(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0111015
(43) 공개일자 2024년07월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/32 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/32 (2013.01)
A61K 47/6803 (2023.08)
(21) 출원번호 10-2024-7022678(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년04월27일
심사청구일자 2024년07월05일
(62) 원출원 특허 10-2019-7031664
원출원일자(국제) 2018년04월27일
심사청구일자 2020년12월29일
(85) 번역문제출일자 2024년07월05일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2018/017345
(87) 국제공개번호 WO 2018/199337
국제공개일자 2018년11월01일
(30) 우선권주장
JP-P-2017-090679 2017년04월28일 일본(JP)

(71) 출원인
아지노모토 가부시키가이샤
일본국 도쿄도 쥬오구 교바시 1쵸메15반1고
(72) 발명자
야마다 케이
일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠 스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키가이샤 내
마츠다 유타카
일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠 스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키가이샤 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 9 항

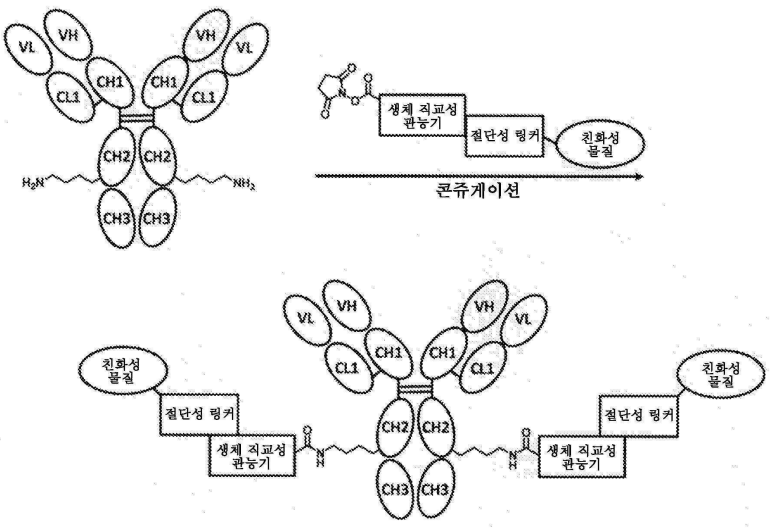
(54) 발명의 명칭 **가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물 또는 이의 염**

(57) 요 약

본 발명은 가용성 단백질의 수식, 특히, 가용성 단백질의 위치 선택적인 수식을 가능하게 하는 기술을 제공한다. 더 구체적으로는, 본 발명은 하기 식 (I)으로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물 또는 이의 염을 제공한다:

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1a



A-L-B-R (I)

〔식 중,

A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기이다〕.

(52) CPC특허분류
A61K 47/6851 (2017.08)
A61K 47/6889 (2017.08)
C07K 16/2887 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자
후지이 도모히로
일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠 스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키가이샤 내
시키다 나츠키
일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠 스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키가이샤 내
유지 레이코
일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠 스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키가이샤 내
심보 가즈타카
일본 가나가와켄 2108681 가와사키시 가와사키쿠 스즈키초 1-1 아지노모토 가부시키가이샤 내
이토 유지
일본 가고시마현 8908580 가고시마시 고리모토 1-초메 21-24 가고시마 유니버시티 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 식 (V)으로 표시되는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는, 인간 IgG Fc 영역을 갖는 항체 또는 이의 염으로서,

하기 식 (V):

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

[식 중,

F는, 기능성 물질이고,

L1은, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

B는, (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

(L1-B)'로 표시되는 구조 단위는, 기능성 물질과, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기 중 어느 한쪽 또는 쌍방 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 구조 단위이고,

R'는, 항체와 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

T는 항체이고,

여기서, (L1-B)'로 표시되는 부분 구조는 펩티드 부분을 포함하지 않는다],

상기 항체가, 하기 표적 Fc 영역:

(a) 인간 IgG Fc 영역에서의 EU 넘버링에 따른 246 내지 248 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역;

(b) 인간 IgG Fc 영역에서의 EU 넘버링에 따른 288 내지 290 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역, 또는

(c) 인간 IgG Fc 영역에서의 EU 넘버링에 따른 317 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역;

중에 있어서 리신 잔기를 1개 이상 포함하고,

F-(L1-B)'-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 표적 Fc 영역 중에 포함되는 1개 이상의 리신 잔기에 대하여 위치 선택적으로 결합하고 있고,

상기 생체 직교성 관능기가 아지드 잔기, 알데히드 잔기, 티올 잔기, 알켄 잔기, 및 알킨 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 잔기이고,

상기 기능성 물질이 약물, 표지 물질, 또는 안정화제인,

기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는, 항체 또는 이의 염.

청구항 2

하기 식 (IV)로 표시되는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는, 인간 IgG Fc 영역을 갖는 항체 또는 이의 염으로서,

하기 식 (IV):

L1-B-R'-T (IV)

[식 중,

L1은, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의

기이고,

B는, (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

R'는, 항체와 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

T는 항체이고,

여기서, L1-B로 표시되는 부분 구조는 펩티드 부분을 포함하지 않는다],

상기 항체가, 하기 표적 Fc 영역:

(a) 인간 IgG Fc 영역에서의 EU 넘버링에 따른 246 내지 248 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역;

(b) 인간 IgG Fc 영역에서의 EU 넘버링에 따른 288 내지 290 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역, 또는

(c) 인간 IgG Fc 영역에서의 EU 넘버링에 따른 317 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역;

중에 있어서 리신 잔기를 1개 이상 포함하고,

L1-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 표적 Fc 영역 중에 포함되는 1개 이상의 리신 잔기에 대하여 위치 선택적으로 결합하고 있고,

상기 생체 직교성 관능기가, 아지드 잔기, 알데히드 잔기, 티올 잔기, 알켄 잔기, 및 알킨 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 잔기인, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 항체 또는 이의 염.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 모노크로날 항체인, 항체 또는 이의 염.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 IgG 항체인, 항체 또는 이의 염.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 인간 유래인, 항체 또는 이의 염.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가, 하기 (A) 및 (B)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 Fc 영역 단백질을 포함하고, 또한 항원 결합능을 갖는 항체인, 항체 또는 이의 염:

(A) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질; 및

(B) 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항체가 2개의 중쇄를 포함하는 항체이고,

항체가, 2개의 중쇄에서의 상기 표적 Fc 영역 중의 상기 1개 이상의 리신 잔기의 위치에 있어서 기능성 물질을 갖는 결과, 2개의 기능성 물질을 갖는, 항체 또는 이의 염.

청구항 8

제1항에 있어서, 기능성 물질이 약물, 또는 표지 물질인, 항체 또는 이의 염.

청구항 9

제2항에 있어서, 상기 항체가 2개의 중쇄를 포함하는 항체이고,

항체가, 2개의 중쇄에서의 상기 표적 Fc 영역 중의 상기 1개 이상의 리신 잔기의 위치에 있어서 생체 직교성 관능기를 갖는 결과, 2개의 생체 직교성 관능기를 갖는, 항체 또는 이의 염.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물 또는 이의 염 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근, 항체 약물 복합체(Antibody Drug Conjugation: ADC)의 연구 개발이 활발하게 행하여지고 있다. ADC는 그 이름과 같이, 항체에 약물(예, 항암제)을 콘주게이션한 약제이며, 암 세포 등에 대하여 직접적인 살세포(殺細胞) 활성을 갖는다. 대표적인 ADC로서는, Immunogene사 및 Roche사가 공동 개발한 T-DM1(상품명: 캐싸일라(등록상표))이 있다(비특허문헌 1 내지 3).

[0003] T-DM1을 비롯한 ADC는 개발 당초부터 그 불균일성이 문제가 되었다. 즉, 항체 중에 70 내지 80 정도 있는 Lys 잔기에 대하여, 저분자 약물을 랜덤으로 반응시키고 있기 때문에, 약물 항체비(Drug Antibody Ratio: DAR)나 콘주게이션 위치가 일정하지 않다. 통상 이러한 랜덤 콘주게이션법이 되면 DAR이 0 내지 8의 범위가 되고, 약물의 결합 수가 다른 복수의 약제가 생기는 것으로 알려져 있다. 최근 ADC 약물의 결합 수 및 결합 위치를 변화시키면, 체내 동태나 약물의 방출 속도, 효과가 변화하는 것이 보고되어 있다. 이러한 점에서 차세대형 ADC에서는 콘주게이션하는 약물의 개수와 위치를 제어하는 것이 요구되고 있다. 개수 및 위치가 일정하면, 기대대로의 efficacy, 콘주게이션 약제의 베리에이션, 로트 차이 이른바 레귤레이션의 문제가 해결된다고 생각되고 있다(비특허문헌 4).

[0004] 항체의 위치 선택적 수식법은 전세계에서 연구되고 있지만, 그 대부분이 유전자 공학적 수법 또는 효소를 사용한 수식법이다. 유전자 공학적 수식법에 관해서는 위치 선택성, 개수 선택성은 제어할 수 있지만, 항체 자체의 발현 효율이 저하(ADC를 조제할 때의 총 수율이 저하)되는 등의 문제가 지적되고 있다. 또한, 항체 발현계의 구축 등에 오랜 세월이 걸리는 것이 문제가 되고 있다(비특허문헌 5 내지 7).

[0005] 또한, 소분자 프로브를 이용하여 세포 내와 같은 협잡한 환경 하에서 단백질을 화학 수식하는 방법이 최근 보고되고 있다. 본 수법은 이미징이나 저분자 약물의 리포지셔닝을 행한 후에 수용체의 동정(同定) 등에 이용되고 있다. 또한, 케미컬 바이올로지 분야에 있어서, 합성 소분자 프로브를 사용한 유기 화학적인 단백질 수식법이 주목을 받고 있다(비특허문헌 8 내지 10).

[0006] 최근, C-CAP(친화성 펩티드에 의한 화학적 접합(Chemical Conjugation by Affinity Peptide))법이 개발되었다. 본 방법은 친화성 펩티드(Affinity Peptide)에 대하여 NHS 활성화 에스테르 및 약물이 연결된 펩티드 시약을 항체와 반응시키는 방법(즉, 펩티드 부분을 포함하는 링커를 통한 ADC의 제작 방법)에 의해, 항체의 위치 선택적인 수식에 성공하고 있다. 본 방법은 세계에서 처음으로, 화학 합성적 수법에 의해, 약물로 항체 Fc 영역을 위치 선택적으로 수식하는 것에 성공한 것이고, 게다가 실용상 양호한 결과 〔반응 시간 30분, 수율 70%(DAR 1의 경우), 위치 선택성 100%〕가 확인되고 있다. 펩티드 시약을 5등량 정도 첨가함으로써 DAR을 2로 제어할 수 있는 것이 실증되고 있고, 수식 위치도 제어할 수 있는 점에서 획기적이다(특허문헌 1).

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 국제공개 제2016/186206호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Reichert JM et al., Nat Biotechnol 2005;23:1073-8

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Kubota T et al., Cancer Sci 2009;100:1566-72

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Wu AM et al., Nat Biotechnol 2005;23:1137-46

(비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Junutula JR et al., Nat Biotechnol 2008;26:925-32

(비특허문헌 0005) 비특허문헌 5: Shen BQ et al., Nat Biotechnol 2012;30:184-9

(비특허문헌 0006) 비특허문헌 6: Hofer T et al., Biochemistry 2009;48:12047-57

(비특허문헌 0007) 비특허문헌 7: Liu W et al., Nat Methods 2007;4:239-44

(비특허문헌 0008) 비특허문헌 8: S. T. Laughlin et al., Science 2008;320,664

(비특허문헌 0009) 비특허문헌 9: A. E. Speers et al., ChemBioChem 2004;5,41

(비특허문헌 0010) 비특허문헌 10: Y. Takaoka et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2013;52,4088

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 가용성 단백질의 수식, 특히, 가용성 단백질의 위치 선택적인 수식을 가능하게 하는 기술을 개발하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 예의 검토한 결과, (1) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 (2) 그 가용성 단백질을 구성하는 아미노산 잔기에 대한 반응성기, 및 (3) 당해 친화성 물질과 당해 반응성기 사이에 절단성 부분을 포함하고, (4) 절단성 부분에서의 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 갖는 구조 단위(즉, 생체 직교성 관능기 및 반응성기를 포함하는 구조 단위)를 생성할 수 있다는 구조적 특징을 갖는, 신규이며 또한 독창적인 설계 사상에 기초하여 개발된 화합물이 가용성 단백질의 위치 특이적인 수식에 유용하다는 것을 발견하였다(예, 도 1a, 도 1b, 도 1c, 도 2). 본 발명자들은 또한 이러한 화합물을 사용함으로써, 펩티드 부분을 링커로서 포함하지 않는, 기능성 물질(예, 약물)을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질(예, 항체 약물 복합체(ADC))을 조제할 수 있는 것 등을 발견하였다. 잠재적인 면역원성을 갖고, 또한 혈중에서 가수분해되기 쉬운 펩티드 부분을 포함하는 링커의 사용 회피는 ADC의 임상 응용에 있어서 바람직한 것이다. 즉, 본 발명자들이 개발한 방법은 세계에서 처음으로, 화학 합성적 수법에 의해, 게다가 펩티드 부분을 포함하는 링커를 사용하지 않고, 약물로 항체 Fc 영역을 위치 선택적으로 수식하는 것에 성공하였다고 할 수 있다. 본 발명자들은 또한, 상기 (1) 내지 (4)와 같은 구조적 특징을 구비한 다양한 화합물의 개발 등에 성공하여(예, 도 1a, 도 1b, 도 1c, 도 2), 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0011] 즉, 본 발명은 이하와 같다.

[0012] 제1 실시형태에서는, 본 발명은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물 또는 이의 염, 및 당해 화합물 또는 이의 염을 포함하는 가용성 단백질의 위치 선택적 수식 시약을 제공한다.

[0013] 〔1〕 하기 식 (I):

[0014] A-L-B-R (I)

[0015] 〔식 중,

[0016] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0017] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0018] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0019] R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기이다〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물 또는 이의 염.

[0020] 〔2〕 L이, (i) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커, 또는 (ii) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖지 않는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커인, 〔1〕의 화합물 또는 이의 염.

[0021] 〔3〕 L이 상기 (i)의 절단성 링커인, 〔2〕의 화합물 또는 이의 염.

[0022] 〔4〕 L이 상기 (i)의 절단성 링커이고, 또한 B가 상기 (b)의 2가의 기인, 〔2〕 또는 〔3〕의 화합물 또는 이의 염.

[0023] 〔5〕 L이 상기 (ii)의 절단성 링커이고, 또한 B가 상기 (a)의 2가의 기인, 〔2〕의 화합물 또는 이의 염.

[0024] 〔6〕 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이 펩티드인, 〔1〕 내지 〔5〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0025] 〔7〕 펩티드가 모노클로날 항체의 Fc 영역에 대한 결합성 펩티드인, 〔6〕의 화합물 또는 이의 염.

[0026] 〔8〕 결합성 펩티드가 IgG의 Fc 영역에 대한 결합성 펩티드인, 〔7〕의 화합물 또는 이의 염.

[0027] 〔9〕 상기 친화성 물질이, 하기 (A) 내지 (C)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 Fc 영역 단백질을 포함하고, 또한 항원 결합능을 갖는 항체에 대한 친화성 물질인, 〔1〕 내지 〔8〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염:

[0028] (A) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질;

[0029] (B) 서열번호 1의 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 몇 개의 아미노산 잔기가 삽입, 부가, 결실 또는 치환된 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질; 또는

[0030] (C) 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질.

[0031] 〔10〕 결합성 펩티드가 하기 식 (i):

[0032] (X_{1-3})-C-(X_2)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3}) (서열번호 94) (i)

[0033] 〔식 중,

[0034] X는 동일 또는 상이하며, 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기이고,

[0035] C는 시스테인 잔기이고,

[0036] H는 히스티딘 잔기이고,

[0037] Xaa1은 아르기닌 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[0038] G는 글리신 잔기이고,

[0039] Xaa2는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기, 아스파라긴 잔기, 또는 아스파라긴산 잔기이고,

[0040] L은 류신 잔기이고,

[0041] V는 발린 잔기이고, 또한

[0042] W는 트립토판 잔기이다〕

[0043] 에 의해 표시되는, 13 내지 17 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 펩티드 또는 이의 염인, 〔7〕 내지 〔9〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0044] 〔11〕 결합성 펩티드가 하기 식 (i-1):

[0045] (X_{1-3})-C-(X_2)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3}) (서열번호 95) (i-1)

[0046] 〔식 중,

[0047] X는 동일 또는 상이하며, 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기이고,

[0048] C는 시스테인 잔기이고,

[0049] H는 히스티딘 잔기이고,

[0050] Xaa1은 리신 잔기, 시스테인 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[0051] G는 글리신 잔기이고,

[0052] Xaa2는 글루타민산 잔기 또는 아스파라긴 잔기이고,

[0053] L은 류신 잔기이고,

[0054] V는 발린 잔기이고, 또한

[0055] W는 트립토판 잔기이다]

[0056] 에 의해 표시되는, 13 내지 17 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 펩티드 또는 이의 염인, [7] 내지 [9] 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0057] [12] 결합성 펩티드가 하기 식 (i-2):

[0058] (X_{1-3})-C-(X_2)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X1-3) (서열번호 96) (i-2)

[0059] [식 중,

[0060] X는 동일 또는 상이하며, 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기이고,

[0061] C는 시스테인 잔기이고,

[0062] H는 히스티딘 잔기이고,

[0063] Xaa1은 아르기닌 잔기, 또는 류신 잔기이고,

[0064] G는 글리신 잔기이고,

[0065] Xaa2는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 또는 아스파라긴산 잔기이고,

[0066] L은 류신 잔기이고,

[0067] V는 발린 잔기이고, 또한,

[0068] W는 트립토판 잔기이다]에 의해 표시되는, 13 내지 17 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 펩티드 또는 이의 염인, [7] 내지 [10] 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0069] [13] 결합성 펩티드가 하기 식 (v):

[0070] (X_{1-3})-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7) (서열번호 102) (v)

[0071] [식 중,

[0072] X는 동일 또는 상이하며, 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기이고,

[0073] C는 시스테인 잔기이고,

[0074] Xaa3은 알라닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[0075] Xaa4는 트립토판 잔기, 또는 티로신 잔기이고,

[0076] H는 히스티딘 잔기이고,

[0077] Xaa1은 아르기닌 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[0078] G는 글리신 잔기이고,

[0079] Xaa2는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기, 아스파라긴 잔기, 또는 아스파라긴산 잔기이고,

[0080] L은 류신 잔기이고,

[0081] V는 발린 잔기이고,

[0082] W는 트립토판 잔기이고,

[0083] Xaa5는 트레오닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[0084] Xaa6은 티로신 잔기, 리신 잔기, 또는 부재이며, 또한

[0085] Xaa7은 히스티딘 잔기, 리신 잔기, 또는 부재]에 의해 표시되는, 13 내지 17 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 펩티드 또는 이의 염인, [7] 내지 [12] 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0086] [14] 결합성 펩티드는 하기 식 (vi):

[0087] D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7) (서열번호 103) (vi)

[0088] [식 중,

[0089] D는 아스파라긴산 잔기이고,

[0090] C는 시스테인 잔기이고,

[0091] Xaa3은 알라닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[0092] Xaa4는 트립토판 잔기, 또는 티로신 잔기이고,

[0093] H는 히스티딘 잔기이고,

[0094] Xaa1은 아르기닌 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[0095] G는 글리신 잔기이고,

[0096] Xaa2는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기, 아스파라긴 잔기, 또는 아스파라긴산 잔기이고,

[0097] L은 류신 잔기이고,

[0098] V는 발린 잔기이고,

[0099] W는 트립토판 잔기이고,

[0100] Xaa5는 트레오닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[0101] Xaa6은 티로신 잔기, 리신 잔기, 또는 부재이며,

[0102] Xaa7은 히스티딘 잔기, 리신 잔기, 또는 부재이다]로 표시되는, 13 내지 15 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 것을 특징으로 하는 펩티드 또는 이의 염인, [7] 내지 [13] 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0103] [15] 결합성 펩티드가 하기 식 (vii):

[0104] D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-T (서열번호 104) (vii)

[0105] [식 중,

[0106] D는 아스파라긴산 잔기이고,

[0107] C는 시스테인 잔기이고,

[0108] Xaa3은 알라닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[0109] Xaa4는 트립토판 잔기, 또는 티로신 잔기이고,

[0110] H는 히스티딘 잔기이고,

[0111] Xaa1은 아르기닌 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[0112] G는 글리신 잔기이고,

[0113] Xaa2는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기, 아스파라긴 잔기, 또는 아스파라긴산 잔기이고,

[0114] L은 류신 잔기이고,

[0115] V는 발린 잔기이고,

[0116] W는 트립토판 잔기이고, 또한

[0117] T는 트레오닌 잔기이다]로 표시되는, 13 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 것을 특징으로 하는 펩티드 또는 이의 염인, [7] 내지 [14] 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0118] [16] 결합성 펩티드가 하기 식 (viii):

[0119] R-G-N-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7) (서열번호 105) (viii)

[0120] [식 중,

[0121] R은 아르기닌 잔기이고,

[0122] G는 글리신 잔기이고,

[0123] N은 아스파라긴 잔기이고,

[0124] C는 시스테인 잔기이고,

[0125] Xaa3은 알라닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[0126] Xaa4는 트립토판 잔기, 또는 티로신 잔기이고,

[0127] H는 히스티딘 잔기이고,

[0128] Xaa1은 아르기닌 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[0129] G는 글리신 잔기이고,

[0130] Xaa2는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기, 아스파라긴 잔기, 또는 아스파라긴산 잔기이고,

[0131] L은 류신 잔기이고,

[0132] V는 발린 잔기이고,

[0133] W는 트립토판 잔기이고,

[0134] Xaa5는 트레오닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[0135] Xaa6은 티로신 잔기, 리신 잔기, 또는 부재이며, 또한

[0136] Xaa7은 히스티딘 잔기, 리신 잔기, 또는 부재이다]로 표시되는, 13 내지 15 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 것을 특징으로 하는 펩티드 또는 이의 염인, [7] 내지 [13] 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0137] [17] 결합성 펩티드가 인간 IgG와 결합 가능한 것을 특징으로 하는, [7] 내지 [16] 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0138] [18] 결합성 펩티드가, (a) FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열번호 92)의 아미노산 서열에 있어서, 어느 하나의 아미노산 잔기가 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 및 디아미노프로피온산 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1개의 아미노산 잔기에 의해 치환되어 있고, 또한

[0139] (b) 서열번호 92의 상기 아미노산 서열에 대하여 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 친화성 펩티드 또는 이의 염인, [7] 내지 [9] 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0140] [19] 절단성 부분이 (a) 산성 물질, 염기성 물질, 환원제, 산화제, 효소로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 물질에 의한 처리, (b) 광으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 물리 화학적 자극에 의한 처리, 또는 (c) 자기 분해성의 절단성 부분을 포함하는 절단성 링커를 사용한 경우의 방치 중 어느 하나에 의해 절단 가능한 부분인, [1] 내지 [18] 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

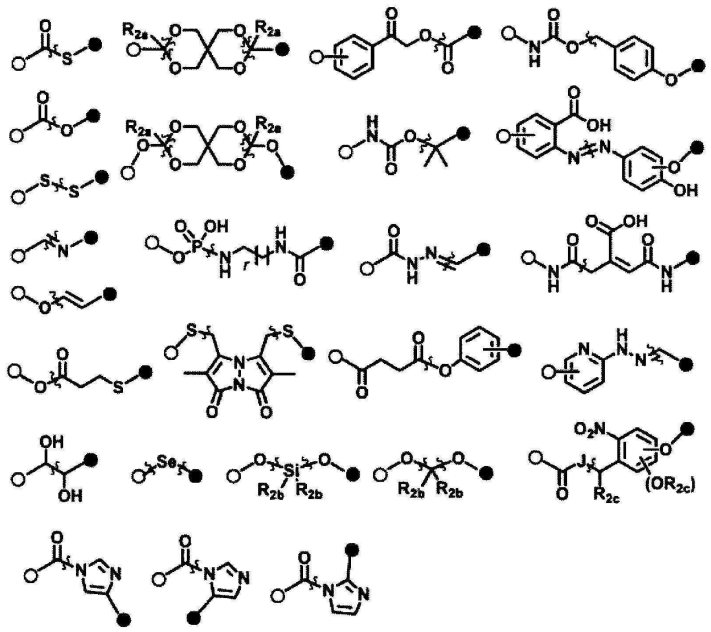
[0141] 〔20〕 상기 절단성 부분이 디술피드 잔기, 아세탈 잔기, 케탈 잔기, 에스테르 잔기, 카르바모일 잔기, 알콕시알킬 잔기, 이민 잔기, 3급 알킬옥시카르바메이트 잔기, 실란 잔기, 하이드라존 함유 잔기, 포스포르아미데이트 잔기, 아코니틸 잔기, 트리틸 잔기, 아조 잔기, 비시날디올 잔기, 셀렌 잔기, 전자 흡인기를 갖는 방향족환 함유 잔기, 쿠마린 함유 잔기, 술폰 함유 잔기, 불포화 결합 함유 쇄 잔기, 글리코실 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 〔1〕 내지 〔19〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0142] 〔21〕 상기 (i)의 절단성 부분이 디술피드 잔기, 에스테르 잔기, 아세탈 잔기, 케탈 잔기, 이민 잔기, 비시날디올 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 〔2〕 내지 〔20〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0143] 〔22〕 상기 (ii)의 절단성 부분이 에스테르 잔기, 카르바모일 잔기, 알콕시알킬 잔기, 이민 잔기, 3급 알킬옥시카르바메이트 잔기, 실란 잔기, 하이드라존 함유 잔기, 포스포르아미데이트 잔기, 아코니틸 잔기, 트리틸 잔기, 아조 잔기, 비시날디올 잔기, 셀렌 잔기, 전자 흡인기를 갖는 방향족환 함유 잔기, 쿠마린 함유 잔기, 술폰 함유 잔기, 불포화 결합 함유 쇄 잔기, 글리코실 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 〔2〕 내지 〔20〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0144] 〔23〕 절단성 부분이 하기:

[0145] [화 1]

[0146] 

[0147] 〔여기서, 결합에 직교하는 파선은 절단 부위를 나타내고,

[0148] 복수의 R_{2a}, 복수의 R_{2b}, 및 복수의 R_{2c}는 동일 또는 상이하며,

[0149] (i) 수소 원자, 또는 할로겐 원자;

[0150] (ii) 1가의 탄화수소기;

[0151] (iii) 아르알킬;

[0152] (iv) 1가의 복소환기;

[0153] (v) R_c-O-, R_c-C(=O)-, R_c-O-C(=O)-, 또는 R_c-C(=O)-O-(R_c는 수소 원자, 또는 1가의 탄화수소기를 나타낸다);

[0154] (vi) NR_dR_e-, NR_dR_e-C(=O)-, NR_dR_e-C(=O)-O-, 또는 R_d-C(=O)-NR_e-(R_d 및 R_e는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 1가의 탄화수소기를 나타낸다); 또는

[0155] (vii) 니트로기, 황산기, 술폰산기, 시아노기, 또는 카르복실기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고,

[0156] J는 $-CH_2-$, -O-, 또는 -S-이고,

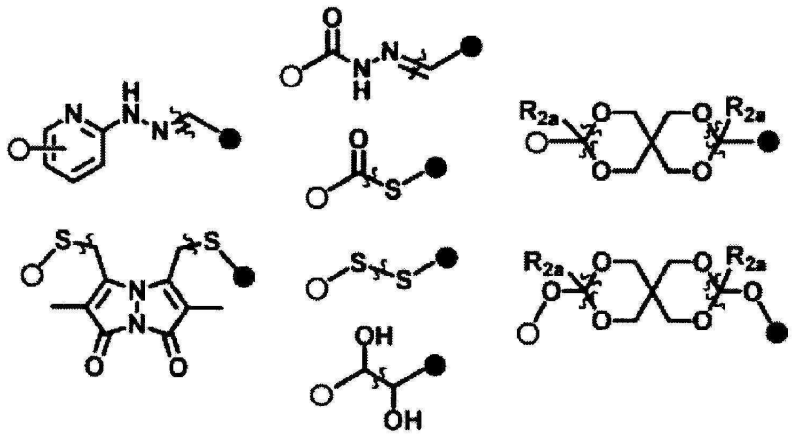
[0157] r은 1 내지 4의 임의의 정수이고,

[0158] ○(흰 환형)은 A에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 B에 대한 결합을 나타낸다.

[0159] 화학 구조가 절단 부위를 중심으로 하여 비대칭인 경우, ●이 A에 대한 결합을 나타내고, ○이 B에 대한 결합을 나타내고 있어도 좋다] 로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하는, [1] 내지 [20] 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0160] [24] 상기 (i)의 절단성 부분이 이하:

[0161] [화 2]



[0162]

[0163] [여기서, 결합에 직교하는 파선은 절단 부위를 나타내고,

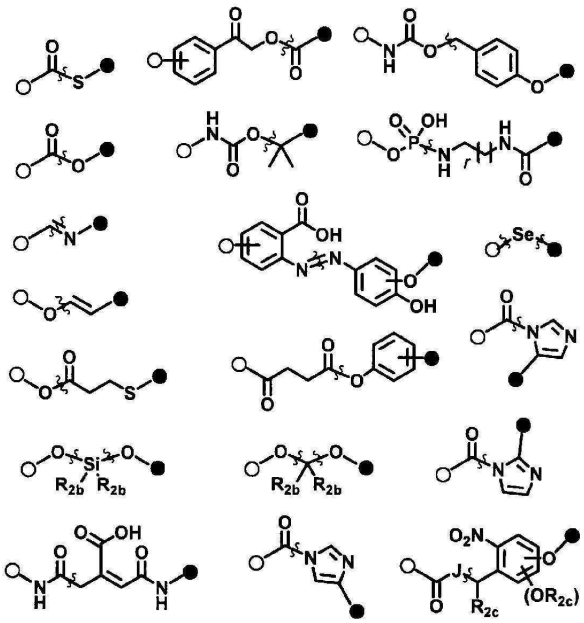
[0164] R_{2a}는 [23] 과 같고,

[0165] ○(흰 환형)은 A에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 B에 대한 결합을 나타낸다.

[0166] 화학 구조가 절단 부위를 중심으로 하여 비대칭인 경우, ●이 A에 대한 결합을 나타내고, ○이 B에 대한 결합을 나타내고 있어도 좋다] 로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하는, [2] 내지 [19], [21], [23] 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0167] [25] 상기 (ii)의 절단성 부분이 이하:

[0168] [화 3]



[0169]

[0170] 〔여기서, 결합에 직교하는 파선은 절단 부위를 나타내고,

[0171] R_{2b}, R_{2c}, J, r은 〔23〕과 같고,

[0172] ○(흰 환형)은 A에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 B에 대한 결합을 나타낸다.

[0173] 화학 구조가 절단 부위를 중심으로 하여 비대칭인 경우, ●이 A에 대한 결합을 나타내고, ○이 B에 대한 결합을 나타내고 있어도 좋다〕로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하는, 〔2〕 내지 〔19〕, 〔22〕, 〔23〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0174] 〔26〕 L이 하기 식 (L1) 내지 (L3):

[0175] La-C-Lb (L1)

[0176] La-C (L2)

[0177] C-Lb (L3)

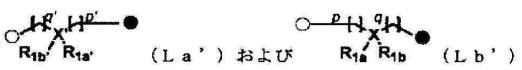
[0178] 〔식 중,

[0179] La 및 Lb는 각각 2가의 기이고,

[0180] c는 절단성 부분〕 중 어느 하나로 표시되는, 〔1〕 내지 〔25〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0181] 〔27〕 상기 La 및 Lb가 각각 하기 (La') 및 (Lb'):

[0182] [화 4]

[0183] 

[0184] 〔식 중,

[0185] p 및 p'는 동일 또는 상이하며, 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0186] q 및 q'는 동일 또는 상이하며, 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0187] X 및 X'는 동일 또는 상이하며, 탄소 원자, 질소 원자, 또는 단결합(여기서, X가 질소 원자인 경우, R_{1b}는 존재하지 않고, X'가 질소 원자인 경우, $R_{1b'}$는 존재하지 않는다. X가 단결합인 경우, R_{1a} 및 R_{1b}는 존재하지 않고, X'가 단결합인 경우, $R_{1a'}$ 및 $R_{1b'}$는 존재하지 않는다)이고,

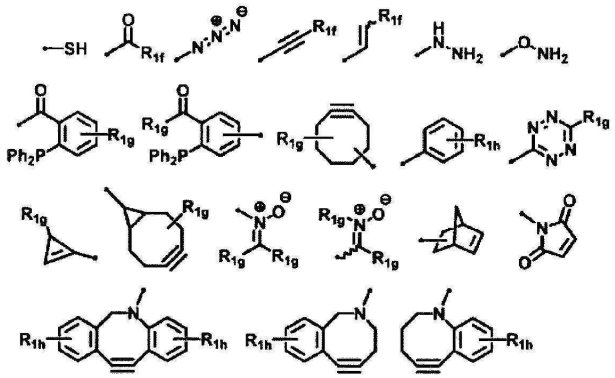
[0188] R_{1a}, R_{1b}, $R_{1a'}$ 및 $R_{1b'}$는 동일 또는 상이하며, 상기 (i) 내지 (vii)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 원자 또는 기〕로 표시되는, 〔26〕의 화합물 또는 이의 염.

[0189] 〔28〕 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기가 아지드 잔기, 알데히드 잔기, 티올 잔기, 알킨 잔기, 알켄 잔기, 테트라진 잔기, 니트론 잔기, 하이드록실아민 잔기, 니트릴 잔기, 히드라진 잔기, 케톤 잔기, 보론산 잔기, 시아노벤조티아졸 잔기, 알릴 잔기, 포스핀 잔기, 말레이미드 잔기, 디술피드 잔기, 티오에스테르기, α-할로카르보닐 잔기, 이소니트릴 잔기, 시드논 잔기, 셀렌 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 생체 직교성 관능기를 주쇄에 포함하는 2가의 기인, 〔1〕 내지 〔27〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0190] 〔29〕 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기가 아지드 잔기, 알데히드 잔기, 티올 잔기, 알킨 잔기, 알켄 잔기, 할로겐 잔기, 테트라진 잔기, 니트론 잔기, 하이드록실아민 잔기, 니트릴 잔기, 히드라진 잔기, 케톤 잔기, 보론산 잔기, 시아노벤조티아졸 잔기, 알릴 잔기, 포스핀 잔기, 말레이미드 잔기, 디술피드 잔기, α-할로카르보닐 잔기, 이소니트릴 잔기, 시드논 잔기, 셀렌 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 생체 직교성 관능기를 측쇄에 포함하는 2가의 기인, 〔1〕 내지 〔27〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0191] 〔30〕 생체 직교성 관능기가 하기:

[0192] [화 5]

[0193] 

[0194] 〔식 중,

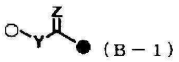
[0195] R_{1f}, 단일 또는 복수의 R_{1g} 및 단일 또는 복수의 R_{1h}는 동일 또는 상이하며, 상기 (i) 내지 (vii)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 원자 또는 기, 또는 전자 흡인기이고,

[0196] ·은 결합수이다)로 표시되는 어느 하나인, 〔1〕 내지 〔29〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0197] 〔31〕 상기 (b)의 2가의 기가 치환되어 있어도 좋은 알킬렌, 치환되어 있어도 좋은 사이클로알킬렌, 치환되어 있어도 좋은 아릴, 치환되어 있어도 좋은 2가의 복소환기, $-NR_a-$(R_a는 수소 원자, 또는 치환기를 나타낸다), -O-, 또는 이들 2 이상의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 〔1〕 내지 〔30〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0198] 〔32〕 B가 하기 식 (B-1):

[0199] [화 6]

[0200] 

[0201] 〔식 중,

[0202] Y는 -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 하기 식 (B-2):

[0203] [화 7]

[0204] 

[0205] (식 중,

[0206] V 및 V' 는 동일 또는 상이하며, -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 단결합이고,

[0207] V1은 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이고,

[0208] s는 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0209] 식 (B-2)에서의 ○ 및 ●은 각각, 식 (B-1)에서의 ○ 및 ●과 같은 배향이다)이고,

[0210] Z는 산소 원자, 유황 원자, 또는 수소 원자(Z가 수소 원자인 경우, $-C(=Z)-$은 $-CH_2-$를 나타낸다)이고,

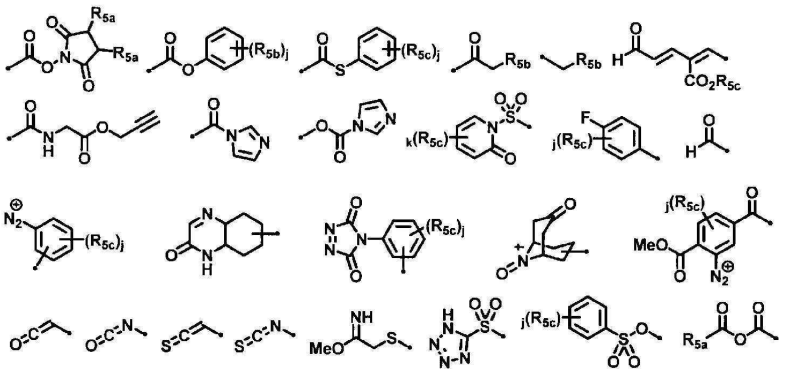
[0211] 식 (B-1)에서의 ○(흰 환형)은 L측의 부분에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 R측의 부분에 대한 결합을 나타낸다〕로 표시되는, 〔1〕 내지 〔31〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0212] 〔33〕 반응성기가 리신 잔기, 티로신 잔기, 또는 트립토판 잔기 중 어느 하나의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인, 〔1〕 내지 〔32〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0213] 〔34〕 반응성기가 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인, 〔33〕의 화합물 또는 이의 염.

[0214] 〔35〕 반응성기가 하기:

[0215] [화 8]

[0216] 

[0217] 〔여기서,

[0218] R_{5a} 및 R_{5c}는 상기 (i) 내지 (vii)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 원자 또는 기이고,

[0219] R_{5b}는 전자 흡인기이고,

[0220] j는 1 내지 5의 임의의 정수이고,

[0221] k는 1 내지 4의 임의의 정수이다〕로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하는, 〔1〕 내지 〔34〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0222] 〔36〕 A 및 R을 연결하는 주쇄의 원자수가 4 내지 20개인, 〔1〕 내지 〔35〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0223] 〔37〕 A 및 R을 연결하는 주쇄가 환 구조를 포함하지 않는, 〔1〕 내지 〔36〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0224] 〔38〕 L-B로 표시되는 부분 구조가 펩티드 부분을 포함하지 않는, 〔1〕 내지 〔37〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0225] 〔39〕 상기 식 (I)로 표시되는 화합물이 하기(I')：

[0226] A-B2-L'-B1-R (I')

[0227] 〔식 중,

[0228] A 및 R은 상기 식 (I)의 것과 같고,

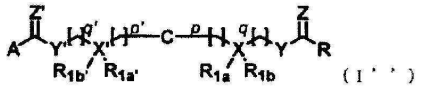
[0229] L'는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0230] B1 및 B2는 동일 또는 상이하며, (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0231] B1 및 B2는 L'를 중심으로 한 대칭 구조를 갖고 있어도 좋다〕로 표시되는 화합물인, 〔1〕 내지 〔38〕 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 염.

[0232] 〔40〕 상기 식 (I')로 표시되는 화합물이 하기(I'')：

[0233] [화 9]

[0234] 

[0235] 〔식 중,

[0236] A 및 R은 〔1〕에 기재된 식 (I)의 것과 같고,

[0237] c는 절단성 부분이고,

[0238] p, p', q, q', X, X', R_{1a}, $R_{1a'}$, R_{1b}, 및 $R_{1b'}$는 〔27〕에 기재된 식 (La') 및 (Lb')의 것과 같고,

[0239] Y 및 Y'는 동일 또는 상이하며, 〔32〕에 기재된 식 (B-1)의 Y와 같고,

[0240] Z 및 Z'는 동일 또는 상이하며, 상기 식 (B-1)의 Z와 같다〕로 표시되는, 〔39〕의 화합물 또는 이의 염.

[0241] 〔41〕 하기 식 (I):

[0242] A-L-B-R (I)

[0243] 〔식 중,

[0244] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0245] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0246] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0247] R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기이다〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물 또는 이의 염을 포함하는 가용성 단백질의 위치 선택적 수식 시약.

[0248] 〔42〕 하기 식 (I):

[0249] A-L-B-R (I)

[0250] 〔식 중,

[0251] A는 항체에 대한 친화성 물질이고,

[0252] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0253] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0254] R은 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기이다〕로 표시되는, 항체에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물 또는 이의 염.

[0255] 〔43〕 하기 식 (I):

[0256] 하기 식 (I):

[0257] A-L-B-R (I)

[0258] 〔식 중,

[0259] A는 항체에 대한 친화성 물질이고,

[0260] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0261] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0262] R은 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기이다〕로 표시되는, 항체에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물 또는 이의 염을 포함하는, 항체의 위치 선택적 수식 시약.

[0263] 두 번째로, 본 발명은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염, 및 그 제조 방법을 제공한다.

[0264] (가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염)

[0265] 〔44〕 하기 식 (II):

[0266] A-L-B-R'-T (II)

[0267] 〔식 중,

[0268] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0269] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0270] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0271] R' 는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0272] T는 가용성 단백질이다〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0273] 〔45〕 가용성 단백질이 모노클로날 항체인, 〔44〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0274] 〔46〕 가용성 단백질이 IgG 항체인, 〔44〕 또는 〔45〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0275] 〔47〕 가용성 단백질이 인간 유래인, 〔44〕 내지 〔46〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0276] 〔48〕 가용성 단백질이, 하기 (A) 내지 (C)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 Fc 영역 단백질을 포함하고, 또한 항원 결합능을 갖는 항체인, 〔44〕 내지 〔47〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염:

[0277] (A) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질;

[0278] (B) 서열번호 1의 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 몇 개의 아미노산 잔기가 삽입, 부가, 결실 또는 치환된 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질; 또는

[0279] (C) 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질.

[0280] 〔49〕 가용성 단백질이, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하고,

[0281] A-L-B-R' 로 표시되는 구조 단위가, 상기 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 〔44〕 내지 〔48〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0282] 〔50〕 상기 표적 영역이 연속하는 1 내지 10개의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역인, 〔49〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0283] 〔51〕 상기 표적 영역이 연속하는 1 내지 3개의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역인, 〔50〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0284] 〔52〕 상기 표적 영역이, (a) 인간 IgG Fc 영역에서의 246 내지 248 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역, (b) 인간 IgG Fc 영역에서의 288 내지 290 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역, 또는 (c) 인간 IgG Fc 영역에서의 317 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역인, 〔51〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0285] 〔53〕 상기 위치 선택성이 50% 이상인, 〔49〕 내지 〔52〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0286] 〔54〕 상기 위치 선택성이 70% 이상인, 〔53〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0287] 〔55〕 상기 위치 선택성이 90% 이상인, 〔54〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0288] 〔56〕 상기 특정한 아미노산 잔기가, 특정한 위치에 존재하는 특정한 아미노산을 중심으로 하여 각각 N 말단측 및 C 말단측에 대하여 a개(여기서, a는 1 내지 10의 임의의 정수)의 아미노산 잔기의 원격 위치까지의 영역에 있어서, 상기 특정한 위치에 존재하는 특정한 아미노산 잔기 이외에, 특정한 아미노산 잔기와 동종의 아미노산 잔기를 포함하지 않는, 〔49〕 내지 〔55〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0289] 〔57〕 상기 가용성 단백질이 복수의 단량체 단백질을 포함하는 다량체 단백질이고,

[0290] T가, 복수개의 단량체 단백질 중의 대응하는 복수개의 표적 영역에 있어서, A-L-B-R' 로 표시되는 구조 단위를 갖는 결과, 상기 다량체 단백질이 A-L-B-R' 로 표시되는 구조 단위를 복수개 갖는 〔44〕 내지 〔56〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0291] 〔58〕 상기 가용성 단백질이 복수개의 중쇄를 포함하는 항체이고,

[0292] T가, 복수개의 중쇄 중의 대응하는 복수개의 표적 영역에 있어서, A-L-B-R'로 표시되는 구조 단위를 갖는 결과, 상기 항체가 A-L-B-R'로 표시되는 구조 단위를 복수개 갖는 〔44〕 내지 〔57〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

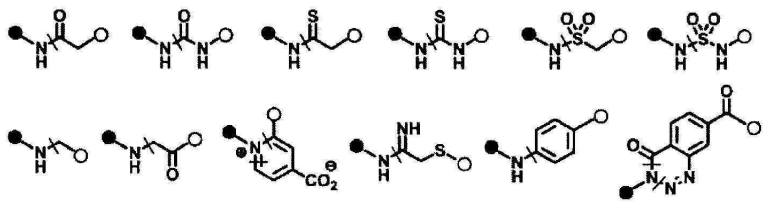
[0293] 〔59〕 중쇄의 개수가 2개인, 〔58〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0294] 〔60〕 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이 리신 잔기, 티로신 잔기, 또는 트립토판 잔기에 대한, 리신 잔기, 티로신 잔기, 또는 트립토판 잔기 중 어느 하나의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기의 반응에 의해 생성되는 부분인, 〔44〕 내지 〔59〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0295] 〔61〕 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이 리신 잔기와, 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분인, 〔44〕 내지 〔60〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0296] 〔62〕 상기 반응에 의해 생성되는 부분이 하기:

[0297] [화 10]

[0298] 

[0299] 〔여기서, ●(검은 환형)은 T측의 부분에 대한 결합을 나타내고, ○(흰 환형)은 B측의 부분에 대한 결합을 나타낸다. 결합에 직교하는 직선은 반응에 의해 생성되는 결합을 나타낸다〕로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하는, 〔44〕 내지 〔61〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0300] 〔63〕 A 및 R'를 연결하는 주쇄의 원자수가 4 내지 20개인, 〔44〕 내지 〔62〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0301] 〔64〕 A 및 R을 연결하는 주쇄가 환 구조를 포함하지 않는, 〔44〕 내지 〔63〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0302] 〔65〕 L-B로 표시되는 부분 구조가 펩티드 부분을 포함하지 않는, 〔44〕 내지 〔64〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0303] 〔66〕 상기 식 (II)로 표시되는 화합물이 하기(II'):

[0304] A-B2-L'-B1-R'-T (II')

[0305] 〔식 중,

[0306] A, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

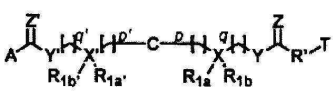
[0307] L'는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0308] B1 및 B2는 동일 또는 상이하며, (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0309] B1 및 B2는 L'를 중심으로 한 대칭 구조를 갖고 있어도 좋다〕로 표시되는 화합물인, 〔44〕 내지 〔65〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0310] 〔67〕 상기 식 (II')로 표시되는 화합물이 하기(II''):

[0311] [화 11]

[0312]  (II'')

[0313] 〔식 중,

[0314] A, R' 및 T는 〔44〕에 기재된 식 (II)의 것과 같고,

[0315] c는 절단성 부분이고,

[0316] p 및 p'는 동일 또는 상이하며, 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0317] q 및 q'는 동일 또는 상이하며, 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0318] X 및 X'는 동일 또는 상이하며, 탄소 원자, 질소 원자, 또는 단결합(여기서, X가 질소 원자인 경우, R_{1b}는 존재하지 않고, X'가 질소 원자인 경우, $R_{1b'}$는 존재하지 않는다. X가 단결합인 경우, R_{1a} 및 R_{1b}는 존재하지 않고, X'가 단결합인 경우, $R_{1a'}$ 및 $R1_{b'}$는 존재하지 않는다)이고,

[0319] R_{1a}, R_{1b}, $R_{1a'}$ 및 $R_{1b'}$는 동일 또는 상이하며,

[0320] (i) 수소 원자, 또는 할로겐 원자;

[0321] (ii) 1가의 탄화수소기;

[0322] (iii) 아르알킬;

[0323] (iv) 1가의 복소환기;

[0324] (v) R_c-O-, R_c-C(=O)-, R_c-O-C(=O)-, 또는 R_c-C(=O)-O-(R_c는 수소 원자, 또는 1가의 탄화수소기를 나타낸다);

[0325] (vi) NR_dR_e-, NR_dR_e-C(=O)-, NR_dR_e-C(=O)-O-, 또는 R_d-C(=O)-NR_e-(R_d 및 R_e는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 1가의 탄화수소기를 나타낸다); 또는

[0326] (vii) 니트로기, 황산기, 술폰산기, 시아노기, 또는 카르복실기

[0327] 로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고,

[0328] Y 및 Y'는 동일 또는 상이하며, 〔32〕에 기재된 식 (B-1)의 Y와 같고,

[0329] Z 및 Z'는 동일 또는 상이하며, 상기 식 (B-1)의 Z와 같다〕로 표시되는, 〔66〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0330] 〔68〕 하기 식 (II):

[0331] A-L-B-R'-T (II)

[0332] 〔식 중,

[0333] A는 항체에 대한 친화성 물질이고,

[0334] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0335] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0336] R'는 항체와, 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0337] T는 항체이다〕로 표시되는, 항체에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 항체 또는 이의 염.

[0338] (가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법)

[0339] 〔69〕 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[0340] 하기 식 (I):

[0341] A-L-B-R (I)

[0342] 〔식 중,

[0343] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0344] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0345] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0346] R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기]로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물 또는 이의 염을, 가용성 단백질과 반응시켜서,

[0347] 하기 식 (II):

[0348] A-L-B-R'-T (II)

[0349] [식 중,

[0350] A, L, 및 B는 상기 식 (I)의 것과 같고,

[0351] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0352] T는 가용성 단백질이다]로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[0353] [70] 가용성 단백질이 항체이고, 반응성기가 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인, [69]의 방법.

[0354] 세 번째로, 본 발명은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염, 및 그 제조 방법을 제공한다.

[0355] (가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염)

[0356] [71] 하기 식 (III):

[0357] A-L-B'(-F)-R'-T (III)

[0358] [식 중,

[0359] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0360] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0361] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0362] F는 기능성 물질이고,

[0363] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0364] T는 가용성 단백질]로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염.

[0365] [72] 가용성 단백질이 모노클로날 항체인, [71]의 복합체 또는 이의 염.

[0366] [73] 가용성 단백질이 IgG 항체인, [71] 또는 [72]의 복합체 또는 이의 염.

[0367] [74] 가용성 단백질이 인간 유래인, [71] 내지 [73] 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0368] [75] 가용성 단백질이, 하기 (A) 내지 (C)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 Fc 영역 단백질을 포함하고, 또한 항원 결합능을 갖는 항체인, [71] 내지 [74] 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염:

[0369] (A) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질;

[0370] (B) 서열번호 1의 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 몇 개의 아미노산 잔기가 삽입, 부가, 결실 또는 치환된 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질; 또는

[0371] (C) 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질.

[0372] [76] 가용성 단백질이, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한

아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하고,

[0373] A-L-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 〔71〕 내지 〔75〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0374] 〔77〕 상기 특정한 아미노산 잔기가, 특정한 위치에 존재하는 특정한 아미노산을 중심으로 하여 각각 N 말단측 및 C 말단측에 대하여 a개(여기서, a는 1 내지 10의 임의의 정수)의 아미노산 잔기의 원격 위치까지의 영역에 있어서, 상기 특정한 위치에 존재하는 특정한 아미노산 잔기 이외에, 특정한 아미노산 잔기와 동종의 아미노산 잔기를 포함하지 않는, 〔76〕의 복합체 또는 이의 염.

[0375] 〔78〕 상기 가용성 단백질이 복수의 단량체 단백질을 포함하는 다량체 단백질이고,

[0376] T가, 복수개의 단량체 단백질 중의 대응하는 복수개의 표적 영역에 있어서, A-L-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위를 갖는 결과, 상기 다량체 단백질이 A-L-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위를 복수개 갖는 〔71〕 내지 〔77〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

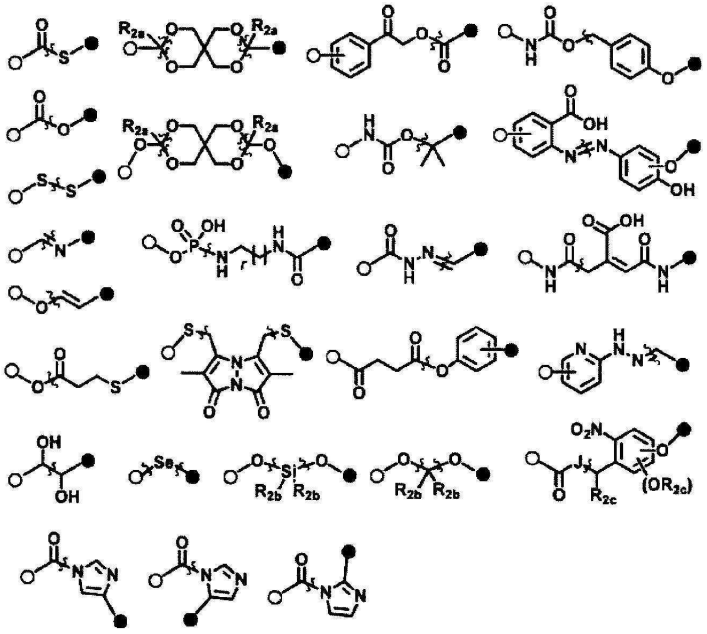
[0377] 〔79〕 상기 가용성 단백질이 복수개의 중쇄를 포함하는 항체이고,

[0378] T가, 복수개의 중쇄 중의 대응하는 복수개의 표적 영역에 있어서, A-L-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위를 갖는 결과, 상기 항체가 A-L-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위를 복수개 갖는 〔71〕 내지 〔78〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0379] 〔80〕 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기가, 디술피드 잔기, 아세탈 잔기, 케탈 잔기, 에스테르 잔기, 카르바모일 잔기, 알콕시알킬 잔기, 이민 잔기, 3급 알킬옥시카르바메이트 잔기, 실란 잔기, 하이드라존 함유 잔기, 포스포르아미데이트 잔기, 아코니틸 잔기, 트리틸 잔기, 아조 잔기, 비시날디올 잔기, 셀렌 잔기, 전자 흡인기를 갖는 방향족환 함유 잔기, 쿠마린 함유 잔기, 술폰 함유 잔기, 불포화 결합 함유 쇄 잔기, 글리코실 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 반응 부분을 포함하는 2가의 기인, 〔71〕 내지 〔79〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0380] 〔81〕 상기 반응에 의해 생성되는 부분이 하기:

[0381] [화 12]



[0382]

[0383] 〔여기서, 결합에 직교하는 파선은 반응에 의해 생성되는 결합을 나타내고,

[0384] 복수의 R_{2a}, 복수의 R_{2b}, 및 복수의 R_{2c}는 동일 또는 상이하며,

[0385] (i) 수소 원자, 또는 할로겐 원자;

[0386] (ii) 1가의 탄화수소기;

[0387] (iii) 아르알킬;

[0388] (iv) 1가의 복소환기;

[0389] (v) R_c-O-, R_c-C(=O)-, R_c-O-C(=O)-, 또는 R_c-C(=O)-O-(R_c는 수소 원자, 또는 1가의 탄화수소기를 나타낸다);

[0390] (vi) NR_dR_e-, NR_dR_e-C(=O)-, NR_dR_e-C(=O)-O-, 또는 R_d-C(=O)-NR_e-(R_d 및 R_e는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 1가의 탄화수소기를 나타낸다); 또는

[0391] (vii) 니트로기, 황산기, 술폰산기, 시아노기, 또는 카르복실기

[0392] 로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고,

[0393] J는 $-CH_2-$, -O-, 또는 -S-이고,

[0394] r은 1 내지 4의 임의의 정수이고,

[0395] ○(흰 환형)은 A에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 B에 대한 결합을 나타낸다.

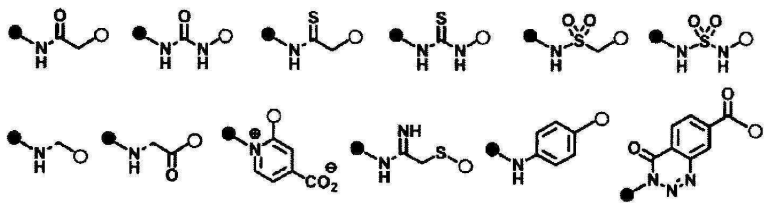
[0396] 화학 구조가 절단 부위를 중심으로 하여 비대칭인 경우, ●이 A에 대한 결합을 나타내고, ○이 B에 대한 결합을 나타내고 있어도 좋다] 로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하는, 〔71〕 내지 〔80〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0397] 〔82〕 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이 리신 잔기, 티로신 잔기, 또는 트립토판 잔기와, 리신 잔기, 티로신 잔기, 또는 트립토판 잔기 중 어느 하나의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분인, 〔71〕 내지 〔81〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0398] 〔83〕 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이 리신 잔기와, 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분인, 〔71〕 내지 〔82〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0399] 〔84〕 상기 반응에 의해 생성되는 부분이 하기:

[0400] [화 13]

[0401] 

[0402] 〔여기서, ●(검은 환형)은 T측의 부분에 대한 결합을 나타내고, ○(흰 환형)은 B측의 부분에 대한 결합을 나타낸다] 로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하는, 〔71〕 내지 〔83〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0403] 〔85〕 기능성 물질이 약물 또는 표지 물질인, 〔71〕 내지 〔84〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0404] 〔86〕 기능성 물질이 저분자 화합물인, 〔71〕 내지 〔85〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0405] 〔87〕 약물이 항암제인, 〔85〕 또는 〔86〕의 복합체 또는 이의 염.

