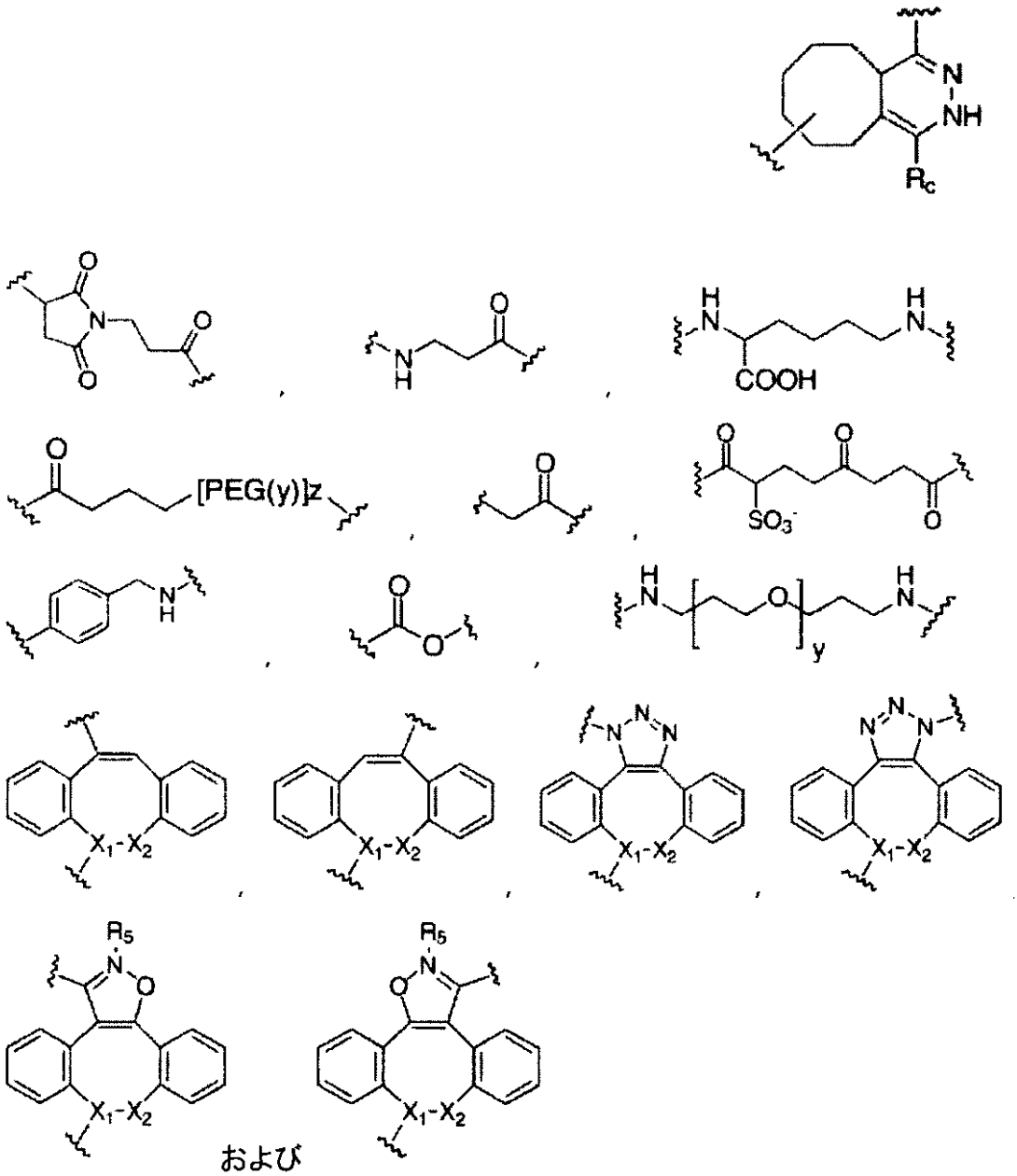
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、リシンを含む有機構造である。

【０４６０】

いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

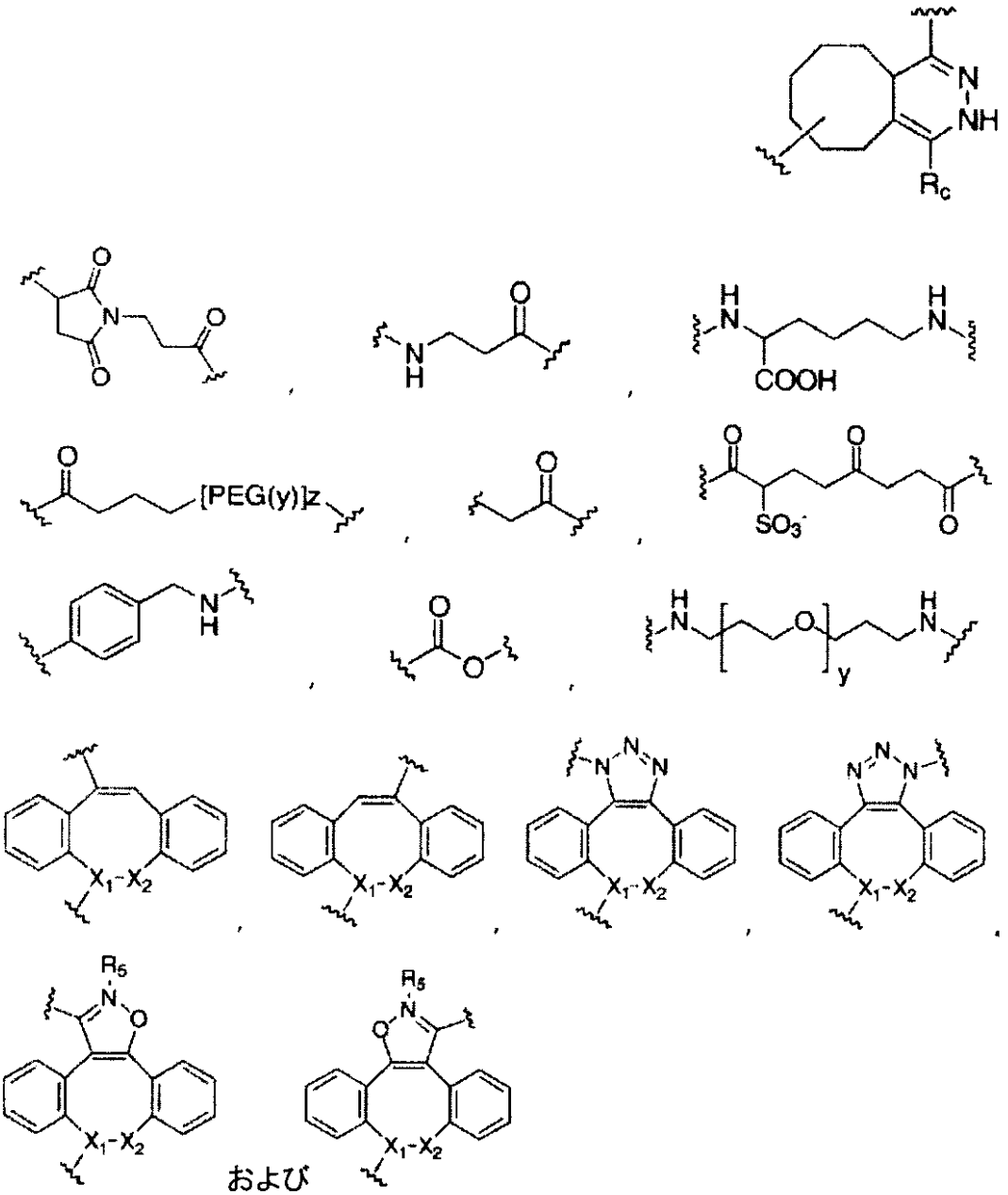
【０４６１】

【化１１６】



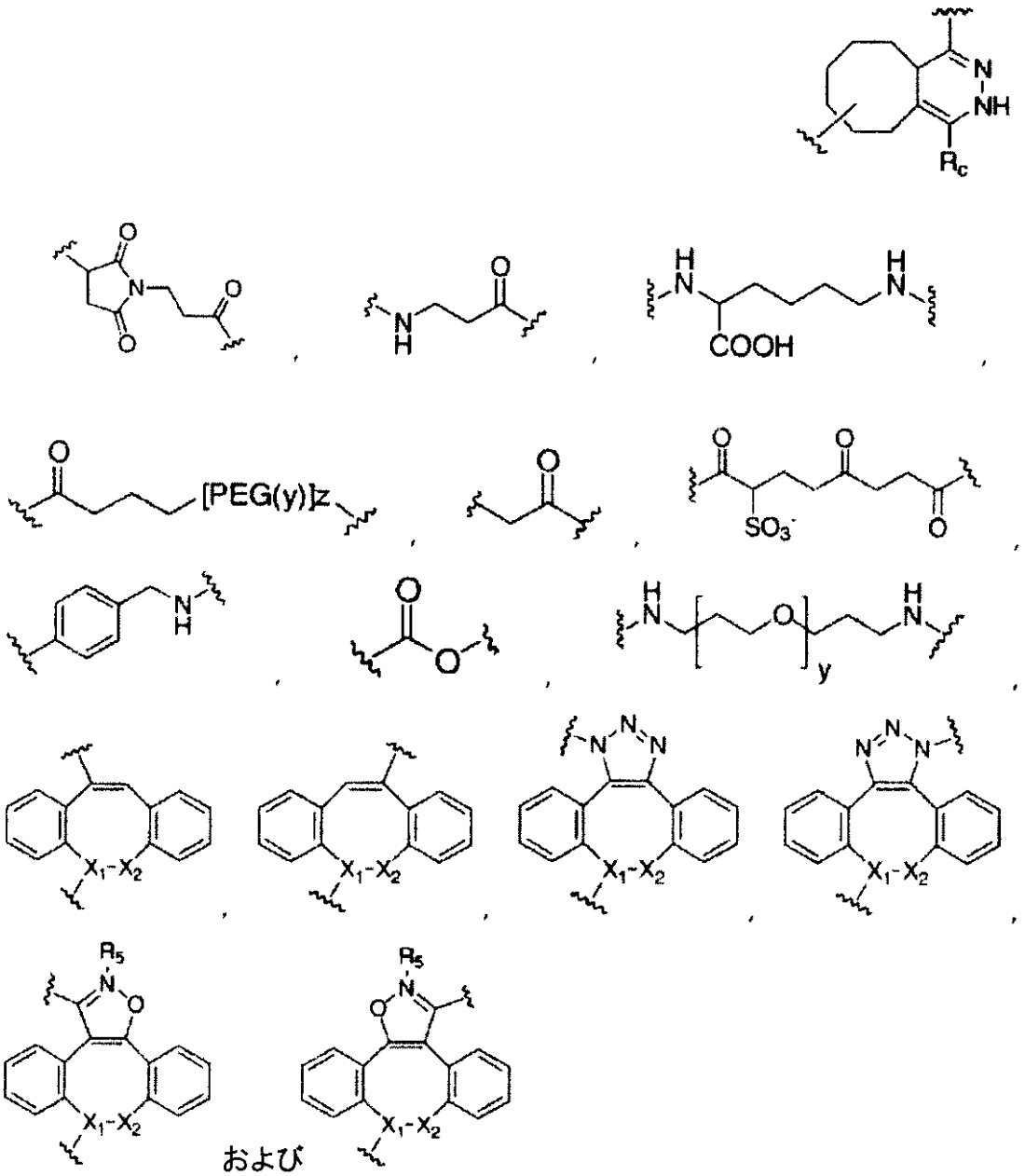
【０４６２】
からなる群から選択される３個の部分の鎖からなる有機構造である。
【０４６３】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、
【０４６４】

【化１１７】



【０４６５】
からなる群から選択される４個の部分の鎖からなる有機構造である。
【０４６６】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、ポリアルキレングリコール、ポリオキシアルキル化ポリオール、ポリビニルアルコール、ポリビニルアルキルエーテル、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－グリコール酸）、多糖、分枝残基、C_1～C_{10}アルキル、C_3～C_{10}シクロアルカン、C_2～C_{10}アルケン、C_5～C_{10}シクロアルケン、アミン、硫黄、酸素、スクシンイミド、マレイミド、グリセロール、トリアゾール、イソオキサゾリジン、C_2～C_5アシル、C_2～C_5アシルアミノ、C_2～C_5アシルオキシ、スクシニル、マロニル、グルタリル、フタリル、アジポイル、アミノ酸、アリール基、ヘテロアリール基、カルバメート、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、
【０４６７】

【化１１８】

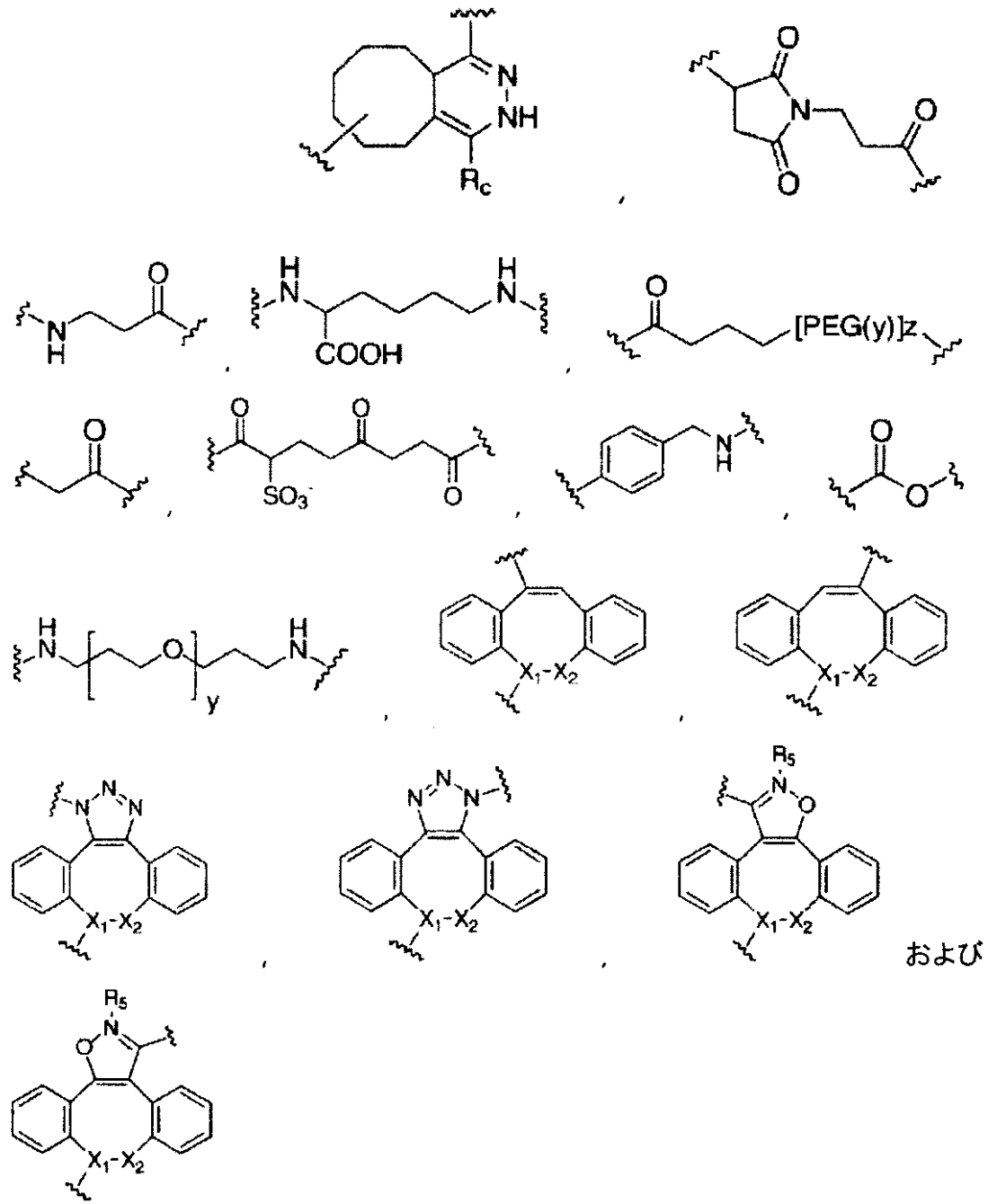


【０４６８】
からなる群から選択される５個の部分の鎖からなる有機構造である。
【０４６９】
いくつかの態様において、ＲａまたはＲｂは、リシンに結合している［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基を含む。
【０４７０】
いくつかの態様において、ＲａまたはＲｂは、スクシンイミド基に結合しているC_1～C_4アシル基を含む。
【０４７１】
いくつかの態様において、ＲａまたはＲｂは、C_1～C_4アシルに結合しているリシンを含む。
【０４７２】
いくつかの態様において、ＲａまたはＲｂは、グルタリルに結合している［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基を含む。
【０４７３】

いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ、C_2～C_5アシル、スクシニル、マロニル、グルタリル、アミノ酸、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造、トリアゾールに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、イソオキサゾリジンに縮合したシクロオクテンを含む化学構造、ジベンゾシクロオクテン、ジベンゾアザシクロオクテン、

【０４７４】

【化１１９】



【０４７５】

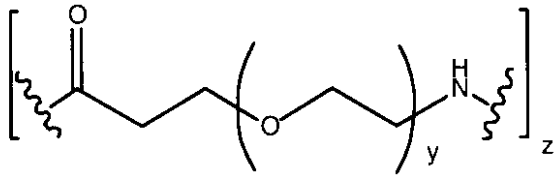
（ここで、X_1は、ＣＨ若しくはＮであり、X_2は、CH_2若しくはカルボニル基であり、R_5は、アリール基若しくはアルキル基である）

からなる群から選択される３個、４個若しくは５個の部分の鎖からなる有機構造であり、

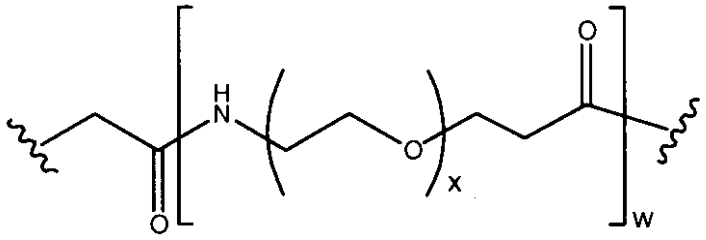
［ＰＥＧ（ｙ）］ｚが、ｙ＝１～１００及びｚ＝１～１０の

【０４７６】

【化１２０】

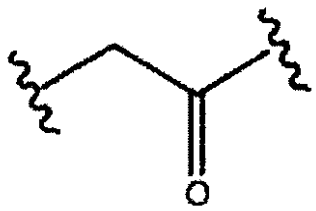


【０４７７】
である。
【０４７８】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、結合である。
【０４７９】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、システインである。
【０４８０】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、直鎖状構造を有する。
【０４８１】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、分枝構造を有する。
【０４８２】
いくつかの態様において、ｙは、１～２０である。いくつかの態様において、ｙは、２１～４０である。いくつかの態様において、ｙは、４１～６０である。いくつかの態様において、ｙは、６１～８０である。いくつかの態様において、ｙは、３０～５０である。いくつかの態様において、ｙは、１２、２４、３６又は４８である。
【０４８３】
いくつかの態様において、ｚは、１である。
【０４８４】
いくつかの態様において、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基の末端カルボニルは、アミド結合の一部である。
【０４８５】
いくつかの態様において、［ＰＥＧ（ｙ）］ｚ基の末端アミンは、アミド結合の一部である。
【０４８６】
いくつかの態様において、Ｒａ又はＲｂは、ｘが１～１００であり、ｗが０～５である
【０４８７】
【化１２１】

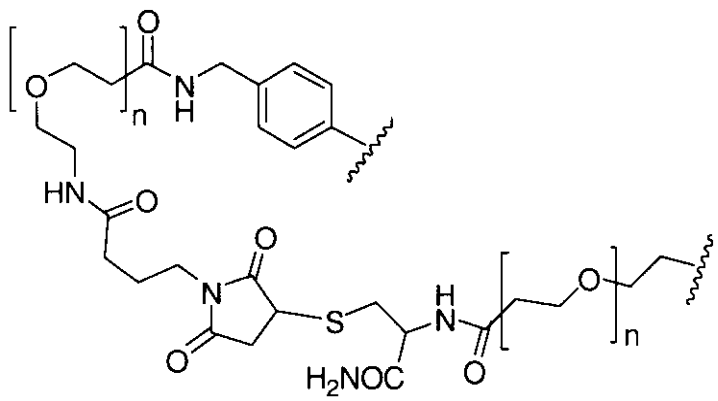


【０４８８】
である。
【０４８９】
いくつかの態様において、ｘは、１～２０である。いくつかの態様において、ｘは、２１～４０である。いくつかの態様において、ｘは、４１～６０である。いくつかの態様において、ｘは、６１～８０である。いくつかの態様において、ｘは、３０～５０である。いくつかの態様において、ｘは、１２、２４、３６又は４８である。

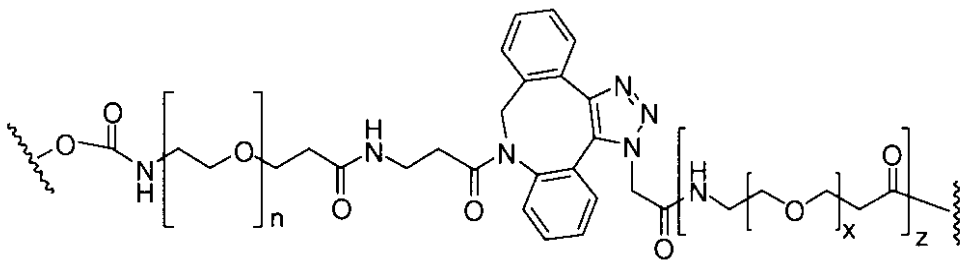
【０４９０】
いくつかの態様において、ｗは、１である。いくつかの態様において、ｗは、０である。
【０４９１】
いくつかの態様において、ＲａまたはＲｂは、以下の構造
【０４９２】
【化１２２】



【０４９３】
を有する。
【０４９４】
いくつかの態様において、ＲａまたはＲｂは、
【０４９５】
【化１２３】



【０４９６】
（ここで、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０である）である。
【０４９７】
いくつかの態様において、ＲａまたはＲｂは、
【０４９８】
【化１２４】



【０４９９】
（ここで、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４

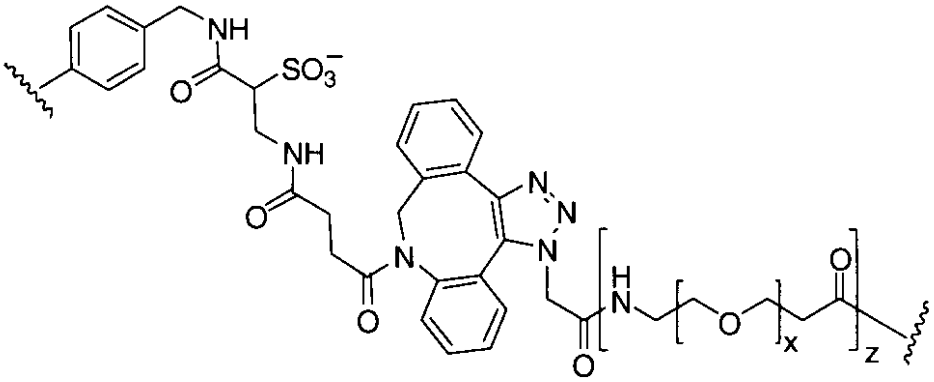
、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０であり、ｘは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０であり、ｚは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０である）
である。

【０５００】

いくつかの態様において、ＲａまたはＲｂは、

【０５０１】

【化１２５】



【０５０２】

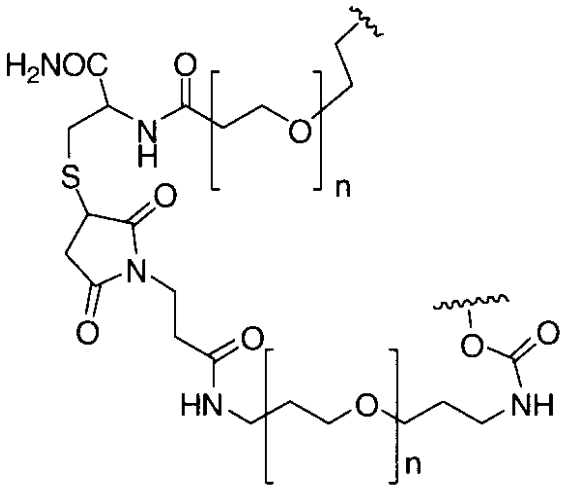
（ここで、ｘは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０であり、ｚは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０である）
である。

【０５０３】

いくつかの態様において、ＲａまたはＲｂは、

【０５０４】

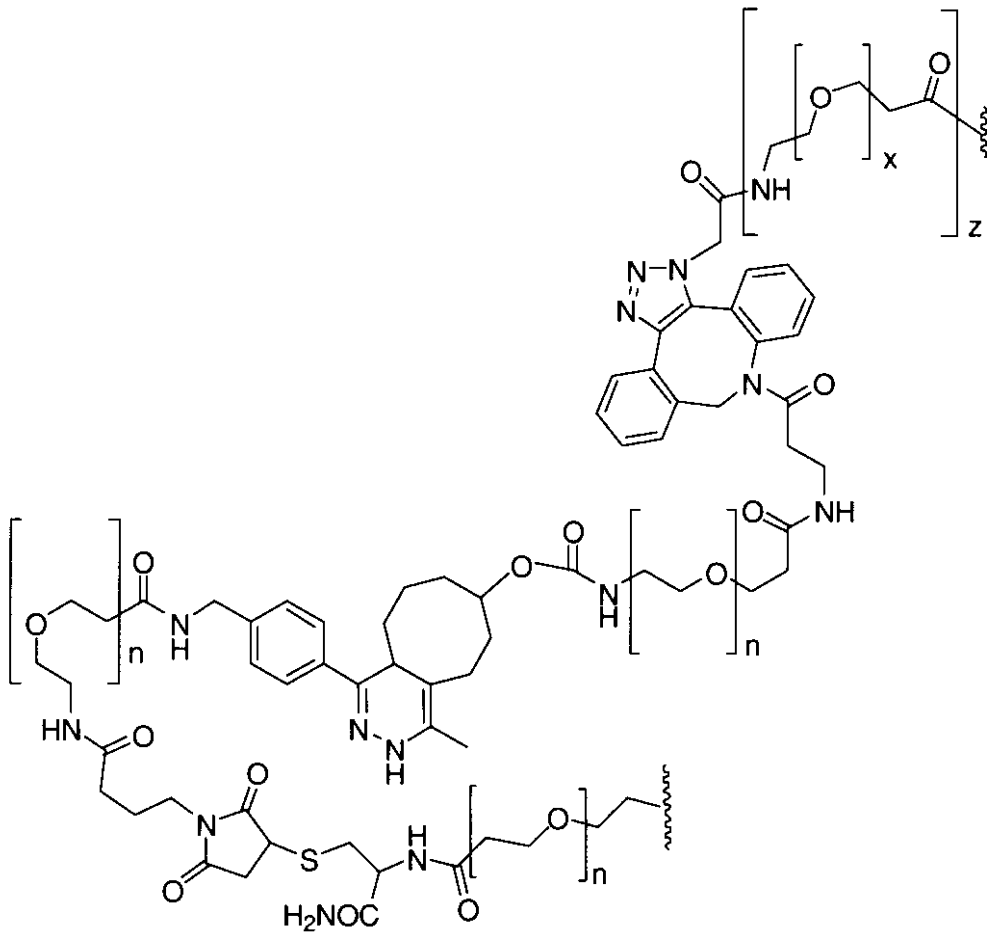
【化１２６】



【０５０５】

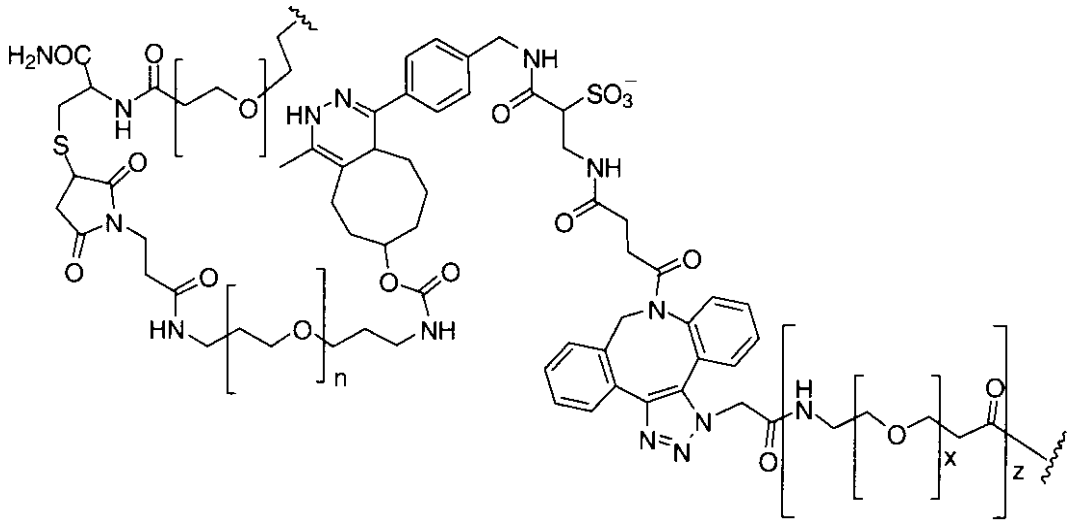
（ここで、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０である）
である。

【０５０６】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造
【０５０７】
【化１２７】

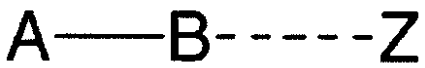


【０５０８】
を含む非ペプチジル結合を表し、
ここで、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０であり、ｘは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０であり、ｚは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０である。
【０５０９】
いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造
【０５１０】

【化１２８】



【０５１１】
を含む非ペプチジル結合を表し、
ここで、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０であり、ｘは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０であり、ｘは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、１～３０、１～４０、又は１～５０である。
【０５１２】
本発明は、以下の構造を有する化合物
【０５１３】
【化１２９】



【０５１４】
（式中、Ａは、化合物の生物学的に活性な構造であり、
Ｚは、化合物のタンパク質成分であり、そのタンパク質成分は、１つ以上のポリペプチドを含み、１つ以上のポリペプチドの少なくとも１つは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸は、（ｉ）抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）Ｆ$_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）システイン又はセレノシステインをＮ末端に有し、
Ｂは、ＡとＺを連結させる化学構造であり、
ＢＺ間の点線は、ペプチジル結合を表し、
ＡＢ間の実線は、非ペプチジル結合を表す）
を生成するための方法であって、
ａ）Ａ又はＡの誘導体と、第１の末端反応性基とを含むＡ’を得る工程と、
ｂ）Ｂ又はＢの誘導体と、第２の末端反応性基と、第３の末端反応性基とを含み、第２の末端反応性基が、第１の末端反応性基と反応して、非ペプチジル結合を形成することができるＢ’を得る工程と、
ｃ）Ｚ又はＺの誘導体と、第４の末端反応性基とを含み、第４の末端反応性基が、第３の末端反応性基と反応して、ペプチジル結合を形成することができるＺ’を得る工程と、
ｄ）Ａ’、Ｂ’及びＺ’を任意の順序で反応させて、化合物を生成する工程

とを含む、方法を提供する。

【０５１５】

いくつかの態様において、システイン又はセレノシステインは、一連の連続アミノ酸に天然に存在する。いくつかの態様において、システイン及びセレノシステインは、一連の連続アミノ酸に天然に存在しない。

【０５１６】

いくつかの態様において、連続アミノ酸は、システイン、セレノシステイン、ＣＰ、ＣＰＸＣＰ（ここで、Ｘ＝Ｐ、Ｒ又はＳ）、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、ＣＶＥＣＰＰＣＰ、ＣＣＶＥＣＰＰＣＰ、及びＣＤＴＰＰＰＣＰＲＣＰからなる群から選択される配列をＮ末端に有する。

【０５１７】

いくつかの態様において、抗体のＦ$_c$ドメインは、天然に存在する、抗体のＦ$_c$ドメインである。

【０５１８】

いくつかの態様において、抗体のＦ$_c$ドメインは、抗体の変異型Ｆ$_c$ドメインである。

【０５１９】

いくつかの態様において、抗体の変異型Ｆ$_c$ドメインは、抗体の変異したＦ$_c$ドメインである。

【０５２０】

いくつかの態様において、変異したＦ$_c$ドメインは、置換変異体である。

【０５２１】

いくつかの態様において、置換変異体は、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＮ末端若しくはＣ末端以外のＦ$_c$ドメインのある位置にアミノ酸置換を有する。

【０５２２】

いくつかの態様において、置換変異体は、その一連の連続アミノ酸中に、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１０～１５、１５～２０、１０～２０、又は２０～５０個のアミノ酸置換を有する。

【０５２３】

いくつかの態様において、置換は、保存的アミノ酸置換である。

【０５２４】

いくつかの態様において、変異したＦ$_c$ドメインは、アミノ酸付加変異体である。

【０５２５】

いくつかの態様において、アミノ酸付加変異体は、その一連の連続アミノ酸中に、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１０～１５、１５～２０、１０～２０、又は２０～５０個の付加アミノ酸を有する。

【０５２６】

いくつかの態様において、変異したＦ$_c$ドメインは、アミノ酸欠失変異体である。

【０５２７】

いくつかの態様において、アミノ酸欠失変異体は、その一連の連続アミノ酸中に、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１０～１５、１５～２０、１０～２０、又は２０～５０個の欠失アミノ酸を有する。

【０５２８】

いくつかの態様において、連続アミノ酸は、抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在する、ある一連の少なくとも０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０又は１９０個の連続アミノ酸と同一である。

【０５２９】

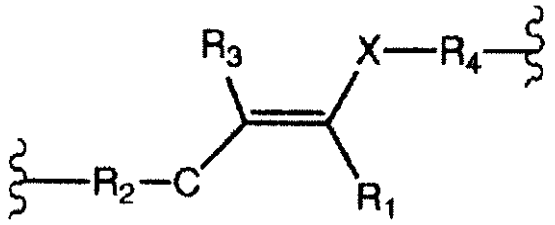
いくつかの態様において、連続アミノ酸は、Ｆｃドメインのヒンジ領域、ＣＨ２領域若しくはＣＨ３領域、又はその一部における、一連のアミノ酸と同一である。

【０５３０】

いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造

【０５３１】

【化１３０】



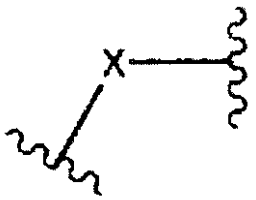
【０５３２】

を含む非ペプチジル結合を表し、

ここで、

【０５３３】

【化１３１】

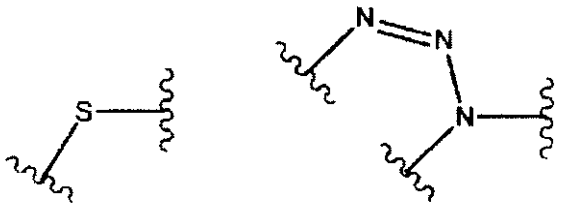


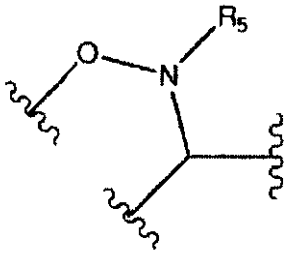
【０５３４】

は、

【０５３５】

【化１３２】





【０５３６】

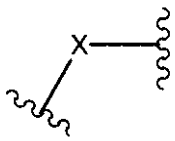
（ここで、R_5は、アルキル基又はアリール基である）

であり、

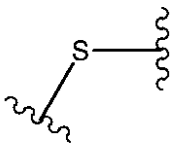
R_1は、Ｈ、又は、環状構造である付加的構造の一部であり、ここで、付加的環状構造は、R_1又はR_1の一部を含み、R_2又はR_2の一部、及びR_2とアルケン二重結合との間の炭素も含んでいてもよく、

ただし、

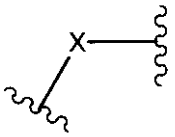
【０５３７】
【化１３３】



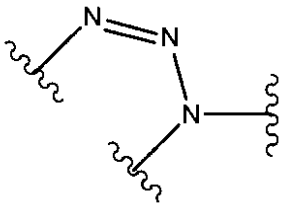
【０５３８】
が、
【０５３９】
【化１３４】



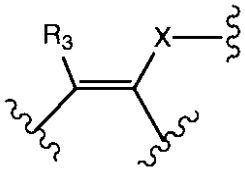
【０５４０】
である場合、R_3は、Ｈであり、
【０５４１】
【化１３５】



【０５４２】
が、
【０５４３】
【化１３６】

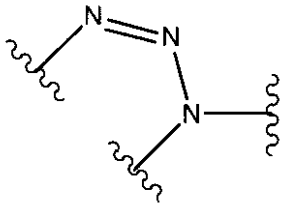


【０５４４】
である場合、
【０５４５】
【化１３７】

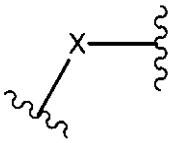


【０５４６】
は、
【０５４７】

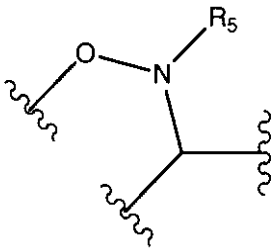
【化１３８】



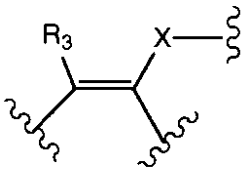
【０５４８】
を含むトリアゾール環であり、
【０５４９】
【化１３９】



【０５５０】
が、
【０５５１】
【化１４０】

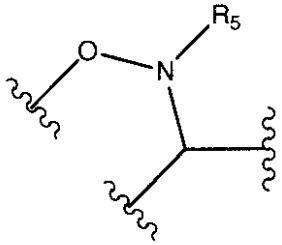


【０５５２】
である場合、
【０５５３】
【化１４１】



【０５５４】
は、
【０５５５】

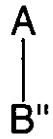
【化１４２】



【０５５６】
を含むＮ－アルキル又はアリール置換イソキサゾリン環であり、
R_2は、Ａ又はＢの一方と接続する有機構造を表し、R_4は、Ａ又はＢのもう一方と接続する有機構造を表し、
それは、
ａ）Ａ又はＡの誘導体と、第１の末端反応性基とを含むＡ’を得る工程と、
ｂ）Ｂ又はＢの誘導体と、第２の末端反応性基と、第３の末端反応性基とを含み、第２の末端反応性基が、第１の末端反応性基と反応して、非ペプチジル結合を形成することができるＢ’を得る工程と、
ｃ）Ｃ又はＣの誘導体と、第４の末端反応性基とを含み、第４の末端反応性基が、第３の末端反応性基と反応して、ペプチジル結合を形成することができるＣ’を得る工程と、
ｄ）Ａ’、Ｂ’及びＣ’を任意の順序で反応させて、化合物を生成する工程
とを含む。
【０５５７】
いくつかの態様において、工程ｄ）を、まず、Ａ’とＢ’とを反応させることにより行って、
【０５５８】
【化１４３】



【０５５９】
（ここで、Ｂ’’は、Ｂと、第３の末端反応性基を含み、Ｂ’’Ａ間の実線は、非ペプチジル結合を表す）を生成し、次いで、
【０５６０】
【化１４４】

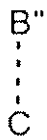


【０５６１】
をＣ’と反応させて、化合物を得る。
【０５６２】
いくつかの態様において、工程ｄ）を、まず、Ｃ’とＢ’とを反応させることにより行って、
【０５６３】

【化１４５】



【０５６４】
（ここで、Ｂ’’は、Ｂと、第２の末端反応性基を含み、Ｂ’’Ｃ間の点線は、ペプチジル結合を表す）を生成し、次いで、
【０５６５】
【化１４６】



【０５６６】
をＡ’と反応させて、化合物を得る。
【０５６７】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、アジド、チオール、ニトロン、又はアルキンである。
【０５６８】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、アルキンである。
【０５６９】
いくつかの態様において、アルキンは、シクロアルキンである。
【０５７０】
いくつかの態様において、アルキンは、８員環である。
【０５７１】
いくつかの態様において、アルキンは、アザシクロオクチンである。
【０５７２】
いくつかの態様において、シクロアルキンは、ビアリールアザシクロオクチンである。
【０５７３】
いくつかの態様において、シクロアルキンは、シクロオクチンである。
【０５７４】
いくつかの態様において、アルキンは、末端アルキンである。
【０５７５】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、アジド、チオール、又はニトロンである。
【０５７６】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、アジドである。
【０５７７】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、チオールである。
【０５７８】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、ニトロンである。
【０５７９】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、Ｎ－アルキルニトロンである。
【０５８０】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、Ｎ－アリールニトロンである。
【０５８１】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、アジド、チオール、ニトロン、又は

アルキンである。
【０５８２】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、アルキンである。
【０５８３】
いくつかの態様において、アルキンは、シクロアルキンである。
【０５８４】
いくつかの態様において、アルキンは、８員環である。
【０５８５】
いくつかの態様において、アルキンは、アザシクロオクチンである。
【０５８６】
いくつかの態様において、シクロアルキンは、ビアリールアザシクロオクチンである。
【０５８７】
いくつかの態様において、シクロアルキンは、シクロオクチンである。
【０５８８】
いくつかの態様において、アルキンは、末端アルキンである。
【０５８９】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、アジド、チオール、又はニトロンである。
【０５９０】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、アジドである。
【０５９１】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、チオールである。
【０５９２】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、ニトロンである。
【０５９３】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、Ｎ－アルキルニトロンである。
【０５９４】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、Ｎ－アリールニトロンである。
【０５９５】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、末端アルキンであり、第２の末端反応性基は、アジド、チオール、又はニトロンである。
【０５９６】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、アジドである。
【０５９７】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、チオールである。
【０５９８】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、ニトロンである。
【０５９９】
いくつかの態様において、ニトロンは、Ｎ－アルキル又はＮ－アリールニトロンである。
【０６００】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、アジド、チオール、又はニトロンであり、第２の末端反応性基は、末端アルキンである。
【０６０１】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、アジドである。
【０６０２】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、チオールである。
【０６０３】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、ニトロンである。
【０６０４】

いくつかの態様において、ニトロンは、Ｎ－アルキル又はＮ－アリールニトロンである。

【０６０５】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、シクロアルキンであり、第２の末端反応性基は、アジド、チオール、又はニトロンである。

【０６０６】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、アジドである。

【０６０７】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、チオールである。

【０６０８】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、ニトロンである。

【０６０９】

いくつかの態様において、ニトロンは、Ｎ－アルキル又はＮ－アリールニトロンである。

【０６１０】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、アジド、チオール、又はニトロンであり、第２の末端反応性基は、シクロアルキンである。

【０６１１】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、アジドである。

【０６１２】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、チオールである。

【０６１３】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、ニトロンである。

【０６１４】

いくつかの態様において、ニトロンは、Ｎ－アルキル又はＮ－アリールニトロンである。

【０６１５】

いくつかの態様において、シクロアルキンは、８員環である。

【０６１６】

いくつかの態様において、シクロアルキンは、アザシクロオクチンである。

【０６１７】

いくつかの態様において、シクロアルキンは、ビアリールアザシクロオクチンである。

【０６１８】

いくつかの態様において、シクロアルキンは、シクロオクチンである。

【０６１９】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、アジドであり、第２の末端反応性基は、末端アルキンである、又は、第１の末端反応性基は、アジドであり、第２の末端反応性基は、シクロアルキンである、又は、第１の末端反応性基は、チオールであり、第２の末端反応性基は、シクロアルキンである、又は、第１の末端反応性基は、Ｎ－アルキルニトロン若しくはＮ－アリールニトロンであり、第２の末端反応性基は、シクロオクチンである。

【０６２０】

いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、アジドであり、第１の末端反応性基は、末端アルキンである、又は、第２の末端反応性基は、アジドであり、第１の末端反応性基は、シクロアルキンである、又は、第２の末端反応性基は、チオールであり、第１の末端反応性基は、シクロアルキンである、又は、第２の末端反応性基は、Ｎ－アルキルニトロン若しくはＮ－アリールニトロンであり、第１の末端反応性基は、シクロオクチンである。

【０６２１】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基及び第２の末端反応性基は反応して、ト

リアゾール、チオレン、Ｎ－アルキルイソキサゾリン、又はＮ－アリールイソキサゾリンを生成する。

【０６２２】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基及び第２の末端反応性基は反応して、トリアゾールを生成する。

【０６２３】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基及び第２の末端反応性基は反応して、チオレンを生成する。

【０６２４】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基及び第２の末端反応性基は反応して、Ｎ－アルキルイソキサゾリン、又はＮ－アリールイソキサゾリンを生成する。

【０６２５】

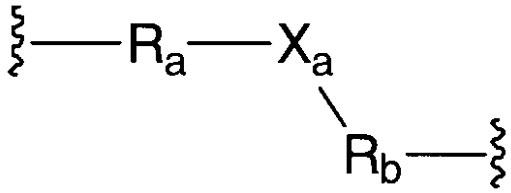
いくつかの態様において、第１の反応性基を第２の反応性基と反応させることは、３、６、１２、１８、２４、３０、３６、４２、４８又は７２時間未満で、少なくとも８０％、８５％又は９０％という反応の収率をもたらす。

【０６２６】

いくつかの態様において、ＡＢ間の実線は、以下の構造

【０６２７】

【化１４７】



【０６２８】

を含む非ペプチジル結合を表し、

ここで、X_aは、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造であり、R_aは、Ａ又はＢの一方と接続する有機構造を表し、R_bは、Ａ又はＢのもう一方と接続する有機構造を表す。

【０６２９】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、ｔｒａｎｓ－シクロオクテン、又はテトラジンである。

【０６３０】

いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、ｔｒａｎｓ－シクロオクテンである。

【０６３１】

いくつかの態様において、アルキンは、テトラジンである。

【０６３２】

いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、ｔｒａｎｓ－シクロオクテン、又はテトラジンである。

【０６３３】

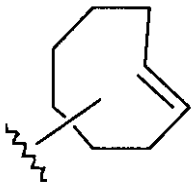
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、ｔｒａｎｓ－シクロオクテンである。

【０６３４】

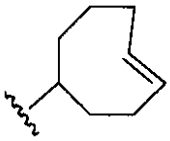
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、以下の構造

【０６３５】

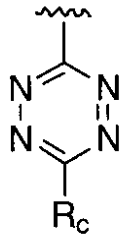
【化１４８】



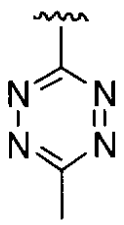
【０６３６】
を有する。
【０６３７】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、以下の構造
【０６３８】
【化１４９】



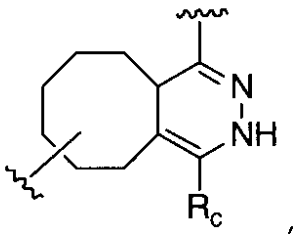
【０６３９】
を有する。
【０６４０】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、テトラジンである。
【０６４１】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、以下の構造
【０６４２】
【化１５０】



【０６４３】
（ここで、R_cは、Ｎ、アルキル又はアリールである）
を有する。
【０６４４】
いくつかの態様において、第２の末端反応性基は、以下の構造
【０６４５】
【化１５１】



【０６４６】
を有する。
【０６４７】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、ｔｒａｎｓ－シクロオクテンであり、第２の末端反応性基は、テトラジンである。
【０６４８】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基は、テトラジンであり、第２の末端反応性基は、ｔｒａｎｓ－シクロオクテンである。
【０６４９】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基と第２の末端反応性基は、反応して、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造を生成する。
【０６５０】
いくつかの態様において、第１の末端反応性基と第２の末端反応性基は、反応して、以下の化学構造
【０６５１】
【化１５２】



【０６５２】
（ここで、R_cは、Ｎ、アルキル若しくはアリールである）
又はその互変異性体を生成する。
【０６５３】
いくつかの態様において、第３の末端反応性基及び第４の末端反応性基は、それぞれ独立に、アミノ酸又はアミノ酸誘導体である。
【０６５４】
いくつかの態様において、第３の末端反応性基は、スレオニン又はスレオニン誘導体である。
【０６５５】
いくつかの態様において、第３の末端反応性基は、アミノ酸のチオエステル誘導体である。
【０６５６】
いくつかの態様において、第４の末端反応性基は、システイン、セレノシステイン、ホモシステイン、若しくはホモセレノシステイン、又はシステイン、セレノシステイン、ホモシステイン、若しくはホモセレノシステインの誘導体である。
【０６５７】
いくつかの態様において、第４の末端反応性基は、システイン又はシステインの誘導体である。
【０６５８】
いくつかの態様において、第４の末端反応性基は、システインである。
【０６５９】
いくつかの態様において、Ａ’を、
ｉ）Ａ又はＡの誘導体と、インテインを含むある一連の連続アミノ酸とを含むＡ’’を得る工程、
ｉｉ）アルキン、アジド、チオール、又はニトロンを含む有機構造にＣ末端で置換されて

いる、システイン、セレノシステイン、ホモシステイン、若しくはホモセレノシステイン残基、又はシステイン、セレノシステイン、ホモシステイン、若しくはホモセレノシステイン残基の置換誘導体を得る工程、及び
ｉｉｉ）Ａ’’を、置換されているシステイン残基と反応させて、Ａ’を生成する工程
によって作製する。
【０６６０】
いくつかの態様において、アルキンを含む有機構造は、Ｎ－プロパルギルアミンである。
【０６６１】
いくつかの態様において、Ａ’を、
ｉ）Ａ又はＡの誘導体を含み、少なくとも１つの遊離チオ基を含むＡ’’を得る工程、
ｉｉ）第１の末端反応性基と末端マレイミドとを含む化合物を得る工程、及び
ｉｉｉ）Ａ’’を、工程ｉｉ）の化合物と反応させて、Ａ’を生成する工程
によって作製する。
【０６６２】
いくつかの態様において、Ａ’’を、
ａ）Ａ又はＡの誘導体を含み、少なくとも１つのジスルフィド結合を含むポリペプチドであるＡ’’’を得る工程、及び
ｂ）Ａ’’’をメルカプトエチルアミン（ＭＥＡ）で処理して、Ａ’’を生成する工程
によって作製する。
【０６６３】
いくつかの態様において、Ａ’’’を、
ａ）Ａ又はＡの誘導体を含み、少なくとも１つのジスルフィド結合を含むモノクローナル抗体を得る工程、及び
ｂ）工程ａ）のポリペプチドをＩｄｅＳで処理して、Ａ’’’を生成する工程
によって作製する。
【０６６４】
いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、ＴＮＦαに結合する。
【０６６５】
いくつかの態様において、モノクローナル抗体は、アダリムマブである。
【０６６６】
いくつかの態様において、Ｒ１が水素であり、第１の末端反応性基がアルキンである場合、工程ｄ）において、Ｂ’を、金属触媒の存在下で反応させる。
【０６６７】
いくつかの態様において、Ｒ１が水素であり、第２の末端反応性基がアルキンである場合、工程ｄ）において、Ｂ’を、金属触媒の存在下で反応させる。
【０６６８】
いくつかの態様において、金属触媒は、Ａｇ（Ｉ）又はＣｕ（Ｉ）である。
【０６６９】
いくつかの態様において、Ａ’は、１つ以上の分枝残基を含み、各分枝残基は、追加の第１の末端反応性基を含む。
【０６７０】
いくつかの態様において、Ｂ’は、１つ以上の分枝残基を含み、各分枝残基は、追加の第２の末端反応性基を含む。
【０６７１】
いくつかの態様において、Ｂ’は、１つ以上の分枝残基を含み、各分枝残基は、追加の第３の末端反応性基を含む。
【０６７２】
いくつかの態様において、分枝残基は、アミノ酸残基である。
【０６７３】