[0406] 〔88〕 A 및 R'를 연결하는 주쇄의 원자수가 4 내지 20개인, 〔71〕 내지 〔87〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0407] 〔89〕 A 및 R을 연결하는 주쇄가 환 구조를 포함하지 않는, 〔71〕 내지 〔88〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0408] 〔90〕 L-B로 표시되는 부분 구조가 펩티드 부분을 포함하지 않는, 〔71〕 내지 〔89〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0409] 〔91〕 상기 식 (III)으로 표시되는 화합물이 하기 식 (III'):

[0410] A-B2'(-F2)-L'-B1'(-F1)-R'-T (III')

[0411] 〔식 중,

[0412] A, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[0413] L'는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

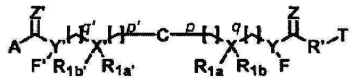
[0414] B1' 및 B2'는 동일 또는 상이하며, 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0415] F1 및 F2는 동일 또는 상이하며, 기능성 물질이고,

[0416] B1'(-F1) 및 B2'(-F2)는 L'를 중심으로 한 대칭 구조를 갖고 있어도 좋다〕로 표시되는, 〔71〕 내지 〔90〕 중 어느 한 항의 복합체 또는 이의 염.

[0417] 〔92〕 상기 식 (III')로 표시되는 화합물이 하기(III'') :

[0418] [화 14]

[0419] 

(III'')

[0420] 〔식 중,

[0421] A, R' 및 T는 〔71〕에 기재된 식 (III)의 것과 같고,

[0422] c는 절단성 부분이고,

[0423] p 및 p'는 동일 또는 상이하며, 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0424] q 및 q'는 동일 또는 상이하며, 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0425] X 및 X'는 동일 또는 상이하며, 탄소 원자, 질소 원자, 또는 단결합(여기서, X가 질소 원자인 경우, R_{1b}는 존재하지 않고, X'가 질소 원자인 경우, $R_{1b'}$는 존재하지 않는다. X가 단결합인 경우, R_{1a} 및 R_{1b}는 존재하지 않고, X'가 단결합인 경우, $R_{1a'}$ 및 $R_{1b'}$는 존재하지 않는다)이고,

[0426] R_{1a}, R_{1b}, $R_{1a'}$ 및 $R_{1b'}$는 동일 또는 상이하며, 상기 (i) 내지 (vii)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고,

[0427] Y 및 Y'는 동일 또는 상이하며, 〔32〕에 기재된 식 (B-1)의 Y에서 수소 원자를 1개 제외한 잔기이고,

[0428] Z 및 Z'는 동일 또는 상이하며, 상기 식 (B-1)의 Z와 동일하고,

[0429] F 및 F'는 동일 또는 상이하며, 기능성 물질〕로 표시되는, 〔91〕의 복합체 또는 이의 염.

[0430] 〔93〕 하기 식 (III):

[0431] A-L-B'(-F)-R'-T (III)

[0432] 〔식 중,

[0433] A는 항체에 대한 친화성 물질이고,

[0434] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0435] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0436] F는 기능성 물질이고,

[0437] R'는 항체와, 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0438] T는 항체이다〕로 표시되는, 친화성 물질, 기능성 물질 및 항체를 갖는 복합체 또는 이의 염.

[0439] (가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염

의 제조 방법)

[0440] 〔94〕 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[0441] 하기 식 (II):

[0442] A-L-B-R'-T (II)

[0443] 〔식 중,

[0444] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0445] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0446] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이고,

[0447] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0448] T는 가용성 단백질〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을, 기능성 물질과 반응시켜서,

[0449] 하기 식 (III):

[0450] A-L-B'(-F)-R'-T (III)

[0451] 〔식 중,

[0452] A, L, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[0453] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0454] F는 기능성 물질이다〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[0455] 〔95〕 가용성 단백질이 항체이고, 반응성기가 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인, 〔94〕의 방법.

[0456] 〔96〕 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[0457] (A) 하기 식 (I):

[0458] A-L-B-R (I)

[0459] 〔식 중,

[0460] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0461] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0462] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이고,

[0463] R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기〕로 표시되는 화합물 또는 이의 염을, 가용성 단백질과 반응시켜서,

[0464] 하기 식 (II):

[0465] A-L-B-R'-T (II)

[0466] 〔식 중,

[0467] A, L, 및 B는 상기 식 (I)의 것과 같고,

[0468] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0469] T는 가용성 단백질〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것, 및

[0470] (B) 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을, 기능성 물

질과 반응시켜서,

[0471] 하기 식 (III):

[0472] A-L-B'(-F)-R'-T (III)

[0473] 〔식 중,

[0474] A 및 L은 상기 식 (I)의 것과 같고,

[0475] R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[0476] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0477] F는 기능성 물질이다〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[0478] 네 번째로, 본 발명은 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질의 제조 방법을 제공한다.

[0479] 〔97〕 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[0480] 하기 식 (II):

[0481] A-L-B-R'-T (II)

[0482] 〔식 중,

[0483] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0484] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0485] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0486] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0487] T는 가용성 단백질이다〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[0488] 하기 식 (IV):

[0489] L1-B-R'-T (IV)

[0490] 〔식 중,

[0491] B, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[0492] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이다〕로 표시되는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[0493] 〔98〕 L이, (i) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커, 또는 (ii) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖지 않는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커인, 〔97〕의 방법.

[0494] 〔99〕 L이 상기 (i)의 절단성 링커이고,

[0495] L1이 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기이고,

[0496] B가 상기 (a) 또는 (b)의 2가의 기인, 〔98〕의 방법.

[0497] 〔100〕 L이 상기 (i)의 절단성 링커이고,

[0498] L1이 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기이고,

[0499] B가 상기 (b)의 2가의 기인, 〔98〕 또는 〔99〕의 방법.

[0500] 〔101〕 L이 상기 (ii)의 절단성 링커이고,

[0501] L1이 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[0502] B가 상기 (a)의 2가의 기인, 〔98〕의 방법.

[0503] 〔102〕 가용성 단백질이 항체이고, 반응성기가 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인, 〔97〕 내지 〔101〕 중 어느 한 항의 방법.

[0504] 〔103〕 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[0505] (A) 하기 식 (I):

[0506] A-L-B-R (I)

[0507] 〔식 중,

[0508] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0509] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0510] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0511] R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기이다〕로 표시되는 화합물 또는 이의 염을, 가용성 단백질과 반응시켜서,

[0512] 하기 식 (II):

[0513] A-L-B-R'-T (II)

[0514] 〔식 중,

[0515] A, L, 및 B는 상기 식 (I)의 것과 같고,

[0516] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0517] T는 가용성 단백질이다〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것, 및

[0518] (B) 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[0519] 하기 식 (IV):

[0520] L1-B-R'-T (IV)

[0521] 〔식 중,

[0522] B, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[0523] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기〕로 표시되는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[0524] 다섯 번째로, 본 발명은 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다.

[0525] 〔104〕 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[0526] 하기 식 (III):

[0527] A-L-B'(-F)-R'-T (III)

[0528] 〔식 중,

[0529] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0530] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0531] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0532] F는 기능성 물질이고,

[0533] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0534] T는 가용성 단백질이다]로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여, 또는

[0535] 하기 식 (IV):

[0536] L1-B-R'-T (IV)

[0537] 〔식 중,

[0538] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[0539] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0540] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0541] T는 가용성 단백질이다]로 표시되는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 기능성 물질과 반응시켜서,

[0542] 하기 식 (V):

[0543] F-(L1-B)'-R'-T (V)

[0544] 〔식 중,

[0545] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[0546] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0547] (L1-B)'로 표시되는 구조 단위는 기능성 물질과, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기 중 어느 한쪽 또는 쌍방 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 구조 단위이고,

[0548] F는 기능성 물질이고,

[0549] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0550] T는 가용성 단백질]로 표시되는, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[0551] 〔105〕 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[0552] 하기 식 (V1):

[0553] L1-B'(-F)-R'-T (V1)

[0554] 〔식 중,

[0555] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[0556] B', F, R' 및 T는 상기 식 (III)의 것과 같다]로 표시되는, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는 방법인, 〔104〕의 방법.

[0557] 〔106〕 상기 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을, 1종 또는 2종의 기능성 물질과 반응시켜서,

[0558] 하기 식 (V2):

[0559] F-L1'-B-R'-T (V2)

[0560] 〔식 중,

[0561] B, R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같고,

[0562] L1'는 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0563] F는 기능성 물질이다〕, 또는

[0564] 하기 식 (V3):

[0565] Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

[0566] 〔식 중,

[0567] R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같고,

[0568] L1'는 상기 식 (V2)의 것과 같고,

[0569] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0570] Fa 및 Fb는 각각, 동일 또는 다른 기능성 물질이다〕로 표시되는, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는 방법인, 〔104〕의 방법.

[0571] 〔107〕 가용성 단백질이 항체이고, 반응성기가 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인, 〔104〕 내지 〔106〕 중 어느 한 항의 방법.

[0572] 〔108〕 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[0573] (A) 하기 식 (II):

[0574] A-L-B-R'-T (II)

[0575] 〔식 중,

[0576] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0577] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0578] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이고,

[0579] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0580] T는 가용성 단백질〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을, 기능성 물질과 반응시켜서,

[0581] 하기 식 (III):

[0582] A-L-B'(-F)-R'-T (III)

[0583] 〔식 중,

[0584] A, L, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[0585] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0586] F는 기능성 물질이다〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염을 생성하는 것, 및

[0587] (B) 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[0588] 하기 식 (V1):

[0589] L1-B'(-F)-R'-T (V1)

[0590] 〔식 중,

[0591] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[0592] B', F, R' 및 T는 상기 식 (III)의 것과 같다〕로 표시되는, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[0593] 〔109〕 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[0594] (A) 하기 식 (I):

[0595] A-L-B-R (I)

[0596] 〔식 중,

[0597] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0598] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0599] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이고,

[0600] R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기이다〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물 또는 이의 염을, 가용성 단백질과 반응시켜서,

[0601] 하기 식 (II):

[0602] A-L-B-R'-T (II)

[0603] 〔식 중,

[0604] A, L, 및 B는 상기 식 (I)의 것과 같고,

[0605] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0606] T는 가용성 단백질이다〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것,

[0607] (B) 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을, 기능성 물질과 반응시켜서,

[0608] 하기 식 (III):

[0609] A-L-B'(-F)-R'-T (III)

[0610] 〔식 중,

[0611] A 및 L은 상기 식 (I)의 것과 같고,

[0612] R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[0613] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0614] F는 기능성 물질〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염을 생성하는 것, 및

[0615] (C) 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[0616] 하기 식 (V1):

[0617] L1-B'(-F)-R'-T (V1)

[0618] 〔식 중,

[0619] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[0620] B', F, R' 및 T는 상기 식 (III)의 것과 같다] 로 표시되는, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[0621] [110] 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[0622] (A) 하기 식 (II):

[0623] A-L-B-R'-T (II)

[0624] [식 중,

[0625] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0626] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0627] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0628] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0629] T는 가용성 단백질이다] 로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[0630] 하기 식 (IV):

[0631] L1-B-R'-T (IV)

[0632] [식 중,

[0633] B, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[0634] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기] 로 표시되는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것, 및

[0635] (B) 상기 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을, 1종 또는 2종 이상의 기능성 물질과 반응시켜서,

[0636] 하기 식 (V2)

[0637] F-L1'-B-R'-T (V2)

[0638] [식 중,

[0639] B, R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같고,

[0640] L1'는 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0641] F는 기능성 물질이다], 또는

[0642] 하기 식 (V3):

[0643] Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

[0644] [식 중,

[0645] R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같고,

[0646] L1'는 상기 식 (V2)의 것과 같고,

[0647] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0648] Fa 및 Fb는 각각, 동일 또는 다른 기능성 물질이다] 로 표시되는, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[0649] [111] 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[0650] (A) 하기 식 (I):

[0651] A-L-B-R (I)

[0652] 〔식 중,

[0653] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0654] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0655] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0656] R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기이다〕로 표시되는 화합물 또는 이의 염을, 가용성 단백질과 반응시켜서,

[0657] 하기 식 (II):

[0658] A-L-B-R'-T (II)

[0659] 〔식 중,

[0660] A, L, 및 B는 상기 식 (I)의 것과 같고,

[0661] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0662] T는 가용성 단백질이다〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것,

[0663] (B) 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[0664] 하기 식 (IV):

[0665] L1-B-R'-T (IV)

[0666] 〔식 중,

[0667] B, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[0668] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기〕로 표시되는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것, 및

[0669] (C) 상기 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을, 1종 또는 2종 이상의 기능성 물질과 반응시켜서,

[0670] 하기 식 (V2)

[0671] F-L1'-B-R'-T (V2)

[0672] 〔식 중,

[0673] B, R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같고,

[0674] L1'는 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0675] F는 기능성 물질이다〕, 또는

[0676] 하기 식 (V3):

[0677] Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

[0678] 〔식 중,

[0679] R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같고,

[0680] L1'는 상기 식 (V2)의 것과 같고,

[0681] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0682] Fa 및 Fb는 각각, 동일 또는 다른 기능성 물질이다〕로 표시되는, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[0683] 여섯 번째로, 본 발명은 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염, 및 그 제조 방법을 제공한다.

[0684] (생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염)

[0685] 〔1〕 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염으로서,

[0686] 가용성 단백질이, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하고, 또한

[0687] 생체 직교성 관능기가 펩티드 부분을 포함하지 않는 링커를 통하여, 상기 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0688] 〔2〕 하기 식 (IV):

[0689] L1-B-R'-T (IV)

[0690] 〔식 중,

[0691] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[0692] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0693] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0694] T는 가용성 단백질이고,

[0695] 상기 가용성 단백질은, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다〕로 표시되고, 또한 L1-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0696] 〔3〕 가용성 단백질이 모노클로날 항체인, 〔1〕 또는 〔2〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0697] 〔4〕 가용성 단백질이 IgG 항체인, 〔1〕 내지 〔3〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0698] 〔5〕 가용성 단백질이 인간 유래인, 〔1〕 내지 〔4〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0699] 〔6〕 가용성 단백질이, 하기 (A) 내지 (C)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 Fc 영역 단백질을 포함하고, 또한 항원 결합능을 갖는 항체인, 〔1〕 내지 〔5〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염:

[0700] (A) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질;

[0701] (B) 서열번호 1의 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 몇 개의 아미노산 잔기가 삽입, 부가, 결실 또는 치환된 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질; 또는

[0702] (C) 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질.

[0703] 〔7〕 상기 표적 영역이 연속하는 1 내지 10개의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역인, 〔1〕 내지 〔6〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0704] 〔8〕 상기 표적 영역이 연속하는 1 내지 3개의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역인, 〔1〕 내지 〔7〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0705] 〔9〕 상기 표적 영역이, (a) 인간 IgG Fc 영역에서의 246 내지 248 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역, (b) 인간 IgG Fc 영역에서의 288 내지 290 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역, 또는 (c) 인간 IgG Fc 영

역에서의 317 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역인, 〔8〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0706] 〔10〕 상기 위치 선택성이 50% 이상인, 〔1〕 내지 〔9〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0707] 〔11〕 상기 위치 선택성이 70% 이상인, 〔10〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0708] 〔12〕 상기 위치 선택성이 90% 이상인, 〔11〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0709] 〔13〕 상기 특정한 아미노산 잔기가, 특정한 위치에 존재하는 특정한 아미노산을 중심으로 하여 각각 N 말단측 및 C 말단측에 대하여 a개(여기서, a는 1 내지 10의 임의의 정수)의 아미노산 잔기의 원격 위치까지의 영역에 있어서, 상기 특정한 위치에 존재하는 특정한 아미노산 잔기 이외에, 특정한 아미노산 잔기와 동종의 아미노산 잔기를 포함하지 않는, 〔1〕 내지 〔12〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0710] 〔14〕 상기 가용성 단백질이 복수의 단량체 단백질을 포함하는 다량체 단백질이고,

[0711] 다량체 단백질에 포함되는 복수의 단량체 단백질 중의 상기 위치에 존재하는 복수의 특정한 아미노산 잔기에 있어서 생체 직교성 관능기를 갖는 결과, 상기 다량체 단백질이 복수의 생체 직교성 관능기를 갖는 〔1〕, 〔3〕 내지 〔13〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0712] 〔15〕 상기 가용성 단백질이 복수의 중쇄를 포함하는 항체이고,

[0713] 항체에 포함되는 복수의 중쇄 중의 상기 위치에 존재하는 복수의 특정한 아미노산 잔기에 있어서 생체 직교성 관능기를 갖는 결과, 항체가 복수의 생체 직교성 관능기를 갖는 〔1〕, 〔3〕 내지 〔14〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0714] 〔16〕 상기 가용성 단백질이 복수의 단량체 단백질을 포함하는 다량체 단백질이고,

[0715] T가, 복수의 단량체 단백질 중의 대응하는 복수의 표적 영역에 있어서, A-L-B-R' 로 표시되는 구조 단위를 갖는 결과, 다량체 단백질이 A-L-B-R' 로 표시되는 구조 단위를 복수 갖는, 〔2〕 내지 〔13〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0716] 〔17〕 상기 가용성 단백질이 복수의 중쇄를 포함하는 항체이고,

[0717] T가, 복수의 중쇄 중의 대응하는 복수의 표적 영역에 있어서, A-L-B-R' 로 표시되는 구조 단위를 갖는 결과, 항체가 A-L-B-R' 로 표시되는 구조 단위를 복수 갖는, 〔2〕 내지 〔13〕, 〔16〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0718] 〔18〕 중쇄의 개수가 2개인, 〔15〕 또는 〔17〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0719] 〔19〕 L1이 하기 식 (L1-1) 내지 (L1-2):

[0720] C1-Lb (L1-1)

[0721] C1 (L1-2)

[0722] 〔식 중,

[0723] Lb는 2가의 기이고,

[0724] C1은 생체 직교성 관능기, 또는 생체 직교성 관능기 이외의 기〕 중 어느 하나로 표시되는, 〔2〕 내지 〔13〕, 〔16〕 내지 〔18〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0725] 〔20〕 상기 Lb가 하기 식 (Lb'):

[0726] [화 15]

[0727] 
(Lb')

[0728] 〔식 중,

[0729] p는 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0730] q는 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0731] X는 탄소 원자, 질소 원자, 또는 단결합(여기서, X가 질소 원자인 경우, R_{1b}는 존재하지 않는다. X가 단결합인

경우, R_{1a} 및 R_{1b}는 존재하지 않는다)이고,

[0732] R_{1a}, 및 R_{1b}는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 상술한 치환기로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.

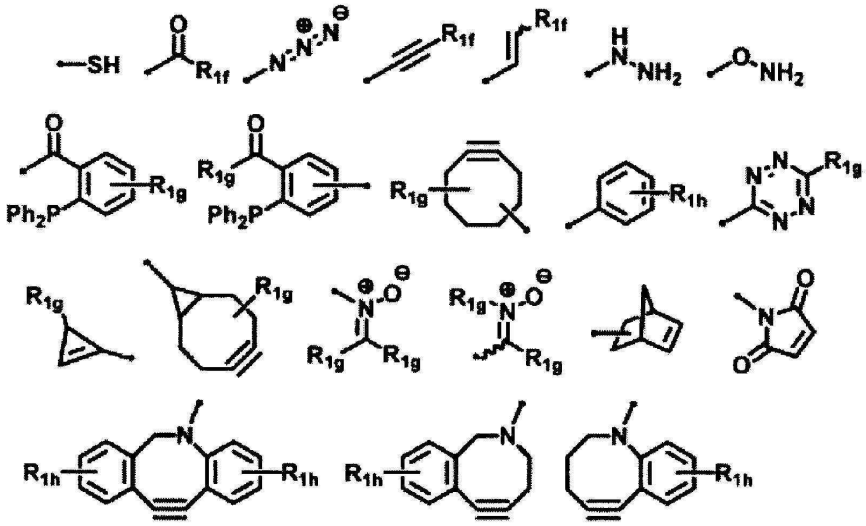
[0733] ○(흰 환형)은 C1에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 B에 대한 결합을 나타낸다] 로 표시되는, 〔19〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0734] 〔21〕 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기가 아지드 잔기, 알데히드 잔기, 티올 잔기, 알킨 잔기, 알켄 잔기, 테트라진 잔기, 니트론 잔기, 하이드록실아민 잔기, 니트릴 잔기, 히드라진 잔기, 케톤 잔기, 보론산 잔기, 시아노벤조티아졸 잔기, 알릴 잔기, 포스핀 잔기, 말레이미드 잔기, 디술피드 잔기, 티오에스테르기, α-할로카르보닐 잔기, 이소니트릴 잔기, 시드논 잔기, 셀렌 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 생체 직교성 관능기를 주쇄에 포함하는 2가의 기인, 〔1〕 내지 〔20〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0735] 〔22〕 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기가 아지드 잔기, 알데히드 잔기, 티올 잔기, 알킨 잔기, 알켄 잔기, 할로겐 잔기, 테트라진 잔기, 니트론 잔기, 하이드록실아민 잔기, 니트릴 잔기, 히드라진 잔기, 케톤 잔기, 보론산 잔기, 시아노벤조티아졸 잔기, 알릴 잔기, 포스핀 잔기, 말레이미드 잔기, 디술피드 잔기, α-할로카르보닐 잔기, 이소니트릴 잔기, 시드논 잔기, 셀렌 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 생체 직교성 관능기를 측쇄에 포함하는 2가의 기인, 〔1〕 내지 〔20〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0736] 〔23〕 생체 직교성 관능기가 하기:

[0737] [화 16]



[0738]

[0739] 〔식 중,

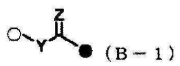
[0740] R_{1f}, 단일 또는 복수의 R_{1g} 및 단일 또는 복수의 R_{1h}는 동일 또는 상이하며, 상기 (i) 내지 (vii)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 원자 또는 기, 또는 전자 흡인기이고,

[0741] ·은 결합수)로 표시되는 어느 하나인, 〔1〕 내지 〔22〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0742] 〔24〕 상기 (b)의 2가의 기가 치환되어 있어도 좋은 알킬렌, 치환되어 있어도 좋은 사이클로알킬렌, 치환되어 있어도 좋은 아릴, 치환되어 있어도 좋은 2가의 복소환기, $-NR_a-$(R_a는 수소 원자, 또는 치환기를 나타낸다), -O-, 또는 이들 2 이상의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 〔2〕 내지 〔13〕, 〔16〕 내지 〔23〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0743] 〔25〕 B가 하기 식 (B-1):

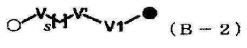
[0744] [화 17]

[0745] 

[0746] 〔식 중,

[0747] Y는 -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 하기 식 (B-2):

[0748] [화 18]

[0749] 

[0750] (식 중,

[0751] V 및 V' 는 동일 또는 상이하며, -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 단결합이고,

[0752] V1은 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이고,

[0753] s는 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0754] 식 (B-2)에서의 ○ 및 ●은 각각, 식 (B-1)에서의 ○ 및 ●과 같은 배향이다)이고,

[0755] Z는 산소 원자, 유황 원자, 또는 수소 원자(Z가 수소 원자인 경우, -C(=Z)-은 $-CH_2-$를 나타낸다)이고,

[0756] 식 (B-1)에서의 ○(흰 환형)은 L측의 부분에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 R측의 부분에 대한 결합을 나타낸다〕로 표시되는, 〔2〕 내지 〔13〕, 〔16〕 내지 〔24〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0757] 〔26〕 생체 직교성 관능기가 리신 잔기, 티로신 잔기, 또는 트립토판 잔기 중 어느 하나의 측쇄를 통하여 가용성 단백질에 결합하고 있는, 〔1〕 내지 〔25〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

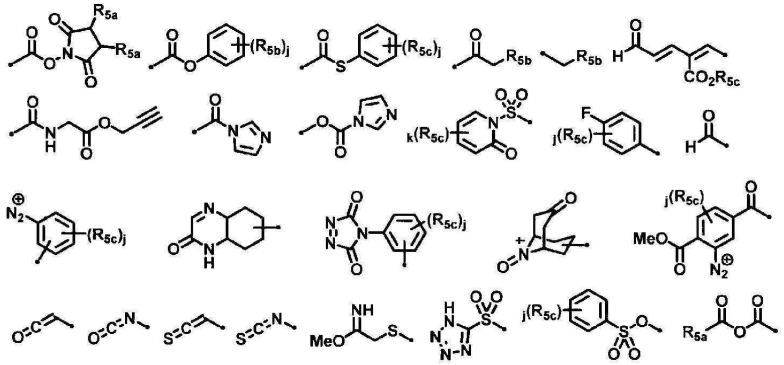
[0758] 〔27〕 생체 직교성 관능기가 리신 잔기의 측쇄를 통하여 가용성 단백질에 결합하고 있는, 〔26〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0759] 〔28〕 반응성기가 리신 잔기, 티로신 잔기, 또는 트립토판 잔기 중 어느 하나의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인, 〔2〕 내지 〔13〕, 〔16〕 내지 〔26〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0760] 〔29〕 반응성기가 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인, 〔2〕 내지 〔13〕, 〔16〕 내지 〔28〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0761] 〔30〕 반응성기가 하기:

[0762] [화 19]

[0763] 

[0764] 〔여기서,

[0765] R_{5a} 및 R_{5c}는 상기 (i) 내지 (vii)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 원자 또는 기이고,

[0766] R_{5b}는 전자 흡인기이고,

[0767] j는 1 내지 5의 임의의 정수이고,

[0768] k는 1 내지 4의 임의의 정수이다〕로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하는, 〔2〕 내지 〔13〕, 〔16〕 내지 〔29〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0769] 〔31〕 생체 직교성 관능기 및 특정한 아미노산 잔기의 측쇄를 연결하는 주쇄의 원자수가 2 내지 10개인 링커를 통하여 생체 직교성 관능기가 가용성 단백질에 결합하고 있는, 〔1〕 내지 〔30〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0770] 〔32〕 생체 직교성 관능기 및 특정한 아미노산 잔기의 측쇄를 연결하는 주쇄가 환 구조를 포함하지 않는 링커를 통하여 생체 직교성 관능기가 가용성 단백질에 결합하고 있는, 〔1〕 내지 〔31〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

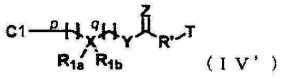
[0771] 〔33〕 L1 말단 부분 및 R'를 연결하는 주쇄의 원자수가 2 내지 10개인, 〔2〕 내지 〔13〕, 〔16〕 내지 〔32〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0772] 〔34〕 A 및 R을 연결하는 주쇄가 환 구조를 포함하지 않는, 〔2〕 내지 〔13〕, 〔16〕 내지 〔33〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0773] 〔35〕 L1-B로 표시되는 부분 구조가 펩티드 부분을 포함하지 않는, 〔2〕 내지 〔13〕, 〔16〕 내지 〔34〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0774] 〔36〕 상기 식 (IV)로 표시되는 가용성 단백질이 하기(IV'):

[0775] [화 20]

[0776] 
(IV')

[0777] 〔식 중,

[0778] C1은 생체 직교성 관능기, 또는 생체 직교성 관능기 이외의 기이다.

[0779] p, q, X, R_{1a} 및 R_{1b}는 상기 식 (Lb')의 것과 같고,

[0780] Y 및 Z는 상기의 것과 같고,

[0781] R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같다〕로 표시되는, 〔2〕 내지 〔13〕, 〔16〕 내지 〔35〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0782] 〔37〕 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염으로서,

[0783] 가용성 단백질이, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하고, 또한

[0784] 생체 직교성 관능기가 펩티드 부분을 포함하지 않는 링커를 통하여, 상기 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있고,

[0785] 생체 직교성 관능기가 리신 잔기의 측쇄를 통하여 가용성 단백질에 결합하고 있고,

[0786] 가용성 단백질이 복수의 중쇄를 포함하는 항체이고,

[0787] 항체에 포함되는 복수의 중쇄 중의 상기 위치에 존재하는 복수의 특정한 아미노산 잔기에 있어서 생체 직교성 관능기를 갖는 결과, 항체가 복수의 생체 직교성 관능기를 갖는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0788] 〔38〕 하기 식 (IV):

[0789] L1-B-R'-T (IV)

[0790] 〔식 중,

[0791] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[0792] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0793] R’ 는 항체와, 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0794] T는 가용성 단백질이고,

[0795] 상기 가용성 단백질은, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다〕로 표시되고, 또한 L1-B-R’ 로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0796] (생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법)

[0797] 본 발명은 또한, 상기 〔1〕 내지 〔38〕의 가용성 단백질 중, 식 (IV) 또는 그 하위의 식에 의한 특정을 필요로 하는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다.

[0798] 〔39〕 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[0799] 하기 식 (II):

[0800] A-L-B-R’-T (II)

[0801] 〔식 중,

[0802] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0803] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0804] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0805] R’ 는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0806] T는 가용성 단백질이고,

[0807] 상기 가용성 단백질은, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다〕로 표시되고, 또한 L1-B-R’ 로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[0808] 하기 식 (IV):

[0809] L1-B-R’-T (IV)

[0810] 〔식 중,

[0811] B, R’ 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[0812] L1은 (i’) 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii’) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기〕로 표시되고, 또한

[0813] L1-B-R’ 로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[0814] 바람직하게는, 상기 〔39〕의 방법은 이하라도 좋다.

[0815] 〔40〕 가용성 단백질이 항체이고, 반응성기가 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인, 〔39〕의 방법.

[0816] 〔41〕 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[0817] (A) 하기 식 (I):

[0818] A-L-B-R (I)

[0819] 〔식 중,

[0820] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[0821] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[0822] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0823] R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기이다〕로 표시되는 화합물 또는 이의 염을, 가용성 단백질(여기서, 가용성 단백질은, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다)과 반응시켜서,

[0824] 하기 식 (II):

[0825] A-L-B-R'-T (II)

[0826] 〔식 중,

[0827] A, L, 및 B는 상기 식 (I)의 것과 같고,

[0828] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0829] T는 가용성 단백질〕로 표시되고, 또한

[0830] L1-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것, 및

[0831] (B) 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[0832] 하기 식 (IV):

[0833] L1-B-R'-T (IV)

[0834] 〔식 중,

[0835] B, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[0836] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기〕로 표시되고, 또한

[0837] L1-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성에서 결합하고 있는 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[0838] 일곱 번째로, 본 발명은 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염, 및 그 제조 방법을 제공한다.

[0839] (기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염)

[0840] 〔1〕 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염으로서,

[0841] 가용성 단백질이, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하고, 또한

[0842] 기능성 물질이 펩티드 부분을 포함하지 않는 링커를 통하여, 상기 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0843] 〔2〕 하기 식 (V):

[0844] F-(L1-B)'-R'-T (V)

[0845] 〔식 중,

[0846] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[0847] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0848] (L1-B)'로 표시되는 구조 단위는 기능성 물질과, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기 중 어느 한쪽 또는 쌍방 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 구조 단위이고,

[0849] F는 기능성 물질이고,

[0850] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0851] T는 가용성 단백질이고,

[0852] 상기 가용성 단백질은, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다〕로 표시되고, 또한

[0853] F-(L1-B)'-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0854] 〔3〕 상기 가용성 단백질 또는 이의 염이 하기 식 (V1):

[0855] L1-B'(-F)-R'-T (V1)

[0856] 〔식 중,

[0857] L1, F, R' 및 T는 상기 식 (V)의 것과 같고,

[0858] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기〕로 표시되고, 또한 L1-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염인, 〔2〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0859] 〔4〕 상기 가용성 단백질 또는 이의 염이 하기 식 (V2):

[0860] F-L1'-B-R'-T (V2)

[0861] 〔식 중,

[0862] F, B, R' 및 T는 상기 식 (V)의 것과 같고,

[0863] L1'는 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기〕로 표시되고, 또한 F-L1'-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염, 또는

[0864] 하기 식 (V3):

[0865] Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

[0866] 〔식 중,

[0867] R' 및 T는 상기 식 (V)의 것과 같고,

[0868] L1'는 상기 식 (V2)의 것과 같고,

[0869] B' 는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[0870] Fa 및 Fb는 각각, 동일 또는 다른 기능성 물질] 로 표시되고, 또한 Fa-L1'-B'(-Fb)-R' 로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염인, 〔2〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0871] 〔5〕 가용성 단백질이 모노클로날 항체인, 〔1〕 내지 〔4〕 중 어느 한 항의 가용 단백질 또는 이의 염.

[0872] 〔6〕 가용성 단백질이 IgG 항체인, 〔1〕 내지 〔5〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0873] 〔7〕 가용성 단백질이 인간 유래인, 〔1〕 내지 〔6〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0874] 〔8〕 가용성 단백질이, 하기 (A) 내지 (C)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 Fc 영역 단백질을 포함하고, 또한 항원 결합능을 갖는 항체인, 〔1〕 내지 〔7〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염:

[0875] (A) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질;

[0876] (B) 서열번호 1의 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 몇 개의 아미노산 잔기가 삽입, 부가, 결실 또는 치환된 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질; 또는

[0877] (C) 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질.

[0878] 〔9〕 상기 표적 영역이 연속하는 1 내지 10개의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역인, 〔1〕 내지 〔8〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0879] 〔10〕 상기 표적 영역이 연속하는 1 내지 3개의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역인, 〔9〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0880] 〔11〕 상기 표적 영역이, (a) 인간 IgG Fc 영역에서의 246 내지 248 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역, (b) 인간 IgG Fc 영역에서의 288 내지 290 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역, 또는 (c) 인간 IgG Fc 영역에서의 317 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 영역인, 〔10〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0881] 〔12〕 상기 위치 선택성이 50% 이상인, 〔1〕 내지 〔11〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0882] 〔13〕 상기 위치 선택성이 70% 이상인, 〔12〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0883] 〔14〕 상기 위치 선택성이 90% 이상인, 〔13〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0884] 〔15〕 상기 특정한 아미노산 잔기가, 특정한 위치에 존재하는 특정한 아미노산을 중심으로 하여 각각 N 말단측 및 C 말단측에 대하여 a개(여기서, a는 1 내지 10의 임의의 정수)의 아미노산 잔기의 원격 위치까지의 영역에 있어서, 상기 특정한 위치에 존재하는 특정한 아미노산 잔기 이외에, 특정한 아미노산 잔기와 동종의 아미노산 잔기를 포함하지 않는, 〔1〕 내지 〔14〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0885] 〔16〕 상기 가용성 단백질이 복수의 단량체 단백질을 포함하는 다량체 단백질이고,

[0886] 다량체 단백질에 포함되는 복수의 단량체 단백질 중의 상기 위치에 존재하는 복수의 특정한 아미노산 잔기에 있어서 기능성 물질을 갖는 결과, 상기 다량체 단백질이 복수의 기능성 물질을 갖는, 〔1〕, 〔5〕 내지 〔15〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0887] 〔17〕 상기 가용성 단백질이 복수의 중쇄를 포함하는 항체이고,

[0888] 항체에 포함되는 복수의 중쇄 중의 상기 위치에 존재하는 복수의 특정한 아미노산 잔기에 있어서 기능성 물질을 갖는 결과, 항체가 복수의 기능성 물질을 갖는, 〔1〕, 〔5〕 내지 〔16〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0889] 〔18〕 상기 가용성 단백질이 복수의 단량체 단백질을 포함하는 다량체 단백질이고,

[0890] T가, 복수개의 단량체 단백질 중의 대응하는 복수개의 표적 영역에 있어서, A-L-B-R' 로 표시되는 구조 단위를 갖는 결과, 상기 다량체 단백질이 A-L-B-R' 로 표시되는 구조 단위를 복수개 갖는, 〔2〕 내지 〔15〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0891] 〔19〕 상기 가용성 단백질이 복수개의 중쇄를 포함하는 항체이고,

[0892] T가, 복수개의 중쇄 중의 대응하는 복수개의 표적 영역에 있어서, A-L-B-R'로 표시되는 구조 단위를 갖는 결과, 상기 항체가 A-L-B-R'로 표시되는 구조 단위를 복수개 갖는, 〔2〕 내지 〔15〕, 〔18〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0893] 〔20〕 중쇄의 개수가 2개인, 〔17〕 또는 〔19〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0894] 〔21〕 L1이 하기 식 (L1-1) 내지 (L1-2):

[0895] C1-Lb (L1-1)

[0896] C1 (L1-2)

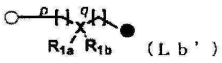
[0897] 〔식 중,

[0898] Lb는 2가의 기이고,

[0899] C1은 생체 직교성 관능기, 또는 생체 직교성 관능기 이외의 기〕 중 어느 하나로 표시되는, 〔2〕 내지 〔15〕, 〔18〕 내지 〔20〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0900] 〔22〕 상기 Lb가 하기 식 (Lb'):

[0901] [화 21]

[0902] 
(Lb')

[0903] 〔식 중,

[0904] p는 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0905] q는 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0906] X는 탄소 원자, 질소 원자, 또는 단결합(여기서, X가 질소 원자인 경우, R_{1b}는 존재하지 않는다. X가 단결합인 경우, R_{1a} 및 R_{1b}는 존재하지 않는다)이고,

[0907] R_{1a}, 및 R_{1b}는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 상술한 치환기로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.

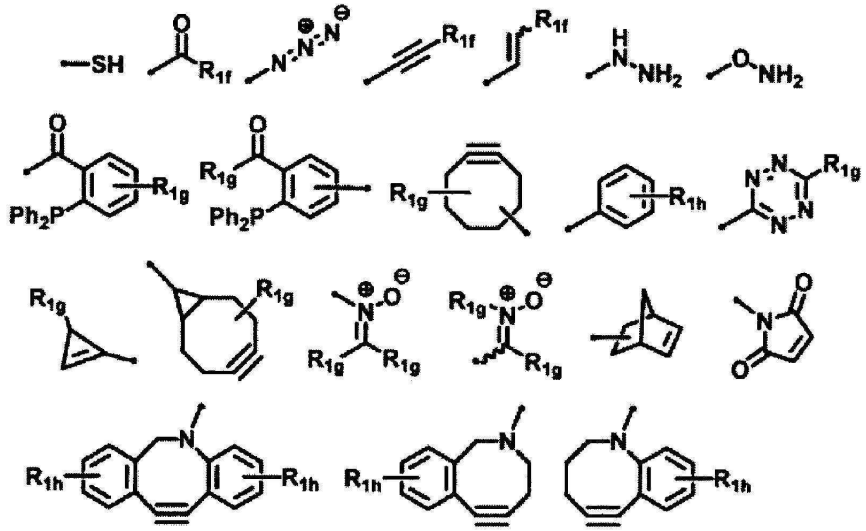
[0908] ○(흰 환형)은 C1에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 B에 대한 결합을 나타낸다〕로 표시되는, 〔21〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0909] 〔23〕 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기가 아지드 잔기, 알데히드 잔기, 티올 잔기, 알킨 잔기, 알켄 잔기, 테트라진 잔기, 니트론 잔기, 하이드록실아민 잔기, 니트릴 잔기, 히드라진 잔기, 케톤 잔기, 보론산 잔기, 시아노벤조티아졸 잔기, 알릴 잔기, 포스핀 잔기, 말레이미드 잔기, 디술피드 잔기, 티오에스테르기, α-할로카르보닐 잔기, 이소니트릴 잔기, 시드논 잔기, 셀렌 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 생체 직교성 관능기를 주쇄에 포함하는 2가의 기인, 〔1〕 내지 〔22〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0910] 〔24〕 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기가 아지드 잔기, 알데히드 잔기, 티올 잔기, 알킨 잔기, 알켄 잔기, 할로겐 잔기, 테트라진 잔기, 니트론 잔기, 하이드록실아민 잔기, 니트릴 잔기, 히드라진 잔기, 케톤 잔기, 보론산 잔기, 시아노벤조티아졸 잔기, 알릴 잔기, 포스핀 잔기, 말레이미드 잔기, 디술피드 잔기, α-할로카르보닐 잔기, 이소니트릴 잔기, 시드논 잔기, 셀렌 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 생체 직교성 관능기를 측쇄에 포함하는 2가의 기인, 〔1〕 내지 〔22〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0911] 〔25〕 생체 직교성 관능기가 하기:

[0912] [화 22]



[0913]

[0914] 〔식 중,

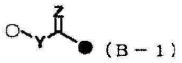
[0915] R_{1f}, 단일 또는 복수의 R_{1g} 및 단일 또는 복수의 R_{1h}는 동일 또는 상이하며, 상기 (i) 내지 (vii)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 원자 또는 기, 또는 전자 흡인기이고,

[0916] ·은 결합수)로 표시되는 어느 하나인, 〔1〕 내지 〔24〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0917] 〔26〕 상기 (b)의 2가의 기가 치환되어 있어도 좋은 알킬렌, 치환되어 있어도 좋은 사이클로알킬렌, 치환되어 있어도 좋은 아릴, 치환되어 있어도 좋은 2가의 복소환기, $-NR_a-$(R_a는 수소 원자, 또는 치환기를 나타낸다), -O-, 또는 이들 2 이상의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 〔1〕 내지 〔25〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0918] 〔27〕 B가 하기 식 (B-1):

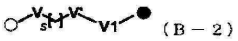
[0919] [화 23]

[0920] 

[0921] 〔식 중,

[0922] Y는 -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 하기 식 (B-2):

[0923] [화 24]

[0924] 

[0925] (식 중,

[0926] V 및 V' 는 동일 또는 상이하며, -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 단결합이고,

[0927] V1은 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이고,

[0928] s는 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[0929] 식 (B-2)에서의 ○ 및 ●은 각각, 식 (B-1)에서의 ○ 및 ●과 같은 배향이다)이고,

[0930] Z는 산소 원자, 유황 원자, 또는 수소 원자(Z가 수소 원자인 경우, $-C(=Z)-$은 $-CH_2-$를 나타낸다)이고,

[0931] 식 (B-1)에서의 ○(흰 환형)은 L측의 부분에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 R측의 부분에 대한 결합을 나타낸다〕로 표시되는, 〔2〕 내지 〔15〕, 〔18〕 내지 〔26〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

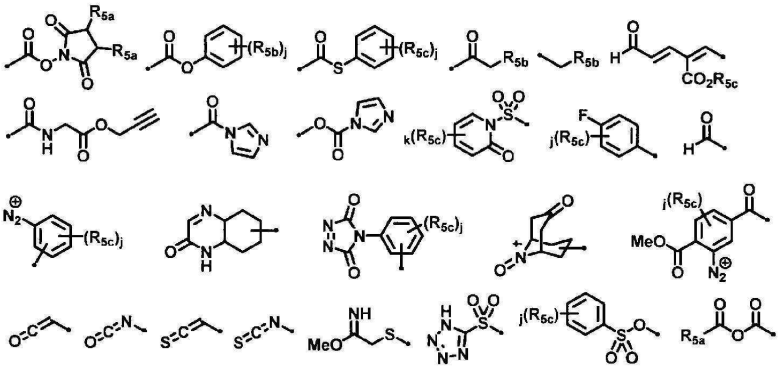
[0932] 〔28〕 반응성기가 리신 잔기, 티로신 잔기, 또는 트립토판 잔기 중 어느 하나의 측쇄에 대하여 특이적인 반응

성기인, 〔2〕 내지 〔15〕, 〔18〕 내지 〔27〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0933] 〔29〕 반응성기가 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인, 〔2〕 내지 〔15〕, 〔18〕 내지 〔28〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0934] 〔30〕 반응성기가 하기:

[0935] [화 25]

[0936] 

[0937] 〔여기서,

[0938] R_{5a} 및 R_{5c}는 상기 (i) 내지 (vii)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 원자 또는 기이고,

[0939] R_{5b}는 전자 흡인기이고,

[0940] j는 1 내지 5의 임의의 정수이고,

[0941] k는 1 내지 4의 임의의 정수이다〕로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하는, 〔2〕 내지 〔15〕, 〔18〕 내지 〔29〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0942] 〔31〕 기능성 물질 및 특정한 아미노산 잔기의 측쇄를 연결하는 주쇄의 원자수가 2 내지 10개인 링커를 통하여 생체 직교성 관능기가 가용성 단백질에 결합하고 있는, 〔1〕 내지 〔30〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0943] 〔32〕 기능성 물질 및 특정한 아미노산 잔기의 측쇄를 연결하는 주쇄가 환 구조를 포함하지 않는 링커를 통하여 생체 직교성 관능기가 가용성 단백질에 결합하고 있는, 〔1〕 내지 〔31〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

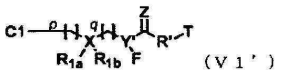
[0944] 〔33〕 L1 말단 부분 및 R'를 연결하는 주쇄의 원자수가 2 내지 10개인, 〔2〕 내지 〔15〕, 〔18〕 내지 〔32〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0945] 〔34〕 A 및 R을 연결하는 주쇄가 환 구조를 포함하지 않는, 〔2〕 내지 〔15〕, 〔18〕 내지 〔33〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0946] 〔35〕 L1-B로 표시되는 부분 구조가 펩티드 부분을 포함하지 않는, 〔2〕 내지 〔15〕, 〔18〕 내지 〔34〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0947] 〔36〕 상기 식 (V1), (V2) 및 (V3)으로 표시되는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염이 각각, 하기 (V1'), (V2') 및 (V3'):

[0948] [화 26]

[0949] 
(V1')

[0950] 〔식 중,

[0951] C1은 생체 직교성 관능기, 또는 생체 직교성 관능기 이외의 기이다.

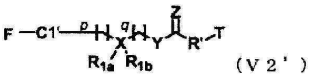
[0952] p, q, X, R_{1a} 및 R_{1b}는 상기 식 (Lb')의 것과 같고,

[0953] Y'는 상기 식 (B-1)의 Y에서 수소 원자를 1개 제외한 잔기이고,

[0954] Z는 상기 식 (B-1)의 것과 같고,

[0955] F, R' 및 T는 상기 식 (V)의 것과 같다〕,

[0956] [화 27]

[0957] 
(V2')

[0958] 〔식 중,

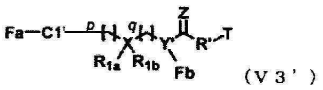
[0959] C1'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이다.

[0960] p, q, X, R_{1a} 및 R_{1b}는 상기 식 (Lb')의 것과 같고,

[0961] Y 및 Z는 상기 식 (B-1)의 것과 같고,

[0962] F, R' 및 T는 상기 식 (V)의 것과 같다〕, 또는

[0963] [화 28]

[0964] 
(V3')

[0965] 〔식 중,

[0966] C1'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이다.

[0967] p, q, X, R_{1a} 및 R_{1b}는 상기 식 (Lb')의 것과 같고,

[0968] Y'는 상기 식 (B-1)의 Y에서 수소 원자를 1개 제외한 잔기이고,

[0969] Z는 상기 식 (B-1)의 것과 같고,

[0970] Fa 및 Fb는 동일 또는 다른 기능성 물질이고,

[0971] R' 및 T는 상기 식 (V)의 것과 같다〕로 표시되는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염인, 〔2〕 내지 〔15〕, 〔18〕 내지 〔35〕 중 어느 한 항의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0972] 〔37〕 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염으로서,

[0973] 가용성 단백질이, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하고, 또한

[0974] 기능성 물질이 펩티드 부분을 포함하지 않는 링커를 통하여, 상기 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있고,

[0975] 기능성 물질이 리신 잔기의 측쇄를 통하여 가용성 단백질에 결합하고 있고,

[0976] 가용성 단백질이 복수의 중쇄를 포함하는 항체이고,

[0977] 항체에 포함되는 복수의 중쇄 중의 상기 위치에 존재하는 복수의 특정한 아미노산 잔기에 있어서 기능성 물질을 갖는 결과, 항체가 복수의 기능성 물질을 갖는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0978] 〔38〕 하기 식 (V):

[0979] F-(L1-B)'-R'-T (V)

[0980] 〔식 중,

[0981] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[0982] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[0983] (L1-B)'로 표시되는 구조 단위는 기능성 물질과, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기 중 어느 한쪽 또는 쌍방 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 구조 단위이고,

[0984] F는 기능성 물질이고,

[0985] R'는 항체의 리신 잔기와, 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[0986] T는 항체이고,

[0987] 항체는, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다〕로 표시되고, 또한 F-(L1-B)'-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0988] 〔39〕 상기 가용성 단백질 또는 이의 염이 하기 식 (V1):

[0989] L1-B'(-F)-R'-T (V1)

[0990] 〔식 중,

[0991] L1, F, R' 및 T는 상기 식 (V)의 것과 같고,

[0992] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기〕로 표시되고, 또한 L1-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염인, 〔38〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[0993] 〔40〕 상기 가용성 단백질 또는 이의 염이 하기 식 (V2):

[0994] F-L1'-B-R'-T (V2)

[0995] 〔식 중,

[0996] F, B, R' 및 T는 상기 식 (V)의 것과 같고,

[0997] L1'는 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기〕로 표시되고, 또한 F-L1'-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염, 또는

[0998] 하기 식 (V3):

[0999] Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

[1000] 〔식 중,

[1001] R' 및 T는 상기 식 (V)의 것과 같고,

[1002] L1'는 상기 식 (V2)의 것과 같고,

[1003] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[1004] Fa 및 Fb는 각각, 동일 또는 다른 기능성 물질〕로 표시되고, 또한 Fa-L1'-B'(-Fb)-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염인, 〔38〕의 가용성 단백질 또는 이의 염.

[1005] (기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법)

[1006] 본 발명은 또한, 상기 〔1〕 내지 〔40〕의 가용성 단백질 중, 식 (V) 또는 그 하위의 식에 의한 특정을 필요로 하는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다.

[1007] 〔41〕 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[1008] 하기 식 (III):

[1009] A-L-B'(-F)-R'-T (III)

[1010] 〔식 중,

[1011] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[1012] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[1013] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[1014] F는 기능성 물질이고,

[1015] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[1016] T는 가용성 단백질이고,

[1017] 상기 가용성 단백질은, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다〕로 표시되고, 또한 A-L-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 위치 선택적으로 갖는 복합체 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여, 또는

[1018] 하기 식 (IV):

[1019] L1-B-R'-T (IV)

[1020] 〔식 중,

[1021] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[1022] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[1023] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[1024] T는, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하는 가용성 단백질〕로 표시되고, 또한 A-L-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 기능성 물질과 반응시켜서,

[1025] 하기 식 (V):

[1026] F-(L1-B)'-R'-T (V)

[1027] 〔식 중,

[1028] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[1029] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[1030] (L1-B)'로 표시되는 구조 단위는 기능성 물질과, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기 중 어느 한쪽 또는

쌍방 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 구조 단위이고,

[1031] F는 기능성 물질이고,

[1032] R' 및 T는 상기 식 (III) 또는 (IV)의 것과 같다] 로 표시되고, 또한 F-(L1-B)'-R' 로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[1033] 바람직하게는, 상기 〔41〕의 방법은 이하라도 좋다.

[1034] 〔42〕 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 위치 선택적으로 갖는 복합체 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[1035] 하기 식 (V1):

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

[1037] 〔식 중,

[1038] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[1039] B', F, R' 및 T는 상기 식 (III)의 것과 같다] 로 표시되고, 또한 L1-B'(-F)-R' 로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는 방법인, 〔41〕의 방법.

[1040] 〔43〕 상기 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을, 1종 또는 2종의 기능성 물질과 반응시켜서,

[1041] 하기 식 (V2):

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

[1043] 〔식 중,

[1044] B, R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같고,

[1045] L1'는 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[1046] F는 기능성 물질] 로 표시되고, 또한 F-L1'-B-R' 로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질, 또는

[1047] 하기 식 (V3):

[1048] Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

[1049] 〔식 중,

[1050] R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같고,

[1051] L1'는 상기 식 (V2)의 것과 같고,

[1052] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[1053] Fa 및 Fb는 각각, 동일 또는 다른 기능성 물질] 로 표시되고, 또한 Fa-L1'-B'(-Fb)-R' 로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는 방법인, 〔41〕의 방법.

[1054] 〔44〕 가용성 단백질이 항체이고, 반응성기가 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인, 〔41〕 내지

〔43〕 중 어느 한 항의 방법.

[1055] 〔45〕 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[1056] (A) 하기 식 (II):

[1057] A-L-B-R'-T (II)

[1058] 〔식 중,

[1059] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[1060] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[1061] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이고,

[1062] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[1063] T는 가용성 단백질이고,

[1064] 상기 가용성 단백질은, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다〕로 표시되고, 또한 A-L-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을, 기능성 물질과 반응시켜서,

[1065] 하기 식 (III):

[1066] A-L-B'(-F)-R'-T (III)

[1067] 〔식 중,

[1068] A, L, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[1069] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[1070] F는 기능성 물질〕로 표시되고, 또한 A-L-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 위치 선택적으로 갖는 복합체 또는 이의 염을 생성하는 것, 및

[1071] (B) 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 위치 선택적으로 갖는 복합체 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[1072] 하기 식 (V1):

[1073] L1-B'(-F)-R'-T (V1)

[1074] 〔식 중,

[1075] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[1076] B', F, R' 및 T는 상기 식 (III)의 것과 같다〕로 표시되고, 또한 L1-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[1077] 〔46〕 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[1078] (A) 하기 식 (I):

[1079] A-L-B-R (I)

[1080] 〔식 중,

[1081] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[1082] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[1083] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이고,

[1084] R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기이다〕로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 위치 선택적으로 갖는 화합물 또는 이의 염을, 가용성 단백질(여기서, 가용성 단백질은, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다)과 반응시켜서,

[1085] 하기 식 (II):

[1086] A-L-B-R'-T (II)

[1087] 〔식 중,

[1088] A, L, 및 B는 상기 식 (I)의 것과 같고,

[1089] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[1090] T는 가용성 단백질이다〕로 표시되고, 또한 A-L-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것,

[1091] (B) 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을, 기능성 물질과 반응시켜서,

[1092] 하기 식 (III):

[1093] A-L-B'(-F)-R'-T (III)

[1094] 〔식 중,

[1095] A 및 L은 상기 식 (I)의 것과 같고,

[1096] R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[1097] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[1098] F는 기능성 물질〕로 표시되고, 또한 A-L-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 위치 선택적으로 갖는 복합체 또는 이의 염을 생성하는 것, 및

[1099] (C) 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 위치 선택적으로 갖는 복합체 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[1100] 하기 식 (V1):

[1101] L1-B'(-F)-R'-T (V1)

[1102] 〔식 중,

[1103] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[1104] B', F, R' 및 T는 상기 식 (III)의 것과 같다〕로 표시되고, 또한 L1-B'(-F)-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[1105] 〔47〕 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[1106] (A) 하기 식 (II):

[1107] A-L-B-R'-T (II)

[1108] 〔식 중,

[1109] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[1110] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[1111] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[1112] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[1113] T는 가용성 단백질이고,

[1114] 상기 가용성 단백질은, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다〕로 표시되고, 또한 A-L-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[1115] 하기 식 (IV):

[1116] L1-B-R'-T (IV)

[1117] 〔식 중,

[1118] B, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[1119] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기〕로 표시되고, 또한 L1-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것, 및

[1120] (B) 상기 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을, 1종 또는 2종 이상의 기능성 물질과 반응시켜서,

[1121] 하기 식 (V2)

[1122] F-L1'-B-R'-T (V2)

[1123] 〔식 중,

[1124] B, R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같고,

[1125] L1'는 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[1126] F는 기능성 물질이다〕로 표시되고, 또한 F-L1'-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염, 또는

[1127] 하기 식 (V3):

[1128] Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

[1129] 〔식 중,

[1130] R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같고,

[1131] L1'는 상기 식 (V2)의 것과 같고,

[1132] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[1133] Fa 및 Fb는 각각, 동일 또는 다른 기능성 물질이다] 로 표시되고, 또한 Fa-L1'-B'(-Fb)-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

[1134] 〔48〕 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법으로서,

[1135] (A) 하기 식 (I):

[1136] A-L-B-R (I)

[1137] 〔식 중,

[1138] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[1139] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[1140] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[1141] R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기이다] 로 표시되는 화합물 또는 이의 염을, 가용성 단백질(여기서, 가용성 단백질은, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다)과 반응시켜서,

[1142] 하기 식 (II):

[1143] A-L-B-R'-T (II)

[1144] 〔식 중,

[1145] A, L, 및 B는 상기 식 (I)의 것과 같고,

[1146] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[1147] T는 가용성 단백질이다] 로 표시되고, 또한 A-L-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것,

[1148] (B) 상기 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여,

[1149] 하기 식 (IV):

[1150] L1-B-R'-T (IV)

[1151] 〔식 중,

[1152] B, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[1153] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이다] 로 표시되고, 또한 L1-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것, 및

[1154] (C) 상기 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을, 1종 또는 2종 이상의 기능성 물질과 반응시켜서,

[1155] 하기 식 (V2):

[1156] F-L1'-B-R'-T (V2)

[1157] 〔식 중,

[1158] B, R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같고,

[1159] L1'는 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[1160] F는 기능성 물질이다〕로 표시되고, 또한 F-L1'-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염, 또는

[1161] 하기 식 (V3):

[1162] Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

[1163] 〔식 중,

[1164] R' 및 T는 상기 식 (IV)의 것과 같고,

[1165] L1'는 상기 식 (V2)의 것과 같고,

[1166] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[1167] Fa 및 Fb는 각각, 동일 또는 다른 기능성 물질〕로 표시되고, 또한 Fa-L1'-B'(-Fb)-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것을 포함하는, 방법.

발명의 효과

[1168] (I) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 본 발명의 화합물 또는 이의 염은, 예를 들면, 가용성 단백질의 위치 선택적인 수식에 유용하다.

[1169] (II) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 (위치 선택적으로) 갖는 본 발명의 가용성 단백질 또는 이의 염, (III) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 (위치 선택적으로) 갖는 본 발명의 복합체 또는 이의 염, 및 (IV) 생체 직교성 관능기를 (위치 선택적으로) 갖는 본 발명의 가용성 단백질 또는 이의 염은, 예를 들면, 기능성 물질을 (위치 선택적으로) 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 조제를 위한 중간체로서 유용하다.

[1170] (V) 기능성 물질을 (위치 선택적으로) 갖는 본 발명의 가용성 단백질 또는 이의 염은, 예를 들면, 의약, 또는 시약(예, 진단약, 연구용 시약)으로서 유용하다. 특히, 가용성 단백질이 항체인 경우, 기능성 물질을 (위치 선택적으로) 갖는 본 발명의 항체 또는 이의 염은 이들의 용도에 적합하다.

도면의 간단한 설명

[1171] 도 1a는, 본 발명의 화합물〔가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물: A-L-B-R(I)〕에 의한 가용성 단백질(예, 항체)의 위치 선택적 수식의 컨셉트를 나타낸 모식도(그 1)이다. 우선, 본 발명의 화합물은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질(A)을 통하여, 항체 등의 가용성 단백질(T)에 회합한다. 다음에, 본 발명의 화합물은 반응성기(R)(도면 중에서는 활성화 에스테르)를 통하여, 친화성 물질과 가용성 단백질과의 회합 부위의 근방에 존재하는 표적 영역 중의 특정한 아미노산 잔기의 측쇄(도면 중에서는 리신 잔기의 측쇄)와 반응하여, 본 발명의 화합물과 가용성 단백질과의 콘쥬게이트〔가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 구조 단위를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질: A-L-B-R'-T(II)〕를 생성한다.

도 1b는, 본 발명의 화합물에 의한 가용성 단백질(예, 항체)의 위치 선택적 수식의 컨셉트를 나타낸 모식도(그 2)이다. 링커(L) 중의 절단성 부분의 절단에 의해, 생체 직교성 관능기로 위치 특이적으로 수식된 가용성 단백질(예, 항체)이 생성된다.

도 1c는, 본 발명의 화합물에 의한 가용성 단백질(예, 항체)의 위치 선택적 수식의 컨셉트를 나타낸 모식도(그 3)이다. 생체 직교성 관능기와 기능성 물질(예, 약물)과의 반응에 의해, 기능성 물질로 위치 특이적으로 수식

된 가용성 단백질(예, 항체)이 생성된다.

도 2는, 본 발명의 각 발명의 관련성을 나타낸 도면이다(염에 대해서는 표기를 생략). 반응(1)에서는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물을 가용성 단백질과 반응시켜서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질을 생성한다. 반응(2)에서는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질을 기능성 물질과 반응시켜서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체를 생성한다. 반응(3)에서는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체의 절단성 부분을 절단하여, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질을 생성한다(이때, 친화성 물질의 함유 부분이 부산물로서 생성된다). 반응(4)에서는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질의 절단성 부분을 절단하여, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질을 생성한다(이때, 친화성 물질의 함유 부분이 부산물로서 생성된다). 반응(5)에서는 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질을 기능성 물질과 반응시켜서, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질을 생성한다. 반응(2) 및 (5)는 마찬가지로 행할 수 있다. 반응(3) 및 (5)도 또한 마찬가지로 행할 수 있다.

도 3은, 펩티드 시약(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)으로 특이적으로 수식된 항-HER2 IgG 항체 트라스투주맙의 HIC-HPLC 해석(검출: 225nm)을 나타낸 도면이다. 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다. a: 트라스투주맙+펩티드 시약 12등량(반응 후 Amicon 10K에 의해 용매 치환); b: 트라스투주맙+펩티드 시약 12등량; c: 트라스투주맙+펩티드 시약 6등량; d: 트라스투주맙 원료; e: 펩티드 시약만; f: DMF만.

도 4는, 펩티드 시약(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)으로 특이적으로 수식된 항-HER2 IgG 항체 트라스투주맙의 HIC-HPLC 해석(검출: 280nm)을 나타낸 도면이다. 샘플에 대해서는 도 1과 동일한 조건으로 반응시켰다.

도 5는, 펩티드 시약(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)으로 특이적으로 수식된 항-CD20 항체 리툭시맙의 HIC-HPLC 해석(검출: 225nm)을 나타낸 도면이다. 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다. a: 리툭시맙+펩티드 시약 12등량(반응 후 Amicon 10K에 의해 용매 치환); b: 리툭시맙+펩티드 시약 12등량; c: 리툭시맙+펩티드 시약 6등량; d: 리툭시맙 원료; e: 펩티드 시약만; f: DMF만.

도 6은, 펩티드 시약(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)으로 특이적으로 수식된 항-CD20 항체 리툭시맙의 HIC-HPLC 해석(검출: 280nm)을 나타낸 도면이다. 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다. a: 리툭시맙+펩티드 시약 12등량(반응 후 Amicon 10K에 의해 용매 치환); b: 리툭시맙+펩티드 시약 12등량; c: 리툭시맙+펩티드 시약 6등량; d: 리툭시맙 원료; e: 펩티드 시약만; f: DMF만.

도 7은, 트라스투주맙·펩티드 복합체의 링커 절단과 재산화에 의해 수득되는 생성물의 RP-HPLC에 의한 해석(검출: 225nm, 및 280nm)을 나타낸 도면이다. a: 트라스투주맙; b: 트라스투주맙+펩티드 시약 6등량; c: 트라스투주맙을 DTT에 의해 환원; d: 완충액 pH8.0, 항체 농도 72μM으로 D,L-디티오트레이톨에 의해 환원; e: d를 디하이드로아스코르브산에 의해 재산화 3시간 후; f: d를 디하이드로아스코르브산에 의해 재산화 24시간 후.

도 8은, (1) 당쇄를 PNGase로 절단한 트라스투주맙의 중쇄의 아미노산 서열, (2) 당쇄를 PNGase로 절단한 IgG1 Fc 영역의 아미노산 서열, 및 (3) 트라스투주맙의 경쇄의 아미노산 서열을 나타낸 도면이다.

도 9는, 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da))를 포함하는, THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK(서열번호 5)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(m/z 998.14796, 3가)를 나타낸 도면이다.

도 10은, 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da))를 포함하는, THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK(서열번호 5)의 펩티드 프래그먼트의 CID 스펙트럼를 나타낸 도면이다.

도 11은, 트라스투주맙의 Glu-C 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da))를 포함하는, LLGGPSVFLFPPKPKD(서열번호 6)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(m/z 929.49651, 2가)를 나타낸 도면이다.

도 12는, 트라스투주맙의 Glu-C 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da))를 포함하는, LLGGPSVFLFPPKPKD(서열번호 6)의 펩티드 프래그먼트의 CID 스펙트럼를 나타낸 도면이다.

도 13은, IgG1 Fc의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da))를 포함하는, THTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK(서열번호 7)의 펩티드 프래그먼트의 (m/z 994.12546, 3가)의 MS 스펙트럼를 나타낸 도면이다.

도 14는, IgG1 Fc의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da))를 포함하는, THTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK(서열번호 7)의 펩티드 프래그먼트의 CID 스펙트럼를 나타낸 도면이다.

도 15는, IgG1 Fc의 Glu-C 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da))를 포함하는, GAPSVFLFPPKPKKDTLMISRTPE(서열번호 8)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(m/z 892.12624, 3가)를 나타낸 도면이다.

도 16은, IgG1 Fc의 Glu-C 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da))를 포함하는, GAPSVFLFPPKPKKDTLMISRTPE(서열번호 8)의 펩티드 프래그먼트의 CID 스펙트럼를 나타낸 도면이다.

도 17은, 트라스투주맙의 중쇄 중의 Fc 영역, 및 IgG1 Fc 영역의 콘센서스 아미노산 서열(서열번호 1)을 나타낸 도면이다.

도 18은, 수식된 트라스투주맙(IgG1)에 대하여 분류(同定)된 아미노산 서열 및 수식을 나타낸 도면이다. 그레이 부분이 동정된 아미노산 서열이다. 또한, 아미노산 서열의 상부에 동정된 수식이 적혀 있다. 둘러싸진 2개소의 리신 잔기(EU 넘버링에 의한 246 위치·248 위치)만 위치 선택적인 아지드 도입체의 수식이 확인되었다.

도 19는, 트라스투주맙의 아지드 도입체의 수식 부위를 나타낸 도면이다. PSMs(Peptide Spectrum Matches)란, 해당하는 펩티드와 일치하는 스펙트럼이 관측된 회수이며, 많을수록 정확도가 오른다. 시그널 강도에 대한 필터링함으로써 (2)와 같이 246 위치의 리신 잔기에만 수식이 동정되게 되었다. (1)에서만 동정되어 있는 수식 부위는 노이즈의 가능성이 높다고 생각된다.

도 20은, 트라스투주맙의 아지드 도입체의 수식 부위를 포함하는 펩티드의 CID 스펙트럼을 나타낸 도면이다. 도 18에서 둘러싸진 부분의 펩티드의 CID 스펙트럼에 대응한다. 이론값과 일치하는 m/z를 갖는 스펙트럼이 표시되어 있다.

도 21은, CID 스펙트럼이 동정된 b/y 이온을 나타낸 도면이다. 도 20에서 동정된 b/y 이온이 표시되어 있다. b25 이온이 동정되어 있기 때문에, EU 넘버링에 의한 246 위치가 수식되어 있을 가능성이 높은 것을 알 수 있다.

도 22는, 수식 트라스투주맙의 비수식 트라스투주맙과의 면적값 비교를 나타낸 도면이다. 수식이 일어난 부위에 관해서는 비수식 펩티드의 면적값이 작아진다는 예측에 기초하여, 비수식 트라스투주맙으로 얻어진 면적값과 비교한 바, EU 넘버링에 의한 246 위치·248 위치의 리신 잔기를 포함하는 펩티드에서만 유의적으로 면적값이 감소하고 있었다.

도 23은, Q-TOFMS에 의한 수식 트라스투주맙의 DAR의 해석을 나타낸 도면이다. 피크의 관측 결과에서, 평균 DAR은 2이었다.

도 24는, 검색에 사용한 아미노산 서열 데이터를 나타낸 도면이다. 탈당쇄를 행함으로써 트라스투주맙 중쇄의 300잔기째의 N이 D로 변하는 것으로 알려져 있기 때문에, 중쇄의 아미노산 서열에 대해서는 2종류를 해석에 사용하였다.

도 25는, 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(아지드 도입체(+254.102Da))를 포함하는, THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(서열번호 40)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 979.49982, 이론값: 979.49975, 4가)을 나타낸 도면이다.

도 26은, 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(아지드 도입체(+254.102Da))를 포함하는, THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(서열번호 40)의 펩티드 프래그먼트의 CID 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 27은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 16).

도 28은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 17).

도 29는, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 18).

도 30은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 19).

도 31은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 20).

도 32는, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 21).

도 33은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 22).

도 34는, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 23).

도 35는, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 24).

도 36은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 25).

도 37은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 26).

도 38은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 27).

도 39는, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 28).

도 40은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 29).

도 41은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 225nm 또는 UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 30).

도 42는, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 31). 세로축의 AU는 흡광도를 나타낸다(이후의 도면에 있어서 동일).

도 43은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 32).

도 44는, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 33).

도 45는, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 34).

도 46은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 35).

도 47은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 36).

도 48은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 37).

도 49는, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 38).

도 50은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 39).

도 51은, 실시예 39의 바인더 펩티드를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는, VVSVLTVLHQDWLNGKEYK(서열번호 66)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(m/z 791.74872, 3가)을 나타낸 도면이다.

도 52는, 실시예 39의 바인더 펩티드를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는, VVSVLTVLHQDWLNGKEYK(서열번호 66)의 펩티드 프래그먼트의 CID 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 53은, 실시예 39의 바인더 펩티드를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는, EEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK(서열번호 67)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(m/z 886.93408, 4가)을 나타낸 도면이다.

도 54는, 실시예 39의 바인더 펩티드를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는, EEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK(서열번호 67)의 펩티드 프래그먼트의 CID 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 55는, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 40).

도 56은, 실시예 40의 바인더 펩티드를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는, FNWYVDGVEVHNAKTKPR(서열번호 69)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(m/z 769.04688, 3가)을 나타낸 도면이다.

도 57은, 실시예 40의 바인더 펩티드를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는, FNWYVDGVEVHNAKTKPR(서열번호 69)의 펩티드 프래그먼트의 CID 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 58은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 41).

도 59는, 티올 도입체를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는, THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(서열번호 40)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(m/z 952.23145, 4가)을 나타낸 도면이다.

도 60은, 티올 도입체를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는, THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(서열번호 40)의 펩티드 프래그먼트의 CID 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 61은, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 42).

도 62는, 티올 도입체를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는, THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(서열번호 40)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(m/z 952.22968, 4가)을 나타낸 도면이다.

도 63은, 티올 도입체를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는,

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(서열번호 40)의 펩티드 프래그먼트의 CID 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 64는, 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 43).

도 65는, 티올 도입체를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는, FNWYVDGVEVHNAKTKPR(서열번호 69)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(m/z 769.04529, 3가)을 나타낸 도면이다.

도 66은, 티올 도입체를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는, FNWYVDGVEVHNAKTKPR(서열번호 69)의 펩티드 프래그먼트의 CID 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 67은, 인간 IgG2 항체의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 2-2).

도 68은, 인간 IgG2 항체의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 43).

도 69는, 인간 IgG4 항체의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 2-2).

도 70은, 인간 IgG4 항체의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석 결과(검출 파장: UV 280nm)를 나타낸 도면이다(실시예 43).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[1172] 1. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물 또는 이의 염

[1173] 1-1. 개요

[1174] 본 발명은 식 (I)로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물 또는 이의 염을 제공한다.

[1175] A-L-B-R (I)

[1176] 〔식 중,

[1177] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[1178] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[1179] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[1180] R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기이다〕

[1181] 본 발명에 관련되어 제시되는 식 (I) 및 다른 식에 있어서, -(하이픈)은, 그 양측에 존재하는 2개의 단위가 공유 결합하고 있는 것을 나타낸다. 따라서, 식 (I)에서는, A는 L과 공유 결합하고 있고, L은 A 및 B와 공유 결합하고 있고, B는 L 및 R과 공유 결합하고 있고, R은 B와 공유 결합하고 있다.

[1182] 1-2. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질(A)

[1183] 식 (I)에 있어서, A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이다. 친화성 물질이란, 표적에 대하여 비공유 결합에 의한 결합능을 갖는 물질이다.

[1184] 본 발명에서 사용되는 친화성 물질은 분비 단백질이라고도 호칭되는 가용성 단백질을 표적으로 한다. 이러한 가용성 단백질로서는, 예를 들면, 항체, 가용성 수용체, 리간드, 알부민, 에리트로포이에틴(EPO), 혈관내피세포 증식인자(항-VEGF), 뼈형성 단백질, 난포자극호르몬(FSH), 글루카곤, 과립상 콜리니 자극인자, 과립상 대식세포 콜리니 자극인자, 섬모성 고나도트로핀, 인슐린, 인터류킨, 인터페론, 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 증식인자(TGF 패밀리, FGF 패밀리)를 들 수 있다. 가용성 단백질은 생체분자(예, 당)로 수식된 단백질(예, 당 단백질)이라도, 생체분자로 미수식된 단백질이라도 좋다.

[1185] 친화성 물질의 표적인 가용성 단백질은 또한 천연 유래 단백질, 또는 인공 단백질이다.

[1186] 천연 유래 단백질로서는, 예를 들면, 생물 및 바이러스 유래의 단백질을 들 수 있다. 생물 유래의 단백질로서는, 예를 들면, 포유 동물, 조류(예, 닭) 등의 동물, 곤충, 미생물, 식물, 균류, 및 어류 유래의 단백질을 들 수 있다. 바람직하게는, 천연 유래 단백질은 포유 동물 유래의 단백질이다. 포유 동물로서는, 예를 들면, 영장류(예, 인간, 원숭이, 침팬지), 설치류(예, 마우스, 래트, 모르모트, 햄스터, 토끼), 애완 동물(예, 개, 고양이), 가축(예, 소, 돼지, 염소), 사역 동물(예, 말, 양)을 들 수 있다. 천연 유래 단백질은, 보다 바람직하게는 영장류 또는 설치류 유래의 단백질이고, 더욱더 바람직하게는 본 발명의 임상 응용의 관점에서, 인간 유래의 단백질이다. 바이러스 유래의 단백질로서는, 예를 들면, 인플루엔자 바이러스(예, 조류 인플루엔자 바이러스, 돼지 인플루엔자 바이러스), 에이즈 바이러스, 에볼라 바이러스, 파지 바이러스를 들 수 있다.

[1187] 인공 단백질로서는, 예를 들면, 천연 유래 단백질의 개변 단백질(예, 치환, 결실 및 삽입으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1이상의 아미노산 잔기의 변이가 천연 유래 단백질에 도입된 단백질), 융합 단백질, 및 인공적으로 설계된 모노클로날 항체를 들 수 있다. 인공적으로 설계된 모노클로날 항체로서는, 예를 들면, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 소정의 당쇄가 부가된 항체(예, N형 당쇄 결합 콘센서스 서열 등의 당쇄 결합 콘센서스 서열을 갖도록 개변된 항체), 2중 특이성 항체, scFv 항체, Fab 항체, F(ab ‘)$_2$ 항체, VHH 항체, Fc 영역 단백질, Fc 융합 단백질을 들 수 있다.

[1188] 친화성 물질의 표적인 가용성 단백질은 또한 단량체 단백질, 또는 다량체(예, 2량체, 3량체, 또는 4량체) 단백질이라도 좋다. 친화성 물질의 표적인 단백질이 다량체 단백질인 경우, 다량체 단백질은 호모 다량체, 또는 헤테로 다량체이다. 다량체 단백질은, 공유 결합(예, 디술피드 결합)을 통하여 다량체를 형성하는 단백질(예, 디술피드 결합을 통하여, 경쇄 및 중쇄로 이루어지는 단위가 2개 연결되어 있는 구조를 갖는 항체)이라도, 비공유 결합(즉, 회합)을 통하여 다량체를 형성하는 단백질이라도 좋지만, 공유 결합을 통하여 다량체를 형성하는 단백질이 바람직하다. 친화성 물질의 표적인 다량체 단백질로서는, 예를 들면, 2가의 항체(예, IgG, IgD, IgE), 4가 이상의 항체(예, IgA 항체, IgM 항체), 알부민을 들 수 있다.

[1189] 친화성 물질의 표적인 가용성 단백질은 또한 임의의 아미노산 잔기로 구성되어 있어도 좋지만, 바람직하게는, 단백질을 통상 구성하는 천연의 20종의 L-α-아미노산 잔기로 구성된다. 이러한 아미노산 잔기로서는, 예를 들면, L-알라닌(A), L-아스파라긴(N), L-시스테인(C), L-글루타민(Q), L-이소류신(I), L-류신(L), L-메티오닌(M), L-페닐알라닌(F), L-프롤린(P), L-세린(S), L-트레오닌(T), L-트립토판(W), L-티로신(Y), L-발린(V), L-아스파라긴산(D), L-글루타민산(E), L-아르기닌(R), L-히스티딘(H), 또는 L-리신(K), 및 글리신(G)을 들 수 있다(이하, L의 표기를 생략). 가용성 단백질은, 예를 들면 100개 이상, 바람직하게는 120개 이상, 보다 바람직하게는 150개 이상, 더욱더 바람직하게는 180개 이상, 특히 바람직하게는 200개 이상의 아미노산 잔기로 구성되어 있어도 좋다. 가용성 단백질은 또한, 예를 들면 1000개 이하, 바람직하게는 900개 이하, 보다 바람직하게는 800개 이하, 더욱더 바람직하게는 700개 이하, 특히 바람직하게는 600개 이하라도 좋다. 더 구체적으로는 가용성 단백질은, 예를 들면 100 내지 1000개, 바람직하게는 120 내지 900개, 보다 바람직하게는 150 내지 800개, 더욱더 바람직하게는 180 내지 700개 이상, 특히 바람직하게는 200 내지 600개의 아미노산 잔기로 구성되어 있어도 좋다. 가용성 단백질이 항체(예, 상술한 바와 같은 인공적으로 설계된 모노클로날 항체)인 경우, 상기 개수의 아미노산 잔기는 항체의 중쇄의 아미노산 잔기에 상당하는 것이라도 좋다.

[1190] 친화성 물질의 표적인 가용성 단백질은 또한 후술하는 바와 같은 반응성기를 반응할 수 있는 측쇄 또는 말단(N 말단 및/또는 C 말단), 바람직하게는 측쇄를 갖는 특정한 아미노산 잔기를 1개의 위치 또는 복수의 위치(바람직하게는 복수의 위치)에서 포함하는 단백질이다. 이러한 특정한 아미노산 잔기로서는, 예를 들면, 후술하는 바와 같은 14종의 아미노산 잔기를 들 수 있지만, 바람직하게는, 리신 잔기, 티로신 잔기, 트립토판 잔기, 및 시스테인 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 잔기이다. 본 발명의 화합물이 가용성 단백질을 위치 선택적으로 수식할 수 있는 것을 감안하면, 이러한 특정한 아미노산 잔기를 복수의 위치에서 포함하는 가용성 단백질이 바람직하다. 복수의 위치로서는 2 이상의 위치인 한 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 3 이상의 위치, 바람직하게는 5 이상의 위치, 보다 바람직하게는 10 이상의 위치, 더욱더 바람직하게는 20 이상의 위치, 특히 바람직하게는 30 이상의 위치라도 좋다. 복수의 위치는 또한, 예를 들면 200 이하의 위치, 바람직하게는 180 이하의 위치, 보다 바람직하게는 150 이하의 위치, 더욱더 바람직하게는 120 이하의 위치, 특히 바람직하게는 100 이하의 위치라도 좋다. 더 구체적으로는, 복수의 위치는, 예를 들면 3 내지 200의 위치, 바람직하게는 5 내지 180의 위치, 보다 바람직하게는 10 내지 150의 위치, 더욱더 바람직하게는 20 내지 120의 위치, 특히 바람직하게는 30 내지 100의 위치라도 좋다. 이러한 특정한 아미노산 잔기를 복수의 위치에서 포함하는 가용성

단백질이라도, 본 발명의 화합물은, 특정한 하나의 위치에 존재하는 특정한 아미노산 잔기를 위치 선택적으로 수식할 수 있다. 예를 들면, 인간 IgG1의 리신 잔기수는 가변 영역 중의 아미노산 조성에도 따르지만, 일반적으로는 70 내지 90개 정도라고 알려져 있다. 본 발명에서는, 이러한 인간 IgG1의 특정한 위치에 존재하는 리신 잔기를 위치 선택적으로 수식하는 것에 성공하고 있다.

[1191] 더 구체적으로는, 본 발명에서는 항체 등의 단백질의 기능을 유지하면서 (즉, 단백질을 변성시키지 않고 네이티브한 접힘(folding)을 유지하면서), 단백질 중의 특정한 위치에 존재하는 아미노산 잔기를 수식하는 관점에서, 단백질의 표면에 노출되어 있는 아미노산 잔기의 위치 선택적인 수식이 바람직하다. 예를 들면, 인간 IgG1 등의 인간 IgG에서는, 노출 리신 잔기 및 노출 티로신 잔기는 이하의 위치에 존재한다(EU 넘버링에 의한;http;//www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html을 참조).

[1192] (1) 노출 리신 잔기

[1193] CH2 도메인(246 위치, 248 위치, 274 위치, 288 위치, 290 위치, 317 위치, 320 위치, 322 위치, 338 위치)

[1194] CH3 도메인(360 위치, 414 위치, 439 위치)

[1195] (2) 노출 티로신 잔기

[1196] CH2 도메인(278 위치, 296 위치, 300 위치)

[1197] CH3 도메인(436 위치)

[1198] 따라서, 인간 IgG1 등의 인간 IgG가 리신 잔기 또는 티로신 잔기로 수식되는 경우, 상기 위치에서의 수식이 바람직하다.

[1199] 바람직하게는, 인간 IgG1 등의 인간 IgG가 리신 잔기 또는 티로신 잔기로 수식되는 경우, 상기 (1) 및 (2)의 위치 중에서도, 표면에 대한 노출성이 높은 이하의 위치에 존재하는 리신 잔기 또는 티로신 잔기가 수식되어도 좋다.

[1200] (1') 노출 리신 잔기

[1201] CH2 도메인(246 위치, 248 위치, 274 위치, 288 위치, 290 위치, 317 위치, 320 위치, 322 위치)

[1202] CH3 도메인(360 위치, 414 위치, 439 위치)

[1203] (2') 노출 티로신 잔기

[1204] CH2 도메인(278 위치, 296 위치, 300 위치)

[1205] CH3 도메인(436 위치)

[1206] 따라서, 인간 IgG1 등의 인간 IgG가 리신 잔기 또는 티로신 잔기로 수식되는 경우, 상기 위치에서의 수식이 보다 바람직하다.

[1207] 보다 바람직하게는, 인간 IgG1 등의 인간 IgG가 리신 잔기로 수식되는 경우, 상기 (1)의 위치 중에서도, 본 발명에 있어서 효율적으로 수식할 수 있는 CH2 도메인 중 소정의 위치(예, 246 위치, 248 위치, 288 위치, 290 위치, 317 위치)에 존재하는 리신 잔기가 수식되어도 좋다.

[1208] 특정한 실시형태에서는, 친화성 물질의 표적인 가용성 단백질은 상술한 바와 같이 특정한 아미노산 잔기를 복수의 위치에서 포함하는 경우, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하는 것이라도 좋다. 표적 영역은, 바람직하게는 1 내지 30개, 보다 바람직하게는 1 내지 20개, 더욱더 바람직하게는 1 내지 10개, 1 내지 5개, 또는 1 내지 3개(즉, 1개, 2개, 또는 3개)의 아미노산 잔기로 이루어지는 것이라도 좋다. 특히 바람직하게는, 표적 영역은 특정한 위치에 존재하는 특정한 아미노산 잔기로 이루어지는 영역이라도 좋다. 이러한 특정한 위치는 표적 단백질 및 친화성 물질의 종류 등에 의해도 변동하지만, 예를 들면, 항체의 정상 영역 중의 특정 영역(예, CH1, CH2, CH3) 중의 특정한 위치라도 좋고, 바람직하게는 항체의 CH2 중의 위치라도 좋다. 더 구체적으로는, 표적 영역은 인간 IgG Fc에서의 Eu 넘버링에 따른 하기 잔기라도 좋다:

[1209] (1) Lys248 잔기(이하, 본 명세서에서는 단지 「Lys248」이라고도 표기하고, 인간 IgG CH2 영역(서열번호 1)의 18번째의 잔기에 상당한다) 또는 Lys246 잔기(이하, 본 명세서에서는 단지 「Lys246」이라고도 표기하고, 인간

IgG CH2 영역(서열번호 1)의 16번째의 잔기에 상당한다):

[1210] (2) Lys288 잔기(이하, 본 명세서에서는 단지 「Lys288」이라고도 표기하고, 인간 IgG CH2 영역(서열번호 1)의 58번째의 잔기에 상당한다) 또는 Lys290 잔기(이하, 본 명세서에서는 단지 「Lys290」이라고도 표기하고, 인간 IgG CH2 영역(서열번호 1)의 60번째의 잔기에 상당한다);

[1211] (3) Lys317 잔기(이하, 본 명세서에서는 단지 「Lys317」이라고도 표기하고, 인간 IgG CH2 영역(서열번호 1)의 87번째의 잔기에 상당한다).

[1212] 본 발명에 의하면, 상기 표적 영역에서의 특정한 아미노산 잔기를 고도로 위치 선택적으로 수식할 수 있다. 이러한 위치 선택성은, 예를 들면 30% 이상, 바람직하게는 40% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 더욱더 바람직하게는 60% 이상, 특히 바람직하게는 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100% 이상이라도 좋다.

[1213] 표적 영역은 또한 특정한 위치에 존재하는 특정한 아미노산 잔기가, 당해 특정한 위치를 중심으로 하여 각각 N 말단측 및 C 말단측에 대하여 a개(여기서, a는 1 내지 10의 임의의 정수)의 아미노산 잔기의 원격 위치까지의 영역에 있어서, 당해 특정한 위치에 존재하는 특정한 아미노산 잔기 이외에, 특정한 아미노산 잔기와 동종의 아미노산 잔기를 포함하지 않는 것이라도 좋다. a는, 바람직하게는 1 내지 5의 정수이고, 보다 바람직하게는 1 내지 3의 정수이고, 더욱더 바람직하게는 1 또는 2이며, 특히 바람직하게는 1이다.

[1214] 바람직한 실시형태에서는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질은 항체에 대한 친화성 물질이다. 항체는 폴리클로널 항체, 또는 모노클로날 항체이다. 항체의 아이소타입으로서는, 예를 들면, IgG(예, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD, IgE, 및 IgY를 들 수 있다. 항체는 전장 항체, 또는 항체 단편(예, $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv, 단쇄 항체)이지만, 전장 항체가 바람직하다.

[1215] 항체는 임의의 항원에 대한 항체이다. 예를 들면, 이러한 항원은 상술한 바와 같은 생물 또는 바이러스에서 찾아낸 성분이라도 좋다. 이러한 항원으로서는 또한, 예를 들면, 단백질〔올리고펩티드, 폴리펩티드를 포함한다. 당 등의 생체분자로 수식된 단백질(예, 당 단백질)이라도 좋다〕, 당쇄, 핵산, 저분자 화합물을 들 수 있다.

[1216] 바람직하게는, 항체는 단백질을 항원으로 하는 항체라도 좋다. 단백질로서는, 예를 들면, 세포막 수용체, 세포막 수용체 이외의 세포막 단백질(예, 세포 외 기질 단백질), 리간드, 가용성 수용체를 들 수 있다.

[1217] 더 구체적으로는, 항체의 항원인 단백질은 질환 표적 단백질이라도 좋다. 질환 표적 단백질로서는, 예를 들면, 이하를 들 수 있다.

[1218] (1) 암 영역

[1219] PD-L1, GD2, PDGFRα(혈소판 유래 성장인자 수용체), CD22, HER2, 포스파티딜세린(PS), EpCAM, 피브로넥틴, PD-1, VEGFR-2, CD33, HGF, gpNMB, CD27, DEC-205, 엽산 수용체, CD37, CD19, Trop2, CEACAM5, S1P, HER3, IGF-1R, DLL4, TNT-1/B, CPAAs, PSMA, CD20, CD105(엔도글린), ICAM-1, CD30, CD16A, CD38, MUC1, EGFR, KIR2DL1,2,, NKG2A, tenascin-C, IGF(인슐린 유사 성장 인자(Insulin-like growth factor)), CTLA-4, 메소텔린, CD138, c-Met, Ang2, VEGF-A, CD79b, ENPD3, 엽산 수용체α, TEM-1, GM2, 글리피칸3, 마크로파아지 억제 인자, CD74, Notch1, Notch2, Notch3, CD37, TLR-2, CD3, CSF-1R, FGFR2b, HLA-DR, GM-CSF, EphA3, B7-H3, CD123, gpA33, Frizzled7 수용체, DLL4, VEGF, RSPO, LIV-1, SLITRK6, 넥틴-4, CD70, CD40, CD19, SEMA4D(CD100), CD25, MET, 조직 인자, IL-8, EGFR, cMet, KIR3DL2, Bst1(CD157), P-카드헤린, CEA, GITR, TAM(종양 관련 마크로파아지), CEA, DLL4, Ang2, CD73, FGFR2, CXCR4, LAG-3, GITR, Fucosyl GM1, IGF-1, 안지오포이에틴 2, CSF-1R, FGFR3, OX40, BCMA, ErbB3, CD137(4-1BB), PTK7, EFNA4, FAP, DR5, CEA, Ly6E, CA6, CEACAM5, LAMP1, 조직 인자, EPHA2, DR5, B7-H3, FGFR4, FGFR2, α2-PI, A33, GDF15, CAIX, CD166, ROR1, GITR, BCMA, TBA, LAG-3, EphA2, TIM-3, CD-200, EGFRvIII, CD16A, CD32B, PIGF, Axl, MICA/B, 톰슨 프리덴리히(Thomsen-Friedenreich), CD39, CD37, CD73, CLEC12A, Lgr3, 트란스페린 수용체, TGFβ, IL-17, 5T4, RTK, 면역 서프레서 단백질, NaPi2b, 루이스 혈액형 B항원, A34, 리실 옥시다제 (Lysil-Oxidase), DLK-1, TROP-2, α9 인테그린, TAG-72(CA72-4), CD70

[1220] (2) 자기면역질환·염증성질환

[1221] IL-17, IL-6R, IL-17R, INF-α, IL-5R, IL-13, IL-23, IL-6, ActRIIB, β7-인테그린, IL-4αR, HAS, 에오탁신-1, CD3, CD19, TNF-α, IL-15, CD3ε, 피브로넥틴, IL-1β, IL-1α, IL-17, TSLP(흉선 기질상 림포포이에틴),

LAMP(알파4 베타 7 인테그린), IL-23, GM-CSFR, TSLP, CD28, CD40, TLR-3, BAFF-R, MAdCAM, IL-31R, IL-33, CD74, CD32B, CD79B, IgE(면역글로불린 E), IL-17A, IL-17F, C5, FcRn, CD28, TLR4, MCAM, B7RP1, CXCR1,2 리간드, IL-21, 캐드헤린-11, CX3CL1, CCL20, IL-36R, IL-10R, CD86, TNF-α, IL-7R, Kv1.3, α9 인테그린, LIFHT

[1222] (3) 뇌신경질환

[1223] CGRP, CD20, β아밀로이드, β아밀로이드프로토피부린, 칼시토닌 유전자-관련 펩티드 수용체(Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor), LINGO(Ig 도메인 함유 1), α시누클레인, 세포 외 tau, CD52, 인슐린 수용체, tau 단백, TDP-43, SOD1, TauC3, JC 바이러스

[1224] (4) 감염증

[1225] 클로스트리디움 디피실 독소(Clostridium Difficile toxin) B, 사이토메갈로 바이러스, RS 바이러스, LPS, 에스. 아우레우스(S.Aureus) 알파-독소, M2e 단백, Psl, PcrV, 에스. 아우레우스 독소 (S.Aureus toxin), 인플루엔자 에이. 알기네이트(A, Alginate), 황색포도구균, PD-L1, 인플루엔자 B, 아시네토박터, F-단백질, Env, CD3, 병원성 대장균, 클레브시엘라, 폐렴구균

[1226] (5) 유전성 · 희소질환

[1227] 아밀로이드 AL, SEMA4D(CD100), 인슐린 수용체, ANGPTL3, IL4, IL13, FGF23, 부신피질자극호르몬, 트란스타이레틴, 헌팅턴

[1228] (6) 안질환

[1229] 인자 D, IGF-1R, PGDFR, Ang2, VEGF-A, CD-105(엔도글린), IGF-1R, β아밀로이드

[1230] (7) 뼈 · 정형외과 영역

[1231] 스클레로스틴(Sclerostin), 미오스타틴(Myostatin), Dickkopf-1, GDF8, RNAKL, HAS, Siglec-15

[1232] (8) 혈액질환

[1233] vWF, 인자 IXa, 인자 X, IFNɣ, C5, BMP-6, 페로포르틴(Ferroportin), TFPI

[1234] (9) 그 외의 질환

[1235] BAFF(B 세포 활성화 인자), IL-1β, PCSK9, NGF, CD45, TLR-2, GLP-1, TNFR1, C5, CD40, LPA, 프로락틴 수용체, VEGFR-1, CB1, 엔도글린, PTH1R, CXCL1, CXCL8, IL-1β, AT2-R, IAPP

[1236] 보다 바람직한 실시형태에서는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질은 모노클로날 항체에 대한 친화성 물질이다. 모노클로날 항체의 아이소타입은 항체에 대해서 상술한 것으로 동일하지만, IgG(예, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)가 바람직하다. 바람직하게는, 모노클로날 항체는 전장(全長) 모노클로날 항체이다.

[1237] 더욱더 바람직한 실시형태에서는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질은 전장 모노클로날 항체인 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체(예, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 등의 IgG)에 대한 친화성 물질이다.

[1238] 특히 바람직한 실시형태에서는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질은 하기 (A) 내지 (C)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 Fc 영역 단백질을 포함하고, 또한 항원 결합능을 갖는 항체에 대한 친화성 물질이다:

[1239] (A) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질;

[1240] (B) 서열번호 1의 아미노산 서열에 있어서, 1 또는 몇 개의 아미노산 잔기가 삽입, 부가, 결실 또는 치환된 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질; 또는

[1241] (C) 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질.

[1242] 서열번호 1의 아미노산 서열은 Fc 영역 단백질이다. 이러한 Fc 영역 단백질은 분비능을 갖는 것으로 알려져 있다. 따라서, 상기 (A) 내지 (C)의 Fc 영역 단백질은 분비능을 가질 수 있다. 또한, 이러한 Fc 영역 단백질을 포함하는 항체는 항원 결합능을 가질 수 있다. 서열번호 1에서의 18 위치의 아미노산 잔기는 임의의 아미노산 잔기이지만, 바람직하게는 중성 아미노산 잔기이고, 보다 바람직하게는 후술하는 바와 같은 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기이고, 더욱더 바람직하게는 류신, 이소류신 또는 알라닌이며, 특히 바람직하게는 류신 또는 알라

닌이다. 서열번호 1에서의 19 위치의 아미노산 잔기는 임의의 아미노산 잔기이지만, 바람직하게는 중성 아미노산 잔기 또는 산성 아미노산 잔기이고, 보다 바람직하게는 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 또는 산성 아미노산 잔기이고, 더욱더 바람직하게는 류신 또는 글루타민산이다. 서열번호 1에서의 21 위치의 아미노산 잔기는 임의의 아미노산 잔기이지만, 바람직하게는 중성 아미노산 잔기이고, 보다 바람직하게는 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기이고, 더욱더 바람직하게는 글리신 또는 알라닌이다. 서열번호 1에서의 140 위치의 아미노산 잔기는 임의의 아미노산 잔기이지만, 바람직하게는 산성 아미노산 잔기이고, 보다 바람직하게는 글루타민산 또는 아스파라긴산이다. 서열번호 1에서의 142 위치의 아미노산 잔기는 임의의 아미노산 잔기이지만, 바람직하게는 중성 아미노산 잔기이고, 보다 바람직하게는 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기이고, 더욱더 바람직하게는 메티오닌, 류신 또는 이소류신이며, 특히 바람직하게는 메티오닌 또는 류신이다. 서열번호 1에서의 177 위치의 아미노산 잔기는 임의의 아미노산 잔기이지만, 바람직하게는 중성 아미노산 잔기이고, 보다 바람직하게는 후술하는 바와 같은 비하전(荷電)성 극성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 또는 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기이고, 더욱더 바람직하게는 트레오닌, 알라닌 또는 글리신이며, 특히 바람직하게는 트레오닌 또는 알라닌이다.

[1243] 바람직한 실시형태에서는, 서열번호 1의 아미노산 서열은 서열번호 2 또는 서열번호 41의 아미노산 서열에서의 220 내지 449 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열이라도 좋다.

[1244] 다른 바람직한 실시형태에서는, 서열번호 1의 아미노산 서열은 서열번호 3의 아미노산 서열에서의 7 내지 236 위치의 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열이라도 좋다.

[1245] 특정한 실시형태에서는, 상술한 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질을 포함하는 항체는, 상술한 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 Fc 영역 단백질, 및 항체의 정상 영역을 포함하는 항체라도 좋다. 이러한 항체의 정상 영역으로서는, 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체(예, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 등의 IgG)의 정상 영역이라도 좋다.

[1246] Fc 영역 단백질 (B)에서는 아미노산 잔기의 결실, 치환, 부가 및 삽입으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1, 2, 3 또는 4종의 변이에 의해, 1개 또는 몇 개의 아미노산 잔기가 개변될 수 있다. 아미노산 잔기의 변이는 아미노산 서열 중 1개의 영역에 도입되어도 좋지만, 복수의 다른 영역에 도입되어도 좋다. 용어 「1개 또는 몇 개」는, 단백질의 활성을 크게 손상하지 않는 개수를 나타낸다. 용어 「1개 또는 몇 개」가 나타내는 수는, 예를 들면, 1 내지 100개, 바람직하게는 1 내지 80개, 보다 바람직하게는 1 내지 50개, 1 내지 30개, 1 내지 20개, 1 내지 10개 또는 1 내지 5개(예, 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 5개)이다.

[1247] Fc 영역 단백질 (C)에서는 서열번호 1의 아미노산 서열과의 동일성 %는 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상이라도 좋다. 본 발명에서는, 펩티드 또는 폴리펩티드(단백질)의 동일성 %의 산출은 알고리즘 blastp에 의해 행할 수 있다. 더 구체적으로는, 폴리펩티드의 동일성의 산정 %는, 기관(National Center for Biotechnology Information(NCBI))에서 제공되고 있는 알고리즘 blastp에 있어서, 디폴트 설정의 스코어링 파라미터(Scoring Parameters)(Matrix:BLOSUM62;Gap Costs:Existence=11 Extension=1;Compositional Adjustments:Conditional Compositional score matrix adjustment)를 사용하여 행할 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드(유전자)의 동일성 %의 산출은 알고리즘 blastn에 의해 행할 수 있다. 더 구체적으로는, 폴리뉴클레오티드의 동일성 %의 산정은 NCBI에서 제공되고 있는 알고리즘 blastn에 있어서, 디폴트 설정의 스코어링 파라미터(Match/Mismatch Scores=1, -2;Gap Costs=Linear)를 사용하여 행할 수 있다.

[1248] 분비능에서의 분비는 분비 단백질의 분비(소위 가용성)와 같은 의미이다. 따라서, 「분비능을 갖는다」란, 통상의 항체와 마찬가지로, 가용성 단백질로서 기능하는 것을 의미한다.

[1249] 상기 Fc 영역 단백질을 포함하는 항체는 목적의 특성(예, 분비능, 항원 결합능)을 유지하는 한, 특정한 부위에 변이가 도입되어 있어도 좋다. 목적의 특성을 유지할 수 있는, 변이가 도입되어도 좋은 아미노산 잔기의 위치는 당업자에게 명백하다. 구체적으로는, 당업자는, 1) 동종의 특성을 갖는 복수의 단백질의 아미노산 서열을 비교하고, 2) 상대적으로 보존되어 있는 영역, 및 상대적으로 보존되어 있지 않은 영역을 명백히 하고, 이어서, 3) 상대적으로 보존되어 있는 영역 및 상대적으로 보존되어 있지 않은 영역으로부터, 각각, 기능에 중요한 역활을 할 수 있는 영역 및 기능에 중요한 역활을 할 수 없는 영역을 예측할 수 있으므로, 구조·기능의 상관성을 인식할 수 있다. 따라서, 당업자는, 상기 Fc 영역 단백질을 포함하는 항체의 아미노산 서열에 있어서 변이가 도입되어도 좋은 아미노산 잔기의 위치를 특정할 수 있다.

[1250] 아미노산 잔기가 치환에 의해 변이되는 경우, 아미노산 잔기의 치환은 보존적 치환이라도 좋다. 본 명세서 중

에서 사용되는 경우, 용어 「보존적 치환」이란, 소정의 아미노산 잔기를, 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환하는 것을 말한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당해 분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들면, 이러한 패밀리로서는, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예, 아스파라긴산, 글루타민산), 비하전성 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), β위치 분기 측쇄를 갖는 아미노산(예, 트레오닌, 발린, 이소류신), 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘), 하이드록실기(예, 알코올성, 페놀성) 함유 측쇄를 갖는 아미노산(예, 세린, 트레오닌, 티로신), 및 유황 함유 측쇄를 갖는 아미노산(예, 시스테인, 메티오닌)을 들 수 있다. 바람직하게는, 아미노산의 보존적 치환은 아스파라긴산과 글루타민산 사이에서의 치환, 아르기닌과 리신과 히스티딘 사이에서의 치환, 트립토판과 페닐알라닌 사이에서의 치환, 페닐알라닌과 발린 사이에서의 치환, 류신과 이소류신과 알라닌 사이에서의 치환, 및 글리신과 알라닌 사이에서의 치환이라도 좋다.

[1251] 상기 (A) 내지 (C)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 Fc 영역을 포함하는 항체로서는, 예를 들면, 키메라 항체(예, 리툭시맙, 바실릭시맙, 인플릭시맙, 세툭시맙, 실툭시맙, 디누툭시맙, 오르타톡사시맙), 인간화 항체(예, 다크리주맙, 팔리비주맙, 트라스투주맙, 알렘투주맙, 오말리주맙, 에팔리주맙, 베바시주맙, 나탈리주맙(IgG4), 토실리주맙, 에쿨리주맙(IgG2), 모가물리주맙, 퍼투주맙, 오비누투주맙, 베돌리주맙, 펨브롤리주맙(IgG4), 메폴리주맙, 엘로투주맙, 다라투무맙, 익세키누맙(IgG4), 레슬리주맙(IgG4), 아테졸리주맙), 인간 항체(예, 아달리무맙, 파니투무맙, 골리무맙, 우스테키누맙, 카나키누맙, 오파투뮤맙, 데노수맙(IgG2), 이필리무맙, 벨리무맙, 락시바쿠맙, 라무시루맙, 니볼루맙(IgG4), 세쿠키누맙, 에볼로쿠맙(IgG2), 알리로쿠맙, 넥시투무맙, 브로달루맙(IgG2), 올랄라투맙)를 들 수 있다(IgG 서브 타입에 언급하고 있지 않은 경우, IgG1인 것을 나타낸다).

[1252] 상술한 바와 같은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질로서는, 예를 들면, 펩티드(올리고펩티드, 폴리펩티드, 및 단백질을 포함한다), 저분자 화합물, 핵산, 핵산-펩티드 복합체, 펩티드-저분자 화합물 복합체, 핵산-저분자 복합체를 들 수 있다.

[1253] 특정한 실시형태에서는, 상술한 바와 같은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질은 펩티드(올리고펩티드, 폴리펩티드, 단백질을 포함한다. 당 단백질이라도 좋다)라도 좋다. 이러한 펩티드로서는, 예를 들면, 이하가 보고되어 있다:

[1254] (1) 인간 IgG 전반(즉, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4. 이하 동일)의 특정 영역(CH2 영역)에 친화성을 갖는 IgG 결합 펩티드(예, 국제공개 제2016/186206호, 국제공개 제2013/027796호, 국제공개 제2008/054030호를 참조);

[1255] (2) 인간 IgG 전반의 특정 영역(CH2 영역)에 친화성을 갖는 단백질A 모사체 펩티드(Mimetic(PAM) peptide)(예, Fassina G et al., JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, 1996, VOL. 6, 564-569를 참조);

[1256] (3) 인간 IgG 전반의 특정 영역(CH2 영역)에 친화성을 갖는 EPIHRSTLTALL(서열번호 9)(예, Ehrlich G. K et al., J. Biochem. Biophys. Methods, 2001, VOL. 49, 443-454를 참조);

[1257] (4) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 갖는 (NH2-Cys1-X1-X2-X3-X4) 2-Lys-Gly-OH(예, Ruvo M et al., ChemBioChem, 2005, VOL. 6, 1242-1253을 참조);

[1258] (5) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 갖는 FARLVSSIRY(서열번호 10), FGRLVSSIRY(서열번호 11), 및 TWKTSRISIF(서열번호 12)(예, Krook M et al., Journal of Immunological Methods, 1998, VOL. 221, 151-157을 참조);

[1259] (6) 인간 IgG 전반의 특정 영역에 친화성을 갖는 QSYP(서열번호 13)(예, Jacobs J. M. et al., Bio. Techniques, 2003, VOL. 34, 132-141을 참조);

[1260] (7) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 갖는 HWRGWV(서열번호 14), HYFKED(서열번호 15), 및 HFRRHL(서열번호 16)(예, Carbonell R. G. et al., Journal of Chromatography A, 2009, VOL. 1216, 910-918을 참조);

[1261] (8) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 갖는 DAAG(서열번호 17)(예, Lund L. N. et al., Journal of Chromatography A, 2012, VOL. 1225, 158-167을 참조);

[1262] (9) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 갖는 Fc-I, Fc-II, 및 Fc-III(예, Warren L. Delano et al., Science, 2000, VOL. 287, 1279-1283; 국제공개 제2001/045746호를 참조); 및

[1263] (10) 인간 IgG 전반의 특정 영역(Fc 영역)에 친화성을 갖는 NARKFYKG(서열번호 18), 및 NKFRGKYK(서열번호 19)(예, Biochemical Engineering Journal, 2013, VOL. 79, 33-40을 참조).

[1264] 다른 특정한 실시형태에서는, 상술한 바와 같은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질은 펩티드 이외의 물질이라도 좋다. 이러한 물질로서는, 예를 들면, 인간 IgG(예, 인간 IgG1 내지 4)의 특정 영역(CH2 영역, 특히 Lys340의 측쇄)에 친화성을 갖는 압타머〔예, GGUGCU 및 GGUGAU 등의 GGUG(C/A)(U/T) 모티프 함유 압타머〕가 보고되어 있다(예, 국제공개 제2007/004748호; Nomura Y et al., Nucleic Acids Res., 2010 Nov; 38(21): 7822-9; Miyakawa S et al., RNA., 2008 Jun; 14(6): 1154-63을 참조).

[1265] 상술한 바와 같은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질은, 당해 분야에서의 임의의 공지된 방법에 의해 수득할 수 있다. 예를 들면, 가용성 단백질 전체, 또는 가용성 단백질 중의 부분 펩티드(예, 단백질 표면 노출 영역이 판명되어 있는 경우, 당해 영역 중에 존재하는 부분 펩티드)를 사용하여 항체를 제작함으로써(예, 하이브리도마법), 또는 친화성 물질을 입수 가능한 라이브러리(예, 펩티드 라이브러리, 항체 라이브러리, 항체 생산세포 라이브러리, 압타머 라이브러리, 파지 라이브러리, mRNA 라이브러리, cDNA 라이브러리)로부터 친화성 물질을 스크리닝함으로써(예, 파지 디스플레이법, SELEX법, mRNA 디스플레이법, 리보솜 디스플레이법, cDNA 디스플레이법, 효모 디스플레이법) 취득할 수 있다. 또한, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이 항체의 Fc 영역(가용성 영역)에 대한 친화성 물질인 경우, 각종 항체(예, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE)의 Fc 영역의 특정 영역(예, CH1, CH2, CH3) 중에 존재하는 부분 펩티드를 사용함으로써, 항체의 Fc 영역 중 임의의 부분에 대하여 선택적으로 결합할 수 있는 친화성 물질(예, 항체, 압타머)을 효율적으로 취득할 수 있다. 이렇게 하여 취득되는 친화성 물질 중에는, 친화적 결합능이 상대적으로 강한 것 및 약한 것이 혼재한다. 그러나, 친화적 결합능이 약한 친화성 물질이라도 과잉량으로 사용함으로써, 그 친화적 결합능을 보강할 수 있다.

[1266] 상술한 바와 같은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질은, 하기 식 (i)로 표시되는 IgG 결합성 펩티드 또는 이의 염이라도 좋다(예, 실시예 및 국제공개 제2016/186206호).

[1267] (X_{1-3})-C-(X_2)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3}) (서열번호 94) (i)

[1268] 〔식 중,

[1269] X는 동일 또는 상이하며, 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기이고,

[1270] C는 시스테인 잔기이고,

[1271] H는 히스티딘 잔기이고,

[1272] Xaa1은 아르기닌 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[1273] G는 글리신 잔기이고,

[1274] Xaa2는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기, 아스파라긴 잔기, 또는 아스파라긴산 잔기이고,

[1275] L은 류신 잔기이고,

[1276] V는 발린 잔기이고, 또한

[1277] W는 트립토판 잔기이다〕

[1278] 에 의해 표시되는, 13 내지 17 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 펩티드 또는 이의 염.

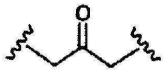
[1279] Xaa1 및 Xaa2는 각각 다른 아미노산 잔기인 것이 바람직하다.

[1280] 본 명세서에 있어서, N 말단 또는 C 말단의 X_{1-3}이라는 표기는, 시스테인(C 또는 Cys) 이외의 독립적으로 임의의 아미노산 잔기 X가 1 내지 3개 연속하고 있는 것을 의미하고, 그것을 구성하는 아미노산 잔기는 같거나 다른 잔기이지만, 바람직하게는 3개 모두가 같은 잔기가 아닌 서열로 이루어진다. 마찬가지로, X2도 시스테인(C 또는 Cys) 이외의 독립적으로 임의의 아미노산 잔기 X가 2개 연속하고 있는 것을 의미하고, 그것을 구성하는 아미노산 잔기는 같거나 다른 잔기이지만, 바람직하게는 당해 2개 연속하고 있는 아미노산 잔기는 같은 잔기가 아닌

서열로 이루어진다. 후술하는 X1도 시스테인(C 또는 Cys) 이외의 독립적으로 임의의 아미노산 잔기 X가 1개 존재하는 것을 의미한다.

[1281] 또한, 본 명세서에 있어서, 펩티드의 각 아미노산 서열 중에 이간된 적어도 2개의 시스테인 잔기는, 디술피드 결합에 의해 환상 펩티드를 형성할 수 있다. 통상, 상기 식 (i) 등의 식의 펩티드에 있어서, 외측의 2개의 시스테인 잔기는 디술피드 결합하고 있다. 또는 상기 식 (i) 등의 식의 펩티드에 있어서, 외측의 2개의 시스테인 잔기 중의 술피드기는 이하에서 표시되는 카르보닐기 함유 링커에 의해 연결되어 있어도 좋다.

[1282] [화 29]

[1283] 

[1284] 상기에서 표시되는 카르보닐기 함유 링커의 파선 부분은 술피드기와의 결합 부분을 의미한다. 당해 링커는 통상의 디술피드 결합보다도, 환원 반응 등에 대하여 안정적이다. 이 펩티드는, 예를 들면, 국제공개 제2016/186206호에 기재된 방법에 의해 조제할 수 있다.

[1285] 특정한 실시형태에서는, 상기 식 (i)의 친화성 물질은 하기 식 (i-1)로 표시되는 IgG 결합성 펩티드 또는 이의 염이라도 좋다(예, 국제공개 제2016/186206호).

[1286] (X_{1-3})-C-(X_2)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3}) (서열번호 95) (i-1)

[1287] 〔식 중,

[1288] X는 동일 또는 상이하며, 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기이고,

[1289] C는 시스테인 잔기이고,

[1290] H는 히스티딘 잔기이고,

[1291] Xaa1은 리신 잔기, 시스테인 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[1292] G는 글리신 잔기이고,

[1293] Xaa2는 글루타민산 잔기 또는 아스파라긴 잔기이고,

[1294] L은 류신 잔기이고,

[1295] V는 발린 잔기이고, 또한

[1296] W는 트립토판 잔기이다〕

[1297] 에 의해 표시되는, 13 내지 17 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 펩티드 또는 이의 염.

[1298] Xaa1 및 Xaa2는 각각 다른 아미노산 잔기인 것이 바람직하다.

[1299] 다른 특정한 실시형태에서는, 상술한 바와 같은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질은 하기 식 (i-2)로 표시되는 IgG 결합성 펩티드 또는 이의 염이라도 좋다(예, 실시예).

[1300] (X_{1-3})-C-(X_2)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3}) (서열번호 96) (i-2)

[1301] 〔식 중,

[1302] X는 동일 또는 상이하며, 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기이고,

[1303] C는 시스테인 잔기이고,

[1304] H는 히스티딘 잔기이고,

[1305] Xaa1은 아르기닌 잔기, 또는 류신 잔기이고,

[1306] G는 글리신 잔기이고,

[1307] Xaa2는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 또는 아스파라긴산 잔기이고,

[1308] L은 류신 잔기이고,

[1309] V는 발린 잔기이고, 또한

[1310] W는 트립토판 잔기이다〕에 의해 표시되는, 13 내지 17 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 펩티드 또는 이의 염.

[1311] 이러한 특정한 구조를 갖는 국제공개 제2016/186206호에 미개시의 친화성 물질은 인간 IgG Fc에서의 Eu 넘버링에 따른 Lys248 잔기 또는 Lys246 잔기, 또는 Lys248 잔기 또는 Lys246 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기의 위치 선택적인 수식에 유용하다(실시예).

[1312] 식 (i-1)의 펩티드의 아미노산 서열에 있어서 아미노산 잔기 X를 더욱 특정한 식 (i-1') 및 식 (i-1'')로 표시되는 펩티드를 이하에 나타내다.

[1313] 즉, 식 (i-1')로 표시되는 펩티드는,

[1314] (X_{1-3})-C-(X1)-Y-H-(Xaa1)-G-N-L-V-W-C-(X_{1-3}) (서열번호 97) (i-1')

[1315] 〔식 중,

[1316] X는 동일 또는 상이하며, 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기이고,

[1317] C는 시스테인 잔기이고,

[1318] Y는 티로신 잔기이고,

[1319] H는 히스티딘 잔기이고,

[1320] Xaa1은 리신 잔기, 시스테인 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[1321] G는 글리신 잔기이고,

[1322] N은 아스파라긴 잔기이고,

[1323] L은 류신 잔기이고,

[1324] V는 발린 잔기이고, 또한

[1325] W는 트립토판 잔기이다〕

[1326] 로 표시되는, 13 내지 17 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 것을 특징으로 한다.

[1327] 식 (i-1'')로 표시되는 펩티드는,

[1328] (X_{1-3})-C-A-(X1)-H-(Xaa1)-G-E-L-V-W-C-(X_{1-3}) (서열번호 98) (i-1'')

[1329] 〔식 중,

[1330] X는 동일 또는 상이하며, 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기이고,

[1331] C는 시스테인 잔기이고,

[1332] A는 알라닌 전기이고,

[1333] H는 히스티딘 잔기이고,

[1334] Xaa1은 리신 잔기, 시스테인 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[1335] G는 글리신 잔기이고,

[1336] E는 글루타민산 잔기이고,

[1337] L은 류신 잔기이고,

[1338] V는 발린 잔기이고, 또한

[1339] W는 트립토판 잔기이다]

[1340] 로 표시되는, 13 내지 17 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 것을 특징으로 한다.

[1341] 또한, 식 (i-1)의 펩티드의 아미노산 서열에 있어서 아미노산 잔기 X를 더욱 특정한 식 (ii)로 표시되는 펩티드를 이하에 나타낸다.

[1342] 즉, 식 (ii)로 표시되는 펩티드는,

[1343] (X_{1-3})-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(X_{1-3}) (서열번호 99) (ii)

[1344] 〔식 중,

[1345] X는 동일 또는 상이하며, 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기이고,

[1346] C는 시스테인 잔기이고,

[1347] H는 히스티딘 잔기이고,

[1348] Xaa1은 리신 잔기, 시스테인 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[1349] G는 글리신 잔기이고,

[1350] Xaa2는 글루타민산 잔기 또는 아스파라긴 잔기이고,

[1351] L은 류신 잔기이고,

[1352] V는 발린 잔기이고,

[1353] W는 트립토판 잔기이고,

[1354] Xaa3은 알라닌 잔기, 세린 잔기 또는 트레오닌 잔기이고, 또한

[1355] Xaa4는 티로신 잔기 또는 트립토판 잔기이다]

[1356] 로 표시되는, 13 내지 17 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 것을 특징으로 한다.