いくつかの態様において、アミノ酸残基は、リシン又はリシン誘導体、アルギニン又はアルギニン誘導体、アスパラギン酸又はアスパラギン酸誘導体、グルタミン酸又はグルタミン酸誘導体、アスパラギン又はアスパラギン誘導体、グルタミン又はグルタミン誘導体、チロシン又はチロシン誘導体、システイン又はシステイン誘導体、オルニチン又はオルニチン誘導体である。

【０６７４】

いくつかの態様において、アミノ酸残基を、末端アミノ又はカルボニル反応性基を含む残基にＮ位で置換する。

【０６７５】

いくつかの態様において、分枝残基は、２つ以上の末端アミノ基又は２つ以上の末端カルボニル基を含む、有機残基である。

【０６７６】

いくつかの態様において、有機残基は、イミノジプロピオン酸、イミノ二酢酸、４－アミノ－ピメリン酸、４－アミノ－ヘプタン二酸、３－アミノヘキサン二酸、３－アミノアジピン酸、２－アミノオクタン二酸、又は２－アミノ－６－カルボニル－ヘプタン二酸である。

【０６７７】

いくつかの態様において、方法は、非チオール還元剤の非存在下で行われる。

【０６７８】

いくつかの態様において、方法は、チオール還元剤の非存在下で行われる。

【０６７９】

いくつかの態様において、方法は、チオール還元剤の存在下で行われる。

【０６８０】

いくつかの態様において、方法は、全収率８０％以上で行われる。

【０６８１】

いくつかの態様において、方法は、全収率９０％以上で行われる。

【０６８２】

いくつかの態様において、第１の反応性基を第２の反応性基と反応させることは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又は６０分未満で、少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、８０％、８５％又は９０％という反応の収率をもたらす。

【０６８３】

いくつかの態様において、Ｂは、有機酸残基である。

【０６８４】

いくつかの態様において、Ｂは、一連の１～５０個のアミノ酸残基及び任意に有機酸残基である。

【０６８５】

いくつかの態様において、Ｂは、一連の１～１０個の連続アミノ酸である。

【０６８６】

いくつかの態様において、Ｂは、ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、ＥＲＫＣＣＶＥＣＰＰＣＰ、ＥＬＫＴＰＬＧＤＴＴＨＴＣＰＲＣＰ（ＥＰＫＳＣＤＴＰＰＰＣＰＲＣＰ）３、ＥＳＫＹＧＰＰＣＰＳＣＰという配列又はその一部における、一連の連続アミノ酸を含む。

【０６８７】

いくつかの態様において、Ｂは、Ｃ末端にスレオニンを有する。

【０６８８】

いくつかの態様において、Ｚは、１つのＣを含み、Ｃは、化合物の第１のポリペプチドであり、第１のポリペプチドは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、（ｉ）抗体のＦ$_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）Ｆ$_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）システイン、セレノシステイン、ＣＰ、ＣＰＸＣＰ（ここで、Ｘ＝Ｐ、Ｒ又はＳ）、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、ＣＶＥＣＰＰＣＰ、ＣＣＶＥＣＰＰＣＰ、及び

ＣＤＴＰＰＣＰＲＣＰからなる群から選択される配列をＮ末端に有する。
【０６８９】
いくつかの態様において、Ｃは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、（ｉ）抗体の$Ｆ_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）$Ｆ_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）ＣＰ、ＣＰＸＣＰ（ここで、Ｘ＝Ｐ、Ｒ又はＳ）、ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ、ＣＶＥＣＰＰＣＰ、ＣＣＶＥＣＰＰＣＰ、及びＣＤＴＰＰＰＣＰＲＣＰからなる群から選択される、天然に存在するシステインを含む配列をＮ末端に有する。
【０６９０】
いくつかの態様において、Ｃは、前記化合物のポリペプチド成分であり、ポリペプチド成分が、連続アミノ酸を含み、連続アミノ酸が、（ｉ）抗体の$Ｆ_c$ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一であり、（ｉｉ）$Ｆ_c$受容体に結合し、（ｉｉｉ）天然に存在しないシステイン又はセレノシステインを含む配列をＮ末端に有する。
【０６９１】
いくつかの態様において、Ｃは、連続アミノ酸を含み、連続アミノ酸が、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、及びＩｇＥからなる群から選択される抗体のＦｃドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である。
【０６９２】
いくつかの態様において、Ｃは、連続アミノ酸を含み、連続アミノ酸が、抗体のＦｃ６ドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である。
【０６９３】
いくつかの態様において、Ｃは、連続アミノ酸をさらに含み、その連続アミノ酸が、抗体のＦｃドメイン鎖以外の抗体の鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である。
【０６９４】
いくつかの態様において、Ｃは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、抗体のＦａｂ又はＦａｂ’の重鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である。
【０６９５】
いくつかの態様において、Ｃは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、抗体のＦａｂ又はＦａｂ’の軽鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である。
【０６９６】
いくつかの態様において、Ｚは、第２のポリペプチドをさらに含み、その第２のポリペプチドが、抗体のＦｃドメイン鎖以外の抗体の鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である連続アミノ酸を含む。
【０６９７】
いくつかの態様において、第２のポリペプチドは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、抗体のＦａｂ又はＦａｂ’の重鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である。
【０６９８】
いくつかの態様において、第２のポリペプチドは、連続アミノ酸を含み、その連続アミノ酸が、抗体のＦａｂ又はＦａｂ’の軽鎖に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である。
【０６９９】
いくつかの態様において、Ｚは、抗体又はその一部分を含む。
【０７００】
いくつかの態様において、Ｚは、抗体の少なくとも１つのＦａｂ若しくはＦａｂ’、又は少なくとも１つのＦａｂ若しくはＦａｂ’の一部分を含む。
【０７０１】
いくつかの態様において、Ｚは、Ｆａｂ若しくはＦａｂ’又はその一部分の少なくとも２、３、４、５，６、７、８、９、又は１０個のコピーを含む。
【０７０２】
いくつかの態様において、Ｚは、抗体のＦａｂ－１若しくはＦａｂ’１又はその一部分

を含む。
【０７０３】
いくつかの態様において、Ｚは、抗体のＦａｂ－２若しくはＦａｂ’２又はその一部分を含む。
【０７０４】
いくつかの態様において、Ｚは、抗体の２つのＦａｂ又はＦａｂ’の手を含む。
【０７０５】
いくつかの態様において、抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、又はＩｇＥ抗体である。
【０７０６】
いくつかの態様において、Ｆａｂ又はＦａｂ’は、アダリムマブに存在する。
【０７０７】
いくつかの態様において、Ｚは、単鎖抗体に存在するある一連の連続アミノ酸と同一である、少なくとも１つの一連の連続アミノ酸を含む。
【０７０８】
いくつかの態様において、ＣのＣ末端は、修飾されている抗体のF_cドメイン鎖に存在するある一連の連続アミノ酸を含む。
【０７０９】
いくつかの態様において、ＣのＣ末端は、システイン、セレノシステイン、ホモシステイン若しくはホモセレノシステイン、又はシステイン、セレノシステイン、ホモシステイン若しくはホモセレノシステインの誘導体である。
【０７１０】
いくつかの態様において、Ｂは、ＺのポリペプチドのＮ末端システイン又はセレノシステインと、Ｂのアミノ酸残基又は有機酸残基との間のペプチジル結合によってＺに連結している。
【０７１１】
いくつかの態様において、Ｚは、第２のポリペプチドを含み、Ｂは、Ｚの第２のポリペプチドのＮ末端システイン又はセレノシステインと、Ｂのアミノ酸残基又は有機酸残基との間のペプチジル結合によってＺに連結している。
【０７１２】
いくつかの態様において、Ｂは、ＣのＮ末端システイン又はセレノシステインと、Ｂのアミノ酸残基又は有機酸残基との間のペプチジル結合によってＣに連結している。
【０７１３】
いくつかの態様において、Ｚは、１つのポリペプチドを含み、それは、Ｃである。
【０７１４】
いくつかの態様において、Ｚは、２つのポリペプチドを含み、それらは、Ｃ及び第２のポリペプチドである。
【０７１５】
本発明は、本発明の化合物を含むホモダイマー及びヘテロダイマーを提供する。
【０７１６】
いくつかの態様において、ダイマーの各化合物は、少なくとも１つのジスルフィド結合によって、他方に結合することができる。
【０７１７】
いくつかの態様において、ダイマーの各化合物は、各化合物のＣ又は第２のポリペプチド間の少なくとも１つのジスルフィド結合によって、他方に結合することができる。
【０７１８】
いくつかの態様において、ダイマーの各化合物は、少なくとも１つのジスルフィド結合によって、他方に結合する。
【０７１９】
いくつかの態様において、ダイマーの各化合物は、各化合物のＣ又は第２のポリペプチ

ド間の少なくとも１つのジスルフィド結合によって、他方に結合する。

【０７２０】

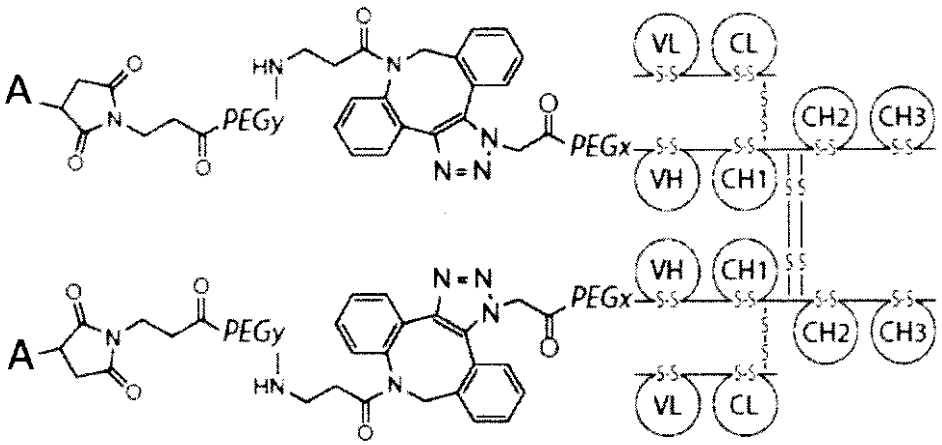
いくつかの態様において、ダイマーの各化合物は、他方に非共有結合する。

【０７２１】

いくつかの態様において、ダイマーは、

【０７２２】

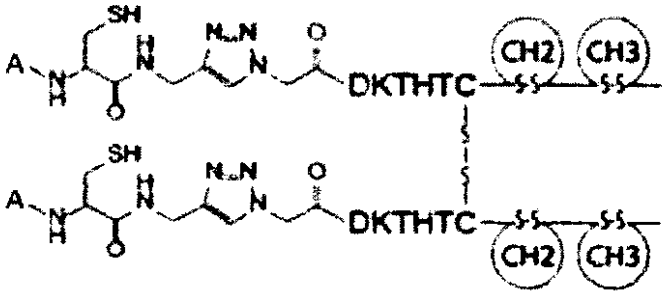
【化１５３－１】



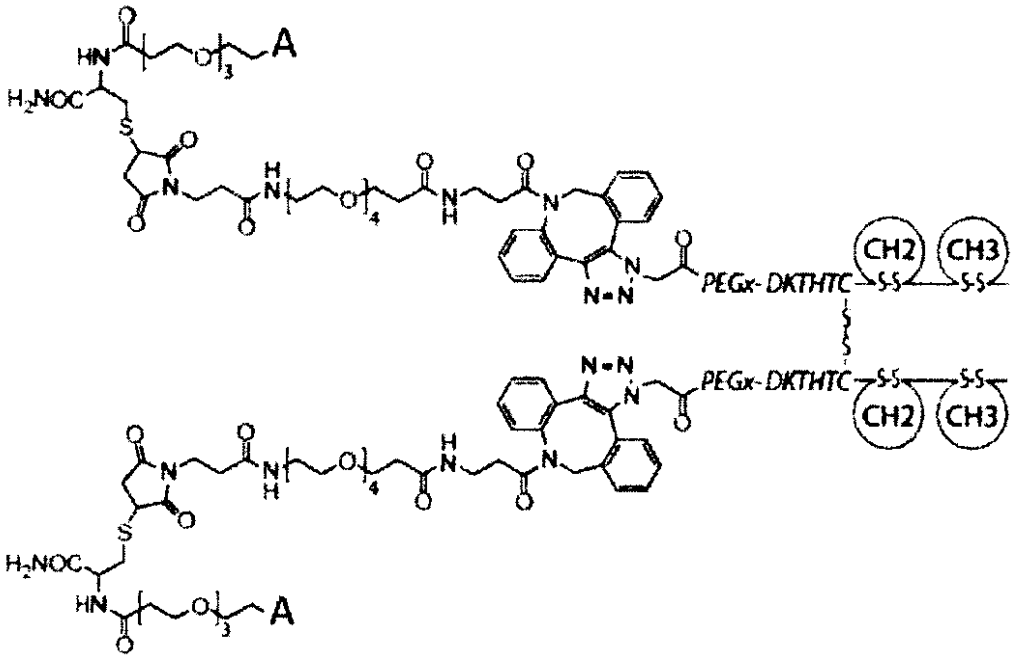
;

【０７２３】

【化１５３－２】

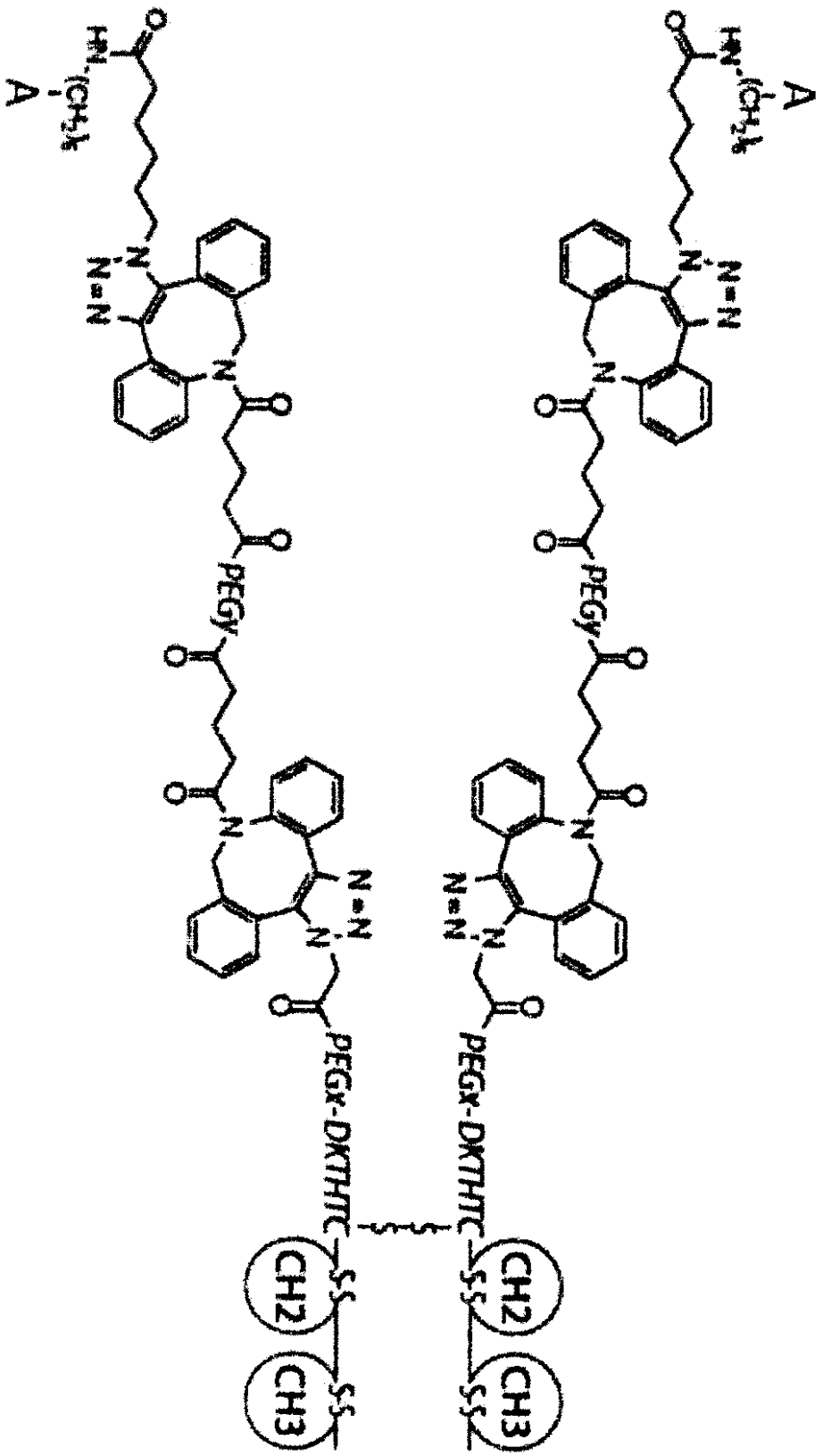


;



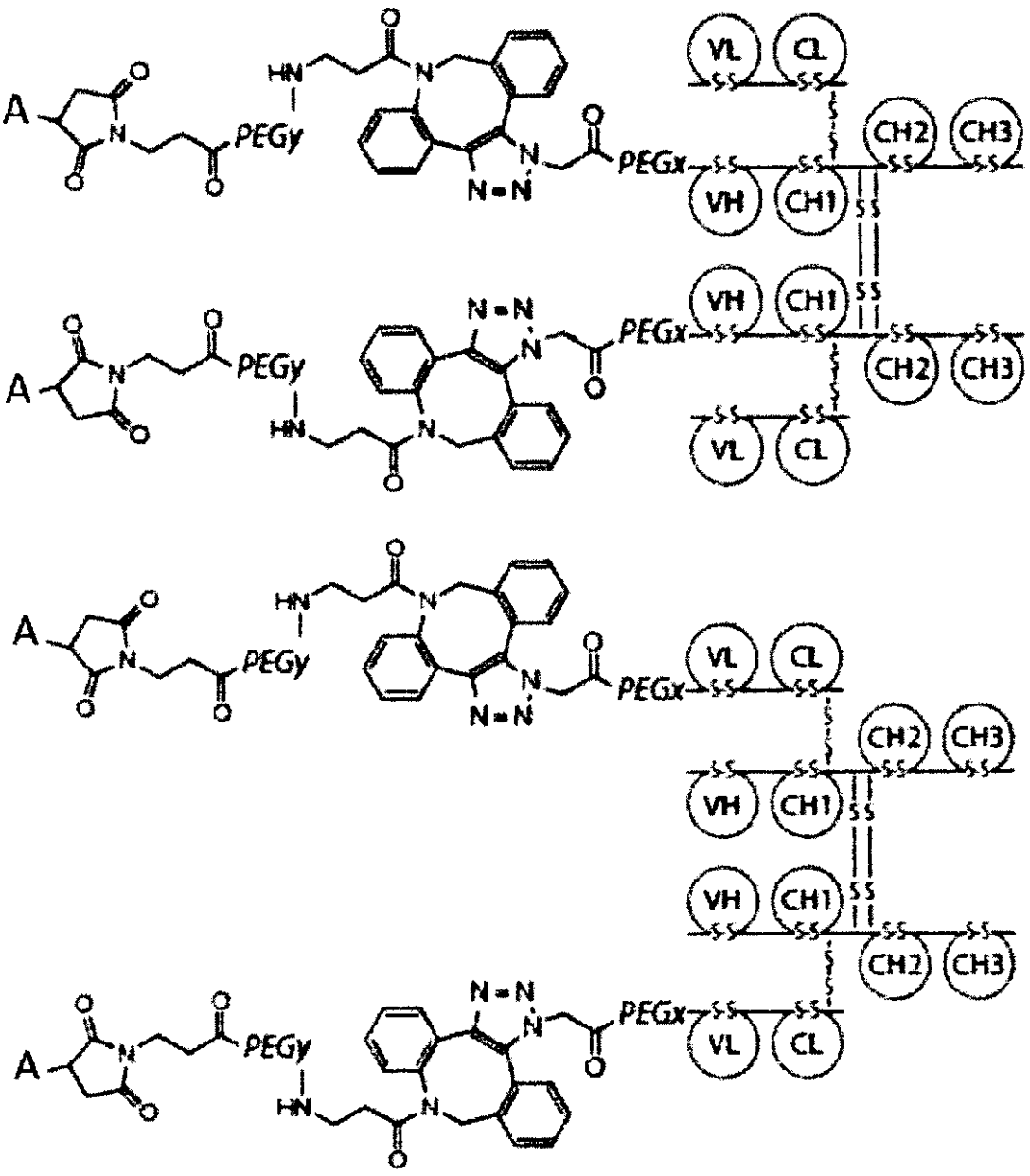
;

【０７２４】
【化１５３－３】

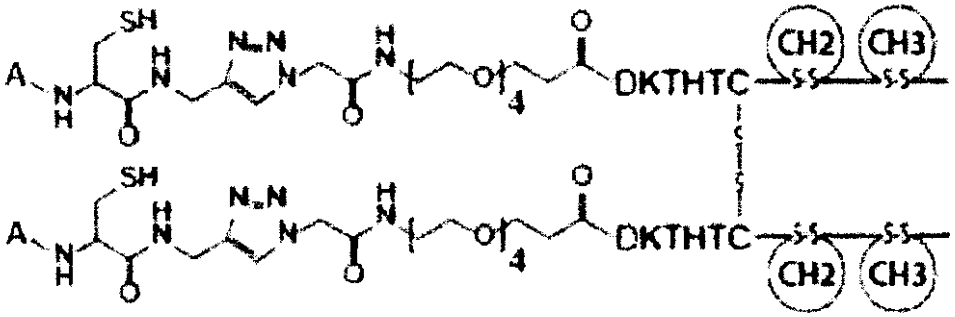


【０７２５】

【化１５３－４】


A
PEGy
HN
N
N=N
PEGx
VL
CL
VH
CH1
CH2
CH3
SS

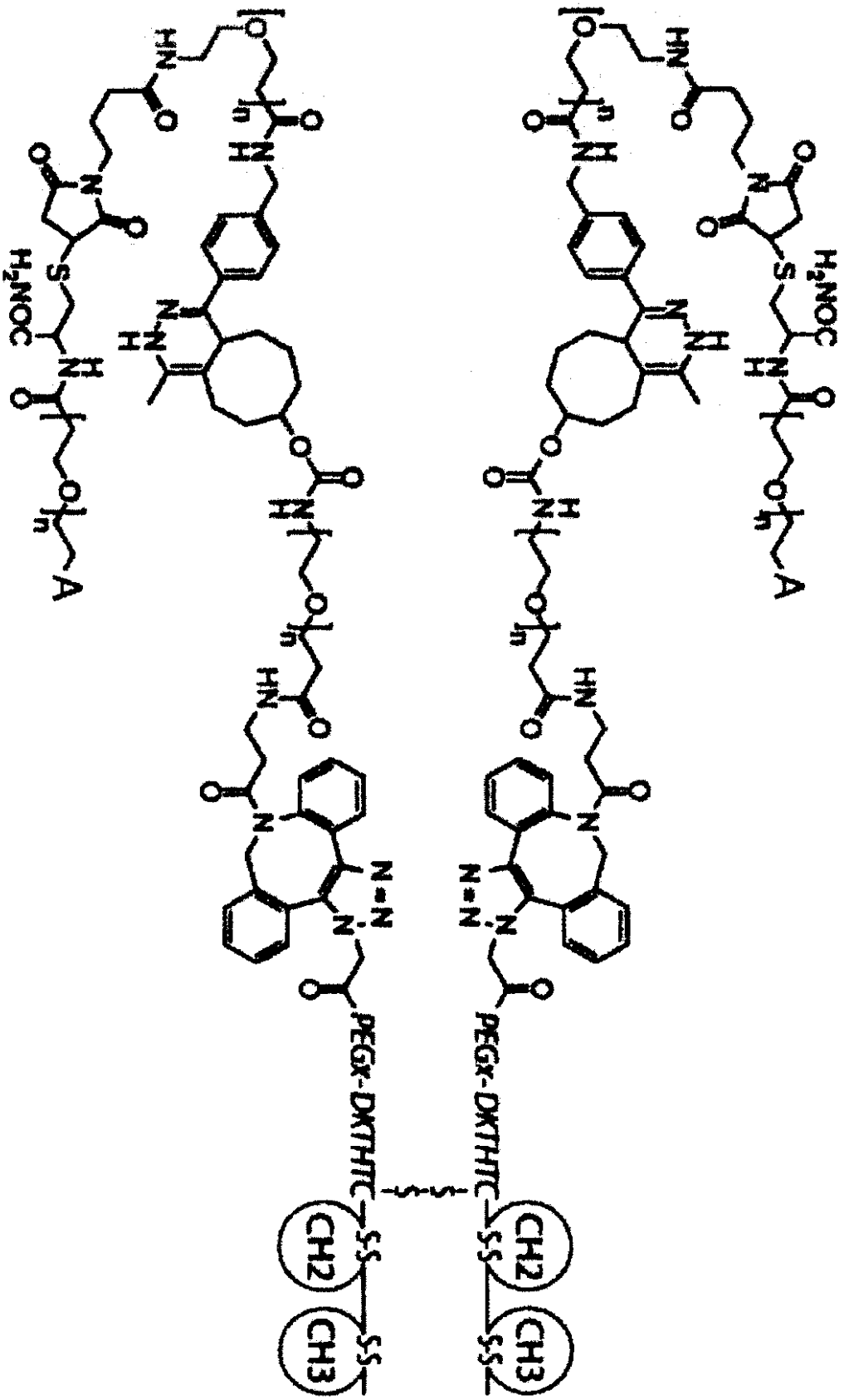
;


SH
A
N
H
O
N=N
HN
O
4
DKTHTC
CH2
CH3
SS

;

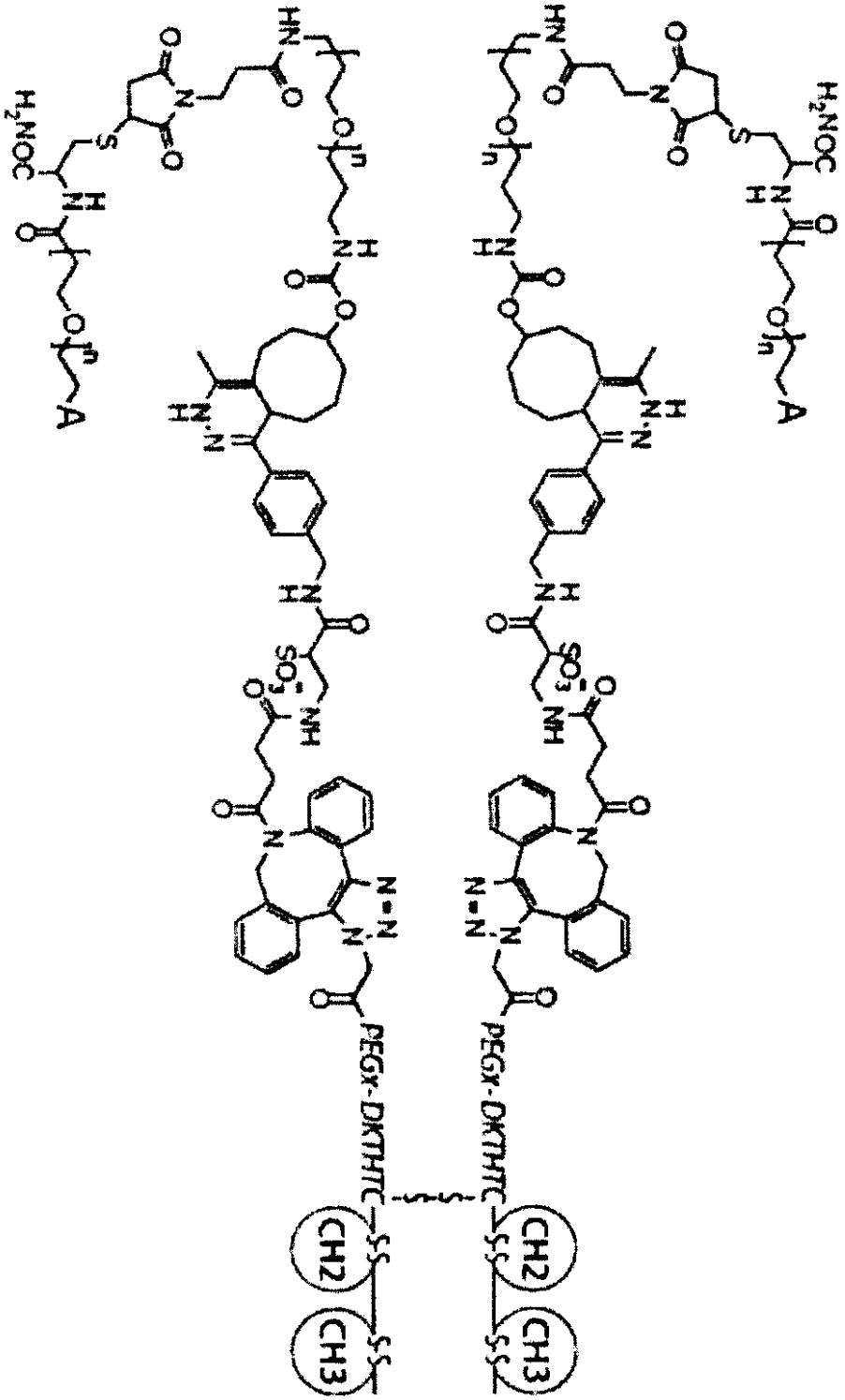
【０７２６】

【化１５３－５】



【０７２７】

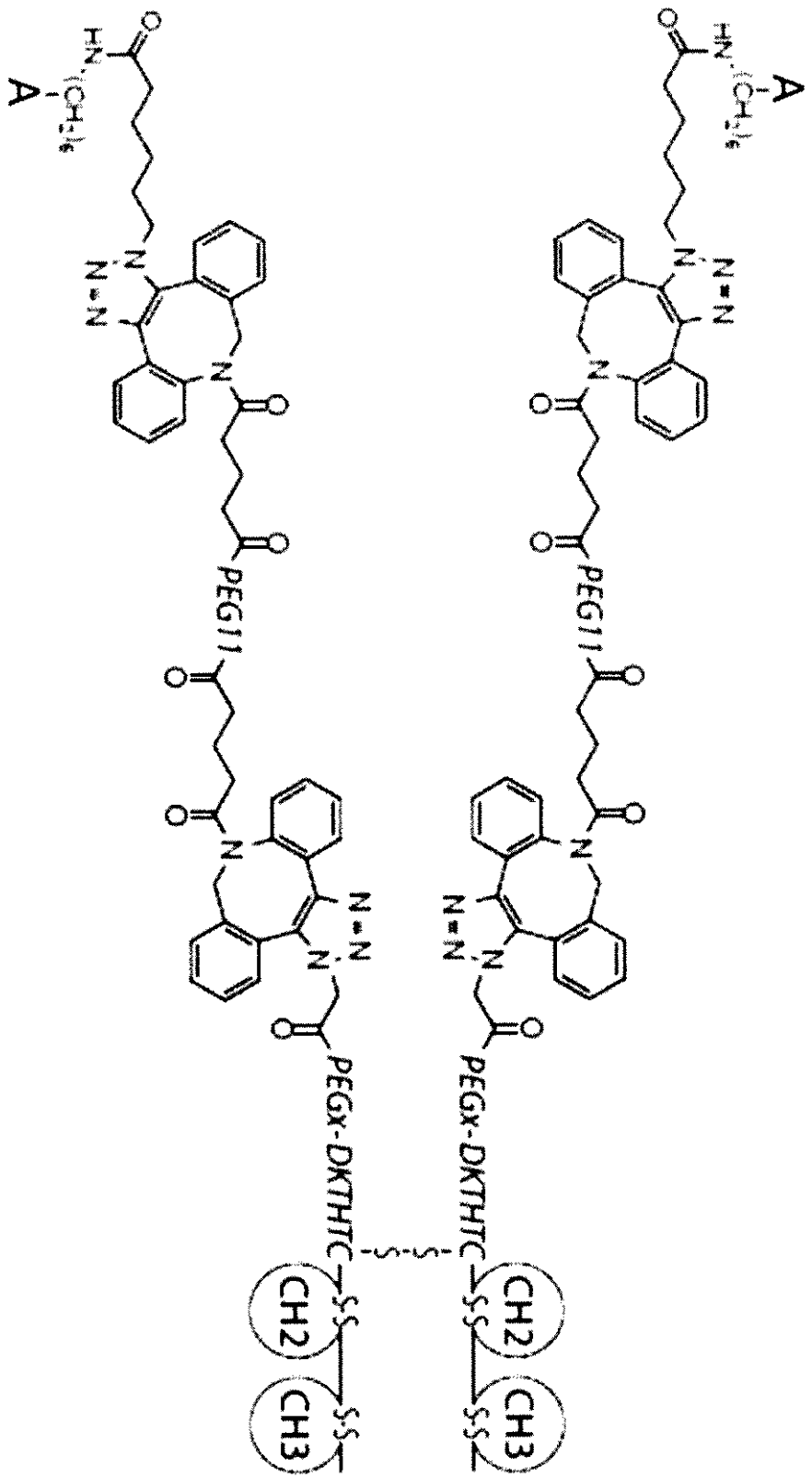
【化１５３－６】



；または

【０７２８】

【化１５３－７】



【０７２９】
である。
【０７３０】
本発明の化合物のダイマーの追加の非限定的例は、図に示されている。
【０７３１】
いくつかの態様において、分枝残基は、リシン又はリシン誘導体、アルギニン又はアル

ギニン誘導体、アスパラギン酸又はアスパラギン酸誘導体、グルタミン酸又はグルタミン酸誘導体、アスパラギン又はアスパラギン誘導体、グルタミン又はグルタミン誘導体、チロシン又はチロシン誘導体、システイン又はシステイン誘導体、オルニチン又はオルニチン誘導体である。

【０７３２】

いくつかの態様において、分枝残基は、末端アミノ又はカルボニル反応性基を含む残基でＮ位で置換されている、アミノ酸である。いくつかの態様において、分枝残基は、２つ以上の末端アミノ基又は２つ以上の末端カルボニル基を含む、有機残基である。

【０７３３】

いくつかの態様において、分枝残基は、２つ以上の末端アミノ基を含む有機残基である。いくつかの態様において、分枝残基は、２つ以上の末端カルボニル基を含む有機残基である。いくつかの態様において、分枝残基は、ジアミノプロピオン酸である。いくつかの態様において、分枝残基は、ジアミノプロピオンカルボニル化合物（diaminopropionic carbonyl compound）である。

【０７３４】

いくつかの態様において、分枝残基は、４－（カルボニルメトキシ）フェニルアラニン、２－アミノ－６－（カルボニルメチルアミノ）ヘキサン酸、Ｓ－（カルボニルプロピル）システイン、Ｓ－（カルボニルエチル）システイン、Ｓ－（カルボニルメチル）システイン、Ｎ－（カルボニルエチル）グリシン、Ｎ－（カルボニルメチル）グリシン、イミノジプロピオン酸、イミノ二酢酸、４－アミノ－ピメリン酸、４－アミノ－ヘプタン二酸、３－アミノヘキサン二酸、３－アミノアジピン酸、２－アミノオクタン二酸、又は２－アミノ－６－カルボニル－ヘプタン二酸である。

【０７３５】

いくつかの態様において、分枝残基は、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ａｓｐ－ＡＭＣ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ａｓｐ－ｐＮＡ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｇｌｕ－ＡＭＣ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｇｌｕ－ｐＮＡ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｇｌｕ（Ｅｄａｎｓ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｇｌｕ（ＰＥＧ－ビオチニル）－ＯＨ、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－ヘキサン二酸－６－ｔｅｒｔ－ブチルエステル、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－アジピン酸－６－ｔｅｒｔ－ブチルエステル、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－Ａａｄ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－５－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－ヘキサン二酸－６－ｔｅｒｔ－ブチルエステル、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－ヘプタン二酸－７－ｔｅｒｔ－ブチルエステル、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－ピメリン酸－７－ｔｅｒｔ－ブチルエステル、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－６－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－ヘプタン二酸－７－ｔｅｒｔ－ブチルエステル、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－オクタン二酸－８－ｔｅｒｔ－ブチルエステル、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－スベリン酸－８－ｔｅｒｔ－ブチルエステル、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－Ａｓｕ（ＯｔＢｕ）－ＯＨ、（Ｒ）－Ｆｍｏｃ－３－アミノ－ヘキサン二酸－１－ｔｅｒｔ－ブチルエステル、（Ｒ）－Ｆｍｏｃ－３－アミノ－アジピン酸－１－ｔｅｒｔ－ブチルエステル、（Ｒ）－Ｆｍｏｃ－４－アミノ－ヘプタン二酸－１－ｔｅｒｔ－ブチルエステル、（Ｒ）－Ｆｍｏｃ－４－アミノ－ピメリン酸－１－ｔｅｒｔ－ブチルエステル、Ｂｏｃ－イミノ二酢酸、Ｆｍｏｃ－イミノ二酢酸、Ｂｏｃ－イミノジプロピオン酸、Ｆｍｏｃ－イミノジプロピオン酸、Ｆｍｏｃ－Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルメチル）－グリシン、Ｆｍｏｃ－Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルエチル）－グリシン、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｃｙｓ（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルメチル）－ＯＨ　（Ｒ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－３－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルメチルスルファニル）－プロピオン酸、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｃｙｓ（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルプロピル）－ＯＨ　（Ｒ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－３－（３－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルプロピルスルファニル）－プロピオン酸、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｃｙｓ（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルエチル）－ＯＨ　（Ｒ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－３－（２－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルエチルスルファニル）－プロピオン酸、Ｆｍｏｃ－４－（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルメトキシ）－Ｌ－フェニルアラニン、又は（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－６－（Ｂｏｃ－ｔｅ

ｒｔ－ブトキシカルボニルメチルアミノ）－ヘキサン酸から作製される。

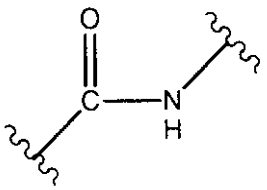
【０７３６】

いくつかの態様において、分枝残基は、Ｎ－α－Ｂｏｃ－ＤＬ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｂｏｃ－Ｄ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｂｏｃ－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｆｍｏｃ－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｂｏｃ－Ｎ－β－Ａｌｌｏｃ－Ｄ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｂｏｃ－Ｎ－β－Ａｌｌｏｃ－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｆｍｏｃ－Ｎ－β－ａｌｌｏｃ－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｎ－β－ビス－Ｂｏｃ－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｆｍｏｃ－Ｎ－β－Ｂｏｃ－Ｄ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｆｍｏｃ－Ｎ－β－Ｂｏｃ－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｚ－Ｎ－β－Ｂｏｃ－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｂｏｃ－Ｎ－β－Ｆｍｏｃ－Ｄ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｂｏｃ－Ｎ－β－Ｆｍｏｃ－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｎ－β－ビス－Ｆｍｏｃ－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｚ－Ｎ－β－Ｆｍｏｃ－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｂｏｃ－Ｎ－β－Ｚ－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｆｍｏｃ－Ｎ－β－Ｚ－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｆｍｏｃ－Ｎ－β－　（Ｂｏｃ－アミノオキシアセチル）－Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｎ－α－Ｂｏｃ－Ｎ－γ－Ｆｍｏｃ－Ｄ－ジアミノ酪酸、Ｎ－α－Ｂｏｃ－Ｎ－γ－Ｆｍｏｃ－Ｌ－ジアミノ酪酸、Ｎ－α－Ｂｏｃ－Ｎ－γ－Ｆｍｏｃ－Ｌ－ジアミノ酪酸、Ｎ－α－Ｆｍｏｃ－Ｎ－γ－Ｂｏｃ－Ｄ－ジアミノ酪酸、Ｎ－α－Ｆｍｏｃ－Ｎ－γ－Ｂｏｃ－Ｌ－ジアミノ酪酸、Ｎ－α－Ｆｍｏｃ－Ｎ－γ－Ａｌｌｏｃ－Ｌ－ジアミノ酪酸、（Ｓ）－Ｎ－ｂ－Ｆｍｏｃ－Ｎ－γ－Ｂｏｃ－３，４－ジアミノ酪酸、Ｈ－Ｌ－オルニチン、Ｎ－ａ－Ｂｏｃ－Ｎ－δ－Ａｌｌｏｃ－Ｌ－オルニチン、Ｎ－ａ－Ｆｍｏｃ－Ｎ－δ－Ａｌｌｏｃ－Ｌ－オルニチン、Ｎ－ａ－Ｆｍｏｃ－Ｎ－δ－Ｂｏｃ－Ｌ－オルニチン、（Ｓ）－Ｂｏｃ－２－アミノ－５－アジド－ペンタン酸。ＤＣＨＡ、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－５－アジド－ペンタン酸、Ｎ－ａ－Ｎ－δ－ビス－Ｂｏｃ－Ｎ－ａ－Ｎ－δ－ビス（３－Ｂｏｃ－アミノプロピル）－Ｌ－オルニチン、Ｎ－α－Ｂｏｃ－Ｎ－β－Ｎ－δ－Ｎ－δ－トリス（３－Ｂｏｃ－アミノプロピル）－Ｌ－オルニチン、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｌｙｓ（ビオチン）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｌｙｓ（Ｄａｂｃｙｌ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）（Ｍｅ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）（ｉＰｒ）－ＯＨ、（２Ｓ，５Ｒ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－４－（３－Ｂｏｃ－２，２－ジメチル－オキサゾリジン－５－イル）－酪酸、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－６－（Ｂｏｃ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルメチル－アミノ）－ヘキサン酸、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－２－アミノ－７－（Ｂｏｃ－アミノ）－ヘプタン酸、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ａｒｇ（Ｍｅ）（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ａｒｇ（Ｍｅ）２（Ｐｂｆ）－ＯＨ、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ａｒｇ（Ｍｅ）２－ＯＨ、（Ｓ）－Ｆｍｏｃ－３－アミノ－５－［（Ｎ’－Ｐｂｆ－ピロリジン－１－カルボキシイミドイル）－アミノ］－ペンタン酸、Ｆｍｏｃ－Ｌ－Ｈｏｍｏａｒｇ（Ｅｔ）２－ＯＨ、Ｂｏｃ－３－アミノ－５－（Ｆｍｏｃ－アミノ）－安息香酸、３，５－ビス［２－（Ｂｏｃ－アミノ）エトキシ］－安息香酸、Ｆｍｏｃ－４－［２－（Ｂｏｃ－アミノ）エトキシ］－Ｌ－フェニルアラニン、Ｎ，Ｎ－ビス（Ｎ’－Ｆｍｏｃ－３－アミノプロピル）－グリシンカリウムヘミスルフェート、Ｎ，Ｎ－ビス（Ｎ’－Ｆｍｏｃ－３－アミノプロピル）－グリシンカリウムヘミスルフェート、Ｆｍｏｃ－Ｎ－（２－Ｂｏｃ－アミノエチル）－グリシン、Ｆｍｏｃ－Ｎ－（３－Ｂｏｃ－アミノプロピル）－グリシン、Ｆｍｏｃ－Ｎ－（４－Ｂｏｃ－アミノブチル）－グリシン、（Ｒ，Ｓ）－Ｎ－α－Ｆｍｏｃ－Ｎ－ａ’－Ｂｏｃ－ジアミノ酢酸、Ｎ，Ｎ’－ビス－Ｆｍｏｃ－ジアミノ酢酸、（Ｓ）－Ｎ－４－Ｆｍｏｃ－Ｎ－８－Ｂｏｃ－ジアミノオクタン酸、（Ｒ，Ｓ）－Ｎ－Ｆｍｏｃ－Ｎ’－Ｂｏｃ－イミダゾリジン－２－カルボン酸、Ｆｍｏｃ－ｐ（ＮＨ－Ｂｏｃ）－Ｌ－Ｐｈｅ－ＯＨ、Ｂｏｃ－ｐ（ＮＨ－Ｆｍｏｃ）－Ｌ－Ｐｈｅ－ＯＨ、又はＢｏｃ－ｐ（ＮＨ－Ｚ）－Ｌ－Ｐｈｅ－ＯＨから作製される。

【０７３７】

ここで開示する各態様は、他の開示する態様のそれぞれに適用できるものであると企図する。したがって、ここで記述する様々な要素の組み合わせのすべてが、本発明の範囲内

である。
【０７３８】
パラメーターの範囲を示す場合、本発明は、その範囲のすべての整数、及びその１０分の１も示すと理解する。例えば、「０．２～５ｍｇ／ｋｇ／日」は、０．２ｍｇ／ｋｇ／日、０．３ｍｇ／ｋｇ／日、０．４ｍｇ／ｋｇ／日、０．５ｍｇ／ｋｇ／日、０．６ｍｇ／ｋｇ／日など、から５．０ｍｇ／ｋｇ／日までの開示である。
用語
ここで使用する場合、特に断りがない限り、以下の用語のそれぞれは、下記の定義を有するものとする。
【０７３９】
ペプチジル結合：構造
【０７４０】
【化１５４】



【０７４１】
ペプチジル結合は、ペプチド結合であってもよい。
【０７４２】
一連の連続アミノ酸：鎖状に配置された複数のアミノ酸であって、鎖の最初のアミノ酸が、任意に、前のアミノ酸につながっていなくてもよいことを除いて、それぞれが、ペプチド結合によって、前のアミノ酸に接続する複数のアミノ酸。鎖のアミノ酸は、天然に存在していても天然に存在していなくてもよく、又はそれらの混合物を含んでいてもよい。アミノ酸は、特に指示がない限り、遺伝的にコードされていてもよいし、天然に存在するが、遺伝的にコードされていなくてもよいし、天然に存在していなくてもよいし、それらの任意の選択であってもよい。
【０７４３】
Ｎ末端アミノ酸残基：遊離α－アミノ（NH_2）官能基又はα－アミノ（NH_2）官能基の誘導体を有する、２個以上の一連の連続アミノ酸の末端残基。
【０７４４】
Ｎ末端：Ｎ末端アミノ酸残基の遊離α－アミノ（NH_2）基（又はその誘導体）。
【０７４５】
Ｃ末端アミノ酸残基：遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）官能基又はα－カルボキシル（ＣＯＯＨ）官能基の誘導体を有する、２個以上の一連の連続アミノ酸の末端残基。
【０７４６】
Ｃ末端：Ｃ末端アミノ酸残基の遊離α－カルボキシル（ＣＯＯＨ）基（又はその誘導体）。
【０７４７】
「生物学的に活性な構造」は、ここで使用する場合、生物学的な文脈（例えば、有機体、細胞、若しくはそれらのインビトロモデル内）で、機能若しくは作用を実行すること、又は機能、作用若しくは反応を刺激する若しくはそれらに応答することによって、疾患若しくは状態を治療すること、又は本発明の化合物を体内における疾患若しくは状態の部位に局在化若しくは標的化することができる、分子又はその断片の構造を意味する。生物学的に活性な構造は、ポリペプチド、核酸、有機又は無機小分子などの小分子の少なくとも１つの構造を含んでいてもよい。
【０７４８】

「結合」は、特に指定がない限り、又は文脈に反しない限り、共有結合、双極子－双極子相互作用、例えば、水素結合、及び分子間相互作用、例えば、ファン・デル・ワールス力を含むと理解する。

【０７４９】

「シグナル配列」は、ポリペプチドの翻訳後輸送を指示する、短い（３～６０アミノ酸長）ペプチド鎖である。

【０７５０】

ここで使用する「アミノ酸」は、一態様において、遺伝的にコードされたアミノ酸、すなわち、イソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン、リシン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシン、バリン、プロリン、アルギニン、セリン、ヒスチジン、チロシン、セレノシステイン、ピロリシンのＬ又はＤ異性体を意味し、ホモシステイン及びホモセレノシステインも含む。

【０７５１】

アミノ酸の他の例としては、タウリン、ギャバ、ドーパミン、ランチオニン、２－アミノイソ酪酸、デヒドロアラニン、オルニチン及びシトルリンのＬ又はＤ異性体、並びに、それらの非天然同族体及び合成的に修飾された形態、例えば、２つまでの炭素原子によって短く又は長くされたアルキレン鎖を有するアミノ酸、任意に置換されていてもよいアリール基を含むアミノ酸、ハロゲン化アルキル及びアリール基を含めたハロゲン化基を含むアミノ酸、並びに、β又はγアミノ酸、及び環状類似体が挙げられる。

【０７５２】

イオン化できるアミノ及びカルボキシル基の存在によって、これらの態様におけるアミノ酸は、酸性の塩又は塩基性の塩の形態であってもよいし、中性の形態であってもよい。個々のアミノ酸残基は、酸化又は還元によって修飾されてもよい。他の企図される修飾としては、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、並びに、リシン、アルギニン及びヒスチジン側鎖のα－アミノ基のメチル化が挙げられる。

【０７５３】

共有結合誘導体は、特定の官能基を、アミノ酸側鎖に又はＮ若しくはＣ末端で連結することによって作製されてもよい。

【０７５４】

Ｒ基置換を有するアミノ酸を含む化合物は、本発明の範囲内である。本発明の化合物での置換基及び置換パターンは、容易に入手できる出発材料から化学的に安定な化合物をもたらすように、当業者によって選択できると理解する。

【０７５５】

ここで使用する「天然アミノ酸」は、遺伝的にコードされたアミノ酸、すなわち、イソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン、リシン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシン、バリン、プロリン、アルギニン、セリン、ヒスチジン、チロシン、セレノシステイン、ピロリシン、並びに、ホモシステイン、及びホモセレノシステインのＬ又はＤ異性体を意味する。

【０７５６】

ここで使用する「非天然アミノ酸」は、α炭素とＳ又はＳｅとの間にC_3～C_{10}脂肪族側鎖を有するシステイン及びセレノシステイン誘導体を含めた、イソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン、リシン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシン、バリン、プロリン、アルギニン、セリン、ヒスチジン、チロシン、セレノシステイン、ピロリシン、ホモシステイン、ホモセレノシステイン、タウリン、ギャバ、ドーパミン、ランチオニン、２－アミノイソ酪酸、デヒドロアラニン、オルニチン又はシトルリンの化学的に修飾されたＬ又はＤ異性体を意味する。一態様において、脂肪族側鎖は、アルキレンであ

る。他の態様において、脂肪族側鎖は、アルキレン又はアルキニレンである。

【０７５７】

ここで記述する一連の連続アミノ酸配列に加えて、それらの変異体を、適切なヌクレオチド変化をコードするＤＮＡに導入することによって、及び／又は所望の連続アミノ酸配列の合成によって作製することができることを企図する。当業者は、発現が、選択された合成方法（例えば、化学合成ではなく）であった場合、アミノ酸変化が、ここで記述した一連の連続アミノ酸の翻訳後プロセスを変える、例えば、グリコシル化部位の数及び位置を変える、又は膜アンカー特性を変えることを理解するであろう。

【０７５８】

ここで記述する配列の変形は、例えば、米国特許第５，３６４，９３４号に記載されている、保存的及び非保存的変異の技術及びガイドラインのいずれかを使用して行うことができる。変形は、アミノ酸配列が、元々の配列と比較して変化する、目的の連続アミノ酸配列をコードする１つ以上のコドンの置換、欠失、又は挿入であってもよい。任意には、変形は、ドメインの１つ以上において、少なくとも１つのアミノ酸を、任意の他のアミノ酸で置換することによるものである。所望の活性に悪影響を与えることなく、どのアミノ酸残基を挿入、置換、又は欠失させるかを決定することにおける指針は、その配列を既知の相同タンパク質分子の配列と比較すること、及び高度な相同性の領域でなされるアミノ酸配列変化の数を最小限にすることによって見出されてもよい。アミノ酸置換は、１つのアミノ酸を、類似の構造的及び／又は化学特性を有する別のアミノ酸に置きかえること、例えば、ロイシンをセリンに置きかえること、すなわち、保存的アミノ酸置換の結果でありうる。挿入又は欠失は、任意に、約１～５つのアミノ酸の範囲であってもよい。認められる変形は、配列におけるアミノ酸の挿入、欠失又は置換を合成的に行うこと、及び、得られた変異体を、元々の完全長又は成熟配列によって示される活性について試験することによって決定されてもよい。いかなる末端変形も、ここで開示する発明の文脈内で行うと理解する。