[1357] 식 (i) 등의 식의 펩티드의 아미노산 서열에 있어서, 17 아미노산 잔기로 한 경우, N 말단으로부터 1번째 및 2번째, 및 16번째 및 17번째의 아미노산 잔기 X는 결실되어 있어도 좋고, 그러한 펩티드는 13 아미노산 길이로 이루어진다.

[1358] 본 명세서에서 사용하는 「17 아미노산 잔기로 한 경우」란, 펩티드의 아미노산 잔기를 아미노산 번호로 부를 때에, 식 (i)의 펩티드 등에 대하여 최장의 아미노산 길이인 17 잔기의 N 말단으로부터 순번으로 1번째에서 17번째까지 번호를 부여하기 위해서 편의적으로 표현한 용어이다.

[1359] 또한, 식 (i-1)의 펩티드의 아미노산 서열에 있어서 아미노산 잔기 X를 더욱 특정한 식 (iii)로 표시되는 펩티드를 이하에 나타낸다.

[1360] 즉, 식 (iii)로 표시되는 펩티드는,

[1361] (X_{1-3})-C-A-Y-H-(Xaa1)-G-E-L-V-W-C-(X_{1-3}) (서열번호 100) (iii)

[1362] 〔식 중,

[1363] X는 동일 또는 상이하며, 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기이고,

[1364] C는 시스테인 잔기이고,

[1365] A는 알라닌 잔기이고,

[1366] Y는 티로신 잔기이고,

[1367] H는 히스티딘 잔기이고,

[1368] Xaa1은 리신 잔기, 시스테인 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[1369] G는 글리신 잔기이고,

[1370] E는 글루타민산 잔기이고,

[1371] L은 류신 잔기이고,

[1372] V는 발린 잔기이고, 또한

[1373] W는 트립토판 잔기이다〕

[1374] 로 표시되는, 13 내지 17 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 것을 특징으로 한다.

[1375] 식 (iii)의 펩티드의 아미노산 서열에 있어서, 17 아미노산 잔기로 한 경우, N 말단으로부터 1번째 및 2번째, 및 16번째 및 17번째의 아미노산 잔기 X는 결실되어 있어도 좋고, 그러한 펩티드는 13 아미노산 길이로 이루어진다.

[1376] 또한, 상기의 각 식의 펩티드의 아미노산 서열의 시스테인(C) 이외의 아미노산 잔기, 즉, 17 아미노산 잔기로 한 경우, N 말단으로부터 1 내지 3, 5, 6, 15 내지 17번째의 각 아미노산 잔기는 이하의 것으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 여기서, 각 대문자의 알파벳은 아미노산의 한 글자 표기이다:

[1377] 1번째의 아미노산 잔기=S, G, F 또는, 부재

[1378] 2번째의 아미노산 잔기=D, G, A, S, P, 호모시스테인 또는, 부재

[1379] 3번째의 아미노산 잔기=S, D, T, N, E 또는 R,

[1380] 15번째의 아미노산 잔기=S, T 또는 D,

[1381] 16번째의 아미노산 잔기=H, G, Y, T, N, D, F, 호모시스테인 또는, 부재,

[1382] 17번째의 아미노산 잔기=Y, F, H, M 또는, 부재.

[1383] 5번째의 아미노산 잔기=A 또는 T,

[1384] 6번째의 아미노산 잔기=Y 또는 W.

[1385] 또한, 식 (i-1)의 펩티드의 아미노산 서열에 있어서 아미노산 잔기 X를 더욱 특정한 식 (iv)로 표시되는 펩티드를 이하에 나타낸다.

[1386] 즉, 식 (iv)로 표시되는 펩티드는,

[1387] D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-T (서열번호 101) (iv)

[1388] 〔식 중,

[1389] D는 아스파라긴산 잔기이고,

[1390] C는 시스테인 잔기이고,

[1391] H는 히스티딘 잔기이고,

[1392] Xaa1은 리신 잔기, 시스테인 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[1393] G는 글리신 잔기이고,

[1394] Xaa2는 글루타민산 잔기 또는 아스파라긴 잔기이고,

[1395] L은 류신 잔기이고,

[1396] V는 발린 잔기이고,

[1397] W는 트립토판 잔기이고,

[1398] T는 트레오닌 잔기이고,

[1399] Xaa3은, 알라닌 잔기 또는 트레오닌 잔기이고, 또한,

[1400] Xaa4는 티로신 잔기 또는 트립토판 잔기] 로 표시되는, 13 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 것을 특징으로 한다.

[1401] 식 (i-1)의 펩티드의 구체적인 예의 몇 가지를 이하의 (1) 내지 (19)에 열거하지만, 이에 제한되지 않는 것은 말할 것도 없다:

[1402] (1) DCAYH(Xaa1)GELVWCT(서열번호 20);

[1403] (2) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH(서열번호 21);

[1404] (3) RCAYH(Xaa1)GELVWCS(서열번호 22);

[1405] (4) GPRCAYH(Xaa1)GELVWCSFH(서열번호 23);

[1406] (5) SPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH(서열번호 24);

[1407] (6) GDDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH(서열번호 25);

[1408] (7) GPSCAYH(Xaa1)GELVWCTFH(서열번호 26);

[1409] (8) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCSFH(서열번호 27);

[1410] (9) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTHH(서열번호 28);

[1411] (10) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFY(서열번호 29);

[1412] (11) SPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFY(서열번호 30);

[1413] (12) SDDCAYH(Xaa1)GELVWCTFY(서열번호 31);

[1414] (13) RGNCAYH(Xaa1)GQLVWCTYH(서열번호 32);

[1415] (14) G(Xaa2)DCAYH(Xaa1)GELVWCT(Xaa2)H(서열번호 33);

[1416] (15) RRGPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH(서열번호 34);

[1417] (16) DCTYH(Xaa1)GNLVWCT(서열번호 35);

[1418] (17) DCAYH(Xaa1)GNLVWCT(서열번호 36);

[1419] (18) DCTYH(Xaa1)GELVWCT(서열번호 37); 및

[1420] (19) DCAWH(Xaa1)GELVWCT(서열번호 38).

[1421] 〔식 중,

[1422] Xaa1은 리신 잔기, 시스테인 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[1423] Xaa2는 호모시스테인이며,

[1424] 바람직하게는, 호모시스테인끼리는 서로 디술피드 결합을 형성하고 있다]

[1425] 식 (i-1)의 펩티드의 바람직한 구체적인 예로서는 이하를 들 수 있다:

[1426] (1) DCAYH(Xaa1)GELVWCT(서열번호 20);

[1427] (2) GPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH(서열번호 21);

[1428] (13) RGNCAYH(Xaa1)GQLVWCTYH(서열번호 22);

[1429] (14) G(Xaa2)DCAYH(Xaa1)GELVWCT(Xaa2)H(서열번호 33); 및

[1430] (15) RRGPDCAYH(Xaa1)GELVWCTFH(서열번호 34)

[1431] 〔식 중,

[1432] Xaa1은 리신 잔기이고,

[1433] Xaa2는 호모시스테인이며,

[1434] 바람직하게는, 시스테인끼리 및/ 또는 호모시스테인끼리는 서로 디술피드 결합을 형성하고 있다〕

[1435] 상기 (13)의 펩티드는 RGNCAYHKGQLVWCTYH(서열번호 39)라도 좋다.

[1436] 다른 특정한 실시형태에서는, 상기 식 (i)의 친화성 물질은 하기 식 (v)로 표시되는 IgG 결합성 펩티드 또는 이의 염이라도 좋다(예, 실시예).

[1437] (X_{1-3})-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7) (서열번호 102) (v)

[1438] 〔식 중,

[1439] X는 동일 또는 상이하며, 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기이고,

[1440] C는 시스테인 잔기이고,

[1441] Xaa3은 알라닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[1442] Xaa4는 트립토판 잔기, 또는 티로신 잔기이고,

[1443] H는 히스티딘 잔기이고,

[1444] Xaa1은 아르기닌 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[1445] G는 글리신 잔기이고,

[1446] Xaa2는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기, 아스파라긴 잔기, 또는 아스파라긴산 잔기이고,

[1447] L은 류신 잔기이고,

[1448] V는 발린 잔기이고,

[1449] W는 트립토판 잔기이고,

[1450] Xaa5는 트레오닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[1451] Xaa6은 티로신 잔기, 리신 잔기, 또는 부재이며, 또한

[1452] Xaa7은 히스티딘 잔기, 리신 잔기, 또는 부재이다〕에 의해 표시되는, 13 내지 17 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG와 결합 가능한 펩티드 또는 이의 염.

[1453] 이러한 특정한 구조를 갖는 국제공개 제2016/186206호에 미개시의 친화성 물질은 인간 IgG Fc에서의 Eu 넘버링에 따른 Lys248 잔기 또는 Lys246 잔기, 또는 Lys248 잔기 또는 Lys246 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기의 위치 선택적인 수식에 유용하다(실시예). 바람직하게는, Xaa3, Xaa1, Xaa2, Xaa5, Xaa6, 및 Xaa7 중 어느 하나가 리신 잔기이다. Xaa1은, 바람직하게는 아르기닌 잔기, 또는 류신 잔기라도 좋다. 또는, Xaa1은, 바람직하게는 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고, 보다 바람직하게는 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 또는 글루타민산 잔기라도 좋다.

[1454] 식 (v)의 펩티드의 아미노산 서열에 있어서, 17 아미노산 잔기로 한 경우, N 말단으로부터 1번째 및 2번째, 및 16번째 및 17번째의 아미노산 잔기 X는 결실되어 있어도 좋고, 그러한 펩티드는 13 아미노산 길이로 이루어진다.

[1455] 또한, 상기 식 (v)의 펩티드의 아미노산 서열의 시스테인(C) 이외의 아미노산 잔기, 즉, 17 아미노산 잔기로 한 경우, N 말단으로부터 1 내지 3번째의 각 아미노산 잔기는 이하의 것으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 여기서, 각 대문자의 알파벳은 아미노산의 한 글자 표기이다:

[1456] 1번째의 아미노산 잔기=R, S, G, F 또는, 부재(바람직하게는, R, 또는 부재)

[1457] 2번째의 아미노산 잔기=D, G, A, S, P, 호모시스테인 또는, 부재(바람직하게는, G, 또는 부재)

[1458] 3번째의 아미노산 잔기=S, D, T, N, E 또는 R(바람직하게는, N, 또는 D).

[1459] 식 (v)의 펩티드의 구체적인 예의 몇 가지를 이하의 (16) 내지 (34)에 열거하지만, 이에 제한되지 않는 것은 말할 것도 없다:

[1460] (16) RGNCAYH(Xaa1)GQLVWCTYH(서열번호 73)

[1461] (17) RGNCAWH(Xaa1)GQLVWCTYH(서열번호 74)

[1462] (18) RGNCAWH(Xaa1)GELVWCTYH(서열번호 75)

[1463] (19) RGNCKWH(Xaa1)GQLVWCTYH(서열번호 76)

[1464] (20) RGNCKYH(Xaa1)GELVWCTYH(서열번호 77)

[1465] (21) RGNCKYH(Xaa1)GQLVWCTYH(서열번호 78)

[1466] (22) DCKWH(Xaa1)GELVWCT(서열번호 79)

[1467] (23) DCKYH(Xaa1)GELVWCT(서열번호 80)

[1468] (24) DCKWH(Xaa1)GELVWCT(서열번호 81)

[1469] (25) DCKWH(Xaa1)GQLVWCT(서열번호 82)

[1470] (26) DCKYH(Xaa1)GELVWCT(서열번호 83)

[1471] (27) DCKYH(Xaa1)GQLVWCT(서열번호 84)

[1472] (28) DCKWH(Xaa1)GQLVWCT(서열번호 85)

[1473] (29) DCKYH(Xaa1)GQLVWCT(서열번호 86)

[1474] (30) RGNCAWH(Xaa1)GQLVWCKYH(서열번호 87)

[1475] (31) RGNCAWH(Xaa1)GELVWCKYH(서열번호 88)

[1476] (32) RGNCAYH(Xaa1)GQLVWCTKH(서열번호 89)

[1477] (33) RGNCAYH(Xaa1)GQLVWCTYK(서열번호 90)

[1478] (34) RGNCAYH(Xaa1)GQLVWCTKH(서열번호 91).

[1479] 〔식 중,

[1480] Xaa1은 아르기닌 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기〕.

[1481] 바람직하게는, Xaa1은 아르기닌 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기이고, 보다 바람직하게는 리신 잔기이다.

[1482] 또한, IgG 결합성 펩티드는 광의의 일차 구조로서 하기의 식 (vi):

[1483] D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7) (서열번호 103) (vi)

[1484] 〔식 중,

[1485] D는 아스파라긴산 잔기이고,

[1486] C는 시스테인 잔기이고,

[1487] Xaa3은 알라닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[1488] Xaa4는 트립토판 잔기, 또는 티로신 잔기이고,

[1489] H는 히스티딘 잔기이고,

[1490] Xaa1은 아르기닌 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[1491] G는 글리신 잔기이고,

[1492] Xaa2는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기, 아스파라긴 잔기, 또는 아스파라긴산 잔기이고,

[1493] L은 류신 잔기이고,

[1494] V는 발린 잔기이고,

[1495] W는 트립토판 잔기이고,

[1496] Xaa5는 트레오닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[1497] Xaa6은 티로신 잔기, 리신 잔기, 또는 부재이며,

[1498] Xaa7은 히스티딘 잔기, 리신 잔기, 또는 부재이다〕로 표시되는, 13 내지 15 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 것을 특징으로 하는 펩티드이다(예, 실시예 및 국제공개 제2016/186206호).

[1499] 바람직하게는, Xaa3, Xaa1, Xaa2, Xaa5, Xaa6, 및 Xaa7 중 어느 하나가 리신 잔기이다. Xaa1은, 바람직하게는 리신 잔기, 아르기닌 잔기, 또는 류신 잔기이고, Xaa2는, 바람직하게는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기이다.

[1500] 특정한 실시형태에서는, IgG 결합성 펩티드는 하기의 식 (vii):

[1501] D-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-T (서열번호 104) (vii)

[1502] 〔식 중,

[1503] D는 아스파라긴산 잔기이고,

[1504] C는 시스테인 잔기이고,

[1505] Xaa3은 알라닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[1506] Xaa4는 트립토판 잔기, 또는 티로신 잔기이고,

[1507] H는 히스티딘 잔기이고,

[1508] Xaa1은 아르기닌 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[1509] G는 글리신 잔기이고,

[1510] Xaa2는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기, 아스파라긴 잔기, 또는 아스파라긴산 잔기이고,

[1511] L은 류신 잔기이고,

[1512] V는 발린 잔기이고,

[1513] W는 트립토판 잔기이고, 또한

[1514] T는 트레오닌 잔기이다〕로 표시되는, 13 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 것을 특징으로 하는 펩티드이다(예, 국제공개 제2016/186206호). 바람직하게는 Xaa3, Xaa1, 및 Xaa2 중 어느 하나가 리신 잔기이다. Xaa1은, 바람직하게는 리신 잔기, 아르기닌 잔기, 또는 류신 잔기이고, Xaa2는, 바람직하게는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기이다.

[1515] 다른 특정한 실시형태에서는, IgG 결합성 펩티드는 하기의 식 (viii):

[1516] R-G-N-C-(Xaa3)-(Xaa4)-H-(Xaa1)-G-(Xaa2)-L-V-W-C-(Xaa5)-(Xaa6)-(Xaa7) (서열번호 105) (viii)

[1517] 〔식 중,

[1518] R은 아르기닌 잔기이고,

[1519] G는 글리신 잔기이고,

[1520] N은 아스파라긴 잔기이고,

[1521] C는 시스테인 잔기이고,

[1522] Xaa3은 알라닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[1523] Xaa4는 트립토판 잔기, 또는 티로신 잔기이고,

[1524] H는 히스티딘 잔기이고,

[1525] Xaa1은 아르기닌 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 또는 디아미노프로피온산 잔기이고,

[1526] G는 글리신 잔기이고,

[1527] Xaa2는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기, 아스파라긴 잔기, 또는 아스파라긴산 잔기이고,

[1528] L은 류신 잔기이고,

[1529] V는 발린 잔기이고,

[1530] W는 트립토판 잔기이고,

[1531] Xaa5는 트레오닌 잔기, 또는 리신 잔기이고,

[1532] Xaa6은 티로신 잔기, 리신 잔기, 또는 부재이며, 또한

[1533] Xaa7은 히스티딘 잔기, 리신 잔기, 또는 부재이다] 로 표시되는, 13 내지 15 아미노산 잔기로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 IgG 및/또는 토끼 IgG와 결합 가능한 것을 특징으로 하는 펩티드(예, 실시예). 이러한 특정한 구조를 갖는 국제공개 제2016/186206호에 미개시의 화합물은, 인간 IgG Fc에서의 Eu 넘버링에 따른 Lys248 잔기 또는 Lys246 잔기, 또는 Lys248 잔기 또는 Lys246 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기의 위치 선택적인 수식에 유용하다(실시예). 바람직하게는, Xaa3, Xaa1, Xaa2, Xaa5, Xaa6, 및 Xaa7 중 어느 하나가 리신 잔기이다. Xaa1은, 바람직하게는 아르기닌 잔기, 또는 류신 잔기라도 좋다. 또는, Xaa1은, 바람직하게는 리신 잔기, 아르기닌 잔기, 또는 류신 잔기이고, Xaa2는, 바람직하게는 리신 잔기, 글루타민 잔기, 글루타민산 잔기이다.

[1534] 펩티드는, 각 아미노산 서열 중에 이간된 적어도 2개의 시스테인(C) 잔기가 디술피드 결합하여 환상 펩티드를 형성하고, 각 시스테인 잔기의 N 말단측 및 C 말단측에는 1 또는 2개의 시스테인 이외의 임의의 아미노산 잔기를 갖고 있어도 좋다. 각 시스테인 잔기의 N 말단측 및 C 말단측에는 1 또는 2개의 아미노산 잔기를 갖는 경우에 있어서, 17 아미노산 잔기로 한 경우, N 말단으로부터 1 내지 2, 16 내지 17번째의 각 아미노산 잔기는 상기 예시한 것이다. 또한, 상기 펩티드를 구성하는 아미노산은 L체 또는 D체 중 어느 하나라도 좋지만, L체가 바람직하다(실시예에서는 펩티드를 구성하는 아미노산 잔기는 모두 L체이다).

[1535] 상기한 바와 같이, IgG 결합성 펩티드에 있어서, 상기 Xaa의 아미노산 잔기가 가교제에 의해 용이하게 수식할 수 있는 아미노산 잔기(리신 잔기, 시스테인 잔기, 아스파라긴산 잔기, 또는 글루타민산 잔기 등의 단백질 구성 아미노산, 또는 디아미노프로피온산 잔기 또는 2-아미노수베르산 잔기 등의 비단백질 구성 아미노산)인 경우, 이들 아미노산 중에서도 리신 잔기가 바람직하다. 이러한 가교제로서는, 예를 들면, DSG(disuccinimidyl glutarate, 디숙신이미딜 글루탈레이트), DSS(disuccinimidyl suberate, 디숙신이미딜 수베레이트) 등의 디숙신이미딜기를 바람직하게는 2 이상 포함하는 가교제, DMA(dimethyl adipimidate·2HCl, 아디프이미드산 디메틸 2염산염), DMP(dimethyl pimelimidate·2HCl, 피멜이미드산 디메틸 2염산염), 및 DMS(dimethyl suberimidate·2HCl, 수벨이미드산 디메틸 2염산염) 등의 이미드산 부분을 바람직하게는 2 이상 포함하는 가교제, 및 DTBP(dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate·2HCl, 3,3'-디티오비스프로피온이미드산 디메틸 2염산염) 및 DSP(dithiobis succinimidyl propionate, 디티오비스 숙신이미딜 프로피온산) 등의 SS 결합을 갖는 가교제를 들 수 있다(예, 국제공개 제2016/186206호). IgG 결합성 펩티드를 가교제에 의해 수식할 때의 부위 특이성을 높이기 위해서, IgG 결합성 펩티드는 그 서열 중에 Xaa1과 같은 잔기를 전혀 갖지 않거나, 거의 갖지 않는(예를 들면, 1개 또는 2개밖에 갖지 않는) 것이 바람직하다. 예를 들면, Xaa1이 리신 잔기인 경우에는, IgG 결합성 펩티드는 그 서열 중에 Xaa1 이외의 장소에 리신 잔기를 전혀 갖지 않거나, 거의 갖지 않은 것이 바람직하다.

[1536] IgG 결합성 펩티드는 IgG의 Fc 도메인에 결합한다. IgG 결합성 펩티드는 상기 Xaa1 등의 상기 Xaa의 아미노산 잔기에 있어서, IgG Fc의 특정한 영역, 즉, 인간 IgG Fc에서의 Eu 넘버링에 따른 Lys248 잔기 또는 Lys246 잔기, 바람직하게는 Lys248과 근접한다(실시예 및 국제공개 제2016/186206호를 참조). 또는, IgG 결합성 펩티드에 있어서, 상기 Xaa의 아미노산 잔기는, 인간 IgG Fc에서의 Eu 넘버링에 따른 Lys248 잔기 또는 Lys246 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기와 근접할 수 있다.

[1537] 더 구체적으로는, 상기 식 (i) 내지 (viii)로 표시되는 펩티드는 이하와 같다.

[1538] (1') RGNCAYHKGQLVWCTYH(서열번호 39)

[1539] (2') RGNCKYHRGQLVWCTYH(서열번호 42)

[1540] (3') RGNCAWHRGKLVWCTYH(서열번호 43)

[1541] (4') RGNCKWHRGELVWCTYH(서열번호 44)

[1542] (5') RGNCKWHRGQLVWCTYH(서열번호 45)

[1543] (6') RGNCKYHLGELVWCTYH(서열번호 46)

[1544] (7') RGNCKYHLGQLVWCTYH(서열번호 47)

[1545] (8') DCKWHLGELVWCT(서열번호 48)

[1546] (9') DCKYHLGELVWCT(서열번호 49)

[1547] (10') DCKWHRGELVWCT(서열번호 50)

[1548] (11') DCKWHLGQLVWCT(서열번호 51)

[1549] (12') DCKYHRGELVWCT(서열번호 52)

[1550] (13') DCKYHLGQLVWCT(서열번호 53)

[1551] (14') DCKWHRGQLVWCT(서열번호 54)

[1552] (15') DCKYHRGQLVWCT(서열번호 55)

[1553] (16') RGNCAWHLGQLVWCKYH(서열번호 56)

[1554] (17') RGNCAWHLGELVWCKYH(서열번호 57)

[1555] (18') RGNCAYHLGQLVWCTKH(서열번호 58)

[1556] (19') RGNCAYHLGQLVWCTYK(서열번호 59)

[1557] (20') RGNCAYHRGQLVWCTKH(서열번호 60)

[1558] 또한, 상술한 바와 같은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질은,

[1559] (a) FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열번호 92)의 아미노산 서열에 있어서, 어느 하나의 아미노산 잔기가 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 및 디아미노프로피온산 잔기(가교제에 의해 용이하게 수식할 수 있는 아미노산 잔기)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1개의 아미노산 잔기(바람직하게는, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 또는 글루타민산 잔기, 보다 바람직하게는 리신 잔기)에 의해 치환되어 있고, 또한

[1560] (b) 서열번호 92의 상기 아미노산 서열에 대하여 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 친화성 펩티드라도 좋다.

[1561] 바람직하게는, (a) 및 (b)의 특성을 갖는 상기 아미노산 서열은 본 명세서 중에 기재된 바와 같은 인간 IgG와 결합 가능하다.

[1562] 서열번호 92의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드는 펩티드 시약 합성 상의 사정에 의해, Z34C로서 알려져 있는 친화성 펩티드에서 N 말단으로부터 세서 26번째와 28번째의 2개의 K(리신)를 R(아르기닌)로 변경한 것이고, 또한 N 말단을 아세틸화하고, 또한 C 말단을 아미드화하여 사용할 수 있다. 더 구체적으로는, 이러한 친화성

펩티드로서는, Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 92)를 들 수 있다. 이러한 특정한 구조를 갖는 친화성 물질은 인간 IgG Fc에서의 Eu 넘버링에 따른 Lys248 잔기 또는 Lys246 잔기, Lys288 또는 Lys290, Lys317, 또는 그들 잔기 이외의 다른 아미노산 잔기의 위치 선택적인 수식에 유용하다(실시예). 또한, 상기 Z34C의 아미노산 서열은 FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNAKIKSIRDDC(서열번호 93)이다(예, Starovasnik, M. A. et al., Structural mimicry of a native protein by a minimized binding domain., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 10080-10085(1997)를 참조).

[1563] 친화성 펩티드는 인간 IgG(예, 상술한 바와 같은 인간 IgG. 바람직하게는 인간 IgG1)에 대한 친화성을 가질 수 있다. 상기 친화성 펩티드는, 5 위치 및 34 위치의 시스테인 잔기가 디술피드 결합하여 환상 펩티드를 형성하고 있어도 좋다.

[1564] 가교제에 의해 수식이 용이한 아미노산 잔기가 도입되는 위치로서는, 인간 IgG1 등의 인간 IgG에 대한 친화성을 갖는 한 임의의 위치를 이용할 수 있다. 이러한 위치에 대해서는 당업자라면 용이하게 동정할 수 있다. 바람직하게는, 가교제에 의해 용이하게 수식할 수 있는 아미노산 잔기가 도입되는 위치는, 디술피드 결합하여 있어도 좋은 5 위치 및 34 위치의 시스테인 잔기 이외의 아미노산 잔기이다. 보다 바람직하게는, 가교제에 의해 용이하게 수식할 수 있는 아미노산 잔기가 도입되는 위치로서는, 예를 들면, 1 위치, 3 위치, 6 위치, 7 위치, 13 위치, 20 위치, 24 위치, 31 위치, 및 32 위치의 아미노산 잔기를 들 수 있다.

[1565] 바람직하게는, (a) 및 (b)의 특성을 갖는 상기 아미노산 서열은 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 및 디아미노프로피온산 잔기(가교제에 의해 용이하게 수식할 수 있는 아미노산 잔기)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1개의 특정한 아미노산 잔기(바람직하게는, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 또는 글루타민산 잔기이고, 보다 바람직하게는 리신 잔기)를 소정의 위치에 갖고, 또한, 천연 단백질을 구성하는 통상의 20종의 아미노산 잔기(바람직하게는, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 및 글루타민산 잔기 이외의 17종의 아미노산 잔기이고, 보다 바람직하게는 리신 잔기 이외의 19종의 아미노산 잔기)의 변이를 당해 소정의 위치 이외의 위치에 갖는 것도 또한 바람직하다. 이러한 소정의 위치는 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 1 위치, 3 위치, 6 위치, 7 위치, 13 위치, 20 위치, 24 위치, 31 위치, 및 32 위치를 들 수 있다. (a) 및 (b)의 특성을 갖는 상기 아미노산 서열은, 5 위치 및 34 위치의 2개의 시스테인 잔기가 유지되고 있고, 이들 2개의 시스테인 잔기는 디술피드 결합에 의해 결합하고 있어도 좋다. 서열번호 92의 상기 아미노산 서열에 대하여 90% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열은 아미노산 잔기의 결실, 치환, 부가 및 삽입으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1, 2, 3 또는 4종의 변이(바람직하게는 치환)에 의해, 1 내지 3개(바람직하게는 1 또는 2개, 보다 바람직하게는 1개)의 아미노산 잔기가 개변된 것이라도 좋다. 아미노산 잔기의 변이는 아미노산 서열 중 1개의 영역에 도입되어도 좋지만, 복수의 다른 영역에 도입되어도 좋다.

[1566] 보다 바람직하게는, (a) 및 (b)의 특성을 갖는 상기 아미노산 서열은 이하 (c) 또는 (d)라도 좋다.

[1567] (c) 이하 (1) 내지 (9)의 아미노산 서열로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열:

[1568] (1) KNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열번호 61);

[1569] (2) FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열번호 62);

[1570] (3) FNMQCQRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열번호 63);

[1571] (4) FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC(서열번호 64);

[1572] (5) FNMQCQRRFYEALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC(서열번호 65);

[1573] (6) FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC(서열번호 68);

[1574] (7) FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열번호 70);

[1575] (8) FNMQCKRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC(서열번호 71); 및

[1576] (9) FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC(서열번호 72); 또는

[1577] (d) 상기 (1) 내지 (9) 중 어느 하나의 아미노산 서열에 있어서, 1개의 리신 잔기 및 2개의 시스테인 잔기 이외의 위치(예, 1 위치, 3 위치, 6 위치, 7 위치, 13 위치, 20 위치, 24 위치, 31 위치, 및 32 위치의 위치)에 있어서, 리신 잔기 이외의 19종의 아미노산 잔기의 변이를 갖는, 상기 (1) 내지 (9) 중 어느 하나의 아미노산 서열에 대하여 90% 이상의 동일성(상술한 바와 같은 개수의 아미노산 잔기의 수식이라도 좋다)을 갖는 아미노산

서열. (d)의 상기 아미노산 서열은, 5 위치 및 34 위치의 2개의 시스테인 잔기가 유지되어 있는 것이 바람직하고, 이들 2개의 시스테인 잔기는 디술피드 결합에 의해 결합하고 있어도 좋다. (d)의 상기 아미노산 서열을 갖는 친화성 펩티드는, 본 명세서 중에 기재된 바와 같은 인간 IgG와 결합 가능한 것이 바람직하다.

[1578] 상기 친화성 펩티드는, 서열번호 92의 상기 아미노산 서열 또는 상기 (1) 내지 (9)의 아미노산 서열에 대하여 90% 이상의 동일성을 갖는 한, 가교제에 의해 수식이 용이한 1개의 아미노산 잔기의 도입 이외에도, 새로운 아미노산 잔기의 변이를 갖고 있어도 좋다. 새로운 아미노산의 변이를 도입할 수 있는 위치에 대해서는 당업자라면 용이하게 상정할 수 있다. 이러한 위치로서는, 예를 들면, 5 위치 및 34 위치의 시스테인 잔기 이외의 위치를 이용할 수 있다. 예를 들면, 1 위치의 페닐알라닌 잔기, 6 위치의 아르기닌 잔기, 13 위치의 류신 잔기, 20 위치의 글루타민산 잔기, 24 위치의 아스파라긴 잔기, 또는 31 위치의 아르기닌 잔기(가교제에 의해 용이하게 수식할 수 있는 아미노산 잔기가 이미 도입된 위치를 제외한다)라도 이용할 수 있다. 새로운 아미노산의 변이에 의해 도입할 수 있는 아미노산으로서는, 예를 들면, 알라닌(A), 아스파라긴(N), 시스테인(C), 글루타민(Q), 글리신(G), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 프롤린(P), 세린(S), 트레오닌(T), 트립토판(W), 티로신(Y), 발린(V), 아스파라긴산(D), 글루타민산(E), 아르기닌(R), 히스티딘(H), 및 리신(L)을 들 수 있다. 바람직하게는, 리신 이외의 이들 19종의 아미노산이 이용되어도 좋다. 아미노산은 L체 또는 D체 중 어느 하나라도 좋지만, L체가 바람직하다(실시예에서는 펩티드를 구성하는 아미노산 잔기는 모두 L체이다).

[1579] 서열번호 92의 상기 아미노산 서열 또는 (1) 내지 (9)의 상기 아미노산 서열에 대한 동일성 %의 정도는, 상술한 바와 같이 결정할 수 있다. 동일성 %의 정도는, 바람직하게는 92% 이상, 보다 바람직하게는 94% 이상, 더욱더 바람직하게는 95% 이상, 특히 바람직하게는 97% 이상(즉, 서열번호 92의 아미노산 서열에 대하여, 리신 잔기, 아스파라긴산 잔기, 글루타민산 잔기, 2-아미노수베르산 잔기, 및 디아미노프로피온산 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1개의 아미노산 잔기의 변이만을 갖는 것)이라도 좋다.

[1580] 친화성 물질이 펩티드인 경우, 펩티드의 말단에 있는 아미노기 및 카르복시기는 보호되어 있어도 좋다. N-말단 아미노기의 보호기로서는, 예를 들면, 알킬카르보닐기(아실기)(예, 아세틸기, 프로폭시기, tert-부톡시카르보닐기 등의 부톡시카르보닐기), 알킬옥시카르보닐기(예, 플루오레닐메톡시카르보닐기), 아릴옥시카르보닐기, 아릴알킬(아르알킬)옥시카르보닐기(예, 벤질옥시카르보닐기)를 들 수 있다. N-말단 아미노기의 보호기로서는 아세틸기가 바람직하다. C-말단 카르복시기의 보호기로서는, 예를 들면, 에스테르 또는 아미드를 형성 가능한 기를 들 수 있다. 에스테르 또는 아미드를 형성 가능한 기로서는, 예를 들면, 알킬옥시기(예, 메틸옥시, 에틸옥시, 프로필옥시, 부틸옥시, 펜틸옥시, 헥실옥시), 아릴옥시기(예, 페닐옥시, 나프틸옥시), 아르알킬옥시기(예, 벤질옥시), 아미노기를 들 수 있다. C-말단 카르복시기의 보호기로서는 아미노기가 바람직하다. 친화성 물질이 2 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 펩티드인 경우, 시스테인 잔기의 측쇄에 있는 티올기를 통하여 디술피드 결합이 형성되어 있어도 좋다.

[1581] 1-3. 링커(L)

[1582] 식 (I)에 있어서, L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이다.

[1583] L로 표시되는 절단성 링커는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기이다. 절단성 부분은, 단백질의 변성·분해(예, 아미드 결합의 절단)를 일으킬 수 없는 조건(온화한 조건) 하에서의 특정한 처리에 의해 절단 가능한 부위이다. 따라서, 절단성 부분은, 온화한 조건 하에서의 특정한 절단 처리에 의해 절단 가능한 부위(아미드 결합 이외의 결합)라고 할 수 있다. 이러한 특정한 처리로서는, 예를 들면, (a) 산성 물질, 염기성 물질, 환원제, 산화제, 효소로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 물질에 의한 처리, (b) 광으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 물리 화학적 자극에 의한 처리, 또는 (c) 자기 분해성의 절단성 부분을 포함하는 절단성 링커를 사용한 경우의 방치를 들 수 있다. 이러한 절단성 링커 및 그 절단 조건은 당해 분야에서의 기술 상식이다(예, G. Leriche, L. Chisholm, A. Wagner, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 20, 571(2012); Feng P. et al., Jounal of American Chemical Society. 132, 1500(2010).; Bessodes M. et al., Journal of Controlled Release, 99, 423(2004).; DeSimone, J. M., Journal of American Chemical Society. 132, 17928(2010); Thompson, D. H., Journal of Controlled Release, 91, 187(2003); Schoenmarks, R. G., Journal of Controlled Release, 95, 291(2004)). 이러한 절단성 부분으로서는, 예를 들면, 디술피드 잔기, 아세탈 잔기, 케탈 잔기, 에스테르 잔기, 카르바모일 잔기, 알콕시알킬 잔기, 이민 잔기, 3급 알킬옥시카르바메이트 잔기(예, tert-부틸옥시카르바메이트 잔기), 실란 잔기, 하이드라존 함유 잔기(예, 하이드라존 잔기, 아실하이드라존 잔기, 비스아릴하이드라존 잔기), 포스포르아미데이트 잔기, 아코니틸 잔기, 트리틸 잔기, 아조 잔기, 비시날디올 잔기, 셀렌 잔기, 전자 흡인기를 갖는 방향족환 함유 잔기, 쿠마린 함유 잔기, 술폰 함유 잔기, 불포화 결합 함

유 쇄 잔기, 글리코실 잔기를 들 수 있다.

[1584] 전자 흡인기를 갖는 방향족환기는 아릴, 아르알킬, 방향족 복소환기, 방향족 복소환기를 갖는 알킬로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 방향족환기를 갖는 것이 바람직하고, 아르알킬, 방향족 복소환기를 갖는 알킬이 보다 바람직하다. 전자 흡인기는 환의 2 위치에 결합하고 있는 것이 바람직하다. 더욱더 바람직하게는, 전자 흡인기를 갖는 방향족환 함유 잔기는, 예를 들면, 2 위치에 전자 흡인기를 갖는 아르알킬(예, 벤질)이다. 전자 흡인기로서는, 예를 들면, 할로겐 원자, 할로겐 원자로 치환된 알킬(예, 트리플루오로메틸), 보론산 잔기, 메실, 토실, 트리플레이트, 니트로, 시아노, 페닐기, 케토기(예, 아실)를 들 수 있다.

[1585] 절단성 부분으로서의 잔기의 명칭에 관련하여 접두어, 접미어 등의 용어로서 발견된 알킬, 아실(즉, 알킬카르보닐), 알콕시(즉, 알킬옥시), 아릴, 아르알킬 등의 기의 정의, 예, 및 바람직한 예는 후술하는 것과 동일하다.

[1586] 에스테르 잔기로서는, 예를 들면, 탄소 원자 및 산소 원자로 구성되는 통상의 에스테르 잔기〔예, 알킬에스테르(예, tert-부틸옥시카르보닐 등의 3급 알킬옥시카르보닐), 아릴에스테르(예, 페나실에스테르, 2-(디페닐포스피노)벤조에이트), 글리코실에스테르 잔기, 오르토에스테르 잔기, 유황 원자 및 산소 원자를 포함하는 에스테르 잔기(예, α-티오페닐에스테르 잔기, 알킬티오에스테르 잔기 등의 티오에스테르 잔기), 인 원자 및 산소 원자를 포함하는 에스테르 잔기(예, 포스포디에스테르 잔기, 포스포트리에스테르 잔기), 활성화 에스테르 잔기(예, N-하이드록시숙신이미드 잔기)를 들 수 있다.

[1587] 술폰 함유 잔기로서는, 예를 들면, 술폰 잔기, 퀴놀리닐벤젠설포네이트 잔기를 들 수 있다.

[1588] 실란 잔기는, 바람직하게는 알킬, 아릴, 아르알킬, 및 알콕시로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 기를 갖는 실란 잔기이다. 이러한 실란 잔기로서는, 예를 들면, 디알킬디알콕시실란 잔기(예, 디메틸디알콕시실란, 디에틸디알콕시실란), 또는 디아릴디알콕시실란 잔기(예, 디페닐디알콕시실란)를 들 수 있다.

[1589] 알콕시알킬(즉, 알킬옥시알킬) 잔기로서는, 후술하는 알킬옥시 및 알킬을 조합한 기이고(알킬옥시 및 알킬의 정의, 예 및 바람직한 예는 후술하는 것과 동일), 예를 들면, 메톡시메틸 잔기, 에톡시메틸 잔기, 메톡시에틸 잔기, 에톡시에틸 잔기를 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[1590] 불포화 결합 함유 쇄 잔기는, 탄소 원자만으로 이루어지는 불포화 결합 부분을 포함하는 잔기(예, 탄소 원자간 이중결합을 갖는 최소 단위인 비닐(에테닐), 또는 탄소 원자간 삼중결합을 갖는 최소 단위인 아세티레닐(에티닐)), 또는 탄소 원자 및 헤테로 원자(예, 질소 원자, 유황 원자, 산소 원자)로 이루어지는 불포화 결합 부분(예, 알데히드, 시아노)을 포함하는 잔기이다. 불포화 결합 함유 쇄 잔기로서는, 예를 들면, 비닐에테르 잔기, 시아노에틸 잔기, 에틸렌 잔기, 말론디알데히드 잔기를 들 수 있다.

[1591] 산성 물질(구전자 시약이라고도 호칭된다)로서는, 예를 들면, 염산, 황산, 질산 등의 무기산성 물질, 및 포름산, 아세트산, 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진프로판술폰산, 3-모르폴리노프로판술폰산, 인산2수소나트륨, 시트르산, 도데실 황산, N-도데칸오일사르코신산, 트리플루오로아세트산 등의 유기산성 물질을 들 수 있다. 산성 물질에 의해 절단 가능한 부위로서는, 예를 들면, 알킬옥시아릴알킬 잔기, 3급 알킬옥시카르바메이트 잔기, 아세탈 잔기, 실란 잔기, 이민 잔기, 비닐에테르 잔기, β-티오프로피오네이트 잔기, 트리틸 잔기, 하이드라존 잔기, 아코니틸 잔기, 오르토에스테르 잔기, 카르바모일 잔기, 2-(디페닐포스피노)벤조에이트 잔기를 들 수 있다.

[1592] 염기성 물질(구핵 시약이라고도 호칭된다)로서는, 예를 들면, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 아세트산나트륨, 아세트산칼륨, 아세트산암모늄 등의 무기염기성 물질, 및 트리에틸아민, N,N'-디이소프로필아민 등의 유기염기성 물질을 들 수 있다. 염기성 물질에 의해 절단 가능한 부위로서는, 예를 들면, 실란 잔기, 시아노에틸 잔기, 술폰 잔기, 에틸렌 잔기, 글리코실디숙시네이트 잔기, α-티오페닐에스테르 잔기, 불포화 비닐술피드 잔기, 말론디알데히드 잔기, 아실하이드라존 잔기, 알킬티오에스테르 잔기를 들 수 있다.

[1593] 환원제로서는, 예를 들면, 시스테인, 디티오트레이톨, 환원형 글루타티온, 하이드록실아민, β-머캅토에탄올을 들 수 있다. 환원제에 의해 절단 가능한 부위로서는, 예를 들면, 디술피드 잔기, 알콕시알킬 잔기, 아조 잔기를 들 수 있다.

[1594] 산화제로서는, 예를 들면, 과요오드산나트륨, 산화형 글루타티온을 들 수 있다. 산화제에 의해 절단 가능한 부위로서는, 예를 들면, 비시날디올 잔기, 셀렌 잔기를 들 수 있다.

[1595] 효소로서는, 예를 들면, 트립신, 파파인, TEV, 트롬빈, 카텝신 B, 카텝신 D, 카텝신 K, 카스파제, 프로테아제, 매트릭스메타로프로테아제, 리파아제, 엔도글리코시다제, PN가제F를 들 수 있다. 효소에 의해 절단 가능한 부

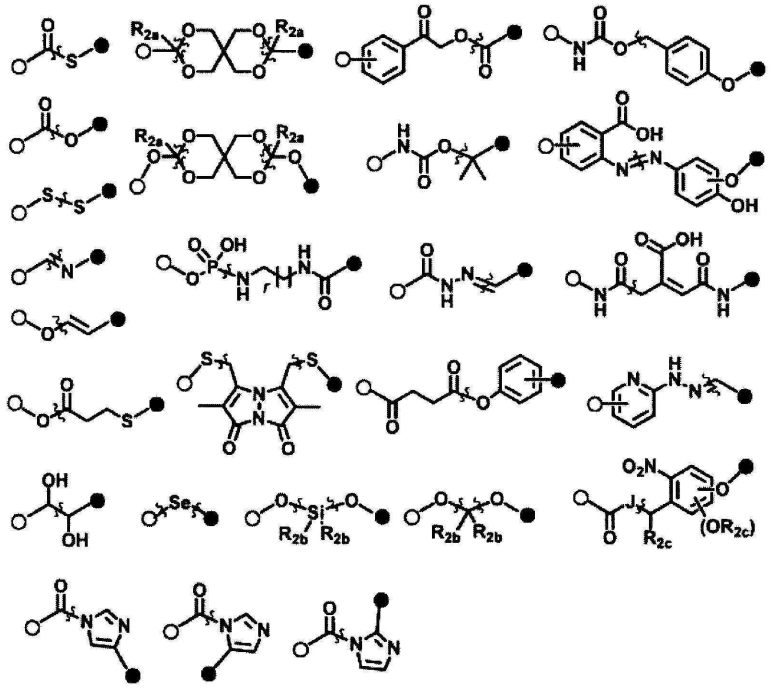
위로서는, 예를 들면, 에스테르 잔기, 포스포디에스테르 잔기, 글리코실 잔기를 들 수 있다.

[1596] 광에 의해 절단 가능한 부위로서는, 예를 들면, 2-니트로벤질 잔기, 페나실에스테르 잔기, 8-퀴놀린벤젠술포네이트 잔기, 쿠마린 잔기, 포스포트리에스테르 잔기, 비스아릴하이드라존 잔기, 비만디티오프로피온산 잔기를 들 수 있다.

[1597] 자기분해성의 절단성 부분으로서는, 예를 들면, 활성화 에스테르 잔기(예, N-하이드록시숙신이미드 잔기)를 들 수 있다.

[1598] 더 구체적으로는, 절단성 부분은 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하고 있어도 좋다.

[1599] [화 30]



[1600]

[1601] 〔여기서, 결합에 직교하는 파선은 절단 부위를 나타내고,

[1602] 복수의 R_{2a}, 복수의 R_{2b}, 및 복수의 R_{2c}는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 후술하는 치환기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고,

[1603] J는 $-CH_2-$, -O-, 또는 -S-이고,

[1604] r은 1 내지 4의 임의의 정수이고,

[1605] ○(흰 환형)은 A(또는 후술하는 La)에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 B(또는 후술하는 Lb)에 대한 결합을 나타낸다.

[1606] 화학 구조가 절단 부위를 중심으로 하여 비대칭인 경우, ●이 A(또는 후술하는 La)에 대한 결합을 나타내고, ○이 B(또는 후술하는 Lb)에 대한 결합을 나타내고 있어도 좋다〕

[1607] J는 $-CH_2-$, -O-, 또는 -S-이다. j는, 바람직하게는 $-CH_2-$ 또는 -O-이고, 보다 바람직하게는 $-CH_2-$이다.

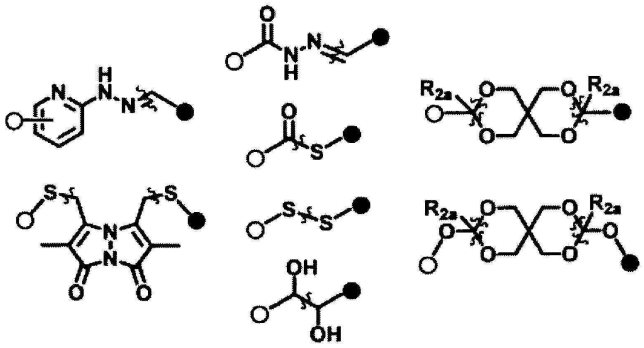
[1608] r은 1 내지 4의 임의의 정수이고, 바람직하게는 1 내지 3의 임의의 정수이고, 보다 바람직하게는 1 또는 2이다.

[1609] 일 실시형태에서는, 절단성 링커는 (i) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커, 또는 (ii) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖지 않는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커라도 좋다.

[1610] (i)의 절단성 부분으로서는, 예를 들면, 디술피드 잔기, 에스테르 잔기, 아세탈 잔기, 케탈 잔기, 이민 잔기, 비시날디올 잔기를 들 수 있다.

[1611] 더 구체적으로는, (i)의 절단성 부분은, 예를 들면, 이하:

[1612] [화 31]



[1613]

[1614] [여기서, 결합에 직교하는 파선은 절단 부위를 나타내고,

[1615] 복수의 R_{2a}는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 후술하는 치환기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고,

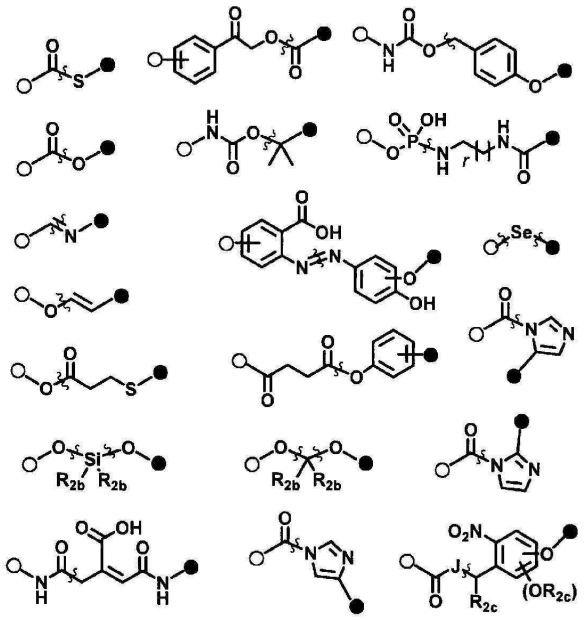
[1616] ○(흰 환형)은 A(또는 후술하는 La)에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 B(또는 후술하는 Lb)에 대한 결합을 나타낸다.

[1617] 화학 구조가 절단 부위를 중심으로 하여 비대칭인 경우, ●이 A(또는 후술하는 La)에 대한 결합을 나타내고, ○이 B(또는 후술하는 Lb)에 대한 결합을 나타내고 있어도 좋다.] 로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하고 있어도 좋다.

[1618] (ii)의 절단성 부분으로서는, 예를 들면, 에스테르 잔기, 카르바모일 잔기, 알콕시알킬 잔기, 이민 잔기, 3급 알킬옥시카르바메이트 잔기, 실란 잔기, 하이드라존 함유 잔기, 포스포르아미데이트 잔기, 아코니틸 잔기, 트리틸 잔기, 아조 잔기, 비시날디올 잔기, 셀렌 잔기, 전자 흡인기를 갖는 방향족환 함유 잔기, 쿠마린 함유 잔기, 술폰 함유 잔기, 불포화 결합 함유 쇄 잔기, 글리코실 잔기를 들 수 있다.

[1619] 더 구체적으로는, (ii)의 절단성 부분은, 예를 들면, 이하:

[1620] [화 32]



[1621]

[1622] [여기서, 결합에 직교하는 파선은 절단 부위를 나타내고,

[1623] 복수의 R_{2b}, 복수의 R_{2c}, J, r은 수소 원자, 또는 후술하는 치환기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고,

[1624] ○(흰 환형)은 A(또는 후술하는 La)에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 B(또는 후술하는 Lb)에 대한 결

합을 나타낸다.

[1625] 화학 구조가 절단 부위를 중심으로 하여 비대칭인 경우, ●이 A(또는 후술하는 La)에 대한 결합을 나타내고, ○이 B(또는 후술하는 Lb)에 대한 결합을 나타내고 있어도 좋다.〕로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하고 있어도 좋다.

[1626] 특정한 실시형태에서는, 절단성 링커(L)는 하기 식 (L1) 내지 (L3) 중 어느 하나로 표시되어도 좋다:

[1627] La-C-Lb (L1)

[1628] La-C (L2)

[1629] C-Lb (L3)

[1630] 〔식 중,

[1631] La 및 Lb는 각각 2가의 기이고,

[1632] c는 절단성 부분〕

[1633] 2가의 기로서는, 예를 들면, 치환기를 갖고 있어도 좋은 2가의 탄화수소기, 치환기를 갖고 있어도 좋은 2가의 복소환기, -C(=O)-, -NR_a-(R_a는 수소 원자, 또는 치환기를 나타낸다), -O-, -S-, -C(=S)-, 및 이들 2 이상(예를 들면 2 내지 8, 바람직하게는 2 내지 6, 보다 바람직하게는 2 내지 4)의 조합으로 이루어지는 기를 들 수 있다.

[1634] 2가의 탄화수소기로서는, 직쇄, 분기쇄, 또는 환상의 2가의 탄화수소기이고, 바람직하게는 직쇄 또는 분기쇄의 2가의 탄화수소기이다. 2가의 탄화수소기로서는, 예를 들면, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 아릴렌을 들 수 있다.

[1635] 알킬렌으로서는, 탄소원자수 1 내지 12의 알킬렌이 바람직하고, 탄소원자수 1 내지 6의 알킬렌이 보다 바람직하고, 탄소원자수 1 내지 4의 알킬렌이 특히 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 알킬렌은 직쇄, 분기쇄, 또는 환상 중 어느 하나라도 좋지만, 직쇄의 알킬렌이 바람직하다. 이러한 알킬렌으로서는, 예를 들면, 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 부틸렌, 펜틸렌, 헥실렌을 들 수 있다.

[1636] 알케닐렌으로서는, 탄소원자수 2 내지 12의 알케닐렌이 바람직하고, 탄소원자수 2 내지 6의 알케닐렌이 보다 바람직하고, 탄소원자수 2 내지 4의 알케닐렌이 특히 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 알케닐렌은 직쇄, 분기쇄, 또는 환상 중 어느 하나라도 좋지만, 직쇄의 알케닐렌이 바람직하다. 이러한 알케닐렌으로서는, 예를 들면, 에틸레닐렌, 프로피닐렌, 부테닐렌, 펜테닐렌, 헥세닐렌을 들 수 있다.

[1637] 알키닐렌으로서는, 탄소원자수 2 내지 12의 알키닐렌이 바람직하고, 탄소원자수 2 내지 6의 알키닐렌이 보다 바람직하고, 탄소원자수 2 내지 4의 알키닐렌이 특히 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 알키닐렌은 직쇄, 분기쇄, 또는 환상 중 어느 하나라도 좋지만, 직쇄의 알키닐렌이 바람직하다. 이러한 알키닐렌으로서는, 예를 들면, 에티닐렌, 프로피닐렌, 부티닐렌, 펜티닐렌, 헥시닐렌을 들 수 있다.

[1638] 아릴렌으로서는, 탄소원자수 6 내지 24의 아릴렌이 바람직하고, 탄소원자수 6 내지 18의 아릴렌이 보다 바람직하고, 탄소원자수 6 내지 14의 아릴렌이 더욱 바람직하고, 탄소원자수 6 내지 10의 아릴렌이 더욱더 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 아릴렌으로서는, 예를 들면, 페닐렌, 나프틸렌, 안트라세닐렌을 들 수 있다.

[1639] 2가의 복소환기는 2가의 방향족 복소환기, 또는 2가의 비방향족 복소환기이다. 복소환을 구성하는 헤테로 원자로서, 산소 원자, 유황 원자, 질소 원자, 인 원자, 붕소 원자 및 규소 원자로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것이 바람직하고, 산소 원자, 유황 원자 및 질소 원자로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것이 보다 바람직하다.

[1640] 2가의 방향족 복소환기로서는, 탄소원자수 3 내지 21의 2가의 방향족 복소환기가 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 15의 2가의 방향족 복소환기가 보다 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 9의 2가의 방향족 복소환기가 더욱 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 6의 2가의 방향족 복소환기가 더욱더 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 더 구체적으로는, 2가의 방향족 복소환기로서는, 예를 들면, 피렌디일, 피롤디일, 푸란디일, 티오펜디일, 피리딘디일, 피리다진디일, 피리미딘디일, 피라진디일, 트리아진디일, 피롤린

디일, 피페리딘디일, 트리아졸디일, 푸린디일, 안트라퀴논디일, 카르바졸디일, 플루오렌디일, 퀴놀린디일, 및 이소퀴놀린디일을 들 수 있다.

[1641] 2가의 비방향족 복소환기로서는, 탄소원자수 3 내지 21의 비방향족 복소환기가 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 15의 비방향족 복소환기가 보다 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 9의 비방향족 복소환기가 더욱 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 6의 비방향족 복소환기가 더욱더 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 더 구체적으로는, 2가의 비방향족 복소환기로서는, 예를 들면, 피롤디온디일, 피롤린디온디일, 옥시란디일, 아지리딘디일, 아제티딘디일, 옥세탄디일, 티에탄디일, 피롤리딘디일, 디하이드로퓨란디일, 테트라하이드로퓨란디일, 디옥소란디일, 테트라하이드로티오펜디일, 이미다졸리딘디일, 옥사졸리딘디일, 피페리딘디일, 디하이드로피란디일, 테트라하이드로피란디일, 테트라하이드로티오피란디일, 모르폴린디일, 티오모르폴린디일, 피페라진디일, 디하이드로옥사진디일, 테트라하이드로옥사진디일, 디하이드로피리미딘디일, 및 테트라하이드로피리미딘디일을 들 수 있다.

[1642] La 및 Lb로 표시되는 2가의 기는, 예를 들면 1 내지 5개, 바람직하게는 1 내지 3개, 보다 바람직하게는 1 또는 2개의 치환기를 갖고 있어도 좋다. 이러한 치환기는 상기 R_a 및 R_b로 표시되는 치환기와 동일하다. 이러한 치환기로서는, 예를 들면, 이하가 들 수 있다:

[1643] (i) 할로겐 원자;

[1644] (ii) 1가의 탄화수소기;

[1645] (iii) 아르알킬;

[1646] (iv) 1가의 복소환기;

[1647] (v) R_c-O-, R_c-C(=O)-, R_c-O-C(=O)-, 또는 R_c-C(=O)-O-(R_c는 수소 원자, 또는 1가의 탄화수소기를 나타낸다); 또는

[1648] (vi) NR_dR_e-, NR_dR_e-C(=O)-, NR_dR_e-C(=O)-O-, 또는 R_d-C(=O)-NR_e-(R_d 및 R_e는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 1가의 탄화수소기를 나타낸다);

[1649] (vii) 니트로기, 황산기, 술폰산기, 시아노기, 및 카르복실기.

[1650] 할로겐 원자로서는, 예를 들면, 불소 원자, 염소 원자, 브롬 원자, 요오드 원자를 들 수 있다.

[1651] 1가의 탄화수소기로서는, 예를 들면, 1가의 쇄상 탄화수소기, 1가의 지환식 탄화수소기, 및 1가의 방향족 탄화수소기를 들 수 있다.

[1652] 1가의 쇄상 탄화수소기란, 쇄상 구조만으로 구성된 탄화수소기를 의미하고, 주쇄에 환상 구조를 포함하지 않는다. 다만, 쇄상 구조는 직쇄상이라도 분기상이라도 좋다. 1가의 쇄상 탄화수소기로서는, 예를 들면, 알킬, 알케닐, 알키닐을 들 수 있다. 알킬, 알케닐 및 알키닐은 직쇄상, 또는 분기상 중 어느 하나라도 좋다.

[1653] 알킬로서는, 탄소원자수 1 내지 12의 알킬이 바람직하고, 탄소원자수 1 내지 6의 알킬이 보다 바람직하고, 탄소원자수 1 내지 4의 알킬이 더욱 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 탄소원자수 1 내지 12의 알킬로서는, 예를 들면, 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, s-부틸, 이소부틸, t-부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 도데실을 들 수 있다.

[1654] 알케닐로서는, 탄소원자수 2 내지 12의 알케닐이 바람직하고, 탄소원자수 2 내지 6의 알케닐이 보다 바람직하고, 탄소원자수 2 내지 4의 알케닐이 더욱 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 탄소원자수 2 내지 12의 알케닐로서는, 예를 들면, 비닐, 프로페닐, n-부테닐을 들 수 있다.