【０７５９】

結合相手のアミノ酸配列変異体は、そのリガンドに対する結合相手の親和性を高めること、結合相手の安定性、精製、及び作製を促すこと、その血漿半減期を変えること、治療効果を向上させること、並びに、結合相手の治療的使用の間の副作用の重症度又は発生を低下させることを含めた、様々な目的を念頭に置いて作製される。

【０７６０】

ここで、これらの配列のアミノ酸配列変異体には、挿入による、置換による、又は欠失による変異体が含まれることも企図する。そのような変異体は、標的に結合するモノマーをコードするＤＮＡにおけるヌクレオチドの部位特異的変異導入によって作製することができ、それによって、変異体をコードするＤＮＡが得られ、その後、そのＤＮＡを、組み換え細胞培養において発現させる。約１００～１５０個までのアミノ酸残基を有するフラグメントも、インビトロ合成によって便利に作製することができる。そのようなアミノ酸配列変異体は、所定の変異体であり、天然に存在しない。変異体は、必ずしも、非変異形態と同じ定量値を示すとは限らないが、非変異形態の質的な生物学的活性（標的に結合することを含む）を示す。アミノ酸配列変形を導入する部位は、前もって決定されているが、変異自体は、前もって決定されている必要はない。例えば、所与の部位での変異の性能を最適化するために、ランダム又は飽和変異導入（ここで、すべての２０個の可能な残基が挿入される）が、標的コドンで行われ、発現した変異体は、所望の活性の最適な組み合わせについてスクリーニングされる。そのようなスクリーニングは、当分野における通常の技能の範囲内である。

【０７６１】

アミノ酸挿入は、通常、約１～１０個のアミノ酸残基程度であり、置換は、典型的には、単一残基について導入され、欠失は、約１～３０個の残基の範囲である。欠失又は挿入は、好ましくは、隣接対、すなわち、２つの残基の欠失又は２つの残基の挿入で行われる。置換、欠失、挿入、又はそれらの任意の組み合わせが、導入され又は組み合わされて、

最終的な構造に到達することは、以下の検討から十分明白であろう。

【０７６２】

一側面において、本発明は、本明細書で開示するアミノ酸配列、図、配列番号、又は本出願の配列表と、少なくとも約８０％の配列同一性、好ましくは、少なくとも約８１％の配列同一性、より好ましくは、少なくとも約８２％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約８３％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約８４％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約８５％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約８６％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約８７％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約８８％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約８９％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約９０％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約９１％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約９２％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約９３％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約９４％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約９５％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約９６％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約９７％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約９８％の配列同一性、さらに好ましくは、少なくとも約９９％の配列同一性を有する一連の連続アミノ酸を含む、化合物に関する。

【０７６３】

アミノ酸配列同一性率の値は、例えば、ＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２コンピュータープログラムを使用して容易に得ることができる（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　２６６：４６０～４８０（１９９６））。

【０７６４】

元々の配列のフラグメントが、ここで提供される。そのようなフラグメントは、Ｎ末端又はＣ末端で切断されていてもよいし、例えば、完全長の元々のタンパク質と比較した場合に、内部残基を欠いていてもよい。いかなる末端変形も、ここで開示する発明の文脈内で行うと理解する。

【０７６５】

ある種のフラグメントは、目的の配列の所望の生物学的活性に不可欠ではないアミノ酸残基を欠いている。

【０７６６】

いくつかの従来の技法のいずれかが使用されてもよい。所望のペプチドフラグメント、又は一連の連続アミノ酸のフラグメントは、化学的に合成されていてもよい。代替的な手法は、酵素消化、例えば、特定のアミノ酸残基によって規定された部位でタンパク質を切断することが知られている酵素で、タンパク質を処理すること、又は適切な制限酵素でＤＮＡを消化し、所望のフラグメントを単離することによって、フラグメントを生じさせることを含む。さらに別の適切な技法は、所望のポリペプチド／配列フラグメントをコードするＤＮＡフラグメントを、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって単離し、増幅することを含む。ＤＮＡフラグメントの所望の末端を規定するオリゴヌクレオチドは、ＰＣＲににおいて、５’及び３’プライマーで用いられる。

【０７６７】

特定の態様において、目的の保存的置換を、好ましい置換という項目の下に、表１に示す。そのような置換が、生物学的活性における変化をもたらした場合、表１で例示的置換と示した、又はアミノ酸のクラスと関連して以下にさらに記述した、より実質的な変化が導入され、生成物がスクリーニングされる。

【０７６８】

【表１】

表１

本来の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

【０７６９】

配列の機能又は免疫学的同一性における実質的な改変は、（ａ）置換領域におけるポリペプチド骨格の構造、例えば、シート若しくはらせんコンフォメーション（ｂ）標的部位での分子の電荷若しくは疎水性、又は（ｃ）側鎖の嵩高さを維持することに対するそれらの効果が有意に異なる置換を選択することによって実現される。天然に存在する残基は、側鎖の共通の特性に基づいて、以下の群に分けられる。

（１）疎水性：ノルロイシン、ｍｅｔ、ａｌａ、ｖａｌ、ｌｅｕ、ｉｌｅ；
（２）中性親水性：ｃｙｓ、ｓｅｒ、ｔｈｒ；
（３）酸性：ａｓｐ、ｇｌｕ；
（４）塩基性：ａｓｎ、ｇｌｎ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、ａｒｇ；
（５）鎖配向に影響を与える残基：ｇｌｙ、ｐｒｏ；
（６）芳香族；ｔｒｐ、ｔｙｒ、ｐｈｅ。

【０７７０】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つのメンバーを別のクラスのものに交換することを必要とする。そのような置換残基も、保存的置換部位、より好ましくは、残りの（非保存的）部位に導入されていてもよい。

【０７７１】
変形は、当分野で既知の方法、例えば、オリゴヌクレオチド媒介（部位指定）変異導入、アラニンスキャニング、及びＰＣＲ変異導入を使用して行うことができる。部位指定変異導入（Ｃａｒｔｅｒら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１３：４３３１（１９８６）；Ｚｏｌｌｅｒら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１０：６４８７（１９８７））、カセット変異導入（Ｗｅｌｌｓら、Ｇｅｎｅ、３４：３１５（１９８５））、制限選択変異導入（Ｗｅｌｌｓら、Ｐｈｉｌｏｓ．Ｔｒａｎｓ．Ｒ．Ｓｏｃ．Ｌｏｎｄｏｎ ＳｅｒＡ、３１７：４１５（１９８６））、又は他の既知の技法をクローン化ＤＮＡで実施して、変異ＤＮＡを生成することができる。

【０７７２】
連続した配列に沿った１つ以上のアミノ酸を同定するために、スキャニングアミノ酸分析を用いることもできる。好ましいスキャニングアミノ酸の中には、比較的小さな中性のアミノ酸がある。そのようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインが挙げられる。アラニンは、β炭素以外の側鎖を除去し、変異体の主鎖コンフォメーションを変える可能性が低いので、一般に、この群の中で好ましいスキャニングアミノ酸である（Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ及びＷｅｌｌｓ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４４：１０８１～１０８５（１９８９））。アラニンはまた、最も一般的なアミノ酸であるので、一般に好ましい。さらに、アラニンは、埋もれた位置にも、露出した位置にもよく見られる（Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、Ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ、（Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．、Ｎ．Ｙ．）；Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１５０：１（１９７６））。アラニン置換が、十分な量の変異体をもたらさない場合、等配電子アミノ酸を使用することができる。

【０７７３】
共有結合修飾：一連の連続アミノ酸は、共有結合により修飾されていてもよい。共有結合修飾の１つのタイプは、標的のアミノ酸と、－ｘ－ｘ－結合に関与しない選択した側鎖又はＮ若しくはＣ末端残基と反応できる有機の誘導体化剤とを反応させることを含む。二官能性剤による誘導体化は、例えば、目的の抗体のアンチ配列を精製するための方法において使用する、水溶性支持マトリックス又は表面と架橋させること及びその逆に有用である。よく使用される架橋剤としては、例えば、１，１－ビス（ジアゾアセチル）－２－フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、４－アジドサリチル酸を含むエステル、３，３’－ジチオビス（スクシンイミジルプロピオナート）などのジスクシンイミジルエステルを含めたホモ二官能性イミドエステル、二官能性マレイミド、例えば、ビス－Ｎ－マレイミド－１，８－オクタン、及びメチル－３－（（ｐ－アジドフェニル）ジチオ）プロピオイミダートなどの薬剤が挙げられる。

【０７７４】
他の修飾としては、グルタミニル残基及びアスパラギニル残基それぞれの、対応するグルタミル残基及びアスパルチル残基への脱アミド化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン及びヒスチジン側鎖のα－アミノ基のメチル化（Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．、Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、７９～８６頁（１９８３））、Ｎ末端アミンのアセチル化、及び任意のＣ末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【０７７５】
別のタイプの共有結合修飾は、一連の連続アミノ酸の元々のグリコシル化パターンを変えることを含む。「元々のグリコシル化パターンを変えること」は、ここでの目的のために、アミノ酸配列に見られる１つ以上の糖鎖を欠失させること（下にあるグリコシル化部位を除去すること、又は化学的及び／又は酵素的手段によってグリコシル化を欠失させることのいずれかによって）、及び／又は元々の配列に存在しない１つ以上のグリコシル化部位を加えることを意味することを意図する。加えて、その語句は、存在する様々な糖鎖

の性質及び割合の変化を含む、元々のタンパク質のグリコシル化における質的変化を含む。

【０７７６】

アミノ酸配列へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を変更することによって実現されてもよい。その変更は、１つ以上のセリン又はスレオニン残基を元々の配列に加える、又は１つ以上のセリン又はスレオニン残基によって置換することによって行われてもよい（Ｏ連結グリコシル化部位の場合）。アミノ酸配列は、特に、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが生じるように、アミノ酸配列をコードするＤＮＡを、予め選択した塩基で変異させることによる、ＤＮＡレベルの変化を通じて任意に変更されてもよい。

【０７７７】

アミノ酸配列での糖鎖の数を増加させる別の手段は、ポリペプチドへのグリコシドの化学的又は酵素的カップリングによるものである。そのような方法は、当分野、例えば、１９８７年９月１１日に公開されたＷＯ８７／０５３３０、並びに、Ａｐｌｉｎ及びＷｒｉｓｔｏｎ、ＣＲＣ　Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、２５９～３０６頁（１９８１）に記載されている。

【０７７８】

アミノ酸配列に存在する糖鎖の除去は、化学的に若しくは酵素的に、又はグリコシル化の標的になるアミノ酸残基をコードするコドンの変異置換によって実現されてもよい。化学的グリコシル化の技法は、当分野で既知であり、例えば、Ｈａｋｉｍｕｄｄｉｎら、Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．、２５９：５２（１９８７）、及びＥｄｇｅら、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１１８：１３１（１９８１）によって説明されている。ポリペプチドでの糖鎖の酵素的切断は、Ｔｈｏｔａｋｕｒａら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．、１３８：３５０（１９８７）によって説明されている通り、様々なエンド及びエキソグリコシダーゼの使用によって実現することができる。

【０７７９】

別のタイプの共有結合修飾は、米国特許第４，６４０，８３５号、第４，４９６，６８９号、第４，３０１，１４４号、第４，６７０，４１７号、第４，７９１，１９２号、又は第４，１７９，３３７号に記載されている方法で、様々な非タンパク質性ポリマーの１つ、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンにアミノ酸配列を連結されることを含む。

【０７８０】

用語「置換」、「置換されている」、及び「置換基」は、通常の原子価が維持され、置換によって、安定な化合物がもたらされることを条件に、その中に含まれる水素原子への１つ以上の結合が、非水素原子への結合に置きかえられている官能基を指す。置換されている基には、炭素又は水素原子への１つ以上の結合が、ヘテロ原子への、二重又は三重結合を含む１つ以上の結合に置きかえられた基も含まれる。置換基の例としては、ハロゲン（すなわち、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、及びＩ）；アルキル基、例えば、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｔｅｒｔ－ブチル、及びトリフルオロメチル；アリール基、例えば、フェニル；ヘテロアリール基、例えば、トリアゾール、ジヒドロピリダジン、及びテトラゾール；ヒドロキシル；アルコキシ基、例えば、メトキシ、エトキシ、ｎ－プロキシ、及びイソプロポキシ；アリールオキシ基、例えば、フェノキシ；アリールアルキルオキシ、例えば、ベンジルオキシ（フェニルメトキシ）及びｐ－トリフルオロメチルベンジルオキシ（４－トリフルオロメチルフェニルメトキシ）；ヘテロアリールオキシ基；スルホニル基、例えば、スルホネート、トリフルオロメタンスルホニル、メタンスルホニル、及びｐ－トルエンスルホニル；スルホニトロ（sulfnitro）、ニトロシル；メルカプト；スルファニル基、例えば、メチルスルファニル、エチルスルファニル、及びプロピルスルファニル；シアノ；アミノ基、例えば、アミノ、メチルアミノ、ジメチルアミノ、エチルアミノ、及びジエチルアミノ；並びに、カルボキシルが挙げられる。複数の置換基部分が、開示されているか、特許請求されている場合、置換されている化合物は、開示されている又は特許請求されている置換基部分の１つ以上によって、単独で又は複数で

、独立に置換されていることができる。「独立に置換されている」は、（２つ以上の）置換基が、同じでありうる又は異なりうることを意味する。本発明の方法で使用する化合物において、アルキル、ヘテロアルキル、単環、二環、アリール、ヘテロアリール、及びヘテロ環基は、１つ以上の水素原子を代替の非水素原子に置きかえることによって、置換されうる。これらとしては、ハロ、ヒドロキシ、メルカプト、アミノ、カルボキシ、シアノ、及びカルバモイルが挙げられるが、それらに限定されない。

【０７８１】

本発明の方法で使用する化合物での置換基及び置換パターンは、化学的に安定している、及び、容易に入手できる出発材料から当分野で既知の技法によって容易に合成できる化合物をもたらすように、当業者によって選択できると理解する。置換基自体が、２つ以上の基で置換されている場合、これらの複数の基は、安定な構造がもたらされる限り、同一の炭素上又は異なる炭素上にあってもよいと理解する。

【０７８２】

本発明の方法で使用する化合物を選択する際に、当業者は、様々な置換基、すなわち、R_1、R_2などが、化学構造連結性の周知の原理に従って選択されるべきであることを認識するであろう。

【０７８３】

ここで使用する場合、「アルキル」は、指定数の炭素原子を有する、分枝脂肪族飽和炭化水素基と直鎖状脂肪族飽和炭化水素基の両方を含み、置換されていなくてもよいし、置換されていてもよい。したがって、「C_1～C_nアルキル」におけるようなC_1～C_nは、直鎖状又は分枝配置の中に１、２、．．．．、ｎ－１又はｎ個の炭素を有する基を含むと定義する。例えば、「C_1～C_6アルキル」におけるようなC_1～C_6は、直鎖状又は分枝配置の中に１、２、３、４、５又は６個の炭素を有する基を含むと定義し、具体的には、メチル、エチル、ｎ－プロピル、イソプロピル、ｎ－ブチル、ｔ－ブチル、ペンチル及びヘキシルを含む。特に指定がない限り、１～１２個の炭素原子を含む。アルキル基は、置換されていない可能性もあるし、それらに限定されないが、ハロゲン、アルコキシ、アルキルチオ、トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、メトキシ及びヒドロキシルを含めた、１つ以上の置換基で置換されている可能性もある。一態様は、C_1～C_{12}アルキル、C_2～C_{12}アルキル、C_3～C_{12}アルキル、C_4～C_{12}アルキルなどでありうる。一態様は、C_1～C_8アルキル、C_2～C_8アルキル、C_3～C_8アルキル、C_4～C_8アルキルなどでありうる。アルキルは、一価、二価、三価などである部分を含むものであることを意図する。

【０７８４】

ここで使用する場合、「C_1～C_4アルキル」は、分枝C_1～C_4アルキルと直鎖状C_1～C_4アルキルの両方を含む。

【０７８５】

ここで使用する場合、用語「シクロアルカン」は、不飽和又は部分的に不飽和であってもよい、すなわち、１つ以上の二重結合を有する、単環式又は二環式環系を指す。単環式環系としては、３～８個の炭素原子を含有する飽和環状水素基がある。単環式環系の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが挙げられる。二環式縮合環系としては、別のシクロアルキル環に縮合したシクロアルキル環がある。二環式縮合環系の例としては、それらに限定されないが、デカリン、１，２，３，７，８，８ａ－ヘキサヒドロナフタレンなどが挙げられる。したがって、C_3～C_{10}シクロアルカンは、総炭素原子３～８個のアルカンの環状環（例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、又はシクロオクチルなど）を含む。シクロアルカン基は、置換されていない可能性もあるし、それらに限定されないが、ハロゲン、アルコキシ、アルキルチオ、トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、メトキシ、及びヒドロキシルを含めた１つ以上の置換基で置換されている可能性もある。シクロアルカンは、一価、二価、三価などである部分を含むものであることを意図する。

【０７８６】

ここで使用する場合、用語「シクロアルケン」は、１つ以上の二重結合を有するシクロアルカンを指す。したがって、C_5～C_{10}シクロアルケンは、総炭素原子５～１０個のアルカンの環状環（例えば、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロヘキサジエニル、シクロオクテニル、又はシクロオクタジエニルなど）を含む。シクロアルケンは、一価、二価、三価などである部分であることを意図する。シクロアルケンは、一価、二価、三価などである部分を含むものであることを意図する。

【０７８７】

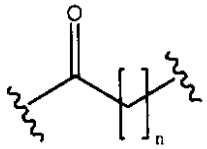
ここで使用する場合、「アルケン」は、１つ以上の二重結合及び特定数の炭素原子を有する、分枝及び直鎖状脂肪族炭化水素基を含み、置換されていなくてもよいし、置換されていてもよい。したがって、「C_2～C_nアルケン」におけるようなC_2～C_nは、直鎖状又は分枝配置の中に２、３、．．．．、ｎ－１又はｎ個の炭素を有する基を含むと定義する。例えば、C_2～C_{10}アルケンにおけるようなC_2～C_{10}は、直鎖状又は分枝配置の中に２、３、４、５．．．１０個の炭素を有する基と定義し、具体的には、ビニル、アリル、１－ブテン、２－ブテン、イソブテン、１－ペンテン、２－ペンテンなどを含む。アルケン基は、置換されていない可能性もあるし、それらに限定されないが、ハロゲン、アルコキシ、アルキルチオ、トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、メトキシ、及びヒドロキシルを含めた１つ以上の置換基で置換されている可能性もある。一態様は、C_2～C_3アルケン、C_2～C_4アルケン、C_2～C_5アルケンなどでありうる。アルケンは、一価、二価、三価などである部分を含むものであることを意図する。

【０７８８】

ここで使用する場合、「アシル」は、１位にケトンを有するアルキル基を指す。例えば、「アシル」の一態様は、アセチル、プロピオニル、ブチリル、及びバレリルでありうる。別の例として、「アシル」の一態様は、

【０７８９】

【化１５５】



【０７９０】

（ここで、ｎは、１～１０である）

でありうる。別の態様において、ｎは、１～４である。

【０７９１】

したがって、「C_2～C_5アシル」は、アセチル、プロピオニル、ブチリル、又はバレリルでありうる。アシルは、一価、二価、三価などである部分を含むものであることを意図する。

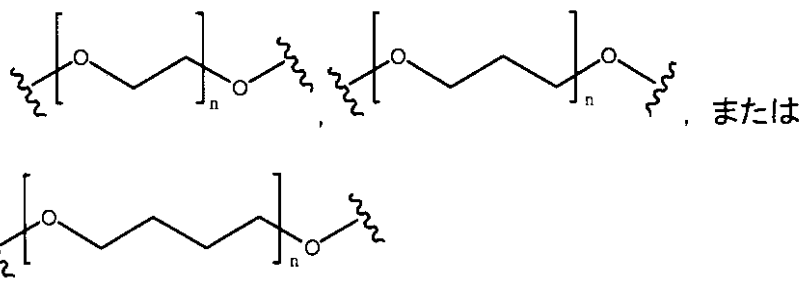
【０７９２】

C_2～C_5アシルアミノは、さらにアミンで置換されている、先に定義したアシル基である。アミンは、アシル基のカルボニル部分に連結して、アミドを形成してもよい、又はアシル基の非カルボニル部分に連結してもよい。例えば、アミノ基は、α位、β位、γ位、δ位などにあってもよい。さらなる例として、アシルアミノは、α－アミノアセチルとアセトアミド基の両方を含む。アシルアミノは、β－アミノプロピオニルを含む。

【０７９３】

C_2～C_5アシルオキシは、酸素でさらに置換されている、先に定義したアシル基である。酸素は、アシル基のカルボニル部分に連結して、アミドを形成してもよい、又はアシル基の非カルボニル部分に連結してもよい。例えば、酸素基は、α位、β位、γ位、δ位などにあってもよい。さらなる例として、アシルオキシは、α－オキシアセチルとアセテート基の両方を含む。アシルオキシは、β－オキシプロピオニルを含む。

【０７９４】
ここで使用する場合、「アミノ」は、第１級、第２級、３級及び４級アミンを含む。したがって、アミノは、－ＮＨ－基、－NH_2基、－ＮＲ－基、－NR_2^+－基、－ＮＲＨ$^+$－基、－NH_2^+－基、－NH_3^+基、及び－NR_3^+基（ここで、Ｒは、アルキル又はアリールである）を含む。アミノは、一価、二価、三価などである部分を含むものであることを意図する。
【０７９５】
ここで使用する場合、「硫黄」は、－Ｓ－基及びＳＨ基を含む。硫黄という用語は、一価、二価、三価などである部分を含むものであることを意図する。
【０７９６】
ここで使用する場合、「酸素」は、－Ｏ－基及びＯＨ基を含む。硫黄という用語は、一価、及び二価である部分であることを意図する。
【０７９７】
ここで使用する場合、「スクシニル」は、１つ又は両方のヒドロキシル基の除去によって、コハク酸から誘導される。一態様は、－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－Ｃ（Ｏ）－でありうる。スクシニルは、一価、二価、三価などである部分を含むものであることを意図する。
【０７９８】
ここで使用する場合、「マロニル」は、１つ又は両方のヒドロキシル基の除去によって、マロン酸から誘導される。一態様は、－Ｃ（Ｏ）－CH_2－Ｃ（Ｏ）－でありうる。マロニルは、一価、二価、三価などである部分を含むものであることを意図する。
【０７９９】
ここで使用する場合、「グルタリル」は、１つ又は両方のヒドロキシル基の除去によって、グルタル酸から誘導される。一態様は、－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－CH_2－Ｃ（Ｏ）－でありうる。グルタリルは、一価、二価、三価などである部分を含むものであることを意図する。
【０８００】
ここで使用する場合、「アジポイル」は、１つ又は両方のヒドロキシル基の除去によって、アジピン酸から誘導される。一態様は、－Ｃ（Ｏ）－CH_2－CH_2－CH_2－CH_2－（Ｏ）－でありうる。アジポイルは、一価、二価、三価などである部分を含むものであることを意図する。
【０８０１】
「ポリアルキレングリコール」は、ヒドロキシル基からの両方の水素の除去によって、ポリアルキレングリコールから誘導される。一態様は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリブチレングリコールから誘導されうる。「ポリアルキレングリコール」の一態様は、
【０８０２】
【化１５６】



【０８０３】
（ここで、ｎは、１～１０である）
でありうる。

【０８０４】
ここで使用する場合、「アリール」は、少なくとも１つの環が芳香族である、各環で原子が１０個までの任意の安定した単環式、二環式、又は多環式炭素環を意味することを意図し、置換されていなくてもよいし、置換されていてもよい。そのようなアリール要素の例としては、フェニル、ｐ－トルエニル（４－メチルフェニル）、ナフチル、テトラヒドロ－ナフチル、インダニル、フェナントリル、アントリル、又はアセナフチルが挙げられるが、それらに限定されない。アリール置換基が二環式であり、１つの環は、非芳香族である場合において、結合は、芳香族環を介すると理解する。
【０８０５】
ここで使用する場合、「アリール」は、少なくとも１つの環が芳香族であり、置換されていなくてもよいし、置換されていてもよい、各環で原子が１０個までの任意の安定した単環式、二環式又は多環式炭素環を意味することを意図する。そのようなアリール要素の例としては、フェニル、ｐ－トルエニル（４－メチルフェニル）、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、フェナントリル、アントリル、又はアセナフチルが挙げられるが、それらに限定されない。アリール置換基が二環式であり、１つの環は非芳香族である場合、結合は、芳香族環を介すると理解する。
【０８０６】
用語「ヘテロアリール」は、ここで使用する場合、少なくとも１つの環が芳香族であり、Ｏ、Ｎ及びＳからなる群から選択される１～４個のヘテロ原子を含有する、各環で原子が１０個までの任意の安定した単環式、二環式又は多環式の環を表す。二環式芳香族ヘテロアリール基は、（ａ）１つの窒素原子を有する６員芳香族（不飽和）複素環に縮合した；（ｂ）２つの窒素原子を有する５若しくは６員芳香族（不飽和）複素環に縮合した；（ｃ）１つの酸素原子又は１つの硫黄原子と共に１つの窒素原子を有する５員芳香族（不飽和）複素環に縮合した：又は（ｄ）Ｏ、Ｎ若しくはＳから選択される１つのヘテロ原子を有する５員芳香族（不飽和）複素環に縮合した、フェニル、ピリジン、ピリミジン若しくはピリジジン環を含む。この定義の範囲内のヘテロアリール基としては、ベンゾイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾフラザニル、ベンゾピラゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾチオフェニル、ベンゾオキサゾリル、カルバゾリル、カルボリニル、シンノリニル、ジヒドロピリジジン、フラニル、インドリニル、インドリル、インドラジニル、インダゾリル、イソベンゾフラニル、イソインドリル、イソキノリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、ナフタピリジニル、オキサジアゾリル、オキサゾリル、オキサゾリン、イソオキサゾリン、オキセタニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリドピリジニル、ピリダジニル、ピリジル、ピリミジル、ピロリル、キナゾリニル、キノリル、キノキサリニル、テトラゾリル、テトラゾロピリジル、チアジアゾリル、チアゾリル、チエニル、トリアゾリル、アゼチジニル、アジリジニル、１，４－ジオキサニル、ヘキサヒドロアゼピニル、ジヒドロベンゾイミダゾリル、ジヒドロベンゾフラニル、ジヒドロベンゾチオフェニル、ジヒドロベンゾオキサゾリル、ジヒドロフラニル、ジヒドロイミダゾリル、ジヒドロインドリル、ジヒドロイソオキサゾリル、ジヒドロイソチアゾリル、ジヒドロオキサジアゾリル、ジヒドロオキサゾリル、ジヒドロピラジニル、ジヒドロピラゾリル、ジヒドロピリジニル、ジヒドロピリミジニル、ジヒドロピロリル、ジヒドロキノリニル、ジヒドロテトラゾリル、ジヒドロチアジアゾリル、ジヒドロチアゾリル、ジヒドロチエニル、ジヒドロトリアゾリル、ジヒドロアゼチジニル、メチレンジオキシベンゾイル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、アクリジニル、カルバゾリル、シンノリニル、キノキサリニル、ピラゾリル、インドリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、イソオキサゾリル、イソチアゾリル、フラニル、チエニル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、キノリニル、イソキノリニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、インドリル、ピラジニル、ピリダジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピロリル、テトラヒドロキノリンが挙げられるが、それらに限定されない。ヘテロアリール置換基が二環式であり、１つの環は非芳香族である、又はヘテロ原子を含有しない場合において、結合は、それぞれ、芳香族環を介する、又はヘテロ原子含有環を介すると理解する。

ヘテロアリールが窒素原子を含有する場合、対応するそのＮ－オキシドもこの定義によって包含されていると理解する。

【０８０７】

用語「フェニル」は、６つの炭素を含む芳香族６員環、及び任意の置換されているそれらの誘導体を意味することを意図する。

【０８０８】

用語「ベンジル」は、ベンゼン環に直接結合したメチレンを意味することを意図する。ベンジル基は、水素がフェニル基に置きかえられたメチル基、及び任意の置換されているそれらの誘導体である。

【０８０９】

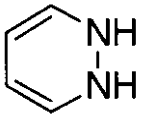
用語「トリアゾール」は、２つの炭素原子及び３つの窒素原子を含有する５員環を有するヘテロアリール、及び任意の置換されたその誘導体を意味することを意図する。

【０８１０】

ジヒドロピリダジンは、任意に置換されていてもよく、１，２－ジヒドロピリダジン

【０８１１】

【化１５７】

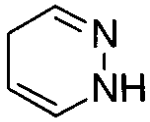


【０８１２】

１，４－ジヒドロピリダジン

【０８１３】

【化１５８】

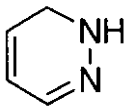


【０８１４】

１，６－ジヒドロピリダジン

【０８１５】

【化１５９】

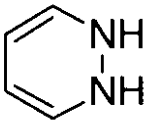


【０８１６】

及び４，５－ジヒドロピリダジン

【０８１７】

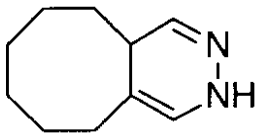
【化１６０】



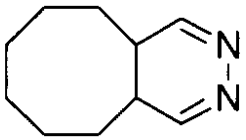
【０８１８】

を含む。

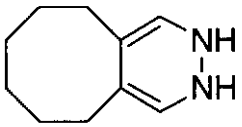
【０８１９】
ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造としては、それらに限定されないが、いずれも任意に置換されていてもよい、ジヒドロピリダジンの３位及び４位に縮合したシクロオクタンを含む化学構造、又は飽和シクロオクタ［ｄ］ピリダジンを含む化学構造が挙げられる。例えば、ジヒドロピリダジンに縮合したシクロオクタンを含む化学構造としては、それらに限定されないが、それぞれ任意に置換されていてもよい、２，４ａ，５，６，７，８，９，１０－オクタヒドロシクロオクタ［ｄ］ピリダジン
【０８２０】
【化１６１】



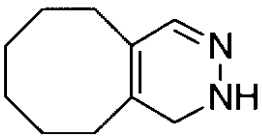
【０８２１】
４ａ，５，６，７，８，９，１０，１０ａ－オクタヒドロシクロオクタ［ｄ］ピリダジン
【０８２２】
【化１６２】



【０８２３】
２，３，５，６，７，８，９，１０－オクタヒドロシクロオクタ［ｄ］ピリダジン
【０８２４】
【化１６３】

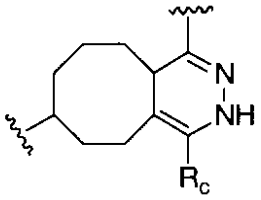


【０８２５】
又は１，２，５，６，７，８，９，１０－オクタヒドロシクロオクタ［ｄ］ピリダジン
【０８２６】
【化１６４】

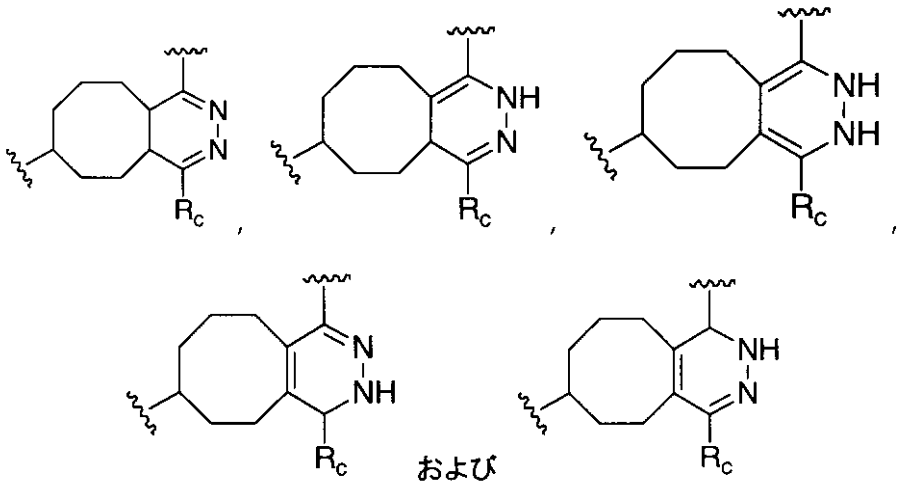


【０８２７】
を含む化学構造が挙げられる。
【０８２８】

【化１６５】



【０８２９】
の互変異性体としては、それらに限定されないが、
【０８３０】
【化１６６】



【０８３１】
が挙げられる。
【０８３２】
いくつかの態様において、ジヒドロピリダジンは、ピリダジンへと酸化される。
【０８３３】
いくつかの態様において、ジヒドロピリダジンが還元されて、１，４－ジカルボニル化合物を有する開環構造がもたらされる。
【０８３４】
本発明の方法で使用する化合物は、有機合成において周知であり、当業者になじみのある技法によって作製されてもよい。しかし、これらは、所望の化合物を合成する又は得るための唯一の手段でなくてもよい。
【０８３５】
対象発明の化合物は、吸収及び生物学的利用能を最適化するために、プロドラッグに変換することができる。プロドラッグの形成は、それらに限定されないが、エステルを形成するための遊離ヒドロキシル基とカルボン酸との反応、リン酸エステルを形成するための遊離ヒドロキシル基と塩化ホスホリルとの反応、その後の加水分解、又は、アミノ酸エステルを形成するための遊離ヒドロキシル基とアミノ酸との反応を含み、その方法は、以前にＣｈａｎｄｒａｎによってＷＯ２００５／０４６５７５に記載されている。置換基が選択され、得られた類似体は、医薬品化学及び薬化学の分野で周知の原理、例えば、構造－活性関係の定量化、生物学的活性の最適化、及びＡＤＭＥＴ（吸収、分布、代謝、排泄、毒性）特性に従って評価される。
【０８３６】
ここで開示する化合物の芳香族環に結合する様々なＲ基は、標準的な手順、例えば、その内容が参照によりここに組み込まれる、Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｃｈｅｍ

istry：Part B：Reaction and Synthesis, Francis Carey and Richard Sundberg、（Springer）5th ed. Edition（２００７）に記載されている手順によって、環に付加されていてもよい。

【０８３７】

本発明の化合物は、参照によりここに組み込まれる、Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry、A. I. Vogel、A. R. Tatchell、B. S. Furnis、A. J. Hannaford、P. W. G. Smith、（Prentice Hall）5th Edition（１９９６）、March's Advanced Organic Chemistry：Reactions、Mechanisms、and Structure、Michael B. Smith、Jerry March、（Wiley－Interscience）5th Edition（２００７）、及びそれらの中の参考文献に記載されている技法によって作製されてもよい。しかし、これらは、所望の化合物を合成する又は得るための唯一の手段でなくてもよい。

【０８３８】

当業者は、ここに示す置換基及び部分（例えば、Ｊ、Ｒａ及びＲｂの部分）の規定が化学的原子価の標準規則に従っていることを意図していることをすぐに理解するであろう。例えば、ここに示す構造が、特定の置換基又は部分（例えば、部分の直鎖における部分）が二価であることを必要とする場合、当業者は、その置換基又は部分の規定が、化学的原子価の標準規則に従うように二価であることをすぐに理解するであろう。

【０８３９】

当業者は、本発明に示すいくつかの二価の部分が、２つ以上の手段で他の化学構造に連結してもよいこと、例えば、示した構造が、回転又は反転したときに他の化学構造に連結してもよいことをすぐに理解するであろう。

【０８４０】

本発明のいくつかの態様において、化合物は、非タンパク質性ポリマーを含む。いくつかの態様において、非タンパク質性ポリマーは、親水性合成ポリマー、すなわち、さもなければ天然に存在しないポリマーであってもよい。しかし、天然に存在し、組み換えによって又はインビトロ方法で生成されるポリマーは、天然から単離されたポリマーと同様に有用である。親水性ポリビニルポリマー、例えば、ポリビニルアルコール及びポリビニルピロリドンは、本発明の範囲内にある。特に有用なのは、ポリアルキレンエーテル、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチレンエステル、又はメトキシポリエチレングリコール；ポリオキシアルキレン、例えば、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン、及びポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンとのブロックコポリマー（Ｐｌｕｒｏｎｉｃ）；ポリメタクリラート；カルボマー；サッカライドモノマーである、Ｄ－マンノース、Ｄ－及びＬ－ガラクトース、フコース、フルクトース、Ｄ－キシロース、Ｌ－アラビノース、Ｄ－グルクロン酸、シアル酸、Ｄ－ガラクツロン酸（galacturontc acid）、Ｄ－マンヌロン酸（例えば、ポリマンヌロン酸又はアルギン酸）、Ｄ－グルコサミン、Ｄ－ガラクトサミン、Ｄ－グルコース、及びノイラミン酸を含む、分枝又は非分枝多糖、例えば、ホモポリサッカライド及びヘテロポリサッカライド、例えば、ラクトース、アミロペクチン、デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、アミロース、硫酸デキストラン、デキストラン、デキストリン、グリコーゲン、又は、酸性ムコ多糖、例えば、ヒアルロン酸の多糖サブユニット；糖アルコールのポリマー、例えば、ポリソルビトール及びポリマンニトール；並びに、ヘパリン又はヘパロン（heparon）である。

塩

ここで開示する化合物の塩は、本発明の範囲内である。ここで使用する場合、「塩」は、本発明の化合物の塩であり、それは、化合物の酸性又は塩基性の塩を作ることによって変更されている。

ＦＣドメイン

用語「Ｆｃドメイン」は、ここで使用する場合、概して、免疫グロブリン重鎖のＣ末端ポリペプチド配列を含むモノマー又はダイマー複合体を指す。Ｆｃドメインは、天然型又は変異型Ｆｃ配列を含んでもよい。免疫グロブリン重鎖のＦｃドメインの境界は、変わりうるが、ヒトＩｇＧ重鎖のＦｃドメインは、一般に、ヒンジ領域のアミノ酸残基からＦｃ配列のカルボキシル末端に及ぶと定義される。免疫グロブリンのＦｃ配列は、２つの定常領域、すなわち、ＣＨ２領域及びＣＨ３領域を含み、任意に、ＣＨ４領域を含む。ヒトＦｃドメインは、任意の適切な免疫グロブリン、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３若しくはＩｇＧ４サブタイプ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＤ、又はＩｇＭから得てもよい。

【０８４１】

適切なＦｃドメインは、１）Ｎ末端システイン残基を有する成熟ペプチドの前で切断される、分泌又は膜貫通タンパク質から得られるシグナルペプチド、それと隣接した２）Ｎ末端システイン残基を有するＦｃドメインポリペプチドを含むプレＦｃキメラポリペプチドの、組み換えＤＮＡによる発現によって作製される。

【０８４２】

シグナルペプチドの適切な例は、ソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ０００１９３）、ＩＦＮα－２（ＩＦＮ）（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＰ０００５９６）、及びコレステロールエステルトランスフェラーゼ（ＣＥＴＰ）（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＭ０００００７８）である。他の適切な例としては、インディアンヘッジホッグ（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ００２１８１）、デザートヘッジホッグ（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ０２１０４４）、ＩＦＮα－１（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＰ０７６９１８）、ＩＦＮα－４（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ０２１０６８）、ＩＦＮα－５（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ００２１６９）、ＩＦＮα－６（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ０２１００２）、ＩＦＮα－７（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ０２１０５７）、ＩＦＮα－８（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ００２１７０）、ＩＦＮα－１０（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ００２１７１）、ＩＦＮα－１３（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ００６９００）、ＩＦＮα－１４（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ００２１７２）、ＩＦＮα－１６（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ００２１７３）、ＩＦＮα－１７（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ０２１２６８）、及びＩＦＮα－２１（ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃ．Ｎｏ．ＮＭ００２１７５）が挙げられる。

【０８４３】

Ｆｃドメイン及びそれらのプレＦｃキメラポリペプチドの適切な例を、配列番号１から配列番号９６に示す。Ｆｃドメインは、シグナルペプチドの分泌及び切断を引き起こす条件下で、細胞においてプレＦｃキメラポリペプチドを発現させることによって得られる。プレＦｃキメラポリペプチドを、原核又は真核宿主細胞の何れかで発現させてもよい。好ましくは、哺乳類宿主細胞に、プレＦｃキメラポリペプチドをコードする発現ベクターをトランスフェクトする。

【０８４４】

Ｎ末端配列ＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥ、ＣＰＰＣＰＡＰＥ、及びＣＰＡＰＥを有する、ヒトＩｇＧ１のＦｃドメインを、それぞれ、配列番号１、配列番号９、及び配列番号１７に示し、それらをコードするＤＮＡ配列を、それぞれ、配列番号２、配列番号１０、及び配列番号１８に示す。配列番号１のＩｇＧ１ドメインは、配列番号３（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号５（ＩＦＮシグナルペプチド）、及び配列番号７（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレＦｃキメラポリペプチドを、それぞれ、配列番号４、配列番号６、及び配列番号８に示すＤＮＡ配列を使用して発現させることによって得られる。配列番号９のＩｇＧ１ドメインは、配列番号１１（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１３（ＩＦＮシグナルペプチド）、及び配列番号１５（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレＦｃキメラポリペプチドを、それぞれ、配列番号１２、配列番号１４、及び配列番号１６に示すＤＮＡ配列を使用して発現させることによって得られる。配列番号１７のＩｇＧ

１ドメインは、配列番号１９（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号２１（ＩＦＮシグナルペプチド）、及び配列番号２３（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレＦｃキメラポリペプチドを、それぞれ、配列番号２０、配列番号２２、及び配列番号２４に示すＤＮＡ配列を使用して発現させることによって得られる。

【０８４５】

Ｎ末端配列ＣＣＶＥＣＰＰＣＰＡＰＥ、ＣＶＥＣＰＰＣＰＡＰＥ、ＣＰＰＣＰＡＰＥ、及びＣＰＡＰＥを有する、ヒトＩｇＧ２のＦｃドメインを、それぞれ、配列番号２５、配列番号３３、配列番号４１、及び配列番号４９に示し、それらをコードするＤＮＡ配列を、それぞれ、配列番号２６、配列番号３４、配列番号４２、及び配列番号５０に示す。配列番号２５のＩｇＧ２ドメインは、配列番号２７（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号２９（ＩＦＮシグナルペプチド）、及び配列番号３１（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレＦｃキメラポリペプチドを、それぞれ、配列番号２８、配列番号３０、及び配列番号３２に示すＤＮＡ配列を使用して発現させることによって得られる。配列番号３３のＩｇＧ２ドメインは、配列番号３５（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号３７（ＩＦＮシグナルペプチド）、及び配列番号３９（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレＦｃキメラポリペプチドを、それぞれ、配列番号３６、配列番号３８、及び配列番号４０に示すＤＮＡ配列を使用して発現させることによって得られる。配列番号４１のＩｇＧ２ドメインは、配列番号４３（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号４５（ＩＦＮシグナルペプチド）、及び配列番号４７（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレＦｃキメラポリペプチドを、それぞれ、配列番号４４、配列番号４６、及び配列番号４８に示すＤＮＡ配列を使用して発現させることによって得られる。配列番号４９のＩｇＧ２ドメインは、配列番号５１（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号５３（ＩＦＮシグナルペプチド）、及び配列番号５５（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレＦｃキメラポリペプチドを、それぞれ、配列番号５２、配列番号５４、及び配列番号５６に示すＤＮＡ配列を使用して発現させることによって得られる。

【０８４６】

Ｎ末端配列（ＣＰＲＣＰＥＰＫＳＤＴＰＰＰ）$_3$－ＣＰＲＣＰＡＰＥ、ＣＰＲＣＰＡＰＥ、及びＣＰＡＰＥを有する、ヒトＩｇＧ３のＦｃドメインを、それぞれ、配列番号５７、配列番号６５、及び配列番号７３に示し、それらをコードするＤＮＡ配列を、それぞれ、配列番号５８、配列番号６６、配列番号４２、及び配列番号７４に示す。配列番号５７のＩｇＧ３ドメインは、配列番号５９（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号６１（ＩＦＮシグナルペプチド）、及び配列番号６３（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレＦｃキメラポリペプチドを、それぞれ、配列番号６０、配列番号６２、及び配列番号６４に示すＤＮＡ配列を使用して発現させることによって得られる。配列番号６５のＩｇＧ３ドメインは、配列番号６７（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号６９（ＩＦＮシグナルペプチド）、及び配列番号７１（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレＦｃキメラポリペプチドを、それぞれ、配列番号６８、配列番号７０、及び配列番号７２に示すＤＮＡ配列を使用して発現させることによって得られる。配列番号７３のＩｇＧ３ドメインは、配列番号７５（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号７７（ＩＦＮシグナルペプチド）、及び配列番号７９（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレＦｃキメラポリペプチドを、それぞれ、配列番号７６、配列番号７８、及び配列番号８０に示すＤＮＡ配列を使用して発現させることによって得られる。

【０８４７】

Ｎ末端配列ＣＰＳＣＰＡＰＥ及びＣＰＡＰＥを有する、ヒトＩｇＧ４のＦｃドメインの配列を、それぞれ、配列番号８１及び配列番号８９に示し、それらをコードするＤＮＡ配列を、それぞれ、配列番号８２及び配列番号９０に示す。配列番号８１のＩｇＧ４ドメインは、配列番号８３（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号８５（ＩＦＮシグナルペプチド）、及び配列番号８７（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレＦｃキメラポリペプチドを、それぞれ、配列番号８４、配列番号８６、及び配列番号８８に示すＤＮＡ配列を使用して発現させることによって得られる。配列番号８９のＩｇＧ４ドメインは、配列番号

９１（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号９３（ＩＦＮシグナルペプチド）、及び配列番号９５（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレＦｃキメラポリペプチドを、それぞれ、配列番号９２、配列番号９４、及び配列番号９６に示すＤＮＡ配列を使用して発現させることによって得られる。

【０８４８】

重鎖Ｎ末端にシステイン残基を有する適切な抗体変異体は、１）Ｎ末端システイン残基を有する成熟ペプチドの前で切断される、分泌又は膜貫通タンパク質から得られるシグナルペプチド、それと隣接した２）Ｎ末端システイン残基を有する抗体重鎖ポリペプチドを含むプレ重鎖キメラポリペプチドの、組み換えＤＮＡによる発現によって作製される。

【０８４９】

軽鎖Ｎ末端にシステイン残基を有する適切な抗体変異体は、１）Ｎ末端システイン残基を有する成熟ペプチドの前で切断される、分泌又は膜貫通タンパク質から得られるシグナルペプチド、それと隣接した２）Ｎ末端システイン残基を有する抗体軽鎖ポリペプチドを含むプレ軽鎖キメラポリペプチドの、組み換えＤＮＡによる発現によって作製される。

【０８５０】

トラスツズマブ重鎖及び軽鎖は、シグナルペプチドの分泌及び切断を引き起こす条件下で、細胞においてプレ重鎖及びプレ軽鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。プレ重鎖及びプレ軽鎖ポリペプチドを、原核又は真核宿主細胞のいずれかにおいて発現させてもよい。好ましくは、哺乳類宿主細胞に、プレ重鎖及びプレ軽鎖ポリペプチドをコードする発現ベクターをトランスフェクトする。

【０８５１】

前述の抗体重鎖、プレ重鎖、軽鎖、及びプレ軽鎖変異体のＮ末端に付加されるタンパク質配列は、組み換え抗体トラスツズマブについてここで示されるが、一般に、いかなる組み換え抗体にも適用できる。トラスツズマブ及びその変異体をコードするＤＮＡ配列を、参照によりここに組み込まれる米国特許第５，８２１，３３７号（「免疫グロブリン変異体」）に記載されているような、重鎖及び軽鎖、並びにそれらから得られる変異体について、ＤＮＡベクターを共トランスフェクトすることによって、哺乳類細胞において構築し、発現させてもよい。野生型トラスツズマブの軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号１２８及び配列番号１２９に示す。

【０８５２】

Ｎ末端システイン残基を有するトラスツズマブ軽鎖及びそれらのプレＦｃキメラポリペプチドの適切な例を、配列番号１３０から配列番号１６５に示す。Ｎ末端システイン残基を有するトラスツズマブ重鎖及びそれらのプレＦｃキメラポリペプチドの適切な例を、配列番号１６６から配列番号２０１に示す。

【０８５３】

Ｎ末端配列Ｃ、ＣＰ、ＣＰＰ、ＣＰＲ、ＣＰＳ、ＣＤＫＴ、ＣＤＫＴＨＴ、ＣＶＥ及びＣＤＴＰＰＰを有するトラスツズマブ軽鎖を、それぞれ、配列番号１３０、配列番号１３４、配列番号１３８、配列番号１４２、配列番号１４６、配列番号１５０、配列番号１５４、配列番号１５８、及び配列番号１６２に示す。配列番号１３０の軽鎖は、配列番号１３１（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１３２（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１３３（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ軽鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１３４の軽鎖は、配列番号１３５（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１３６（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１３７（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ軽鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１３８の軽鎖は、配列番号１３９（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１４０（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１４１（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ軽鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１４２の軽鎖は、配列番号１４３（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１４４（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１４５（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ軽鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１４６の軽鎖は、配列番号１４７（Ｓ

ＨＨシグナルペプチド）、配列番号１４８（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１４９（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ軽鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１５０の軽鎖は、配列番号１５１（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１５２（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１５３（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ軽鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１５４の軽鎖は、配列番号１５５（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１５６（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１５７（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ軽鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１５８の軽鎖は、配列番号１５９（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１６０（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１６１（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ軽鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１６２の軽鎖は、配列番号１６３（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１６４（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１６５（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ軽鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。

【０８５４】

Ｎ末端配列Ｃ、ＣＰ、ＣＰＰ、ＣＰＲ、ＣＰＳ、ＣＤＫＴ、ＣＤＫＴＨＴ、ＣＶＥ及びＣＤＴＰＰＰを有するトラスツズマブ重鎖を、それぞれ、配列番号１６６、配列番号１７０、配列番号１７４、配列番号１７８、配列番号１８２、配列番号１８６、配列番号１９０、配列番号１９４、及び配列番号１９８に示す。配列番号１６６の重鎖は、配列番号１６７（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１６８（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１６９（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ重鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１７０の重鎖は、配列番号１７１（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１７２（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１７３（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ重鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１７４の重鎖は、配列番号１７５（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１７６（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１７７（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ重鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１７８の重鎖は、配列番号１７９（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１８０（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１８１（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ重鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１８２の重鎖は、配列番号１８３（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１８４（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１８５（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ重鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１８６の重鎖は、配列番号１８７（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１８８（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１８９（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ重鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１９０の重鎖は、配列番号１９１（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１９２（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１９３（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ重鎖キメラポリペプチドを発現させることによって得られる。配列番号１９４の重鎖は、配列番号１９５（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号１９６（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号１９７（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ重鎖キメラポリペプチドによって得られる。配列番号１９８の重鎖は、配列番号１９９（ＳＨＨシグナルペプチド）、配列番号２００（ＩＦＮシグナルペプチド）及び配列番号２０１（ＣＥＴＰシグナルペプチド）に示すプレ重鎖キメラポリペプチドによって得られる。

【０８５５】

適切な宿主細胞としては、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、Ｍｄ．）から得られる、２９３ヒト肺細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１５７３）及びＣＨＯ－Ｋ１ハムスター卵巣細胞（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－６１）が挙げられる。細胞を、空気９５％；二酸化炭素５％の雰囲気下で、３７℃で増殖させる。２９３細胞は、１．５ｇ／Ｌの炭酸水素ナトリウム、０．１ｍＭの非必須アミノ酸、及び１．０ｍＭのピルビン酸ナトリウム９０％；ウシ胎児血清１０％を含有するように調整

された、２ｍＭのＬ－グルタミン及びアール液を含む最小必須培地（イーグル）で維持される。ＣＨＯ－Ｋ１細胞は、１．５ｇ／Ｌの炭酸水素ナトリウム９０％；ウシ胎児血清１０％を含有するように調整された、２ｍＭのＬ－グルタミンを含むＨａｍ’ｓ　Ｆ１２Ｋ培地で維持される。他の適切な宿主細胞としては、ＣＶ１サル腎細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－７０）、ＣＯＳ－７サル腎細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６５１）、ＶＥＲＯ－７６サル腎細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８７）、ＨＥＬＡヒト子宮頸部細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－２）、Ｗ１３８ヒト肺細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－７５）、ＭＤＣＫイヌ腎細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－３４）、ＢＲＬ３Ａラット肝細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１４４２）、ＢＨＫハムスター腎細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－１０）、ＭＭＴ０６０５６２マウス乳腺細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－５１）、及びＣＤ８．ｓｕｐ．＋Ｔ細胞（参照によりその全体がここに組み込まれるＵ．Ｓ．Ｓｅｒ．Ｎｏ．０８／２５８，１５２に記載されている）が挙げられる。

【０８５６】

適切な発現ベクターの例は、配列番号９７に示すｐＣＤＮＡ３．１（＋）、及び配列番号９８に示すｐＳＡである。プラスミドｐＳＡは、以下のＤＮＡ配列要素を含む。１）ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩＫＳ（＋）（ヌクレオチド９１２～２９４１／１～６１９、ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｘ５２３２７）、２）ヒトサイトメガロウイルスプロモーター、エンハンサー、及び第１エクソンのスプライスドナー（ヌクレオチド６３～９１２、ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｋ０３１０４）、３）ヒトα１－グロブリンの第２エクソンのスプライスアクセプター（ヌクレオチド６８０８～６９１９、ＧｅｎＢａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｊ００１５３）、４）ＳＶ４０Ｔ抗原のポリアデニル化部位（ヌクレオチド２７７０～２５３３、Ｒｅｄｄｙら（１９７８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２００、４９４～５０２）、及び５）ＳＶ４０の複製起点（ヌクレオチド５７２５～５５７８、Ｒｅｄｄｙら、同書）。他の適切な発現ベクターとしては、プラスミドｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲ及びｐＲＫＣＤ４（米国特許第５，３３６，６０３号）、プラスミドｐＩＫ．１．１（米国特許第５，３５９，０４６号）、プラスミドｐＶＬ－２（米国特許第５，８３８，４６４号）、プラスミドｐＲＴ４３．２Ｆ３（参照によりその全体がここに組み込まれるＵ．Ｓ．Ｓｅｒ．Ｎｏ．０８／２５８，１５２に記載されている）が挙げられる。

【０８５７】

ヒトＩｇＧのプレＦｃポリペプチドに適した発現ベクターは、配列番号９８から作製されるＨｉｎｄＩＩＩ－ＰｓｐＯＭ１ベクターフラグメントと、配列番号４、６、８、１２、１４、１６、２０、２２、２４、２８、３０、３２、３６、３８、４０、４４、４６、４８、５２、５４、５６、６０、６２、６４、６８、７０、７２、７６、７８、８０、８４、８６、８８、９２、９４、及び９６から作製されるＨｉｎｄＩＩＩ－ＥａｇＩ挿入フラグメントとのライゲーションによって構築されてもよい。

【０８５８】

適切な選択可能なマーカーとしては、Ｔｎ５トランスポゾンのネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（ＮＥＯ）遺伝子（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ及びＢｅｒｇ（１９８２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎ．１、３２７～３４１）、及びジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＮＦＲ）ｃＤＮＡ（Ｌｕｃａｓら１９９６）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２４、１７７４～１７７９）が挙げられる。ＮＥＯ遺伝子を組み込む適切な発現ベクターの一例は、プラスミドｐＳＡ－ＮＥＯであり、それは、配列番号９９をＥｃｏＲＩ及びＢｇｌＩＩで消化することにより作製される第１のＤＮＡフラグメントを、配列番号９８をＥｃｏＲＩ及びＢｇｌＩＩで消化することにより作製される第２のＤＮＡフラグメントとライゲートすることによって構築される。配列番号９９は、翻訳開始配列が先行する、ＮＥＯ遺伝子（ヌクレオチド１５５１～２３４５、Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｕ００００４）を組み込む（Ｋｏｚａｋ（１９９１）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ、２６６、１９８６７～１９８７０）。ＮＥＯ遺伝子及びＤＨＦＲ　ｃＤＮＡを組み込む、適切な発現ベクターの別の例は、プラスミドｐＳＶｅ－ＮＥＯ－ＤＨＦＲであり、それは、配列番号９９を

ＥｃｏＲＩ及びＢｇｌＩＩで消化することにより作製される第１のＤＮＡフラグメントを、ｐＳＶｅＣＤ４ＤＨＦＲをＥｃｏＲＩ及びＢｇｌＩＩで消化することにより作製される第２のＤＮＡフラグメントとライゲートすることによって構築される。プラスミドｐＳＶｅ－ＮＥＯ－ＤＨＦＲは、ＮＥＯ遺伝子及びＤＨＦＲ　ｃＤＮＡの発現を推進するために、ＳＶ４０初期プロモーター／エンハンサーを使用する。他の適切な選択可能なマーカーとしては、ＸＰＧＴ遺伝子（Ｍｕｌｌｉｇａｎ及びＢｅｒｇ（１９８０）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０９、１４２２～１４２７）、及びハイグロマイシン耐性遺伝子（Ｓｕｇｄｅｎら（１９９５）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５、４１０～４１３）が挙げられる。

【０８５９】

一態様において、細胞は、Ｇｒａｈａｍら（１９７７）Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．３６、５９～７４のリン酸カルシウム法によってトランスフェクトされる。ＤＮＡ混合物（１０ｕｇ）は、０．５ｍｌの１ｍＭトリス－ＨＣｌ、０．１ｍｌ　ＥＤＴＡ及び２２７ｍＭ　$CaCl_2$に溶解される。ＤＮＡ混合物は、発現ベクターＤＮＡ、選択可能なマーカーＤＮＡ、及び、ＶＡ　ＲＮＡ遺伝子（Ｔｈｉｍｍａｐｐａｙａら、（１９８２）Ｃｅｌｌ　３１、５４３～５５１）をコードするＤＮＡを（１０：１：１の比で）含有する。この混合物に、０．５ｍＬの５０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ（ｐＨ７．３５）、２８０ｍＭ　ＮａＣｌ、及び１．５ｍＭ　$NaPO_4$が滴下される。２５℃で１０分間、ＤＮＡ沈殿物を形成させ、懸濁させ、１００ｍｍのプラスチック製組織培養皿でコンフルエントに増殖した細胞に添加する。３７℃で４時間後、培地が吸引され、ＰＢＳ中の２０％グリセロール２ｍｌが、０．５分間添加される。次いで、細胞は、血清不含培地で洗浄され、新しい培地が添加され、細胞は、５日間インキュベートされる。

【０８６０】

別の態様において、細胞は、Ｓｏｍｐａｒｙｒａｃら（１９８１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１２、７５７５～７５７９の硫酸デキストラン法によって一時的にトランスフェクトされる。細胞を、スピナーフラスコにおいて最大密度まで増殖させ、その細胞は、遠心分離によって濃縮され、ＰＢＳで洗浄される。ＤＮＡ－デキストラン沈殿物は、細胞ペレット上でインキュベートされる。３７℃で４時間後、ＤＥＡＥ－デキストランは、吸引され、ＰＢＳ中の２０％グリセロールが、１．５分間添加される。次いで、細胞は、血清不含培地で洗浄され、５マイクログラム／ｍｌのウシインスリン及び０．１マイクログラム／ｍｌのウシトランスフェリンを含有する新しい培地を含むスピナーフラスコに再度導入され、４日間インキュベートされる。

【０８６１】

何れかの方法によるトランスフェクション後、馴化培地は、遠心分離され、濾過され、宿主細胞及び残屑が除去される。次いで、Ｆｃドメインを含むサンプルが濃縮され、任意の選択された方法、例えば、透析、及び／又はカラムクロマトグラフィーによって精製される（以下参照）。細胞培養上清中のＦｃドメインを同定するために、細胞培地が、トランスフェクションの２４～９６時間後に除去され、濃縮され、ジチオトレイトールなどの還元剤の存在又は非存在下のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）によって分析される。

【０８６２】

非増幅発現の場合、効率の高い手順（Ｇｏｒｍａｎら、ＤＮＡ　Ｐｒｏｔ．Ｅｎｇ．Ｔｅｃｈ．２：３　１０（１９９０））を使用して、プラスミドが、ヒト２９３細胞（Ｇｒａｈａｍら、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．３６：５９　７４（１９７７））にトランスフェクトされる。培地は、５日間まで毎日、血清不含のものに取りかえられ、回収される。非増幅発現の場合、効率の高い手順（Ｇｏｒｍａｎら、ＤＮＡ　Ｐｒｏｔ．Ｅｎｇ．Ｔｅｃｈ．２：３　１０（１９９０））を使用して、プラスミドが、ヒト２９３細胞（Ｇｒａｈａｍら、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．３６：５９　７４（１９７７））にトランスフェクトされる。培地は、５日間まで毎日、血清不含のものに取りかえられ、回収される。Ｆｃドメインは、ＨｉＴｒａｐ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ　ＨＰ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）を使用して、細胞培養上清から精製される。溶離したＦｃドメインは、Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ－３０（

Ａｍｉｃｏｎ）を使用して、ＰＢＳにバッファー交換され、０．５ｍｌに濃縮され、４℃で、Ｍｉｌｌｅｘ－ＧＶ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して滅菌濾過される。

一連の連続アミノ酸

ここで言及する一連の連続アミノ酸の例としては、それらに限定されないが、結合ドメインを含む連続アミノ酸、例えば、分泌又は膜貫通タンパク質、細胞内結合ドメイン、及び抗体（全体若しくはその一部）、並びにそれらの改変形が挙げられる。以下は、一部の非限定的例である。

１）免疫グロブリン

用語「抗体」を、最も広い意味で使用し、それは、具体的には、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、一価抗体、多価抗体、並びに、所望の生物学的活性を示す限りは、抗体フラグメント（例えば、Ｆａｂ及び／又は単一アーム抗体）を包含する。

【０８６３】

抗体の「クラス」は、抗体の重鎖がもつ定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体の５つの主要なクラス：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭがあり、これらのいくつかは、更に、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１及びＩｇＡ２に分けてもよい。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。

【０８６４】

「抗体フラグメント」は、インタクト抗体が結合する抗原に結合する、インタクト抗体の一部を含む、インタクト抗体以外の分子を指す。抗体フラグメントの例としては、それらに限定されないが、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）$_2$；ダイアボディ；直鎖状抗体；単鎖抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）；及び、抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられる。

【０８６５】

ここで、用語「完全長抗体」、「インタクト抗体」、及び「完全な抗体」を、天然型抗体の構造に実質的に類似する構造を有する、又はここで定義するＦｃ領域を含む重鎖を有する抗体を指すために互換的に使用する。

【０８６６】

「ブロッキング」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物学的活性を（部分的に又は完全に）顕著に阻害するものである。

【０８６７】

基準抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて、抗原への基準抗体の結合を５０％以上ブロックする、逆に、基準抗体が、競合アッセイにおいて、抗原への該抗体の結合を５０％以上ブロックする抗体を指す。例示的な競合アッセイをここで示す。

【０８６８】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗原への抗体の結合に関与する、抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを指す。天然型抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、ＶＨ及びＶＬ）は、一般に類似の構造を有し、各ドメインは、４つの保存フレームワーク領域（ＦＲ）及び３つの超可変領域（ＨＶＲ）を含む（例えば、Ｋｉｎｄｔら、Ｋｕｂｙ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、第６版、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．、９１頁（２００７）を参照されたい）。単一ＶＨ又はＶＬドメインは、抗原結合特異性を与えるのに十分であってもよい。更に、特定の抗原と結合する抗体は、抗原に結合する抗体からのＶＨ又はＶＬドメインを使用して、それぞれ、相補的なＶＬ又はＶＨドメインのライブラリーをスクリーニングして単離されてもよい。例えば、Ｐｏｒｔｏｌａｎｏら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：８８０～８８７（１９９３）；Ｃｌａｒｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４～６２８（１９９１）を参照されたい。

【０８６９】

用語「超可変領域」又は「ＨＶＲ」は、ここで使用する場合、配列において超可変であ

る、及び／又は構造的に定義されたループ（超可変ループ）を形成する、抗体可変ドメインの領域のそれぞれを指す。一般に、天然型４鎖抗体は、６つのＨＶＲを含み、それをＶＨに３つ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）、及びＶＬに３つ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）含む。ＨＶＲは、一般に、超可変ループからの、及び／又は「相補性決定領域」（ＣＤＲ）からのアミノ酸残基を含み、後者は、最も高い配列可変性のもの、及び／又は抗原認識に関与するものである。例示の超可変ループは、アミノ酸残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）、９１～９６（Ｌ３）、２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）、及び９６～１０１（Ｈ３）に存在する（Ｃｈｏｔｈｉａ及びＬｅｓｋ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１～９１７（１９８７））。例示的なＣＤＲ（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、及びＣＤＲ－Ｈ３）は、Ｌ１のアミノ酸残基２４～３４、Ｌ２のアミノ酸残基５０～５６、Ｌ３のアミノ酸残基８９～９７、Ｈ１のアミノ酸残基３１～３５Ｂ、Ｈ２のアミノ酸残基５０～６５、及びＨ３のアミノ酸残基９５～１０２に存在する（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、第５版、Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ（１９９１））。ＶＨ中のＣＤＲ１を除いて、ＣＤＲは、一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。ＣＤＲはまた、抗原に接触する残基である「特異性決定残基」又は「ＳＤＲ」も含む。ＳＤＲは、短縮ＣＤＲ又はａ－ＣＤＲと呼ばれるＣＤＲ領域内に含まれる。例示的なａ－ＣＤＲ（ａ－ＣＤＲ－Ｌ１、ａ－ＣＤＲ－Ｌ２、ａ－ＣＤＲ－Ｌ３、ａ－ＣＤＲ－Ｈ１、ａ－ＣＤＲ－Ｈ２、及びａ－ＣＤＲ－Ｈ３）は、Ｌ１のアミノ酸残基３１～３４、Ｌ２のアミノ酸残基５０～５５、Ｌ３のアミノ酸残基８９～９６、Ｈ１のアミノ酸残基３１～３５Ｂ、Ｈ２のアミノ酸残基５０～５８、及びＨ３のアミノ酸残基９５～１０２に存在する（Ａｌｍａｇｒｏ及びＦｒａｎｓｓｏｎ、Ｆｒｏｎｔ．Ｂｉｏｓｃｉ．１３：１６１９～１６３３（２００８）を参照されたい）。特に指示がない限り、ここで、可変ドメイン中のＨＶＲ残基及び他の残基（例えば、ＦＲ残基）は、Ｋａｂａｔら、前掲、に従って番号が付与される。

【０８７０】

「フレームワーク」又は「ＦＲ」は、超可変領域（ＨＶＲ）の残基を除く、可変ドメインの残基を指す。可変ドメインのＦＲは、一般に、４つのＦＲドメイン、すなわち、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４からなる。したがって、ＨＶＲ及びＦＲ配列は、一般に、ＶＨ（又はＶＬ）における以下の配列、すなわち、ＦＲ１－Ｈ１（Ｌ１）－ＦＲ２－Ｈ２（Ｌ２）－ＦＲ３－Ｈ３（Ｌ３）－ＦＲ４に出現する。

【０８７１】

語句「Ｎ末端切断型重鎖」は、ここで使用する場合、完全長免疫グロブリン重鎖のすべてではなく一部を含むポリペプチドを指し、そこで、欠損部分は、通常、重鎖のＮ末端領域にあるものである。欠損部分は、それらに限定されないが、可変ドメイン、ＣＨ１、及びヒンジ配列の一部又は全体を含んでもよい。一般に、野生型ヒンジ配列が存在しない場合、Ｎ末端切断型重鎖の残りの定常ドメインは、別のＦｃ配列（すなわち、ここで記述する「第１の」Ｆｃポリペプチド）に連結できる構成成分を含むであろう。例えば、前記構成成分は、ジスルフィド結合を形成できる修飾残基又は付加システイン残基でありうる。

【０８７２】

「Ｆｃ受容体」又は「ＦｃＲ」は、抗体のＦｃ領域に結合する受容体のことをいう。いくつかの態様において、ＦｃＲは、天然型ヒトＦｃＲである。いくつかの態様において、ＦｃＲは、ＩｇＧ抗体（γ受容体）と結合するものであり、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ及びＦｃγＲＩＩＩサブクラスの受容体を含み、それらには、これらの受容体の対立遺伝子変異体、選択的スプライスによる形態が含まれる。ＦｃγＲＩＩ受容体には、ＦｃγＲＩＩＡ（「活性型受容体」）及びＦｃγＲＩＩＢ（「阻害型受容体」）があり、それらは、主にその細胞質ドメインが異なる、類似のアミノ酸配列を有する。活性型受容体ＦｃγＲＩＩＡは、細胞質ドメインに免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を含む。阻害型受容体ＦｃγＲＩＩＢは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン阻害モチーフ（

ＩＴＩＭ）を含む。（例えば、Ｄａｅｒｏｎ、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５：２０３～２３４（１９９７）を参照されたい）。ＦｃＲは、例えば、Ｒａｖｅｔｃｈ及びＫｉｎｅｔ、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ、９：４５７～９２（１９９１）；Ｃａｐｅｌら、Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ　４：２５～３４（１９９４）；及びｄｅ　Ｈａａｓら、Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１２６：３３０～４１（１９９５）で概説されている。他のＦｃＲは、将来同定されることになるものを含めて、ここで、用語「ＦｃＲ」により包含される。

【０８７３】

用語「Ｆｃ受容体」又は「ＦｃＲ」は、母性ＩｇＧの胎児への移送（Ｇｕｙｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１７：５８７（１９７６）及びＫｉｍら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２４９（１９９４））、及び、免疫グロブリンのホメオスタシスの調節に関与する新生児性受容体ＦｃＲｎも含む。ＦｃＲｎへの結合を測定する方法は、既知である（例えば、Ｇｈｅｔｉｅ及びＷａｒｄ．、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ　１８（１２）：５９２～５９８（１９９７）；Ｇｈｅｔｉｅら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１５（７）：６３７～６４０（１９９７）；Ｈｉｎｔｏｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７９（８）：６２１３～６２１６（２００４）；ＷＯ２００４／９２２１９（Ｈｉｎｔｏｎら）を参照されたい）。

【０８７４】

インビボでのヒトＦｃＲｎへの結合、及びヒトＦｃＲｎ高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えば、ヒトＦｃＲｎを発現する、トランスジェニックマウス若しくはトランスフェクトされたヒト細胞株において、又は、変異型Ｆｃ領域を有するポリペプチドを投与された霊長類においてアッセイすることができる。ＷＯ２０００／４２０７２（Ｐｒｅｓｔａ）は、ＦｃＲへの結合を向上又は減弱させる抗体変異体を説明している。例えば、Ｓｈｉｅｌｄｓら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．９（２）：６５９１～６６０４（２００１）も参照されたい。

【０８７５】

「ヒンジ領域」、「ヒンジ配列」、及びそれらの変形は、ここで使用する場合、当分野で既知の意味を含み、それは、例えば、Ｊａｎｅｗａｙら、Ｉｍｍｕｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｙ：ｔｈｅ　ｉｍｍｕｎｅ　ｓｙｓｔｅｍ　ｉｎ　ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　ｄｉｓｅａｓｅ（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｌｔｄ．、ＮＹ）（第４版、１９９９）；Ｂｌｏｏｍら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９７）、６：４０７～４１５；Ｈｕｍｐｈｒｅｙｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ（１９９７）、２０９：１９３～２０２において説明されている。

【０８７６】

特に指示がない限り、「多価抗体」という表現を、３つ以上の抗原結合部位を含む抗体を指すために、本明細書全体を通して使用する。多価抗体は、好ましくは、３つ以上の抗原結合部位を有するように操作されたものであり、一般に、天然配列のＩｇＭ又はＩｇＡ抗体ではない。

【０８７７】

「Ｆｖ」フラグメントは、完全な抗原認識及び結合部位を含む抗体フラグメントである。この領域は、例えば、ｓｃＦｖにおいては、本質的に共有結合することができる、密接な会合状態の１つの重鎖と１つの軽鎖可変ドメインとのダイマーからなる。各可変ドメインの３つのＨＶＲが、V_H-V_Lダイマーの表面で抗原結合部位を定めるために相互作用するのは、この立体配置においてである。まとめると、６つのＨＶＲ又はそれらのサブセットは、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な３つのＨＶＲのみを含む、半分のＦｖ）でさえ、通常、結合部位全体よりは低い親和性ではあるが、抗原を認識し、それに結合する能力を有する。

【０８７８】

「Ｆａｂ」フラグメントは、軽鎖の可変及び定常ドメインと、重鎖の可変ドメイン及び第１の定常領域（ＣＨ１）とを含む。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体フラグメントは、一対のＦａｂ

フラグメントを含み、それらは、一般に、それらの間のヒンジシステインによってそのカルボキシ末端近傍で共有結合により連結されている。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも当分野で既知である。

【０８７９】

語句「抗原結合アーム」は、ここで使用する場合、目的の標的分子に特異的に結合する能力を有する抗体フラグメントの構成部分を指す。一般に且つ好ましくは、抗原結合アームは、免疫グロブリンポリペプチド配列、例えば、ＨＶＲ及び／又は免疫グロブリン軽鎖及び重鎖の可変ドメイン配列の複合体である。

【０８８０】

「単鎖Ｆｖ」又は「ｓｃＦｖ」抗体フラグメントは、抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。一般に、Ｆｖポリペプチドは、V_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それは、ｓｃＦＶが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。ｓｃＦｖの概説については、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ ｉｎ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ｖｏｌ １１３、Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ及びＭｏｏｒｅ編、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、２６９～３１５頁（１９９４）を参照されたい。

【０８８１】

用語「ダイアボディ」は、２つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを指し、そのフラグメントは、同一ポリペプチド鎖（V_H及びV_L）において軽鎖可変ドメイン（V_L）に連結した重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。同一鎖上の２つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、そのドメインは別の鎖の相補的ドメインと強制的に対合し、２つの抗原結合部位を作り出す。ダイアボディは、例えば、ＥＰ４０４０９７；ＷＯ９３／１１１６１；及びＨｏｌｌｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０：６４４４～６４４８（１９９３）に、より十分に記載されている。

【０８８２】

「直鎖状抗体」という表現は、Ｚａｐａｔａら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．８（１０）：１０５７～１０６２（１９９５）に記載されている抗体を意味する。簡潔には、これらの抗体は、相補的な軽鎖ポリペプチドと一緒に一対の抗原結合領域を形成する一対のタンデムＦｄセグメント（ＶＨ－ＣＨ１－ＶＨ－ＣＨ１）を含む。直鎖状抗体は、二重特異性又は単一特異性であってもよい。

【０８８３】

ここで使用する用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、例えば、天然に生じる変異を含む、又はモノクローナル抗体調製物の製造時に発生する、一般に少量で存在している変異体などの可能性のある変異体抗体を除き、集団を構成する個々の抗体は、同一である、及び／又は同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を通常含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。したがって、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体の特徴を示すものであり、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とするものとして解釈すべきではない。例えば、使用しようとするモノクローナル抗体は、限定されないが、ハイブリドーマ法、組み換えＤＮＡ法、ファージディスプレイ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含む様々な技術によって作られてもよく、モノクローナル抗体を作るためのそのような方法及び他の例示的な方法を、ここで記述している。

【０８８４】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の供給源又は種から得られ、重鎖及び／又は軽鎖の残りが異なる供給源又は種から得られる抗体を指す。

【０８８５】

「ヒト化」抗体は、非ヒトＨＶＲからのアミノ酸残基と、ヒトＦＲからのアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。ある種の態様において、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインのすべてを実質的に含み、そこでは、ＨＶＲ（例えば、ＣＤＲ）のすべて又は実質的にすべてが、非ヒト抗体のものに対応し、すべて又は実質的にすべてのＦＲが、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意に、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化された抗体を指す。

【０８８６】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞により産生されるか、又はヒト抗体のレパートリー又はヒト抗体をコードする他の配列を利用した非ヒト供給源から得られる抗体のアミノ酸配列に対応する、アミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、具体的には、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。

【０８８７】

「ネイキッド抗体」は、異種の部分（例えば、細胞毒性部分）又は放射性標識にコンジュゲートしていない抗体を指す。ネイキッド抗体は、医薬製剤に存在してもよい。

【０８８８】

「天然型抗体」は、様々な構造を有する、天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然型ＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合している２つの同一の軽鎖及び２つの同一の重鎖からなる約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。Ｎ末端からＣ末端に、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＨ）を有し、その後に、３つの定常ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３）が続く。同様に、Ｎ末端からＣ末端に、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＬ）を有し、その後に、定常軽鎖（ＣＬ）ドメインが続く。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる、２つのタイプの一方に割り当てられてもよい。

【０８８９】

「親和性」は、分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。ここで使用する場合、特に断りがない限り、「結合親和性」は、結合対（例えば、抗体及び抗原）のメンバー間の１：１の相互作用を反映している、本質的な結合親和性を指す。そのパートナーＹに対する分子Ｘの親和性は、一般的に、解離定数（Ｋｄ）で表すことができる。親和性は、ここで記述するものを含む、当分野で既知の一般的方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な実例的及び例示的態様を、以下に記述する。

【０８９０】

「親和性成熟」抗体は、変更を有していない親抗体と比較して、その１つ以上のＨＶＲにおいて１つ以上の変更を有する抗体を指し、そのような変更は、抗原への抗体の親和性を高める。

【０８９１】

指定された抗体の「生物学的特徴」を有する抗体は、同じ抗原に結合する他の抗体とそれを区別する、その抗体の生物学的特徴の１つ以上を有する抗体である。

【０８９２】

抗体の「機能的抗原結合部位」は、標的抗原に結合することができる部位である。抗原結合部位の抗原結合親和性は、必ずしも、抗原結合部位が得られる親抗体ほど強いとは限らないが、抗原に結合する能力は、抗原への抗体の結合を評価するための既知の様々な方法の何れかを使用して測定できなければならない。更に、ここで、多価抗体の抗原結合部位の各々の抗原結合親和性は、量的に同じである必要はない。ここでの多量体抗体について、機能的抗原結合部位の数は、米国特許出願公開第２００５０１８６２０８号の例２に記載されている通り、超遠心分離分析を用いて評価することができる。この分析方法によれば、標的抗原対多量体抗体の異なる比が組み合わされ、複合体の平均分子量が、機能的結合部位の異なった数を仮定して計算される。これらの理論値は、機能的結合部位の数を

評価するために得られた実際の実験値と比較される。

【０８９３】

「種依存性抗体」は、第２の哺乳類種からの抗原の相同体に対して有している結合親和性よりも強力な、第１の哺乳類種からの抗原への結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原と「特異的に結合」する（すなわち、約１×１０$^{-7}$Ｍ以下、好ましくは約１×１０$^{-8}$以下、最も好ましくは約１×１０$^{-9}$Ｍ以下の結合親和性（Ｋｄ）値を有する）が、そのヒト抗原への結合親和性よりも、少なくとも約５０倍、又は少なくとも約５００倍、又は少なくとも約１０００倍弱い、第２の非ヒト哺乳類種からの抗原の相同体への結合親和性を有する。種依存性抗体は、上で定義した種々のタイプの抗体の何れかでありうる。いくつかの態様において、種依存性抗体は、ヒト化又はヒト抗体である。

【０８９４】

「単離された」抗体は、その自然環境の構成成分から分離された抗体である。いくつかの態様では、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動（ＩＥＦ）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換又は逆相ＨＰＬＣ）によって決定される、純度９５％超又は９９％に精製される。抗体純度の評価のための方法の概説については、Ｆｌａｔｍａｎら、Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ｂ　８４８：７９～８７（２００７）を参照されたい。

２）細胞外タンパク質

細胞外タンパク質は、とりわけ、多細胞生物の形成、分化、及び維持において重要な役割を果たす。目的の様々な細胞外タンパク質の検討は、参照により組み込まれる、２００４年４月２０日に発行された米国特許第６，７２３，５３５号（Ａｓｈｋｅｎａｚｉら）に記載されている。

【０８９５】

多くの個々の細胞の運命、例えば、増殖、遊走、分化、又は他の細胞との相互作用は、典型的には、他の細胞及び／又は直近の環境から受け取る情報によって統制されている。この情報は、しばしば、分泌ペプチド（例えば、分裂促進因子、生存因子、細胞毒性因子、分化因子、神経ペプチド、及びホルモン）により伝達され、これが、多様な細胞受容体又は膜結合タンパク質により受け取られ、解釈される。これらの分泌ポリペプチド又はシグナル分子は、通常、細胞の分泌経路を通過し、細胞外環境に存在するそれらの活性部位に到達する。

【０８９６】

分泌タンパク質は、製薬、診断、バイオセンサー及びバイオリアクターを含む、様々な産業上の利用性を有している。血栓溶解剤、インターフェロン、インターロイキン、エリスロポエチン、コロニー刺激因子、及び様々な他のサイトカインなどの、現在入手可能な大抵のタンパク質薬は、分泌タンパク質である。膜タンパク質であるその受容体も、治療又は診断用薬剤としての可能性を有している。新規の天然型分泌タンパク質を同定する努力が産業界と学術界の両方によってなされている。新規な分泌タンパク質のコード配列を同定するために、多くの努力が、哺乳類組換えＤＮＡライブラリーのスクリーニングに注がれている。スクリーニング方法及び技術の例は、文献に記載されている（例えば、Ｋｌｅｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９３：７１０８～７１１３（１９９６）；米国特許第５，５３６，６３７号を参照されたい）。

【０８９７】

膜結合タンパク質と受容体は、とりわけ、多細胞生物の形成、分化及び維持において重要な役割を果たすことができる。多くの個々の細胞の運命、例えば増殖、遊走、分化又は他の細胞との相互作用は、典型的には、他の細胞及び／又は直近の環境から受け取る情報に統制される。この情報は、しばしば、分泌ポリペプチド（例えば、分裂促進因子、生存因子、細胞毒性因子、分化因子、神経ペプチド、及びホルモン）により伝達され、これが、多様な細胞受容体又は膜結合タンパク質により受け取られ、解釈される。このような膜結合タンパク質と細胞受容体としては、それらに限定されないが、サイトカイン受容体、受容体キナーゼ、受容体ホスファターゼ、細胞－細胞間相互作用に関与する受容体、並び

に、セレクチン及びインテグリンのような細胞接着分子が挙げられる。例えば、細胞の成長及び分化を調節するシグナルの伝達は、様々な細胞タンパク質のリン酸化により部分的に調節される。そのプロセスを触媒する酵素であるプロテインチロシンキナーゼは、成長因子受容体としても作用することができる。例としては、繊維芽細胞成長因子及び神経成長因子受容体が挙げられる。

【０８９８】

膜結合タンパク質及び受容体分子は、製薬及び診断薬を含む、様々な産業上の利用性を有している。例えば、受容体イムノアドヘシンは、受容体－リガンド間相互作用をブロックする治療薬として用いることができる。膜結合タンパク質は、関連する受容体／リガンド間相互作用の可能性のあるペプチド又は小分子インヒビターをスクリーニングするために使用することもできる。

３）インテインベースのＣ末端合成

例えば、２００５年２月１日に発行された米国特許第６，８４９，４２８号に記載されている通り、インテインは、自己スプライシングＲＮＡイントロンのタンパク質同等物であり（Ｐｅｒｌｅｒら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２：１１２５～１１２７（１９９４））、それは、前駆タンパク質からのそれら自体の切除を触媒し、同時に、エクステインとして知られるフランキングタンパク質配列を融合させる（Ｐｅｒｌｅｒら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．１：２９２～２９９（１９９７）；Ｐｅｒｌｅｒ，Ｆ．Ｂ．Ｃｅｌｌ ９２（１）：１～４（１９９８）；Ｘｕら、ＥＭＢＯ Ｊ．１５（１９）：５１４６～５１５３（１９９６）で概説されている）。

【０８９９】

インテインスプライシング機構の研究により、Ｓｃｅ ＶＭＡインテインのＮ末端でのペプチド結合のチオール誘導切断を使用するタンパク質精製システムが開発された（Ｃｈｏｎｇら、Ｇｅｎｅ、１９２（２）：２７１～２８１（１９９７）。このインテイン媒介システムによる精製によって、Ｃ末端チオエステルを有する細菌発現タンパク質が生ずる（Ｃｈｏｎｇら，（１９９７））。細胞毒性タンパク質を単離すると述べられている１つの用途において、Ｃ末端チオエステルを有する細菌発現タンパク質は、「天然化学ライゲーション」に関する化学（Ｅｖａｎｓら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．、７：２２５６～２２６４（１９９８）、Ｍｕｉｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９５：６７０５～６７１０（１９９８））を使用して、Ｎ末端システインを有する化学合成ペプチドと融合される。

【０９００】

「インテイン媒介タンパク質ライゲーション（ＩＰＬ）」と呼ばれるこの技法により、タンパク質半合成法がかなり進歩した。しかし、約１００を超える残基を有する化学合成ペプチドを得ることが困難であるので、ＩＰＬの一般的な適用は、ライゲーションの相手としての化学合成ペプチドの要件により限定された。

【０９０１】

例えば、米国特許第６，８４９，４２８号に記載されている通り、所定のＮ末端、例えば、システインを有する発現タンパク質が作製された時、ＩＰＬ技術は、著しく拡大した。これにより、宿主細胞、例えば、細菌、酵母、哺乳類細胞から発現させた１種以上のタンパク質を融合させることが可能になる。非限定的な一例において、Ｃ末端又はＮ末端のいずれかで開裂する、改変ＲＩＲ１ Ｍｅｔｈａｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｈｅｒｍｏａｕｔｏｔｒｏｐｈｉｃｕｍのインテインを使用し、これにより、１カラム精製の間に、細菌発現タンパク質の放出が可能になり、したがって、プロテアーゼの必要性が完全になくなる。

【０９０２】

インテイン技術は、構成成分を得るための１つの経路の一例である。一態様において、本発明の化合物のサブユニットは、成熟キメラペプチドを発現及び分泌できる適切な細胞をトランスフェクトすることによって得られ、そこでは、そのようなポリペプチドは、例えば、単離可能なＣ末端インテインドメインに隣接するアドヘシンドメインを含む（例え

ば、参照により組み込まれる、２００５年２月１日に発行された、米国特許第６，８４９，４２８（Ｅｖａｎｓら）を参照されたい）。哺乳類細胞又は細菌細胞などの細胞は、既知の組み換えＤＮＡ技法を使用してトランスフェクトされる。次いで、分泌されたキメラポリペプチドは、例えば、インテイン－キチン結合ドメインの場合は、キチン誘導体化樹脂を使用して単離することができ（参照により組み込まれる、２００５年５月２４日に発行された、米国特許第６，８９７，２８５号（Ｘｕら）を参照されたい）、次いで、チオール媒介切断、及びこの時点でＣ末端チオエステル末端付きサブユニットの放出を可能にする条件下で処理される。チオエステル末端付きアドヘシンサブユニットは、Ｃ末端システイン末端付きサブユニットに容易に変換される。

【０９０３】

例えば、インテイン自動切断反応後に、天然化学ライゲーションによる、Ｃ末端へのシステイン、セレノシステイン、ホモシステイン若しくはホモセレノシステイン、又はシステイン、セレノシステイン、ホモシステイン、ホモセレノシステインの誘導体の簡単な添加を可能にするチオエステル中間体を生じさせる。天然化学ライゲーションにより、システイン、セレノシステイン、ホモシステイン若しくはホモセレノシステイン、又はシステイン、セレノシステイン、ホモシステイン、ホモセレノシステインの誘導体をＣ末端に付加する方法は、本発明の側面に有用であり、２００８年１０月１６日に公開された米国特許出願第２００８／０２５４５１２号（Ｃａｐｏｎ）に記載されており、それは、参照によりその内容全体がここに組み込まれる。

キット

本発明の別の側面は、ここで開示する化合物及びこれらの化合物を含む医薬組成物を含むキットを提供する。キットは、化合物又は医薬組成物に加えて、診断又は治療薬を含んでもよい。キットは、診断又は治療法における使用説明書も含んでもよい。診断の態様において、キットは、化合物又はその医薬組成物、及び診断薬を含む。治療の態様において、キットは、抗体又はその医薬組成物、及び１種以上の治療薬、例えば、追加の抗悪性腫瘍薬、抗腫瘍薬又は化学療法薬を含む。

一般的技法

以下の記述は主に、コード核酸を含むベクターで形質転換又はトランスフェクトされる細胞を培養することによる、目的の一連の連続アミノ酸又はポリペプチドの生成に関する。当然、当分野で周知されている代替的方法が用いられてもよいことを企図する。例えば、アミノ酸配列又はその一部は、固相法を使用する直接ペプチド合成によって生成されてもよい（例えば、Ｓｔｅｗａｒｔら、Ｓｏｌｉｄ－Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ Ｃｏ．、Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、Ｃａｌｉｆ．（１９６９）；Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、８５：２１４９～２１５４（１９６３）を参照されたい）。インビトロタンパク質合成は、手動法を使用して、又は自動的に行われてもよい。自動合成は、例えば、製造元の説明書を使用して、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ（Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、Ｃａｌｉｆ．）を使用して行われてもよい。目的の一連の連続アミノ酸又はポリペプチドの様々な部分を個々に又は組み合わせて、化学合成し、化学的又は酵素的方法を使用して、目的の完全長の一連の連続アミノ酸又はポリペプチドを生成してもよい。

１．宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞は、生成のために、ここに記述する発現又はクローニングベクターでトランスフェクト又は形質転換され、プロモーターを誘導する、形質転換体を選択する、又は、所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために、必要に応じて改変された従来の栄養培地で培養される。培養条件、例えば、培地、温度、ｐＨなどを、過度の実験をすることなく、当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール及び実際の技法は、Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ、Ｍ．Ｂｕｔｌｅｒ編（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ、１９９１）、及びＳａｍｂｒｏｏｋら、前掲、において見出すことができる。

【０９０４】
真核生物細胞トランスフェクション及び原核生物細胞形質転換の方法、例えば、$CaCl_2$、$CaPO_4$、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは、当業者に既知である。使用する宿主細胞に応じて、形質転換は、そのような細胞に適した標準的方法を使用して行われる。Ｓａｍｂｒｏｏｋら、前掲、に記載されている塩化カルシウムを用いるカルシウム処理、又はエレクトロポレーションは、一般に、原核生物に使用される。Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓによる感染は、Ｓｈａｗら、Ｇｅｎｅ、２３：３１５（１９８３）、及び１９８９年６月２９日に公開されたＷＯ８９／０５８５９に記載されているように、ある種の植物細胞の形質転換に使用される。そのような細胞壁を有しない哺乳類細胞については、Ｇｒａｈａｍ及びｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、５２：４５６～４５７（１９７８）のリン酸カルシウム沈殿法が使用される。哺乳類細胞の宿主系の形質転換の一般的な側面は、米国特許第４，３９９，２１６号に記載されている。酵母への形質転換は、典型的には、Ｖａｎ Ｓｏｌｉｎｇｅｎら、Ｊ．Ｂａｃｔ．、１３０：９４６（１９７７）、及びＨｓｉａｏら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）、７６：３８２９（１９７９）の方法に従って行われる。しかしながら、ＤＮＡを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、インタクト細胞との細菌プロトプラスト融合、又は、ポリカチオン、例えば、ポリブレン、ポリオルニチンも使用されてもよい。哺乳類細胞を形質転換するための様々な技法については、Ｋｅｏｗｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、１８５：５２７～５３７（１９９０）、及びＭａｎｓｏｕｒら、Ｎａｔｕｒｅ、３３６：３４８～３５２（１９８８）を参照されたい。

【０９０５】
ここで、ベクターにおいてＤＮＡをクローニングする又は発現させるのに適切な宿主細胞は、原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物としては、それらに限定されないが、真正細菌、例えば、グラム陰性又はグラム陽性微生物、例えば、大腸内細菌科、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）が挙げられる。様々な大腸菌株が公に入手可能であり、例えば、大腸菌Ｋ１２株ＭＭ２９４（ＡＴＣＣ ３１，４４６）；大腸菌Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ ３１，５３７）；大腸菌株Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ ２７，３２５）及びＫ５７７２（ＡＴＣＣ ５３，６３５）である。他の適切な原核動物宿主細胞としては、腸内細菌科、例えば、大腸菌属、例えば、大腸菌、エンテロバクター、Ｅｒｗｉｎｉａ属、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ属、Ｐｒｏｔｅｕｓ属、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、例えば、ネズミチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、Ｓｅｒｒａｔｉａ属、例えば、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃａｎｓ、及び赤痢菌（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）、並びに、桿菌、例えば、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ及びＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ（例えば、１９８９年４月１２日に公開されたＤＤ２６６，７１０に記載されたＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ４１Ｐ）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ属、例えば、緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、並びに、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ属が挙げられる。これらの例は、限定ではなく例示である。株Ｗ３１１０は、組み換えＤＮＡ生成物発酵に共通の宿主株であるので、１つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株Ｗ３１１０を、宿主にとって内因性のタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子変異をもたらすように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型ｔｏｎＡを有する大腸菌Ｗ３１１０株１Ａ２；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３を有する大腸菌Ｗ３１１０株９Ｅ４；完全な遺伝子型ｔｏｎＡｐｔｒ３ｐｈｏＡ Ｅ１５（ａｒｇＦ－ｌａｃ）１６９ ｄｅｇＰ ｏｍｐＴ ｋａｎ^{r}を有する大腸菌Ｗ３１１０株２７Ｃ７（ＡＴＣＣ ５５，２４４）；完全な遺伝子型ｔｏｎＡ ｐｔｒ３ ｐｈｏＡ Ｅ１５（ａｒｇＦ－ｌａｃ）１６９ ｄｅｇＰ ｏｍｐＴ ｒｂｓ７ ｉｌｖＧ ｋａｎ^{r}を有する大腸菌Ｗ３１１０株３７Ｄ６；非カナマイシン耐性ｄｅｇＰ欠失変異を有する３７Ｄ６株である、大腸菌Ｗ３１１０株４０Ｂ４；及び、１９９０年８月７日発行の米国特許第４，９４６，７８３号に開示されている変異ペリプラズムプロテアーゼを有する大腸菌株が挙げられる。或いは、クローニン

グのインビトロ法、例えば、ＰＣＲ又は他の核酸ポリメラーゼ反応が適切である。

【０９０６】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母などの真核微生物は、ベクターをコードするのに適切なクローニング又は発現宿主である。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅは、よく使用される下等真核生物宿主微生物である。他には、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ（Ｂｅａｃｈ及びＮｕｒｓｅ、Ｎａｔｕｒｅ、２９０：１４０（１９８１）；１９８５年５月２日に公開されたＥＰ１３９，３８３）；Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ宿主（米国特許第４，９４３，５２９号；Ｆｌｅｅｒら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、９：９６８～９７５（１９９１））、例えば、Ｋ．ｌａｃｔｉｓ（ＭＷ９８－８Ｃ、ＣＢＳ６８３、ＣＢＳ４５７４；Ｌｏｕｖｅｎｃｏｕｒｔら、Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．７３７（１９８３）、Ｋ．ｆｒａｇｉｌｉｓ（ＡＴＣＣ １２，４２４）、Ｋ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ（ＡＴＣＣ １６，０４５）、Ｋ．ｗｉｃｋｅｒａｍｉｉ（ＡＴＣＣ ２４，１７８）、Ｋ．ｗａｌｔｉｉ（ＡＴＣＣ ５６，５００）、Ｋ．ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａｒｕｍ（ＡＴＣＣ ３６，９０６）；Ｖａｎ ｄｅｎ Ｂｅｒｇら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、８：１３５（１９９０））、Ｋ．ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓ及びＫ．ｍａｒｘｉａｎｕｓ；ｙａｒｒｏｗｉａ属（ＥＰ４０２，２２６）；Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ（ＥＰ１８３，０７０）；Ｓｒｅｅｋｒｉｓｈｎａら、Ｊ．Ｂａｓｉｃ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ、２８：２６５～２７８（１９８８））；Ｃａｎｄｉｄａ属；Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｉａ（ＥＰ２４４，２３４）；アカパンカビ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒａｓｓａ）（Ｃａｓｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７６：５２５９～５２６３（１９７９））；Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ属、例えば、Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ ｏｃｃｉｄｅｎｔａｌｉｓ（１９９０年１０月３１日に公開されたＥＰ３９４，５３８）；及び糸状真菌、例えば、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ属、Ｔｏｌｙｐｏｃｌａｄｉｕｍ（１９９１年１月１０日に公開されたＷＯ９１／００３５７）；並びに、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ属宿主、例えば、Ａ．ｎｉｄｕｌａｎｓ（Ｂａｌｌａｎｃｅら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．、１１２：２８４～２８９（１９８３）；Ｔｉｌｂｕｒｎら、Ｇｅｎｅ、２６：２０５～２２１（１９８３）；Ｙｅｌｔｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８１：１４７０～１４７４（１９８４））、及びＡ．ｎｉｇｅｒ（Ｋｅｌｌｙ及びＨｙｎｅｓ、ＥＭＢＯ Ｊ．、４：４７５～４７９（１９８５））がある。ここで、メチロトローフ酵母が適切であり、メチロトローフ酵母としては、それらに限定されないが、Ｈａｎｓｅｎｕｌａ、Ｃａｎｄｉｄａ、Ｋｌｏｅｃｋｅｒａ、Ｐｉｃｈｉａ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｔｏｒｕｌｏｐｓｉｓ、及びＲｈｏｄｏｔｏｒｕｌａからなる属から選択される、メタノールで成長できる酵母を含む。この酵母のクラスの例示である具体的な種のリストは、Ｃ．Ａｎｔｈｏｎｙ、Ｔｈｅ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｍｅｔｈｙｌｏｔｒｏｐｈｓ、２６９（１９８２）に記載されている。

【０９０７】

目的のグリコシル化された一連の連続アミノ酸、又はポリペプチドの発現に適した宿主細胞は、多細胞生物由来のものである。非脊椎動物細胞の例としては、昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）Ｓ２及びＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ Ｓｆ９、並びに、植物細胞が挙げられる。有用な哺乳類宿主細胞株の例としては、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、及びＣＯＳ細胞である。より具体的な例としては、ＳＶ４０（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ ＣＲＬ１６５１）により形質転換されたサル腎ＣＶ１細胞株；ヒト胚芽腎細胞株（２９３細胞、又は懸濁培養で成長するようにサブクローニングされた２９３細胞、Ｇｒａｈａｍら、Ｊ．Ｇｅｎ Ｖｉｒｏｌ．、３６：５９（１９７７））；チャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、Ｕｒｌａｕｂ及びＣｈａｓｉｎ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：４２１６（１９８０））；マウスセルトリ細胞（ＴＭ４、Ｍａｔｈｅｒ、Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．、２３：２４３～２５１（１９８０））；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７５）；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ Ｇ２、ＨＢ ８０６５）；及びマウス乳腺腫瘍細胞（ＭＭＴ ０６０５６２

、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）が挙げられる。適切な宿主細胞の選択は、当分野の技能の範囲内であると考える。

２．複製可能なベクターの選択及び使用

目的の一連の連続アミノ酸又はポリペプチドをコードする核酸（例えば、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ）は、クローニング（ＤＮＡの増幅）又は発現のために、複製可能なベクターに挿入されてもよい。様々なベクターが、公に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態であってもよい。適切な核酸配列は、様々な手順によって、ベクターに挿入されてもよい。一般に、ＤＮＡは、当分野で既知の技法を使用して、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター構成成分としては、それらに限定されないが、一般的には、シグナル配列、複製の起点、１つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列のうちの１つ以上が挙げられる。これらの構成成分の１つ以上を含む適切なベクターの構築は、当業者に既知の標準的なライゲーション技術を用いる。

【０９０８】

目的の一連の連続アミノ酸又はポリペプチドは、組み換えによって、直接的にだけでなく、シグナル配列、又は、成熟タンパク質若しくはポリペプチドのＮ末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドであってもよい、異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとして生成されてもよい。一般に、シグナル配列は、ベクターの構成成分であってもよいし、ベクターに挿入されるＤＮＡをコードする一部であってもよい。シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、１ｐｐ、又は熱安定性エンテロトキシンＩＩリーダーの群から選択される、原核生物シグナル配列であってもよい。酵母の分泌については、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、α因子リーダー（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ及びＫｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓのα因子リーダーを含み、後者は、米国特許第５，０１０，１８２号に記載されている）、又は酸性ホスファターゼリーダー、Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓグルコアミラーゼリーダー（１９９０年４月４日に公開されたＥＰ３６２，１７９）、又は１９９０年１１月１５日に公開されたＷＯ９０／１３６４６に記載されているシグナルであってもよい。哺乳類細胞の発現において、同一又は関係種の分泌ペプチドからのシグナル配列などの哺乳類シグナル配列、並びに、ウイルス分泌リーダーが、タンパク質の分泌を誘導するために使用されてもよい。

【０９０９】

発現ベクターとクローニングベクターの両方は、１つ以上の選択される宿主細胞において、ベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は、様々な細菌、酵母、ウイルスについてよく知られている。プラスミドｐＢＲ３２２由来の複製の起点は、ほとんどのグラム陰性菌に適していて、２ｍｕプラスミド起点は、酵母に適していて、様々なウイルス起源（ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、ＶＳＶ又はＢＰＶ）は、哺乳類細胞においてベクターをクローニングするのに有用である。

【０９１０】

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選択マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、（ａ）アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート又はテトラサイクリンなどの抗生物質、又は他の毒素に耐性を与え、（ｂ）栄養要求性欠陥を補い、又は（ｃ）例えば、ＢａｃｉｌｌｉのＤ－アラニンラセマーゼをコードする遺伝子などの、複合培地から得られない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。

【０９１１】

哺乳類細胞に適した選択可能なマーカーの例は、コード核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することができるもの、例えば、ＤＨＦＲ又はチミジンキナーゼである。野生型ＤＨＦＲを用いた場合の適切な宿主細胞は、Ｕｒｌａｕｂら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７７：４２１６（１９８０）に記載されている通りに作製され増殖された、ＤＨＦＲ活性に欠陥のあるＣＨＯ株化細胞である。酵母での使用に適した選択遺伝子は、酵母プラスミドＹＲｐ７に存在するｔｒｐ１遺伝子である（Ｓｔｉｎｃｈ

ｃｏｍｂら、Ｎａｔｕｒｅ、２８２：３９（１９７９）；Ｋｉｎｇｓｍａｎら、Ｇｅｎｅ、７：１４１（１９７９）；Ｔｓｃｈｅｍｐｅｒら、Ｇｅｎｅ、１０：１５７（１９８０））。ｔｒｐ１遺伝子は、トリプトファン、例えば、ＡＴＣＣ　ＮＯ．４４０７６、又はＰＥＰ４－１で成長する能力を欠く酵母の変異株に対する選択マーカーを与える（Ｊｏｎｅｓ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、８５：１２（１９７７）。

【０９１２】

発現及びクローニングベクターは、通常、コード核酸配列に作用可能に連結し、ｍＲＮＡ合成を方向付けるプロモーターを含む。種々の潜在的な宿主細胞によって認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主との使用に適したプロモーターは、β－ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系（Ｃｈａｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ、２７５：６１５（１９７８）；Ｇｏｅｄｄｅｌら、Ｎａｔｕｒｅ、２８１：５４４（１９７９））、アルカリホスファターゼ、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系（Ｇｏｅｄｄｅｌ、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、８：４０５７（１９８０）；ＥＰ３６，７７６号）、並びに、ハイブリッドプロモーター、例えば、ｔａｃプロモーター（ｄｅＢｏｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８０：２１～２５（１９８３））を含む。細菌系で使用するプロモーターも、コードするＤＮＡに作用可能に連結したシャイン・ダルガーノ（Ｓ．Ｄ．）配列を有する。

【０９１３】

酵母宿主との使用に適したプロモーター配列の例としては、３－ホスホグリセラートキナーゼ（Ｈｉｔｚｅｍａｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２５５：２０７３（１９８０））、又は他の糖分解酵素（Ｈｅｓｓら、Ｊ．Ａｄｖ．Ｅｎｚｙｍｅ　Ｒｅｇ．、７：１４９（１９６８）；Ｈｏｌｌａｎｄ、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、１７：４９００（１９７８））、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース－６－リン酸イソメラーゼ、３－ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが挙げられる。