[1655] 알키닐로서는, 탄소원자수 2 내지 12의 알키닐이 바람직하고, 탄소원자수 2 내지 6의 알키닐이 보다 바람직하고, 탄소원자수 2 내지 4의 알키닐이 더욱 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 탄소원자수 2 내지 12의 알키닐로서는, 예를 들면, 에티닐, 프로피닐, n-부티닐을 들 수 있다.

[1656] 1가의 쇄상 탄화수소기로서는 알킬이 바람직하다.

[1657] 1가의 지환식 탄화수소기란, 환 구조로서 지환식 탄화수소만을 포함하고, 방향족환를 포함하지 않는 탄화수소기를 의미하고, 지환식 탄화수소는 단환, 다환 중 어느 하나라도 좋다. 다만, 지환식 탄화수소만으로 구성되어 있을 필요는 없고, 그 일부에 쇄상 구조를 포함하고 있어도 좋다. 1가의 지환식 탄화수소기로서는, 예를 들면,

사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐을 들 수 있고, 이들은 단환, 다환 중 어느 하나라도 좋다.

[1658] 사이클로알킬로서는, 탄소원자수 3 내지 12의 사이클로알킬이 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 6의 사이클로알킬이 보다 바람직하고, 탄소원자수 5 내지 6의 사이클로알킬이 더욱 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 탄소원자수 3 내지 12의 사이클로알킬로서는, 예를 들면, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실을 들 수 있다.

[1659] 사이클로알케닐로서는, 탄소원자수 3 내지 12의 사이클로알케닐이 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 6의 사이클로알케닐이 보다 바람직하고, 탄소원자수 5 내지 6의 사이클로알케닐이 더욱 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 탄소원자수 3 내지 12의 사이클로알케닐로서는, 예를 들면, 사이클로프로페닐, 사이클로부테닐, 사이클로펜테닐, 사이클로헥세닐을 들 수 있다.

[1660] 사이클로알키닐로서는, 탄소원자수 3 내지 12의 사이클로알키닐이 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 6의 사이클로알키닐이 보다 바람직하고, 탄소원자수 5 내지 6의 사이클로알키닐이 더욱 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 탄소원자수 3 내지 12의 사이클로알키닐로서는, 예를 들면, 사이클로프로피닐, 사이클로부티닐, 사이클로펜티닐, 사이클로헥시닐을 들 수 있다.

[1661] 1가의 지환식 탄화수소기로서는 사이클로알킬이 바람직하다.

[1662] 1가의 방향족 탄화수소기란, 방향족환 구조를 포함하는 탄화수소기를 의미한다. 다만, 방향족환만으로 구성되어 있을 필요는 없고, 그 일부에 쇄상 구조나 지환식 탄화수소를 포함하고 있어도 좋고, 방향족환는 단환, 다환 중 어느 하나라도 좋다. 1가의 방향족 탄화수소기로서는, 탄소원자수 6 내지 12의 아릴이 바람직하고, 탄소원자수 6 내지 10의 아릴이 보다 바람직하고, 탄소원자수 6의 아릴이 더욱 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 탄소원자수 6 내지 12의 아릴로서는, 예를 들면, 페닐, 나프틸을 들 수 있다.

[1663] 1가의 방향족 탄화수소기로서는 페닐이 바람직하다.

[1664] 이들 중에서도, 1가의 탄화수소기로서는 알킬, 사이클로알킬, 아릴이 바람직하고, 알킬이 보다 바람직하다.

[1665] 아르알킬이란, 아릴알킬을 말한다. 아릴알킬에서의 아릴 및 알킬의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다. 아르알킬로서는, 탄소원자수 3 내지 15의 아르알킬이 바람직하다. 이러한 아르알킬로서는, 예를 들면, 벤조일, 페네틸, 나프틸메틸, 나프틸에틸을 들 수 있다.

[1666] 1가의 복소환기란, 복소환식 화합물의 복소환에서 수소 원자 1개를 제외한 기를 말한다. 1가의 복소환기는 1가의 방향족 복소환기, 또는 1가의 비방향족 복소환기이다. 복소환기를 구성하는 헤테로 원자로서, 산소 원자, 유황 원자, 질소 원자, 인 원자, 붕소 원자 및 규소 원자로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것이 바람직하고, 산소 원자, 유황 원자 및 질소 원자로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 것이 보다 바람직하다.

[1667] 1가의 방향족 복소환기로서는, 탄소원자수 3 내지 15의 방향족 복소환기가 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 9의 방향족 복소환기가 보다 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 6의 방향족 복소환기가 더욱 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 1가의 방향족 복소환기로서는, 예를 들면, 피레닐, 피롤릴, 푸라닐, 티오페닐, 피리디닐, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 트리아지닐, 피롤리닐, 피페리디닐, 트리아조닐, 푸리닐, 카르바조닐, 플루오레닐, 퀴놀리닐, 및 이소퀴놀리닐을 들 수 있다.

[1668] 1가의 비방향족 복소환기로서는, 탄소원자수 3 내지 15의 비방향족 복소환기가 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 9의 비방향족 복소환기가 보다 바람직하고, 탄소원자수 3 내지 6의 비방향족 복소환기가 더욱 바람직하다. 상기 탄소원자수에 치환기의 탄소원자수는 포함되지 않는다. 1가의 비방향족 복소환기로서는, 예를 들면, 옥시라닐, 아지리디닐, 아제티디닐, 옥세타닐, 티에타닐, 피롤리디닐, 디하이드로푸라닐, 테트라하이드로푸라닐, 디옥솔라닐, 테트라하이드로티오페닐, 이미다졸리디닐, 옥사졸리디닐, 피페리디닐, 디하이드로피라닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로티오피라닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 피페라지닐, 디하이드로옥사지닐, 테트라하이드로옥사지닐, 디하이드로피리미디닐, 및 테트라하이드로피리미디닐을 들 수 있다.

[1669] 이들 중에서도, 1가의 복소환기로서는 5원 또는 6원의 복소환기가 바람직하다.

[1670] 바람직하게는, 치환기는 이하라도 좋다:

[1671] (i') 할로겐 원자;

[1672] (ii') 탄소원자수 1 내지 12의 알킬, 페닐, 또는 나프틸;

[1673] (iii') 탄소원자수 3 내지 15의 아르알킬;

[1674] (iv') 5원 또는 6원의 복소환;

[1675] (v') R_c-O-, R_c-C(=O)-, R_c-O-C(=O)-, 또는 R_c-C(=O)-O-(R_c는 수소 원자, 또는 탄소원자수 1 내지 12의 알킬을 나타낸다); 또는

[1676] (vi') NR_dR_e-, NR_dR_e-C(=O)-, NR_dR_e-C(=O)-O-, 또는 R_d-C(=O)-NR_e-(R_d 및 R_e는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 탄소원자수 1 내지 12의 알킬을 나타낸다);

[1677] (vii') 상기(vii)에서 열거한 것과 같은 기.

[1678] 보다 바람직하게는, 치환기는 이하라도 좋다:

[1679] (i'') 할로겐 원자;

[1680] (ii'') 탄소원자수 1 내지 12의 알킬;

[1681] (iii'') R_c-O-, R_c-C(=O)-, R_c-O-C(=O)-, 또는 R_c-C(=O)-O-(R_c는 수소 원자, 또는 탄소원자수 1 내지 12의 알킬을 나타낸다); 또는

[1682] (iv'') NR_dR_e-, NR_dR_e-C(=O)-, NR_dR_e-C(=O)-O-, 또는 R_d-C(=O)-NR_e-(R_d 및 R_e는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 탄소원자수 1 내지 12의 알킬을 나타낸다);

[1683] (v'') 상기(vii)에서 열거한 것과 같은 기.

[1684] 더욱더 바람직하게는, 치환기는 이하라도 좋다:

[1685] (i''') 할로겐 원자;

[1686] (ii''') 탄소원자수 1 내지 6의 알킬;

[1687] (iii''') R_c-O-, R_c-C(=O)-, R_c-O-C(=O)-, 또는 R_c-C(=O)-O-(R_c는 수소 원자, 또는 탄소원자수 1 내지 6의 알킬을 나타낸다); 또는

[1688] (iv''') NR_dR_e-, NR_dR_e-C(=O)-, NR_dR_e-C(=O)-O-, 또는 R_d-C(=O)-NR_e-(R_d 및 R_e는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 탄소원자수 1 내지 6의 알킬을 나타낸다);

[1689] (v''') 상기(vii)에서 열거한 것과 같은 기.

[1690] 특히 바람직하게는, 치환기는 이하라도 좋다:

[1691] (i'''') 할로겐 원자;

[1692] (ii'''') 탄소원자수 1 내지 4의 알킬;

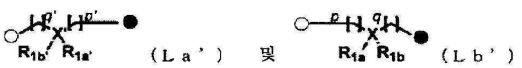
[1693] (iii'''') R_c-O-, R_c-C(=O)-, R_c-O-C(=O)-, 또는 R_c-C(=O)-O-(R_c는 수소 원자, 또는 탄소원자수 1 내지 4의 알킬을 나타낸다); 또는

[1694] (iv'''') NR_dR_e-, NR_dR_e-C(=O)-, NR_dR_e-C(=O)-O-, 또는 R_d-C(=O)-NR_e-(R_d 및 R_e는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 탄소원자수 1 내지 4의 알킬을 나타낸다);

[1695] (v'''') 상기(vii)에서 열거한 것과 같은 기.

[1696] 특정한 실시형태에서는, La 및 Lb는 각각 하기 (La') 및 (Lb'):

[1697] [화 33]

[1698]  (La') 및 (Lb')

[1699] [식 중,

[1700] p 및 p’ 는 동일 또는 상이하며, 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[1701] q 및 q’ 는 동일 또는 상이하며, 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[1702] X 및 X’ 는 동일 또는 상이하며, 탄소 원자, 질소 원자, 또는 단결합(여기서, X가 질소 원자인 경우, R_{1b}는 존재하지 않고, X’ 가 질소 원자인 경우, $R_{1b'}$ 는 존재하지 않는다. X가 단결합인 경우, R_{1a} 및 R_{1b}는 존재하지 않고, X’ 가 단결합인 경우, $R_{1a'}$ 및 $R_{1b'}$ 는 존재하지 않는다)이고,

[1703] R_{1a}, R_{1b}, $R_{1a'}$ 및 $R_{1b'}$ 는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 상술한 치환기로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다] 로 표시되어도 좋다.

[1704] p 및 p’ 는 동일 또는 상이하며, 0 내지 10의 임의의 정수이고, 바람직하게는 0 내지 8의 정수이고, 보다 바람직하게는 0 내지 6의 정수이고, 더욱더 바람직하게는 0 내지 4의 정수이고, 특히 바람직하게는 0, 1 또는 2이다. 바람직하게는 p 및 p’ 는 동일하다.

[1705] q 및 q’ 는 동일 또는 상이하며, 0 내지 10의 임의의 정수이고, 바람직하게는 0 내지 8의 정수이고, 보다 바람직하게는 0 내지 6의 정수이고, 더욱더 바람직하게는 0 내지 4의 정수이고, 특히 바람직하게는 0, 1 또는 2이다. 바람직하게는 q 및 q’ 는 동일하다.

[1706] X 및 X’ 는 동일 또는 상이하며, 탄소 원자, 질소 원자, 또는 단결합이고, 바람직하게는 탄소 원자 또는 단결합이다. 바람직하게는 X 및 X’ 는 동일하다.

[1707] R_{1a}, R_{1b}, $R_{1a'}$ 및 $R_{1b'}$ 는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 후술하는 치환기로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다. 치환기의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다. 바람직하게는 R_{1a}, R_{1b}, $R_{1a'}$ 및 $R_{1b'}$ 는 수소 원자이다.

[1708] 1-4. (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기(B)

[1709] 식 (I)에 있어서, B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이다.

[1710] 생체 직교성 관능기란, 생체 구성 성분(예, 아미노산, 핵산, 지질, 당, 인산)과는 반응하지 않는, 또는 생체 구성 성분에 대한 반응의 속도가 느리지만, 생체 구성 성분 이외의 성분에 대하여 선택적으로 반응하는 기를 말한다. 생체 직교성 관능기는 당해 기술분야에 있어서 잘 알려져 있다(예, Sharpless K. B. et al., Angew. Chem. Int. Ed. 40, 2004(2015); Bertozzi C. R. et al., Science 291, 2357(2001); Bertozzi C. R. et al., Nature Chemical Biology 1, 13(2005)을 참조).

[1711] 친화성 물질의 표적이 가용성 단백질인 경우, 생체 직교성 관능기는 단백질에 대한 생체 직교성 관능기이다. 단백질에 대한 생체 직교성 관능기란, 단백질을 구성하는 천연의 20종의 아미노산 잔기의 측쇄와 반응하지 않고, 소정의 관능기와 반응하는 기이다. 단백질을 구성하는 천연의 20종의 아미노산은 알라닌(A), 아스파라긴(N), 시스테인(C), 글루타민(Q), 글리신(G), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 프롤린(P), 세린(S), 트레오닌(T), 트립토판(W), 티로신(Y), 발린(V), 아스파라긴산(D), 글루타민산(E), 아르기닌(R), 히스티딘(H), 및 리신(L)이다. 이들 천연의 20종의 아미노산 중, 측쇄가 없는(즉, 수소 원자) 글리신, 및 측쇄가 탄화수소기인(즉, 유황 원자, 질소 원자, 및 산소 원자로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 헤테로 원자를 측쇄에 포함하지 않는) 알라닌, 이소류신, 류신, 페닐알라닌, 및 발린은 통상의 반응에 대하여 불활성이다. 따라서, 단백질에 대한 생체 직교성 관능기는, 통상의 반응에 대하여 불활성인 측쇄를 갖는 이들 아미노산의 측쇄에 더하여, 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 아스파라긴산, 글루타민산, 아르기닌, 히스티딘, 및 리신의 측쇄에 대하여도 반응할 수 없는 관능기이다.

[1712] 단백질에 대하여 반응할 수 없는 이러한 생체 직교성 관능기로서는, 예를 들면, 아지드 잔기, 알데히드 잔기, 티올 잔기, 알켄 잔기(환언하면, 탄소 원자간 이중결합을 갖는 최소 단위인 비닐렌(에테닐렌) 부분을 갖고 있으면 좋다. 이하 동일), 알킨 잔기(환언하면, 탄소 원자간 삼중결합을 갖는 최소 단위인 에티닐렌 부분을 갖고 있으면 좋다. 이하 동일), 할로겐 잔기, 테트라진 잔기, 니트론 잔기, 하이드록실아민 잔기, 니트릴 잔기, 히드라진 잔기, 케톤 잔기, 보론산 잔기, 시아노벤조티아졸 잔기, 알릴 잔기, 포스핀 잔기, 말레이미드 잔기, 디술피드 잔기, 티오에스테르기, α-할로카르보닐 잔기(예, α 위치에 불소 원자, 염소 원자, 브롬 원자 또는 요오드 원자를 갖는 카르보닐 잔기. 이하 동일), 이소니트릴 잔기, 시드논 잔기, 셀렌 잔기를 들 수 있다. 단백

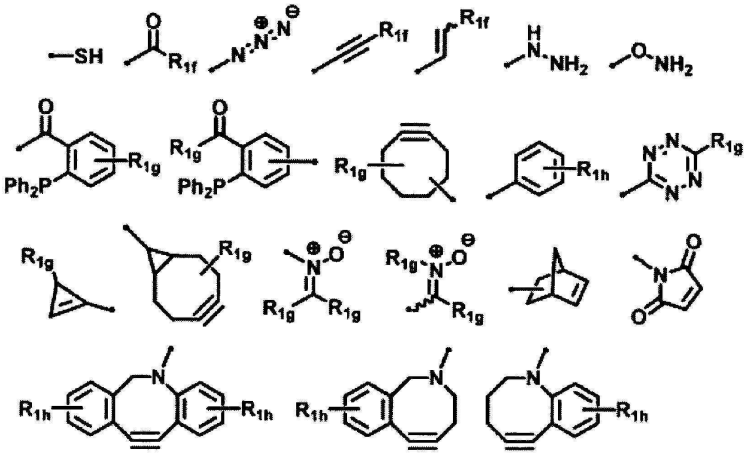
질로서는, 유리(遊離)의 티올(시스테인)을 포함할 수 있는 단백질(예, 항체 이외의 단백질), 및 유리의 티올을 포함할 수 없는 단백질(예, 항체)이 존재한다. 유리의 티올을 포함할 수 없는 단백질에서는 티올이 생체 직교성 관능기로서 기능한다. 따라서, 친화성 물질의 표적인 가용성 단백질이 유리의 티올을 포함할 수 없는 단백질(예, 항체)인 경우, 생체 직교성 관능기에는 티올이 포함되는 것이 바람직하다. 또한, 가용성 단백질이 유리의 티올을 포함할 수 있는 단백질(예, 항체 이외의 단백질)인 경우, 생체 직교성 관능기에는 티올이 포함되지 않은 것이 바람직하다. 1종 또는 2종 이상(예, 2종, 3종, 4종)의 생체 직교성 관능기가 2가의 기에 포함되어 있어도 좋지만, 바람직하게는, 1종의 생체 직교성 관능기가 2가의 기에 포함되어 있어도 좋다.

[1713] 일 실시형태에서는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기는 아지드 잔기, 알데히드기, 티올 잔기, 알킨 잔기, 알켄 잔기, 테트라진 잔기, 니트론 잔기, 하이드록실아민 잔기, 니트릴 잔기, 히드라진 잔기, 케톤 잔기, 보론산 잔기, 시아노벤조티아졸 잔기, 알릴 잔기, 포스핀 잔기, 말레이미드 잔기, 디술피드 잔기, 티오에스테르기, α-할로카르보닐 잔기, 이소니트릴 잔기, 시드논 잔기, 셀렌 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 생체 직교성 관능기를 주쇄에 포함하는 2가의 기라도 좋다.

[1714] 다른 실시형태에서는, 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기는 아지드 잔기, 알데히드 잔기, 티올 잔기, 알킨 잔기, 알켄 잔기, 할로겐 잔기, 테트라진 잔기, 니트론 잔기, 하이드록실아민 잔기, 니트릴 잔기, 히드라진 잔기, 케톤 잔기, 보론산 잔기, 시아노벤조티아졸 잔기, 알릴 잔기, 포스핀 잔기, 말레이미드 잔기, 디술피드 잔기, α-할로카르보닐 잔기, 이소니트릴 잔기, 시드논 잔기, 셀렌 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 생체 직교성 관능기를 측쇄에 포함하는 2가의 기라도 좋다.

[1715] 더 구체적으로는, 생체 직교성 관능기는 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하고 있어도 좋다.

[1716] [화 34]

[1717] 

[1718] 〔식 중,

[1719] R_{1f}, 단일 또는 복수의 R_{1g} 및 단일 또는 복수의 R_{1h}는 동일 또는 상이하며, 상기 (i) 내지 (vii)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 원자 또는 기, 또는 전자 흡인기이고,

[1720] ·은 결합수이다)

[1721] 전자 흡인기로서는, 예를 들면, 상술한 것을 들 수 있지만, 할로겐 원자, 보론산 잔기, 메실, 토실, 트리플레이트가 바람직하다.

[1722] 일 실시형태에서는, B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기라도 좋다. 2가의 기에 포함되는 생체 직교성 관능기의 수는 단일 또는 복수이며, 예를 들면 1 내지 5, 바람직하게는 1 내지 3, 보다 바람직하게는 1 또는 2, 더욱더 바람직하게는 1이다. 2가의 기에 포함되는 생체 직교성 관능기의 수가 복수인 경우, 복수의 생체 직교성 관능기는 동종이라도 이종이라도 좋지만, 단순한 구조의 채용 등의 관점에서는 동종인 것이 바람직하다.

[1723] 특정한 실시형태에서는, B는 (a1) 생체 직교성 관능기를 주쇄에 포함하는 2가의 기라도 좋다. 생체 직교성 관능기를 주쇄에 포함하는 2가의 기는 아지드 잔기, 알데히드기, 티올 잔기, 알킨 잔기, 알켄 잔기, 테트라진 잔기, 니트론 잔기, 하이드록실아민 잔기, 니트릴 잔기, 히드라진 잔기, 케톤 잔기, 보론산 잔기, 시아노벤조티아

졸 잔기, 알릴 잔기, 포스핀 잔기, 말레이미드 잔기, 디술피드 잔기, 티오에스테르기, α-할로카르보닐 잔기, 이소니트릴 잔기, 시드논 잔기, 셀렌 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 생체 직교성 관능기 자체를 2가의 기로 하는 것, 또는 이러한 2가의 생체 직교성 관능기의 어느 한쪽의 말단 또는 양단에 상기한 2가의 기가 연결되어 있는 기이다. 연결되어야 할 2가의 기의 정의, 예 및 바람직한 예는 상기한 2가의 기와 동일하다.

[1724] 다른 특정한 실시형태에서는, B는 (a2) 생체 직교성 관능기를 측쇄에 포함하는 2가의 기라도 좋다. 생체 직교성 관능기를 측쇄에 포함하는 2가의 기는 아지드 잔기, 알데히드 잔기, 티올 잔기, 알킨 잔기, 알켄 잔기, 할로겐 잔기, 테트라진 잔기, 니트론 잔기, 하이드록실아민 잔기, 니트릴 잔기, 히드라진 잔기, 케톤 잔기, 보론산 잔기, 시아노벤조티아졸 잔기, 알릴 잔기, 포스핀 잔기, 말레이미드 잔기, 디술피드 잔기, α-할로카르보닐 잔기, 이소니트릴 잔기, 시드논 잔기, 셀렌 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 생체 직교성 관능기 또는 그것을 포함하는 기로 치환된 2가의 기이다. 치환되어야 할 2가의 기의 정의, 예 및 바람직한 예는 상기한 2가의 기와 동일하다.

[1725] 다른 실시형태에서는, B는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기라도 좋다. 이러한 2가의 기는 치환되어 있어도 좋은 알킬렌, 치환되어 있어도 좋은 사이클로알킬렌, 치환되어 있어도 좋은 아릴, 치환되어 있어도 좋은 2가의 복소환기, $-NR_a-$(R_a는 수소 원자, 또는 치환기를 나타낸다), -O-, 및 이들 2 이상의 조합(예를 들면 2 내지 8, 바람직하게는 2 내지 6, 보다 바람직하게는 2 내지 4)으로 이루어지는 기라도 좋다. 치환되어 있어도 좋은 경우의 치환기, 및 R_a의 치환기는 생체 직교성 관능기 이외의 치환기이다. 이러한 치환기로서는, 예를 들면, 알킬, 사이클로알킬, 아르알킬, 1가의 복소환기, 하이드록실, 아미노, 알킬옥시(알콕시), 사이클로알킬옥시, 아르알킬옥시를 들 수 있다. 이러한 치환기의 수는, 예를 들면 1 내지 5개, 바람직하게는 1 내지 3개, 보다 바람직하게는 1 또는 2개, 더욱더 바람직하게는 1개이다.

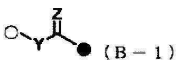
[1726] 생체 직교성 관능기 이외의 치환기에 대하여, 알킬, 사이클로알킬, 아르알킬, 1가의 복소환기의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다.

[1727] 생체 직교성 관능기 이외의 치환기에 대하여, 알킬옥시(알콕시)에서의 알킬, 사이클로알킬옥시에서의 사이클로알킬, 및 아르알킬옥시에서의 아르알킬의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다. 더 구체적으로는, 알킬옥시로서는, 예를 들면, 메틸옥시, 에틸옥시, 프로필옥시(예, n-프로필옥시, iso-프로필옥시), 부틸옥시(예, n-부틸옥시, iso-부틸옥시, sec-부틸옥시, tert-부틸옥시), 펜틸옥시(예, n-펜틸옥시), 헥실옥시(예, n-헥실옥시)를 들 수 있다. 사이클로알킬옥시로서는, 예를 들면, 사이클로프로필옥시, 사이클로부틸옥시, 사이클로펜틸옥시, 사이클로헥실옥시를 들 수 있다. 아르알킬옥시로서는, 예를 들면, 벤조일옥시, 페네틸옥시, 나프틸메틸옥시, 나프틸에틸옥시를 들 수 있다.

[1728] 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기는 또한, 반응에 대하여 고도로 불활성한 기라도 좋다. 따라서, 이러한 2가의 기는 탄소 원자 및 수소 원자만으로 구성되는 기라도 좋다. 이러한 2가의 기는 알킬렌, 사이클로알킬렌, 또는 아릴, 및 이들 2 이상의 조합(예를 들면 2 또는 3)이다. 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기가 반응에 대하여 고도로 불활성한 기인 경우, 이러한 2가의 기는 반응에 대하여 고도로 불활성한 치환기로서, 알킬렌, 사이클로알킬렌, 및 아릴로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 치환기를 갖고 있어도 좋다. 반응에 대하여 고도로 불활성한 치환기의 수는, 예를 들면 1 내지 5개, 바람직하게는 1 내지 3개, 보다 바람직하게는 1 또는 2개이다.

[1729] 특정한 실시형태에서는, B는 하기 식 (B-1):

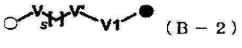
[1730] [화 35]

[1731] 

[1732] 〔식 중,

[1733] Y는 -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 하기 식 (B-2):

[1734] [화 36]

[1735] 

[1736] (식 중,

[1737] V 및 V' 는 동일 또는 상이하며, -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 단결합이고,

[1738] V1은 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[1739] s는 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[1740] 식 (B-2)에서의 ○ 및 ●은 각각, 식 (B-1)에서의 ○ 및 ●과 같은 배향이다)이고,

[1741] Z는 산소 원자, 유황 원자, 또는 수소 원자(Z가 수소 원자인 경우, -C(=Z)-은 $-CH_2-$를 나타낸다)이고,

[1742] 식 (B-1)에서의 ○(흰 환형)은 L측의 부분에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 R측의 부분에 대한 결합을 나타낸다〕로 표시되어도 좋다.

[1743] Y는 -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 상기 식 (B-2)로 표시되는 기이다. 구조의 간편화 등의 관점에서, Y는 -NH-, -O-, 또는 $-CH_2-$라도 좋다. 또는, 탄소 원자를 기조로 한 구조의 설계 등의 관점에서는, Y는 $-CH_2-$, 또는 상기 식 (B-2)로 표시되는 기라도 좋다.

[1744] Z는 산소 원자, 유황 원자, 또는 수소 원자이지만, 바람직하게는 산소 원자 또는 유황 원자이다.

[1745] V 및 V' 는 -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 단결합이고, 바람직하게는 $-CH_2-$, 또는 단결합이다.

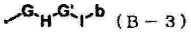
[1746] V1은 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이다. 이러한 2가의 기는 상술한 것과 같다.

[1747] 바람직하게는, V1에서의 2가의 기는 치환되어 있어도 좋은 2가의 탄화수소기, 또는 치환되어 있어도 좋은 2가의 복소환기이다. 2가의 탄화수소기의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 동일하지만, V1의 경우, 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 사이클로알킬렌, 사이클로알케닐렌, 사이클로알키닐렌, 아릴렌이 바람직하다. 예를 들면, 생체 직교성 관능기를 함유하는 부분으로 치환되어 있지 않은 경우, 알케닐렌, 알키닐렌, 사이클로알케닐렌, 사이클로알키닐렌이 바람직하다. 한편, 생체 직교성 관능기를 함유하는 부분으로 치환되어 있는 경우, 알킬렌, 사이클로알킬렌, 아릴렌이 바람직하다. 이들 기의 예 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다. 2가의 복소환기의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 동일하지만, V1의 경우, 5원 또는 6원의 복소환기가 바람직하다. 5원 또는 6원의 복소환기의 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 동일하다. 치환기의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다. V1은 (a) 생체 직교성 관능기를, 예를 들면 1 내지 5개, 바람직하게는 1 내지 3개, 보다 바람직하게는 1개 또는 2개, 더욱더 바람직하게는 1개 갖고 있어도 좋다. 2가의 기에 포함되는 생체 직교성 관능기의 수가 복수인 경우, 복수의 생체 직교성 관능기는 동종이라도 이종이라도 좋다. 단순한 구조의 채용, 및 반응성의 향상 등의 관점에서는 동종인 것이 바람직하다. 차별화된 반응의 확보 등의 관점에서는 이종인 것이 바람직하다. V1은 또한 (b) 치환기를 1 내지 5개, 바람직하게는 1 내지 3개, 보다 바람직하게는 1 또는 2개를 갖고 있어도 좋다.

[1748] s는 0 내지 10의 임의의 정수이고, 바람직하게는 0 내지 8의 정수이고, 보다 바람직하게는 0 내지 6의 정수이고, 더욱더 바람직하게는 0 내지 4의 정수이고, 특히 바람직하게는 0, 1 또는 2이다.

[1749] 또한 특정한 실시형태에서는, V1은 하기 식 (B-3):

[1750] [화 37]

[1751] 

[1752] 〔식 중,

[1753] G 및 G' 는 동일 또는 상이하며, -NH-, -O-, $-CH_2-$, 단결합, 또는 하기 식 (B-4):

[1754] [화 38]

[1755] 

[1756] (식 중,

[1757] W 및 W'는 동일 또는 상이하며, -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 단결합이고,

[1758] W1은 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[1759] t는 0 내지 10의 임의의 정수이다.

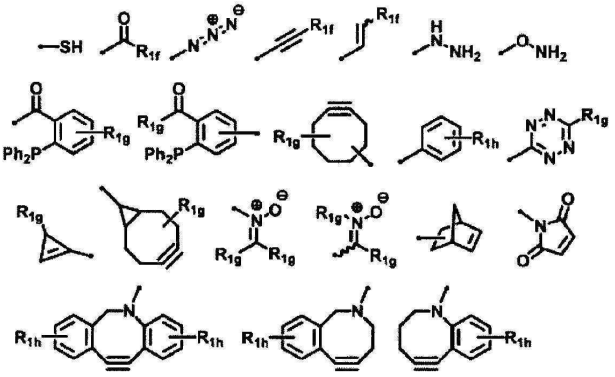
[1760] 식(B-4)에서의 ○(흰 환형)은 식(B-3)에서의 결합 수(·)의 방향에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 b측의 방향에 대한 결합을 나타낸다)로 표시되는 기이고,

[1761] H는 $-CH_2-$, -C=O-, -C=S-, -NH-, 또는 단결합이고,

[1762] I는 2가의 탄화수소기, 2가의 복소환, 또는 단결합이고,

[1763] B는 하기:

[1764] [화 39]

[1765] 

[1766] (식 중,

[1767] R_{1f}, 단일 또는 복수의 R_{1g} 및 단일 또는 복수의 R_{1h}는 동일 또는 상이하며, 상기 (i) 내지 (vii)로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 원자 또는 기, 또는 전자 흡인기이고,

[1768] ·은 결합수이다)로 표시되는 어느 하나의 기] 로 표시되는 기를 측쇄로서 갖는 2가의 기라도 좋다. 이러한 2가의 기는 2가의 탄화수소기, 또는 2가의 복소환기이고, 바람직하게는 치환되어 있어도 좋은 2가의 탄화수소기이고, 보다 바람직하게는 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 사이클로알킬렌, 사이클로알케닐렌, 사이클로알키닐렌, 또는 아릴렌이고, 더욱더 바람직하게는 알킬렌, 사이클로알킬렌, 또는 아릴렌이며, 특히 바람직하게는 알킬렌이다. 이들 기의 예 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다. 이들 기는 상기 측쇄 이외의 치환기로 치환되어 있어도 좋다. 이러한 치환기의 수는 1 내지 5개, 바람직하게는 1 내지 3개, 보다 바람직하게는 1 또는 2개이다. 치환기의 예 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다.

[1769] G 및 G'는 동일 또는 상이하며, -NH-, -O-, $-CH_2-$, 단결합, 또는 상기 식 (B-4)로 표시되는 기이다. 구조의 간편화 등의 관점에서, G 및 G'는 -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 단결합이라도 좋다. 또는, 탄소 원자를 기조로 한 구조의 설계 등의 관점에서는, G 및 G'는 $-CH_2-$, 단결합, 또는 상기 식 (B-4)로 표시되는 기라도 좋다.

[1770] H는 $-CH_2-$, -C=O-, -C=S-, -NH-, 또는 단결합이다. 바람직하게는, H는 $-CH_2-$, 또는 단결합이다.

[1771] I는 2가의 탄화수소기, 2가의 복소환, 또는 단결합이다. 2가의 탄화수소기, 및 2가의 복소환은 치환기로 치환되어 있어도, 치환되어 있지 않아도 좋다. 2가의 탄화수소기, 2가의 복소환, 및 치환기의 정의, 예 및 바람직한 예는, V1에서 상술한 것과 동일하다.

[1772] W 및 W'는 동일 또는 상이하며, -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 단결합이고, 바람직하게는 $-CH_2-$, 또는 단결합이다.

[1773] W1은 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이다. 이러한 2가의 기는 상술한 것과 동일하다.

[1774] t는 0 내지 10의 임의의 정수이고, 바람직하게는 0 내지 8의 정수이고, 보다 바람직하게는 0 내지 6의

정수이고, 더욱더 바람직하게는 0 내지 4의 정수이고, 특히 바람직하게는 0, 1 또는 2이다.

[1775] 1-5. 반응성기(R)

[1776] 식 (I)에 있어서, R은 가용성 단백질에 대한 반응성기이다. 이러한 반응성기는 당해 기술분야에 있어서 기술상식이다.

[1777] 반응성기는 생체 직교성 관능기와 동종 또는 이종의 기이다.

[1778] 예를 들면, B가, (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기인 경우, 반응성기는 그 생체 직교성 관능기와 이종의 기라도 좋다. 반응성기가 생체 직교성 관능기와 동종의 기이면, 가용성 단백질에 대한 반응성기의 반응특이성이 확보되지 않기 때문이다. 또한, 애당초 생체 직교성 관능기는 가용성 단백질을 구성하는 천연의 20종의 아미노산 잔기의 측쇄와 반응할 수 없기 때문이다.

[1779] 더 구체적으로는, 단백질을 구성하는 상술한 바와 같은 천연의 20종의 아미노산 중, 측쇄가 없는 글리신, 및 측쇄가 탄화수소기인 알라닌, 이소류신, 류신, 페닐알라닌, 및 발린은 통상의 반응에 대하여 불활성이다. 따라서, 단백질에 대한 반응성기는 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 아스파라긴산, 글루타민산, 아르기닌, 히스티딘, 및 리신으로 이루어지는 14종의 아미노산 중 어느 1종 또는 2종 이상(예, 2종, 3종, 4종)의 측쇄에 대하여 반응할 수 있는 기이다. 단백질의 아미노산 조성 등의 조건에 따라, 1종 또는 2종 이상(예, 2종, 3종, 4종)의 반응성기가 식 (I)로 표시되는 화합물에 포함되어 있어도 좋지만, 바람직하게는, 1종의 반응성기가 식 (I)로 표시되는 화합물에 포함되어 있어도 좋다.

[1780] 바람직하게는, 반응성기는 단백질을 구성하는 상술한 바와 같은 14종의 아미노산 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄와 반응할 수 있는 기이다.

[1781] 보다 바람직하게는, 반응성기는 리신, 티로신, 트립토판, 또는 시스테인 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기라도 좋다.

[1782] 더욱더 바람직하게는, 반응성기는 리신, 티로신, 또는 트립토판 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기라도 좋다.

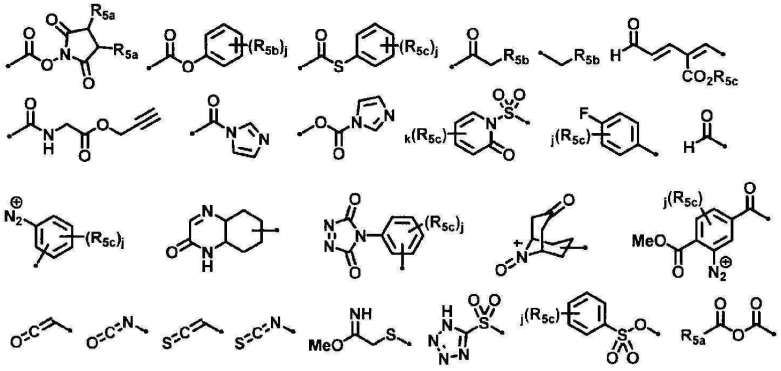
[1783] 또한, 단백질이 인간 IgG1 등의 인간 IgG인 경우, 반응성기는 리신 또는 티로신의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인 것이 바람직하다.

[1784] 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기는, 리신 잔기의 측쇄 중에 존재하는 아미노기(NH_2)와 특이적으로 반응할 수 있는 기이고, 예를 들면, 활성화 에스테르 잔기(예, N-하이드록시숙신이미드 잔기), 비닐술폰 잔기, 설포닐 클로라이드 잔기, 이소시아네이트 잔기, 이소티오시아네이트 잔기, 알데히드 잔기, 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 잔기, 2-이미노-2-메톡시에틸 잔기, 디아조늄 테레프탈산 잔기를 들 수 있다.

[1785] 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 상술한 반응성기와, 리신 잔기의 측쇄 중에 존재하는 아미노기(NH_2) 사이의 반응에 의해 생성되는 연결 부분으로서는, 예를 들면, 아미드 잔기, 우레아 잔기, 피리딘 잔기, 카르바메이트 잔기, 술폰아미드 잔기를 들 수 있다.

[1786] 더 구체적으로는, 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기는, 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하고 있어도 좋다.

[1787] [화 40]



[1788]

[1789] 〔여기서,

[1790] R_{5a} 및 R_{5c}는 수소 원자, 또는 상술한 치환기이고,

[1791] R_{5b}는 전자 흡인기이고,

[1792] j는 1 내지 5의 임의의 정수이고,

[1793] k는 1 내지 4의 임의의 정수이다〕

[1794] R_{5a} 및 R_{5c}는 수소 원자, 또는 상술한 치환기이다. 치환기의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 것과 동일하다.

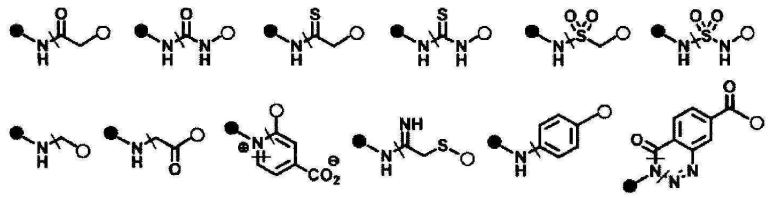
[1795] R_{5b}는 전자 흡인기이다. 이러한 전자 흡인기로서는, 예를 들면, 상술한 것을 들 수 있지만, 할로겐 원자, 보론산 잔기, 메실, 토실, 트리플레이트가 바람직하다.

[1796] j는 1 내지 5의 임의의 정수이고, 바람직하게는 1 내지 3의 정수이고, 보다 바람직하게는 1 또는 2이다.

[1797] k는 1 내지 4의 임의의 정수이고, 바람직하게는 1 내지 3의 정수이고, 보다 바람직하게는 1 또는 2이다.

[1798] 리신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인 상기 화학 구조와, 리신 잔기의 측쇄 중에 존재하는 아미노기(NH_2) 사이의 반응에 의해 생성되는 연결 부분은, 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하고 있어도 좋다.

[1799] [화 41]



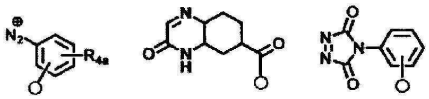
[1800]

[1801] 〔여기서, ●(검은 환형)은 T측의 부분에 대한 결합을 나타내고, ○(흰 환형)은 B측의 부분에 대한 결합을 나타낸다. 결합에 직교하는 직선은 반응에 의해 생성되는 결합을 나타낸다〕

[1802] 티로신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기는, 티로신 잔기의 측쇄 중에 존재하는 페놀성 하이드록실기(OH)의 오르토 위치의 원자와 특이적으로 반응할 수 있는 기이고, 예를 들면, 디아조늄 잔기, 디아조디카르복실레이트 잔기, 2,3-디하이드로-1H-피라진-6-온 잔기를 들 수 있다.

[1803] 더 구체적으로는, 티로신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기는, 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하고 있어도 좋다.

[1804] [화 42]

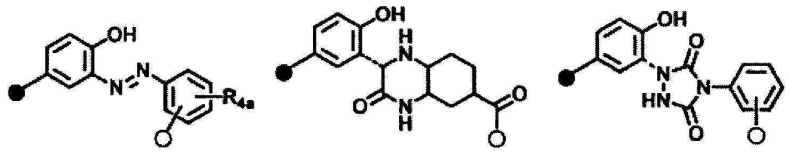
[1805] 

[1806] 〔여기서, R_{4a}는 수소 원자, 또는 상술한 치환기이고, ○은 B에 대한 결합을 나타낸다〕

[1807] R_{4a}는 수소 원자, 또는 상술한 치환기이다. 치환기의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 것과 동일하다.

[1808] 티로신 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인 상기 화학 구조와, 티로신 잔기의 측쇄 중에 존재하는 페놀성 하이드록실기(OH)의 오르토 위치의 원자 사이의 반응에 의해 생성되는 연결 부분은, 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하고 있어도 좋다.

[1809] [화 43]

[1810] 

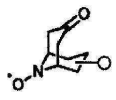
[1811] 〔여기서, R_{4a}는 수소 원자, 또는 상기한 치환기이고, ●은 T에 대한 결합을 나타내고, ○은 B에 대한 결합을 나타낸다〕

[1812] R_{4a}는 수소 원자, 또는 상술한 치환기이다. 치환기의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 것과 동일하다.

[1813] 트립토판 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기는, 트립토판 잔기의 측쇄 중에 존재하는 인돌기의 3 위치의 환 구성 원자와 특이적으로 반응할 수 있는 기이고, 예를 들면, 9-아자비사이클로 [3.3.1]노난-3-온-N-옥실 잔기를 들 수 있다.

[1814] 더 구체적으로는, 트립토판 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기는, 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하고 있어도 좋다.

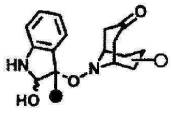
[1815] [화 44]

[1816] 

[1817] 〔여기서, ○은 B에 대한 결합을 나타낸다〕

[1818] 트립토판 잔기의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기인 상기 화학 구조와, 트립토판 잔기의 측쇄 중에 존재하는 인돌기의 3 위치의 환 구성 원자 사이의 반응에 의해 생성되는 연결 부분은, 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하고 있어도 좋다.

[1819] [화 45]

[1820] 

[1821] 〔여기서, ●은 T에 대한 결합을 나타내고, ○은 B에 대한 결합을 나타낸다〕

[1822] 특히 바람직하게는, 반응성기는 리신의 측쇄에 대하여 특이적인 반응성기라도 좋다.

[1823] 1-6. 부분 구조 「L-B」

[1824] 1-6-1. A 및 R을 연결하는 부분 구조 「L-B」 중의 주쇄의 길이

[1825] 식 (I)에 있어서, A(친화성 물질) 및 R(반응성기)을 연결하는 주쇄(L-B 중의 직쇄 부분)의 길이는 가용성 단백질 및 친화성 물질의 종류, 및 가용성 단백질에서의 친화성 물질의 표적 부위와, R이 반응하여 결합해야 하는,

상술한 바와 같은 표적 영역(예, 특정한 위치) 중의 특정한 아미노산 잔기의 위치 및 수와의 관계 등 다양한 인자에 따라, 적절히 설계할 수 있다. 식 (I)로 표시되는 화합물은 친화성 물질이 가용성 단백질에 회합하고, 이어서, L-B를 통하여 친화성 물질과 공유 결합하고 있는 반응성기가, 상기 표적 부위의 근방에 존재하는 특정한 아미노산 잔기의 측쇄 중의 기(예, 리신 잔기의 측쇄 중의 아미노기)와 반응함으로써, 가용성 단백질과 공유 결합할 수 있다. 이때, R이 반응하여 결합해야 하는 특정한 아미노산 잔기의 근방 영역, 상기 표적 부위의 근방 영역, 및 당해 특정한 아미노산 잔기와 상기 표적 부위 사이의 영역에 있어서 당해 특정한 아미노산 잔기가 이외에 존재하지 않는 경우, 주쇄의 길이를 엄밀하게 제어하지 않아도, 반응성기는 당해 특정한 아미노산 잔기에 대하여 위치 선택적으로 결합할 수 있다. 물론, 이러한 영역에 있어서 당해 특정한 아미노산 잔기가 이외에 존재하는 경우라도, 주쇄의 길이를 제어함으로써, 반응성기는 당해 특정한 아미노산 잔기에 대하여 위치 선택적으로 결합할 수 있다.

[1826] A 및 R을 연결하는 주쇄의 길이는 가용성 단백질 및 그에 대한 친화성 물질의 종류, 및 가용성 단백질 중의 표적 부위 중의 특정한 아미노산 잔기의 위치 및수의 관계 등의 인자에 따라 변동될 수 있지만, 약 5Å 이상, 바람직하게는 약 7.5Å, 보다 바람직하게는 약 10.5Å 이상이라도 좋다. 이러한 주쇄의 길이는 또한, 예를 들면 약 30Å 이하, 바람직하게는 약 23Å 이하, 보다 바람직하게는 약 16.5Å 이하라도 좋다. 더 구체적으로는, 이러한 주쇄의 길이는, 예를 들면 약 5.0 내지 30Å, 바람직하게는 약 7.5 내지 23Å, 보다 바람직하게는 약 10.5 내지 16.5Å 이라도 좋다.

[1827] 그런데, 원자간의 길이(거리)의 관계에 대해서는 하기 표와 같은 것이, 당해 기술분야에서의 기술 상식이다. 따라서, 당업자라면 하기 표의 원자간의 길이를 참고로 하여, 상술한 바와 같은 주쇄의 길이(Å)에 대응하는 개수의 원자를 갖는 주쇄을 적절히 설계할 수 있다.

[1828] [표 1]

직쇄 알킬렌에서의 양말단의 탄소원자간의 길이(거리)의 관계

	길이 (Å)
직쇄 알킬렌	
CH_2-CH_2 (C2)	약 1.5
$CH_2-CH_2-CH_2$ (C3)	약 3.0
C4	약 4.5
C5	약 6.0
C6	약 7.5
C7	약 9.0
C8	약 10.5
C9	약 12.0
C10	약 13.5
직쇄 알케닐렌	
CH=CH	약 1.5

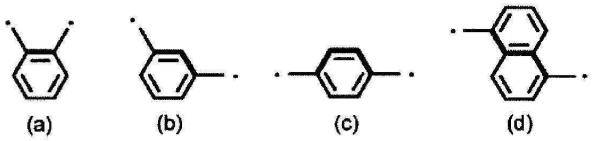
[1829]

[1830] 더 구체적으로는, A 및 R을 연결하는 주쇄의 길이는 주쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)를 구성하는 원자수로서 규정할 수도 있다. 주쇄을 구성하는 원자수는, 예를 들면 4개(약 5.0Å) 이상, 바람직하게는 6개(약 7.5Å), 보다 바람직하게는 8개(약 10.5Å) 이상이라도 좋다. 주쇄의 원자수는 또한, 예를 들면 20개(약 30Å) 이하, 바람직하게는 16개(약 23Å) 이하, 보다 바람직하게는 12개(약 16.5Å) 이하라도 좋다. 더 구체적으로는, 주쇄의 원자수는, 예를 들면 4 내지 20개, 바람직하게는 6 내지 16개, 보다 바람직하게는 8 내지 12개라도 좋다.

[1831] 주쇄가 환 구조를 포함하지 않는 구조인 경우, 주쇄의 원자수는 쇄상 구조 중의 원자수를 셈으로써 결정할 수 있다.

[1832] 한편, 주쇄가 환 구조를 포함하는 구조인 경우, 주쇄의 원자수와 상술한 길이는 반드시 대응하지 않고, 주쇄의 원자수에 의해 규정될 수 있는 길이는 상술한 길이보다도 짧아지는 경향이 있다. 이러한 경우라도, 주쇄의 길이를 규정하는 관점에서, 주쇄의 원자수를 편의적으로 셀 수 있다. 구체적으로는, 이러한 경우에서의 주쇄의 원자수는, 주쇄에 있어서 2가의 환 구조를 포함하지 않는 쇄상 구조 중의 원자수에 더하여, 환 구조 중의 2개의 결합수를 연락하는 최단 경로의 원자수를 셈으로써 결정할 수 있다(예를 들면, 이하 (a) 내지 (d)의 볼드체 경로를 참조).

[1833] [화 46]

[1834] 

[1835] · 은 결합수이다.

[1836] (a)의 경우, 최단 경로는 볼드체 경로이기 때문에, 주쇄의 원자수로서 셀 수 있는 2가의 환 구조 중의 원자수는 2이다.

[1837] (b)의 경우, 최단 경로는 볼드체 경로이기 때문에, 주쇄의 원자수로서 셀 수 있는 2가의 환 구조 중의 원자수는 3이다.

[1838] (c)의 경우, 어느 경로도 최단 경로(등거리)이기 때문에, 주쇄의 원자수로서 셀 수 있는 2가의 환 구조 중의 원자수는 4이다.

[1839] (d)의 경우, 축합 부위의 경로가 최단 경로이기 때문에, 주쇄의 원자수로서 셀 수 있는 2가의 환 구조 중의 원자수는 4이다.

[1840] 바람직하게는, L-B로 표시되는 A와 R의 연결 부분(측쇄를 제외한다)은, 2가의 환 구조를 포함하지 않는 쇄상 구조라도 좋다. 이 경우, L-B로 표시되는 A와 R의 연결쇄 부분에 있어서 2가의 환기(環基)가 포함되지 않도록 L 및 B를 적절히 설계할 수 있다.

[1841] 1-6-2. 부분 구조 「L-B」의 구체적 구조

[1842] 상기 식 (I)에 있어서, L 및 B는 서로 연관될 수 있는 구조이다. 따라서, 상기 식 (I)에 있어서, L 및 B는 「L-B」로 표시되는 부분 구조로서 규정할 수 있다.

[1843] 일 실시형태에서는, 절단성 링커는 (i) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커, 또는 (ii) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖지 않는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커라도 좋다.

[1844] 특정한 실시형태에서는, L이 상기 (i)의 절단성 링커인 경우, B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이다.

[1845] 바람직하게는, L이 상기 (i)의 절단성 링커인 경우, B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이다. 이 경우, (i)에서 생성되는 생체 직교성 관능기는 (a)에서의 생체 직교성 관능기와 동종이라도 이종이라도 좋다. 보다 단순한 구조의 채용, 및/또는 단일의 기능성 물질에 대한 반응성의 향상 등의 관점에서는, (i)에서 생성되는 생체 직교성 관능기는 (a)에서의 생체 직교성 관능기와 동종이라도 좋다. 한편, 2종 이상의 기능성 물질에 대한 차별화된 반응성의 확보, 및 반응에서의 일부의 생체 직교성 관능기의 불사용 등의 관점에서는, (i)에서 생성되는 생체 직교성 관능기는 (a)에서의 생체 직교성 관능기와 이종이라도 좋다.

[1846] 또는, L이 상기 (i)의 절단성 링커인 경우, B는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기라도 좋다. 이 경우, 식 (I)로 표시되는 화합물 또는 이의 염은 보다 단순한 구조를 갖게 되므로, 합성이 용이하다.

[1847] 다른 특정한 실시형태에서는, L이 상기 (ii)의 절단성 링커인 경우, B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이다.

[1848] 특정한 실시형태에서는, L-B로 표시되는 부분 구조는, 바람직하게는 펩티드 부분을 포함하지 않는다. 이 경우, 본 발명의 화합물을 사용하여 수득되는 본 발명의 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질(예, 항체 약물 복합체)은, 면역원성을 가질 수 있는 펩티드 부분을 링커로서 포함할 수 없다는 이점이 있다.

[1849] 특정한 실시형태에서는, 「L-B」로 표시되는 부분 구조는, A 및 R을 연결하는 주쇄(L-B 중의 직쇄 부분)의 중심 위치에 존재하는 원자(예, 주쇄을 구성하는 원자수가 홀수인 경우), 또는 당해 주쇄의 중심 위치에 존재하는 결합 부위(예, 주쇄을 구성하는 원자수가 짝수인 경우)를 기준으로 하여, 대칭 구조〔예, 시스형 (즉, Z), 트랜스형 (즉, E)〕를 갖고 있어도 좋다. 예를 들면, 중심 위치에 존재하는 결합 부위를, 상술한 바와 같은 절단 링커 중의 절단성 부분으로서 설계할 수도 있다. 「L-B」로 표시되는 부분 구조가 대칭 구조를 갖는 경우, 「L-B」로 표시되는 부분 구조는 용이하게 합성할 수 있다. 예를 들면, 반응하여 절단성 부분을 형성할 수 있는 관

능기를 한쪽의 말단에 갖는 같은 2가의 기(예, SH기를 한쪽의 말단에 갖는 쇄상의 2가의 기)를 서로 반응시킴으로써, 주쇄의 중심 위치에 절단성 부분을 포함하는 대칭 구조(쇄상의 2가의 기 -S-S- 쇄상의 2가의 기)를 실현할 수 있다.

[1850] 따라서, 「L-B」로 표시되는 부분 구조는 「B2-L'-B1」로 표시되는 부분 구조(즉, L이 B2-L'로 표시되는 2가의 기이고, B가 B1이다)라도 좋다. 이 경우, 상기 식 (I)로 표시되는 화합물은 하기 식 (I')로 표시되는 화합물로서 규정할 수 있다.

[1851] A-B2-L'-B1-R (I')

[1852] 〔식 중,

[1853] A 및 R은 상기 식 (I)의 것과 같고,

[1854] L'는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[1855] B1 및 B2는 동일 또는 상이하며, (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[1856] B1 및 B2는 L'를 중심으로 한 대칭 구조를 갖고 있어도 좋다〕

[1857] B1 및 B2는 동일 또는 상이하며, B의 정의, 예 및 바람직한 예와 동일하다.

[1858] 특정한 실시형태에서는, L'는 하기 식 (L1') 내지 (L3') 중 어느 하나로 표시되어도 좋다:

[1859] La'-C'-Lb' (L1')

[1860] La'-C' (L2')

[1861] C'-Lb' (L3')

[1862] 〔식 중,

[1863] La' 및 Lb'는 각각 2가의 기이고,

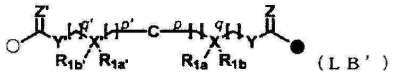
[1864] C'는 절단성 부분〕

[1865] La' 및 Lb'로 표시되는 2가의 기는 각각, La' 및 Lb'로 표시되는 2가의 기의 정의, 예 및 바람직한 예와 동일하다.

[1866] C'로 표시되는 절단성 부분은 C로 표시되는 절단성 부분의 정의, 예 및 바람직한 예와 동일하다.

[1867] 다른 특정한 실시형태에서는, L-B로 표시되는 구조 단위는 하기 식 (LB')로 표시되어도 좋다.

[1868] [화 47]

[1869] 

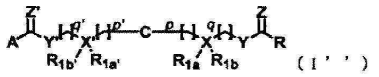
[1870] 〔식 중,

[1871] C, p, p', q, q', X, X', R_{1a}, $R_{1a'}$, R_{1b}, $R_{1b'}$, Y, Y', Z 및 Z'의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같고,

[1872] ○(흰 환형)은 A에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 R에 대한 결합을 나타낸다〕

[1873] 따라서, 상기 식 (I)은 하기 식 (I'')로서 규정할 수 있다.

[1874] [화 48]

[1875] 

[1876] 〔식 중,

[1877] A, R, C, p, p', q, q', X, X', R_{1a}, R_{1b}, $R_{1a'}$, $R_{1b'}$, Y, Y', Z 및 Z'의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한

것과 같다]

[1878] 상기 식 (LB') 및 (I'')에 있어서, C=Z에서의 C(탄소 원자)로부터 C=Z' 에서의 C(탄소 원자)까지의 길이는 A 및 R을 연결하는 주쇄의 길이와 동일하다. 이들 식에 있어서, C=Z에서의 C로부터 C=Z' 에서의 C까지의 길이는 또한, C=Z에서의 C로부터 C=Z' 에서의 C를 연결하는 부분 구조의 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)를 구성하는 원자수로서 규정할 수도 있다. 이러한 원자수는 A 및 R을 연결하는 주쇄을 구성하는 원자수와 동일하다. C=Z에서의 C로부터 C=Z' 에서의 C를 연결하는 부분 구조의 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)는 환 구조를 포함하고 있지 않아도 포함하고 있어도 좋지만, 환 구조를 포함하고 있지 않은 것이 바람직하다. 당해 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)는, 바람직하게는 펩티드 부분을 포함하지 않는 것이라도 좋다.

[1879] 1-8. 제조 방법

[1880] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물 또는 이의 염은 적절히 조제할 수 있다. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물은 식 (I), 바람직하게는 식 (I'), 보다 바람직하게는 식 (I'')로 표시된다.

[1881] 친화성 물질로서는, 임의의 관능기를 갖는 것을 적절히 선택할 수 있다. 따라서, 당해 관능기와 반응할 수 있는 반응성기를 이용함으로써 친화성 물질을, L-B-R로 표시되는 구조 단위, 또는 R-L-B-R로 표시되는 구조 단위(2개의 반응성기는 동일 또는 상이하다)와 반응시켜서, A-L-B-R로 표시되는 구조 단위를 조제할 수 있다. 예를 들면, 이러한 반응은 적절한 반응계, 예를 들면 유기용매계 또는 수용액계에 있어서, 적온(예, 약 15 내지 200℃)에서 행할 수 있다. 반응계는 적절한 촉매를 포함하고 있어도 좋다. 반응 시간은, 예를 들면 1분 내지 20시간, 바람직하게는 10분 내지 15시간, 보다 바람직하게는 20분 내지 10시간, 더욱더 바람직하게는 30분 내지 8시간이다.

[1882] 반응계에 있어서, 친화성 물질(X)에 대한, L-B-R로 표시되는 구조 단위, 또는 R-L-B-R로 표시되는 구조 단위(Y)의 몰 비율(Y/X)은 당해 구조 단위 및 친화성 물질의 종류, 당해 구조 단위에 의해 수식되어야 할 친화성 물질 중의 부위의 수 등에 따라 변동하기 때문에 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 0.1 내지 50이고, 바람직하게는 0.5 내지 40이고, 보다 바람직하게는 1 내지 35이고, 더욱더 바람직하게는 2 내지 25이고, 특히 바람직하게는 3 내지 15이다.

[1883] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염의 생성의 확인은 그 구체적인 원료 및 생성물의 분자량에도 따르지만, 예를 들면, 전기영동법, 크로마토그래피(예, 겔 여과 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 컬럼 크로마토그래피, HPLC), 또는 질량 분석에 의해, 바람직하게는 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염은 크로마토그래피(예, 상기한 크로마토그래피, 및 어피니티 크로마토그래피) 등 임의의 방법에 의해 적절히 정제할 수 있다.

[1884] 1-9. 그 외

[1885] 후술하는 발명〔예, 식 (II) 내지 (v) 및 그 하위 개념의 식, 및 부분 구조식(예, (L1) 내지 (L3), (La'), (Lb'), (B-1) 내지 (B-4))으로 표시되는 발명〕에서는, 임의의 기호(예, A, L, B, R), 당해 기호로 표시되는 용어, 및 이들의 상세(예를 들면, 정의, 예 및 바람직한 예)는 상기 식 (I)로 표시되는 화합물 또는 이의 염의 발명과 공통된다. 또한, 후술하는 발명을 규정할 수 있는 특정한 부분(예, 절단성 부분, 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖는 부분), 특정한 기(예, 생체 직교성 관능기, 2가의 기, 알킬기, 치환기, 전자 흡인기), 및 특정한 수치, 및 염 등 임의의 기술 요소(예, 정의, 예 및 바람직한 예)에 대해서도, 상기에서 설명한 것과 공통으로 할 수 있다. 따라서, 이들 사항은 특별히 언급하지 않고, 후술하는 발명에서 적절히 원용할 수 있다. 마찬가지로, 후술하는 발명에서 언급한 특정한 발명의 기술 요소는 본 발명 및 다른 발명의 기술 요소로서 적절히 원용할 수 있다.

[1886] 2. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염

[1887] 2-1. 개요

[1888] 본 발명은 식 (II)로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염을 제공한다.

[1889] A-L-B-R'-T (II)

[1890] 〔식 중,

[1891] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[1892] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[1893] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[1894] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[1895] T는 가용성 단백질〕

[1896] 2-2. 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분(R')

[1897] 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분에 있어서, 가용성 단백질 및 반응성기의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다. 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분은 당해 기술분야에 있어서 기술 상식이며, 가용성 단백질 및 반응성기의 종류에 따라 적절히 결정할 수 있다.

[1898] 바람직하게는, 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분은 가용성 단백질에 포함될 수 있는 14종의 아미노산(아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 아스파라긴산, 글루타민산, 아르기닌, 히스티딘, 및 리신) 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄와, 그에 대한 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이다.

[1899] 보다 바람직하게는, 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분은 리신, 티로신, 트립토판, 또는 시스테인 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄와, 그에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이라도 좋다.

[1900] 더욱더 바람직하게는, 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분은 리신, 티로신, 또는 트립토판 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄와, 그에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이라도 좋다. 리신, 티로신, 또는 트립토판 중 어느 1종의 아미노산의 측쇄와, 그에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분으로서는, 예를 들면, 상기 「1-5. 반응성기(R)」에서 언급한 연결 부분 및/또는 화학 구조를 들 수 있다.

[1901] 또한 한층더 바람직하게는, 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분은 리신 또는 티로신의 측쇄와, 그에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이라도 좋다(특히, 가용성 단백질이 인간 IgG1 등의 인간 IgG인 경우). 리신 또는 티로신의 측쇄와, 그에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분으로서는, 예를 들면, 상기 「1-5. 반응성기(R)」에서 언급한 연결 부분 및/ 또는 화학 구조를 들 수 있다.

[1902] 특히 바람직하게는, 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분은 리신의 측쇄와, 그에 대하여 특이적인 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이라도 좋다.

[1903] 2-3. 부분 구조 「L-B」

[1904] 부분 구조 「L-B」의 상세한 것은 상기 「1-6. 부분 구조 「L-B」」에서 언급한 바와 같다.

[1905] 특정한 실시형태에서는, 「L-B」로 표시되는 부분 구조는 「B2-L'-B1」로 표시되는 부분 구조(즉, L이 B2-L'로 표시되는 2가의 기이고, B가 B1이다)라도 좋다. 이 경우, 상기 식 (II)로 표시되는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염은 하기 식 (II')로 표시될 수 있다.

[1906] A-B2-L'-B1-R'-T (II')

[1907] 〔식 중,

[1908] A, R' 및 T는 상기 식 (II)의 것과 같고,

[1909] L'는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

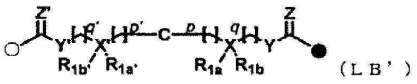
[1910] B1 및 B2는 동일 또는 상이하며, (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[1911] B1 및 B2는 L’ 를 중심으로 한 대칭 구조를 갖고 있어도 좋다]

[1912] 상기 식 (II’)에 있어서, L’ 는 상기한 식(L1’) 내지 (L3’) 중 어느 하나로 표시되어도 좋다.

[1913] 다른 특정한 실시형태에서는, L-B로 표시되는 구조 단위는 하기 식 (LB’)로 표시되어도 좋다.

[1914] [화 49]

[1915] 
(LB’)

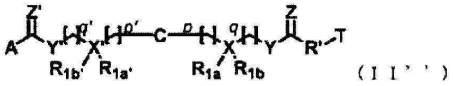
[1916] 〔식 중,

[1917] C, p, p’, q, q’, X, X’, R_{1a}, $R_{1a'}$, R_{1b}, $R_{1b'}$, Y, Y’, Z 및 Z’의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같고,

[1918] ○(흰 환형)은 A에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 R’에 대한 결합을 나타낸다]

[1919] 따라서, 상기 식 (II)은 하기 식 (II’’)로서 규정할 수 있다.

[1920] [화 50]

[1921] 
(II’’)

[1922] 〔식 중,

[1923] A, R’, T, C, p, p’, q, q’, X, X’, R_{1a}, R_{1b}, $R_{1a'}$, $R_{1b'}$, Y, Y’, Z 및 Z’의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같다]

[1924] 상기 식 (LB’) 및 (II’’)에 있어서, C=Z에서의 C(탄소 원자)로부터 C=Z’에서의 C(탄소 원자)까지의 길이는, 상술한 바와 같은 A 및 R을 연결하는 주쇄의 길이와 동일하다. 이들 식에 있어서, C=Z에서의 C로부터 C=Z’에서의 C까지의 길이는 또한, C=Z에서의 C로부터 C=Z’에서의 C를 연결하는 부분 구조의 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)를 구성하는 원자수로서 규정할 수도 있다. 이러한 원자수는 A 및 R을 연결하는 주쇄을 구성하는 원자수와 동일하다. C=Z에서의 C로부터 C=Z’에서의 C를 연결하는 부분 구조의 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)는 환 구조를 포함하고 있지 않아도 포함하고 있어도 좋지만, 환 구조를 포함하고 있지 않은 것이 바람직하다. 당해 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)는, 바람직하게는 펩티드 부분을 포함하지 않는 것이라도 좋다.

[1925] 2-4. 가용성 단백질이 갖는, 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 결합 부위(위치 선택성)

[1926] 가용성 단백질 이외의 부분 구조(예, A-L-B-R’)는 가용성 단백질(T)에서의 상술한 바와 같은 표적 영역에 위치 선택적으로 결합시킬 수 있다.

[1927] 본 명세서에 있어서, 「위치 선택적」 또는 「위치 선택성」이란, 가용성 단백질에 있어서 특정한 아미노산 잔기가 특정한 영역에 편재하고 있지 않음에도 불구하고, 가용성 단백질 중의 특정한 아미노산 잔기와 결합할 수 있는 소정의 구조 단위가, 가용성 단백질 중의 특정한 영역에 편재하는 것을 말한다. 따라서, 「위치 선택적으로 갖는다」, 「위치 선택적인 결합」, 「위치 선택성에서의 결합」 등의 위치 선택성에 관련된 표현은, 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기를 포함하는 표적 영역에서의 소정의 구조 단위의 보유율 또는 결합율이, 표적 영역에서의 당해 특정한 아미노산 잔기와 동종인 복수개의 아미노산 잔기를 포함하는 비표적 영역에서의 당해 구조 단위의 보유율 또는 결합율보다도 유의한 레벨로 높은 것을 의미한다. 이러한 위치 선택적인 결합 또는 보유는 가용성 단백질 중의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 소정의 구조 단위를 랜덤으로 반응시키는 것이 아니고, 가용성 단백질 중의 표적 영역에서의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 소정의 구조 단위를 우선적으로 반응시킬 수 있는 본 발명에 의해 달성할 수 있다.

[1928] 구체적으로는, T가, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하는 경우, 가용성 단백질 이외의 부분 구조는, 당해 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합시킬 수 있다. 표적 영역 및 위치 선택성의

정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다.

[1929] 2-5. 가용성 단백질이 갖는, 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수

[1930] 가용성 단백질(T)이 보유하는, 가용성 단백질 이외의 부분 구조(예, A-L-B-R')의 개수는 변동될 수 있다. 예를 들면, T가 복수의 단량체 단백질을 포함하는 다량체 단백질인 경우, T는, 복수개의 단량체 단백질 중의 대응하는 복수개의 표적 영역에 있어서, T 이외의 부분 구조를 가질 수 있다. 그 결과, T는 T 이외의 부분 구조를 복수개 가질 수 있다. 따라서, 식 (II), (II'), 또는 (II'')로 표시되는 구조는 T가, T 이외의 부분 구조를 1개 또는 복수개 갖고 있어도 좋은 것을 나타낸다. T가 갖는, T 이외의 부분 구조의 개수는 가용성 단백질의 종류, 및 가용성 단백질과 그에 대하여 도입되는 구조 단위와의 반응 비율 등의 조건을 적절히 설정함으로써 조절할 수 있다. 이러한 개수는 가용성 단백질의 종류에 따라서도 다르지만, 예를 들면 1 내지 8, 바람직하게는 1 내지 4, 보다 바람직하게는 1 또는 2라도 좋다.

[1931] 특정한 실시형태에서는, 가용성 단백질이 보유하는 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수는, 가용성 단백질이 복수개의 단량체 단백질로 구성되는 다량체 단백질인 경우, 복수개라도 좋다. 본 발명에 의하면, 복수개의 단량체 단백질의 동일 표적 영역에 대하여 가용성 단백질 이외의 부분 구조를 복수개 도입할 수 있다.

[1932] 바람직한 실시형태에서는, 가용성 단백질은 복수개의 중쇄를 포함하는 항체라도 좋다. 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다. 중쇄의 개수는 항체의 종류에 따라 다르다. 예를 들면, IgG, IgE, 및 IgD는 2개의 중쇄를 가질 수 있다. IgA는 2개 또는 4개의 중쇄를 가질 수 있다. IgM은 8개의 중쇄를 가질 수 있다. 항체(가용성 단백질)가 보유하는, 항체 이외의 부분 구조의 개수는 DAR과 동의(同議)의 것으로서 고려할 수 있다. 본 발명에서는, 항체가 보유하는 항체 이외의 부분 구조의 개수는 IgG, IgE, 및 IgD에 대해서는 1개 또는 2개(바람직하게는 2개)이고, IgA에 대해서는 1 내지 4개(바람직하게는 4개)이고, IgM에 대해서는 1 내지 8개(바람직하게는 8개)라도 좋다.

[1933] 2-6. 제조 방법

[1934] 본 발명은, 이하를 포함하는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다:

[1935] (A1) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물 또는 이의 염을 가용성 단백질과 반응시켜서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것.

[1936] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물은 식 (I), 바람직하게는 식 (I'), 보다 바람직하게는 식 (I'')로 표시된다. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질은 식 (II), 바람직하게는 식 (II'), 보다 바람직하게는 식 (II'')로 표시된다.

[1937] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물 또는 이의 염은 반응성기를 갖기 때문에, 가용성 단백질과 반응할 수 있다. 이러한 반응은 단백질의 변성·분해(예, 아미드 결합의 절단)를 일으킬 수 없는 조건(온화한 조건) 하에서 적절히 행할 수 있다. 예를 들면, 이러한 반응은 적절한 반응계, 예를 들면 완충액 중에서, 실온(예, 약 15 내지 30℃)에서 행할 수 있다. 완충액의 pH는, 예를 들면 5 내지 9이고, 바람직하게는 5.5 내지 8.5이고, 보다 바람직하게는 6.0 내지 8.0이다. 완충액은 적절한 촉매를 포함하고 있어도 좋다. 반응 시간은, 예를 들면 1분 내지 20시간, 바람직하게는 10분 내지 15시간, 보다 바람직하게는 20분 내지 10시간, 더욱더 바람직하게는 30분 내지 8시간이다. 이러한 반응의 상세에 대해서는, 예를 들면, G. J. L. Bernardes et al., Chem. Rev., 115, 2174(2015); G. J. L. Bernardes et al., Chem. Asian. J., 4, 630(2009); B. G. Davies et al., Nat. Commun., 5, 4740(2014); A. Wagner et al., Bioconjugate. Chem., 25, 825(2014)를 참조.

[1938] 반응계에 있어서, 가용성 단백질(X)에 대한, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물 또는 이의 염(Y)의 몰 비율(Y/X)은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물 및 가용성 단백질(예, 항체)의 종류, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물에 의해 수식되어야 할 가용성 단백질 중 부위의 수(예, DAR) 등에 따라 변동하기 때문에 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 0.1 내지 100이고, 바람직하게는 0.5 내지 80이고, 보다 바람직하게는 1 내지 70이고, 더욱더 바람직하게는 2 내지 50이고, 특히 바람직하게는 3 내지 30이다.

[1939] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염의 생성의 확인은

그 구체적인 원료 및 생성물의 분자량에도 따르지만, 예를 들면, 전기영동법, 크로마토그래피(예, 겔 여과 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 컬럼 크로마토그래피, HPLC), 또는 질량 분석에 의해, 바람직하게는 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 위치 선택성의 확인은, 예를 들면, 펩티드 매핑에 의해 행할 수 있다. 펩티드 매핑은, 예를 들면, 프로테아제(예, 트립신, 키모트립신) 처리 및 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 프로테아제로서는, 엔드프로테아제가 바람직하다. 이러한 엔드프로테아제로서는, 예를 들면, 트립신, 키모트립신, Glu-C, Lys-N, Lys-C, Asp-N을 들 수 있다. 가용성 단백질이 갖는 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수의 확인은, 예를 들면, 전기영동법, 크로마토그래피, 또는 질량 분석에 의해, 바람직하게는 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염은 크로마토그래피(예, 상기한 크로마토그래피, 및 어피니티 크로마토그래피) 등 임의의 방법에 의해 적절히 정제할 수 있다.

[1940] 3. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염

[1941] 3-1. 개요

[1942] 본 발명은, 식 (III)로 표시되는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염을 제공한다.

[1943] A-L-B'(-F)-R'-T (III)

[1944] 〔식 중,

[1945] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[1946] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[1947] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[1948] F는 기능성 물질이고,

[1949] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[1950] T는 가용성 단백질〕로 표시되는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염.

[1951] 식 (III) 또는 다른 식에 있어서, R'는 F가 아니고, B'에 공유 결합하고 있다.

[1952] 3-2. 기능성 물질(F)

[1953] 기능성 물질로서는 가용성 단백질에 임의의 기능을 부여하는 물질인 한 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 약물, 표지 물질, 안정화제를 들 수 있지만, 바람직하게는 약물 또는 표지 물질이다. 기능성 물질은 또한, 단일의 기능성 물질이라도 좋고, 또는 2 이상의 기능성 물질이 연결된 물질이라도 좋다.

[1954] 약물로서는 임의의 질환에 대한 약물이라도 좋다. 이러한 질환으로서는, 예를 들면, 암(예, 폐암, 위암, 대장암, 췌장암, 신장암, 간암, 갑상선암, 전립선암, 방광암, 난소암, 자궁암, 뼈암, 피부암, 뇌종양, 흑색종), 자기면역질환·염증성질환(예, 알레르기 질환, 관절 류머티즘, 전신성 홍반루푸스), 뇌신경질환(예, 뇌경색, 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측색경화증), 감염증(예, 세균 감염증, 바이러스 감염증), 유전성·희소질환(예, 유전성 구상적혈구증, 비디스트로피 근긴장증), 안질환(예, 가령황반변성증, 당뇨병망막증, 망막색소변성증), 뼈·정형외과 영역의 질환(예, 변형성 관절증), 혈액질환(예, 백혈병, 자반병), 그 밖의 질환(예, 당뇨병, 고지혈증 등의 대사이상증, 간 질환, 신장 질환, 폐 질환, 순환기계 질환, 소화기관계 질환)을 들 수 있다. 가용성 단백질이 소정 질환의 표적 단백질에 대한 항체인 경우, 약물은 당해 소정 질환에 관련된 약물(예, 당해 소정 질환을 치료하는 약물, 당해 소정 질환의 표적 단백질에 대한 항체의 사용에 따르는 부작용을 완화하는 약물)이라도 좋다.

[1955] 더 구체적으로는, 약물은 항암제이다. 항암제로서는, 예를 들면, 화학요법제, 독소, 방사성 동위체 또는 이를 포함하는 물질을 들 수 있다. 화학요법제로서는, 예를 들면, DNA 손상제, 대사 길항약, 효소 저해제, DNA 인터칼레이트제, DNA 절단제, 토포이소메라제 저해제, DNA 결합 저해제, 튜불린 결합 저해제, 세포 상해성 뉴클레오티드, 백금 화합물을 들 수 있다. 독소로서는, 예를 들면, 세균 독소(예, 디프테리아 독소), 식물 독소(예, 리신)를 들 수 있다. 방사성 동위체로서는, 예를 들면, 수소 원자의 방사성 동위체(예, ^{3}H), 탄소 원자의 방사성

동위체(예, ^{14}C), 인 원자의 방사성 동위체(예, ^{32}P), 유황 원자의 방사성 동위체(예, $35^{S)}$, 이트륨의 방사성 동위체(예, ^{90}Y), 테크네튬의 방사성 동위체(예, ^{99m}Tc), 인듐의 방사성 동위체(예, ^{111}In), 요오드 원자의 방사성 동위체(예, ^{123}I, ^{125}I, ^{129}I, ^{131}I), 사마륨의 방사성 동위체(예, $_{153}Sm$), 레늄의 방사성 동위체(예, $_{186}Re$), 아스타틴의 방사성 동위체(예, ^{211}At), 비스무트의 방사성 동위체(예, ^{212}Bi)를 들 수 있다.

[1956] 표지 물질로서는, 예를 들면, 효소(예, 페록시다아제, 알칼리 포스파타아제, 루시페라아제, β갈락토시다아제), 친화성 물질(예, 스트렙트아비딘, 비오틴, 디곡시게닌, 압타머), 형광 물질(예, 플루오레세인, 플루오레세인이소티오시아네이트, 로다민, 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질), 발광 물질(예, 루시페린, 에쿠오린, 아크리디늄에스테르, 트리스(2,2'-비피리딜)루테늄, 루미놀), 방사성 동위체(예, 상기한 것) 또는 이를 포함하는 물질을 들 수 있다.

[1957] 기능성 물질은 또한 고분자 화합물, 중분자 화합물, 또는 저분자 화합물이고, 바람직하게는 저분자 화합물이다. 저분자 화합물이란, 분자량 1500 이하의 화합물을 말한다. 저분자 화합물은 천연 화합물 또는 합성 화합물이다. 저분자 화합물의 분자량은 1200 이하, 1000 이하, 900 이하, 800 이하, 700 이하, 600 이하, 500 이하, 400 이하, 또는 300 이하라도 좋다. 저분자 화합물의 분자량은 또한 30 이상, 40 이상, 또는 50 이상이라도 좋다. 저분자 화합물은 상술한 바와 같은 약물 또는 표지 물질이라도 좋다. 또한, 저분자 화합물로서는, 예를 들면, 아미노산, 올리고펩티드, 비타민, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 단당, 올리고당, 지질, 지방산, 및 이들의 염을 들 수 있다.

[1958] 3-3. 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기(B')

[1959] B'은, (a)의 생체 직교성 관능기가 기능성 물질과 반응하고 있는 것을 제외하고, 상기한 B에서의 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기와 동일하다. 따라서, B'에서의 2가의 기 및 직교성 관능기의 정의, 예 및 바람직한 예는 B에서의 것과 동일하다.

[1960] 기능성 물질은 그 구조에 따른 다양한 관능기를 갖는다. 기능성 물질이 생체 직교성 관능기와 반응하기 쉬운 관능기를 갖는 경우, 기능성 물질의 당해 관능기와 생체 직교성 관능기를 적절히 반응시킬 수 있다. 생체 직교성 관능기와 반응하기 쉬운 관능기는, 생체 직교성 관능기의 구체적인 종류에 따라서도 다를 수 있다. 당업자라면 적절한 관능기를, 생체 직교성 관능기와 반응하기 쉬운 관능기로서 적절히 선택할 수 있다. 생체 직교성 관능기와 반응하기 쉬운 관능기로서는, 예를 들면, 생체 직교성 관능기가 티올인 경우에는 말레이미드 및 디술피드를 들 수 있고, 생체 직교성 관능기가 알킨인 경우에는 아지드를 들 수 있고, 생체 직교성 관능기가 알데히드 또는 케톤인 경우에는 히드라진을 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[1961] 한편, 기능성 물질이 생체 직교성 관능기와 반응하기 쉬운 관능기를 갖지 않는 경우, 기능성 물질로서, 원하는 관능기를 갖도록 유도체화된 것을 사용할 수 있다. 예를 들면, 기능성 물질이 가용성 단백질인 경우, 가용성 단백질이 천연에 갖지 않는 관능기를 갖도록 유도체화된 것을 사용할 수 있다. 이 경우, 가용성 단백질의 유도체화는 본 발명의 방법에 의해 행하여져도 좋다. 이 경우, 원하는 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖도록 유도체화된 가용성 단백질을, 기능성 물질로서 사용할 수 있다.

[1962] 유도체화는 당해 분야에서의 기술 상식이다(예, 국제공개 제2004/010957호, 미국 특허출원 공개 제2006/0074008호 명세서, 미국 특허출원 공개 제2005/0238649호 명세서). 예를 들면, 유도체화는 상술한 바와 같은 가교제를 사용하여 행하여져도 좋다. 또는, 유도체화는 원하는 관능기를 갖는 특정한 링커를 사용하여 행하여져도 좋다. 예를 들면, 이러한 링커는, 적절한 환경(예, 세포 내 또는 세포 외)에서 기능성 물질과 가용성 단백질을 링커의 절단에 의해 분리 가능한 것이라도 좋다. 이러한 링커로서는, 예를 들면, 특정의 프로테아제〔예, 세포 내 프로테아제(예, 리소좀, 또는 엔드솜 중에 존재하는 프로테아제), 세포 외 프로테아제(예, 분비성 프로테아제)〕로 분해되는 펩티딜 링카(예, 미국특허 제6,214,345호; Dubowchik et al., Pharm. Therapeutics 83: 67-123(1999)), 생체 내에 존재하는 국소 산성 부위에서 절단될 수 있는 링커(예, 미국특허 제5,622,929호, 미국특허 제5,122,368호; 미국특허 제5,824,805호)를 들 수 있다. 링커는 자괴적(self-immolative)이라도 좋다(예, 국제공개 제02/083180호, 국제공개 제04/043493호, 국제공개 제05/112919호). 본 발명에서는 유도체화된 기능성 물질도, 단지 「기능성 물질」이라고 호칭할 수 있다.

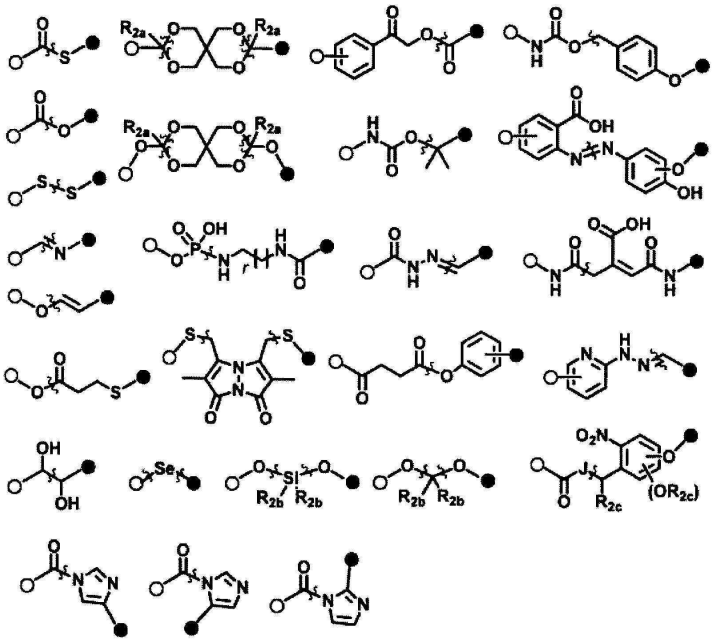
[1963] 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기에 있어서, 기능성 물질 및 생체 직교성 관능기의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다. 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분은 당해 기술분야에 있어서 기술 상식이며, 기능성 물질(기능성 물질이 유

도체화되어 있는 경우, 그 유도체화 부분) 및 생체 직교성 관능기의 종류에 따라 적절히 결정할 수 있다.

[1964] 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 디술피드 잔기, 아세탈 잔기, 케탈 잔기, 에스테르 잔기, 카르바모일 잔기, 알콕시알킬 잔기, 이민 잔기, 3급 알킬옥시카르바메이트 잔기, 실란 잔기, 하이드라존 함유 잔기, 포스포르아미데이트 잔기, 아코니틸 잔기, 트리틸 잔기, 아조 잔기, 비시날디올 잔기, 셀렌 잔기, 전자 흡인기를 갖는 방향족환 함유 잔기, 쿠마린 함유 잔기, 술폰 함유 잔기, 불포화 결합 함유 쇄 잔기, 글리코실 잔기로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 잔기를 포함하는 2가의 기라도 좋다.

[1965] 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기는 또한 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 하기:

[1966] [화 51]

[1967] 

[1968] 〔여기서, 결합에 직교하는 파선은 반응에 의해 생성되는 결합을 나타내고,

[1969] 복수의 R_{2a}, 복수의 R_{2b}, 및 복수의 R_{2c}는 동일 또는 상이하며, 상기한 수소 원자 또는 치환기이고,

[1970] J는 $-CH_2-$, -O-, 또는 -S-이고,

[1971] r은 1 내지 4의 임의의 정수이고,

[1972] ○(흰 환형)은 F측의 부분에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 B' 측의 부분에 대한 결합을 나타낸다.

[1973] 화학 구조가, 절단성 부분을 중심으로 하여 비대칭인 경우, ●이 B' 측의 부분에 대한 결합을 나타내고, ○이 F 측의 부분에 대한 결합을 나타내고 있어도 좋다〕로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나의 화학 구조에 대응하는 잔기를 포함하는 2가의 기라도 좋다.

[1974] 3-4. 부분 구조 「L-B'(-F)」

[1975] 부분 구조 「L-B'(-F)」의 상세한 것은 B가 B'(-F)로 변경되어 있는 것을 제외하고, 상기 「1-6. 부분 구조 「L-B」」에서 언급한 바와 같다.

[1976] 일 실시형태에서는, 절단성 링커는 (i) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커, 또는 (ii) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖지 않는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커라도 좋다.

[1977] 특정한 실시형태에서는, 절단성 링커는 상기 (ii)의 절단성 링커라도 좋다. 이미 B'은 기능성 물질(F)과 결합하고 있으므로, 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성할 필요가 없기 때문이다.

[1978] 다른 특정한 실시형태에서는, L-B'(-F)로 표시되는 부분 구조는, B2'(-F2)-L'-B1'(-F1)로 표시되는 부분 구

조(즉, L은 B2'(-F2)-L'이고, B'은 B1')라도 좋다. 이 경우, 상기 식 (III)로 표시되는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염은 하기 식 (III')로 표시될 수 있다.

[1979] A-B2'(-F2)-L'-B1'(-F1)-R'-T (III')

[1980] 〔식 중,

[1981] A, R' 및 T는 상기 식 (III)의 것과 같고,

[1982] L'는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

[1983] B1' 및 B2'는 동일 또는 상이하며, 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[1984] F1 및 F2는 동일 또는 상이하며, 기능성 물질이고,

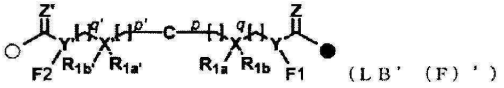
[1985] B1'(-F1) 및 B2'(-F2)는 L'를 중심으로 한 대칭 구조를 갖고 있어도 좋다〕.

[1986] B1' 및 B2'는 동일 또는 상이하며, B'의 정의, 예 및 바람직한 예와 동일하다.

[1987] 상기 식 (III')에 있어서, L'는 상기한 식(L1') 내지 (L3') 중 어느 하나로 표시되어도 좋다.

[1988] 다른 특정한 실시형태에서는, L-B'(-F)로 표시되는 구조 단위는 하기 식 (LB'(F)')으로 표시되어도 좋다.

[1989] [화 52]

[1990] 

(LB'(F)')

[1991] 〔식 중,

[1992] C, F1, F2, p, p', q, q', X, X', R_{1a}, $R_{1a'}$, R_{1b}, $R_{1b'}$, Z 및 Z'의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같고,

[1993] Y 및 Y'는 동일 또는 상이하며, 상기 식 (B-1)의 Y에서 수소 원자를 1개 제외한 잔기이고,

[1994] ○(흰 환형)은 A에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 R'에 대한 결합을 나타낸다〕

[1995] 더 구체적으로는, Y 및 Y'에서의, 상기 식 (B-1)의 Y에서 수소 원자를 1개 제외한 잔기는 -N(-)-, -CH(-)-, 또는 상기 식 (B-2)에서 수소 원자를 1개 제외한 기이다. 구조의 간편화 등의 관점에서, Y는 -N(-)-, 또는 -CH(-)-라도 좋다. 또는, 탄소 원자를 기조로 한 구조의 설계 등의 관점에서는, Y는 -CH(-)-, 또는 상기 식 (B-2)에서 수소 원자를 1개 제외한 기라도 좋다.

[1996] 상기 식 (B-2)에서 수소 원자를 1개 제외한 기는 하기 식 (B-2'):

[1997] [화 53]

[1998] 

(B-2')

[1999] (식 중,

[2000] V 및 V'는 동일 또는 상이하며, -NH-, -O-, $-CH_2-$, 또는 단결합이고,

[2001] V1은 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

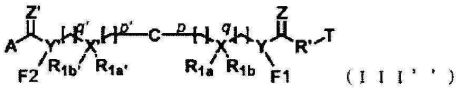
[2002] s는 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[2003] 식 (B-2')에서의 ○ 및 ●은 각각, 식 (B-1)에서의 ○ 및 ●과 같은 배향이다)에서 수소 원자를 1개 제외한 기이다. 식 (B-2')에서의 s의 정의, 예 및 바람직한 예는 식 (B-2)의 것과 동일하다. 따라서, 식 (B-2')에서는 V 및 V'의 한쪽이 -N(-)-, 또는 -CH(-)-라도 좋다. 또는, 식 (B-2')에서는, V1은 상기 (a) 또는 (b)의 2가의 기에서 수소 원자가 1개 제외된 3가의 기라도 좋다. 또는, 식 (B-2')에서는 s개의 $-CH_2-$ 중 하나가

-CH(-)-라도 좋다.

[2004] 이 경우, 상기 식 (III)은 하기 식 (III'')로서 규정할 수 있다.

[2005] [화 54]

[2006] 

(III'')

[2007] 〔식 중,

[2008] A, R, C, F1, F2, p, p', q, q', X, X', R_{1a}, R_{1b}, $R_{1a'}$, $R_{1b'}$, Y, Y', Z 및 Z'의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같다〕

[2009] 상기 식 (LB'(F)'') 및 (III'')에 있어서, C=Z에서의 C(탄소 원자)로부터 C=Z'에서의 C(탄소 원자)까지의 길이는, 상술한 바와 같은 A 및 R을 연결하는 주쇄의 길이와 동일하다. 이들 식에 있어서, C=Z에서의 C로부터 C=Z'에서의 C까지의 길이는 또한, C=Z에서의 C로부터 C=Z'에서의 C를 연결하는 부분 구조의 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)를 구성하는 원자수로서 규정할 수도 있다. 이러한 원자수는 A 및 R을 연결하는 주쇄을 구성하는 원자수와 동일하다. C=Z에서의 C로부터 C=Z'에서의 C를 연결하는 부분 구조의 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)는 환 구조를 포함하고 있지 않아도 포함하고 있어도 좋지만, 환 구조를 포함하고 있지 않은 것이 바람직하다. 당해 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)는, 바람직하게는 펩티드 부분을 포함하지 않는 것이라도 좋다.

[2010] 3-5. 가용성 단백질이 갖는 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 결합 부위(위치 선택성)

[2011] 가용성 단백질 이외의 부분 구조(예, A-L-B'(-F)-R'')는, 가용성 단백질(T)에서의 상술한 바와 같은 표적 영역에 위치 선택적으로 결합시킬 수 있다. 구체적으로는, T가, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하는 경우, 가용성 단백질 이외의 부분 구조는, 당해 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합시킬 수 있다. 표적 영역 및 위치 선택성의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다.

[2012] 3-6. 가용성 단백질이 갖는 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수

[2013] 가용성 단백질(T)이 보유하는, 가용성 단백질 이외의 부분 구조(예, A-L-B'(-F)-R'')의 개수는 변동될 수 있다. 예를 들면, T가 복수의 단량체 단백질을 포함하는 다량체 단백질인 경우, T는, 복수개의 단량체 단백질 중의 대응하는 복수개의 표적 영역에 있어서, T 이외의 부분 구조를 가질 수 있다. 그 결과, T는 T 이외의 부분 구조를 복수개 가질 수 있다. 따라서, 식 (III), (III'), 또는 (III'')로 표시되는 구조는 T가, T 이외의 부분 구조를 1개 또는 복수개 갖고 있어도 좋은 것을 나타낸다. T가 갖는, T 이외의 부분 구조의 개수는 가용성 단백질의 종류, 및 가용성 단백질과 그에 대하여 도입되는 구조 단위와의 반응 비율 등의 조건을 적절히 설정함으로써 조절할 수 있다. 이러한 개수는 가용성 단백질의 종류에 따라서도 다르지만, 예를 들면 1 내지 8, 바람직하게는 1 내지 4, 보다 바람직하게는 1 또는 2라도 좋다.

[2014] 특정한 실시형태에서는, 가용성 단백질이 보유하는 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수는, 가용성 단백질이 복수개의 단량체 단백질로 구성되는 다량체 단백질인 경우, 복수개라도 좋다. 본 발명에 의하면, 복수개의 단량체 단백질의 동일 표적 영역에 대하여 가용성 단백질 이외의 부분 구조를 복수개 도입할 수 있다.

[2015] 바람직한 실시형태에서는, 가용성 단백질은 복수개의 중쇄를 포함하는 항체라도 좋다. 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다. 본 발명에서는, 항체가 보유하는 항체 이외의 부분 구조의 개수는 IgG, IgE, 및 IgD에 대해서는 1개 또는 2개(바람직하게는 2개)이고, IgA에 대해서는 1 내지 4개(바람직하게는 4개)이고, IgM에 대해서는 1 내지 8개(바람직하게는 8개)라도 좋다.

[2016] 3-7. 제조 방법

[2017] 본 발명은, 이하를 포함하는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다:

[2018] (B1) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염을 기능성 물

질과 반응시켜서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염을 생성하는 것.

[2019] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질은 식 (II), 바람직하게는 식 (II'), 보다 바람직하게는 식 (II'')로 표시된다. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체는 식 (III), 바람직하게는 식 (III'), 보다 바람직하게는 식 (III'')로 표시된다.

[2020] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염은, 기능성 물질에 대하여 반응할 수 있는 생체 직교성 관능기를 갖기 때문에 기능성 물질과 반응할 수 있다. 이러한 반응은 상기 「2-6. 제조 방법」에서 언급한 바와 같은, 단백질의 변성·분해(예, 아미드 결합의 절단)를 일으킬 수 없는 조건(온화한 조건) 하에서 적절히 행할 수 있다.

[2021] 반응계에 있어서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염(X)에 대한 기능성 물질(Y)의 몰 비율(Y/X)은, 가용성 단백질(예, 항체) 및 기능성 물질의 종류, 기능성 물질에 의해 수식되어야 할 가용성 단백질 중 부위의 수(예, DAR) 등에 따라 변동하기 때문에 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 0.1 내지 100이고, 바람직하게는 0.5 내지 80이고, 보다 바람직하게는 1 내지 70이고, 더욱더 바람직하게는 2 내지 50이고, 특히 바람직하게는 3 내지 30이다.

[2022] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염의 생성의 확인은 그 구체적인 원료 및 생성물의 분자량에도 따르지만, 예를 들면, 전기영동법, 크로마토그래피(예, 겔 여과 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 컬럼 크로마토그래피, HPLC), 또는 질량 분석에 의해, 바람직하게는 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 위치 선택성의 확인, 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수의 확인, 및 정제는 상기 「2-6. 제조 방법」에서 언급한 방법에 의해 적절히 행할 수 있다.

[2023] 본 발명은 또한, 이하를 포함하는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다:

[2024] (B2) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물 또는 이의 염을 가용성 단백질과 반응시켜서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것; 및

[2025] (B3) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염을 기능성 물질과 반응시켜서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염을 생성하는 것.

[2026] 상기 (B2)의 공정은 상기 「2-6. 제조 방법」에서 언급한 상기 (A1)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (B3)의 공정은 상기 (B1)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (B2) 및 (B3)의 공정은 별도로 행할 수 있다. 또는, 상기 (B2) 및 (B3)의 공정은, 가용성 단백질 중의 반응 표적인 특정한 아미노산 잔기와 반응성기와의 반응쌍, 및 기능성 물질 중의 관능기와 생체 직교성 관능기와의 반응쌍의 조합에 따라, 동시에 행할 수 있다.

[2027] 4. 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염

[2028] 4-1. 제조 방법의 개요

[2029] 본 발명은 식 (IV)로 표시되는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다.

[2030] L1-B-R'-T (IV)

[2031] 〔식 중,

[2032] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[2033] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[2034] R' 는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[2035] T는 가용성 단백질]

[2036] 4-2. (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기(L1)

[2037] 식 (IV)에 있어서, L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이다. 이러한 1가의 기는, 상술한 바와 같은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커의 절단에 의해 생성할 수 있는 1가의 기이다. 따라서, L1은, 상술한 바와 같은 절단성 부분의 잔기 또는 화학 구조의 절단에 의해 생성할 수 있는 1가의 기라도 좋다. 더 구체적으로는, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기는, 상술한 (i) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커의 절단에 의해 생성할 수 있는 1가의 기라도 좋고, (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기는, (ii) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖지 않는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커의 절단에 의해 생성할 수 있는 1가의 기라도 좋다.

[2038] 특정한 실시형태에서는, L1은 하기 식 (L1-1) 또는 (L1-2) 중 어느 하나로 표시되어도 좋다:

[2039] C1-Lb (L1-1)

[2040] C1 (L1-2)

[2041] 〔식 중,

[2042] Lb는 2가의 기이고,

[2043] C1은 생체 직교성 관능기, 또는 생체 직교성 관능기 이외의 기]

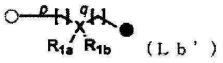
[2044] 2가의 기로서는, 예를 들면, 치환기를 갖고 있어도 좋은 2가의 탄화수소기, 치환기를 갖고 있어도 좋은 2가의 복소환기, -C(=O)-, -NR_a-(R_a는 수소 원자, 또는 치환기를 나타낸다), -O-, -S-, -C(=S)-, 및 이들 2 이상(예를 들면 2 내지 8, 바람직하게는 2 내지 6, 보다 바람직하게는 2 내지 4)의 조합으로 이루어지는 기를 들 수 있다. 2가의 탄화수소기, 2가의 복소환기, 및 치환기의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다.

[2045] 생체 직교성 관능기의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다.

[2046] 생체 직교성 관능기 이외의 기로서는, 예를 들면, 상술한 치환기 중, 생체 직교성 관능기 이외의 것을 들 수 있다. 생체 직교성 관능기 이외의 이러한 기로서는, 예를 들면, 알킬, 사이클로알킬, 아르알킬, 1가의 복소환기, 하이드록실, 아미노, 알킬옥시(알콕시), 사이클로알킬옥시(아르알킬옥시)를 들 수 있다. 이들의 기 및 이들의 기의 구성 요소(예, 알킬옥시(알콕시)에서의 알킬, 사이클로알킬옥시에서의 사이클로알킬, 및 아르알킬옥시에서의 아르알킬)의 정의, 예 및 바람직한 예에 대해서는 상술한 것과 동일하다.

[2047] 특정한 실시형태에서는, Lb는 하기(Lb'):

[2048] [화 55]

[2049]  (Lb')

[2050] 〔식 중,

[2051] p는 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[2052] q는 0 내지 10의 임의의 정수이고,

[2053] X는 탄소 원자, 질소 원자, 또는 단결합(여기서, X가 질소 원자인 경우, R_{1b}는 존재하지 않는다. X가 단결합인 경우, R_{1a} 및 R_{1b}는 존재하지 않는다)이고,

[2054] R_{1a}, 및 R_{1b}는 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 또는 상술한 치환기로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.

[2055] ○(흰 환형)은 C1에 대한 결합을 나타내고, ●(검은 환형)은 B에 대한 결합을 나타낸다] 로 표시되어도 좋다.

[2056] p, q, 및 X, 및 R_{1a}, 및 R_{1b}(치환기)의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다.

[2057] 4-3. 부분 구조 「L1-B」

[2058] 4-3-1. L1 말단 부분 및 R'를 연결하는 부분 구조 「L1-B」의 길이

[2059] 식 (IV)에 있어서, 절단에 의해 생성된 L1 말단 부분(또는 C1 말단 부분) 및 R'를 연결하는 부분 구조(「L1-B」 중의 직쇄 부분)의 길이(또는, 식 (IV) 등의 특정한 식에 한정되지 않는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염에 있어서의, 생체 직교성 관능기 및 특정한 아미노산 잔기의 측쇄를 연결하는 주쇄의 원자수. 이하 동일)는, 상기 「1-6-1. A 및 R을 연결하는 부분 구조 「L-B」 중의 주쇄의 길이」에서 언급한 바와 같은 다양한 인자에 따라, 적절히 설계할 수 있다.

[2060] 절단에 의해 생성된 L1 말단 부분(또는 C1 말단 부분) 및 R'를 연결하는 부분 구조의 길이는, 예를 들면 약 2.5Å 이상, 바람직하게는 약 4Å 이상, 보다 바람직하게는 약 5Å 이상이라도 좋다. 부분 구조의 길이는 또한, 예를 들면 약 15Å 이하, 바람직하게는 약 12Å 이하, 보다 바람직하게는 약 8Å 이하라도 좋다. 더 구체적으로는, 부분 구조의 길이는, 예를 들면 약 2.5 내지 15Å, 바람직하게는 약 4 내지 12Å, 보다 바람직하게는 약 5 내지 8Å이라도 좋다.

[2061] 더 구체적으로는, 절단에 의해 생성된 L1 말단 부분(또는 C1 말단 부분) 및 R'를 연결하는 부분 구조의 길이는, 부분 구조의 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)를 구성하는 원자수로서 규정할 수도 있다. 연결쇄를 구성하는 원자수는, 예를 들면 2개(약 2.5Å) 이상, 바람직하게는 3개(약 4Å) 이상, 보다 바람직하게는 4개(약 5Å) 이상이라도 좋다. 연결쇄를 구성하는 원자수는 또한, 예를 들면 10개(약 15Å) 이하, 바람직하게는 8개(약 12Å) 이하, 보다 바람직하게는 6개(약 8Å) 이하라도 좋다. 더 구체적으로는, 연결쇄를 구성하는 원자수는, 예를 들면 2 내지 10개, 바람직하게는 3 내지 8개, 보다 바람직하게는 4 내지 6개라도 좋다.

[2062] 절단에 의해 생성된 L1 말단 부분(또는 C1 말단 부분) 및 R'를 연결하는 부분 구조의 연결쇄가 2가의 환 구조를 포함하지 않는 쇄상 구조인 경우, 연결쇄의 원자수는 연결쇄 중의 원자수를 셈으로써 결정할 수 있다.

[2063] 한편, 절단에 의해 생성된 L1 말단 부분(또는 C1 말단 부분) 및 R'를 연결하는 부분 구조의 연결쇄가 2가의 환 구조를 포함하는 구조인 경우, 연결쇄의 원자수와 상술한 길이는 반드시 대응하지 않고, 연결쇄의 원자수에 의해 규정될 수 있는 길이는 상술한 길이보다도 짧아지는 경향이 있다. 이러한 경우라도, 원자수에 의해 연결쇄의 길이를 규정하는 관점에서, 연결쇄의 원자수를 편의적으로 셀 수 있다. 구체적으로는, 이러한 경우에서의 연결쇄의 원자수는 상술한 바와 같이, 연결쇄에 있어서 2가의 환 구조를 포함하지 않는 쇄상 구조 중의 원자수에 더하여, 2가의 환 구조 중의 2개의 결합수를 연락하는 최단 경로의 원자수를 셈으로써 결정해도 좋다.

[2064] 바람직하게는, 절단에 의해 생성된 L1 말단 부분(또는 C1 말단 부분) 및 R'를 연결하는 부분 구조의 연결쇄는 2가의 환 구조를 포함하지 않는 쇄상 구조라도 좋다. 이 경우, 절단에 의해 생성된 말단 부분 및 R'를 연결하는 부분 구조의 연결쇄에 있어서 2가의 환기가 포함되지 않도록 L1-B를 적절히 설계할 수 있다.

[2065] 특정한 실시형태에서는, L1-B로 표시되는 부분 구조는, 바람직하게는 펩티드 부분을 포함하지 않는다. 이 경우, 본 발명의 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질을 사용하여 수득되는 본 발명의 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질(예, 항체 약물 복합체)은, 면역원성을 가질 수 있는 펩티드 부분을 링커로서 포함할 수 없다는 이점이 있다.

[2066] 4-3-2. 부분 구조 「L1-B」의 구체적 구조

[2067] 상기 식 (IV)에 있어서, L1 및 B는 서로 연관될 수 있는 구조이다. 따라서, 상기 식 (IV)에 있어서, L1 및 B는 「L1-B」로 표시되는 부분 구조로서 규정할 수 있다.

[2068] 특정한 실시형태에서는, L1이 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기인 경우, B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이다.

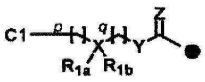
[2069] 바람직하게는, L1이 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기인 경우, B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이다. 이 경우, (i')에서의 생체 직교성 관능기는 (a)에서의 생체 직교성 관능기와 동종이라도 이종이라도 좋다. 보다 단순한 구조의 채용, 및/또는 단일의 기능성 물질에 대한 반응성의 향상 등의 관점에서는, (i')에서의 생체 직교성 관능기는 (a)에서의 생체 직교성 관능기와 동종이라도 좋다. 한편, 2종 이상의 기능성 물질에 대한 차별화된 반응성의 확보 등, 및 반응에서의 일부의 생체 직교성 관능기의 불사용의 관점에서는, (i')에서의 생체 직교성 관능기는 (a)에서의 생체 직교성 관능기와 이종이라도 좋다.

[2070] 또는, L1이 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기인 경우, B는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기라도 좋다. 이 경우, 식 (IV)로 표시되는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염은 보다 단순한 구조를 갖게 되므로, 합성이 용이하다.

[2071] 다른 특정한 실시형태에서는, L1이 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기인 경우, B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이다.

[2072] 특정한 실시형태에서는, L1-B로 표시되는 구조 단위는 하기 식 (L1B')로 표시되어도 좋다.

[2073] [화 56]

[2074] 
(L1B')

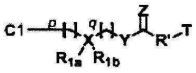
[2075] 〔식 중,

[2076] C1, p, q, X, R_{1a}, R_{1b}, Y, 및 Z의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같고,

[2077] ●(검은 환형)은 R'에 대한 결합을 나타낸다〕

[2078] 따라서, 상기 식 (IV)은 하기 식 (IV')로서 규정할 수 있다.

[2079] [화 57]

[2080] 
(IV')

[2081] 〔식 중,

[2082] C1, p, q, X, R_{1a}, R_{1b}, Y, Z, R', 및 T의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같다〕

[2083] 상기 식 (L1B') 및 (IV')에 있어서, C=Z에서의 C로부터 C1까지의 길이는, 절단에 의해 생성된 L1 말단 부분(또는 C1 말단 부분) 및 R'를 연결하는 부분 구조의 길이와 동일하다. 이들 식에 있어서, C=Z에서의 C로부터 C1까지의 길이는 또한, C=Z에서의 C로부터 C1까지의 부분 구조의 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)를 구성하는 원자수로서 규정할 수도 있다. 이러한 원자수는, 절단에 의해 생성된 L1 말단 부분(또는 C1 말단) 및 R'를 연결하는 부분 구조(수소 원자 및 치환기를 제외한다)을 구성하는 원자수와 동일하다. C=Z에서의 C로부터 C1을 연결하는 부분 구조의 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)는 환 구조를 포함하고 있지 않아도 포함하고 있어도 좋지만, 환 구조를 포함하고 있지 않은 것이 바람직하다. 당해 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)는, 바람직하게는 펩티드 부분을 포함하지 않는 것이라도 좋다.

[2084] 4-4. 가용성 단백질이 갖는 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 결합 부위(위치 선택성)

[2085] 가용성 단백질 이외의 부분 구조(예, L1-B-R')는, 가용성 단백질(T)에서의 상술한 바와 같은 표적 영역에 위치 선택적으로 결합시킬 수 있다. 구체적으로는, T가, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하는 경우, 가용성 단백질 이외의 부분 구조는, 당해 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합시킬 수 있다. 표적 영역 및 위치 선택성의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다.

[2086] 4-5. 가용성 단백질이 갖는 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수

[2087] 가용성 단백질(T)이 보유하는, 가용성 단백질 이외의 부분 구조(예, L1-B-R')의 개수는 변동될 수 있다. 예를 들면, T가 복수의 단량체 단백질을 포함하는 다량체 단백질인 경우, T는, 복수개의 단량체 단백질 중의 대응하는 복수개의 표적 영역에 있어서, T 이외의 부분 구조를 가질 수 있다. 그 결과, T는 T 이외의 부분 구조를 복수개 가질 수 있다. 따라서, 식 (IVI), (IV'), 또는 IV'')로 표시되는 구조는 T가, T 이외의 부분 구조를 1개 또는 복수개 갖고 있어도 좋은 것을 나타낸다. T가 갖는, T 이외의 부분 구조의 개수는 가용성 단백질의 종류, 및 가용성 단백질과 그에 대하여 도입되는 구조 단위와의 반응 비율 등의 조건을 적절히 설정함으로써 조절할 수 있다. 이러한 개수는 가용성 단백질의 종류에 따라서도 다르지만, 예를 들면 1 내지 8, 바람직하게는 1 내지 4, 보다 바람직하게는 1 또는 2라도 좋다.

[2088] 특정한 실시형태에서는, 가용성 단백질이 보유하는 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수는, 가용성 단백질이 복수개의 단량체 단백질로 구성되는 다량체 단백질인 경우, 복수개라도 좋다. 본 발명에 의하면, 복수개의 단량체 단백질의 동일 표적 영역에 대하여 가용성 단백질 이외의 부분 구조를 복수개 도입할 수 있다.

[2089] 바람직한 실시형태에서는, 가용성 단백질은 복수개의 중쇄를 포함하는 항체라도 좋다. 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다. 본 발명에서는, 항체가 보유하는 항체 이외의 부분 구조의 개수는 IgG, IgE, 및 IgD에 대해서는 1개 또는 2개(바람직하게는 2개)이고, IgA에 대해서는 1 내지 4개(바람직하게는 4개)이고, IgM에 대해서는 1 내지 8개(바람직하게는 8개)라도 좋다.

[2090] 4-6. 제조 방법

[2091] 본 발명은 이하를 포함하는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다:

[2092] (C1) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것.

[2093] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질은 식 (II), 바람직하게는 식 (II'), 보다 바람직하게는 식 (II'')로 표시된다. 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질은 식 (IV), 바람직하게는 식 (IV'), 보다 바람직하게는 식 (IV'')로 표시된다.

[2094] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염은, 상술한 바와 같은 절단 처리에 의해 절단할 수 있는 절단성 부분을 갖기 때문에, 절단할 수 있다. 이러한 절단 반응은 상기 「2-6. 제조 방법」에서 언급한 바와 같은, 단백질의 변성·분해(예, 아미드 결합의 절단)를 일으킬 수 없는 조건(온화한 조건) 하에서 적절히 행할 수 있다.

[2095] 절단 처리로서는, 예를 들면, (a) 산성 물질, 염기성 물질, 환원제, 산화제, 효소로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 물질에 의한 처리, (b) 광으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 물리 화학적 자극에 의한 처리, 또는 (c) 자기 분해성의 절단성 부분을 포함하는 절단성 링커를 사용한 경우의 방치를 들 수 있다. 이러한 절단 처리의 조건은 당해 분야에서의 기술 상식이다(예, G. Leriche, L. Chisholm, A. Wagner, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 20, 571(2012); Feng P. et al., Jounal of American Chemical Society. 132, 1500(2010).; Bessodes M. et al., Journal of Controlled Release, 99, 423(2004).; DeSimone, J. M., Journal of American Chemical Society. 132, 17928(2010); Thompson, D. H., Journal of Controlled Release, 91, 187(2003); Schoenmarks, R. G., Journal of Controlled Release, 95, 291(2004)).

[2096] 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 생성의 확인은 그 구체적인 원료 및 생성물의 분자량에도 따르지만, 예를 들면, 전기영동법, 크로마토그래피(예, 겔 여과 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 컬럼 크로마토그래피, HPLC), 또는 질량 분석에 의해, 바람직하게는 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 위치 선택성의 확인, 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수의 확인, 및 정제는 상기 「2-6. 제조 방법」에서 언급한 방법에 의해 적절히 행할 수 있다.

[2097] 본 발명은 또한 이하를 포함하는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다:

[2098] (C2) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물 또는 이의 염을 가용성 단백질과 반응시켜서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것; 및

[2099] (C3) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것.

[2100] 상기 (C2)의 공정은, 상기 「2-6. 제조 방법」에서 언급한 상기 (A1)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (C3)의 공정은, 상기 (C1)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (C2) 및 (C3)의 공정은 별도로 행할 수 있다. 또는, 상기 (C2) 및 (C3)의 공정은, 반응성기와, 절단에 의해 생성될 수 있는 생체 직교성 관능기의 조합(비반응성) 등의 인자에 따라, 동시에 행할 수 있다.

[2101] 5. 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법

[2102] 5-1. 개요

[2103] 본 발명은, 식 (V)로 표시되는 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다.

[2104] F-(L1-B)'-R'-T (V)

[2105] 〔식 중,

[2106] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[2107] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[2108] (L1-B)'로 표시되는 구조 단위는 기능성 물질과, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기 중 어느 한쪽 또는 쌍방 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 구조 단위이고,

[2109] F는 기능성 물질이고,

[2110] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[2111] T는 가용성 단백질이다〕

[2112] 5-2. 부분 구조 「F-(L1-B)'」

[2113] 5-2-1. F 및 R'를 연결하는 부분 구조 「L1-B」의 길이

[2114] 식 (V)에 있어서, F 및 R'를 연결하는 부분 구조 「L1-B」 (「L1-B」 중의 직쇄 부분)의 길이(또는, 식 (V) 등의 특정한 식에 한정되지 않는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염에 있어서의, 기능성 물질 및 특정한 아미노산 잔기의 측쇄를 연결하는 주쇄의 원자수, 또는 기능성 물질이 생체 직교성 관능기를 통하여 가용성 단백질에 결합하고 있는 경우에는, 생체 직교성 관능기 및 특정한 아미노산 잔기의 측쇄를 연결하는 주쇄의 원자수. 이하 동일)는, 상기 「1-6-1. A 및 R을 연결하는 부분 구조 「L-B」 중의 주쇄의 길이」에서 언급한 바와 같은 다양한 인자에 따라, 적절히 설계할 수 있다.

[2115] F 및 R'를 연결하는 부분 구조의 길이는, 예를 들면 약 2.5Å 이상, 바람직하게는 약 4Å 이상, 보다 바람직하게는 약 5Å 이상이라도 좋다. 부분 구조의 길이는 또한, 예를 들면 약 15Å 이하, 바람직하게는 약 12Å 이하, 보다 바람직하게는 약 8Å 이하라도 좋다. 더 구체적으로는, 부분 구조의 길이는, 예를 들면 약 2.5 내지 15Å, 바람직하게는 약 4 내지 12Å, 보다 바람직하게는 약 5 내지 8Å이라도 좋다.

[2116] 더 구체적으로는, F 및 R'를 연결하는 부분 구조의 길이는, 부분 구조의 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)를 구성하는 원자수로서 규정할 수도 있다. 연결쇄를 구성하는 원자수는, 예를 들면 2개(약 2.5Å) 이상, 바람직하게는 3개(약 4Å) 이상, 보다 바람직하게는 4개(약 5Å) 이상이라도 좋다. 연결쇄를 구성하는 원자수는 또한, 예를 들면 10개(약 15Å) 이하, 바람직하게는 8개(약 12Å) 이하, 보다 바람직하게는 6개(약 8Å) 이하라도 좋다. 더 구체적으로는, 연결쇄를 구성하는 원자수는, 예를 들면 2 내지 10개, 바람직하게는 3 내지 8개, 보다 바람직하게는 4 내지 6개라도 좋다.

[2117] F 및 R'를 연결하는 부분 구조의 연결쇄가 2가의 환 구조를 포함하지 않는 쇄상 구조인 경우, 연결쇄의 원자수는 연결쇄 중의 원자수를 셈으로써 결정할 수 있다.