【０９１４】

他の酵母プロモーターは、成長条件によって転写が制御される追加の利点を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ２、イソシトクロムＣ、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ、並びに、マルトース及びガラクトースの利用に関与する酵素の、プロモーター領域である。酵母菌での発現での使用に適したベクター及びプロモーターは、更に、ＥＰ７３，６５７に記載されている。

【０９１５】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス（１９８９年７月５日に公開されたＵＫ２，２１１，５０４号）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス２）、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス及びサルウイルス４０（ＳＶ４０）などのウイルスのゲノムから、異種哺乳類プロモーター、例えば、アクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーターから、並びにヒートショックプロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合できる限り制御される。

【０９１６】

より高等の真核生物による、目的の一連の連続アミノ酸連又はポリペプチドをコードするＤＮＡの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強されてもよい。エンハンサーは、通常は約１０～３００ｂｐで、プロモーターに作用してその転写を増強する、ＤＮＡのシス作用要素である。現在、哺乳類遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が知られている（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α－フェトプロテイン及びインスリン）。しかし、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが使用され

るであろう。例としては、複製起点の後期側のＳＶ４０エンハンサー（１００～２７０ｂｐ）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。エンハンサーは、コード配列の５’又は３’位でベクター中にスプライシングされてもよいが、好ましくは、プロモーターから５’位に位置する。

【０９１７】

真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞）において使用される発現ベクターは、転写の終結及びｍＲＮＡの安定化に必要な配列も含む。そのような配列は、真核生物又はウイルスのＤＮＡ又はｃＤＮＡの、通常は５’、時には３’の非翻訳領域から得られる。これらの領域は、目的の一連の連続アミノ酸又はポリペプチドをコードするｍＲＮＡの非翻訳部分でポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

【０９１８】

組み換え脊椎動物細胞培養での一連の連続アミノ酸又はポリペプチドの合成への適合化に適した他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Ｇｅｔｈｉｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ、２９３：６２０～６２５（１９８１）；Ｍａｎｔｅｉら、Ｎａｔｕｒｅ、２８１：４０～４６（１９７９）；ＥＰ１１７，０６０；及びＥＰ１１７，０５８に記載されている。

３．遺伝子の増幅／発現の検出

遺伝子の増幅及び／又は発現は、ここで提供する配列に基づき、適切に標識されたプローブを使用して、例えば、従来のサザンブロット法、ｍＲＮＡの転写を定量化するノーザンブロット法（Ｔｈｏｍａｓ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７７：５２０１～５２０５（１９８０））、ドットブロット法（ＤＮＡ分析）、又はインサイチューハイブリダイゼーションによって、直接的にサンプルにおいて測定されてもよい。或いは、ＤＮＡ二本鎖、ＲＮＡ二本鎖、及びＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド二本鎖又はＤＮＡ－タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体が用いられてもよい。次いで、抗体は、標識されてもよく、アッセイが実施されてもよく、ここで二本鎖は、表面に結合しており、その結果、表面での二本鎖の形成の時点で、その二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

【０９１９】

或いは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量化する免疫学的な方法、例えば、細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色、及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。サンプル液の免疫組織化学的染色及び／又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナル又はポリクローナルのいずれかであってもよく、任意の哺乳類で作製されてもよい。好都合には、抗体は、天然配列の目的の一連の連続アミノ酸若しくはポリペプチドに対して、又はここで提供するＤＮＡ配列に基づく合成ペプチドに対して、又は目的の一連の連続アミノ酸又はポリペプチド及び特異的な抗体エピトープをコードするＤＮＡに融合する外因性配列に対して作製されてもよい。

４．ポリペプチドの精製

目的の一連の連続アミノ酸又はポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性である場合、適切な洗浄液（例えば、トリトン－Ｘ１００）を使用して、又は酵素的切断によって、膜から引き離すことができる。目的の一連の連続アミノ酸又はポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの様々な物理的又は化学的手段によって破壊することができる。

【０９２０】

目的の一連の連続アミノ酸又はポリペプチドを、組み換え細胞タンパク質又はポリペプチドから精製することが望まれるかもしれない。適切な精製手順の例である次の手順によって：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相ＨＰＬＣ；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えば、ＤＥＡＥによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；ＳＤＳ－ＰＡＧＥ；硫酸アンモニウム沈殿；例えば、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－７５

を用いる、ゲル濾過；ＩｇＧなどの混入物質を除去するプロテインＡセファロースカラム；並びに、エピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムによって精製される。タンパク質精製の様々な方法が用いられてもよく、そのような方法は、当分野で既知であり、例えば、Ｄｅｕｔｓｃｈｅｒ、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、１８２（１９９０）；Ｓｃｏｐｅｓ、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８２）に記載されている。選択される精製工程は、例えば、使用される生成方法、及び生成される特定の、目的の一連の連続アミノ酸又はポリペプチドの性質に依存する。

大腸菌における、目的の一連の連続アミノ酸又はポリペプチド成分の発現の例

所望の目的のアミノ酸配列又はポリペプチドをコードするＤＮＡ配列を、まず、選択したＰＣＲプライマーを使用して増幅する。プライマーは、選択された発現ベクターでの制限酵素部位に対応した制限酵素部位を含むはずである。様々な発現ベクターを用いてもよい。適切なベクターの例は、ｐＢＲ３２２（大腸菌由来；Ｂｏｌｉｖａｒら、Ｇｅｎｅ、２：９５（１９７７）参照）であり、それは、アンピシリン及びテトラサイクリンに耐性の遺伝子を含む。ベクターは、制限酵素で消化され、脱リン酸化される。次いで、ＰＣＲで増幅された配列を、ベクターにライゲートする。ベクターは、好ましくは、抗体耐性遺伝子をコードする配列、ｔｒｐプロモーター、ポリｈｉｓリーダー（最初の６つのＳＴＩＩコドン、ポリｈｉｓ配列、エンテロキナーゼ切断部位を含む）、具体的な、目的のアミノ酸配列／ポリペプチドコード領域、λ転写終結領域、及びａｒｇＵ遺伝子を含む。

【０９２１】

次いで、ライゲーション混合物を使用して、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、前掲、に記載されている方法で、選択した大腸菌株を形質転換する。形質転換体を、ＬＢプレートで増殖する能力によって同定し、次いで、抗体耐性コロニーを選択する。プラスミドＤＮＡは、単離し、限定解析及びＤＮＡ塩基配列決定によって確認することができる。

【０９２２】

選択したクローンを、液体培地、例えば、抗体を補給したＬＢブロスにおいて、終夜増殖させることができる。終夜の培養は、その後により大きな規模の培養物に接種するために使用されてもよい。次いで、細胞を、所望の光学濃度まで増殖させ、その間、発現プロモーターがオンになる。

【０９２３】

細胞をさらに数時間培養した後、細胞は、遠心分離によって採取することができる。遠心分離によって得られた細胞ペレットは、当分野で既知の様々な薬剤を使用して、溶解させることができ、溶解させた目的のアミノ酸配列又はポリペプチドは、次いで、タンパク質を密接に結合させる条件下で、金属キレートカラムを使用して精製することができる。

【０９２４】

プライマーは、選択した発現ベクターでの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、並びに、効率的で確かな翻訳開始、金属キレートカラムでの速い精製、及びエンテロキナーゼによるタンパク質分解除去をもたらす他の有用な配列を含む。ＰＣＲで増幅した、ポリ－Ｈｉｓタグ付き配列は、例えば、株５２（Ｗ３１１０ ｆｕｈＡ（ｔｏｎＡ） Ｉｏｎ ｇａｌＥ ｒｐｏＨｔｓ（ｈｔｐＲｔｓ） ｃｌｐＰ（ｌａｃＩｑ）をベースにした大腸菌宿主を形質転換するのに使用される発現ベクターにライゲートすることができる。形質転換体を、Ｏ．Ｄ．６００が３～５に達するまで、まず、５０ｍｇ／ｍｌのカルベニシリンを含有するＬＢにおいて、振盪させながら、３０℃で増殖させることができる。次いで、培養物を、Ｃ ＲＡＰ培地（３．５７ｇの$(NH_4)_2SO_4$、０．７１ｇのクエン酸ナトリウム－２H_2O、１．０７ｇのＫＣｌ、５．３６ｇのＤｉｆｃｏ酵母エキス、５００ｍＬの水中５．３６ｇのＳｈｅｆｆｉｅｌｄ ｈｙｃａｓｅＳＦ、並びに、１１０ｍＭのＭＰＯＳ、ｐＨ７．３、０．５５％（ｗ／ｖ）のグルコース及び７ｍＭの$MgSO_4$）を混合して調製された）に５０～１００倍希釈し、振盪させながら、３０℃で約２０～３０時間増殖させる。サンプルを取り出し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によって発現を確認して、

バルク細胞を遠心分離し、細胞をペレットにする。細胞ペレットを、精製及び再フォールディングまで凍結させた。

【０９２５】

０．５～１Ｌの発酵物からの大腸菌ペースト（６～１０ｇのペレット）を、１０容量（ｗ／ｖ）の７Ｍのグアニジン、２０ｍＭのトリス、ｐＨ８バッファーに懸濁させた。固体の硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加し、最終濃度をそれぞれ、０．１Ｍ及び０．２Ｍにし、溶液を、４℃で終夜撹拌した。この工程の結果、スルフィトリゼーションによってすべてのシステイン残基がブロックされた、変性タンパク質が生じる。溶液を、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｕｌｔｒａｃｅｎｔｉｆｕｇｅで、４０，０００ｒｐｍで３０分間遠心分離した。上清を、３～５容量の金属キレートカラムバッファー（６Ｍのグアニジン、２０ｍＭのトリス、ｐＨ７．４）で希釈し、０．２２ミクロンのフィルターで濾過して、透明にした。透明にされた抽出物を、金属キレートカラムバッファーにおいて平衡化された５ ｍｉｌ Ｑｉａｇｅｎ Ｎｉ－ＮＴＡ金属キレートカラムに装填した。カラムを、５０ｍＭのイミダゾールを含有するｐＨ７．４の追加バッファー（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、Ｕｔｒｏｌ ｇｒａｄｅ）で洗浄した。タンパク質を、２５０ｍＭのイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含む画分をプールし、４℃で保存した。タンパク質の濃度を、アミノ酸配列に基づき計算された吸光係数を使用して、２８０ｎｍでの吸光度によって推測した。

哺乳類細胞における、一連の連続アミノ酸又はポリペプチドの発現

この一般的例は、哺乳類細胞における組み換え発現による、所望の目的アミノ酸配列又はポリペプチド成分のグリコシル化形態の調製を例示する。

【０９２６】

ベクターｐＲＫ５（１９８９年3月１５日に公開されたＥＰ３０７，２４７を参照されたい）を、発現ベクターとして用いることができる。任意に、コードＤＮＡを、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、前掲、に記載されているようなライゲーション方法を使用して、ＤＮＡを挿入させる選択した制限酵素で、ｐＲＫ５にライゲートする。

【０９２７】

一態様において、選択される宿主細胞は、２９３細胞であってもよい。ヒト２９３細胞（ＡＴＣＣ ＣＣＬ １５７３）を、ウシ胎児血清、及び任意に栄養成分及び／又は抗体を補給したＤＭＥＭなどの培地の組織培養プレートにおいてコンフルエントに増殖させる。約１０μｇのライゲートされたベクターＤＮＡを、ＶＡ ＲＮＡ遺伝子［Ｔｈｉｍｍａｐｐａｙａら、Ｃｅｌｌ ３１：５４３（１９８２）］をコードするＤＮＡ約１μｇと混合し、５００μｌの１ｍＭのトリス－ＨＣｌ、０．１ｍＭのＥＤＴＡ、０．２２７ＭのＣａＣｌ$_2$に溶解する。この混合物に、５００μｌの５０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．３５）、２８０ｍＭのＮａＣｌ、１．５ｍＭのＮａＰＯ$_4$を滴下し、２５℃で１０分間、沈殿を形成させる。沈殿物を懸濁させて、２９３細胞を添加して、３７℃で約４時間静置した。培地を吸引除去し、ＰＢＳ中の２０％グリセロール２ｍｌを、３０秒間添加する。次いで、２９３細胞を、血清不含培地で洗浄し、新しい培地を添加し、細胞を約５日間インキュベートする。

【０９２８】

トランスフェクションの約２４時間後、培地を除去し、培地（単独）、又は、２００μＣｉ／ｍｌの^{35}Ｓ－システイン及び２００μＣｉ／ｍｌの^{35}Ｓ－メチオニンを含有する培地に取りかえる。１２時間のインキュベーション後、馴化培地を収集し、スピンフィルターで濃縮し、１５％のＳＤＳゲルに装填する。処理されたゲルを乾燥させ、選択した期間の間フィルムに曝露し、目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分の存在を明らかにする。トランスフェクト細胞を含有する培養物は、（血清不含培地中で）さらにインキュベーションされてもよく、培地を、選択したバイオアッセイ試験する。

【０９２９】

代替の方法において、核酸の目的アミノ酸配列又はポリペプチド成分を、Ｓｏｍｐａｒｙｒａｃら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、１２：７５７５（１９８１）に

よって説明されている硫酸デキストラン法を使用して、一時的に２９３細胞に導入してもよい。２９３細胞を、スピナーフラスコにおいて、最大濃度にまで増殖させ、７００μｇのライゲートされたベクター添加する。細胞を、まず、遠心分離によってスピナーフラスコから濃縮し、ＰＢＳで洗浄する。ＤＮＡ－デキストラン沈殿物を、細胞ペレット上で４時間インキュベートする。細胞を、２０％のグリセロールで９０秒処理し、組織培地で洗浄し、組織培地、５μｇ／ｍｌのウシインスリン、及び０．１μｇ／ｍｌのウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再び導入する。約４日後、馴化培地を遠心分離し、濾過し、細胞及び残屑を除去した。次いで、発現した目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分を含むサンプルを濃縮し、任意に選択した方法、例えば、透析及び／又はカラムクロマトグラフィーによって精製することができる。

【０９３０】

別の態様において、目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分を、ＣＨＯ細胞において発現させることができる。目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分を、$CaPO_4$又はＤＥＡＥ－デキストランなどの既知の試薬を使用して、ＣＨＯ細胞にトランスフェクトすることができる。上記の通り、細胞培養物をインキュベートし、培地を、培地（単独）、又は、^{35}Ｓ－メチオニンなどの放射性標識を含む培地に取りかえる。目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分の存在を決定した後、培地を、血清不含培地に取りかえてもよい。好ましくは、培地を、６日間インキュベートし、次いで、馴化培地を採取する。発現した目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分を含有する培地を、濃縮し、選択した方法によって精製することができる。

【０９３１】

エピトープタグ付きの目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分も、宿主ＣＨＯ細胞において発現させてもよい。目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分を、ｐＲＫ５ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローン挿入は、ＰＣＲ処理を受けて、選択したエピトープタグ、例えば、ポリ－ｈｉｓタグとインフレームで融合して、バキュロウイルス発現ベクターに入ることができる。次いで、ポリ－ｈｉｓタグ付きの目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分の挿入は、安定なクローンの選択のためにＤＨＦＲなどの選択マーカーを含むＳＶ４０駆動ベクターにサブクローニングすることができる。最後に、ＣＨＯ細胞を、ＳＶ駆動ベクターで、（上記の通り）トランスフェクトすることができる。発現を明らかにするために、上記の通り、標識化を行ってもよい。発現した、ｐｏｌｙ－Ｈｉｓタグ付きの目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分を含む培地を、次いで、濃縮し、任意の選択した方法、例えば、Ni^{2+}－キレートアフィニティークロマトグラフィーによって精製することができる。

【０９３２】

一態様において、目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分を、ＩｇＧ構築体（イムノアドヘシン）として発現させ、そこでは、各タンパク質の可溶形態のコード配列（例えば、細胞外ドメイン）は、ヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ２ドメイン、及び／又はポリ－Ｈｉｓタグ付きの形態を含むＩｇＧ１定常領域配列に融合される。

【０９３３】

ＰＣＲ増幅後、各ＤＮＡは、Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｕｎｉｔ ３．１６、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ（１９９７）に記載されている標準的技法を使用して、ＣＨＯ発現ベクターにサブクローニングされる。ＣＨＯ発現ベクターは、ｃＤＮＡの好都合なシャトリングを可能にするように、適合する制限部位を目的ＤＮＡの５’側及び３’側にもつように構築される。ＣＨＯ細胞における発現に使用されるベクターは、Ｌｕｃａｓら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２４：９（１７７４～１７７９（１９９６）に記載されたものであり、目的ｃＤＮＡ及びジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）の発現を駆動するためにＳＶ４０初期プロモーター／エンハンサーを使用する。ＤＨＦＲ発現により、トランスフェクション後に安定に維持されたプラスミドを選択することができる。

酵母における、一連の連続アミノ酸又はポリペプチドの発現

以下の方法は、酵母における、所望の目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分の組み換え発現を述べる。

【０９３４】

まず、酵母発現ベクターは、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーターからの一連の連続アミノ酸の細胞内生成又は分泌のために構築される。所望の目的アミノ酸配列又はポリペプチド成分、選択したシグナルペプチド、及びプロモーターをコードするＤＮＡは、選択したプラスミド内の適切な制限酵素部位へ挿入され、目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分の細胞内の発現を指令する。分泌のためには、一連の連続アミノ酸をコードするＤＮＡを、ＡＤＨ２／ＧＡＰＤＨプロモーター、酵母α－因子分泌シグナル／リーダー配列、及びリンカー配列（必要であれば）をコードするＤＮＡと共に、一連の連続アミノ酸を発現させるために、選択したプラスミドにクローニングすることができる。

【０９３５】

次いで、酵母細胞、例えば、酵母株ＡＢ１１０を、上記の発現プラスミドで形質転換し、選択した発酵培地中で培養することができる。形質転換酵母の上清を１０％トリクロロ酢酸で沈殿させ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離し、その後、ゲルをクーマシーブルーで染色することにより分析することができる。

【０９３６】

目的の組み換えアミノ酸配列又はポリペプチド成分は、次いで、酵母細胞を発酵培地から遠心分離により除去し、選択したカートリッジフィルターを使用して、培地を濃縮することにより、単離及び精製することができる。目的のアミノ酸配列又はポリペプチド成分を含有する濃縮物は、選択したカラムクロマトグラフィー樹脂を使用してさらに精製されてもよい。

バキュロウイルスに感染した昆虫細胞における、一連の連続アミノ酸又はポリペプチドの発現

以下の方法は、バキュロウイルスに感染した昆虫細胞における、一連の連続アミノ酸の組み換え発現を述べる。

【０９３７】

一連の連続アミノ酸をコードする所望の核酸を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させる。そのようなエピトープタグには、ポリ－ｈｉｓタグ及び免疫グロブリンタグ（例えば、ＩｇＧのＦｃ領域）が含まれる。様々なプラスミドが用いられてもよく、これには市販のプラスミド、例えば、ｐＶＬ１３９３（Ｎｏｖａｇｅｎ）から得られたものが含まれる。簡潔には、目的のアミノ酸配列若しくはポリペプチド成分、又は目的のアミノ酸配列若しくはポリペプチド成分の所望の部分（例えば、膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列）を、５’及び３’領域に相補的なプライマーを用いるＰＣＲにより増幅させる。５’プライマーは、フランキングする（選択した）制限酵素部位を含むことができる。次いで、選択した制限酵素で生成物を消化させ、発現ベクターにサブクローニングする。

【０９３８】

組み換えバキュロウイルスは、リポフェクチン（ＧＩＢＣＯ－ＢＲＬから市販）を使用して、前述のプラスミド及びＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ（商標）ウイルスＤＮＡ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）をツマジロクサヨトウ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）（「Ｓｆ９」）細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １７１１）に、共トランスフェクトすることによって作製することができる。２８℃で４～５日間インキュベートした後、放出されたウイルスを採取して、さらなる増幅に用いる。ウイルス感染及びタンパク質発現は、Ｏ’Ｒｅｉｌｌｅｙら、Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｏｘｆｏｒｄ：Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９４）の記載の通りに実施される。

【０９３９】

次いで、発現したポリ－ｈｉｓタグ付きの目的のアミノ酸配列若しくはポリペプチド成分を、以下の通り、例えば、Ni^{2+}－キレートアフィニティークロマトグラフィーにより

精製することができる。抽出物を、組み換えウイルス感染させたＳｆ９細胞から、Ｒｕｐｅｒｔら、Ｎａｔｕｒｅ、３６２：１７５～１７９（１９９３）に従って調製する。簡潔には、Ｓｆ９細胞を、超音波処理バッファー（２５ｍＬ　Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７．９；１２．５ｍＭ　$MgCl_2$；０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ；１０％グリセロール；０．１％　ＮＰ４０；０．４Ｍ　ＫＣｌ）で洗浄して、再懸濁し、氷上で２０秒間、２回超音波処理する。超音波処理物を遠心分離で透明にし、上清を装填用バッファー（５０ｍＭリン酸塩，３００ｍＭ　ＮａＣｌ，１０％グリセロール，ｐＨ７．８）で５０倍希釈し、０．４５μｍフィルターで濾過する。Ni^{2+}－ＮＴＡアガロースカラム（Ｑｉａｇｅｎから市販されている）をベッド容量５ｍＬで調製し、２５ｍＬの水で洗浄し、２５ｍＬの装填用バッファーで平衡化する。濾過した細胞抽出物を、カラムに０．５ｍＬ／分で装填する。カラムをベースラインA_{280}まで装填用バッファーで洗浄し、この時点で画分採集を開始する。次に、カラムを二次洗浄用バッファー（５０ｍＭリン酸塩；３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％グリセロール、ｐＨ６．０）で洗浄し、非特異的結合タンパク質が溶離する。再度、A_{280}ベースラインに達した後、カラムを二次洗浄用バッファー中の０～５００ｍＭイミダゾール勾配で展開する。１ｍＬ画分を採集し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び銀染色、又はアルカリホスファターゼにコンジュゲートしたNi^{2+}－ＮＴＡ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いるウエスタンブロットによって分析する。溶離したHis_{10}－タグ付き配列を含む画分をプールし、装填用バッファーに対して透析する。

【０９４０】

或いは、ＩｇＧタグ付き（又はＦｃタグ付き）アミノ酸配列の精製は、例えば、プロテインＡ又はプロテインＧカラムクロマトグラフィーを含めた、既知のクロマトグラフィー法によって行うことができる。

【０９４１】

タンパク質のＦｃ含有構築体は、以下の通り、馴化培地から精製することができる。馴化培地を、２０ｍＭリン酸ナトリウムバッファー、ｐＨ６．８中で平衡化した５ｍｌのプロテインＡカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）に送入する。装填後、カラムを平衡用バッファーで十分に洗浄してから、１００ｍＭクエン酸、ｐＨ３．５で溶離する。２７５ｍＬの１Ｍトリスバッファー（ｐＨ９）を入れた試験管中に１ｍｌ画分を採集することにより、溶離したタンパク質を直ちに中和する。次いで、この高度に精製されたタンパク質を、脱塩して、ポリ－Ｈｉｓタグ付きタンパク質について上記の保存用バッファーに入れる。タンパク質の均質性を、ＳＤＳポリアクリルアミドゲル（ＰＥＧ）電気泳動、及びエドマン分解によるＮ末端アミノ酸配列決定によって確かめる。

【０９４２】

医薬組成物の例

かかる組成物及び投与量の限定しない例は、以下に記載される通りである。

【０９４３】

エタネルセプト（たとえば、エンブレル）の配列を有する連続アミノ酸を含む、連続アミノ酸のひと続きを含む化合物を含む組成物は、マンニトール、スクロース、及びトロメタミンを含んでいてもよい。一態様では、組成物は、凍結乾燥物の形態である。一態様では、組成物は、たとえば、（０．９％ベンジルアルコールを含有する）米国薬局方の注射用静菌性滅菌水（ＢＷＦＩ:Bacteriostatic Water for Injection）で再構成される。一態様では、化合物は、徴候及び症状を軽減し、主な臨床応答を誘導し、構造上の損傷の進行を抑制し、中等度から重度な活性のある関節リウマチを伴う対象において身体機能を改善するために対象に投与される。化合物は、メトトレキサート（ＭＴＸ）と併用して開始しても単独で使用してもよい。一態様では、化合物は、１種以上のＤＭＡＲＤに不適切な応答を有している対象において、中等度から重度な活性のある多関節性若年性関節リウマチ（polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis）の徴候及び症状を軽減するために対象に投与される。一態様では、化合物は、徴候及び症状を軽減し、活性のある関節炎の構造上の損傷の進行を抑制し、乾癬性関節炎を伴う対象において身体機能を改善するために対象に投与される。一態様では、化合物は、活性のある強直性脊椎炎を伴う対象

において徴候及び症状を軽減するために対象に投与される。一態様では、化合物は、慢性の中等度から重度の尋常性乾癬の治療のために対象に投与される。一態様では、対象が関節リウマチ、乾癬性関節炎、又は強直性脊椎炎を有する場合、化合物は、１回以上の皮下（ＳＣ）注射として使用される１週間当たり２５～７５ｍｇで投与される。さらなる態様では、化合物は、単回ＳＣ注射の形で１週間当たり５０ｍｇで投与される。一態様では、対象が尋常性乾癬を有する場合、化合物は、３カ月の間隔を開けて１週間又は４日に２回２５～７５ｍｇで投与され、その後、１週間当たり２５～７５ｍｇの維持量に減らす。さらなる態様では、化合物は、３カ月の間隔を開けて１週間又は４日に２回５０ｍｇの用量で投与され、その後、１週間当たり５０ｍｇの維持量に減らす。一態様では、用量は、ここで記載する用量より少ない２×乃至１００×である。一態様では、対象が、活性のある多関節性ＪＲＡを有する場合、化合物は、１週間当たり０．２～１．２ｍｇ／ｋｇ（１週間当たり最大７５ｍｇまで）の用量で投与してもよい。さらなる態様では、化合物は、１週間当たり０．８ｍｇ／ｋｇ（１週間当たり最大５０ｍｇまで）の用量で投与される。いくつかの態様では、用量は、上述された用量より少ない２×乃至１００×である。

【０９４４】

インフリキシマブ（たとえば、レミケード）の配列を有する連続アミノ酸を含む、連続アミノ酸のひと続きを含む化合物を含む組成物は、スクロース、ポリソルベート８０、リン酸二水素ナトリウム（monobasic sodium phosphate）一水和物、及びリン酸水素ナトリウム（dibasic sodium phosphate）二水和物を含んでいてもよい。保存剤は、一態様において存在しない。一態様では、組成物は、凍結乾燥物の形態である。一態様では、組成物は、たとえば、米国薬局方の注射用の水（ＢＷＦＩ）で再構成される。一態様では、組成物のｐＨは、７．２である又は約７．２である。一態様では、化合物は、静脈注入として使用される２～４ｍｇ／ｋｇの用量で、続いて、第１の注入の２及び６週間後、次いで、その後８週間毎に、さらに類似の用量で関節リウマチを伴う対象に投与される。さらなる態様では、化合物は、静脈注入として使用される３ｍｇ／ｋｇの用量で、続いて、第１の注入の２及び６週間後、次いで、その後８週間毎に、さらに類似の用量で投与される。一態様では、用量は、１０ｍｇ／ｋｇまで調整される又は４週間毎に治療される。一態様では、化合物は、メトトレキサートと併用して投与される。一態様では、化合物は、中等度から重度な活性のあるクローン病又はフィステル形成する疾患を治療するために、０、２及び６週間の誘導レジメンとして使用される２～７ｍｇ／ｋｇの用量で、その後、８週間毎の４～６ｍｇ／ｋｇの維持レジメンで、クローン病又はフィステル形成するクローン病を伴う対象に投与される。さらなる態様では、化合物は、中等度から重度な活性のあるクローン病又はフィステル形成する疾患を治療するために、０、２及び６週間の誘導レジメンとして使用される５ｍｇ／ｋｇの用量で、その後、８週間毎に５ｍｇ／ｋｇの維持レジメンで投与される。一態様では、用量は、１０ｍｇ／ｋｇまで調整される。一態様では、化合物は、静脈注入として使用される２～７ｍｇ／ｋｇの用量で、続いて、第１の注入の２及び６週間後、次いで、その後６週間毎に、さらに類似の用量で強直性脊椎炎を伴う対象に投与される。さらなる態様では、化合物は、静脈注入として使用される５ｍｇ／ｋｇの用量で、続いて、第１の注入の２及び６週間後、次いで、その後６週間毎に、さらに類似の用量で投与される。一態様では、化合物は、静脈注入として使用される２～７ｍｇ／ｋｇの用量で、続いて、第１の注入の２及び６週間後、次いで、その後８週間毎に、さらに類似の用量で乾癬性関節炎を伴う対象に投与される。さらなる態様では、化合物は、静脈注入として使用される５ｍｇ／ｋｇの用量で、続いて、第１の注入の２及び６週間後、次いで、その後８週間毎に、さらに類似の用量で投与される。一態様では、化合物は、メトトレキサートと共に投与される。一態様では、化合物は、中等度から重度な活性のある潰瘍性大腸炎を治療するために、０、２及び６週間で誘導レジメンとして使用される２～７ｍｇ／ｋｇの用量で、その後、８週間毎に２～７ｍｇ／ｋｇの維持レジメンで、潰瘍性大腸炎を伴う対象に投与される。さらなる態様では、化合物は、０、２及び６週間の誘導レジメンとして使用される５ｍｇ／ｋｇの用量で、その後８週間毎の５ｍｇ／ｋｇの維持レジメンで潰瘍性大腸炎を伴う対象に投与される。いくつかの態様では、個々の疾患を治療

するために、用量は、上述される用量より少ない２×乃至１００×である。
【０９４５】
ここで記載される組成物の態様のそれぞれにおいて、組成物は、凍結乾燥物の形態である場合、たとえば、無菌の水溶液、滅菌水、注射用滅菌水（米国薬局方）、注射用静菌性滅菌水（米国薬局方）、及び当業者に公知のその相当物で再構成していてもよい。
【０９４６】
本発明の化合物（instant compounds）のいずれかの投与において、化合物は、単離の形で、担体の形で、医薬組成物の一部として、又は任意の適切なビヒクルで投与してもよいことが理解される。
投与量
投与量範囲が、たとえば、１週間当たり１～１０ｍｇ／ｋｇとここで記載される場合、ここで開示される本発明はまた、上限及び下限の間でそれぞれ整数値、及びその１０分の１の数値の用量も考慮することが理解される。したがって、所与の例の場合では、本発明は、１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４ｍｇ／ｋｇなどから１０ｍｇ／ｋｇまでを考慮する。
【０９４７】
態様では、本発明の化合物は、単回投与として投与することもできる、又は多回投与として投与してもよい。
【０９４８】
一般に、前述の方法により障害又は状態を治療するための１日投与量は、一般に、治療しようとする対象の体重１ｋｇ当たり約０．０１から約１０．０ｍｇまでの範囲である。
【０９４９】
当分野の医師が、たとえば、治療される者の体重、年齢及び状態、病気の重症度、並びに選ばれた特定の投与経路の公知の検討材料を勘案することにより、前述の投与量範囲に基づいた変形がなされていてもよい。
【０９５０】
開示された化合物は、必要とされる有効な投与量に対して、付随的結果と結びついて協同的に作用することも予想される。
医薬品
用語「薬学的に許容される担体」には、賦形剤、担体又は希釈剤が含まれることが理解される。用いられる特定の担体、希釈剤又は賦形剤は、有効成分が適用される手段及び目的に依存する。
【０９５１】
非経口投与の場合、無菌の水溶液中で本発明の化合物又は薬学的に許容されるその塩を含有する溶液を、用いてもよい。かかる水溶液は、必要なら適当に緩衝させ、液体希釈剤は、十分な食塩水又はグルコースで最初に等張させるべきである。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内投与に特に適している。用いられる無菌の水性媒体は、当業者に公知の標準的な技法によりすべて容易に利用できる。
【０９５２】
本発明の組成物は、様々な形態となっていてもよい。これらには、たとえば、液体、半固体及び固体剤形、たとえば、溶液（たとえば、注射用及び注入用溶液）、分散液又は懸濁液が含まれる。好ましい形態は、投与及び治療への適用の所期の様態に依存する。いくつかの組成物は、注射用又は注入用溶液の形態である。投与の様態は、非経口（たとえば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。一態様では、化合物は、静脈注入又は注射により投与される。別の態様では、化合物は、筋肉内又は皮下注射によって投与される。
【０９５３】
治療的使用の場合、ここに開示される組成物は、ボーラス投与、連続的な注入、植込錠からの徐放、経口摂取、局所注射（たとえば、心臓内（intracrdiac）、筋肉内）、全身注射、又は医薬分野において周知の他の適当な技法による可溶性の形態を含む、様々な様式で投与することができる。医薬投与の他の方法は、それだけには限らないが、経口、皮

下、経皮、静脈内、筋肉内及び非経口投与方法が含まれる。通常、可溶性組成物は、生理的に許容される担体、賦形剤又は希釈剤と併せた、精製された化合物を含む。かかる担体は、用いられる投与量及び濃度でレシピエントに対して無毒性である。かかる組成物の調製は、緩衝液、酸化防止剤、グルコース、スクロース又はデキストリンを含む炭水化物、キレート化剤、たとえばＥＤＴＡ、グルタチオン及び他の安定剤並びに賦形剤と化合物を合わせることを伴うことができる。中性の緩衝食塩水又は同種の血清アルブミンと混合した食塩水は、模範的な適切な希釈剤である。生成物は、希釈剤としての適切な賦形剤溶液（たとえば、スクロース）を用いた凍結乾燥物として配合することができる。

【０９５４】

他の誘導体は、非タンパク質性のポリマーに共有結合した本発明の化合物／組成物を含む。ポリマーへの結合は、化合物の好ましい生物学的活性、たとえば、標的への化合物の結合活性と干渉しないように一般に行われる。非タンパク質性のポリマーは、通常、親水性の合成ポリマー、すなわち、天然で見出されていないポリマーである。しかしながら、天然に存在し、組換えにより又はインビトロ方法により生成されるポリマーは、天然から単離されるポリマーであるため有用である。親水性のポリビニルポリマーは、本発明の範囲内に収まる、たとえば、ポリビニルアルコール及びポリビニルピロリドンである。特に有用なのは、ポリアルキレンエーテル、たとえば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチレンエステル又はメトキシポリエチレングリコール；ポリオキシアルキレン、たとえば、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン、及びポリオキシエチレン及びポリオキシプロピレンのブロックコポリマー（Ｐｌｕｒｏｎｉｃｓ）；ポリメタクリレート；カルボマー；糖モノマーを含む分枝若しくは分枝していない多糖類、Ｄ－マンノース、Ｄ－及びＬ－ガラクトース、フコース、フルクトース、Ｄ－キシロース、Ｌ－アラビノース、Ｄ－グルクロン酸、シアル酸、Ｄ－ガラクツロン酸（galacturontc acid）、Ｄ－マンヌロン酸（たとえば、ポリマンヌロン酸、又はアルギン酸）、Ｄ－グルコサミン、Ｄ－ガラクトサミン、Ｄ－グルコース並びにホモ多糖及びヘテロ多糖類を含むノイラミン酸、たとえば、ラクトース、アミロペクチン、デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、アミロース、デキストラン硫酸、デキストラン、デキストリン、グリコーゲン、又は酸性ムコ多糖類の多糖サブユニット、たとえば、ヒアルロン酸；糖アルコールのポリマー、たとえば、ポリソルビトール及びポリマンニトール；並びにヘパリン又はヘパロンである。

【０９５５】

本発明の医薬組成物は、本発明の化合物の「治療上有効な量」又は「予防上有効な量」が含まれていてよい。「治療上有効な量」は、所望の治療結果を達成するために必要な投与量及び期間の有効な量を意味する。化合物の治療上有効な量は、因子、たとえば、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重により変わっていてもよい。治療上有効な量はまた、化合物の任意の毒性若しくは有害な効果が治療上有益な効果によって上回るものである。「予防上有効な量」は、所望の予防上の結果を達成するために必要な投与量及び期間の有効な量を意味する。通常、予防量が、疾患の早期の段階の前又は疾患の早期の段階の時に対象において用いられるため、予防上有効な量は、治療上有効な量よりも少ない。

【０９５６】

ここで開示された様々な要素のすべての組合せは、本発明の範囲内である。

【０９５７】

本発明は、次の実験の詳細と関連してより良く理解されるが、当業者は、詳細な特定の実験が、その後に続く特許請求の範囲でさらに十分に記載される通り、本発明の例示的なものに過ぎないということが容易にわかる。

【０９５８】

［実施例］

実験の詳細

例１

ＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６

ＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６を、アジド修飾Ｆｃ６とのアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ（ＴＮＦ受容体１Ｂ）の反応によって、次の通り調製した。ＴＮＲ１Ｂ－アジド－アルキン－Ｆｃ６を、アルキン修飾Ｆｃ６とのアジド修飾ＴＮＲ１Ｂの反応による同じ原理を用いて調製する。

【０９５９】

アルキン修飾ＴＮＦＲ１Ｂ（ＴＮＲ１Ｂ－Ａｌｋ）を、システイン－プロパルギルアミド、$HSCH_2CH[NH_2]CONHCH_2C{\equiv}CH_3$（図１）によるＴＮＲ１Ｂ－インテイン（ＴＮＲ１Ｂ－Ｍｔｈ融合タンパク質）の切断により調製し、アジド修飾ＴＮＲ１Ｂ（ＴＮＲ１Ｂ－Ａｚ）を、システイン－３－アジドプロピルアミド、$HSCH_2CH[NH_2]CONH(CH_2)_3NH_2$によるＴＮＲ１Ｂ－インテインの切断により調製した。

【０９６０】

ＴＮＲ１Ｂ－インテイン及びＦｃ６は、２００８年１０月１６日公開の米国特許出願第１１／９８２０８５号に記載されており、その全体を参照によりここに組み込む。

【０９６１】

ＴＮＲ１Ｂ－インテイン融合タンパク質を、ベクターｐＣＤＮＡ３－ＴＮＲ１Ｂ－Ｍｔｈを用いて生成し、その配列を配列番号１００に示す。自動切断部位でＭｔｈ　ＲＩＲ１自己スプライシングインテインのＮ－末端へのペプチド結合により、そのＣ－末端で接合されたＴＮＲ１Ｂ細胞外ドメインを含有し、最初に発現されるプレ－ＴＮＲ１Ｂ－インテインキメラポリペプチドを、配列番号１０１に示す。細胞シグナルペプチダーゼによる相同ＴＮＲシグナル配列の切断は、細胞培養液に分泌される成熟したＴＮＲ１Ｂ－インテイン融合タンパク質を形成し、その配列を、配列番号１０２に示す。

【０９６２】

Ｆｃ６タンパク質をベクターｐＣＤＮＡ３－ＳＨＨ－ＩｇＧ１－Ｆｃ１１を用いて発現させ、その配列を配列番号１０３に示す。最初に発現されるプレ－Ｆｃ６ポリペプチドを、配列番号１０４に示す。細胞シグナルペプチダーゼによる非相同のソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）シグナル配列の切断は、細胞培養液に分泌される成熟したＦｃ６タンパク質を形成し、その配列を配列番号１０５に示す。

【０９６３】

タンパク質産生を、無血清の懸濁培養液に適合されたＣＨＯ－ＤＧ４４細胞中の過渡的な発現により実行した。過渡的なトランスフェクションを、Ｒａｊｅｎｄｒａら、Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１５３、２２～２６（２０１１）によって記載される、高密度条件下でＤＮＡと複合させるトランスフェクション剤としてポリエチレンイミンを用いて行った。シードトレイン（Seed train）培養物を、ＴＰＰ（Ｔｒａｓａｄｉｎｇｅｎ、ＣＨ）から得たＴｕｂｅＳｐｉｎ（登録商標）バイオリアクター５０管中で維持し、体積のスケールを上げて、トランスフェクションのための十分なバイオマスを生成した。トランスフェクションを０．５～１．０Ｌの培養物で実施した。このスケールでの培養物を、通風キャップ付きの２Ｌ又は５ＬのＳｃｈｏｔｔビン中で維持した。このビンを加湿しCO_2を５％で制御しながら、Ｋｕｅｈｎｅｒインキュベーター振とう器中で１８０ｒｐｍで振り混ぜた。細胞培養液を１０日後に回収し、精製前に遠心し無菌ろ過した。

【０９６４】

システイン－プロパルギルアミド及びシステイン－３－アジドプロピルアミドを次の通り調製した。Ｂｏｃ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ、$(C_6H_5)_3CSCH_2CH[NHCO_2C(CH_3)_3]CO_2H$；プロパルギルアミン、$HC{\equiv}CCH_2NH$；３－アジドプロピルアミン、$NH_2CH_2CH_2CH_2N_3$；ＥＤＣ、Ｎ－（３－ジメチルアミノプロピル）－Ｎ’－エチルカルボジイミド塩酸塩；及びＨＯＢｔ、１－ヒドロキシベンゾトリアゾールを、ＡｎａＳｐｅｃ（Ｆｒｅｅｍｏｎｔ、ＣＡ）又はＣＰＣ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＣＡ）から得た。他のすべての化学薬品を、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）から得た。システイン－プロパルギルアミドの合成の場合、Ｂｏｃ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－ＯＨ（１００ｍＭ）及びプロパルギルアミン（１００ｍＭ）のＣＨ２Ｃｌ２溶液を、ＥＤＣ、ＨＯＢｔ、及びトリエチルアミン中でそれぞれ１００ｍＭ作製

した。シスチル－３－アジドプロピルアミドの合成の場合、３－アジドプロピルアミン（１００ｍＭ）をプロパルギルアミンについて置換した。両方の反応を以下の手順により処理した。室温で終夜撹拌してから、反応を水中の過量の飽和ＮａＨＣＯ３で停止させ、ＣＨ２Ｃｌ２で抽出し、ＭｇＳＯ４で脱水し、ろ過し、蒸発させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。Ｂｏｃ／Ｔｒｔ保護基を除去するために、中間体生成物を、ＴＦＡ／トリイソプロピルシラン／Ｈ２Ｏ（９０：５：５）に０.０５Ｍの濃度で溶解し、室温で３０分間撹拌した。次いで、反応を蒸発により乾燥し、ＣＨ２Ｃｌ２で抽出した。次いで、有機層を、水で抽出し、帯黄色の油として最終のシスチル－プロパルギルアミド生成物を生成し、帯黄色の固体として最終のシスチル－３－アジドプロピルアミド生成物を生成した。

【０９６５】

アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ（図１）又はアジド修飾ＴＮＲ１Ｂを調製するために、細胞培養液中のＴＮＲ１Ｂ－インテインタンパク質を、緩衝液Ａ（２０ｍＭトリス－ＨＣｌ、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７.５）で予め平衡化した、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ（Ｂｅｖｅｒｌｅｙ、ＭＡ）から得たキチンビーズで充てんしたカラムに適用した。緩衝液Ａを含むカラムから、非結合性タンパク質を洗浄した。切断を、５０ｍＭシスチル－プロパルギルアミド（アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂの場合）又は５０ｍＭシスチル－３－アジドプロピルアミド（アジド修飾ＴＮＲ１Ｂの場合）のいずれかを含有する緩衝液Ｂ（２０ｍＭトリス－ＨＣｌ、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ８.０）中でキチン樹脂を速やかに平衡化することにより開始し、インキュベーションを、室温で２４～９６時間実施した。切断されたアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ（配列番号１０６）又はアジド修飾ＴＮＲ１Ｂタンパク質（配列番号１０７）を緩衝液Ａを含むカラムから溶出し、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）製のＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａｃｅｌ－３　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｕｎｉｔを用いて濃縮し、ＵＣＳＦ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｆａｃｉｌｉｔｙ（Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）から得たＣａ又はＭｇ塩（ＰＢＳ）を含まないダルベッコのリン酸緩衝食塩水に対して透析し、使用前に４℃で保存した。

【０９６６】

図２は、シスチル－プロパルギルアミドの代わりに５０ｍＭシステインを用いて調製したシステイン修飾ＴＮＲ１Ｂ（配列番号１０８）と比較した、アルキン修飾ＴＮＲ１ＢのＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）分析を示す。ＳＤＳ－ＰＡＧＥを、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）から得たＮｕＰＡＧＥ（登録商標）Ｎｏｖｅｘ　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ　Ｍｉｄｉ　Ｇｅｌ（１０％）を用いて実施した。タンパク質を、Ｂｉｏ－Ｒａｄ（Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）から得たＳｉｌｖｅｒ　Ｓｔａｉｎ　Ｐｌｕｓ又はＢｉｏ－Ｓａｆｅ　Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ　Ｓｔａｉｎを用いて可視化した。アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ（レーン３）及びシステイン修飾ＴＮＲ１Ｂ（レーン１）は、同じＭｒ約４３，０００であった。さらに、アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂは、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）から得たヒトｓＴＮＦＲＩＩ／ＴＮＦＲＳＦ１Ｂ　Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡを用いて測定された通り、システイン修飾ＴＮＲ１Ｂに対する同程度の生物学的活性を有した。５０ｍＭ　ＭＥＳＮＡの存在下で作製したシステイン修飾ＴＮＲ１Ｂ（レーン２）、アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ（レーン４）、又はチオエステル修飾ＴＮＲ１Ｂ（配列番号１０９）（レーン５）の調製は、類似のＭｒであったが、ＭＥＳＮＡの非存在下で作製された調製について観察された生物学的活性は５％未満であった。したがって、ＭＥＳＮＡの非存在下で調製したアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂをさらに研究において用いた。

【０９６７】

アジド修飾Ｆｃ６（Ａｚ－Ｆｃ６）を、様々なアジド含有ペプチドチオエステル（図３）及びアジド含有ＰＥＧチオエステル（図４）とのＦｃ６タンパク質の反応により調製した。アルキン修飾Ｆｃ６（Ａｌｋ－Ｆｃ６）を、アルキン含有チオエステルのＦｃ６タンパク質との反応により調製した。

【０９６８】
組換えＦｃ６タンパク質を、ＴＮＲ１Ｂ－インテインについて記載された通り（上記を参照のこと）、チャイニーズハムスターの卵巣（ＣＨＯ）細胞中で発現させ、プロテインＡ親和性クロマトグラフィーによって精製した。培養上清を、ＰＢＳで予め平衡化したＰｈａｒｍａｃｉａ（Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）製のｒＰｒｏｔｅｉｎ Ａ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗで充てんしたカラムに適用した。カラムをＰＢＳで広範に洗浄し、次いで、Ｆｃ６タンパク質をｐＨ２．７の０．１Ｍグリシン緩衝液で溶出した。ｐＨ９．０の（最終ｐＨ７．５にする）１．０Ｍトリス－ＨＣｌ０．０５体積／体積を含有する管に、画分を回収し、プールし、ＰＢＳに対して透析し、使用前に４℃で保存した。

【０９６９】
表１は、代表的なアジド含有及びアルキン含有ペプチド／ＰＥＧチオエステルを示す。チオエステルを、Ｆｍｏｃ－Ｔｈｒ（ｔＢｕ）－ＯＨで前負荷した塩化２－クロロトリチル樹脂におけるＦｍｏｃ／ｔ－ブチル固相ストラテジーにより合成した。アミノ酸誘導体をＣＰＣ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ、ＣＡ）から得、Ｆｍｏｃ－ＰＥＧ$_n$－ＯＨ誘導体をＱｕａｎｔａ ＢｉｏＤｅｓｉｇｎ（Ｐｏｗｅｌｌ、ＯＨ）から得、２－（１Ｈ－ベンゾトリアゾール－１－イル）－１，１，３，３－テトラメチルアミニウム（tetramethylaminium）ヘキサフルオロホスフェート（ＨＢＴＵ）、ジクロロメタン（ＤＣＭ）、トリクロロ酢酸（ＴＦＡ）、Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）、Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥＡ）及びトリイソプロピルシラン（ＴＩＳ）を、Ｓｉｇｍａ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）から得た。標準的なＨＢＴＵ活性化をペプチド伸長について用いた。ＰＥＧを含有するペプチドは、Ｆｍｏｃ－ＰＥＧ$_n$－ＯＨの挿入を必要とした。ペプチド伸長における最終工程として、末端のα－Ｆｍｏｃ（９－フルオレニルメトキシカルボニル）保護基をＢｏｃ（ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル）に変換した。ペプチド樹脂をＤＣＭで洗浄し、１％ＴＦＡ／ＤＣＭで切断して、Ｃ－末端上で遊離カルボン酸を有する完全に保護されたペプチドを生成した。終夜ＤＣＭ中で未精製の保護されたペプチドをＤＩＣ／ＨＯＢｔ／ＤＩＥＡ及びベンジルメルカプタン又はチオフェノールで処置することによりペプチドのチオエステルを形成した。濃縮後、未精製の保護されたペプチドチオエステルを、冷エーテルによる複合の倍散により沈殿させ、その後遠心した。室温で２時間ＴＦＡ／ＴＩＳ／H_2O９５：２．５：２．５による未精製の保護された生成物の処置により脱保護を実施した。氷冷エーテルで沈澱後、脱保護したペプチドチオエステルを、H_2O－アセトニトリル（０．１％ＴＦＡ）系において分取ＲＰ－ＨＰＬＣにより精製して、純度９１～９５％及び所望のＭＳで最終生成物を得た。

【０９７０】
アジド修飾Ｆｃ６及びアルキン修飾Ｆｃ６を、未変性の化学連結により次の通り調製した。２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸（ＭＥＳ）をＡｃｒｏｓ（Ｍｏｒｒｉｓ Ｐｌａｉｎｓ、ＮＪ）から得、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）をＰｉｅｒｃｅ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）から得、４－メルカプトフェニル酢酸（ＭＰＡＡ）をＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）から得た。表１に示した様々なチオエステルを、Ｆｃ６プロテインと連結することにより反応を次の通り実施した。反応（１００ｕＬ）は、５０ｍＭ ＭＥＳ緩衝液ｐＨ６．５、０．８ｍＭ ＴＣＥＰ、１０ｍＭ ＭＰＡＡ、ペプチドチオエステル４ｍｇ／ｍｌ、及びＦｃ６タンパク質０．５ｍｇ／ｍｌを含有した。室温で終夜インキュベーションした後、反応をｐＨ９．０の１．０Ｍトリス－ＨＣｌ０．０５体積／体積を用いてｐＨ７．０に調整し、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ製のプロテインＡ磁気ビーズを用いて精製し、ｐＨ８．０の０．１Ｍリン酸で透析し、濃縮した。

【０９７１】
図５は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示し、Ｆｃ６タンパク質（レーン１）がアジド－ＤＫＴＨＴ－チオエステルと定量的に反応してＡｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６タンパク質（レーン２）を得、アジド－ＰＥＧ$_4$－ＤＫＴＨＴ－チオエステルと定量的に反応してＡｚ－ＰＥ

G_4－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６タンパク質（レーン３）を得ることを実証している。Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６タンパク質の配列は、配列番号１１０で示され、Ａｚ－PEG_4－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６の配列は、配列番号１１１で示される。PEG_4オリゴマーによって、５アミノ酸ＤＫＴＨＴ・配列と同程度にサイズが漸進的に増加した。これにより、単一のオキシエチレンモノマー単位が、単一のアミノ酸残基に類似の長さの輪郭を描くのに寄与し、同様の十分に伸長された立体配座約３．５～４Åを有するものと一致していることが示されている（Ｆｌｏｒｙ（１９６９）Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ｍｅｃｈａｎｉｃｓ ｏｆ Ｃｈａｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ（Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）。

【０９７２】

ＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６を、Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６タンパク質（図６）及びＡｚ－PEG_4－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６タンパク質（図７）とのアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂの反応によって調製した。（無水の）リン酸水素ナトリウム、及びリン酸二水素ナトリウム（一水和物）を、Ａｃｒｏｓから得、ＴＣＥＰは、Ｐｉｅｒｃｅ製であり、$CuSO_4$（五水和物）は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ製であり、ＡｎａＳｐｅｃ（Ｆｒｅｅｍｏｎｔ、ＣＡ）製のトリス［１－ベンジル－１Ｈ－１，２，３－トリアゾル－４－イル）メチル］アミン（ＴＢＴＡ）であった。反応（６０ｕＬ）は、ｐＨ８．０の０．１Ｍリン酸ナトリウム、１．０ｍＭ $CuSO_4$、２．０ｍＭ ＴＢＴＡ、アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ（３０ｕｇ）、並びに未修飾Ｆｃ６タンパク質、Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６タンパク質、又はＡｚ－PEG_4－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６タンパク質（１０ｕｇ）のいずれかを含有した。反応を、２．０ｍＭ ＴＣＥＰを添加することにより開始し、室温で終夜インキュベートした。反応生成物を、プロテインＡ磁気ビーズを用いて精製して、任意の未反応のアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂを除去した。