[2118] 한편, F 및 R'를 연결하는 부분 구조의 연결쇄가 2가의 환 구조를 포함하는 구조인 경우, 연결쇄의 원자수와 상술한 길이는 반드시 대응하지 않고, 연결쇄의 원자수에 의해 규정될 수 있는 길이는 상술한 길이보다도 짧아지는 경향이 있다. 이러한 경우라도, 원자수에 의해 연결쇄의 길이를 규정하는 관점에서, 연결쇄의 원자수를 편의적으로 셀 수 있다. 구체적으로는, 이러한 경우에서의 연결쇄의 원자수는 상술한 바와 같이, 연결쇄에 있어서 2가의 환 구조를 포함하지 않는 쇄상 구조 중의 원자수에 더하여, 2가의 환 구조 중의 2개의 결합수를 연락하는 최단 경로의 원자수를 셈으로써 결정해도 좋다.

[2119] 바람직하게는, F 및 R'를 연결하는 부분 구조의 연결쇄는 2가의 환 구조를 포함하지 않는 쇄상 구조라도 좋다. F 및 R'를 연결하는 부분 구조의 연결쇄에 있어서 2가의 환기가 포함되지 않도록 L1-B를 적절히 설계할 수 있다.

[2120] 특정한 실시형태에서는, L1-B로 표시되는 부분 구조는, 바람직하게는 펩티드 부분을 포함하지 않는다. 이 경우, 본 발명의 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질(예, 항체 약물 복합체)은, 면역원성을 가질 수 있는 펩티드

부분을 링커로서 포함하지 않는다는 이점이 있다.

[2121] 5-2-2. 부분 구조 「F-(L1-B)'」의 구체적 구조

[2122] 식 (V)에 있어서, F-(L1-B)'에서의 L1 및 B는 서로 연관될 수 있는 구조이다. 따라서, 상기 식 (V)에 있어서, L1 및 B는 「L1-B」로 표시되는 부분 구조로서 규정할 수 있다.

[2123] 또한, F-(L1-B)'로 표시되는 구조 단위는, 기능성 물질과, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기 중 어느 한쪽 또는 쌍방 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이다. 반응에 제공된 생체 직교성 관능기는 식 (V)에 있어서 존재하지 않는다. 따라서, 식 (V)에 있어서, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기 중 어느 한쪽 또는 쌍방은 존재하지 않는다. 기능성 물질과, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기 중 어느 한쪽 또는 쌍방 사이의 반응에 의해 생성되는 부분은, 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분과 같다. 따라서, 본 명세서에 있어서, 기능성 물질과, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기 중 어느 한쪽 또는 쌍방 사이의 반응에 의해 생성되는 부분의 예(잔기의 명칭) 및 구체적인 예(화학 구조식)는, 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분에 대하여 상술한 것과 같다.

[2124] 일 실시형태에서는, L1이 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기인 경우, B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이다.

[2125] 바람직한 실시형태에서는, L1이 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기인 경우, B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이다. 이 경우, (i')에서의 생체 직교성 관능기는 (a)에서의 생체 직교성 관능기와 동종이라도 이종이라도 좋다. 보다 단순한 구조의 채용, 및/또는 단일의 기능성 물질에 대한 반응성의 향상 등의 관점에서는, (i')에서의 생체 직교성 관능기는 (a)에서의 생체 직교성 관능기와 동종이라도 좋다. 한편, 2종 이상의 기능성 물질에 대한 차별화된 반응성의 확보, 및 반응에서의 일부의 생체 직교성 관능기의 불사용 등의 관점에서는, (i')에서의 생체 직교성 관능기는 (a)에서의 생체 직교성 관능기와 이종이라도 좋다.

[2126] 다른의 바람직한 실시형태에서는, L1이 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기인 경우, B는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기라도 좋다. 이 경우, 식 (V)로 표시되는, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염은 보다 단순한 구조를 갖게 되므로, 합성이 용이하다.

[2127] 다른 실시형태에서는, L1이 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기인 경우, B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기이다.

[2128] 특정한 실시형태에서는, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기가 이종인 경우, 식 (V)로 표시되는, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염은 식 (V1) 또는 (V2)로 표시되어도 좋다.

[2129] L1-B'(-F)-R'-T (V1)

[2130] 〔식 중,

[2131] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[2132] B'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[2133] F는 기능성 물질이고,

[2134] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[2135] T는 가용성 단백질이다〕

[2136] F-L1'-B-R'-T (V2)

[2137] 〔식 중,

[2138] L1'는 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[2139] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[2140] F는 기능성 물질이고,

[2141] R' 는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[2142] T는 가용성 단백질이다]

[2143] L1' 는 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이다. 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분은, 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분과 같다. 따라서, 본 명세서에 있어서, 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분의 예(잔기의 명칭) 및 구체적인 예(화학 구조식)는, 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분에 대하여 상술한 것과 같다. 따라서, 기능성 물질이 생체 직교성 관능기와 반응하므로, 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기(L1')는, 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기로 표현할 수도 있다(이하 동일). L1' 에서의, 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기의 정의, 예 및 바람직한 예는 B' 에서의, 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기인 것과 동일하여도 좋다.

[2144] 다른 특정한 실시형태에서는, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기가 동종 또는 이종인 경우, 식 (V)로 표시되는, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염은 식 (V3)로 표시되어도 좋다.

[2145] Fa-L1' -B' (-Fb)-R' -T (V3)

[2146] 〔식 중,

[2147] L1' 는 기능성 물질과, (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

[2148] B' 는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기이고,

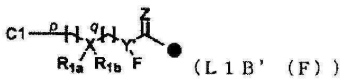
[2149] Fa 및 Fb는 각각, 동일 또는 다른 기능성 물질이고,

[2150] R' 는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[2151] T는 가용성 단백질〕

[2152] 특정한 실시형태에서는, 상기 식 (V1)에 있어서, L1-b' (-F)로 표시되는 구조 단위는 하기 식 (FL1' B)로 표시되어도 좋다.

[2153] [화 58]

[2154]  (L 1 B' (F))

[2155] 〔식 중,

[2156] F, C1, p, q, X, R_{1a}, R_{1b}, 및 Z의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같고,

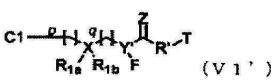
[2157] Y' 는 상기 식 (B-1)의 Y에서 수소 원자를 1개 제외한 잔기이고,

[2158] ●(검은 환형)은 R' 에 대한 결합을 나타낸다〕

[2159] 상기 식 (B-1)의 Y에서 수소 원자를 1개 제외한 잔기의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 동일하다.

[2160] 따라서, 상기 식 (V1)은 하기 식 (V1')로서 규정할 수 있다.

[2161] [화 59]

[2162]  (V 1')

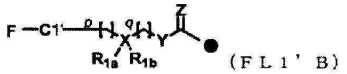
[2163] 〔식 중,

[2164] F, C1, p, q, X, R_{1a}, R_{1b}, Z, R' , 및 T의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같고,

[2165] Y’ 는 상기 식 (B-1)의 Y에서 수소 원자를 1개 제외한 잔기]

[2166] 특정한 실시형태에서는, 상기 식 (V2)에 있어서, F-L1’-B로 표시되는 구조 단위는 하기 식 (FL1’B)로 표시되어도 좋다.

[2167] [화 60]

[2168] 
(FL1’B)

[2169] 〔식 중,

[2170] F, p, q, X, R_{1a}, R_{1b}, Y, 및 Z의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같고,

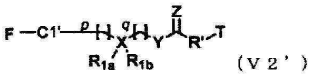
[2171] C1’ 는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[2172] ●(검은 환형)은 R’ 에 대한 결합을 나타낸다]

[2173] C1’ 는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이다. C1’ 에서의, 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분의 정의, 예 및 바람직한 예는, 상기 「3-3. 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 기(B’)」에서 언급한 것과 동일하다(이하 동일).

[2174] 따라서, 상기 식 (V2)은 하기 식 (V2’)로서 규정할 수 있다.

[2175] [화 61]

[2176] 
(V2’)

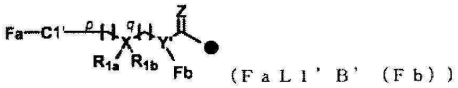
[2177] 〔식 중,

[2178] F, p, q, X, R_{1a}, R_{1b}, Y, Z, R’, 및 T의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같고,

[2179] C1’ 는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분]

[2180] 특정한 실시형태에서는, 상기 식 (V3)에 있어서, Fa-L1’-B’(-Fb)로 표시되는 구조 단위는 하기 식 (FaL1’b’(Fb))로 표시되어도 좋다.

[2181] [화 62]

[2182] 
(FaL1’B’(Fb))

[2183] 〔식 중,

[2184] Fa, Fb, p, q, X, R_{1a}, R_{1b}, 및 Z의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같고,

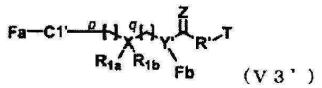
[2185] C1’ 는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[2186] Y’ 는 상기 식 (B-1)의 Y에서 수소 원자를 1개 제외한 잔기이고,

[2187] ●(검은 환형)은 R’ 에 대한 결합을 나타낸다]

[2188] 따라서, 상기 식 (V3)은 하기 식 (V3’)로서 규정할 수 있다.

[2189] [화 63]

[2190] 
(V3’)

[2191] 〔식 중,

[2192] Fa, Fb, p, q, X, R_{1a}, R_{1b}, Z, R', 및 T의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 같고,

[2193] C1'는 기능성 물질과 생체 직교성 관능기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[2194] Y'는 상기 식 (B-1)의 Y에서 수소 원자를 1개 제외한 잔기]

[2195] 상기 식 (L1B'(F)), (FL1'B), 및 (FaL1'B'(F2)), 및 (V1'), (V2') 및 (V3')에 있어서, C=Z에서의 C로부터 C1까지의 길이는, 절단에 의해 생성된 L1 말단 부분(또는 C1 말단 부분) 및 R'를 연결하는 부분 구조의 길이와 동일하다. 이들 식에 있어서, C=Z에서의 C로부터 C1까지의 길이는 또한, C=Z에서의 C로부터 C1까지의 부분 구조의 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)를 구성하는 원자수로서 규정할 수도 있다. 이러한 원자수는, 절단에 의해 생성된 L1 말단 부분(또는 C1 말단) 및 R'를 연결하는 부분 구조(수소 원자 및 치환기를 제외한다)을 구성하는 원자수와 동일하다. C=Z에서의 C로부터 C1을 연결하는 부분 구조의 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)는 환 구조를 포함하고 있지 않아도 포함하고 있어도 좋지만, 환 구조를 포함하고 있지 않은 것이 바람직하다. 당해 연결쇄(수소 원자 및 치환기를 제외한다)는, 바람직하게는 펩티드 부분을 포함하지 않는 것이라도 좋다.

[2196] 5-3. 가용성 단백질이 갖는 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 결합 부위(위치 선택성)

[2197] 가용성 단백질 이외의 부분 구조(예, F-(L1-B)'-R')는, 가용성 단백질(T)에서의 상술한 바와 같은 표적 영역에 위치 선택적으로 결합시킬 수 있다. 구체적으로는, T가, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하는 경우, 가용성 단백질 이외의 부분 구조는, 당해 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합시킬 수 있다. 표적 영역 및 위치 선택성의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다.

[2198] 5-4. 가용성 단백질이 갖는 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수

[2199] 가용성 단백질(T)이 보유하는, 가용성 단백질 이외의 부분 구조(예, F-(L1-B)'-R')의 개수는 변동될 수 있다. 예를 들면, T가 복수의 단량체 단백질을 포함하는 다량체 단백질인 경우, T는, 복수개의 단량체 단백질 중의 대응하는 복수개의 표적 영역에 있어서, T 이외의 부분 구조를 가질 수 있다. 그 결과, T는 T 이외의 부분 구조를 복수개 가질 수 있다. 따라서, 식 (V), (V1), (V2), (V3), (V1'), (V2'), 또는 (V3')로 표시되는 구조는 T가, T 이외의 부분 구조를 1개 또는 복수개 갖고 있어도 좋은 것을 나타낸다. T가 갖는, T 이외의 부분 구조의 개수는 가용성 단백질의 종류, 및 가용성 단백질과 그에 대하여 도입되는 구조 단위와의 반응 비율 등의 조건을 적절히 설정함으로써 조절할 수 있다. 이러한 개수는 가용성 단백질의 종류에 따라서도 다르지만, 예를 들면 1 내지 8, 바람직하게는 1 내지 4, 보다 바람직하게는 1 또는 2라도 좋다.

[2200] 특정한 실시형태에서는, 가용성 단백질이 보유하는 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수는, 가용성 단백질이 복수개의 단량체 단백질로 구성되는 다량체 단백질인 경우, 복수개라도 좋다. 본 발명에 의하면, 복수개의 단량체 단백질의 동일 표적 영역에 대하여 가용성 단백질 이외의 부분 구조를 복수개 도입할 수 있다.

[2201] 바람직한 실시형태에서는, 가용성 단백질은 복수개의 중쇄를 포함하는 항체라도 좋다. 항체의 정의, 예, 및 바람직한 예는 상술한 바와 같다. 본 발명에서는, 항체가 보유하는 항체 이외의 부분 구조의 개수는 IgG, IgE, 및 IgD에 대해서는 1개 또는 2개(바람직하게는 2개)이고, IgA에 대해서는 1 내지 4개(바람직하게는 4개)이고, IgM에 대해서는 1 내지 8개(바람직하게는 8개)라도 좋다.

[2202] 5-5. 제조 방법

[2203] 본 발명은, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다. 본 제조 방법은, (D) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염을 원료로서 사용하는 방법(도 2의 반응(3)을 참조), 및 (E) 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 원료로서 사용하는 방법(도 2의 반응(5)을 참조)으로 분류할 수 있다.

[2204] (D) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염을 원료로서 사용하는 방법은, 이하를 포함한다:

[2205] (D1) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것.

[2206] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체는 식 (III), 바람직하게는 식 (III'), 보다 바람직하게는 식 (III'')로 표시된다. 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질은 식 (V), 바람직하게는 식 (V1), (V2), 또는 (V3), 보다 바람직하게는 식 (V1'), (V2'), 또는 (V3')로 표시된다.

[2207] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염은, 상술한 바와 같은 절단 처리에 의해 절단할 수 있는 절단성 부분을 갖기 때문에, 절단할 수 있다. 이러한 절단 반응은 상기 「4-6. 제조 방법」에서 언급한 바와 같은 양식에서 행할 수 있다.

[2208] 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 생성의 확인은 그 구체적인 원료 및 생성물의 분자량에도 따르지만, 예를 들면, 전기영동법, 크로마토그래피(예, 겔 여과 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 컬럼 크로마토그래피, HPLC), 또는 질량 분석에 의해, 바람직하게는 질량 분석에 의해 행할 수 있다. 위치 선택성의 확인, 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수의 확인, 및 정제는 상기 「2-6. 제조 방법」에서 언급한 방법에 의해 적절히 행할 수 있다.

[2209] 본 발명은 또한, 이하를 포함하는 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다:

[2210] (D2) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염을 기능성 물질과 반응시켜서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염을 생성하는 것; 및

[2211] (D3) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것.

[2212] 상기 (D2)의 공정은, 상기 「3-7.제조 방법」에서 언급한 상기 (B1)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (D3)의 공정은, 상기 (D1)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (D2) 및 (D3)의 공정은 별도로 행할 수 있다. 또는, 상기 (D2) 및 (D3)의 공정은 절단성 부분, 기능성 물질 및 생체 직교성 관능기의 조합 등의 인자에 따라, 동시에 행할 수 있다.

[2213] 본 발명은 또한, 이하를 포함하는 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다:

[2214] (D4) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물 또는 이의 염을 가용성 단백질과 반응시켜서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것;

[2215] (D5) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염을 기능성 물질과 반응시켜서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염을 생성하는 것; 및

[2216] (D6) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것.

[2217] 상기 (D4)의 공정은, 상기 「2-6. 제조 방법」에서 언급한 상기 (A1)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (D5) 및 (D6)의 공정은, 상기 (D2) 및 (D3)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (D5)의 공정은, 상기 「3-7.제조 방법」에서 언급한 상기 (B1)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (D6)의 공정은, 상기 (D1)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (D4) 내지 (D6)의 공정은 별도로 행할 수 있다. 또는, 상기 (D4) 내지 (D6)의 공정의 적어도 일부는 반응성기, 절단성 부분, 기능성 물질 및 생체 직교성 관능기의 조합 등의 인자에 따라, 동시에 행할 수 있다.

[2218] (E) 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 원료로서 사용하는 방법은, 이하를 포함한다:

[2219] (E1) 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 기능성 물질과 반응시켜서, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것.

[2220] 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질은 식 (IV), 바람직하게는 식 (IV')로 표시된다. 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질은 식 (V), 바람직하게는 식 (V1), (V2), 또는 (V3), 보다 바람직하게는 식 (V1'), (V2'), 또는 (V3')로 표시된다.

[2221] 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질은 또는 이의 염은, 생체 직교성 관능기를 갖기 때문에 기능성 물질과

반응할 수 있다. 이러한 반응은, 상기 「3-7.제조 방법」에서 언급한 바와 같은 양식에서 행할 수 있다.

[2222] 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 생성의 확인은 상술한 바와 같은 방법에 의해 행할 수 있다. 위치 선택성의 확인, 가용성 단백질 이외의 부분 구조의 개수의 확인, 및 정제는 상기 「2-6. 제조 방법」에서 언급한 방법에 의해 적절히 행할 수 있다.

[2223] 본 발명은 또한, 이하를 포함하는 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다:

[2224] (E2) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것; 및

[2225] (E3) 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 기능성 물질과 반응시켜서, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것.

[2226] 상기 (E2)의 공정은, 상기 「4-6. 제조 방법」에서 언급한 상기 (C1)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (E3)의 공정은, 상기 (E1)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (E2) 및 (E3)의 공정은 별도로 행할 수 있다. 또는, 상기 (E2) 및 (E3)의 공정은 절단성 부분, 기능성 물질 및 생체 직교성 관능기의 조합 등의 인자에 따라, 동시에 행할 수 있다.

[2227] 본 발명은 또한, 이하를 포함하는 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다:

[2228] (E4) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 포함하는 화합물 또는 이의 염을 가용성 단백질과 반응시켜서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것;

[2229] (E5) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 포함하는 가용성 단백질 또는 이의 염의 절단성 부분을 절단하여, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것; 및

[2230] (E6) 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 기능성 물질과 반응시켜서, 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 생성하는 것.

[2231] 상기 (E4)의 공정은, 상기 「2-6. 제조 방법」에서 언급한 상기 (A1)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (E5) 및 (E6)의 공정은, 상기 (E2) 및 (E3)의 공정과 동일하게 하여 행할 수 있다. 상기 (E4) 내지 (E6)의 공정은 별도로 행할 수 있다. 또는, 상기 (E4) 내지 (E6)의 공정의 적어도 일부는 반응성기, 절단성 부분, 기능성 물질 및 생체 직교성 관능기의 조합 등의 인자에 따라, 동시에 행할 수 있다.

[2232] 6. 생체 직교성 관능기를 위치 특이적으로 갖는 특정한 가용성 단백질 또는 이의 염, 및 그 제조 방법

[2233] 본 발명은 또한, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 제공한다. 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 본 발명의 가용성 단백질 또는 이의 염은, 가용성 단백질이, 연속하는 1개 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하고, 또한 생체 직교성 관능기가 펩티드 부분을 포함하지 않는 링커를 통하여, 상기 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염이다.

[2234] 특정한 실시형태에서는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 본 발명의 가용성 단백질 또는 이의 염은 하기 식 (IV):

[2235] L1-B-R'-T (IV)

[2236] 〔식 중,

[2237] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[2238] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[2239] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[2240] T는 가용성 단백질이고,

[2241] 상기 가용성 단백질은, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다〕로 표시되고, 또한 L1-B-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염이라도 좋다.

[2242] 본 발명은 또한, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다.

[2243] 종래의 방법에서는 상기한 바와 같은, 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 제조할 수 없었지만, 본 발명자들이 개발한 방법에 의하면, 이러한 생체 직교성 관능기를 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 제조할 수 있다. 생체 직교성 관능기, 위치 선택성, 가용성 단백질, 표적 영역, 링커 등의 요건, 및 L1에서의 (i') 및 (ii'), B에서의 (a) 및 (b), R', 및 T, 및 이들 요건의 일부의 기술 요소의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 동일하다. 제조 방법의 공정의 상세도 또한, 위치 선택성 및 이에 관한 기술 요소(예, 표적 영역)를 필수 요건으로 하고 있는 것을 제외하고, 「4. 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법」에서 언급한 것과 동일하다.

[2244] 7. 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염, 및 그 제조 방법

[2245] 본 발명은 또한, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 제공한다. 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 본 발명의 가용성 단백질 또는 이의 염은, 가용성 단백질이, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함하고, 또한 기능성 물질이 펩티드 부분을 포함하지 않는 링커를 통하여, 상기 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염이다.

[2246] 특정한 실시형태에서는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 본 발명의 가용성 단백질 또는 이의 염은 하기 식 (V):

[2247] F-(L1-B)'-R'-T (V)

[2248] 〔식 중,

[2249] L1은 (i') 생체 직교성 관능기를 포함하는 1가의 기, 또는 (ii') 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 1가의 기이고,

[2250] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[2251] (L1-B)'로 표시되는 구조 단위는 기능성 물질과, (i') 및 (a)에서의 생체 직교성 관능기 중 어느 한쪽 또는 쌍방 사이의 반응에 의해 생성되는 부분을 포함하는 2가의 구조 단위이고,

[2252] F는 기능성 물질이고,

[2253] R'는 가용성 단백질과 반응성기 사이의 반응에 의해 생성되는 부분이고,

[2254] T는 가용성 단백질이고,

[2255] 상기 가용성 단백질은, 연속하는 1 내지 50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 표적 영역 중에 있어서 특정한 아미노산 잔기를 1개 이상 포함하고, 또한, 상기 표적 영역 이외의 비표적 영역 중에 있어서 상기 특정한 아미노산 잔기를 5개 이상 포함한다〕로 표시되고, 또한

[2256] F-(L1-B)'-R'로 표시되는 구조 단위가, 상기 가용성 단백질의 표적 영역 중에 포함되는 1개 이상의 특정한 아미노산 잔기에 대하여 30% 이상의 위치 선택성으로 결합하고 있는, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염이라도 좋다.

[2257] 본 발명은 또한, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법을 제공한다.

[2258] 종래의 방법에서는 상기한 바와 같은, 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 제조

할 수 없었지만, 본 발명자들이 개발한 방법에 의하면, 이러한 기능성 물질을 위치 선택적으로 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염을 제조할 수 있다. 기능성 물질, 위치 선택성, 가용성 단백질, 표적 영역, 링커 등의 요건, 및 L1에서의 (i') 및 (ii'), B에서의 (a) 및 (b), (L1-B)', F, R', 및 T, 및 이들 요건의 일부의 기술 요소의 정의, 예 및 바람직한 예는 상술한 것과 동일하다. 제조 방법의 공정의 상세도 또한, 위치 선택성 및 이에 관한 기술 요소(예, 표적 영역)를 필수 요건으로 하고 있는 것을 제외하고, 「5. 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 제조 방법」에서 언급한 것과 동일하다.

[2259] 8. 염

[2260] 본 발명에 있어서, 염으로서는, 예를 들면, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 무기염기와의 염, 유기염기와의 염, 및 아미노산과의 염을 들 수 있다. 무기산과의 염으로서는, 예를 들면, 염화수소, 브롬화수소 , 인산, 황산, 질산과의 염을 들 수 있다. 유기산과의 염으로서는, 예를 들면, 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 락트산, 타르타르산, 푸마르산, 옥살산, 말레산, 시트르산, 석신산, 말산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산과의 염을 들 수 있다. 무기염기와의 염으로서는, 예를 들면, 알칼리 금속(예, 나트륨, 칼륨), 알칼리 토금속(예, 칼슘, 마그네슘), 및 아연, 알루미늄 등의 다른 금속, 및 암모늄과의 염을 들 수 있다. 유기염기와의 염으로서는, 예를 들면, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 프로필렌디아민, 에틸렌디아민, 피리딘, 에탄올아민, 모노알킬에탄올아민, 디알킬에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민과의 염을 들 수 있다. 아미노산과의 염으로서는, 예를 들면, 염기성 아미노산(예, 아르기닌, 히스티딘, 리신, 오르니틴), 및 산성 아미노산(예, 아스파라긴산, 글루타민산)과의 염을 들 수 있다. 염은, 바람직하게는 무기산(예, 염화수소)과의 염, 또는 유기산(예, 트리플루오로아세트산)과의 염이다.

[2261] 9. 용도

[2262] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 본 발명의 화합물 또는 이의 염은, 예를 들면, 가용성 단백질의 위치 선택적인 수식에 유용하다. 따라서, 본 발명은 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물 또는 이의 염을 포함하는 가용성 단백질의 위치 선택적 수식 시약을 제공한다.

[2263] 본 발명의 위치 선택적 수식 시약은, 다른 성분을 추가로 포함하는 조성물의 형태로 제공되어도 좋다. 이러한 다른 성분으로서는, 예를 들면, 용액, 안정화제 (예, 산화방지제, 보존제)를 들 수 있다. 용액으로서는 수용액이 바람직하다. 수용액으로서는, 예를 들면, 물(예, 증류수, 멸균 증류수, 정제수, 생리식염수), 완충액(예, 인산 수용액, Tris-염산 완충액, 탄산-중탄산 완충액, 붕산 수용액, 글리신-수산화나트륨 완충액, 시트르산 완충액)을 들 수 있지만, 완충액이 바람직하다. 용액의 pH는, 예를 들면 5.0 내지 9.0, 바람직하게는 5.5 내지 8.5이다. 본 발명의 위치 선택적 수식 시약은 액상 또는 분말상(예, 동결 건조 분말)에서 제공할 수 있다.

[2264] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 (위치 선택적으로) 갖는 본 발명의 가용성 단백질 또는 이의 염, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 (위치 선택적으로) 갖는 본 발명의 복합체 또는 이의 염, 및 생체 직교성 관능기를 (위치 선택적으로) 갖는 본 발명의 가용성 단백질 또는 이의 염은, 예를 들면, 기능성 물질을 (위치 선택적으로) 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염의 조제를 위한 중간체로서 유용하다.

[2265] 기능성 물질을 (위치 선택적으로) 갖는 본 발명의 가용성 단백질 또는 이의 염은, 예를 들면, 의약, 또는 시약(예, 진단약, 연구용 시약)으로서 유용하다. 특히, 가용성 단백질이 항체인 경우, 기능성 물질을 (위치 선택적으로) 갖는 본 발명의 항체 또는 이의 염은 이들의 용도에 적합하다.

[2266] 특히, 기능성 물질을 (위치 선택적으로) 갖는 본 발명의 항체 또는 이의 염은 의약으로서 유용하다. 항체 약물 복합체(ADC)의 약물의 결합 수 및 결합 위치를 변화시키면, 체내 동태나 약물의 방출 속도, 효과가 변화하는 것이 상기한 바와 같이 보고되어 있다. 이러한 점에서 차세대형 ADC에서는 콘주게이션하는 약물의 개수와 위치를 제어하는 것이 요구되고 있다. 개수 및 위치가 일정하면, 기대대로의 efficacy, 콘주게이션 약제의 베리에이션, 로트 차이 소위 레귤레이션의 문제가 해결된다고 생각되고 있다. 기능성 물질을 갖는 본 발명의 항체 또는 이의 염은 이러한 레귤레이션의 문제를 해결할 수 있다. 따라서, 기능성 물질을 갖는 본 발명의 항체 또는 이의 염은, 의약 조성물의 형태에서 제공되어도 좋다. 이러한 의약 조성물은 기능성 물질을 갖는 가용성 단백질 또는 이의 염에 더하여, 의약상 허용될 수 있는 담체를 포함하고 있어도 좋다. 의약상 허용될 수 있는 담체로서는, 예를 들면, 수크로스, 전분, 만니톨, 소르비트, 유당, 글루코스, 셀룰로오스, 활석, 인산칼슘, 탄산칼슘 등의 부형제, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 폴리프로필피롤리돈,

젤라틴, 아라비아 고무, 폴리에틸렌글리콜, 수크로스, 전분 등의 결합제, 전분, 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필 스타치, 탄산수소나트륨, 인산칼슘, 시트르산칼슘 등의 붕괴제, 스테아르산마그네슘, 에어로질, 활석, 라우릴황산나트륨 등의 윤활제, 시트르산, 멘톨, 글리실글리신·암모늄염, 글리신, 오렌지 분말 등의 방향제, 벤조산나트륨, 아황산수소나트륨, 메틸파라벤, 프로필파라벤 등의 보존제, 시트르산, 시트르산나트륨, 아세트산 등의 안정제, 메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 스테아르산알루미늄 등의 현탁제, 계면활성제 등의 분산제, 물, 생리식염수, 오렌지 쥬스 등의 희석제, 카카오지, 폴리에틸렌글리콜, 백등유 등의 베이스 왁스 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 기능성 물질을 갖는 본 발명의 항체 또는 이의 염은 또한 안정성을 실현하는 임의의 수식(예, PEG화)을 갖고 있어도 좋다.

[2267] 경구 투여에 적합한 제제는 물, 생리식염수, 오렌지 쥬스와 같은 희석액에 유효량의 리간드를 용해시킨 액제, 유효량의 리간드를 고체나 과립으로서 포함하고 있는 캡슐제, 사쉐제 또는 정제, 적당한 분산매 중에 유효량의 유효 성분을 현탁시킨 현탁액제, 유효량의 유효 성분을 용해시킨 용액을 적당한 분산매 중에 분산시켜 유화시킨 유제 등이다.

[2268] 의약 조성물은 비경구적인 투여(예, 정맥내 주사, 피하 주사, 근육 주사, 국소 주입, 복강내 투여)에 적합하다. 이러한 비경구적인 투여에 적합한 의약 조성물로서는, 수성 및 비수성의 등장(等張)인 무균의 주사액제가 있고, 이것에는 항산화제, 완충액, 제균제, 등장화제 등이 포함되어 있어도 좋다. 또한, 수성 및 비수성의 무균의 현탁액제를 들 수 있고, 이것에는 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정화제, 방부제 등이 포함되어 있어도 좋다.

[2269] 의약 조성물의 투여량은 유효 성분의 종류·활성, 질병의 중독도, 투여 대상이 되는 동물종, 투여 대상의 약물 수용성, 체중, 연령 등에 따라 다르지만, 적절히 설정할 수 있다.

[2270] **[실시예]**

[2271] 다음에 실시예를 게시하여 본 발명을 더 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이하의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[2272] [실시예 1: IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성]

[2273] (1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

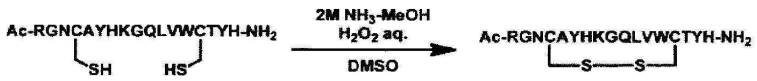
[2274] (1-1) 가용성 단백질에 대한 친화성 물질(Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 39)의 펩티드)의 합성

[2275] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질인 Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 39)의 펩티드를 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 펩티드 합성 장치는 Biotage사 제조 Syro wave를 사용하였다. 시약은 모두 와타나베 카가쿠 코교 제조의 것을 사용하였다. Resin은 Fmoc-NH-SAL-PEG Resin,HL, 아르기닌(R), 시스테인(C), 히스티딘(H)은 더블 커플링을 행하였다. Resin으로부터의 절제(切除)는 트리플루오로아세트산:물:트리이소프로필실란:에탄디티올=94:2.5:1.0:2.5의 용액 중 3시간 교반의 조건으로 행하였다. 절제 후 Resin을 필트레이션에 의해 제거하고, 트리플루오로아세트산을 제거하였다. 생성된 결정 중에 디에틸에테르를 첨가하여 에테르 침전을 행하고, 생성된 백색 결정을 필트레이션에 의해 회수하였다. 이것을 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.1% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하였다.

[2276] MS (ESI) m/z:z=3 693$[M+3H]^{3+}$, z=4 520$[M+4H]^{4+}$

[2277] (1-2) Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 39)의 펩티드에서의 4 위치와 14 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2278] [화 64]

[2279] 

[2280] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[2281] (1-1)에서 합성한 펩티드를 DMSO에 용해하여 100mM으로 한 후, 2M NH_3-MeOH를 2등량, 과산화수소수를 1등량 첨가하여 실온에서 12시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을

정지하고 역상 분취 크로마토그래피로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하였다. 5mg 내지 100mg의 스케일로 모두 수율은 90% 이상이었다.

[2282] MS(ESI) m/z:z=3 692[M+3H]$^{3+}$, z=4 519[M+4H]$^{4+}$

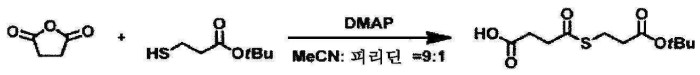
[2283] [실시예 2: 절단성 링커의 합성과 IgG1 Fc 결합성 펩티드와의 연결]

[2284] (2) 절단성 링커의 합성과 펩티드와의 연결

[2285] (2-1) 티오에스테르 링커의 합성과 펩티드와의 연결

[2286] (2-1-1) 티오에스테르 링커의 합성

[2287] [화 65]

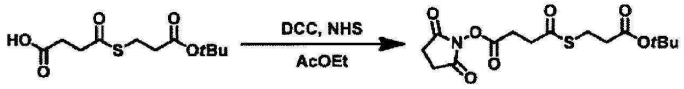
[2288] 

[2289] 석신산무수물(0.2g, 2mmol)과 N,N'-디메틸아미노피리딘(12.2mg, 0.1mmol)을 아세토니트릴:피리딘=9:1 용매에 용해시켜, 아르곤 가스로 치환하였다. tert-부틸-3-술파닐프로파노에이트(0.3g, 2.2mmol)를 첨가하고, 실온에서 16시간 교반하였다. 반응액을 아세트산에틸로 희석하고, 0.1M 염산 수용액, 물, 식염수로 세정 후, 무수황산마그네슘을 첨가하여 5분 정치하였다. 필트레이션에 의해 황산마그네슘을 제거하고, 감압하 농축함으로써 4-(3-tert-부톡시-3-옥소-프로필)술파닐-4-옥소-부탄산(0.47g, 1.8mmol)을 수득하였다.

[2290] ^{1}H NMR(400MHz, 클로로포름-d) δ 3.12(t, J=7.0Hz, 2H), 2.91(t, J=6.9Hz, 2H), 2.72(t, J=6.9Hz, 2H), 2.55(t, J=7.0Hz, 2H), 1.46(s, 9H).

[2291] MS(ESI) m/z:263[M+H]$^{+}$

[2292] [화 66]

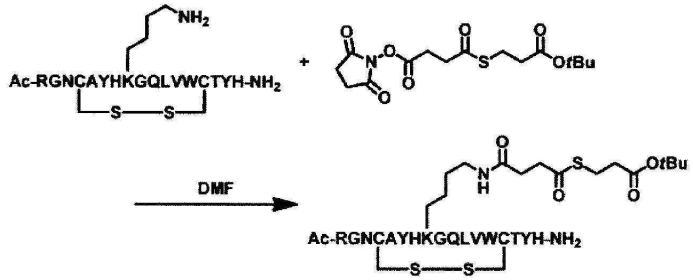
[2293] 

[2294] 4-(3-tert-부톡시-3-옥소-프로필)술파닐-4-옥소-부탄산(0.47g, 1.8mmol)에 아세트산에틸 5mL을 첨가하여 용해하였다. 그 후, N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드(0.39g, 1.9mmol), N-하이드록시숙신이미드(0.22g, 1.9mmol)을 첨가하여 1시간 교반하였다. 생긴 백색 결정을 여과하여 모액을 감압하 농축함으로써(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 4-(3-tert-부톡시-3-옥소-프로필)술파닐-4-옥소-부타노에이트(0.61g, 1.7mmol)를 수득하였다.

[2295] MS(ESI) m/z:360[M+H]$^{+}$

[2296] (2-1-2) 티오에스테르 링커와 펩티드의 연결

[2297] [화 67]

[2298] 

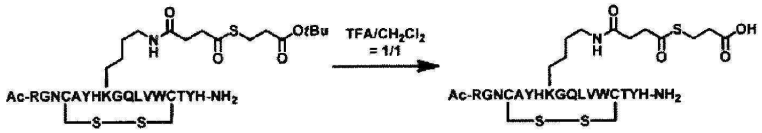
[2299] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[2300] 실시예 1-2에서 합성한 Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 39)의 펩티드 (42mg, 20.3μmol, 다만, 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N'-디메틸포름아미드 1mL에 용해

하고, (2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 4-(3-tert-부톡시-3-옥소-프로필)술파닐-4-옥소-부타노에이트(0.61g, 1.7mmol)를 아세토니트릴 1mL에 용해한 용액 중에 첨가하였다. 실온에서 12시간 교반한 후, 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드 링커 연결-tBu체(41.7mg, 18μmol)를 수득하였다.

[2301] MS(ESI) m/z:z=3 773[M+3H]$^{3+}$, z=4 580[M+4H]$^{4+}$

[2302] [화 68]

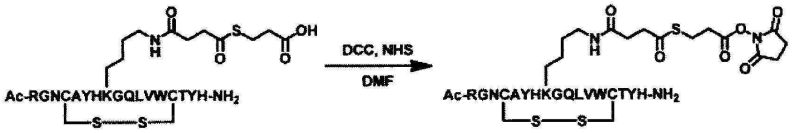
[2303] 

[2304] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[2305] 상기 펩티드 링커 연결물(41.7mg, 18μmol)을 디클로로메탄 1.0mL 중에 용해하고, 트리플루오로아세트산을 1.0mL 첨가하여 실온 중에서 1시간 교반하였다. 감압 농축을 행한 후, 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드 링커 연결물-카복실산체(40.7mg, 18μmol)를 수득하였다.

[2306] MS(ESI) m/z:z=3 755[M+3H]$^{3+}$, z=4 566[M+4H]$^{4+}$

[2307] [화 69]

[2308] 

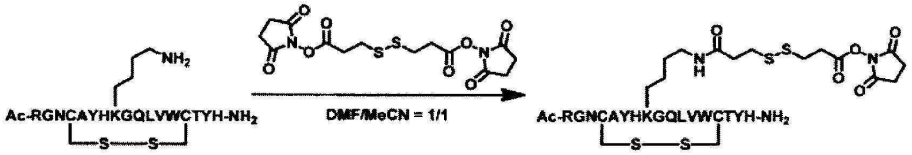
[2309] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[2310] 상기 펩티드 링커 연결물-카복실산체(40.7mg, 18μmol)를 N,N'-디메틸포름아미드 1mL에 용해하고, N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드(37.1mg, 0.18mmol), N-하이드록시숙신이미드(20.7mg, 0.18mmol)를 첨가하여 1시간 교반하였다. 생긴 백색 결정을 여과하여 모액에 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드티오에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체(5.2mg, 2.24μmol)를 수득하였다.

[2311] MS(ESI) m/z:z=3 787[M+3H]$^{3+}$, z=4 590[M+4H]$^{4+}$

[2312] (2-2) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2313] [화 70]

[2314] 

[2315] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[2316] 실시예 1-2에서 합성한 Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 39)의 펩티드 (10mg, 4.8μmol, 다만, 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N'-디메틸포름아미드 1mL에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(0.2g, 0.48mmol)을 1mL에 용해한 용액에 첨가하여 실온에서 12시간 교반하였다. 0.5% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(8.6mg, 3.63μmol)를 수득하였다.

[2317] MS(ESI) m/z:z=3 789[M+3H]$^{3+}$, z=4 592[M+4H]$^{4+}$

[2318] (2-3) 아세탈 링커의 합성과 펩티드의 연결

[2319] (2-3-1) 아세탈 링커의 합성

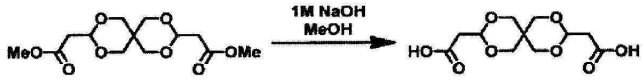
[2320] [화 71]

[2321] 

[2322] 펜타에리트리톨(1.98g, 14.3mmol), 디메톡시프로피온산메틸(6.0g, 31.7mmol)과 p-톨루엔술폰산·1수화물(33.0mg, 0.143mmol)을 혼합하고, 130℃에서 16시간 교반하였다. 16시간 후 실온으로 되돌리고, 석출한 결정을 여과에 의해 회수하여 메틸2-[9-(2-메톡시-2-옥소-에틸)-2,4,8,10-테트라옥소스피로[5.5]운데칸-3-일]아세테이트(3.04g, 10mmol)를 수득하였다.

[2323] MS(ESI) m/z:305[M+H]$^{+}$

[2324] [화 72]

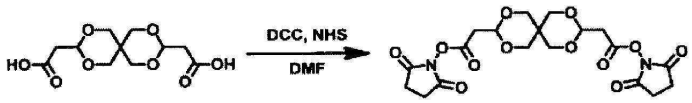
[2325] 

[2326] 메틸2-[9-(2-메톡시-2-옥소-에틸)-2,4,8,10-테트라옥소스피로[5.5]운데칸-3-일]아세테이트(50mg, 0.164mmol)를 메탄올 1mL에 용해하고, 빙냉하 1M NaOH aq.를 0.49mL 첨가하고, 실온으로 승온 후 2시간 교반하였다. 양이온 교환 수지를 첨가하여 중성으로 한 후, 필트레이션에 의해 수지를 제거하여 2-[9-(2-메톡시-2-옥소-에틸)-2,4,8,10-테트라옥소스피로[5.5]운데칸-3-일]아세트산(32mg, 0.116mmol)을 수득하였다.

[2327] ^{1}H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 4.85(t, J=5.4Hz, 2H), 4.26(dd, J=11.3, 2.4Hz, 2H), 3.67-3.61(m, 2H), 3.60(s, 8H), 3.42(d, J=11.6Hz, 2H), 2.69-2.56(m, 4H).

[2328] MS(ESI) m/z:277[M+H]$^{+}$

[2329] [화 73]

[2330] 

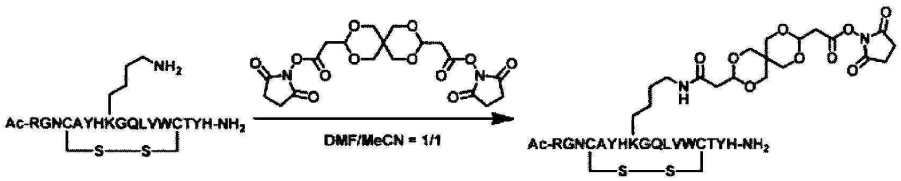
[2331] 2-[9-(2-메톡시-2-옥소-에틸)-2,4,8,10-테트라옥소스피로[5.5]운데칸-3-일]아세트산(32mg, 0.116mmol)을 아세트산에틸 1mL에 용해하고, N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드(37.1mg, 0.18mmol), N-하이드록시숙신이미드(20.7mg, 0.18mmol)를 첨가하여 1시간 교반하였다. 생긴 백색 결정을 여과하여 모액을 감압하 농축 후, 물을 첨가하여 중성의 아세토니트릴 및 물을 용매로서 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하고, (2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2-[9-(2-메톡시-2-옥소-에틸)-2,4,8,10-테트라옥소스피로[5.5]운데칸-3-일]아세테이트(13mg, 27.6㎛ol)를 수득하였다.

[2332] ^{1}H NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 4.79(t, J=5.3Hz, 2H), 4.24(dd, J=11.2, 2.3Hz, 2H), 3.60-3.48(m, 4H), 3.34(d, J=11.5Hz, 2H), 2.33(d, J=5.3Hz, 4H).

[2333] MS(ESI) m/z:471[M+H]$^{+}$

[2334] (2-3-2) 아세탈 링커와 펩티드의 연결

[2335] [화 74]



[2336]

[2337] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[2338] 실시예 1-2에서 합성한 Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 39)의 펩티드 (10mg, 4.8㎛mol, 다만, 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N'-디메틸포름아미드 1mL에 용해하고, (2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2-[9-(2-메톡시-2-옥소-에틸)-2,4,8,10-테트라옥소스피로[5.5]운데칸-3-일]아세테이트(13mg, 27.6㎛mol)를 1mL에 용해한 용액에 첨가하여 실온에서 12시간 교반하였다. 물을 첨가하여 중성의 아세토니트릴 및 물을 용매로서 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드아세탈 링커 연결물-NHS 활성화체(8.6mg, 3.63㎛mol)를 수득하였다.

[2339] MS(ESI) m/z:z=3 810$[M+3H]^{3+}$, z=4 608$[M+4H]^{4+}$

[2340] [실시예 3: IgG1 Fc 결합성 펩티드 시약에 의한 IgG1 Fc의 특이적 수식과 MALDI-TOFMS에 의한 해석]

[2341] (3-1) 티오에스테르 링커 결합성 펩티드 시약에 의한 IgG1 Fc의 특이적 수식과 MALDI-TOFMS에 의한 해석

[2342] IgG1 Fc는 R&D사 제조 IgG1 Fc, Human, Recombinant, Carrier-free(제품번호: 110-HG-100)를 사용하였다. 실시예 2의 (2-1)에서 합성한 펩티드티오에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 0.4mM으로 하였다. IgG1 Fc 15㎍을 0.1M 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 15μL에 용해하고, 0.4mM의 펩티드 시약을 7μL(IgG1 Fc에 대하여 5등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.4)로 용매 치환하고 반응을 정지하였다. MALDI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 IgG1 Fc는 m/z 28270에 피크가 관측되고, 생성물은 결합성 펩티드가 하나 도입된 m/z 30532에 피크가 관측되었다.

[2343] (3-2) 디술피드 링커 결합성 펩티드 시약에 의한 IgG1 Fc의 특이적 수식과 MALDI-TOFMS에 의한 해석

[2344] IgG1 Fc는 R&D사 제조 IgG1 Fc, Human, Recombinant, Carrier-free(제품번호: 110-HG-100)를 사용하였다. 실시예 2의 (2-2)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 0.4mM으로 하였다. IgG1 Fc 20㎍을 0.1M 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 40μL에 용해하고, 0.4mM의 펩티드 시약을 10.7μL(IgG1 Fc에 대하여 6등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.4)으로 용매 치환하고 반응을 정지하였다. MALDI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 IgG1 Fc는 m/z 28183에 피크가 관측되고, 생성물은 결합성 펩티드가 하나 도입된 m/z 30418에 피크가 관측되었다.

[2345] (3-3) 아세탈 링커 결합성 펩티드 시약에 의한 IgG1 Fc의 특이적 수식과 MALDI-TOFMS에 의한 해석

[2346] IgG1 Fc는 R&D사 제조 IgG1 Fc, Human, Recombinant, Carrier-free(제품번호: 110-HG-100)를 사용하였다. 실시예 2의 (2-3)에서 합성한 펩티드아세탈 링커 연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 0.4mM으로 하였다. IgG1 Fc 20㎍을 0.1M 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 40μL에 용해하고, 0.4mM의 펩티드 시약을 10.7μL(IgG1 Fc에 대하여 6등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.4)으로 용매 치환하고 반응을 정지하였다. MALDI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 IgG1 Fc는 m/z 28183에 피크가 관측되고, 생성물은 결합성 펩티드가 하나 도입된 m/z 30541에 피크가 관측되었다.

[2347] [실시예 4: IgG1 Fc-펩티드 복합체의 링커 절단과 MALDI-TOFMS에 의한 해석]

[2348] (4-1) 티오에스테르 링커의 절단과 MALDI-TOFMS에 의한 해석

[2349] 0.2M PBS 완충액(pH7.0), 25mM 시스테인 용액 40μL에, 실시예 3의 (3-1)에서 합성한 IgG1 Fc-펩티드티오에스테르 링커 복합체를 용해하고, 실온에서 16시간 교반하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액

(pH7.0)으로 용매 치환하고 반응을 정지하였다. MALDI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 결합성 펩티드가 하나 도입된 복합체는 m/z 30541에 피크가 관측되고, 반응 후에는 m/z 28397에 피크가 관측되었다.

[2350] (4-2) 티오에스테르 링커의 절단과 MALDI-TOFMS에 의한 해석

[2351] 0.2M PBS 완충액(pH7.0) 40μL에, 실시예 3의 (3-2)에서 합성한 IgG1 Fc-펩티드디술피드 링커 복합체를 용해하고, 10mM D,L-디티오트레이톨 12.5μL(Fc에 대하여 10등량)을 첨가하여 실온에서 16시간 교반하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.0)으로 용매 치환하고 반응을 정지하였다. MALDI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 결합성 펩티드가 하나 도입된 복합체는 m/z 30418에 피크가 관측되고, 반응 후에는 m/z 28183에 피크가 관측되었다.

[2352] (4-3) 아세탈 링커의 절단과 MALDI-TOFMS에 의한 해석

[2353] 임의의 완충액(pH3.0 내지 pH6.0)에, 실시예 3의 (3-3)에서 합성한 IgG1 Fc-펩티드아세탈 링커 복합체를 용해하고, 실온에서 교반함으로써 아세탈 구조가 분해되고, 알데히드가 IgG1 Fc 위에 남는다. 이것을 MALDI-TOFMS에 의해 질량을 측정할 수 있다.

[2354] [실시예 5: 항-HER2 IgG 항체 트라스투주맙과 항-CD20 항체 리툭시맙의 특이적 수식과 MALDI-TOFMS 및 HIC-HPLC에 의한 해석]

[2355] (5-1) 항-HER2 IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 MALDI-TOFMS에 의한 해석

[2356] 실시예 2의 (2-2)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 0.4mM으로 하였다. 항-HER2 IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 200μL에 용해시켜, 0.4mM의 펩티드 시약을 50.7μL(항체에 대하여 6등량)을 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.4)으로 용매 치환하고 반응을 정지하였다. MALDI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 m/z 147569에 피크가 관측되고, 생성물은 결합성 펩티드가 2개 도입된 m/z 151848에 피크가 관측되었다.

[2357] (5-2) 항-HER2 IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2358] (5-1)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2359] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2360] a: 트라스투주맙+펩티드 시약 12등량(반응 후 Amicon 10K에 의해 용매 치환);

[2361] b: 트라스투주맙+펩티드 시약 12등량;

[2362] c: 트라스투주맙+펩티드 시약 6등량;

[2363] d: 트라스투주맙 원료;

[2364] e: 펩티드 시약만;

[2365] f: DMF만.

[2366] 유지시간 9.417분은 트라스투주맙 원료, 10.943분 및 13.063분은 펩티드 시약 유래의 피크, 0.44분은 DMF인 것을 알 수 있다(도 3, 4). 트라스투주맙에 펩티드 시약을 6등량 반응시킨 바 9.417분의 피크가 소실되고, 9.99분 및 10.237분의 피크가 출현하였다(도 3, 4). 또한 펩티드 시약을 12등량 첨가한 바 9.99분의 피크가 소실되었기 때문에, 9.99분의 피크는 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 3, 4). a를 MALDI-TOFMS에 의해 해석한 바 (5-1)에서 게시한 바와 같이 m/z 151848의 MS 피크를 나타낸 펩티드 시약이 트라스투주맙에 대하여 2개 도입된 피크가 관측되었다(도 3, 4).

[2367] (5-3) 항-CD20 항체 리툭시맙의 특이적 수식과 MALDI-TOFMS에 의한 해석

[2368] 실시예 2의 (2-2)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 0.4mM으로 하였다. 항-CD20 항체 리툭시맙 500㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 200μL에 용해시켜, 0.4mM의 펩티드 시약을 50.7μL(항체에 대하여 6등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 Amicon

10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.4)으로 용매 치환하고 반응을 정지하였다. MALDI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 리툭시맙은 m/z 144002에 피크가 관측되고, 생성물은 결합성 펩티드가 2개 도입된 m/z 148169에 피크가 관측되었다.

[2369] (5-4) 항-CD20 항체 리툭시맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2370] (5-3)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2371] a 내지 f의 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2372] a: 리툭시맙+펩티드 시약 12등량(반응 후 Amicon 10K에 의해 용매 치환);

[2373] b: 리툭시맙+펩티드 시약 12등량;

[2374] c: 리툭시맙+펩티드 시약 6등량;

[2375] d: 리툭시맙 원료;

[2376] e: 펩티드 시약만;

[2377] f: DMF만.

[2378] 유지시간 9.417분은 리툭시맙 원료, 10.94분 및 13.02분은 펩티드 시약 유래의 피크, 0.44분은 DMF인 것을 알 수 있다(도 5, 6). 리툭시맙에 펩티드 시약을 6등량 반응시킨 바 10.36분의 피크가 소실되고, 10.763분 및 10.94분의 피크가 출현하였다(도 5, 6). 또한 펩티드 시약을 12등량 첨가한 바 10.763분의 피크가 소실되었기 때문에, 10.763분의 피크는 펩티드가 리툭시맙에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 5, 6). a를 MALDI-TOFMS에 의해 해석한 바 (5-1)에서 게시한 바와 같이 m/z 148169의 펩티드 시약이 리툭시맙에 대하여 2개 도입된 피크가 관측되었다(도 5, 6).

[2379] [실시예 6: 트라스투주맙·펩티드 복합체 및 리툭시맙·펩티드 복합체의 절단, 및 재산화, 및 이들 생성물의 MALDI-TOFMS와 RP-HPLC에 의한 해석]

[2380] (6-1) 트라스투주맙·펩티드 복합체의 링커 절단과 재산화, 및 이들 생성물의 MALDI-TOFMS에 의한 해석

[2381] 우선, 실시예 5의 (5-1)에서 합성한 트라스투주맙·펩티드 복합체 400㎍을 60mM 인산 완충액(pH8.0)에 용해하고, 72μM으로 한 후, 20mM D,L-디티오트레이톨 10.0μL(트라스투주맙·펩티드 복합체에 대하여 60등량)을 첨가하고 실온에서 16시간 교반하여, 링커 중의 디술피드 결합을 절단하였다.

[2382] 다음에, 링커 중의 디술피드 결합과 함께 절단된 항체 중의 디술피드 결합을 다시 결합시키기 위해서, 재산화의 공정을 행하였다(Jagath R Junutula et al., NATURE BIOTECHNOLOGY, 26(8), 925-932(2008)). 구체적으로는, 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.0)으로 용매 치환하고, 트라스투주맙·펩티드 복합체의 농도를 18μM으로 한 후, 10mM 디하이드로아스코르브산 6.4μL(트라스투주맙·펩티드 복합체에 대하여 20등량) 첨가하여 3시간 교반함으로써, 재산화를 행하였다. MALDI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 티오프로피오닐기가 2개 도입된 m/z 145329에 피크가 관측되었다.

[2383] (6-2) 트라스투주맙·펩티드 복합체의 링커 절단과 재산화에 의해 수득되는 생성물의 RP-HPLC에 의한 해석

[2384] (6-1)의 반응을 RP-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 TSK gel, 단백질 C4-300(TOSOH) 4.6×150mm 3.0㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1% TFA, B_완충액: 0.1% TFA, 80% ACN으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B20→60%, 20min(데이터 채취30min), 컬럼 온도는 60℃, 서모스탯 온도는 10℃, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2385] a 내지 f의 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시키고 있다.

[2386] a: 트라스투주맙;

[2387] b: 트라스투주맙+펩티드 시약 6등량;

[2388] c: 트라스투주맙을 DTT에 의해 환원;

[2389] d: 완충액 pH8.0, 항체 농도 72μM으로 D,L-디티오트레이톨에 의해 환원;

[2390] e: d를 디하이드로아스코르브산에 의해 재산화 3시간 후;

[2391] f: d를 디하이드로아스코르브산에 의해 재산화 24시간 후.

[2392] b, d, 및 e 또는 f의 순서로 반응하고 있고, 경쇄와 중쇄로 분해한 후(d), 디하이드로아스코르브산에 의해 재산화하여 e 또는 f가 되었다(도 7). 또한, 피크의 Retention Time으로부터, 트라스투주맙의 경쇄와 수식체의 경쇄가 같은 위치에 나오고 있고, 중쇄의 리텐션 타임이 벗어나 있기 때문에, 중쇄가 수식되어 있는 것을 알 수 있다(도 7).

[2393] (6-3) 리툭시맙·펩티드 복합체의 링커 절단과 MALDI-TOFMS에 의한 해석

[2394] 실시예 5의 (5-3)에서 합성한 리툭시맙·펩티드 복합체 400μg을 60mM 인산 완충액(pH8.0)에 용해하고, 72μM으로 한 후, 20mM D,L-디티오트레이톨 10.0μL(리툭시맙·펩티드 복합체에 대하여 60등량)을 첨가하여 실온에서 16시간 교반하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.0)으로 용매 치환하고, 농도를 18μM으로 한 후, 10mM 디하이드로아스코르브산 6.4μL(리툭시맙·펩티드 복합체에 대하여 20등량) 첨가하여 3시간 교반하여, 링커 중의 디술피드 결합을 절단하였다. MALDI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 티오프로피오닐기가 2개 도입된 m/z 144783에 피크가 관측되었다.

[2395] [실시예 7: 트라스투주맙 및 리툭시맙의 티올 도입체에 대한 형광 표지와 형광 표지율의 산출]

[2396] (7-1) 트라스투주맙의 티올 도입체에 대한 형광 표지와 형광 표지율의 산출

[2397] 실시예 6의 (6-1)에서 합성한 트라스투주맙의 티올 도입체를 20mM PBS 완충액에 용해하여 0.3mM으로 한 후, Thermo Fisher 제조 DyLight 550(0.94mM, DMF에 용해)을 20μL 첨가하고, 실온에서 12시간 교반하였다. 반응 후, Dy 제거 컬럼에 의해 형광 색소를 제거하였다. BECKMAN COULTER 제조 DU 800 SPECTROPHOTOMETER에 의해 280nm과 557nm의 흡광도를 측정하였다. 흡광도에서, 형광 표지율을 산출한 바, 2이었다.

[2398] (7-2) 리툭시맙의 티올 도입체에 대한 형광 표지와 형광 표지율의 산출

[2399] 실시예 6의 (6-3)에서 합성한 리툭시맙의 티올 도입체를 20mM PBS 완충액에 용해하여 0.3mM으로 한 후, Thermo Fisher 제조 DyLight 550(0.94mM, DMF에 용해)을 20μL 첨가하고, 실온에서 12시간 교반하였다. 반응 후, Dy 제거 컬럼에 의해 형광 색소를 제거하였다. BECKMAN COULTER 제조 DU 800 SPECTROPHOTOMETER에 의해 280nm과 557nm의 흡광도를 측정하였다. 흡광도에서, 형광 표지율을 산출한 바, 2이었다.