【０９７３】

図８は、還元条件下でのＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６生成物のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。$CuSO_4$、ＴＢＴＡ及びＴＣＥＰの非存在下では、Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６（レーン２）とＡｚ－PEG_4－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６（レーン５）の両方は、入力アジド修飾Ｆｃ６タンパク質に対応するＭｒ約２８～３０，０００ダルトン（矢印ｄ）の単一のバンドを得、いずれの生成物をも形成する徴候がない。さらに、プロテインＡ精製後に、入力アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ（レーン１に示される）のキャリーオーバーの証拠はなかった。しかしながら、$CuSO_4$、ＴＢＴＡ及びＴＣＥＰの存在下において、アルキン修飾ＴＮＲ１ＢとＡｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６（レーン３）との間の反応並びにアルキン修飾ＴＮＲ１ＢとＡｚ－PEG_4－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６（レーン６）との間の反応の両方によって、Ｍｒ約７５，０００ダルトン（矢印ａ）及び約６５，０００ダルトン（矢印ｂ）の２つの新規の生成物を生成した。塩を除去するためのｐＨ８．０の０．１Ｍリン酸中での緩衝液－交換後、アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂの調製を用いて実施した反応は、Ｍｒ約６５，０００ダルトンの生成物に対してＭｒ約７５，０００ダルトンの生成物の収率で有意な増加があったが、Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６（レーン４）とＡｚ－PEG_4－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６（レーン６）の両方との本質的に類似の反応生成物を得た。

【０９７４】

図９は、ＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６反応生成物（左のパネル）及びＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－PEG_4－Ｆｃ６反応生成物（右のパネル）をＴＮＲ１Ｂ－Ｆｃ融合タンパク質（エタネルセプト）と比較するＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。予測される配列が配列番号１１２に示される、Ｍｒ約７５，０００ダルトン（レーン２）のＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６生成物、及び予測される配列が配列番号１１３に示される、Ｍｒ約７５，０００ダルトン（レーン４）のＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－PEG_4－Ｆｃ６生成物は、サイズにおいてエタネルセプト（レーン１、３）と本質的に区別不能であり、その配列は、配列番号１１４に示される。

【０９７５】

図１０は、反応性のためのアルキン及びアジド基の要件を確認する証拠をさらに提供す

るＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂを未修飾Ｆｃ６タンパク質と共に含有した反応混合物は、Ｆｃ６単独（レーン１）と比較して反応生成物（レーン２）を得ず、Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６を有するアルキン修飾ＴＮＲ１Ｂは、Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６単独（レーン３）と比較して、予想される生成物（レーン４）を得た。再度、入力アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ（レーン５に示される）のキャリーオーバーは、プロテインＡ精製後明らかでなかった。

【０９７６】

図１０のＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６生成物は、そのＬＣ－ＭＳによるトリプシンペプチドのシークエンシングによってさらに特徴付けられた。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後、ゲルを、クーマシー染色し、Ｍｒ約７５，０００の生成物（矢印ａ）、Ｍｒ約６５，０００の生成物（矢印ｂ）、アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂが移動した非染色領域（矢印ｃ）、及びＭｒ約２８，０００の未反応のＡｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６タンパク質（矢印ｄ）に対応して、４カ所のゲル領域を切除した。４個のゲル切片を、小型の小片（約０．５～１．０ｍｍ^3）の賽の目に切り、次の通り処理した。重炭酸アンモニウム、アセトニトリル、ジチオスレイトール、及びヨードアセトアミドをＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから得、ギ酸はＰｉｅｒｃｅから得、ブタのトリプシン（シークエンシンググレード）をＰｒｏｍｅｇａ（Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）から得た。クーマシー染色を除去するため、各ゲル切片を、ボルテックスすることにより５０％アセトニトリル中の２５ｍＭのNH_4HCO_3 ２００ｕＬで抽出し、遠心して上澄みを除去し、ゲル小片が小さくなり白色になるまで数分間アセトニトリルを添加することにより脱水した。アセトニトリルを捨て、ゲル切片をＳｐｅｅｄ Ｖａｃ（Ｓａｖａｎｔ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｆａｒｍｉｎｇｄａｌｅ、ＮＹ）で乾燥させた。次いで、２５ｍＭ NH_4HCO_3中の１０ｍＭジチオスレイトール４０ｕＬにおいてゲル切片を再水和し、ボルテックスすることにより還元及びアルキル化を実施し、４５分間５６℃でインキュベートした。次いで、上澄みを捨て、２５ｍＭ NH_4HCO_3中の５５ｍＭヨードアセトアミド４０ｕＬを添加し、ゲル切片をボルテックスし、室温で３０分間暗所でインキュベートした。上澄みを捨て、ゲル切片を再びアセトニトリルで脱水し、Ｓｐｅｅｄ Ｖａｃで乾燥した。次いで、６０分間氷上で２５ｍＭ NH_4HCO_3中のトリプシン（１２．５ｕｇ／ｍＬ）２５ｕＬでゲル切片を再水和することによりトリプシン消化を実施した。次いで、過剰量のトリプシン溶液を除去し、ゲル切片を２５ｍＭ NH_4HCO_3で被覆し、終夜３７°Ｃでインキュベートした。上澄みを除去し、次いで、ゲルを、水中の５０％アセトニトリル／０．１％ギ酸３０ｕＬで２回抽出した。有機抽出物を上澄み液（aqueous supernatant）と合わせ、Ｓｐｅｅｄ Ｖａｃにおいて１０ｕＬの容積まで減少させ、次いで、Ｑ－Ｓｔａｒ Ｅｌｉｔｅ質量分析計（ＡＢ ＳＣＩＥＸ、Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、ＣＡ）を用いてＬＣ－ＭＳにより分析した。

【０９７７】

図１１は、質量分析によりＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６反応生成物の構造の特徴付けをまとめて示す。完全長ＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６生成物について予想される通り、Ｍｒ約７５，０００の生成物は、アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂとアジド修飾Ｆｃ６親タンパク質の両方由来のペプチドを含有した。さらに、アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂ配列（上のパネル）のペプチド被覆度は、Ｎ－末端領域（ＥＹＹＤＱＴＡＱＭＣＣＳＫ）からＣ－末端領域（ＳＭＡＰＧＡＶＨＬＰＱＰＶＳＴ）まで伸長した。同様に、アジド修飾Ｆｃ６タンパク質配列（下のパネル）のペプチド被覆度は、Ｎ－末端領域（ＤＴＬＭＩＳＲ）からＣ－末端領域（ＴＴＰＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫ）まで伸長した。これに対して、ＥＹＹＤＱＴＡＱＭＣＣＳＫペプチドを欠如したＭｒ約６５，０００は、予想された完全長ＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６生成物のＮ－末端を削除されたバージョン（N-terminally deleted version）であったことが示唆されている。アルキン修飾ＴＮＲ１Ｂが普通なら移動するはずの場合（矢印ｃ）、ＴＮＲ１Ｂタンパク質に由来する配列は、Ｍｒ約４３，０００の非染色領域において検出されず、Ｆｃ６タンパク質に由来する配列のみは、Ｍｒ約２８，０００の未反応のＡｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６タンパク質において検出された（矢印ｄ）。

【０９７８】
図１０のＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６及びＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－PEG_4－Ｆｃ６生成物を、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）を用いてＴＮＦ－αを結合する能力を測定することにより、それらの生物学的活性についてさらに特徴付けた。（無担体の）組換えヒトＴＮＦ－αタンパク質を、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから得、ＰＢＳに再構成した。ＳＰＲ試験をＢｉａｃｏｒｅ　ＡＢ（Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）製のＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００器具を用いて実施した。表面結合リガンド、ＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６及びＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－PEG_4－Ｆｃ６を、製造業者の指示に従ってＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）から得たＡｍｉｎｅ　Ｃｏｕｐｌｉｎｇ　Ｋｉｔ（ＢＲ－１０００－５０）を用いて、ＣＭ５センサーチップ、Ｓｅｒｉｅｓ　Ｓ上で固定化した。ｐＨ７．４の１０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ緩衝液、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、及び０．００５％のＴｗｅｅｎ－２０において２５℃でＴＮＦ－αの結合を実施した。結合をＴＮＦ－α濃度０．１５６ｎＭ、０．３１２ｎＭ、０．６２５ｎＭ、１．２５ｎＭ、２．５ｎＭ、５．０ｎＭ、１０．０ｎＭ、２０．０ｎＭ及び４０ｎＭで繰り返して評価した。Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、ｖｅｒｓｉｏｎ　２．０．３を用いてデータを評価した。

【０９７９】
図１２は、ＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６（左のパネル）及びＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－PEG_4－Ｆｃ６（右のパネル）のキネティック結合曲線を示す。どちらの生成物も飽和性のＴＮＦ－α結合を示し、２指数モデル（χ^2約０．０５）を用いて優れた適合が得られた。表２は、キネティック結合データをまとめて示す。各生成物についての結合部位のおよそ４０％は、親和性が高く、ＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６（K_D＝２．９９×１０$^{-10}$Ｍ）の場合よりもＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－PEG_4－Ｆｃ６（K_D＝１．８６×１０$^{-10}$Ｍ）の解離定数が１．６倍高い。結合部位の残りの６０％は、親和性が低く、解離定数はＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－PEG_4－Ｆｃ６（K_D＝５．１２×１０$^{-9}$Ｍ）及びＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６（K_D＝５．１７×１０$^{-9}$Ｍ）の場合とほぼ同じである。高親和性結合を増加させるが、低親和性結合に等しいPEG_4リンカーを会合させると、ＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６と比較して、ＴＮＲ１Ｂ－アルキン－アジド－PEG_4－Ｆｃ６によるＴＮＦ－αの協同的（両手の）結合の程度が高いという説得力のある証拠を示している。

【０９８０】

【表２】

表1.アジド含有およびアルキン含有チオエステル

名称	式	Mr	MH^+	配列
Az-DKTHT	$C_{33}H_{47}O_{10}N_{11}S$	789.86	780.60	アジド-DKTHT-チオエステル
Az-PEG_4-DKTHT	$C_{44}H_{68}O_{15}N_{12}S$	1037.14	1038.20	アジド-PEG_4-DKTHT-チオエステル
Az-PEG_{12}-DKTHT	$C_{59}H_{98}O_{23}N_{12}S$	1375.55	1376.26	アジド-PEG_{12}-DKTHT-チオエステル
Az-PEG_{24}-DKTHT	$C_{83}H_{146}O_{35}N_{12}S$	1904.18	1904.80	アジド-PEG_{24}-DKTHT-チオエステル
Az-PEG_{36}-DKTHT	$C_{107}H_{194}O_{47}N_{12}S$	2432.82	2434.40	アジド-PEG_{36}-DKTHT-チオエステル
Alk-PEG_{12}	$C_{53}H_{74}O_{15}N_2S$	1011.22	1011.80	DIBAC-PEG_{12}-チオエステル

Mr、相対分子質量;MH^+、モノアイソタイプ質量値。

【０９８１】

【表３】

表2.表面プラスモン共鳴によって測定したTNF-α結合

表面結合のリガンド	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (M)	Rmax1	ka2 (1/Ms)	kd2 (1/s)	KD2 (M)	Rmax2	Chi2
TNR1B-Alk-Az-DKTHT-Fc6	1.252E+7	0.003744	2.990E-10	2.5	5.176E+6	0.03392	6.553E-9	3.9	0.0514
TNR1B-Alk-Az-PEG4-DKTHT-Fc6	1.400E+7	0.002613	1.866E-10	3.0	5.129E+6	0.03021	5.890E-9	4.8	0.0503

略語:ka、(測定された)評価内:kd、(測定された)評価外:KD、(算出された)解離定数。

【０９８２】

例２

Ｆａｂ’－アルキン－アジド－Ｆｃ６

Ｆａｂ’－アルキン－アジド－Ｆｃ６を、アジド修飾Ｆｃ６とのシクロアルキン修飾Ｆａｂ’の反応により次の通り調製した。

【０９８３】

アダリムマブ（Ｈｕｍｉｒａ）を、Ａｂｂｏｔｔ（Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）製の液剤（５０ｍｇ／ｍｌ）として得た。Ｆａｂ’フラグメントを、ＩｄｅＳプロテアーゼを用いて調製して、Ｆａｂ’２フラグメントをまず生成し、その後、鎖間のジスルフィドを２－メルカプトエチルアミンで選択的に還元した（図１３）。抗体（１０ｍｇ）を、Ｐｉｅｒｃｅ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）製のＳｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ Ｍｉｎｉ Ｄｉａｌｙｓｉｓ Ｕｎｉｔ、１０Ｋ ＭＷＣＯを用いて、切断緩衝液（５０ｍＭリン酸ナトリウム、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ６.６）に交換し、次いで、Ｇｅｎｏｖｉｓ（Ｌｕｎｄ、Ｓｗｅｄｅｎ）製のアガロースビーズ（ＦｒａｇＩＴ ＭｉｄｉＳｐｉｎカラム）で固定化されたｈｉｓ－タグ付きの組換えＩｄｅＳで、一定の混合をしながら室温で１時間インキュベートした。ビーズを遠心によって消化溶液から除去し、切断緩衝液で２回洗浄し、次いで、消化溶液及び洗浄溶液を合わせ、ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）製のＨｉＴｒａｐプロテインＡ ＨＰカラムに適用して、Ｆｃ’フラグメント及び消化されない抗体を除去した。Ｆａｂ’２フラグメントを含有するフロースルー画分を、１ｍＬアリコートをＰｉｅｒｃｅ製の２－メルカプトエチルアミン（ＭＥＡ）６ｍｇを含有するバイアルに添加することにより、Ｆａｂ’フラグメントに還元した。鎖間のジスルフィドの再酸化を最小限にするために、１０ｍＭ ＥＤＴＡで還元を実施した。１１０分間３７℃でインキュベーション後、過剰量のＭＥＡを、ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）製のＰＤ－１０脱塩カラムを用いて１０ｍＭ ＥＤＴＡを含有するＰＢＳに緩衝液－交換することにより除去した。Ｆａｂ’フラグメントを含有する溶出液を、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）製のＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａｃｅｌ－３ Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ Ｆｉｌｔｅｒ Ｕｎｉｔを用いて濃縮した。

【０９８４】

図１４は、ＩｄｅＳによる切断後（パネルＡ）、続いて、プロテインＡクロマトグラフィー及びＭＥＡとの穏やかな還元後（パネルＢ）のアダリムマブのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。ポリアクリルアミドゲル中の強力な還元剤（ジチオスレイトール）の存在下で、全抗体（レーン１）は、Ｍｒ約５５，０００の重鎖（矢印ａ）及びＭｒ約２５，０００の軽鎖（矢印ｄ）として移動した。ＩｄｅＳによって、重鎖（レーン２）はＭｒ約２９，０００のＣ－末端フラグメント（矢印ｂ）及びＭｒ約２６，０００のＮ－末端フラグメント（矢印ｃ）に切断された。軽鎖及びＮ－末端重鎖フラグメントは、Ｆａｂ’２ドメインを含み、Ｃ－末端重鎖フラグメントは、Ｆｃ’ドメインを含む。プロテインＡカラムは、Ｆｃ’ドメインをフラグメントから効率的に除去した（レーン２をレーン５及び６と比較）。非還元条件下で、Ｆａｂ’２ドメインは、Ｍｒ約１１０，０００の単一の種として移動し（レーン３）、ＭＥＡとの穏やかな還元により生成したＦａｂ’ドメインは、Ｍｒ約５５，０００の単一の種として移動した（レーン４）。還元条件下で、Ｆａｂ’２ドメイン（レーン５）とＦａｂ’ドメイン（レーン６）の両方は、予想通り同じ軽鎖（矢印ｄ）及びＮ－末端重鎖フラグメント（矢印ｃ）を生成した。したがって、この手順により得られたＦａｂ’ドメインは、本質的にＦａｂ’２及びＦｃ’ドメインがなかった。

【０９８５】

シクロアルキン修飾Ｆａｂ’を２官能性リンカー、ＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ$_{12}$－Ｌｙｓ（Ｍａｌ）を用いて、アダリムマブＦａｂ’ドメインから調製し、２官能性リンカーは、Ｆａｂ’フラグメント上で遊離チオール基と反応することができるマレイミド基を含有する（図１５）。ＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ$_{12}$－Ｌｙｓ（Ｍａｌ）をＦｍｏｃ固相合成ストラテジーを用いて調製した。Ｌｙｓ（Ｍｔｔ）－Ｗａｎｇ樹脂及びスクシンイミド３－マレイミドプロパノエート（Ｍｐａ－ＯＳｕ）をＣＰＣ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ（Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ

、ＣＡ）から得、Ｆｍｏｃ－Ｎ－アミド－ｄＰＥＧ$_{12}$酸をＱｕａｎｔａ　ＢｉｏＤｅｓｉｇｎ（Ｐｏｗｅｌｌ、ＯＨ）から得、５－（１１，１２－ジデヒドロジベンゾ［ｂ，ｆ］アゾシン－５（６Ｈ）－イル）－５－オキソペンタン酸、酸官能性をもたせたアザ－ジベンゾシクロオクチン（ＤＩＢＡＣ酸）を、Ｄｅｂｅｔｓ、Ｍ.Ｆ.ら、Ｃｈｅｍ.Ｃｏｍｍｕｎ.４６、９７～９９（２０１０）によって記載される通り合成した。Ｆｍｏｃ－Ｎ－アミド－ｄＰＥＧ$_{12}$酸及びＤＩＢＡＣ酸を、Ｌｙｓ（Ｍｔｔ）－Ｗａｎｇ樹脂と逐次的に反応させて、ＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ$_{12}$－Ｌｙｓ（Ｍｔｔ）－Ｗａｎｇ樹脂を得、次いで、ＴＦＡ／ＤＣＭ／ＴＩＳ（１：９６：３）で処理して、Ｍｔｔ基を除去した。脱保護した樹脂を、リジン側鎖上の遊離アミノ基におけるＭｐａ－ＯＳｕと反応させて、ＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ１２－Ｌｙｓ（Ｍｐａ）－Ｗａｎｇ樹脂を得た。ＴＦＡ／水（９５：５）で切断後、粗生成物を分取ＲＰ－ＨＰＬＣによって精製して、純度が９３％であり所望のＭＳスペクトルを有するＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ$_{12}$－Ｌｙｓ（Ｍａｌ）生成物（ＤＰＫＭ）を生成した。

【０９８６】

図１６は、アダリムマブＦａｂ’フラグメントのＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ$_{12}$－Ｌｙｓ（Ｍａｌ）リンカーによる化学修飾及び得られたシクロアルキン修飾Ｆａｂ’の精製を示す。精製の場合、反応（０.５３５ｍＬ）を、ｐＨ７.０及びｐＨ７.４の０.１Ｍリン酸ナトリウムにおいて実施し、それぞれがＦａｂ’フラグメント５ｍｇ及びＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ$_{12}$－Ｌｙｓ（Ｍａｌ）１０ｍｇを含有している。室温で３０時間のインキュベーション後、２つの反応を合わせ、ＰＤ－１０カラムを用いて２０ｍＭ酢酸ナトリウム、２０ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ５.５）に緩衝－交換させた。溶出液（３.５ｍＬ）を、非修飾のＦａｂ’及び残留Ｆａｂ’２すべてを保持するＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ製のＨｉＴｒａｐ　ＳＰ　ＨＰ陽イオン－交換カラムに適用させた。精製したシクロアルキン修飾Ｆａｂ’（図１６ｂ）を含有するフロースルー画分（５.５ｍＬ）をプールし、１０×ＰＢＳ（０.５５ｍＬ）でｐＨ７.０に調整し、ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ製のプロテインＬカラム（Ｃａｐｔｏ　Ｌ）の親和性クロマトグラフィーにより濃縮した。シクロアルキン修飾Ｆａｂ’を、ｐＨ２.７の０.１ＭグリシンＨＣｌ（２.４ｍＬ）を含むプロテインＬカラムから溶出し、ｐＨ９.０の１.０ＭトリスＨＣｌ　１／２０容積で中和させ、ＰＤ－１０カラム（３.５ｍＬ）を用いてＰＢＳに緩衝－交換させ、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａｃｅｌ－３　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｕｎｉｔを用いて９.５ｍｇ／ｍＬの濃度の最終容積７０ｕＬまで濃縮した。

【０９８７】

異なる長さのＰＥＧリンカーを有する様々なアジド修飾Ｆｃ６タンパク質を、アダリムマブＦａｂ’－シクロアルキン－アジド－Ｆｃ６の調製において用いた。Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６（図３）及びＡｚ－ＤＫＴＨＴ－ＰＥＧ$_{x}$－Ｆｃ６誘導体（ｘ＝１２、２４、及び３６である）（図４）を、ｐＨ６.５の５０ｍＭ　ＭＥＳ、０.８ｍＭ　ＴＣＥＰ、１０ｍＭ　ＭＰＡＡ、４つのＡｚ－ＤＫＴＨＴ－ＰＥＧ$_{x}$－チオエステル各５ｍｇ／ｍｌ、及びＦｃ６タンパク質２.３６ｍｇ／ｍｌを含有した反応（２ｍＬ）で調製した。室温で２０時間後、反応を、ｐＨ９.０のトリスＨＣｌ　１００ｕＬで中和させ、１２，０００ｘｇの遠心（centrigugation）によって明らかにし、１ｍｌのＨｉＴｒａｐプロテインＡＨＰカラムに適用した。カラムをＰＢＳ１２体積で洗浄し、次いで、アジド修飾Ｆｃ６タンパク質をｐＨ２.７の０.１ＭグリシンＨＣｌ（２.０ｍＬ）で溶出し、ｐＨ９.０の１.０ＭトリスＨＣｌ　１／２０体積で中和させ、Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ　Ｍｉｎｉ　Ｄｉａｌｙｓｉｓ　Ｕｎｉｔ、１０Ｋ　ＭＷＣＯを用いてそれぞれ１２時間ＰＢＳを３回変更して透析し、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａｃｅｌ－３　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｕｎｉｔｓを用いて濃縮した。

【０９８８】

図１７は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによるＦｃ６（レーン１）Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６（レーン２）、Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－ＰＥＧ$_{12}$－Ｆｃ６（レーン３）、Ａｚ－ＤＫＴＨＴ－ＰＥＧ$_{24}$－Ｆｃ６（レーン４）、及びＡｚ－ＤＫＴＨＴ－ＰＥＧ$_{36}$－Ｆｃ６（レーン５）タン

パク質の還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析を示す。Ｆｃ６タンパク質を、４つのチオエステルすべてと定量的に（＞９０％）反応させ、生成物のラダーのサイズを増大させた。

【０９８９】

図１８は、４つのアジド修飾Ｆｃ６タンパク質生成物が親Ｆｃ６分子と同じ二量体の構造であったことを確認するためのサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）による分析を示す。Ｐｒｏｍｉｎｅｎｃｅ ＨＰＬＣ系（Ｓｈｉｍａｄｚｕ Ｃｏｒｐ、Ｋｙｏｔｏ、Ｊａｐａｎ）を用いてＳＥＣを実施した。ＴＳＫｇｅｌ Ｓｕｐｅｒ ＳＷ３０００カラム（４.６ｍｍ×３０ｃｍカラム、４.６ｍｍ×５ｃｍガードカラム）をＴＯＳＯＨ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｔｏｋｙｏ、Ｊａｐａｎ）から得た。用いた移動相、流量、カラム温度、及び検出波長は、それぞれ、５０ｍＭリン酸ナトリウム、３００ｍＭ ＮａＣｌ（ｐＨ７.４）、０.３５ｍＬ／分、３０℃、及び２８０ｎｍであった。４つのアジド修飾Ｆｃ６タンパク質生成物は、ＰＥＧリンカーのサイズが増加するにつれて減少する保持時間を示し、これらの二量体構造を確認した。４つすべての生成物はまた、本質的に単一のピークを示し、親Ｆｃ６二量体の両方のＮ－末端が、非還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により確認されたＰＥＧリンカーにより修飾された両手の構造を示した（下記参照）。

【０９９０】

シクロオクチン修飾Ｆａｂ’を４つすべてのアジド修飾Ｆｃ６分子と反応させ（図１９）、アームの長さが増加するＦａｂ’－ＰＥＧ$_{y}$－シクロアルキン－アジド－ＰＥＧ$_{x}$－Ｆｃ６構造のファミリーを生成した（図２０）。得られたアームの全長は、Ｆａｂ’－ＰＥＧ$_{12}$－Ｆｃ６（ｘ＝０、ｙ＝１２の場合）、Ｆａｂ’－ＰＥＧ$_{24}$－Ｆｃ６（ｘ＝１２、ｙ＝１２の場合）、Ｆａｂ’－ＰＥＧ$_{36}$－Ｆｃ６（ｘ＝２４、ｙ＝１２の場合）、及びＦａｂ’－ＰＥＧ$_{48}$－Ｆｃ６（ｘ＝３６、ｙ＝１２の場合）であった。シクロアルキン修飾Ｆａｂ’（５ｍｇ／ｍｌ）の存在下又は非存在下で、４つのアジド修飾Ｆｃ６タンパク質（２.５ｍｇ／ｍｌ）をそれぞれ用いて、終夜室温でｐＨ７.０の０.１Ｍリン酸ナトリウムで反応（８ｕＬ）を実施した。

【０９９１】

図２１は、還元及び非還元条件下で、Ｆａｂ’－シクロアルキン－アジド－Ｆｃ６反応のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。シクロアルキン修飾Ｆａｂ’（レーン５、７、９、及び１１）の非存在下において、アジド修飾Ｆｃ６タンパク質のうち４つすべては、還元ゲルと非還元ゲルの両方において単一のバンドを生じ、これらの二量体の、両手の構造を認識している。シクロアルキン修飾Ｆａｂ’（レーン４、６、８、及び１０）の存在下において、アジド修飾Ｆｃ６タンパク質のうち４つすべてを、得られた反応中で大いに消費した。還元条件下で、４つすべての反応によって、Ｍｒ約５７，０００～６２，０００（矢印ａ）の生成物を得た。Ｆａｂ’－ＰＥＧ$_{12}$－Ｆｃ６生成物（レーン４）のサイズは、野生型アダリムマブ重鎖（レーン１）よりも大きいおよそ１～２ｋＤであり、Ｆａｂ’－ＰＥＧ$_{24}$－Ｆｃ６（レーン６）、Ｆａｂ’－ＰＥＧ$_{36}$－Ｆｃ６（レーン８）、及びＦａｂ’－ＰＥＧ$_{48}$－Ｆｃ６（レーン１０）生成物のサイズは、ＰＥＧリンカーの全長と共にさらに増大した。非還元条件下で、２つの生成物を観察し、第１の生成物は、Ｍｒ約１５５，０００～１６０，０００（矢印ａ）であり、第２の生成物は、Ｍｒ約１１０，０００～１１５，０００（矢印ｂ）であった。より大型のＦａｂ’－ＰＥＧ$_{12}$－Ｆｃ６生成物（レーン４）は、予想される両手の生成物と一致するアダリムマブ全抗体（レーン１）よりも大きいおよそ５ｋＤであり、より大型のＦａｂ’－ＰＥＧ$_{24}$－Ｆｃ６（レーン６）、Ｆａｂ’－ＰＥＧ$_{36}$－Ｆｃ６（レーン８）、及びＦａｂ’－ＰＥＧ$_{48}$－Ｆｃ６（レーン１０）生成物は、ＰＥＧリンカーの全長が増加するのに比例してサイズがさらに増大した。

【０９９２】

図２２は、Ｆａｂ’－ＰＥＧ$_{12}$－Ｆｃ６、Ｆａｂ’－ＰＥＧ$_{24}$－Ｆｃ６、Ｆａｂ’－ＰＥＧ$_{36}$－Ｆｃ６、及びＦａｂ’－ＰＥＧ$_{48}$－Ｆｃ６反応が、Ｍｒ約１５５，０００～１６０，０００である、より大型の反応生成物の両手の構造（すなわち、１つのＦｃ６ドメインに付着される２つのＦａｂ’の手）を確認するためのＳＥＣによる分析を示す。４つす

べての反応生成物は、ＰＥＧリンカーのサイズが増加するにつれてさらに減少したアダリムマブ全抗体よりも保持時間が短いことを示し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によって観察された両手の構造を確認した。

【０９９３】

Ｆａｂ’－シクロアルキン－アジド－Ｆｃ６生成物の生物学的活性は、アクチノマイシンＤで処理したマウスＷＥＨＩ細胞に対するＴＮＦ－α媒介性細胞毒性を中和するその能力により評価された。マウスＷＥＨＩ－１３ＶＡＲ細胞株（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２１４８）を、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）から得、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）から得た、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）及びペニシリン及びストレプトマイシン（１０Ｕ／ｍｌ）を補充したＧｉｂｃｏ　ＲＰＭＩ培地１６４０（ＲＰＭＩ－１６４０）で成長させた。ＴＮＦ－α細胞毒性アッセイを以下の通り実施した。ＷＥＨＩ－１３ＶＡＲ細胞を、ウェル当たり2×10^4細胞でＴｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ（Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）から得た９６ウェルＮｕｎｃ白色細胞培養プレートに終夜播種し、次いで、ＴＮＦＲ－ＩｇＧ又は他の阻害物質の非存在下又は存在下で、Ｓｉｇｍａ（Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）から得たアクチノマイシンＤ（０．５μｇ／ｍｌ）及びＴＮＦ－α（０．２ｎｇ／ｍｌ）で処理した。３７℃／ＣＯ２　５％でのインキュベーションの２４時間後、代謝活性のある細胞に存在するＡＴＰ量及びＰＯＬＡＲｓｔａｒ照度計（ＢＭＧ　ＬＡＢＴＥＣＨ　Ｉｎｃ.、Ｃａｒｙ、ＮＣ）を用いて測定した発光を測定するＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ　Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｃｅｌｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ　Ａｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）で、細胞生存率を決定した。各阻害物質を、１０μｇ／ｍｌで開始し１０種の３倍段階希釈により希釈し、２回又は３回測定した。細胞毒性データを、次の方程式：（ルシフェラーゼの１サンプルの読み取り／アクチノマイシンＤ単独で処理した細胞からのルシフェラーゼの読み取り）×１００％を用いて算出し、平均±標準偏差として示した。エンブレルを細胞毒性陽性対照として、Ｆｃ６を陰性対照として用いた。

【０９９４】

図２３は、（入力シクロアルキン修飾Ｆａｂ’の等量に基づいて）シクロアルキン修飾Ｆａｂ’と比較した、Ｆａｂ’－PEG_{12}－Ｆｃ６、Ｆａｂ’－PEG_{24}－Ｆｃ６、Ｆａｂ’－PEG_{36}－Ｆｃ６、及びＦａｂ’－PEG_{48}－Ｆｃ６反応混合物によるＴＮＦ－α媒介性細胞毒性の中和を示す。Ｆａｂ’－PEG_{12}－Ｆｃ６とＦａｂ’－PEG_{24}－Ｆｃ６反応混合物は両方とも、入力シクロアルキン修飾Ｆａｂ’（上のパネル）のそれと比較して、同程度のＴＮＦ－α中和活性を示し、Ｆａｂ’－PEG_{36}－Ｆｃ６及びＦａｂ’－PEG_{48}－Ｆｃ６反応混合物は、入力シクロアルキン修飾Ｆａｂ’（下のパネル）と比較して、ＴＮＦ－α中和活性の１．５倍及び２．０倍の増加をそれぞれ示した。両手の生成物の量が、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図２２）により推定される通り、各反応において総シクロアルキン修飾Ｆａｂ’１０～２０％を表すにすぎなかったため、Ｆａｂ’－PEG_{36}－Ｆｃ６及びＦａｂ’－PEG_{48}－Ｆｃ６反応の両手の生成物は、それぞれ入力シクロアルキン修飾Ｆａｂ’よりも大きい、少なくとも７．５倍及び１０倍であることが推定される。

【０９９５】

例３

Ｆａｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６

Ｆａｂ－インテイン融合タンパク質を次の通り切断することにより生成される、アルキン修飾又はシクロアルキン修飾Ｆａｂタンパク質とアジド修飾Ｆｃ６を反応させることにより、Ｆａｂ－アルキン－アジド－Ｆｃ６を調製する。同様に、Ｆａｂ－インテイン融合タンパク質を切断することにより生成されるアジド修飾Ｆａｂタンパク質とアルキン修飾又はシクロアルキン修飾Ｆｃ６を反応させることにより、Ｆａｂ－アジド－アルキン－Ｆｃ６を調製する。

【０９９６】

発現ベクターｐＦＵＳＥ２ｓｓ－ＤＥ２７－Ｖκ－ＣＬＩｇ－ｈｋ（配列番号１１５）

をｐＰＵＳＥｓｓ－ＤＥ２７－Ｖγ１－ＣＨＩｇ－ｈＧ１－Ｍｔｈ－１（配列番号１１６）又はｐＦＵＳＥｓｓ－ＤＥ２７－Ｖγ１－ＣＨＩｇ－ｈＧ１－Ｍｔｈ－２（配列番号１１７）と同時形質移入することにより、アダリムマブＦａｂ－インテイン融合タンパク質を生成する。

【０９９７】

ベクターｐＦＵＳＥ２ｓｓ－ＤＥ２７－Ｖκ－ＣＬＩｇ－ｈｋは、配列番号１１８に示したアダリムマブのプレ－κ軽鎖の発現を方向づける。細胞シグナルペプチダーゼによる非相同のＩＬ－２シグナル配列の切断によって、配列番号１１９に示されるアダリムマブの成熟κ軽鎖を形成する。

【０９９８】

ベクターｐＦＵＳＥｓｓ－ＤＥ２７－Ｖγ１－ＣＨＩｇ－ｈＧ１－Ｍｔｈ－１は、配列番号１２０に示したプレ－重鎖－インテインキメラポリペプチドの第１のタイプの発現を方向づけ、アダリムマブ重鎖ＶＨ及びＣＨ１ドメインは、自動切断部位におけるＲＩＲ１自己スプライシングインテインのＣ－末端からＮ－末端で接合される。細胞シグナルペプチダーゼにより非相同のＩＬ－２シグナル配列を切断することによって、配列番号１２１に示した成熟重鎖－インテイン融合タンパク質を形成する。一緒になって、配列番号１１９及び配列番号１２１のタンパク質は、細胞培養液に分泌されるアダリムマブＦａｂ－１－インテイン融合タンパク質を含む。

【０９９９】

ベクターｐＦＵＳＥｓｓ－ＤＥ２７－Ｖγ１－ＣＨＩｇ－ｈＧ１－Ｍｔｈ－２は、配列番号１２２に示したプレ－重鎖－インテインキメラポリペプチドの第２のタイプの発現を方向づけ、アダリムマブ重鎖ＶＨ及びＣＨ１ドメインは、自動切断部位におけるＲＩＲ１自己スプライシングインテインのＣ－末端からＮ－末端で接合される。細胞シグナルペプチダーゼにより非相同のＩＬ－２シグナル配列を切断することによって、配列番号１２３に示した成熟重鎖－インテイン融合タンパク質を形成する。一緒になって、配列番号１１９及び配列番号１２３のタンパク質は、細胞培養液に分泌されるアダリムマブＦａｂ－２－インテイン融合タンパク質を含む。

【１０００】

タンパク質産生は、例１に記載されている通り本質的にＣＨＯ－ＤＧ４４細胞中の過渡的な発現により、配列番号１１５を配列番号１１６と同時形質移入してアダリムマブＦａｂ－１－インテイン融合タンパク質を生成することにより、及び配列番号１１５を配列番号１１７と同時形質移入してアダリムマブＦａｂ－２－インテイン融合タンパク質を生成することにより実行される。

【１００１】

アルキン修飾アダリムマブＦａｂタンパク質は、例１に記載されている通り本質的にアダリムマブＦａｂ－インテイン融合タンパク質を５０ｍＭシスチル－プロパルギルアミドで切断することにより生成される。アダリムマブＦａｂ－１－インテイン融合タンパク質を、シスチル－プロパルギルアミドで切断して、配列番号１１９及び配列番号１２４のヘテロ二量体タンパク質であるアルキン修飾アダリムマブＦａｂ－１タンパク質を生成する。アダリムマブＦａｂ－２－インテイン融合タンパク質を、シスチル－プロパルギルアミドで切断して、配列番号１１９及び配列番号１２５のヘテロ二量体タンパク質である、アルキン修飾アダリムマブＦａｂ－２タンパク質を生成する。

【１００２】

例１に記載されている通り本質的にアダリムマブＦａｂ－インテイン融合タンパク質を５０ｍＭシスチル－３－アジドプロピルアミドで切断することにより、アジド修飾アダリムマブＦａｂタンパク質を生成する。アダリムマブＦａｂ－１－インテイン融合タンパク質をシスチル－３－アジドプロピルアミドで切断して、配列番号１１９及び配列番号１２６のヘテロ二量体タンパク質である、アジド修飾アダリムマブＦａｂ－１タンパク質を生成する。アダリムマブＦａｂ－２－インテイン融合タンパク質を、シスチル－３－アジドプロピルアミドで切断して、配列番号１１９及び配列番号１２７のヘテロ二量体タンパク

質であるアジド修飾アダリムマブＦａｂ－２タンパク質を生成する。

【１００３】

アルキン修飾アダリムマブＦａｂ－１タンパク質又はアルキン修飾アダリムマブＦａｂ－２タンパク質をＡｚ－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６タンパク質（図６）又はＡｚ－ＰＥＧ$_x$－ＤＫＴＨＴ－Ｆｃ６タンパク質（図７）と反応させることによって、アダリムマブＦａｂ－１－アルキン－アジド－Ｆｃ６及びアダリムマブＦａｂ－２－アルキン－アジド－Ｆｃ６を調製する。

【１００４】

トリス（３－ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル）アミン（ＴＨＴＰＡ）を、Ｈｏｎｇら、Ａｎｇｅｗ.Ｃｈｅｍ.Ｉｎｔ.Ｅｄ.４８、１－７（２００９）に記載されている通り調製する。５ｍｇｓ／ｍＬ又はそれ以上の濃度、及びＦａｂ－Ａ：リンカー－Ｆｃのモル比＞２：１で、ｐＨ７.０の０.１Ｍリン酸ナトリウム中でリンカー－Ｆｃとの反応を実施した。最終濃度が０.０００１ＭのＣｕＳＯ$_4$、０.０００５ＭのＴＨＴＰＡを反応に添加する。最終濃度０.００５Ｍアミノグアニジン及び０.００５Ｍアスコルビン酸ナトリウムに添加することにより反応を開始する。閉管中で室温で１２～１８時間インキュベーション後、反応混合物を、プロテインＡ（ＧＥ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＮＪ）で充てんしたクロマトグラフのカラムに適用して、過剰量の試薬及び未反応のＦａｂ－Ａを除去し、ＰＢＳで洗浄し、ｐＨ２.７の０.１Ｍグリシン－ＨＣｌで溶出し、ｐＨ９.０の１.０Ｍトリス－ＨＣｌを添加することにより直ちに中和した。溶出したアダリムマブＦａｂ－１－アルキン－アジド－Ｆｃ６及びアダリムマブＦａｂ－２－アルキン－アジド－Ｆｃ６生成物を、ＰＢＳに対して透析する。

【１００５】

アジド修飾アダリムマブＦａｂ－１タンパク質又はアジド修飾アダリムマブＦａｂ－２タンパク質をシクロアルキン修飾Ｆｃ６タンパク質と反応させることによって、アダリムマブＦａｂ－１－アジド－アルキン－Ｆｃ６及びアダリムマブＦａｂ－２－アジド－アルキン－Ｆｃ６を調製する。

【１００６】

同様に調製したＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ$_{12}$－チオエステル（表１）及び他のＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ$_x$－チオエステル及びＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ$_x$－ＤＫＴＨＴ－チオエステルを用いて、シクロアルキン修飾Ｆｃ６タンパク質を例１に記載されている通り本質的に調製する。

【１００７】

例４

Ｎ末端アジド修飾Ｆｃタンパク質

それぞれがＮ末端にアジド官能基を有し、ＰＥＧリンカーを任意に有していてもよい、一連のアジド修飾Ｆｃタンパク質（Ｎ$_3$－Ｐｘ－Ｆｃ）を、Ｆｃ６タンパク質を、アジドアセチル－Ｐｘ－ＤＫＴＨＴ－チオフェノール（ｘ＝０、１２、２４、３６、４８）という配列を有する５つのチオエステルと反応させることによって調製した。反応をＴＣＥＰ非存在下で行い、アジド基の第１級アミンへの任意の還元を最小限にした。ｘ＝１２、２４、３６のアジドアセチル－Ｐｘ－ＤＫＴＨＴ－チオフェノールを表１に示す。アジドアセチル－ＤＫＴＨＴ－チオフェノールチオエステルを、例１に記述した通りに調製した（Ｃ$_{32}$Ｈ$_{45}$Ｏ$_{10}$Ｎ$_{11}$Ｓ［Ｍ＋Ｈ］$^+$についての計算値７７６．８、実測値７７６．３）。アジドアセチル－ＰＥＧ４８－ＤＫＴＨＴ－チオフェノールを、Ｑｕａｎｔａ　ＢｉｏＤｅｓｉｇｎから得たＦｍｏｃ－ＰＥＧ１２－ＯＨ及びＦｍｏｃ－ＰＥＧ３６－ＯＨの逐次縮合により、固相によって調製した（Ｃ$_{134}$Ｈ$_{247}$Ｎ$_{13}$Ｏ$_{60}$Ｓ［Ｍ＋Ｈ］$^+$についての計算値３０３２．５、実測値３０３２．８）。構造式は、下記の通りである。

【１００８】

各反応物（２ｍＬ）は、ｐＨ６．５の５０ｍＭのＭＥＳ、１０ｍＭのメルカプトフェニル酢酸、２．２ｍｇのＦｃ６、及び以下の５つのチオエステル、すなわち、アジドアセチル－ＤＫＴＨＴ－チオフェノール（５ｍｇ）、アジドアセチル－ＰＥＧ１２－ＤＫＴＨＴ－チオフェノール（５ｍｇ）、アジドアセチル－ＰＥＧ２４－ＤＫＴＨＴ－チオフェノー

ル（１０ｍｇ）、アジドアセチル－ＰＥＧ３６－ＤＫＴＨＴ－チオフェノール（１０ｍｇ）又はアジドアセチル－ＰＥＧ４８－ＤＫＴＨＴ－チオフェノール（２０ｍｇ）の１つを含んだ。反応を、室温で２０時間行い、ｐＨ９．０の０．１ｍＬのトリスＨＣｌで中和し、１２，０００ｘｇで遠心分離し、ＨｉＴｒａｐプロテインＡ　ＨＰカラムに適用した。カラムを、１２体積のＰＢＳで洗浄し、次いで、N_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を、ｐＨ２．７の０．１Ｍのグリシン ＨＣｌで溶出し、ｐＨ９．０の１．０Ｍのトリス ＨＣｌ１／２０体積で中和した。Ａ２８０によるピークフラクションをまとめて、ＰＤ－１０カラム上で脱塩し、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａｃｅｌ－３　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　Ｕｎｉｔｓを使用して濃縮した。

【１００９】

図２４は、還元条件（左）及び非還元条件（右）下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、精製されたN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を示す：Ｆｃ６対照（レーンａ）、N_3－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｂ）、N_3－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｃ）、N_3－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｄ）、N_3－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｅ）、及びN_3－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｆ）。N_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のサイズは、ＰＥＧリンカーの長さと共に増大した。加えて、ＴＣＥＰ無しで調製したN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のサイズ（図２４）は、ＴＣＥＰ有りで調製されたN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のサイズ（図１７）とＳＤＳ－ＰＡＧＥにより区別できなかった。

【１０１０】

例５

ＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン

一連のＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン（ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐｘ－Ｆｃ）を、シクロオクチン官能基を有するようにさらに修飾されたＧＬＰ－１（グルカゴン様ペプチド１）類似体を、例４の５つのN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のそれぞれと反応させることによって調製した。ＧＬＰ－１類似体の配列、ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＥＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧ－ＰＥＧ$_3$－Ｃ－NH_2（ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＶＳＳＹＬＥＥＱＡＡＫＥＦＩＡＷＬＶＫＧＲＧは、配列番号２０２である）は、元々のＧＬＰ－１ペプチドの残基７－３７に相当し、そこでは、グリシンが８位でアラニンに置換され、グルタミン酸が２２位でグリシンに置換されている。加えて、ＧＬＰ－１類似体は、シクロオクチン官能基に結合するために使用される、ＰＥＧ３リンカー及びシステイン残基をＣ末端に有する。このＧＬＰ－１類似体、ｇｌｙ８－ｇｌｕ２２－ＧＬＰ－１（７－３７）－ＰＥＧ３－ｃｙｓ－NH_2を、ＳＰＰＳによって調製した（$C_{165}H_{253}N_{43}O_{53}S$［Ｍ＋Ｈ］$^+$についての計算値３７２０．３、実測値３７２１．３）。

【１０１１】

シクロオクチン官能基を、Ｃ末端システイン残基上で遊離チオール基と反応できるマレイミド基を含有する、ヘテロ二官能性リンカーであるＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－マレイミドを使用して、ｇｌｙ８－ｇｌｕ２２－ＧＬＰ－１（７－３７）－ＰＥＧ３－ｃｙｓ－NH_2に付加した（図２５）。ＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－マレイミド（$C_{50}H_{54}N_4O_9$、分子量８５４．９２）は、Ｃｌｉｃｋ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｔｏｏｌｓ（Ｓｃｏｔｔｓｄａｌｅ、ＡＺ）から得た。使用前に、リンカーを、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）から得たジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に濃度２５ｍｇ／ｍＬで溶解した。反応物（０．４ｍＬ）は、ｐＨ６．５の５０ｍＭのＭＥＳ、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．４５ｍｇのｇｌｙ８－ｇｌｕ２２－ＧＬＰ－１（７－３７）－ＰＥＧ３－ｃｙｓ－NH_2ペプチド、及び０．９ｍｇ／ｍＬのＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－マレイミドリンカーを含んだ。反応を、室温で３０分間行った。過剰な未反応リンカーを、ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓから得た５ｍＬのＨｉＴｒａｐ脱塩カラムを使用して除去した。図２５は、得られたシクロオクチン修飾ＧＬＰ－１類似体反応生成物（ＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＢＣＯ）の構造を示す。

【１０１２】

ＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＢＣＯを、５つのN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のそれぞれ１つと個々に反応させて（図２６）、一連のＧＬＰ１－Ｐ７－トリアゾール－Ｐｘ－Ｆｃハイブリ

ッド免疫グロブリンを生成した（図２７）。各反応物（１．５ｍＬ）は、ｐＨ０．７の０．１Ｍのリン酸ナトリウム、０．３７５ｍｇのＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＢＣＯペプチド、及び５つのN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質の１つを０．５ｍｇ含んだ。反応を、室温で３．５時間行い、反応物を、ＨｉＴｒａｐプロテインＡ　ＨＰクロマトグラフィーによって精製し、例４に記述した通りに脱塩し、濃縮した。

【１０１３】

図２８は、還元条件（左）及び非還元条件（右）下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、精製されたＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンを示す：Ｆｃ６対照（レーンａ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｂ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｃ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｄ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｅ）、及びＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｆ）。ＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンのサイズは、N_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と同様に、ＰＥＧリンカーの長さと共に増大した。

【１０１４】

図２９は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、ＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン及びN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を直接比較する：Ｆｃ６対照（レーンａ）、N_3－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｂ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｃ）、N_3－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｄ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｅ）、N_3－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｆ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｇ）、N_3－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｈ）、ＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｉ）、N_3－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｊ）、及びＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｋ）。各N_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質の、対応するＧＬＰ１－Ｐ４－ＤＮ－Ｐｘ－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンへの変換率は、約９５％であった。

【１０１５】

例６

ＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンの生物学的活性

ＧＬＰ１－Ｐ７－トリアゾール－Ｐｘ－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンの生物学的活性を、ヒトＧＬＰ－１受容体（ＧＬＰ－１Ｒ）を発現する細胞におけるｃＡＭＰ合成の誘導を測定する、細胞ベースのアッセイにおいて評価した。ＧＬＰ－１Ｒ発現細胞を単離するために、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）をＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）から、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、ペニシリン、ストレプトマイシン、及びジェネティシン硫酸塩（Ｇ４１８）をＣｏｒｎｉｎｇ（Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）から得て、ＣａｌＰｈｏｓトランスフェクションキットをＣｌｏｎｔｅｃｈ（Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ、ＣＡ）から得て、ヒトＧＬＰ－１受容体発現プラスミドをＧｅｎｅＣｏｐｏｅｉａ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）から得て、抗ヒトＧＬＰ－１Ｒ－フィコエリトリンモノクローナル抗体をＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）から得た。ｃＡＭＰアッセイのために、３－イソブチル－１－メチルキサンチン（ＩＢＭＸ）をＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから得て（Ｎｏ．Ｉ５８７９）、ｃＡＭＰダイナミック２キットをＣｉｓｂｉｏ　Ｂｉｏａｓｓａｙｓ（Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ）から得て、ＧＬＰ－１（７－３７）ペプチドをＡｎａＳｐｅｃ（Ｎｏ．２０７６１）から得た。

【１０１６】

ＧＬＰ－１Ｒ発現細胞を、ＣａｌＰｈｏ哺乳類トランスフェクションキットを使用して、ＧＬＰ－１Ｒ発現ベクター（ＥＸ－Ａ０５１０－Ｍ０２）をヒト２９３Ｔ胎児由来腎臓細胞にトランスフェクトすることによって作製した。トランスフェクト細胞を、１０％ＦＢＳ及びペニシリン及びストレプトマイシン（１０ＩＵ／ｍｌ）を補給したＤＭＥＭにおいて増殖させ、安定したトランスフェクタントの選択を、２ｍｇ／ｍｌのＧ４１８を含有する同じ培地において行った。ＧＬＰ－１Ｒ発現を、抗ヒトＧＬＰ－１Ｒ－フィコエリトリンモノクローナル抗体を使用したフローサイトメトリック分析によって評価した。

【１０１７】

ｃＡＭＰアッセイのために、２９３Ｔ－ＧＬＰ－１Ｒ細胞を、２０μＬ培地／ウェル中

５，０００、８，０００又は１０，０００細胞／ウェルの密度で、３８４ウェルの組織培養処理済み白色マイクロタイタープレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｎｏ．３７０４）に一晩中蒔いた。翌日、０．５ｍＭのＩＢＭＸを含有する２０μＬのＰＢＳ中のアゴニスト（ＧＬＰ－１ペプチド又はＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン）の段階希釈液を細胞に添加し、次いで、細胞を３７℃で１、４又は２４時間インキュベートした。刺激した後、ｃＡＭＰレベルを、製造業者の使用説明書に従って、Ｃｉｓｂｉｏ　ｃＡＭＰダイナミック２キットを使用して、ＣｌａｒｉｏＳｔａｒマイクロプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）において、均一時間分解蛍光測定法（ＨＴＲＦ：Homogeneous Time-Resolved Fluorescence）によって決定した。ＨＴＲＦ検出試薬の添加後、抗ｃＡＭＰ　Ｍａｂをクリプテート（２０μＬ）で標識し、ｃＡＭＰを色素ｄ２（２０μＬ）で標識し、プレートを室温で１時間インキュベートし、蛍光割合（６６５ｎｍ／６２０ｎｍ）を算出し、それを使用して、ｃＡＭＰ標準曲線への４パラメーターフィットによって、細胞溶解液中のｃＡＭＰ濃度を決定した。

【１０１８】

図３０は、ＧＬＰ－１（７－３７）ペプチド及びＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＮ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質（ｘ＝０、１２、２４、３６、４８）についての結果を示す。５つのＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンすべてが、ＧＬＰ－１（７－３７）ペプチドと同様にｃＡＭＰレベルを誘導した。ＧＬＰ－１（７－３７）による刺激は、細胞が、アゴニストに１時間、４時間又は２４時間晒されていようと同じであり、ＥＣ５０は、２４時間で約２ｎＭであったが、ＧＬＰ１－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンによる刺激は、細胞が、より長い時間アゴニストに晒されると劇的に増大し、ＥＣ５０は、２４時間で約０．４ｎＭであった。

【１０１９】

例７

Ｎ－末端シクロオクチン－Ｆｃタンパク質

それぞれがシクロオクチン官能基をＮ末端に有する、一連のシクロオクチン修飾Ｆｃタンパク質（ＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐｘ－Ｆｃ）を、ホモ二官能性シクロオクチンリンカーを例４のアジド修飾N_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と反応させることによって調製する。図３１に示す、リンカーであるＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ１１－ＤＩＢＡＣを、ＣＰＣ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから得た（$C_{74}H_{102}N_6O_{17}$［Ｍ＋Ｈ］$^+$についての計算値１３４６．６、実測値１３４６．４）。このリンカーのＰＥＧ１１部分は、［－ＮＨ－CH_2－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_3$－（CH_2）$_3$－ＣＯ－ＮＨ－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_5$－（CH_2）$_2$－ＣＯ－ＮＨ－CH_2－（CH_2－CH_2－Ｏ）$_3$－（CH_2）$_3$－ＮＨ－］という構造を有するジアミド－ｄＰＥＧ１１－ジアミン（Ｑｕａｎｔａ　Ｂｉｏｄｅｓｉｇｎｓ　Ｎｏ．１０３６１）に由来した。

【１０２０】

ＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ１１－ＤＩＢＡＣを、５つのN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のそれぞれ１つと個々に反応させて（図３１）、一連のＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を生成する（図３２）。代表的な結果を、ＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃを生成する、ＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ１１－ＤＩＢＡＣとN_3－Ｐ０－Ｆｃタンパク質との反応について示す。８４ｍｇのN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を、水－エタノール（０．６４：０．３６体積／体積）におけるｐＨ７．０の０．０２Ｍリン酸ナトリウム中の１１．２５ｍｇのＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ１１－ＤＩＢＡＣリンカーに添加することによって、反応（１ｍＬ）を開始した。反応を、室温で１２時間行い、次いで、ＤＩＢＡＣ－ＰＥＧ１１－ＤＩＢＡＣリンカーを、１ｍＬのＰＢＳを添加することによって抽出し、よく混合し、１２，０００ｘｇで遠心分離し、より濃厚な油相としてのリンカーを分離した。上部の水性相に含まれる所望のＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃ生成物を、ＨｉＴｒａｐプロテインＡ　ＨＰクロマトグラフィーによって精製し、例４に記述した通りに脱塩し、濃縮した。

【１０２１】

図３３は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによるＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃ反応生成物を示す：Ｆｃ６対照（レーンｂ）、未精製の反応生成物（レーンｃ～ｅ）、精製されたN_3－Ｐ０－Ｆｃタンパク質（レーンｆ）、及び精製されたＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃタンパク質（レーンｇ）。約７０％のN_3－Ｐ０－Ｆｃ（Ｉ）タンパク質を、期待したサイズのＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃ（ＩＩ）タンパク質を有する生成物に変換した。

【１０２２】

例８

ＤＮＡ－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン

一連のＤＮＡ－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンの（ＤＮＡ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐｘ－Ｆｃ）を、アジド修飾ＤＮＡ又はＲＮＡを、例７の５つのＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のそれぞれと反応させることによって調製する。図３４は、成熟ヒトｈｓａ－ｌｅｔ－７ｄ－５ｐ　ｍｉＲＮＡ（ｗｗｗ．ｍｉｒｂａｓｅ．ｏｒｇ、受入番号ＭＩＭＡＴ０００００６５）についてのＤＮＡコード鎖の配列５’－ＡＧＡＧＧＴＡＧＴＡＧＧＴＴＧＣＡＴＡＧＴＴ－３’（配列番号２０３）を有する、アジド修飾ＤＮＡである５ＡｚＤ－ｌｅｔ７ｄの構造を示す。５ＡｚＤ－ｌｅｔ７ｄオリゴヌクレオチド（５ＡｚＤ－ｌｅｔ７ｄ）を、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ、ＩＡ）から得た。使用前に、５ＡｚＤ－ｌｅｔ７ｄ（分子量７１８７．８）を、１０ｍＭのトリスＨＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡに溶解した。

【１０２３】

５ＡｚＤ－ｌｅｔ７ｄを、ＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のそれぞれと個々に反応させ（図３４）、一連のＤＮＡ－トリアゾール－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンを生成した（図３５）。代表的な結果を、５ＡｚＤ－ｌｅｔ７ｄとＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃタンパク質との反応について示す。反応物（２０μＬ）は、ｐＨ７．０の０．１Ｍリン酸ナトリウム、５０μｇの５ＡｚＤ－ｌｅｔ７ｄ又はその一連の２倍希釈液、及び５．７μｇのＤＮＡ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を含んだ。反応を、室温で２時間行った。

【１０２４】

図３６は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる反応生成物を示す。５ＡｚＤ－ｌｅｔ７ｄオリゴヌクレオチド濃度（ｍｇ／ｍｌ）は、以下の通りであった：マーカー（レーンａ）、０（レーンｂ）、２．５（レーンｃ）、１．２５（レーンｄ）、０．０６３（レーンｅ）、０．０３１（レーンｆ）、０．０１６（レーンｇ）、０．０８（レーンｈ）。約９０％のＤＩＢＡＣ－Ｐ１１－ＤＮ－Ｐ０－Ｆｃ（ＩＩ）タンパク質を、期待したサイズのＤＮＡ－ＮＤ－Ｐ１１－ＤＮ－ＰＥＧ０－Ｆｃ（ＩＩＩ）ハイブリッド免疫グロブリンを有する生成物に変換した。

【１０２５】

例９

Ｎ－末端アジド－Ｍａｂタンパク質

それぞれがアジド官能基を重鎖のＮ末端に有し、任意にＰＥＧリンカーを有していてもよい一連のアジド修飾トラスツズマブタンパク質（N_3－Ｐｘ－Ｈｃ）を、トラスツズマブタンパク質変異体、ｃｙｓ１Ｈ－ＩｇＧ１を、アジドアセチル－Ｐｘ－ＤＫＴＨＴ－チオフェノールという配列を有するチオエステルと反応させることによって調製する（図３７）。

【１０２６】

Ｃｙｓ１Ｈ－ＩｇＧ１は、配列番号１２８に示す野生型トラスツズマブ軽鎖と、システイン残基を重鎖Ｎ末端に有する変異型トラスツズマブ重鎖とからなる。ｃｙｓ１Ｈ－ＩｇＧ１重鎖は、最初、それぞれＳＨＨシグナルペプチド、ＩＦＮシグナルペプチド、及びＣＥＴＰシグナルペプチドを有する、配列番号１６７、配列番号１６８、及び配列番号１６９に示される、変異型トラスツズマブのプレ重鎖として発現する。細胞のシグナルペプチダーゼによる異種シグナル配列の切断は、Ｎ末端システインを有する成熟重鎖タンパク質

をもたらし、その配列は、配列番号１６６に示される。
【１０２７】
それぞれがアジド官能基を軽鎖のＮ末端に有し、任意にＰＥＧリンカーを有していてもよい第２の一連のアジド修飾トラスツズマブタンパク質（Ｎ３－Ｐｘ－Ｌｃ）を、トラスツズマブタンパク質変異体であるｃｙｓ１Ｌ－ＩｇＧ１を、アジドアセチル－Ｐｘ－ＤＫＴＨＴ－チオフェノールという配列を有するチオエステルと反応させることによって調製する（図３８）。
【１０２８】
Ｃｙｓ１Ｌ－ＩｇＧ１は、配列番号１２９に示す野生型トラスツズマブ重鎖と、システイン残基をその軽鎖Ｎ末端に有する変異型トラスツズマブ軽鎖とからなる。ｃｙｓ１Ｈ－ＩｇＧ１軽鎖は、最初、それぞれＳＨＨシグナルペプチド、ＩＦＮシグナルペプチド、及びＣＥＴＰシグナルペプチドを有する、配列番号１３１、配列番号１３２、及び配列番号１３３に示される、変異型トラスツズマブのプレ軽鎖として発現する。細胞のシグナルペプチダーゼによる異種シグナル配列の切断は、Ｎ末端システインを有する成熟軽鎖タンパク質をもたらし、その配列は、配列番号１３０に示される。
【１０２９】
適切な軽鎖及び重鎖発現ベクターを共トランスフェクトして、ｃｙｓ１Ｈ－ＩｇＧ１及びｃｙｓ１Ｌ－ＩｇＧ１タンパク質を生成する。タンパク質の生成を、例１に記述した通り、ＣＨＯ－ＤＧ４４細胞における一過性発現によって行い、無血清懸濁培養に適応させ、その後、プロテインＡ精製を行う。
【１０３０】
例１０
メルタンシン－トリアゾール－トラスツズマブハイブリッド免疫グロブリン
一連のメルタンシン－トリアゾール－トラスツズマブハイブリッド免疫グロブリンを、シクロオクチン官能基を有するようにさらに修飾されたメイタンシノイドＤＭ１（メルタンシン）を、例９のN_3－Ｐｘ－Ｈｃ及びN_3－Ｐｘ－Ｌｃタンパク質のそれぞれと反応させることによって調製する。
【１０３１】
ＤＭ１（遊離チオール形態：Ｍ．Ｗ．７３７．５ｇ／モル）を、参照によりここに組み込まれる米国特許第５，２０８，０２０号及び第６，３３３，４１０号Ｂ１に以前から記載されている通りに調製する。シクロオクチン官能基を、ＤＭ１の遊離チオール基と反応できるマレイミド基を含有する、ＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－マレイミドヘテロ二官能性リンカーを使用してＤＭ１に付加する（図３９）。例５の手順を使用して、ＤＭ１を、ＤＭＳＯ中のＤＢＣＯ－ＰＥＧ４－マレイミドと反応させる。シクロオクチン修飾ＤＭ１生成物（ＤＭ１－Ｐ４－ＤＢＣＯ）を、ＨＰＬＣにより精製し、使用前にＤＭＳＯに溶解する。
【１０３２】
ＤＭ１－Ｐ４－ＤＢＣＯを、５つのＮ３－Ｐｘ－Ｈｃタンパク質のそれぞれ１つと個々に反応させて（図４０）、トラスツズマブ重鎖のＮ末端でＤＭ１を修飾した一連のメルタンシン－トリアゾール－トラスツズマブハイブリッド免疫グロブリン（ＤＭ１－Ｐ４－トリアゾール－Ｐｘ－Ｈｃ）を生成する（図４１）。
【１０３３】
ＤＭ１－Ｐ４－ＤＢＣＯを、５つのＮ３－Ｐｘ－Ｌｃタンパク質のそれぞれ１つと個々に反応させて（図４２）、トラスツズマブ軽鎖のＮ末端でＤＭ１で修飾した一連のメルタンシン－トリアゾール－トラスツズマブハイブリッド免疫グロブリン（ＤＭ１－Ｐ４－トリアゾール－Ｐｘ－Ｌｃ）を生成する（図４３）。
【１０３４】
新規の抗体薬物複合体としてのメルタンシン－トリアゾール－トラスツズマブハイブリッド免疫グロブリンの有効性を、参照によりここに組み込まれる米国特許第７５２１５４１号Ｂ２に記載されているような、インビトロの細胞増殖アッセイ及びインビボの腫瘍増殖抑制アッセイ使用して、評価し、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ（Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎ

ｃｉｓｃｏ、ＣＡ）から得たアドートラスツズマブエムタンシンと比較する。

【１０３５】

例１１

Ｎ－末端テトラジン－Ｆｃタンパク質

それぞれがテトラジン基をＮ末端に有し、任意にＰＥＧｘリンカーを有していてもよい一連のテトラジン修飾Ｆｃタンパク質（Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃ）を、ヘテロ二官能性リンカーを、例４のアジド修飾N_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と反応させることによって調製した。図４４は、N_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のアジド基と反応できるシクロオクチン基を一方の末端で有し、もう一方の末端でテトラジン基を有する、テトラジン－ＤＢＣＯヘテロ二官能性リンカーを示す。テトラジン－ＤＢＣＯリンカーを、Ｃｌｉｃｋ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｔｏｏｌｓから得た（商品番号１０２２；$C_{32}H_{29}N_7O_6S$、プロトン化；分子量６３９．６８、プロトン化）。使用前に、テトラジン－ＤＢＣＯを、水に濃度２５ｍｇ／ｍＬで溶解した。

【１０３６】

テトラジン－ＤＢＣＯを、各N_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と個々に反応させて（図４４）、対応する一連のＴｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を生成した（図４５）。反応物（０．７２ｍＬ）は、ｐＨ７．０の０．１Ｍのリン酸ナトリウム、０．１８７５ｍｇのテトラジン－ＤＢＣＯリンカー、及び０．６ｍｇのN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を含んだ。反応を、室温で３．５時間行った。過剰な未反応リンカーを、ＨｉＴｒａｐプロテインＡ ＨＰクロマトグラフィーによって除去した。

【１０３７】

図４６は、還元条件（左）及び非還元条件（右）下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、精製されたＴｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を示す：Ｆｃ６対照（レーンａ）、Ｔｅｔ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｂ）、Ｔｅｔ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｃ）、Ｔｅｔ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｄ）、Ｔｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｅ）、及びＴｅｔ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｆ）。Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥでのサイズは、還元条件と非還元条件の両方で、ＰＥＧリンカーの長さが増大するにつれて増大した。加えて、Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のそれぞれが、還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥによる対応するN_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質よりも大きかった（図５０）。

【１０３８】

例１２

Ｎ末端ｔｒａｎｓ－シクロオクテン－Ｆｃタンパク質

それぞれがｔｒａｎｓ－シクロオクテン基をＮ末端に有し、任意にＰＥＧｘリンカーを有していてもよい一連のｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾Ｆｃタンパク質（Ｔｃｏ－Ｐｘ－Ｆｃ）を、ヘテロ二官能性リンカーを例４のアジド修飾N_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と反応させることによって調製する。図４７は、N_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のアジド基と反応できるシクロオクチン基を一方の末端で有し、もう一方の末端でｔｒａｎｓ－シクロオクテン基を有する、ＴＣＯ－ＰＥＧ１２－ＤＢＣＯヘテロ二官能性リンカーを示す。ＴＣＯ－ＰＥＧ１２－ＤＢＣＯリンカーを、Ｃｌｉｃｋ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｔｏｏｌｓから得た（商品番号１００５；$C_{54}H_{81}N_3O_{16}$；分子量１０２８．２３）。使用前に、ＴＣＯ－ＰＥＧ１２－ＤＢＣＯを、ＤＭＳＯに濃度１００ｍｇ／ｍＬで溶解した。

【１０３９】

ＴＣＯ－ＰＥＧ１２－ＤＢＣＯを、各N_3－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と個々に反応させて（図４７）、対応する一連のＴｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を生成した（図４８）。代表的な結果を、ＴＣＯ－ＰＥＧ１２－ＤＢＣＯとN_3－Ｐ３６－Ｆｃタンパク質との反応について示す。反応物（６μＬ）は、ｐＨ７．０の０．１Ｍのリン酸ナトリウム、０．２ｍｇのＴＣＯ－ＰＥＧ１２－ＤＢＣＯリンカー又はＤＭＳＯ中のその一連の２倍希釈液、及び５μｇのN_3－Ｐ３６－Ｆｃタンパク質を含んだ。反応を、室温で３．５時間行った。

【１０４０】

図４９は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによるＴｃｏ－Ｐ１２－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を示す。Ｔｃｏ－Ｐ１２－ＤＭＣＯリンカー濃度（ｍｇ／ｍｌ）は、以下の通りであった：３２（レーンａ）、１６（レーンｂ）、８（レーンｃ）、４（レーンｄ）、２（レーンｅ）、１（レーンｆ）、０．５（レーンｇ）、０．２５（レーンｈ）、０．１２５（レーンｉ）、及び０（レーンｊ）。N_3－Ｐ３６－Ｆｃ（Ｉ）タンパク質のＴｃｏ－Ｐ１２－Ｐ３６－Ｆｃ（ＩＩ）タンパク質への変換は、Ｔｃｏ－Ｐ１２－ＤＢＣＯリンカー濃度１ｍｇ／ｍｌ（レーンｆ）で、本質的に完全であった。さらなる研究において、それによって得られたＴｃｏ－Ｐ１２－Ｐ３６－Ｆｃタンパク質を、ＨｉＴｒａｐプロテインＡＨＰクロマトグラフィーによって精製し、例４に記述した通りに脱塩し、濃縮した。

【１０４１】

テトラジン官能基を有するＴｃｏ－Ｐ１２－Ｐ３６－Ｆｃタンパク質の反応性を試験するために、精製されたＴｃｏ－Ｐ１２－Ｐ３６－Ｆｃタンパク質を、まず、ヘテロ二官能性テトラジン－ＤＢＣＯリンカーと反応させ、ＤＢＣＯ－ＴＴ－Ｐ１２－Ｐ３６－Ｆｃタンパク質を調製し、プロテインＡによって精製し、次いで、Ｑｕａｎｔａ　Ｂｉｏｄｅｓｉｇｎｓから得た、アジド－ＰＥＧ－アミンリンカーであるNH_2－ＰＥＧ２３－N_3（商品番号１０５２５、$C_{48}H_{98}N_4O_{23}$、分子量１０９９．３０）と反応できる能力について試験した。試験の反応物（６μＬ）は、ｐＨ７．０の０．１Ｍのリン酸ナトリウム、０．２ｍｇのNH_2－ＰＥＧ２３－N_3リンカー又はその一連の２倍希釈液、及び５μｇのＤＢＣＯ－ＴＴ－Ｐ１２－Ｐ３６－Ｆｃタンパク質を含んだ。反応を、室温で１時間行った。

【１０４２】

図５０は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる反応生成物を示す。NH_2－ＰＥＧ２３－N_3リンカー濃度（ｍｇ／ｍｌ）は、以下の通りであった：０．１２（レーンａ）、０．０６（レーンｂ）、０．０３（レーンｃ）、０．０１５（レーンｄ）、０．００７５（レーンｅ）、０．００３８（レーンｆ）、０．００２（レーンｇ）、０．００１（レーンｈ）、０（レーンｉ）。Ｔｃｏ－Ｐ１２－Ｐ３６－Ｆｃ（図示せず）ではなく、ＤＢＣＯ－ＴＴ－Ｐ１２－Ｐ３６－Ｆｃ（ＩＩＩ）タンパク質を、期待したNH_2－Ｐ２３－ＮＤ－ＴＴ－Ｐ１２－Ｐ３６－Ｆｃ（ＩＶ）タンパク質に変換し、テトラジン官能基を有するＴｃｏ－Ｐ１２－Ｐ３６－Ｆｃタンパク質の反応性を確認した。

【１０４３】

例１３

ＧＬＰ１－ジヒドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン

一連のＧＬＰ１－ジヒドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン（ＧＬＰ１－Ｐ３－ＴＴ－Ｐｘ－Ｆｃ）を、ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾ＧＬＰ－１類似体を例１１のＴｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と反応させることによって調製した。ＧＬＰ１－ジヒドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンを、テトラジン修飾ＧＬＰ－１類似体を例１２のＴｃｏ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と反応させることによっても調製する。

【１０４４】

ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾ＧＬＰ－１類似体を調製するために、ｇｌｙ８－ｇｌｕ２２－ＧＬＰ－１（７－３７）－ＰＥＧ３－ｃｙｓ－ＮＨ２ペプチドを、ヘテロ二官能性リンカーと反応させた。ＴＣＯ－ＰＥＧ３－マレイミドは、Ｃ末端システイン残基上で遊離チオール基と反応できるマレイミド基を含有する（図５１）。ＴＣＯ－ＰＥＧ３－マレイミド（$C_{26}H_{41}N_3O_8$、分子量５２３．６２）を、Ｃｌｉｃｋ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｔｏｏｌｓから得た（商品番号１００２）。使用前に、リンカーを、ＤＭＳＯに濃度２５ｍｇ／ｍＬで溶解した。反応物（０．４２ｍｌ）は、ｐＨ６．５の５０ｍＭのＭＥＳ、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．４５ｍｇのｇｌｙ８－ｇｌｕ２２－ＧＬＰ－１（７－３７）－ＰＥＧ３－ｃｙｓ－NH_2ペプチド、及び０．３７５ｍｇのＴＣＯ－ＰＥＧ３－マレイミドリンカーを含んだ。反応を、室温で６０分間行った。過剰な未反応リンカーを、５ｍＬのＨｉＴｒａｐ脱塩カラムを使用した、ｐＨ７．０の０．０２Ｍのリン酸ナトリウムへのバッファー交換によって除去した。図５１は、ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾ＧＬＰ－１

類似体（ＧＬＰ１－Ｐ６－Ｔｃｏ）の構造を示す。

【１０４５】

ＧＬＰ１－Ｐ６－Ｔｃｏペプチドを、Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のそれぞれと個々に反応させて（図５２）、ＧＬＰ１－Ｐ３－ＴＴ－Ｐｘ－Ｆｃシリーズのハイブリッド免疫グロブリンを生成した（図５３）。反応物（０．９９ｍｌ）は、ｐＨ７．０の０．１Ｍのリン酸ナトリウム、０．１４５ｍｇのＧＬＰ１－Ｐ６－Ｔｃｏペプチド、及び０．３３ｍｇの各Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を含んだ。反応を、室温で３０分間行った。次いで、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐｘ－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンを、ＨｉＴｒａｐプロテインＡ　ＨＰでクロマトグラフィーによって精製された。

【１０４６】

テトラジン修飾ＧＬＰ－１類似体を調製するために、ｇｌｙ８－ｇｌｕ２２－ＧＬＰ－１（７－３７）－ＰＥＧ３－ｃｙｓ－ＮＨ２ペプチドを、二官能性リンカーと反応させる。テトラジン－ＰＥＧ４－マレイミドは、Ｃ末端システイン残基上で遊離チオール基と反応できるマレイミド基を含有する（図５４）。テトラジン－ＰＥＧ４－マレイミド（$C_{29}H_{39}N_7O$、分子量６１３．６６）を、Ｃｌｉｃｋ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｔｏｏｌｓから得た（商品番号Ａ１３９）。使用前に、リンカーをＤＭＳＯに濃度２５ｍｇ／ｍＬで溶解する。反応物（０．４２ｍｌ）は、ｐＨ６．５の５０ｍＭのＭＥＳ、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．４５ｍｇのｇｌｙ８－ｇｌｕ２２－ＧＬＰ－１（７－３７）－ＰＥＧ３－ｃｙｓ－ＮＨ２ペプチド及び０．３７５ｍｇのテトラジン－ＰＥＧ４－マレイミドリンカーを含む。反応を、室温で６０分間行う。過剰な未反応リンカーを、５ｍＬのＨｉＴｒａｐ脱塩カラムを使用した、ｐＨ７．０の０．０２Ｍのリン酸ナトリウムへのバッファー交換によって除去する。図５４は、テトラジン修飾ＧＬＰ－１類似体（ＧＬＰ１－Ｐ７－Ｔｅｔ）の構造を示す。

【１０４７】

ＧＬＰ１－Ｐ７－Ｔｅｔペプチドを、Ｔｃｏ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のそれぞれと個々に反応させて（図５５）、ＧＬＰ１－Ｐ７－ＴｅｔＴｃｏ－Ｐｘ－Ｆｃシリーズのハイブリッド免疫グロブリンを生成する（図５６）。反応物（０．９９ｍｌ）は、ｐＨ７．０の０．１Ｍのリン酸ナトリウム、０．１４５ｍｇのＧＬＰ１－Ｐ７－Ｔｅｔペプチド、及び０．３３ｍｇの各Ｔｃｏ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を含む。反応を、室温で３０分間行う。次いで、ＧＬＰ１－Ｐ７－Ｔｅｔ／Ｔｃｏ－Ｐｘ－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンを、ＨｉＴｒａｐプロテインＡ　ＨＰでクロマトグラフィーによって精製する。

【１０４８】

図５７は、還元条件（左）及び非還元条件（右）下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、精製されたＧＬＰ１－ジドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンを示す：Ｆｃ６対照（レーンａ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｂ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｃ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｄ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｅ）、及びＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｆ）。ＧＬＰ１－ジヒドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンのサイズは、Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と同様にＰＥＧリンカーの長さと共に増大した。

【１０４９】

図５８は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、Ｎ３－Ｐｘ－Ｆｃ（ＩＩ）タンパク質、Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃ（ＩＩ）タンパク質、及びＧＬＰ１－ジヒドロピリジジン－Ｆｃ（ＩＩＩ）ハイブリッド免疫グロブリンを直接比較する：Ｆｃ６対照（レーンａ）、N_3－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｂ）、Ｔｅｔ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｃ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｄ）、N_3－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｅ）、Ｔｅｔ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｆ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｇ）、N_3－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｈ）、Ｔｅｔ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｉ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｊ）、N_3－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｋ）、Ｔｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｌ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｍ）、N_3－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｎ）、Ｔｅｔ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｏ）、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｐ）。各

Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質の対応するＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐｘ－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンへの変換率は、約９２％であった。

【１０５０】

図５９は、ＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＢＣＯとN_3－Ｐ３６－Ｆｃとの反応の時間的経過、及びＧＬＰ１－Ｐ６－ＴｃｏとＴｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃとの反応の時間的経過を示す。各反応を、過剰な競合物の添加によって終了させることを除いて、示した様々な時間について、反応を上記の通りに行った。ＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＢＣＯとN_3－Ｐ３６－Ｆｃとの反応のために、アジドナトリウムを添加して、最終濃度０．１％にし、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴｃｏとＴｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃとの反応のために、ＴＣＯ－ＰＥＧ３－マレイミドを添加して、最終濃度３．５ｍｇ／ｍｌにした。各反応を、還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した：（上側パネル）０、１、２、４、６、２４、４８、７２時間の間、N_3－Ｐ３６－Ｆｃ単独（レーンａ）、N_3－Ｐ３６－Ｆｃ＋ＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＢＣＯ；（下側パネル）－４、－２、－１、０、１、２、４分間の間、Ｔｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃ単独（レーンａ）、Ｔｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃ＋ＴＣＯ－ＰＥＧ３－マレイミドのみ（レーンｂ）、Ｔｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃ＋ＧＬＰ１－Ｐ６－Ｔｃｏ。ＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＮ－Ｐ３６－Ｆｃ（ＩＩ）の形成を引き起こす、ＧＬＰ１－Ｐ６－ＴｃｏとＴｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃ（Ｉ）との反応は、非常に速く、１分以内に終了するのに対して、ＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＮ－Ｐ３６－Ｆｃ（ＩＩ）の形成を引き起こす、ＧＬＰ１－Ｐ７－ＤＢＣＯとN_3－Ｐ３６－Ｆｃ（Ｉ）との反応は、６時間後にたった５０％の終了である。

【１０５１】

ＧＬＰ１－Ｐ６－ジヒドロピリリジン－Ｐｘ－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンの生物学的活性を、例６に記述した細胞ベースのアッセイにおいて評価した。図６０は、ＧＬＰ－１（７－３７）ペプチド及びＧＬＰ１－Ｐ６－ＴＴ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質（ｘ＝０、１２、２４、３６、４８）についての結果を示す。５つのＧＬＰ１－ジヒドロピリジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンすべてが、ＧＬＰ－１（７－３７）ペプチドと同様にｃＡＭＰレベルを誘導した。ＧＬＰ－１（７－３７）による刺激は、細胞が、アゴニストに１時間、４時間又は２４時間晒されていようと同じであり、ＥＣ５０は、２４時間で約２ｎＭであったが、ＧＬＰ１－ジヒドロピリジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンによる刺激は、細胞が、より長い時間アゴニストに晒されると劇的に増大し、ＥＣ５０は、２４時間で約０．２ｎＭであった。

【１０５２】

例１４

アダリムマブＦａｂ－ジヒドロピリジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン

一連のＦａｂ－ジヒドロピリジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン（Ｆａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐｘ－Ｆｃ）を、ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾Ｆａｂフラグメントを例１１のＴｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と反応させることによって調製した。Ｆａｂ－ジヒドロピリジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンを、テトラジン修飾Ｆａｂフラグメントを例１２のＴｃｏ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と反応させることによっても調製する。

【１０５３】

ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾Ｆａｂを調製するために、ＴＣＥＰ処理したＦａｂを、ＴＣＥＰ処理したＦａｂ上で遊離チオール基と反応できるマレイミド基を含有する、ヘテロ二官能性リンカーであるＴＣＯ－ＰＥＧ３－マレイミドと反応させた（図６１）。Ｆａｂフラグメントを、製造業者の使用説明書に従って、Ｐｉｅｒｃｅ（商標）Ｆａｂ　Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（カタログ番号４４９８５）を使用して、Ａｂｂｏｔｔから得た１０ｍｇのアダリムマブ（Ｈｕｍｉｒａ（商標））のパパイン消化によって生成した。消化後、Ｆａｂフラグメントを、ＨｉＴｒａｐプロテインＡ　ＨＰでクロマトグラフィーによって精製し、Ｆｃフラグメント及び未消化抗体を除去した。Ｆａｂフラグメントを含有するフロースルーフラクションを、ＰＢＳにバッファー交換し、５ｍｇ／ｍｌに濃縮した。

【１０５４】

ＴＣＥＰによるＦａｂフラグメントの部分的還元のために、反応物（０．２６ｍｌ）は、ｐＨ７．０の０．１Ｍのリン酸ナトリウム、０．５ｍｇのＦａｂ、及び０．０８ｍｇ／ｍｌのＴＣＥＰを含んだ。室温での６０分のインキュベーション後、ｐＨ７．０の０．３Ｍのリン酸ナトリウム０．２４ｍｌ、及び０．２２ｍｌの水の添加によって、反応物を０．７２ｍｌにした。次いで、ＴＣＯ－ＰＥＧ３－マレイミドリンカーを、反応物（ＤＭＳＯ中の濃度５０μｇ／ｍｌで０．１２ｍｌ）に付加し、反応物を、室温で２０分間インキュベートした。ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾Ｆａｂを、ＰＤ－１０カラムで、ｐＨ７．０の０．０２Ｍのリン酸ナトリウムにバッファー交換し、過剰なリンカーを除去し、最終生成物を、２．７ｍｇ／ｍｌに濃縮した。これらの条件下で、９０％超のＦａｂ重鎖及び１０％未満のＦａｂ軽鎖を、ＴＣＯ－ＰＥＧ３－マレイミドリンカーによって修飾した。図６１は、ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾Ｆａｂタンパク質（Ｆａｂ－Ｐ３－Ｔｃｏ）の構造を示す。

【１０５５】

Ｆａｂ－Ｐ３－Ｔｃｏタンパク質を、Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のそれぞれと個々に反応させて（図６２）、Ｆａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐｘ－Ｆｃシリーズのハイブリッド免疫グロブリンを生成した（図６３）。反応物（６μｌ）は、Ｈ７．０の０．１Ｍのリン酸ナトリウム、３．６μｇのＦａｂ－Ｐ３－Ｔｃｏタンパク質、及び１μｇの各Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を含んだ。反応を、室温で６０分間行った。

【１０５６】

図６４は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥによる、Ｆａｂ－ジヒドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンを示す：マーカー（レーンａ）、アダリムマブ（レーンｂ）、Ｆａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｃ）、Ｆａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｄ）、Ｆａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｅ）、Ｆａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｆ）、Ｆａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｇ）、Ｆａｂ－Ｐ３－Ｔｃｏ（レーンｈ）、Ｔｅｔ－Ｐ０－Ｆｃ（レーンｉ）、Ｔｅｔ－Ｐ１２－Ｆｃ（レーンｊ）、Ｔｅｔ－Ｐ２４－Ｆｃ（レーンｋ）、Ｔｅｔ－Ｐ３６－Ｆｃ（レーンｌ）、Ｔｅｔ－Ｐ４８－Ｆｃ（レーンｍ）。アダリムマブ（レーンｂ）と比較して、Ｆａｂ－ジヒドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンは、期待したサイズを有しており、それは、Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と同様にＰＥＧリンカーの長さと共に増大したことを示す。各Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質の対応するＦａｂ－Ｐ３－ＴＴ－Ｐｘ－ＦｃハイブリッドＦ免疫グロブリンへの変換率は、約７５％であった。

【１０５７】

例１５

オランザピン－ジヒドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン

この例において、ハイブリッド免疫グロブリンを、第１級アミン、第２級アミン又はアルコール化合物のアジド誘導体で調製する。アジド誘導体化合物を、参照によりここに組み込まれるＰｏｔｈｕｋａｎｕｒｉ，Ｓ．ａｎｄ Ｗｉｎｓｓｉｎｇｅｒ，Ｎ．、Ｏｒｇ Ｌｅｔｔ．２００７；９（１１）：２２２３－５に記載されている通りに調製してもよい。第１級アミン、第２級アミン又はアルコール化合物を、まず、クロロギ酸クロロアルキルと反応させて、カルバミン酸クロロアルキルを得て、塩化物のアジド置換がそれに続き、カルバミン酸アジドアルキルがもたらされる。すべての化学物質をＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから得る。

【１０５８】

まず、オランザピン（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号０１１４１）を、参照によりここに組み込まれる２０１３年１０月１０日に公開された米国特許出願１３／８０１，３４４、公開番号ＵＳ２０１３０２６７５０５Ａ１に記載されているように、クロロギ酸クロロメチルと反応させる。オランザピン（６０ｍｍｏｌ）及びトリエチルアミン（１２０ｍｍｏｌ）の無水ジクロロメタン（２５０ｍｌ）溶液を、透明の溶液が形成されるまで３５℃に温め、次いで、５℃まで冷却する。次いで、クロロギ酸クロロメチル（９０ｍｍｏｌ）を２０分かけて添加する。他の適切なクロロギ酸クロロアルキルとしては、クロロギ酸２－ク

ロロエチル、クロロギ酸３－クロロプロピル、及びクロロギ酸４－クロロブチルが挙げられる。反応物を、室温で３０分間撹拌し、室温にまで温める。室温で１５分後、反応混合物を、ジクロロメタン（１００ｍｌ）で希釈し、次いで、飽和$NaHCO_3$水溶液（７５ｍｌ）及び水（３５０ｍｌ）で洗浄する。有機相をＭｇＳＯ４で乾燥して、ろ過する。次いで、有機相を、真空中で４５℃で濃縮し、体積１５０ｍｌにする。混合物を３０ｍｌの酢酸エチルで希釈し、真空中でさらに蒸発させる（２０～３０ｍｌ）。混合物を室温まで冷却し、得られた沈殿物をろ過し、酢酸エチルで洗浄する。真空中で３５℃で、９０分間乾燥した後、クロロメチル、２－メチル－４－（４－メチルピペラジン－１－イル）－５Ｈ－ベンゾ［ｂ］チエノ［２，３－ｅ］［１，４］ジアゼピン－５－カルボキシレートを得る。次いで、この化合物（１．５当量）を、室温で、CH_3CN：Ｈ２Ｏ（１：１、０．３Ｍ）中で、NaN_3（１．５当量）で８～３６時間処理する。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、有機相を水、ブラインで洗浄し、次いで、Na_2SO_4で乾燥し、真空中で濃縮した。ＨＰＬＣによる精製は、アジドオランザピン誘導体であるアジドメチル２－メチル－４－（４－メチルピペラジン－１－イル）－５Ｈ－ベンゾ［ｂ］チエノ［２，３－ｅ］［１，４］ジアザピン－５－カルボキシレートをもたらす（図６５）。

【１０５９】

次いで、以下の通り、アジド－オランザピン誘導体を使用して、一連のオランザピン－ジヒドロピリジジン－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリン（Ｏｌａ－Ｐ１２－ＴＴ－Ｐｘ－Ｆｃ）を調製する。第１の工程において、アジド－オランザピン誘導体を、ヘテロ二官能性リンカーを使用して、ｔｒａｎｓ－シクロオクテン官能基で修飾する。第２の工程において、ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾オランザピンを、例１１のＴｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質と反応させる。

【１０６０】

ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾オランザピンを調製するために、アジド－オランザピン誘導体を、アジド基と反応できるシクロオクチン基を含有する、ヘテロ二官能性リンカーであるＴＣＯ－ＰＥＧ１２－ＤＢＣＯと反応させる（図６５）。反応物（１ｍｌ）は、０．５ｍｇのアジド－オランザピン誘導体、及びＤＭＳＯ中の５ｍｇのＴＣＯ－ＰＥＧ１２－ＤＢＣＯリンカーを含む。反応を、室温で３～２０時間行う。ｔｒａｎｓ－シクロオクテン修飾オランザピン（Ｏｌａ－Ｐ１２－Ｔｃｏ）を、ＨＰＬＣによって精製し、過剰な未反応ＴＣＯ－ＰＥＧ１２－ＤＢＣＯリンカーを除去する。使用前に、Ｏｌａ－Ｐ１２－Ｔｃｏを、ＤＭＳＯに濃度１ｍｇ／ｍＬで溶解する。

【１０６１】

Ｏｌａ－Ｐ１２－Ｔｃｏを、Ｔｅｔ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質のそれぞれと個々に反応させて（図６６）、Ｏｌａ－Ｐ１２－ＴＴ－Ｐｘ－Ｆｃシリーズのハイブリッド免疫グロブリンを生成する（図６７）。反応物（１ｍｌ）は、０．１ｍｇのＧＬＰ１－Ｐ７－Ｔｅｔペプチド、及びＤＭＳＯ中の０．３３ｍｇの各Ｔｃｏ－Ｐｘ－Ｆｃタンパク質を含む。反応を、室温で６０分間行う。次いで、Ｏｌａ－Ｐ１２－ＴＴ－Ｐｘ－Ｆｃハイブリッド免疫グロブリンを、ＨｉＴｒａｐプロテインＡ　ＨＰでクロマトグラフィーによって精製する。

【１０６２】

考察

本発明の側面は、大型の結合ドメイン、たとえば、Ｆａｂ自体又は受容体細胞外ドメインを取り込む非タンパク質ヒンジによる抗体の化学半合成を提供する。本発明は、コグネイトタンパク質の未変性の構造及び機能に適合し、効率的に進行する連結反応の同定に関する。本発明の側面は、可動性並びに伸長可能である非タンパク質鎖を有する化合物を提供する。本発明の態様において提供される抗体様分子は、これらの疾患標的への結合親和性を改善した治療薬候補として非常に大きな可能性をもつ。

【図１】

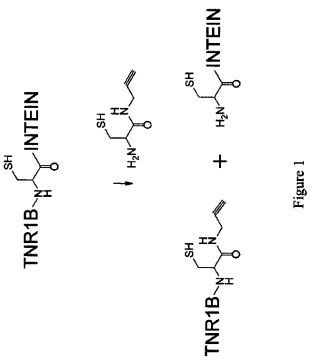


Figure 1

【図２】

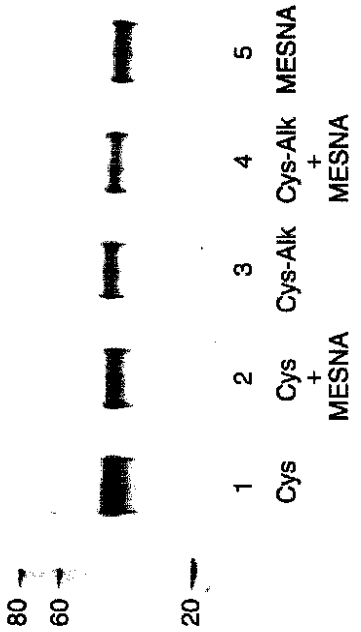


Figure 2

【図３】

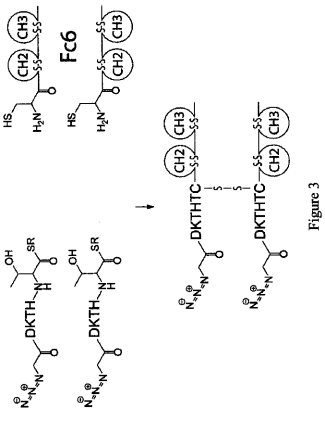


Figure 3

【図４】

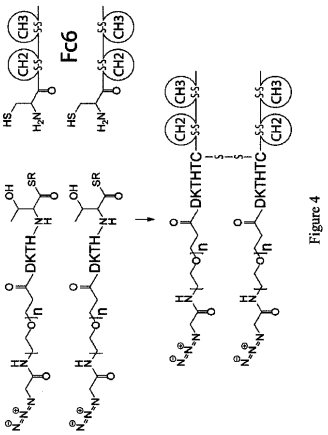


Figure 4

【図５】

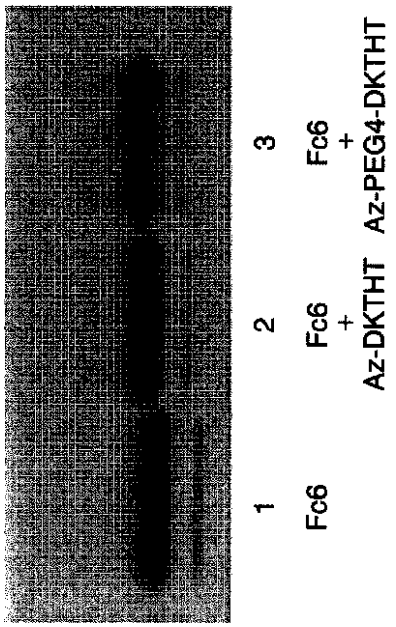


Figure 5

【図６】

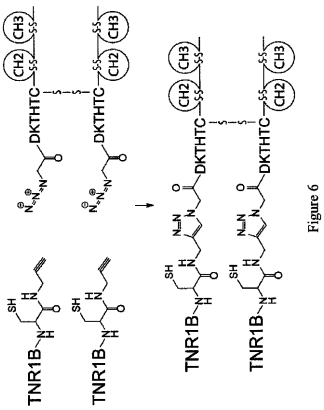


Figure 6

【図７】

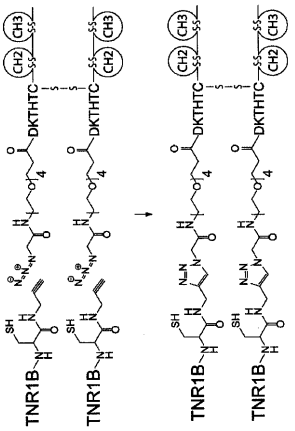


Figure 7

【図８】

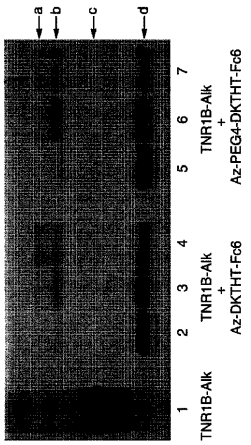


Figure 8

【図９】

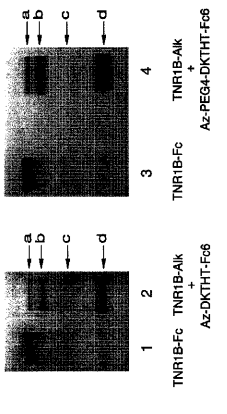


Figure 9

【図１０】

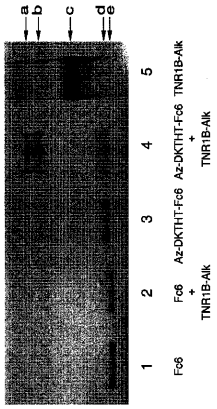


Figure 10

【図１１】

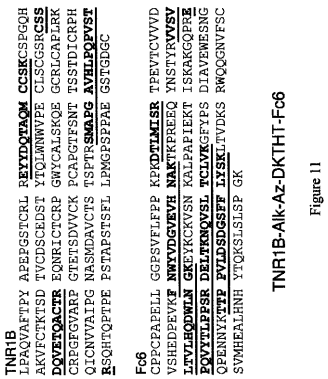


Figure 11

【図１２】

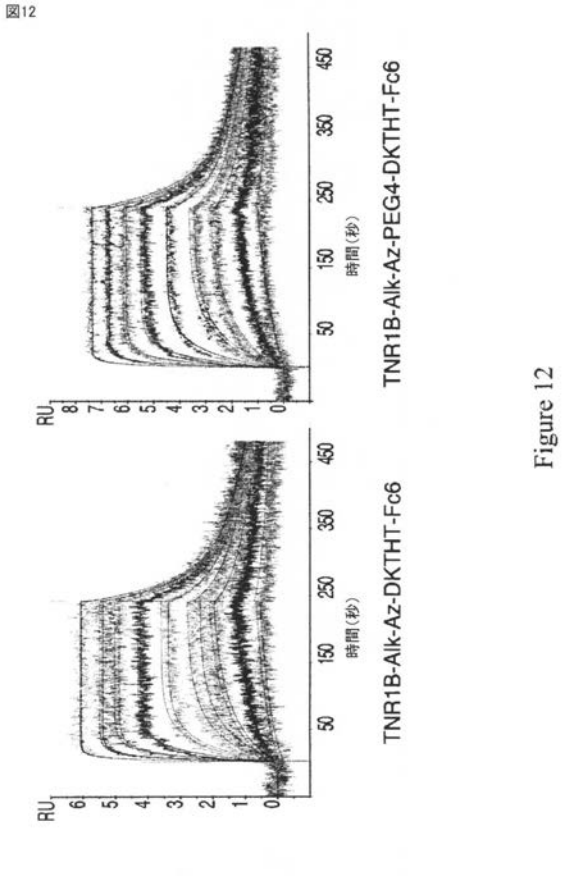


Figure 12

【図１３】

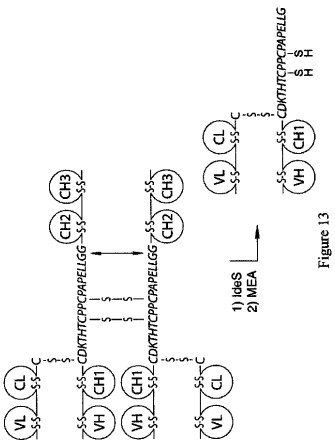


Figure 13

【図１４】

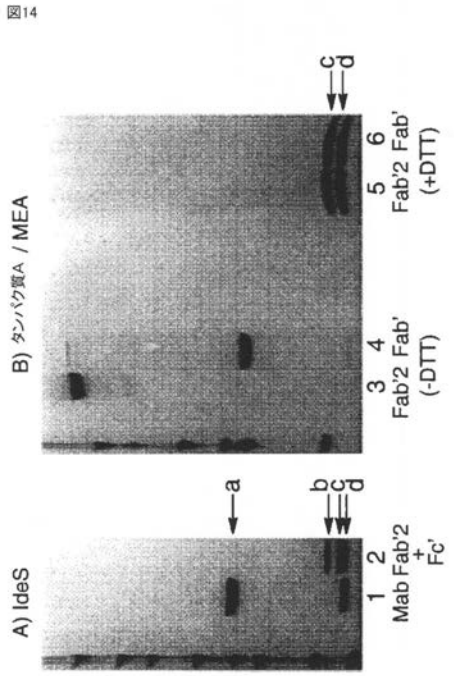


Figure 14

【図１５】

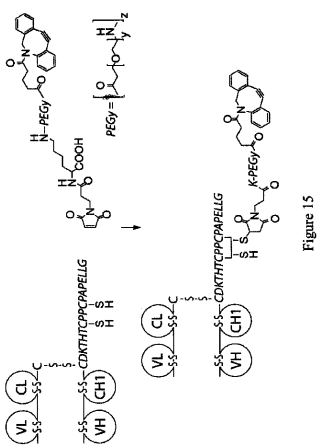


Figure 15

【図１６】

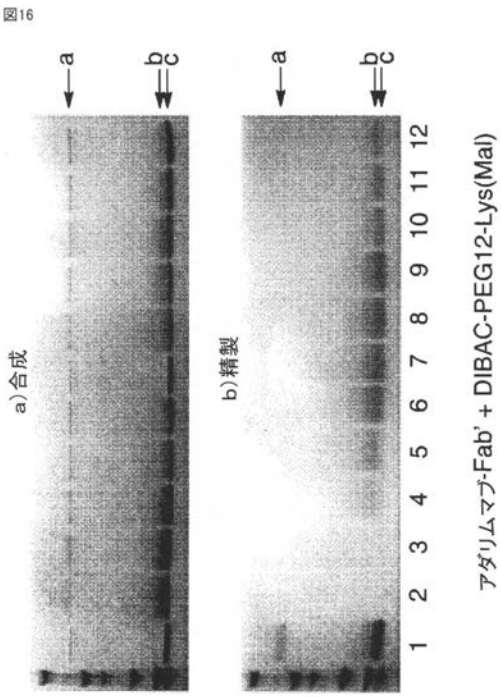


Figure 16

【図１７】

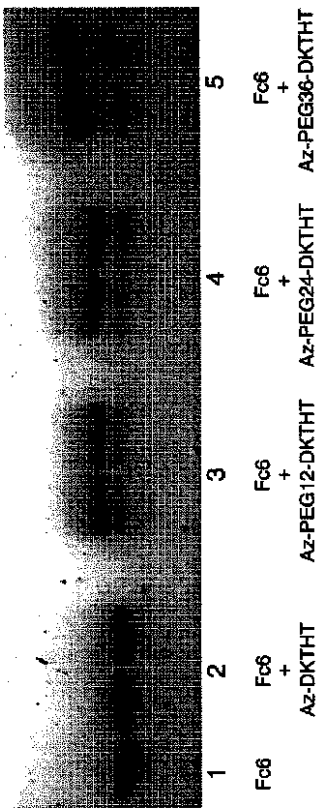


Figure 17

【図１８】

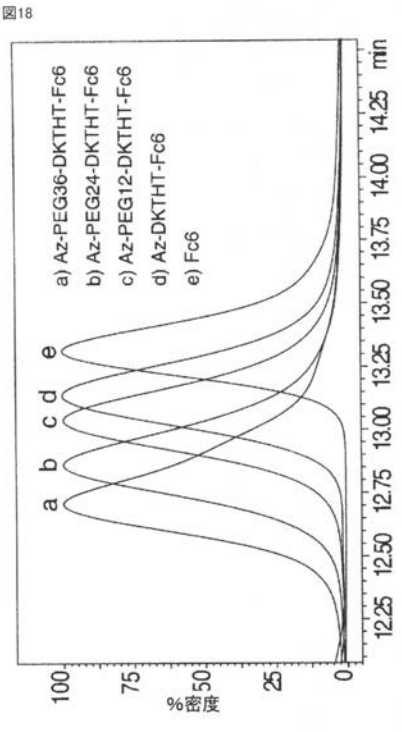


Figure 18

【図１９】

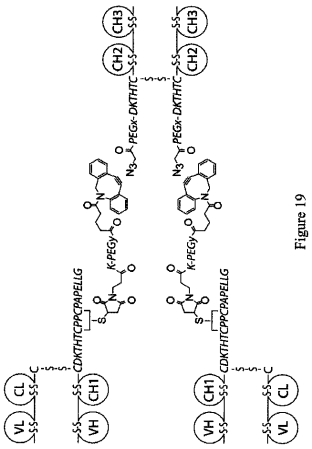


Figure 19

【図２０】

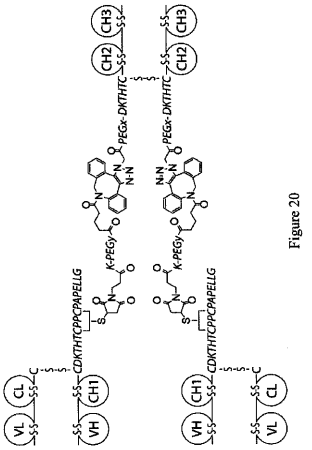


Figure 20

【図２１】

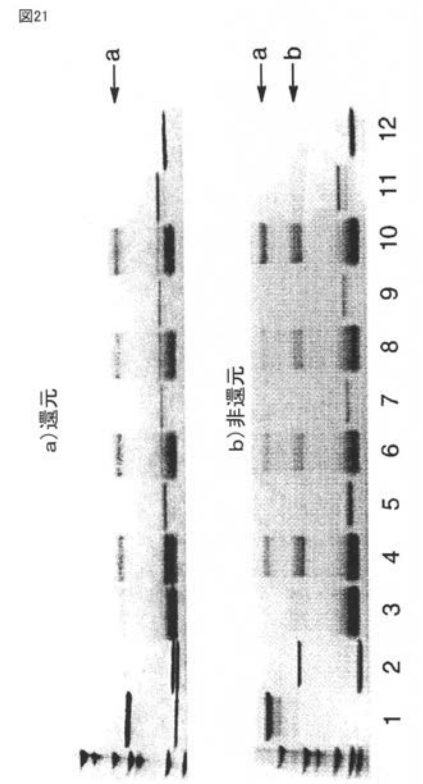


Figure 21

【図２２】

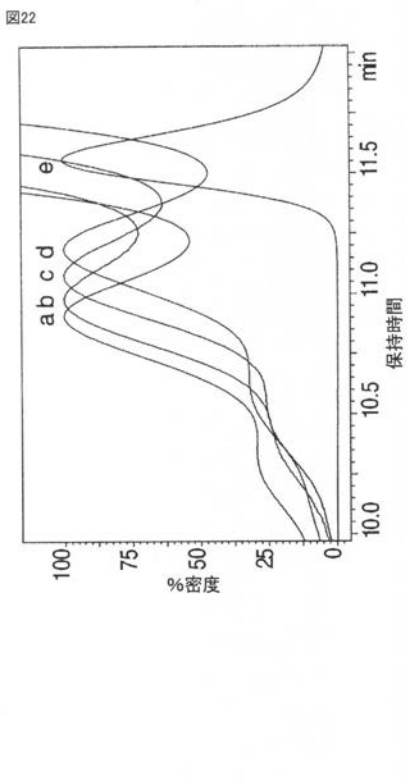


Figure 22

【図２３】

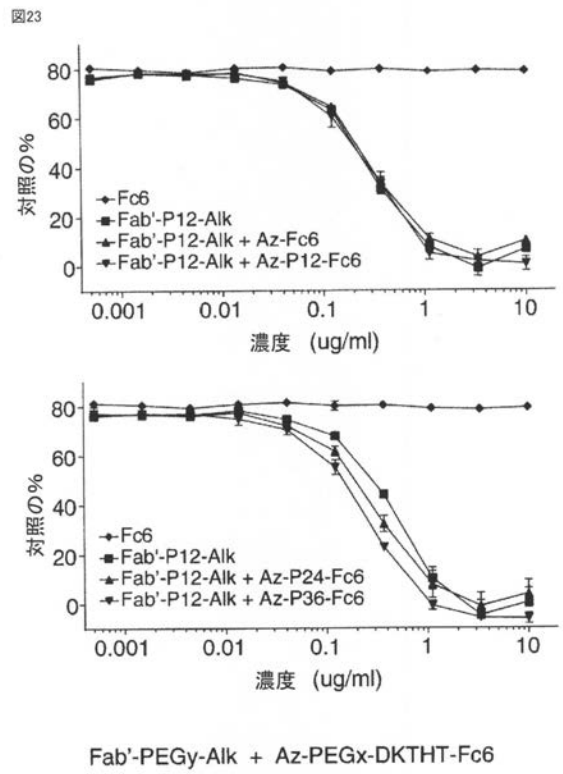


Figure 23

【図２４】

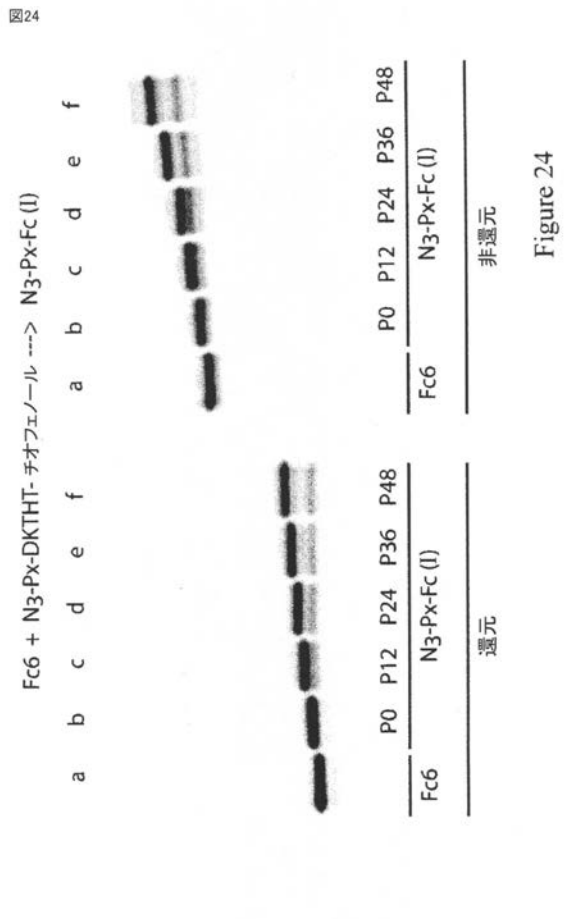


Figure 24

【図２５】

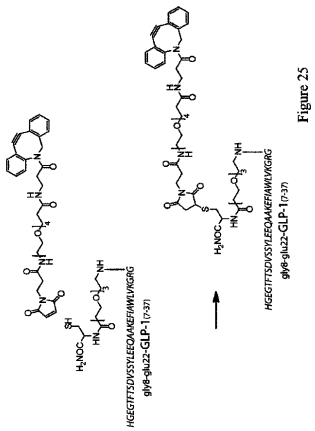


Figure 25

【図２６】

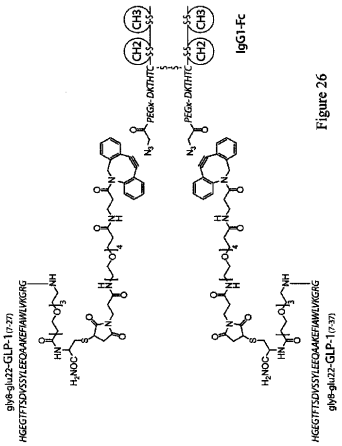
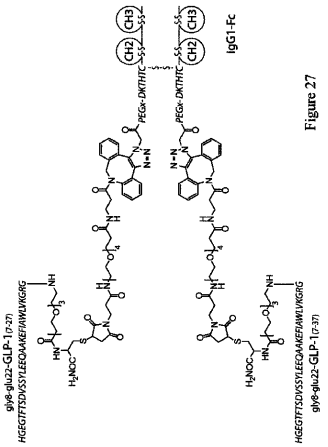
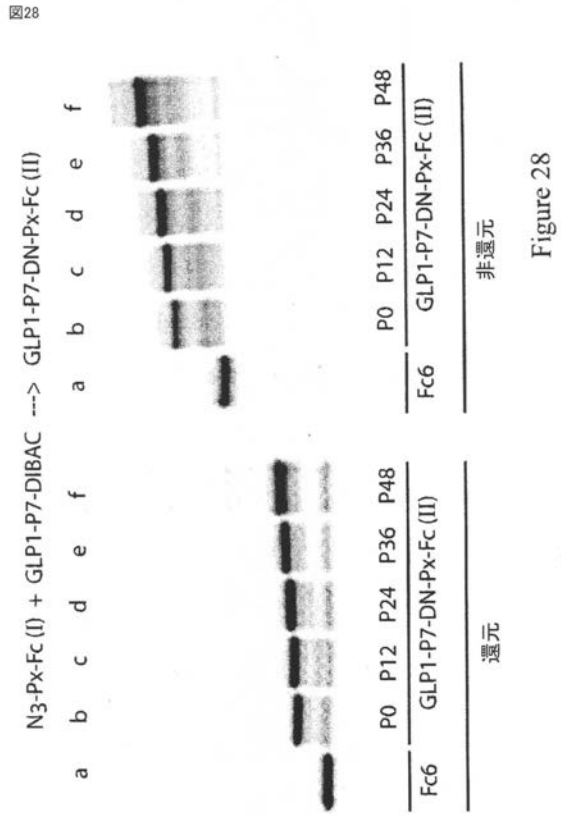


Figure 26

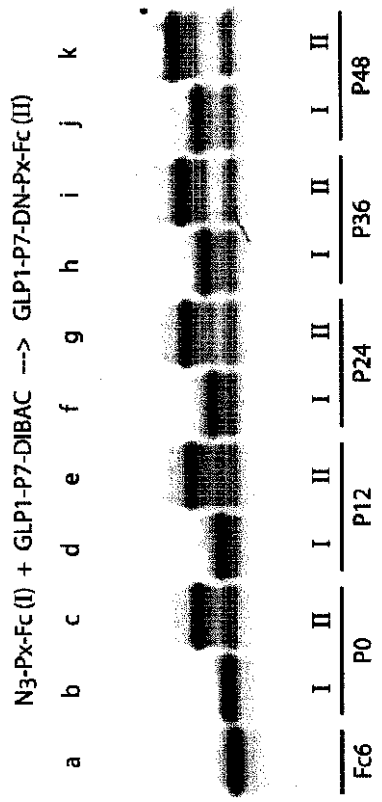
【図２７】



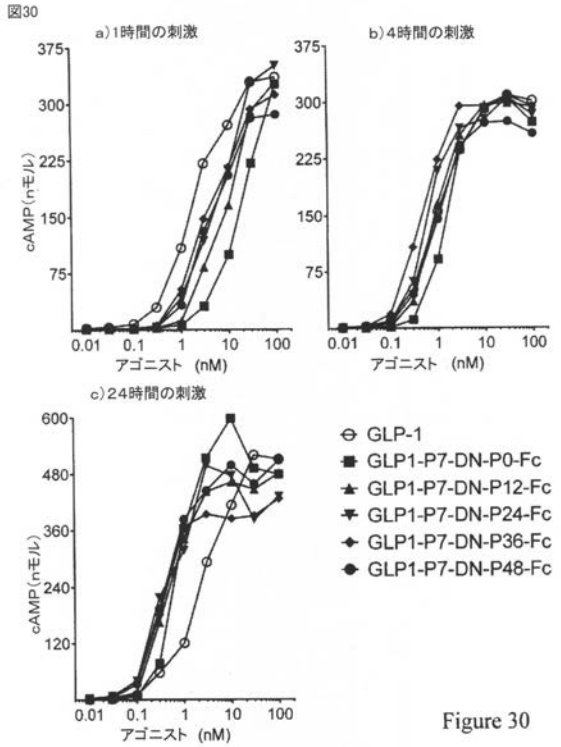
【図２８】



【図２９】



【図３０】



【図３１】

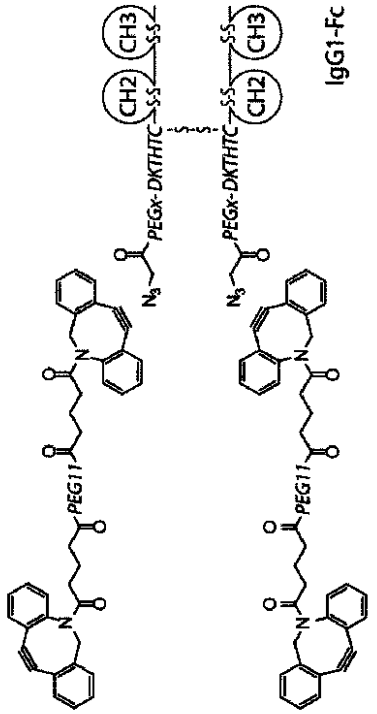


Figure 31

【図３２】

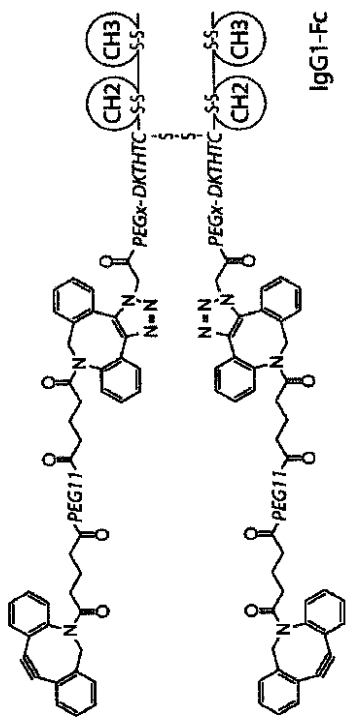


Figure 32

【図３３】



Figure 33

【図３４】

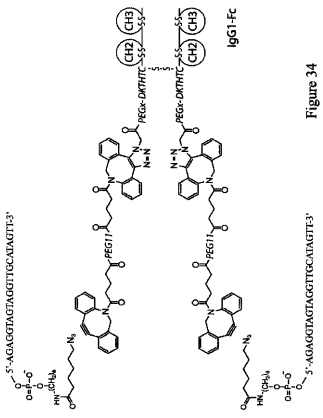


Figure 34

【図３５】

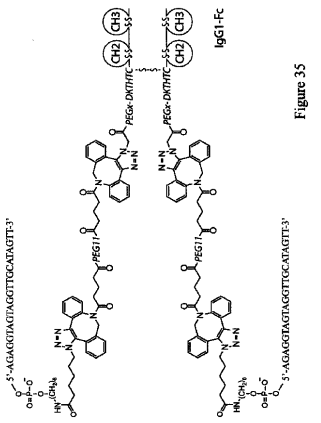


Figure 35

【図３６】

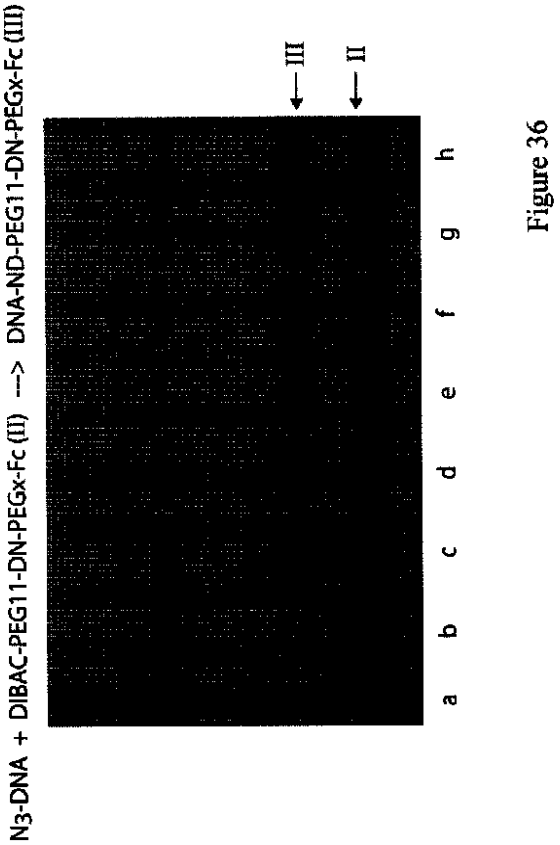


Figure 36

【図３７】

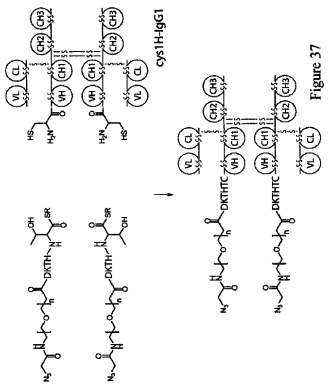


Figure 37

【図３８】

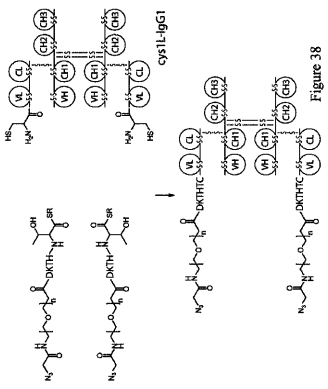


Figure 38

【図３９】

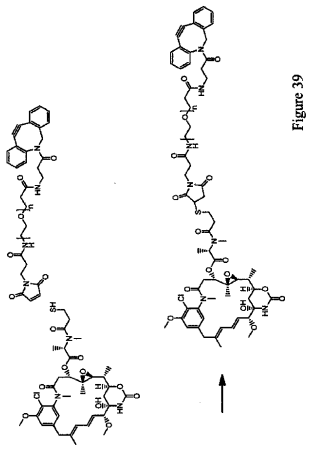


Figure 39

【図４０】

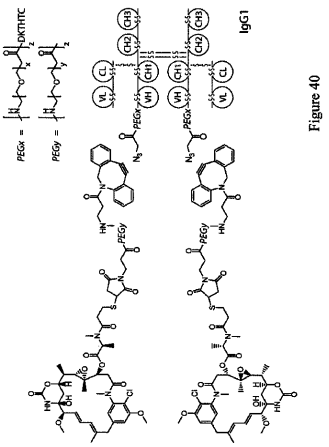


Figure 40

【図４１】

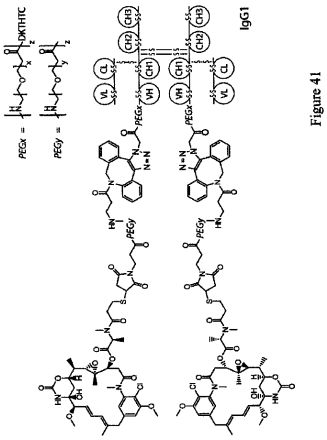


Figure 41

【図４２】

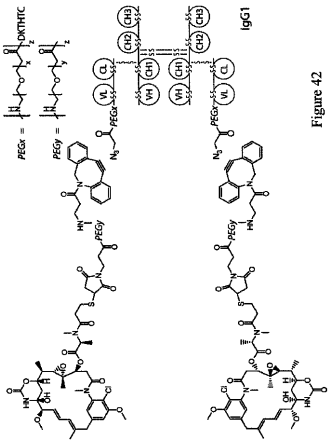


Figure 42

【図４３】

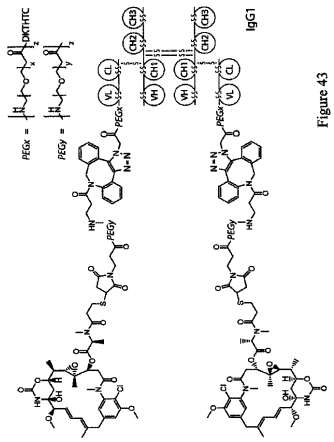


Figure 43

【図４４】

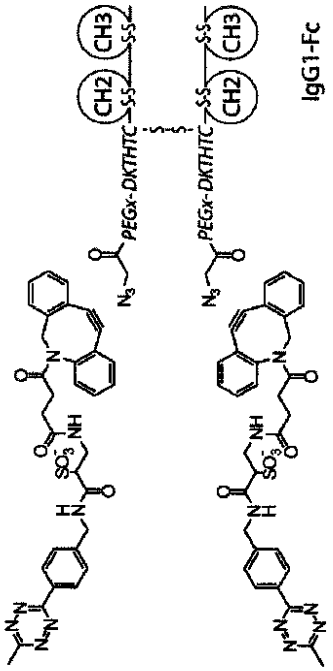


Figure 44

【図４５】

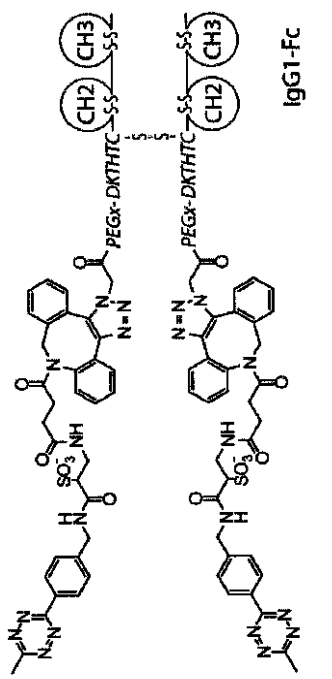


Figure 45

【図４６】

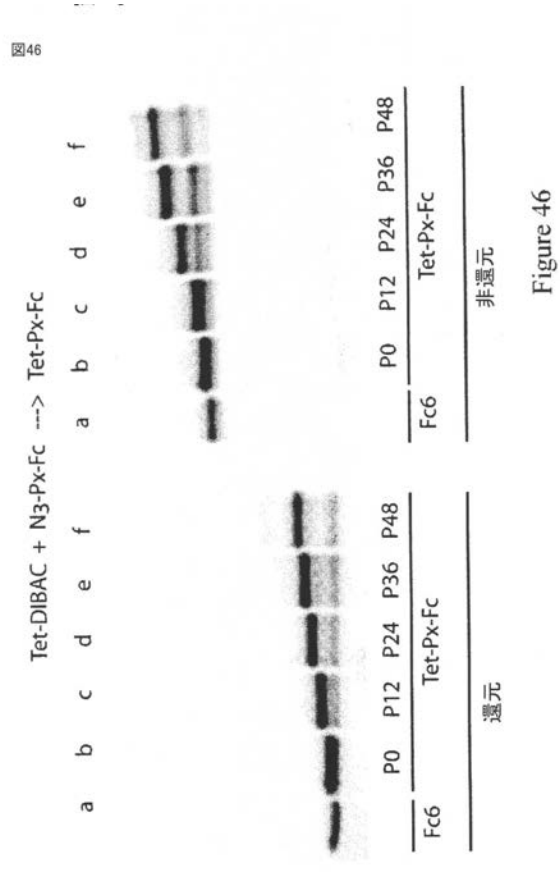


Figure 46

【図４７】

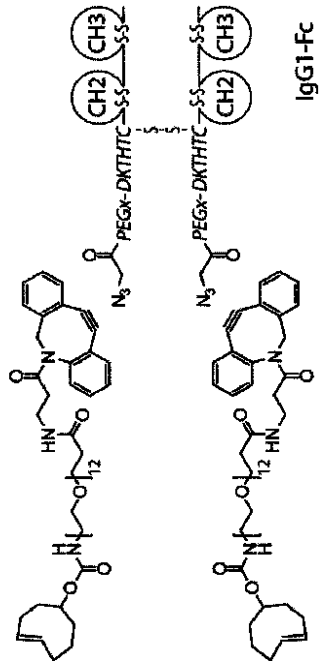


Figure 47

【図４８】

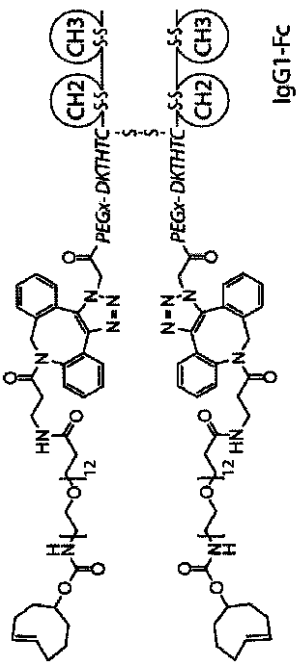


Figure 48

【図４９】

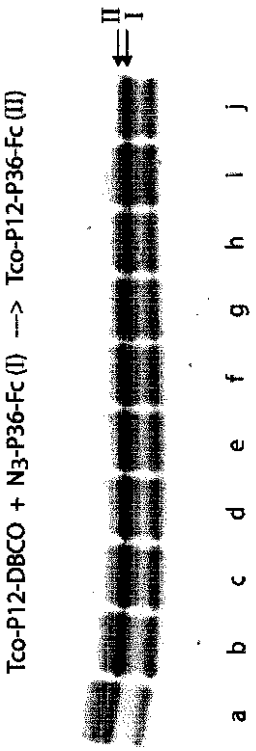


Figure 49

【図５０】

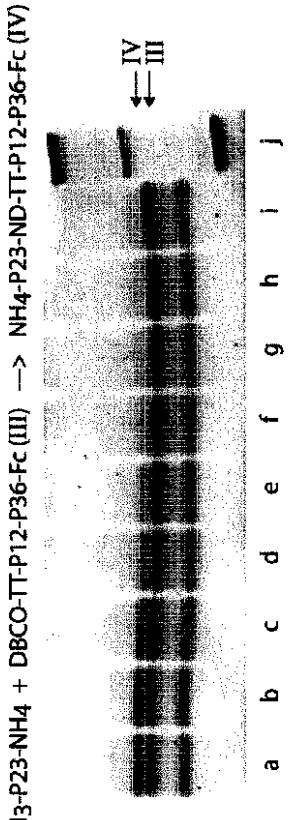


Figure 50

【図５１】

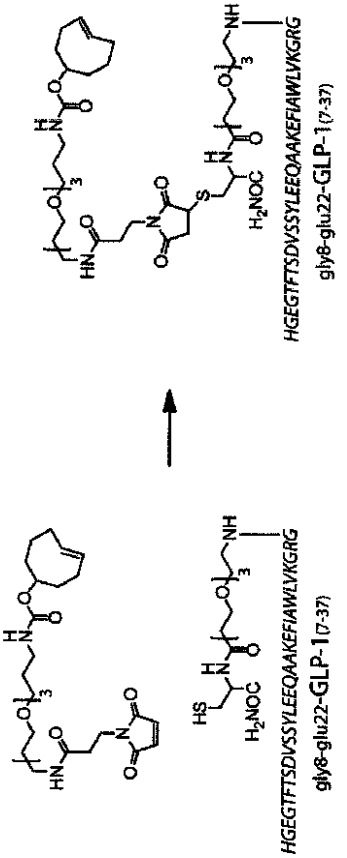


Figure 51

【図５２】

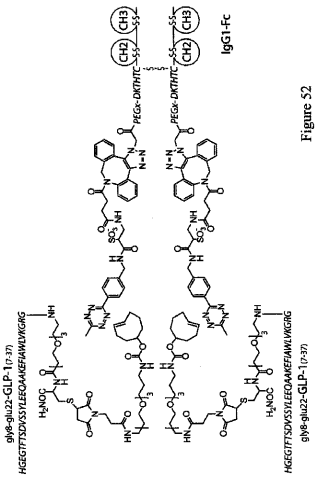


Figure 52

【図５３】

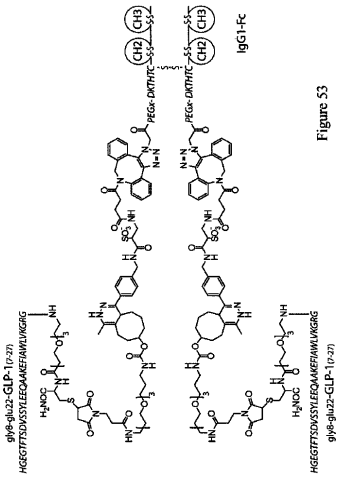


Figure 53

【図５４】

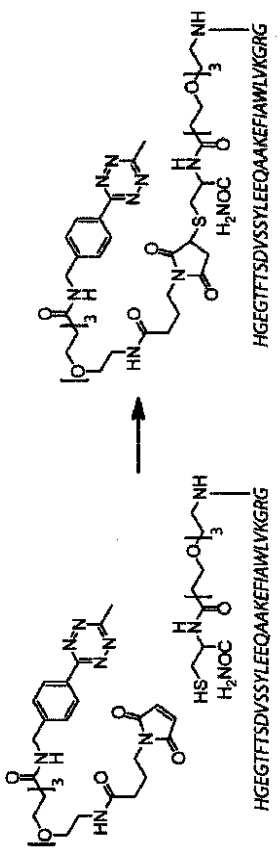


Figure 54

【図５５】

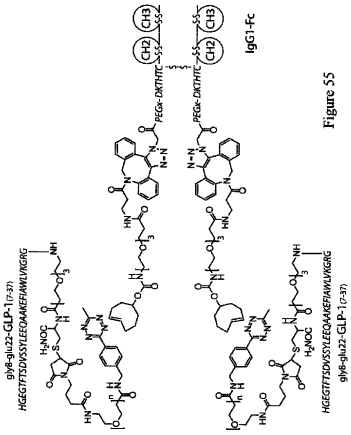


Figure 55

【図５６】

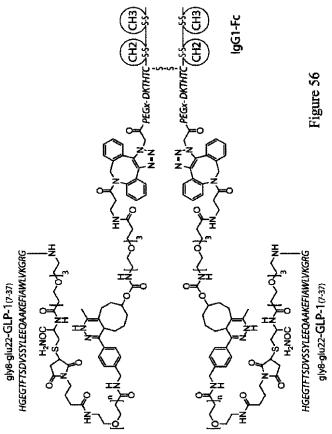


Figure 56

【図５７】

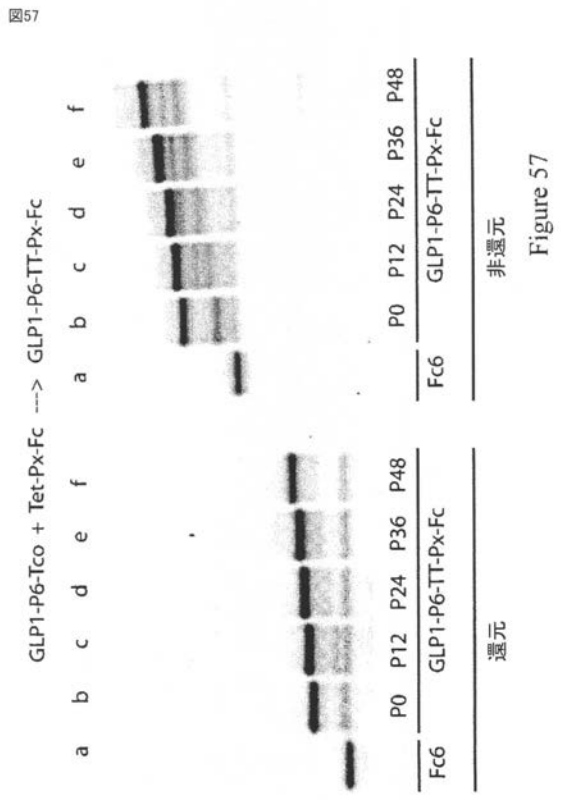


Figure 57

【図５８】

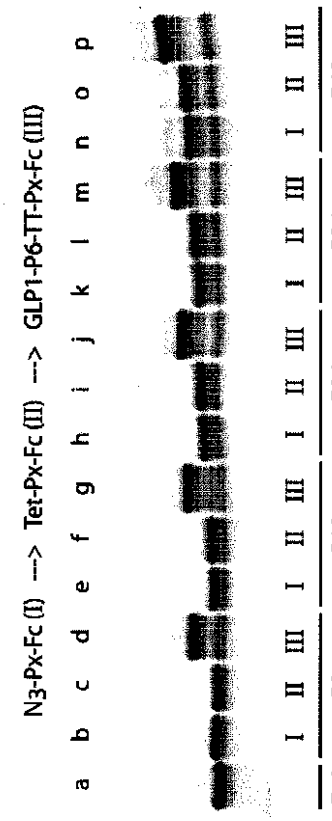


Figure 58

【図５９】

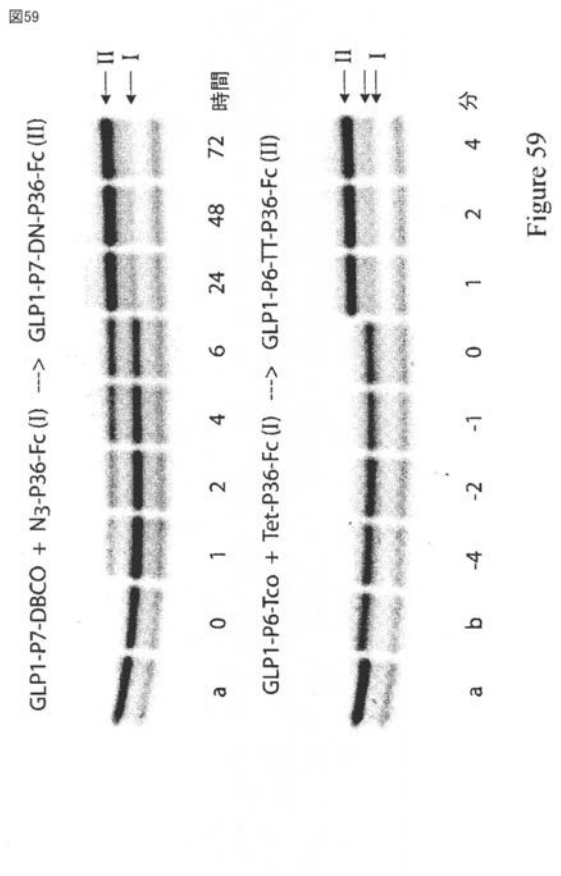


Figure 59

【図６０】

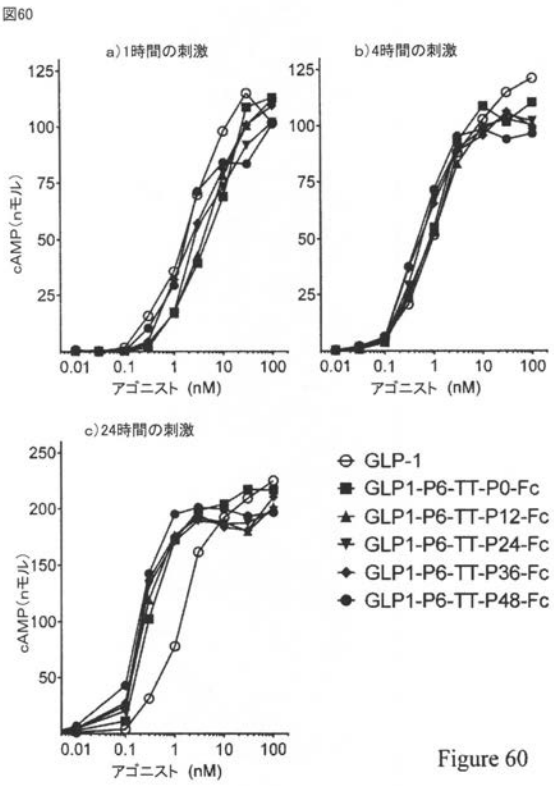


Figure 60

【図６１】

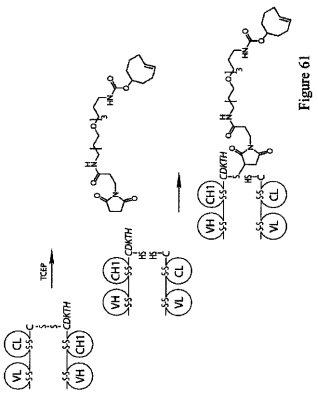


Figure 61

【図６２】

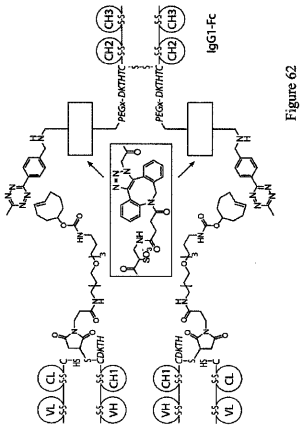


Figure 62

【図６３】

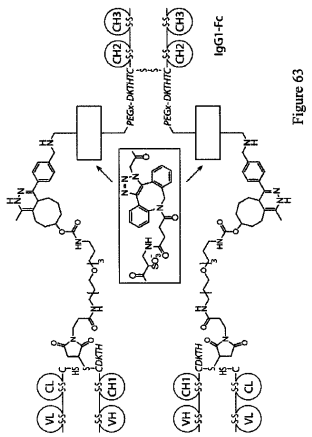


Figure 63

【図６４】

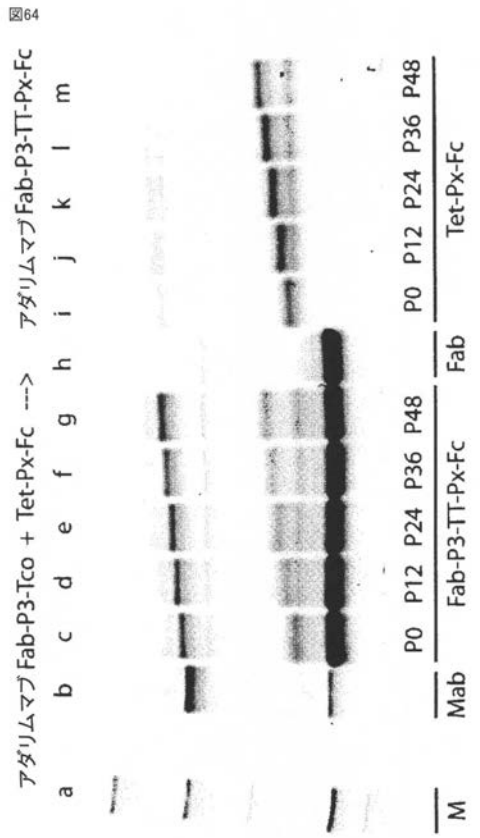


Figure 64

【図６５】

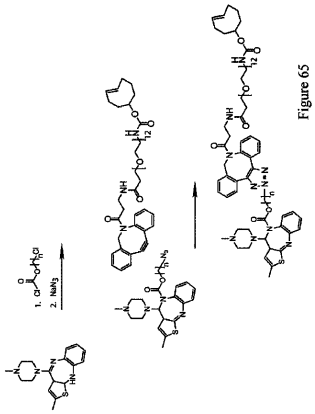


Figure 65

【図６６】

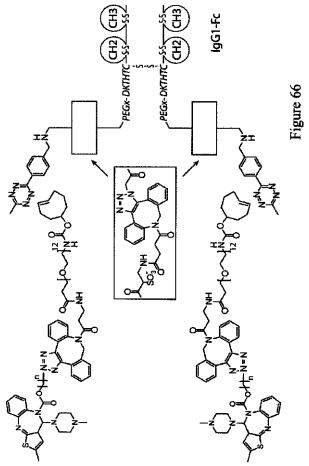


Figure 66

【図６７】

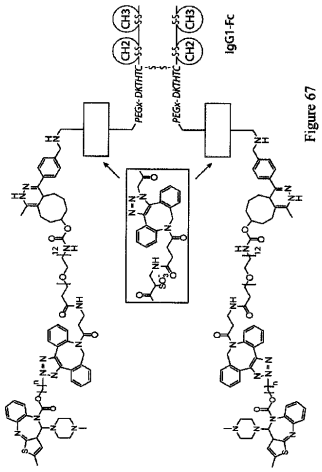


Figure 67

【配列表】
2017516839000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/020458

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 31/05 (2015.01)
CPC - C07C 217/32 (2015.07)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - A61K 31/05, 31/075, 31/095, 31/12, 31/121 (2015.01)
CPC - C07C 217/32, 233/56, 235/24, 235/52 (2015.07) (keyword delimited)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
US Classes - 424/1.65, 1.89; 435/184; 514/229.8

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

PatBase, Google Patents, Google, PubMed, PubChem
Search terms used: antibody, linker, cleave, TNR1, TNR1b, azide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0104589 A1 (GOVINDAN et al) 29 April 2010 (29.04.2010) entire document	1-4, 28
A	US 2013/0164286 A1 (CHOU et al) 27 June 2013 (27.06.2013) entire document	1-4, 28
A	WO 2014/014563 A1 (CAPON et al) 23 January 2014 (23.01.2014) entire document	1-4, 28
A	CAPON et al, "Flexible antibodies with nonprotein hinges," Proc. Jpn. Acad. Series B, Vol. 87, No. 9, Pgs. 603-616. 2011 entire document	1-4, 28
P, X	WO 2014/144911 A2 (CAPON et al) 18 September 2014 (18.09.2014)	1-4, 28

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
31 July 2015	07 OCT 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/020458

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 5, 9-12, 18-27
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Extra Sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4 and 28 to the extent that they read on a compound having the structure A-B-Z selected to be SEQ ID NO: 112, wherein the Xaa nonpeptidyl linker of SEQ ID NO: 112 is a [1-({[1-(2-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methyl}carbamoyl)-2-sulfanylethyl] amino group

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2009)

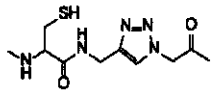
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/020458

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

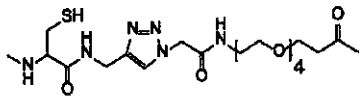
Group I+: claims 1-4, 6-8, 13-17, and 28 are drawn to a compound having the structure A-B-Z or L-Ra-B-Z; and a process of producing the compound.

The first invention of Group I+ is restricted to a compound, and a process of producing the compound, wherein the compound having the structure A-B-Z selected to be SEQ ID NO: 112, wherein the Xaa nonpeptidyl linker of SEQ ID NO: 112 is selected to be:



It is believed that claims 1-4 and 28 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on the above depicted compound.

Applicant is invited to elect additional polypeptide sequences and their specific linkers with explicitly specified chemical structure to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a compound and a process of producing a compound selected to be SEQ ID NO: 113, wherein the Xaa nonpeptidyl linker is selected to be:



Additional polypeptide sequences and their specific linkers with explicitly specified chemical structure will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element, requiring the selection of alternatives for the compounds "having the structure A-B-Z, wherein A is a biologically active structure of the compound; wherein Z is a protein component of the compound, which
protein component comprises one or more polypeptides, wherein at least one of the one or more polypeptides comprises consecutive amino acids which (i) are identical to a stretch of consecutive amino acids present in a chain of an F, domain of an antibody; (II) bind to an F, receptor; and (III) have at their N-terminus a cysteine or a selenocysteine; wherein B is a chemical structure linking A and Z; wherein the dashed line between B and Z represents a peptidyl linkage; and wherein the solid line between A and B represents a nonpeptidyl linkage."

The Groups I+ share the technical features of a compound, and a method of producing the compound, the compound having the structure A-B-Z wherein A is a biologically active structure of the compound; wherein Z is a protein component of the compound, which protein component comprises one or more polypeptides, wherein at least one of the one or more polypeptides comprises consecutive amino acids which (i) are identical to a stretch of consecutive amino acids present in a chain of an F, domain of an antibody; (ii) bind to an F, receptor; and (iii) have at their N-terminus a cysteine or a selenocysteine; wherein B is a chemical structure linking A and Z; wherein the dashed line between B and Z represents a peptidyl linkage; and wherein the solid line between A and B represents a nonpeptidyl linkage; which comprises the following steps: a) obtaining an A' which comprises A or a derivative of A, and a first terminal reactive group; b) obtaining a B' which comprises B or a derivative of B, a second terminal reactive group and a third terminal reactive. group, wherein the second terminal reactive group is capable of reacting with the first terminal reactive group to form a non-peptidyl linkage; c) obtaining a Z' which comprises Z or a derivative of Z, and a fourth terminal reactive group, wherein the fourth terminal reactive group is capable of reacting with the third terminal reactive group to form a peptidyl linkage; and d) reacting A', B' and Z' in any order to produce the compound; and the compound having the structure L-Ra-B-Z, wherein Z is a protein component of the compound, which protein component comprises one or more polypeptides, wherein at least one of the one or more polypeptides comprises consecutive amino acids which are identical to a stretch of consecutive amino acids present in a chain of an Fc domain of an antibody; bind to an Fc receptor; and have at their N-terminus a cysteine or a selenocysteine; wherein B is a chemical structure linking Ra and C; wherein the dashed line between B and Z represents a peptidyl linkage, and Ra is a bond or organic structure. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/020458

Specifically, US 2010/0104589 A1 to Govindan et al. discloses a compound, and a method of producing the compound, the compound having the structure A-B-Z (The present invention relates to therapeutic conjugates with improved ability to target various diseased cells, Abstract; a process of preparing conjugates, wherein the linker is first conjugated to a drug, thereby producing a drug-linker conjugate, Para. [0018]; Mab-[L2]-[L1]-[AA]m-[A']-Drug, Para; [0052]); wherein A is a biologically active structure of the compound (a first linker connects the drug at one end, Para. [0051]); wherein Z is a protein component of the compound (An exemplary preferred embodiment is directed to a conjugate of a drug derivative and an antibody of the general formula 2, Para. [0052]), which protein component comprises one or more polypeptides, wherein at least one of the one or more polypeptides comprises consecutive amino acids which (i) are identical to a stretch of consecutive amino acids present in a chain of an Fc, domain of an antibody (the sequences of antibodies, such as the Fc portions of antibodies, may be varied to optimize the physiological characteristics of the conjugates, Para. [0093]); (ii) bind to an Fc, receptor (cleaved after it is internalized into the cell upon binding by the MAb-drug conjugate to a receptor thereof, Para. [0075]); and (iii) have at their N-terminus a cysteine or a selenocysteine (at one end, complementary to the acetylene (or azide) moiety in L2, and a reactive group such as carboxylic acid or hydroxyl group at the other end; AA is an L-amino acid....cysteine, Para. [0052]; N-terminus is attached to a cross-linker, Para. [0058]); wherein B is a chemical structure linking A and Z (bifunctional drug moiety is prepared by first linking A-OH to the C-terminus of AA via an amide bond, followed by coupling the amine end of AA to a carboxylic acid group of L1, Para. [0072]); wherein the dashed line between B and Z represents a peptidyl linkage (therapeutic moiety via an intracellularly-cleavable moiety; Wherein said linker attachment to therapeutic moiety further comprises an L-amino acid or a polypeptide made up of up to four L-amino acids, Para. [0026]); and wherein the solid line between A and B represents a nonpeptidyl linkage (a first linker connects the drug at one end and terminates with an acetylene or an azide group at the other end; this first linker comprises a defined PEG moiety With an azide or acetylene group at one end and a different reactive group, such as carboxylic acid or hydroxyl group, Para. [0051]); which comprises the following steps: a) obtaining an A' which comprises A or a derivative of A, and a first terminal reactive group ; b) obtaining a B' which comprises B or a derivative of B, a second terminal reactive group and a third terminal reactive group, wherein the second terminal reactive group is capable of reacting with the first terminal reactive group to form a non-peptidyl linkage (the bifunctional drug moiety is prepared by first linking A-OH to the C-terminus of AA via an amide bond, followed by coupling the amine end of AA to a carboxylic acid group of L1. If AA is absent (i.e m:0), A-OH is directly attached to L1 via an amide bond. The cross-linker, [L1]-[AA] m-[A-OH], is attached to drug's hydroxyl or amino group, and this is followed by attachment to the L1 moiety, by taking recourse to the reaction between azide (or acetylene) and acetylene (or azide) groups in L1 and L2 via click chemistry, Para. [0072]); c) obtaining a Z' which comprises Z or a derivative of Z (the antibody is pre-derivatized with a thiol-reactive group, Para. [0068]), and a fourth terminal reactive group (Which first linker contains a reactive moiety that is capable of combining with a second linker that additionally contains a targeting-moiety-coupling group, Para. [0016]), wherein the fourth terminal reactive group is capable of reacting with the third terminal reactive group to form a peptidyl linkage (Furthermore, in a preferred embodiment, the linker component 'L2' comprises a thiol group that reacts with a thiol-reactive residue introduced at one or more lysine side chain amino groups of said targeting moiety, Para. [0068]); and d) reacting A', B' and Z' in any order to produce the compound (A-OH is directly attached to L1 via an amide bond. The cross-linker, [L1]-[AA]m-[A-OH], is attached to drug's hydroxyl or amino group, and this is followed by attachment to the L1 moiety, by taking recourse to the reaction between azide (or acetylene) and acetylene (or azide) groups in L1 and L2 via click chemistry, Para. [0072]); and the compound having the structure L-Ra-B-Z (The present invention relates to therapeutic conjugates with improved ability to target various diseased cells, Abstract; a process of preparing conjugates, wherein the linker is first conjugated to a drug, thereby producing a drug-linker conjugate, Para. [0018]; Mab-[L2]-[L1]-[AA]m-[A']-Drug, Para; [0052]); wherein Z is a protein component of the compound (therapeutic moiety via an intracellularly-cleavable moiety; Wherein said linker attachment to therapeutic moiety further comprises an L-amino acid or a polypeptide made up of up to four L-amino acids, Para. [0026]), which protein component comprises one or more polypeptides (the sequences of antibodies, such as the Fc portions of antibodies, may be varied to optimize the physiological characteristics of the conjugates, Para. [0093]), wherein at least one of the one or more polypeptides comprises consecutive amino acids which are identical to a stretch of consecutive amino acids present in a chain of an Fc domain of an antibody (the sequences of antibodies, such as the Fc portions of antibodies, may be varied to optimize the physiological characteristics of the conjugates, Para. [0093]); (ii) bind to an Fc, receptor (cleaved after it is internalized into the cell upon binding by the MAb-drug conjugate to a receptor thereof, Para. [0075]); bind to an Fc receptor (cleaved after it is internalized into the cell upon binding by the MAb-drug conjugate to a receptor thereof, Para. [0075]); and have at their N-terminus a cysteine or a selenocysteine (at one end, complementary to the acetylene (or azide) moiety in L2, and a reactive group such as carboxylic acid or hydroxyl group at the other end; AA is an L-amino acid....cysteine, Para. [0052]; N-terminus is attached to a cross-linker, Para. [0058]); wherein B is a chemical structure linking Ra and C (bifunctional drug moiety is prepared by first linking A-OH to the C-terminus of AA via an amide bond, followed by coupling the amine end of AA to a carboxylic acid group of L1, Para. [0072]); wherein the dashed line between B and Z represents a peptidyl linkage (therapeutic moiety via an intracellularly-cleavable moiety; Wherein said linker attachment to therapeutic moiety further comprises an L-amino acid or a polypeptide made up of up to four L-amino acids, Para. [0026]); and Ra is a bond or organic structure (reaction between azide (or acetylene) and acetylene (or azide) groups in L1 and L2 via click chemistry, Para. [0072]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*38/22*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/02		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*38/26*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/24		
Ａ６１Ｋ	*31/711*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/28		
Ａ６１Ｋ	*31/7105*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/711		
Ａ６１Ｋ	*31/7088*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		
Ａ６１Ｋ	*31/497*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		
Ａ６１Ｋ	*31/215*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/497		
Ｃ０７Ｋ	*16/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/215		
Ｃ０７Ｋ	*16/28*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/00		
Ａ６１Ｐ	*11/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28		
Ａ６１Ｐ	*11/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00		
Ａ６１Ｐ	*25/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/06		
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/04		
Ａ６１Ｐ	*25/24*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ａ６１Ｐ	*9/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/24		
Ａ６１Ｐ	*9/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10		
Ａ６１Ｐ	*9/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10	１０３	
Ａ６１Ｐ	*3/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/06		
Ａ６１Ｐ	*37/08*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/12		
Ａ６１Ｐ	*31/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10		
Ａ６１Ｐ	*25/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08		
Ａ６１Ｐ	*25/18*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00		
Ａ６１Ｐ	*1/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/16		
Ａ６１Ｐ	*25/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/18		
Ａ６１Ｐ	*25/26*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04		
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/14		
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/26		
			Ａ６１Ｋ	48/00		
			Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100199565
弁理士 飯野 茂
(72)発明者 カポン、ダニエル・ジェイ.
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９４０１０、ヒルズボロー、ウッドリッジ・ロード ９０

Ｆターム(参考) 4C076 AA95 CC41 EE59
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13 AA17 BA03 BA26 BA34 BA41
BA42 BA44 CA59 DA35 DA53 DB01 DB02 DB12 DB31 DB35
DB37 DB38 DB40 NA06 NA13 ZA021 ZA022 ZA071 ZA072 ZA081
ZA082 ZA111 ZA112 ZA121 ZA122 ZA181 ZA182 ZA361 ZA362 ZA381

	ZA382	ZA401	ZA402	ZA421	ZA422	ZA591	ZA592	ZA661	ZA662	ZB111
	ZB112	ZB131	ZB132	ZB311	ZB312	ZB321	ZB322	ZC351	ZC352	
4C085	AA21	AA24	AA25	AA26	BB31	BB41	BB42	BB43	CC22	CC23
	DD56	EE01	GG01	GG02	GG03	GG04	GG06	GG08		
4C086	AA01	AA02	AA03	AA04	BC50	EA16	GA07	GA12	MA01	MA04
	NA06	NA13								
4C206	AA01	AA02	AA03	AA04	DB11	DB43	KA01	MA01	MA04	NA06
	NA13									
4H045	AA10	AA11	BA51	BA56	BA57	DA76	EA20	FA74	GA26	

【要約の続き】
成する方法を提供する。