[2400] [실시예 8: IgG1 Fc 및 트라스투주맙의 티올 도입체의 펩티드 매핑]

[2401] (8-1) IgG1 Fc 및 트라스투주맙, 리툭시맙의 티올 도입체의 트립신 처리

[2402] 1.5mL 저흡착 마이크로테스트 튜브에 8M 요소를 포함하는 100mM 탄산수소암모늄 완충액을 40μL 분주(分注)하고, 샘플 용액을 12μL, 100mM 탄산수소암모늄 완충액에 용해한 2%의 ProteaseMAX(프로테아제 소화 촉진제 ProteaseMAX™ Surfactant)를 2μL 첨가하여, 교반, 혼합하였다. 그 후, 20mM의 디티오스레이톨 수용액 20μL을 첨가하여 65℃에서 15분간 가온 후, 30mM의 요오드아세트산 수용액 42μL을 첨가하고, 차광하 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후, 100mM 탄산수소암모늄 완충액을 150μL 첨가하여 교반하고, 100mM 탄산수소암모늄 완충액에 용해한 2%의 ProteaseMAX를 1.4μL 첨가하고, 100μg/mL의 트립신 수용액(Proteomics Grade, Code No. T6567-5×20μg(SIGMA))을 10μL 첨가하여 37℃에서 18시간 효소 소화하였다. 소화 후, 10% 트리플루오로아세트산 수용액 15μL, 2% 아세토니트릴을 포함하는 0.01% 트리플루오로아세트산 수용액을 4.6μL 첨가하고, LC-MS/MS 측정에 사용하였다.

[2403] (8-2) IgG1 Fc 및 트라스투주맙의 티올 도입체의 Glu-C 처리

[2404] 1.5mL 저흡착 마이크로테스트 튜브에 8M 요소를 포함하는 100mM 탄산수소암모늄 완충액을 20μL 분주하고, 샘플 용액을 8μL 첨가하여, 교반, 혼합하였다. 그 후, 100mM의 디티오스레이톨 수용액 5μL을 첨가하여 65℃에서 15분간 가온 후, 200mM 요오드아세트산 수용액 6μL을 첨가하고, 차광하 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후, 100mM의 디티오스레이톨 수용액 2μL을 첨가하고, 또한, 100mM 탄산수소암모늄 완충액을 3μL 첨가하여 교반하고, 200μg/mL의 Glu-C 프로테아제 수용액(Pierce™ Glu-C 프로테아제, MS Grade, 제품번호: 90054)을 5μL 첨가하여 37℃에서 18시간 효소 소화하였다. 소화 후, 10% 트리플루오로아세트산 수용액 4μL 첨가하고, LC-

MS/MS 측정에 사용하였다.

[2405] (8-3) IgG1 Fc 및 트라스투주맙의 LC-MS/MS 측정 조건

[2406] (분석 장치)

[2407] 나노 HPLC: EASY-nLC 1000(써모피셔사이언티픽)

[2408] 질량 분석계: 트리브리드 질량 분석계 Orbitrap Fusion(써모피셔사이언티픽)

[2409] (HPLC 분석 조건)

[2410] 트랩 컬럼: Acclaim PepMap(등록상표) 100, 75㎛×2cm, nanoViper(써모피셔사이언티픽)

[2411] 분석 컬럼: ESI-컬럼(NTCC-360/75-3-125, 75㎛×12.5cm, 3㎛(닛교테크노스 가부시키가이샤))

[2412] 이동상 A: 0.1% 포름산 수용액

[2413] 이동상 B: 0.1% 포름산, 아세토니트릴 용액

[2414] 로딩 용액: 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액

[2415] 유속: 300nL/min

[2416] 샘플 주입량: 2μL(IgG1 Fc), 3μL(트라스투주맙)

[2417] 그래디언트 조건(B%): 2%(0.0-0.5분), 2%→45%(0.5-33.5분), 45%→75% (33.5-35.5분), 75% (35.5-45.0분)

[2418] (질량 분석계 분석 조건)

[2419] 이온화법: ESI, Positive 모드

[2420] 스캔 타입: 데이터 의존성 취득(Data Dependent Aquisition)

[2421] 활성화 유형: 충돌 유도된 해리(Collision Induced Dissociation)(CID)

[2422] 데이터의 취득은 부속 소프트인 Xcalibur 3.0(써모피셔사이언티픽) 및 Thermo Orbitrap Fusion Tune Application 2.0(써모피셔사이언티픽)을 사용하여 행하였다.

[2423] (8-4) IgG1 Fc 및 트라스투주맙의 수식 부위의 해석 조건

[2424] LC-MS/MS 측정 결과에 대한 수식 부위 해석에 대해서는, Proteome Discoverer version 1.4(써모피셔사이언티픽)를 사용하여 행하였다.

[2425] Proteome Discoverer에서의 해석은 Sequest HT를 검색 엔진으로서 사용하고, 프리커서 이온의 범위를 350 내지 5000Da로 하였다. 또한, 소화 효소에 관해서는, 샘플에 맞추어, 트립신 또는 Glu-C를 소화 효소로서 설정하고, 최대 소실된 절단 부위 (Maximum Missed Cleavage Sites)는 0으로 하였다. 또한, 프리커서 및 프래그먼트 이온의 매쓰 관용성 (Mass Tolerance)는 각각 10ppm 및 0.5Da로 하였다. 스태틱 변형 (Static Modification)에는 요오드아세트산에 의한 시스테인 잔기의 수식으로서, 카복시메틸(+58.005Da)을 설정하였다. 다이나믹 변형 (Static Modifications)에 대해서는, 메티오닌의 산화(+15.995Da) 및 리신 잔기에 대한 수식체(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da)를 설정하였다.

[2426] 또한, 수식 부위의 검색 대상의 아미노산 서열의 데이터로서 도 8에 도시된 (1) 내지 (3)을 사용하였다.

[2427] (8-5) IgG1 Fc 및 트라스투주맙의 LC-MS/MS에 의한 수식 부위의 해석 결과

[2428] LC/MS/MS를 사용한 해석 결과, 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da))를 포함하는 아미노산 26잔기로 이루어지는 펩티드, THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK(서열번호 5)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 998.14874, 이론값: 998.14859, 3가)이 관측되고(도 9), CID 스펙트럼에서 중쇄의 EU 넘버링에서의 246 위치의 리신 잔기의 수식을 나타내는, 2가의 b24에 상당하는 m/z 1375.59(이론값: 1375.14)의 프로덕트 이온이 확인되었다(도 10). 또한, 트라스투주맙의 Glu-C 프로테아제 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da))를 포함하는 아미노산 16잔기로 이루어지는 펩티드, LLGGPSVFLFPPKPKD(서열번호 6)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 929.49573, 이론값: 929.49527, 2가)이 관측되고(도 11), CID 스펙트럼에서 중쇄의 EU 넘버링에서의 248 위치의 리신 잔기의 수식을 나타내는, 2가의 y3에 상당하는

m/z 505.22(이론값: 505.20)의 프로덕트 이온이 확인되었다(도 12).

[2429] 또한, IgG1 Fc의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da))를 포함하는 아미노산 26잔기로 이루어지는 펩티드, THTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK(서열번호 7)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 994.12885, 이론값: 994.12433, 3가)이 관측되고(도 13), CID 스펙트럼에서 중쇄의 EU 넘버링에서의 246 위치의 리신 잔기의 수식을 나타내는, 2가의 b24에 상당하는 m/z 1369.16(이론값: 1369.10)의 프로덕트 이온이 확인되었다(도 14). 또한, IgG1 Fc의 Glu-C 프로테아제 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트산에 의한 카복시메틸화를 받은 티올 도입체(+146.004Da))를 포함하는 아미노산 23잔기로 이루어지는 펩티드, GAPSVFLFPPKPKDTLMISTRPE(서열번호 8)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 892.12604, 이론값: 892.12611, 3가)이 관측되고(도 15), CID 스펙트럼에서 중쇄의 EU 넘버링에서의 248 위치의 리신 잔기의 수식을 나타내는, 2가의 b12에 상당하는 m/z 620.27(이론값: 619.85)의 프로덕트 이온이 확인되었다(도 16).

[2430] 이상에서, EU 넘버링에서의 246 위치 및 248 위치의 리신 잔기를 포함하는 펩티드 프래그먼트에 대한 수식이 확인되었다(도 9 내지 16).

[2431] [실시예 9: 위치 선택적 트라스투주맙-DM1 콘쥬게이트의 합성, 및 평균 DAR의 해석]

[2432] (9-1) 위치 선택적 T-DM1*(트라스투주맙-DM1) 콘쥬게이트의 합성

[2433] 실시예 6의 (6-1)에서 합성한 생체 직행성 관능기가 2개 도입된 화합물 0.35mg을 200μL의 100mM PBS, 10mM EDTA 완충액에 용해시켜, 1.75mg/mL로 한 뒤, 10μL의 N,N'-디메틸포름아미드와 DM-1(Abzena사 제조)을 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 5mM으로 한 것을 4.8μL 첨가하고 20℃에서 2시간 교반하였다. 2시간 후, N-아세틸시스테인을 100mM PBS, 10mM EDTA 완충액에 용해시켜서 50mM으로 한 것을 1μL 첨가하고 추가로 20℃에서 1시간 교반하였다. 반응 후, NAP-5 컬럼에 의해 추출하고, DM-1을 제거하였다.

[2434] (9-2) SoloVPE에 의한 반응 후의 항체 농도 측정

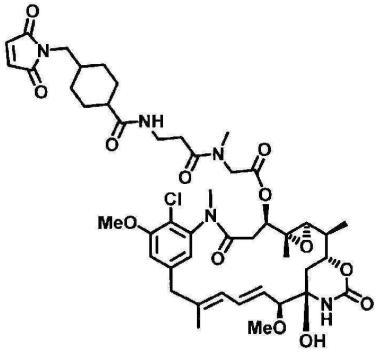
[2435] 280nm의 파장에서 흡광도를 측정하고, 몰 흡광 계수에서 항체 농도를 산출한 바, 0.48mg/mL이었다. 용액량은 0.7mL이었으므로, 수량은 0.336mg으로 산출할 수 있다.

[2436] (9-3) Q-TOFMS에 의한 DAR의 산출

[2437] Q-TOFMS는 아지렌트사 제조의, DAD 검출기, 자동샘플채취기 냉각 및 온도조절장치 컬럼 격실을 갖는 Agilent 1290 UPLC에 커플링된 Agilent 6550을 사용하였다. 소프트웨어는 MassHunter를 사용하고, DAR을 산출하였다. 생성물은 DM-1이 2개 도입된 149945에 피크가 관측되고, 평균 DAR은 2로 산출되었다(도 23).

[2438] 본 실시예에서 사용한 DM1*은 이하이다.

[2439] [화 75]

[2440] 

[2441] 화학식: C46H60ClN5O13

[2442] 정확한 질량: 925.3876

[2443] [실시예 10: Biacore에 의한 결합성 평가]

[2444] (10-1) ELISA에 의한 항원 HER2에 대한 결합성 평가

[2445] 실시예 9의 (9-1)에서 합성한 위치 선택적 T-DM1(트라스투주맙-DM1) 콘쥬게이트의 항원 HER2에 대한 결합성을

ELISA에 의해 평가하였다. 컨트롤로서 캐싸일라(T-DM1)도 평가하였다. 그 결과, 캐싸일라의 해리 정수(KD값)는 6.372±0.76pM이고, 위치 선택적 T-DM1(트라스투주맙-DM1) 콘쥬게이트는 6.684±0.17pM이었다. 따라서, 본 수법에 의해 합성된 ADC는 항원 결합성을 유지하고 있다고 생각된다.

[2446] (10-2) Biacore에 의한 FcRn에 대한 결합성 평가

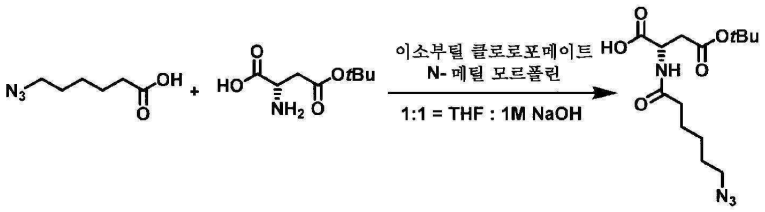
[2447] 실시예 9의 (9-1)에서 합성한 위치 선택적 T-DM1(트라스투주맙-DM1) 콘쥬게이트의 신생아 Fc 수용체(FcRN)에 대한 결합성을 ELISA에 의해 평가하였다. 항체의 FcRn에 대한 결합성이 보다 높은 경우, 항체가 보다 긴 혈중 반감기를 갖는 것으로 알려져 있다. 컨트롤로서 캐싸일라(T-DM1)도 평가하였다. 그 결과, 캐싸일라의 해리 정수(KD값)는 1.65±0.05㎛이고, 위치 선택적 T-DM1(트라스투주맙-DM1) 콘쥬게이트는 0.258±0.001㎛이었다. 따라서, 본 수법에 의해 합성된 ADC는 FcRn 결합성을 유지하고 있다고 생각되며, 기존의 ADC인 캐싸일라보다도 6배 정도 FcRn에 대한 친화성이 높아지고 있는 것을 알 수 있었다.

[2448] [실시예 11: (1) 다양한 절단성 링커의 합성, 및 (2) 합성된 링커와 IgG1 Fc 결합성 펩티드와의 연결에 의한, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드-아지드 수식 티오에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체, 펩티드-말레이미드 수식 티오에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체, 펩티드-아지드 수식 에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체, 및 펩티드아세탈 링커 연결물-NHS 활성화체)의 합성]

[2449] (11-1) 티오에스테르 링커의 합성과 펩티드와의 연결

[2450] (11-1-1) 티오에스테르 링커의 합성

[2451] [화 76]

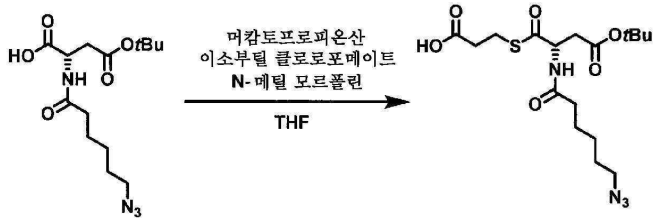
[2452] 

[2453] 6-아지드헥산산(300mg, 1.91mmol)을 THF 용매(20mL)에 용해시켜, 0℃로 클로로탄산이소부틸(284μL, 2.10mmol), N-메틸모르폴린(273μL, 2.48mmol)을 첨가하여 30분 교반하고, 6-아지드헥산산의 혼합 산무수물을 조제하였다. 실온에서 4-(tert-부톡시-옥소)-2-아미노-부탄산(362mg, 2.10mmol)을 1M 수산화나트륨 수용액(2.10mL)에 용해시킨 뒤, 상술한 6-아지드헥산산의 혼합 산무수물의 THF 용액을 실온에서 적하하였다. 실온에서 16시간 교반한 후, 6M 염산 수용액을 첨가하고, 계내의 pH를 3.0으로 조정하였다. 반응액을 아세트산에틸로 희석하고, 물, 식염수로 세정 후, 무수황산마그네슘을 첨가하여 5분 정치하였다. 필트레이션에 의해 황산마그네슘을 제거하고, 감압하 농축함으로써 조(粗)생성물을 수득한 뒤, 컬럼 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=10:1)로 정제하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써, 4-(tert-부톡시-옥소)-2-(6-아지드헥시-1-옥소)아미노-부탄산(352mg, 1.07mmol)을 수득하였다.

[2454] ^{1}H NMR(400MHz, 클로로포름-d) δ 6.56(d, J=7.6Hz, 1H), 4.76(ddd, J=7.6, 5.2, 4.8Hz, 1H), 3.22(t, 3.6Hz, 2H), 2.90(dd, J=17.2, 4.8Hz, 1H), 2.70(dd, J=17.2, 5.2Hz, 1H), 2.22(t, J=7.2Hz, 2H), 1.53-1.65(m, 4H), 1.37(s, 9H), 1.36-1.31(m, 2H).

[2455] MS(ESI) m/z:351[M+Na]$^+$

[2456] [화 77]

[2457] 

[2458] 4-(tert-부톡시-옥소)-2-(6-아지드헥시-1-옥소)아미노-부탄산(50.0mg, 0.152mmol)을 THF(1.5mL)에 용해시켜, 0

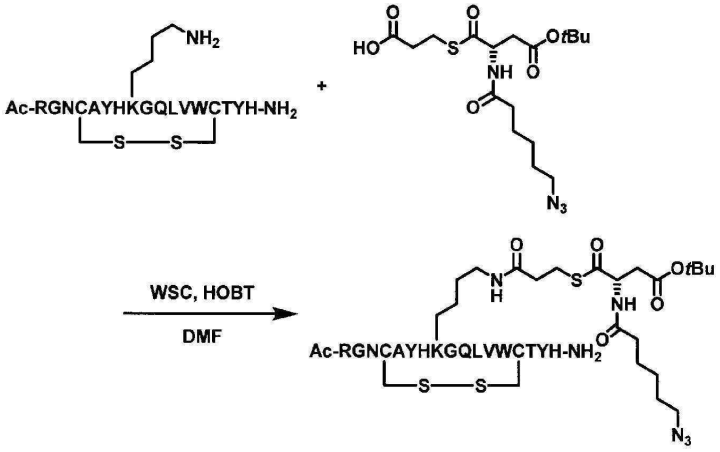
℃로 클로로탄산이소부틸(30.9μL, 0.228mmol), N-메틸모르폴린(28.5μL, 0.258mmol)을 첨가하여 30분 교반하고, 대응하는 혼합 산무수물을 조제하였다. 실온에서 머캅토프로피온산(32.3mg, 0.456mmol)을 THF(ml)에 용해시킨 뒤, 상술한 혼합 산무수물의 THF 용액을 실온에서 적하하였다. 실온에서 16시간 교반한 후, 1M 수산화나트륨 수용액을 첨가하고, 계내의 pH를 9.0으로 조정하였다. 반응액을 물과 아세트산에틸로 세정하고, 수상(水相)을 회수하였다. 수상에 6M 염산 수용액을 첨가하고, 계내의 pH를 3.0으로 조정한 후, 아세트산에틸에 의한 분액 추출을 행하고 나서 , 유기상을 식염수로 세정 후, 무수황산마그네슘을 첨가하여 5분 정치하였다. 필트레이션에 의해 황산마그네슘을 제거하고, 감압하 농축함으로써, 3-[4-(tert-부톡시-옥소)-2-(6-아지드헥시-1-옥소)아미노-1-옥소]술파닐-프로판산(60.1mg, 0.144mmol)을 수득하였다.

[2459] ^{1}H NMR(400MHz, 클로로포름-d) δ 6.69(d, J=9.6Hz, 1H), 4.89(dt, J=9.6, 4.4Hz, 1H), 3.22(t, 8.5Hz, 2H), 3.07(t, 7.2Hz, 2H), 2.82-2.60(m, 3H), 2.29-2.22(m, 3H), 1.70-1.52(m, 4H), 1.42-1.39(m, 2H), 1.40(s, 9H).

[2460] MS(ESI) m/z:439[M+H]$^{+}$

[2461] (11-1-2) 티오에스테르 링커와 펩티드의 연결

[2462] [화 78]



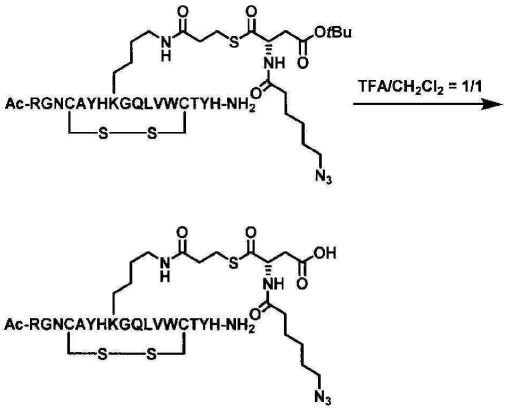
[2463]

[2464] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[2465] 실시예 1-2에서 합성한 Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 39)의 펩티드 (20.0mg, 9.64μmol, 다만, 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N'-디메틸포름아미드 1mL에 용해하고, 3-[4-(tert-부톡시-옥소)-2-(6-아지드헥시-1-옥소)아미노-1-옥소]-술파닐-프로판산(60.1mg, 0.144mmol), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드염산염(25.9mg, 0.135mmol), 1-하이드록시벤조트리아졸(18.2mg, 0.135mmol)을 DMF 1mL에 용해시켜, 계중에 첨가하였다. 실온에서 12시간 교반한 후, 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드 링커 연결-tBu체(15mg, 7.23μmol)를 수득하였다.

[2466] MS(ESI) m/z:z=2 1237[M+2H]$^{2+}$, z=3 824[M+3H]$^{3+}$

[2467] [화 79]



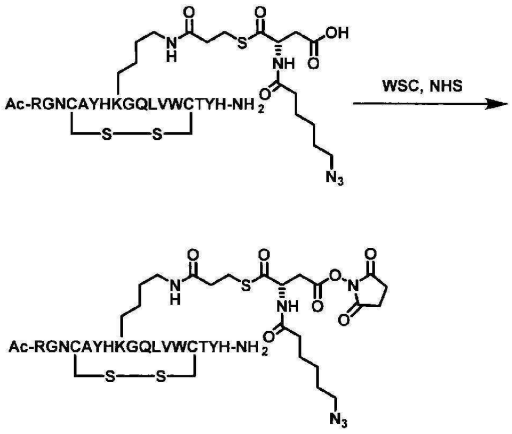
[2468]

[2469] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[2470] 상기 펩티드 링커 연결물(10.0mg, 4.82㎛ol)을 디클로로메탄 0.250mL 중에 용해하고, 트리플루오로아세트산을 0.250mL 첨가하여 실온 중에서 1시간 교반하였다. 감압 농축을 행한 후, 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드 링커 연결물-카복실산체(6.2mg, 2.57㎛ol)를 수득하였다.

[2471] MS(ESI) m/z:z=2 1208$[M+2H]^{2+}$, z=3 806$[M+3H]^{3+}$

[2472] [화 80]



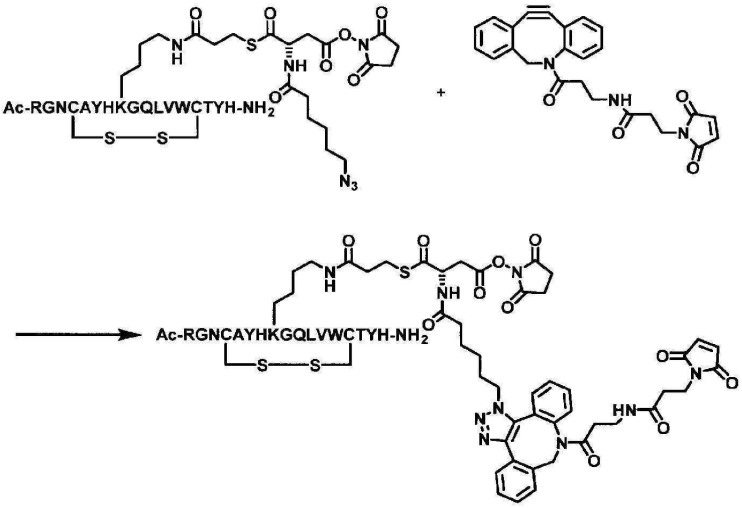
[2473]

[2474] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[2475] 상기 펩티드 링커 연결물-카복실산체(5.7mg, 2.36㎛ol)를 N,N'-디메틸포름아미드 0.5mL에 용해하고, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드염산염(9.1mg, 47.2㎛ol), N-하이드록시숙신이미드(8.1mg, 70.8㎛ol)를 첨가하여 16시간 교반하였다. 반응액에 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드-아지드 수식 티오에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체(3.0mg, 1.19㎛ol)를 수득하였다.

[2476] MS(ESI) m/z:z=2 1257$[M+2H]^{2+}$, z=3 838$[M+3H]^{3+}$

[2477] [화 81]



[2478]

[2479] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

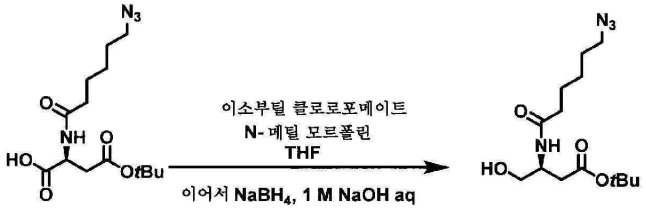
[2480] 상기 펩티드-아지드 수식 티오에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체(3.0mg, 1.20㎛ol)를 N,N'-디메틸포름아미드 0.5mL에 용해하고, 상기 디벤조사이클로옥틴-말레이미드(0.6mg, 1.2㎛ol)를 첨가하여 16시간 교반하였다. 반응액에 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드-말레이미드 수식 티오에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체(2.8mg, 0.95㎛ol)를 수득하였다.

[2481] MS(ESI) m/z:z=2 1471$[M+2H]^{2+}$, z=3 981$[M+3H]^{3+}$

[2482] (11-2) 에스테르 링커의 합성과 펩티드와의 연결

[2483] (11-2-1) 에스테르 링커의 합성

[2484] [화 82]



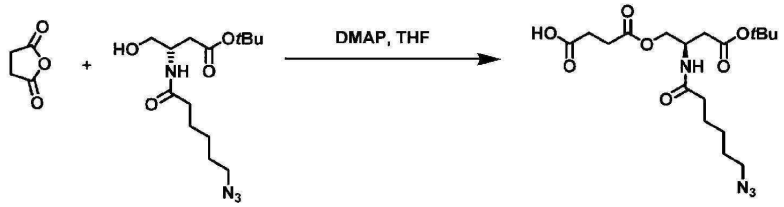
[2485]

[2486] 4-(tert-부톡시-옥소)-2-[(6-아지드헥시-1-옥소)아미노]-부탄산(50mg, 0.152mmol)을 THF(1.5mL)에 용해시켜, 0℃로 클로로탄산이소부틸(22.7μL, 0.167mmol), N-메틸모르폴린(21.7μL, 0.198mmol)을 첨가하여 30분 교반하고, 대응하는 혼합 산무수물을 조제하였다. 실온에서 수소화붕소나트륨(28.7mg, 0.76mmol)을 1M 수산화나트륨 수용액(1.0ml)에 용해시킨 뒤, 상술한 혼합 산무수물의 THF 용액을 실온에서 적하하였다. 실온에서 16시간 교반한 후, 계내에 아세트산에틸을 첨가하고, 물, 식염수로 세정 후, 유기상을 회수하고, 무수황산마그네슘을 첨가하여 5분 정치하였다. 필트레이션에 의해 황산마그네슘을 제거하고, 감압하 농축함으로써 조생성물을 수득한 후, 컬럼 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=10:1)로 정제하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써, tert-부틸4-하이드록시-3-[(6-아지드헥시-1-옥소)아미노]-부타노에이트(38.1mg, 0.121mmol)를 수득하였다.

[2487] ^{1}H NMR(400MHz, 클로로포름-d) δ 6.36(d, J=7.2Hz, 1H), 4.20(m, 1H), 3.69(dt, 12.4, 4.4Hz, 2H), 3.27(t, J=6.8Hz, 2H), 2.50(d, J=6.0Hz, 2H), 2.22(t, J=7.2Hz, 2H), 1.53-1.72(m, 4H), 1.41(s, 9H), 1.40-1.38(m, 2H).

[2488] MS(ESI) m/z:337$[M+Na]^+$

[2489] [화 83]



[2490]

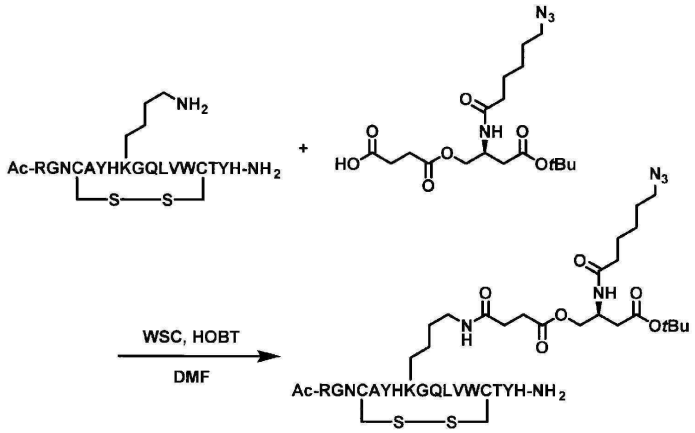
[2491] tert-부틸-4-하이드록시-3-[(6-아지드헥시-1-옥소)아미노]-부타노에이트(70.4mg, 0.224mmol)를 THF(2.2mL)에 용해시켜, 실온에서 석신산무수물(67.3mg, 0.673mmol), N,N-디메틸아미노피리딘(82.2mg, 0.673mmol)을 첨가하고, 실온에서 16시간 교반한 후, 1M 수산화나트륨 수용액을 첨가하고, 계내의 pH를 9.0으로 조정하였다. 반응액에 물과 아세트산에틸을 첨가하여 분액 조작을 한 뒤, 수상을 회수하였다. 수상에 6M 염산 수용액을 첨가하고, 계내의 pH를 3.0으로 조정한 후, 아세트산에틸에 의한 분액 추출을 행하고 나서 , 유기상을 식염수로 세정 후, 무수황산마그네슘을 첨가하여 5분 정치하였다. 필트레이션에 의해 황산마그네슘을 제거하고, 감압하 농축함으로써, 4-[4-(tert-부톡시-옥소)-2-(6-아지드헥시-1-옥소)아미노]옥시-4-옥소-프로판산(78.9mg, 0.190mmol)을 수득하였다.

[2492] ^{1}H NMR(400MHz, 클로로포름-d) δ 6.28(d, J=8.0Hz, 2H), 4.52(m, 1H), 4.29(dd, J=11.2, 4.4, 1H), 4.15(dd, J=11.2, 5.6), 3.28(m, 2H), 2.66(m, 4H), 2.49(d, J=6.4Hz, 2H), 2.18(t, J=7.2, 2H), 1.72-1.50(m, 4H), 1.42(s, 9H), 1.41-1.38(m, 2H).

[2493] MS(ESI) m/z:415[M+H]$^+$

[2494] (11-2-2) 에스테르 링커와 펩티드의 연결

[2495] [화 84]



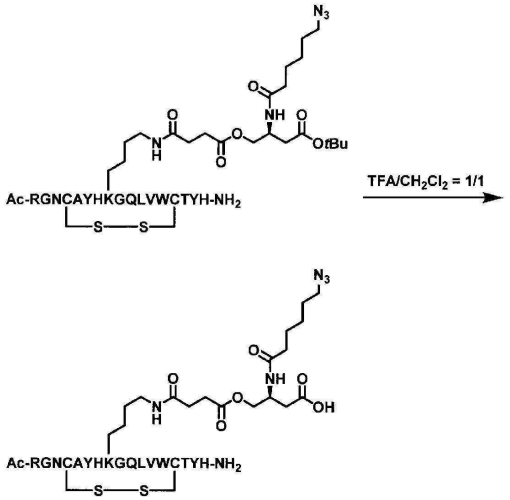
[2496]

[2497] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[2498] 실시예 1-2에서 합성한 Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 39)의 펩티드 (20mg, 9.63μmol, 다만, 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N'-디메틸포름아미드 1mL에 용해하고, (4-[4-(tert-부톡시-옥소)-2-(6-아지드헥시-1-옥소)아미노]옥시-4-옥소-프로판산(39.9mg,96.3μmol), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드염산염(25.8mg, 0.135mmol), 1-하이드록시벤조트리아졸(18.2mg, 0.135mmol)을 DMF 1mL에 용해시켜, 계중에 첨가하였다. 실온에서 12시간 교반한 후, 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드 링커 연결-tBu체(18.2mg, 7.36μmol)를 수득하였다.

[2499] MS(ESI) m/z:z=2 1236[M+2H]$^{2+}$, z=3 824[M+3H]$^{3+}$

[2500] [화 85]



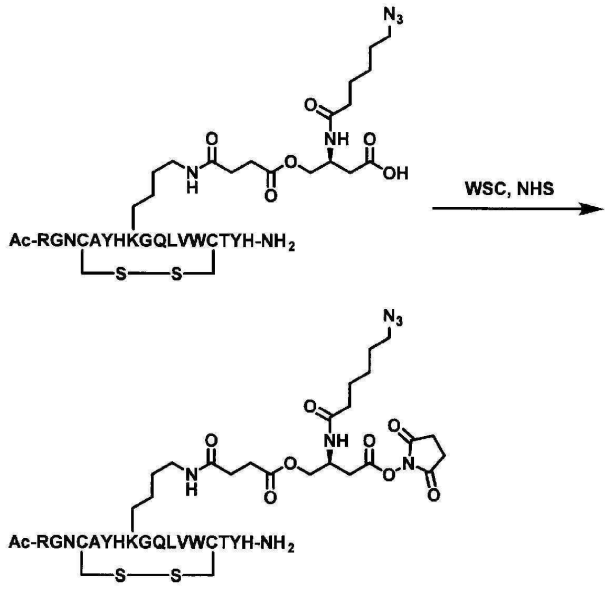
[2501]

[2502] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[2503] 상기 펩티드 링커 연결물(16.5mg, 6.67㎛ol)을 디클로로메탄 1.0mL 중에 용해하고, 트리플루오로아세트산을 1.0mL 첨가하여 실온 중에서 1시간 교반하였다. 감압 농축을 행한 후, 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드 링커 연결물-카복실산체(15.2mg, 6.29㎛ol)를 수득하였다.

[2504] MS(ESI) m/z:z=2 1208$[M+2H]^{2+}$, z=3 805$[M+3H]^{3+}$

[2505] [화 86]



[2506]

[2507] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

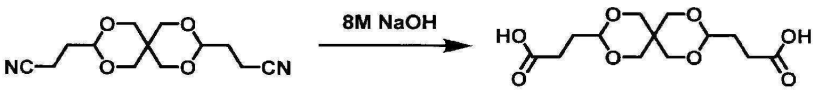
[2508] 상기 펩티드 링커 연결물-카복실산체(3.0mg, 1.21㎛ol)를 N,N'-디메틸포름아미드 1mL에 용해하고, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드염산염(4.7mg, 24.3㎛ol), N-하이드록시숙신이미드(4.2mg, 36.4㎛ol)를 첨가하여 16시간 교반하였다. 반응액에 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드-아지드 수식 에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체(3.0mg, 1.19㎛ol)를 수득하였다.

[2509] MS(ESI) m/z:z=2 1257[M+2H]$^{2+}$, z=3 837[M+3H]$^{3+}$

[2510] (11-3) 아세탈 링커의 합성과 펩티드의 연결

[2511] (11-3-1) 아세탈 링커의 합성

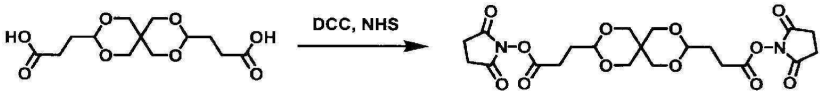
[2512] [화 87]

[2513] 

[2514] 3,9-비스(2-시아노에틸)-2,4,8,10-[5.5]테트라옥사스피로운데칸(200mg, 0.752mmol)을 8M 수산화나트륨 수용액 20mL에 용해시켜, 100℃에서 16시간 교반하였다. 16시간 후 실온으로 되돌리고, 수상에 6M 염산 수용액을 첨가하고, 계내의 pH를 7.0으로 조정한 후, 아세토니트릴, 식염수를 순차 첨가하여 분액 조작을 행하였다. 아세토니트릴상을 회수 후, 무수황산나트륨을 첨가하여 5분 정치하였다. 필트레이션에 의해 황산나트륨을 제거하고, 감압하 농축함으로써, 2,4,8,10-[5.5]테트라옥사스피로운데칸-3,9-디프로판산(151mg, 0.497mmol)을 수득하였다.

[2515] MS(ESI) m/z:327[M+Na]$^{+}$

[2516] [화 88]

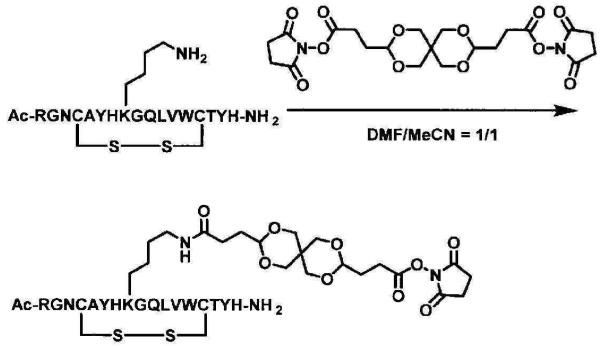
[2517] 

[2518] 2-[9-(2-메톡시-2-옥소-에틸)-2,4,8,10-테트라옥소스피로[5.5]운데칸-3-일]아세트산(30.0mg, 0.099mmol)을 아세트산에틸 0.5mL에 용해하고, N,N'-디사이클로헥실카르보디이미드(22.4mg, 0.109mmol), N-하이드록시숙신이미드(31.2mg, 0.271mmol)를 첨가하여 2시간 교반하였다. 생긴 백색 결정을 여과하여 모액을 감압하 농축하고, 비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2,4,8,10-[5.5]테트라옥사스피로운데칸-3,9-디프로파노에이트(15mg, 31.8㎛ol)를 수득하였다.

[2519] MS(ESI) m/z:521[M+Na]$^{+}$

[2520] (11-3-2) 아세탈 링커와 펩티드의 연결

[2521] [화 89]

[2522] 

[2523] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[2524] 실시예 1-2에서 합성한 Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 39)의 펩티드 (3.0mg, 1.45㎛ol, 다만, 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N'-디메틸포름아미드 0.3mL에 용해하고, (비스(2,5-디옥소피롤리딘-1-일) 2,4,8,10-[5.5]테트라옥사스피로운데칸-3,9-디프로파노에이트(14.4mg, 28.9㎛ol)를 첨가하여 실온에서 12시간 교반하였다. 물을 첨가하여 중성의 아세토니트릴 및 물을 용매로서 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드아세탈 링커 연결물-NHS 활성화체(2.8mg, 1.14㎛ol)를 수득하였다.

[2525] MS(ESI) m/z:z=2 1729$[M+2H]^{2+}$, z=3 819$[M+3H]^{3+}$

[2526] [실시예 12: 다양한 화합물에 의한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식, 및 ESI-TOFMS에 의한 해석]

[2527] (12-1) 아지드 수식 티오에스테르 링커 결합성 펩티드 시약에 의한 IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2528] 실시예 11의 (11-1-2)에서 합성한 펩티드-아지드 수식 티오에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 120㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 39.8μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 2.4μL(항체에 대하여 12등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.4)으로 용매 치환하고 반응을 정지하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148225에 피크가 관측되고, 생성물은 결합성 펩티드가 2개 도입된 153018에 피크가 관측되었다.

[2529] (12-2) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2530] (12-1)에서 생성된 항체·펩티드 복합체의 PBS 용액에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 2.0μL(항체에 대하여 100등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 50595, 50757에 중쇄 피크, 23440에 경쇄 피크가 관측되고, 생성물은 중쇄에 결합성 펩티드가 도입된 52995 및 53156에 피크가 관찰되고, 원료와 같은 23440에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2531] (12-3) 말레이미드 수식 티오에스테르 링커 결합성 펩티드 시약에 의한 IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2532] 실시예 11의 (11-1-2)에서 합성한 펩티드-말레이미드 수식 티오에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 120㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 39.8μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 2.4μL(항체에 대하여 12등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.4)으로 용매 치환하고 반응을 정지하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148225에 피크가 관측되고, 생성물은 결합성 펩티드가 2개 도입된 153901에 피크가 관측되었다.

[2533] (12-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2534] (12-3)에서 생성된 항체·펩티드 복합체의 PBS 용액에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 2.0μL(항체에 대하여 100등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 50594, 50757에 중쇄 피크, 23440에 경쇄 피크가 관측되고, 생성물은 중쇄에 결합성 펩티드가 도입된 53421 및 53600에 피크가 관찰되고, 원료와 같은 23440에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2535] (12-5) 아지드 수식 에스테르 링커 결합성 펩티드 시약에 의한 IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2536] 실시예 11의 (11-2-2)에서 합성한 펩티드-아지드 수식 에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 120㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 39.8μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 2.4μL(항체에 대하여 12등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.4)으로 용매 치환하고 반응을 정지하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148225에 피크가 관측되고, 생성물은 결합성 펩티드가 2개 도입된 153028에 피크가 관측되었다.

[2537] (12-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2538] (12-5)에서 생성된 항체·펩티드 복합체의 PBS 용액에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 2.0μL(항체에 대하여 100등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 50594 및 50757에 중쇄 피크, 23440에 경쇄 피크가 관측되고, 생성물은 중쇄에 결합성 펩티드가 도입된 52994 및 53154에 피크가 확인되고, 원료와 같은 23440에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2539] (12-7) 아세탈 링커 결합성 펩티드 시약에 의한 IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2540] 실시예 11의 (11-3-2)에서 합성한 펩티드-아세탈 링커 연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 120㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 39.8μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 2.4μL(항체에 대하여 12등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.4)으로 용매 치환하고 반응을 정지하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148238에 피크가 관측되고, 생성물은 결합성 펩티드가 2개 도입된 153522에 피크가 관측되었다.

[2541] (12-8) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2542] (12-7)에서 생성된 항체·펩티드 복합체의 PBS 용액에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 2.0μL(항체에 대하여 100등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 50595, 50757에 중쇄 피크, 23440에 경쇄 피크가 관측되고, 생성물은 중쇄에 결합성 펩티드가 도입된 52940 및 53103에 피크가 관찰되고, 원료와 같은 23440에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2543] [실시예 13: 트라스투주맙·펩티드 복합체의 절단, 및 이들 생성물의 ESI-TOFMS에 의한 해석]

[2544] (13-1) 트라스투주맙·펩티드 복합체의 링커 절단, 및 생성물의 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2545] 우선, 실시예 12의 (12-1)에서 합성한 트라스투주맙·펩티드 복합체 40㎍을 100mM Tris·염산 완충액(pH8.5)에 용해하고, 2.0μM으로 한 후, 실온에서 48시간 교반하여, 링커 중의 티오에스테르 결합을 절단하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 트라스투주맙·펩티드 복합체는 153018에 피크가 관측되고, 생성물은 아지드가 2개 도입된 148729에 피크가 관측되었다.

[2546] (13-2) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2547] (13-1)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 2.0μL(항체에 대하여 100등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙·펩티드 복합체는 52995 및 53155에 중쇄 피크, 23440에 경쇄 피크가 관측되고, 생성물은 중쇄에 아지드가 도입된 50850 및 51010에 피크가 관찰되고, 원료와 같은 23440에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2548] (13-3) 트라스투주맙·펩티드 복합체의 링커 절단, 및 생성물의 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2549] 우선, 실시예 12의 (12-3)에서 합성한 트라스투주맙·펩티드 복합체 20㎍을 100mM Tris·염산 완충액(pH8.5)에 용해하고, 2.0μM으로 한 후, 실온에서 48시간 교반하여, 링커 중의 티오에스테르 결합을 절단하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 트라스투주맙·펩티드 복합체는 153901에 피크가 관측되고, 생성물은 말레이미드가 2개 도입된 149476에 피크가 관측되었다.

[2550] (13-4) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2551] (13-3)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 2.0μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 트라스투주맙·펩티드 복합체는 53421, 및 53600에 중쇄 피크, 23440에 경쇄 피크가 관측되고, 생성물은 중쇄에 말레이미드가 도입된 51278 및 51439에 피크가 관찰되고, 원료와 같은 23440에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2552] (13-5) 에스테르 링커의 절단과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2553] 임의의 완충액(pH4.5 내지 9.0)에, 실시예 12의 (12-5)에서 합성한 항체·펩티드에스테르 링커 복합체를 용해하고, 에스테라제계 효소를 첨가하여 실온에서 교반함으로써 에스테르 구조가 가수분해되고, 아지드기가 항체 위에 남는다. 이것을 ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정할 수 있다.

[2554] (13-6) 트라스투주맙·펩티드 복합체의 링커 절단, 및 생성물의 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2555] 우선, 실시예 12의 (12-7)에서 합성한 트라스투주맙·펩티드 복합체 20㎍을 100mM 글리신·염산 완충액(pH2.0)에 용해하고, 2.0μM으로 한 후, 실온에서 교반하여, 링커 중의 아세탈 결합을 절단하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 트라스투주맙·펩티드 복합체는 1535223에 피크가 관측되고, 생성물은 알데히드가 2개 도입된 148452에 피크가 관측되었다.

[2556] (13-7) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2557] (13-1)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 2.0μL(항체에 대하여 100등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 항체·펩티드 복합체는 52940, 및 53103에 중쇄 피크, 23440에 경쇄 피크가 관측되고, 생성물은 중쇄에 알데히드가 도입된 50683 및 50845에 피크가 관찰되고, 원료와 같은 23440에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2558] [실시예 14: 트라스투주맙-아지드 도입체와 저분자 화합물과의 콘주게이션]

[2559] (14-1) 트라스투주맙의 아지드 도입체와 저분자 화합물과의 콘주게이션

[2560] 실시예 13의 (13-1)에서 합성한, 트라스투주맙의 아지드 도입체를 20mM PBS 완충액에 용해하여 0.3mM으로 한 후, Sigma Aldrich 제조 디벤조사이클로옥틴-Cy3 (0.94mM, DMF에 용해)을 20μL 첨가하고, 실온에서 12시간 교반하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.4)으로 용매 치환하고 반응을 정지하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙의 아지드 도입체는 148706에 피크가 관측되고, 생성물은 저분자가 2개 도입된 150688에 피크가 관측되었다.

[2561] (14-2) 트라스투주맙-저분자 화합물 복합체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2562] (14-1)에서 생성된 항체·저분자 복합체의 PBS 용액에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 2μL(항체에 대하여 100등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙의 아지드 도입체는 50850 및 51010에 중쇄 피크, 23440에 경쇄 피크가 관측되고, 생성물은 중쇄에 저분자가 도입된 51834 및 51990에 피크가 관찰되고, 원료와 같은 23440에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2563] [실시예 15: 트라스투주맙의 아지드 도입체의 펩티드 매핑]

[2564] (15-1) 트라스투주맙의 아지드 도입체(실시예 14)의 트립신 처리

[2565] 1.5mL 저흡착 마이크로테스트 튜브에 샘플 용액을 10μL, 50mM 탄산수소암모늄 완충액, 20% 트리플루오로에탄올에 용해한 20mM의 디티오스레이톨 수용액 10μL을 첨가하여 65℃에서 1시간 가온 후, 50mM의 요오드아세트아미드 수용액 10μL을 첨가하고, 차광하 실온에서 30분간 300rpm으로 진탕하여 반응시켰다. 반응 후, 50mM 탄산수소암모늄 완충액을 40μL 첨가하여 교반하고, 20ng/μL의 트립신 수용액(Proteomics Grade, Code No. T6567-5×20㎍(SIGMA))을 10μL 첨가하여 37℃에서 18시간 효소 소화하였다. 소화 후, 20% 트리플루오로아세트산 수용액 2μL 첨가하여 반응을 멈추었다. 그 후, 종농도(終濃度) 0.25% 트리플루오로아세트산 수용액이 되도록 2배 희석하고, LC-MS/MS 측정에 사용하였다.

[2566] (15-2) 트라스투주맙의 LC-MS/MS 측정 조건

[2567] (분석 장치)

[2568] 나노 HPLC: EASY-nLC 1000(써모피셔사이언티픽)

[2569] 질량 분석계: 트리브리드 질량 분석계 Orbitrap Fusion(써모피셔사이언티픽)

[2570] (HPLC 분석 조건)

[2571] 트랩 컬럼: Acclaim PepMap(등록상표) 100, 75㎛×2cm(써모피셔사이언티픽)

[2572] 분석 컬럼: ESI-컬럼(NTCC-360/75-3-125, 75㎛×12.5cm, 3㎛(닛교테크노스 가부시키가이샤))

[2573] 이동상 A: 0.1% 포름산 수용액

[2574] 이동상 B: 0.1% 포름산, 아세토니트릴 용액

[2575] 로딩 용액: 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액

[2576] 유속: 300nL/min

[2577] 샘플 주입량: 1μL

[2578] 그래디언트 조건(B%): 2%(0.0-0.5분), 2%→30%(0.5-23.5분), 30%→75%(23.5-25.5분), 75%(25.5-35.0분)

[2579] (질량 분석계 분석 조건)

[2580] 이온화법: ESI, Positive 모드

[2581] 스캔 타입: 데이터 의존성 취득

[2582] 활성화 유형: 충돌 유도된 해리(CID)

[2583] 데이터의 취득은 부속 소프트인 Xcalibur 3.0(써모피셔사이언티픽) 및 Thermo Orbitrap Fusion Tune Application 2.0(써모피셔사이언티픽)을 사용하여 행하였다.

[2584] (15-3) 트라스투주맙의 수식 부위의 해석 조건

[2585] LC-MS/MS 측정 결과에 대한 수식 부위 해석에 대해서는, Proteome Discoverer version 1.4(써모피셔사이언티픽)를 사용하여 행하였다.

[2586] Proteome Discoverer에서의 해석은 Sequest HT를 검색 엔진으로서 사용하고, 프리커서 이온의 범위를 350 내지 5000Da, 총 강도 역치(Total Intensity Threshold)를 50000으로 하였다. 또한, 트립신을 소화 효소로서 설정하고, 최대 소실된 절단 부위 (Maximum Missed Cleavage Sites)는 3으로 하였다. 또한, 프리커서 및 프래그먼트 이온의 매쓰 관용성은 각각 5ppm 및 0.5Da로 하였다. 스태틱 변형에는 요오드아세트아미드에 의한 시스테인 잔기의 수식으로서, 카바미도메틸(+57.021Da)을 설정하였다. 다이나믹 변형에 대해서는, 메티오닌의 산화(+15.995Da) 및 리신 잔기에 대한 수식체(아지드 도입체(+254.102Da), 아민 도입체(+228.111Da))를 설정하였다. 또한, 펩티드 컨피던스(Peptide Confidence)가 높은(High) 것만으로 되도록 필터링하였다.

[2587] 또한, 수식 부위의 검색 대상의 아미노산 서열의 데이터로서 도 24에 도시된 (1) 내지 (3)을 사용하였다.

[2588] (15-4) 트라스투주맙의 LC-MS/MS에 의한 수식 부위의 해석 결과

[2589] LC-MS/MS를 사용한 해석 결과, 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(아지드 도입체(+254.102Da))를 포함하는 아미노산 33잔기로 이루어지는 펩티드, THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(서열번호 40)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 979.49982, 이론값: 979.49975, 4가)이 관측되고(도 25), CID 스펙트럼에서 중쇄의 EU 넘버링에서의 246 위치의 리신 잔기의 수식을 나타내는, 2가의 y19에 상당하는 m/z 1192.87(이론값: 1192.64)의 프로덕트 이온이 확인되었다(도 26).

[2590] [실시예 16: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

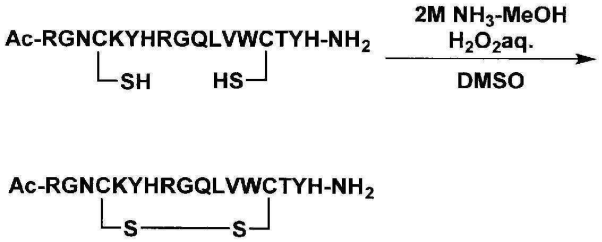
[2591] (16-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2592] Ac-RGNCKYHRGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 42)의 서열을 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 펩티드 합성 장치는 CEM사 제조 Liberty Blue를 사용. 시약은 모두 와타나베 카가쿠코교 제조의 것을 사용. Resin은 Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL, 아르기닌(R), 시스테인(C), 히스티딘(H)은 더블 커플링을 행하였다. Resin으로부터의 절제는 트리플루오로아세트산:물:트리이소프로필실란:에탄디티올=94:2.5:1.0:2.5의 용액 중 3시간 교반의 조건으로 행하였다. 절제 후 Resin을 필트레이션에 의해 제거하고, 트리플루오로아세트산을 제거하였다. 생성된 결정 중에 디에틸에테르를 첨가하여 에테르 침전을 행하고, 생성된 백색 결정을 필트레이션에 의해 회수하였다. 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(36.4mg, 16.8μmol)을 수득하였다.

[2593] MS(ESI) m/z:z=3 721.80$[M+3H]^{3+}$, z=4 541.60$[M+4H]^{4+}$

[2594] (16-2) Ac-RGNCKYHRGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 42)의 4 위치와 14 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2595] [화 90]



[2596]

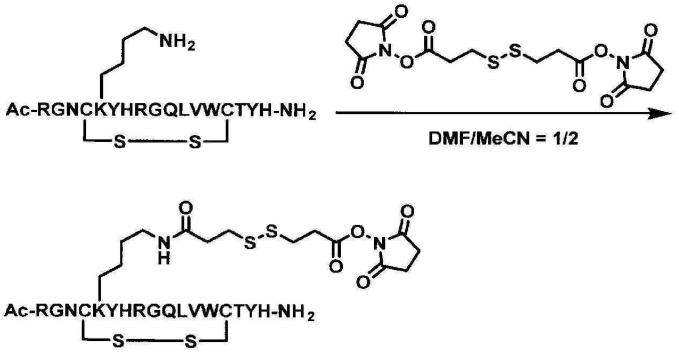
[2597] 상기 아미노산 서열은 서열번호 42이다.

[2598] (16-1)에서 합성한 펩티드(36.4mg, 16.8㎛ol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하여 2M NH_3-MeOH(17.0μL, 33.6㎛ol), 과산화수소물(34.0μL, 0.336mmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(20.3mg, 9.40㎛ol)를 수득하였다.

[2599] MS(ESI) m/z:z=3 721.25$[M+3H]^{3+}$, z=4 541.20$[M+4H]^{4+}$

[2600] (16-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2601] [화 91]



[2602]

[2603] 상기 아미노산 서열은 서열번호 42이다.

[2604] (16-2)에서 합성한 Ac-RGNCKYHRGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 42)(20.3mg, 9.40㎛ol, 다만 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(228mg, 0.563mmol)를 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(6.80mg, 2.78㎛ol)를 수득하였다.

[2605] MS(ESI) m/z:z=3 817.60$[M+3H]^{3+}$, z=4 613.45$[M+4H]^{4+}$

[2606] HPLC 순도: 100%

[2607] (16-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 MALDI-TOFMS에 의한 해석

[2608] (16-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다.

반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. MALDI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙 유래 피크는 확인되지 않고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 152639에 피크가 관측되었다.

[2609] (16-5) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[2610] (16-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2611] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2612] a: 트라스투주맙 원료

[2613] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2614] UV 225nm의 경우, 유지시간 9.454분은 트라스투주맙 원료, 9.845분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 10.173분은 펩티드가 트라스투주맙에 2개 도입된 화합물이라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 9.541분은 트라스투주맙 원료, 9.936분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 10.254분은 펩티드가 트라스투주맙에 2개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 27).

[2615] [실시예 17: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

[2616] (17-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2617] Ac-RGNCAWHRGKLVWCTYH-NH_2(서열번호 43)의 서열을 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 펩티드 합성 장치는 CEM사 제조 Liberty Blue를 사용. 시약은 모두 와타나베 카가쿠코교 제조의 것을 사용. Resin은 Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL, 아르기닌(R), 시스테인(C), 히스티딘(H)은 더블 커플링을 행하였다. Resin으로부터의 절제는 트리플루오로아세트산:물:트리이소프로필실란:에탄디티올=94:2.5:1.0:2.5의 용액 중 3시간 교반의 조건으로 행하였다. 절제 후 Resin을 필트레이션에 의해 제거하고, 트리플루오로아세트산을 제거하였다. 생성된 결정 중에 디에틸에테르를 첨가하여 에테르 침전을 행하고, 생성된 백색 결정을 필트레이션에 의해 회수하였다. 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(64.8mg, 30.5㎛ol)을 수득하였다.

[2618] MS(ESI) m/z:z=3 710.45$[M+3H]^{3+}$

[2619] (17-2) Ac-RGNCAWHRGKLVWCTYH-NH_2(서열번호 43)의 4 위치와 14 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2620] [화 92]





[2621]

[2622] 상기 아미노산 서열은 서열번호 43이다.

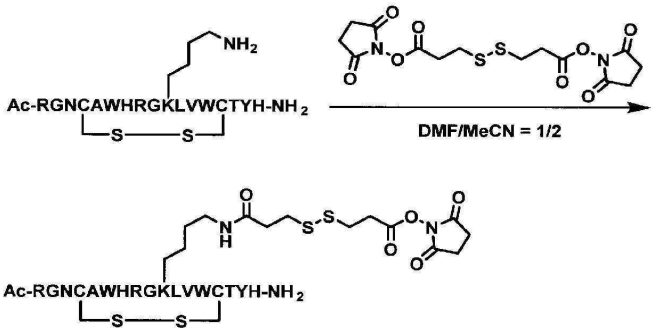
[2623] (17-2)에서 합성한 펩티드(64.8mg, 30.5㎛ol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(31.0μL, 61.0㎛ol), 과산화수소물(62.0μL, 610㎛ol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이

포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(35.3mg, 16.6㎛ol)을 수득하였다.

[2624] MS(ESI) m/z:z=3 709.75[M+3H]$^{3+}$, z=4 532.55[M+4H]$^{4+}$

[2625] (17-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2626] [화 93]



[2627]

[2628] 상기 아미노산 서열은 서열번호 43이다.

[2629] (17-2)에서 합성한 Ac-RGNCAWHRGKLVWCTYH-NH_2(서열번호 43)(35.3mg, 16.6㎛ol, 다만 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(269mg, 0.664mmol)를 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(17.5mg, 7.25㎛ol)를 수득하였다.

[2630] MS(ESI) m/z:z=3 806.20[M+3H]$^{3+}$, z=4 604.90[M+4H]$^{4+}$

[2631] HPLC 순도: 100%

[2632] (17-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2633] (17-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148235에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 도입된 생성물 유래의 피크는 관측되지 않았다.

[2634] (17-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2635] (17-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50594, 50753 및, 원료와 같은 23435에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2636] (17-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2637] (17-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2638] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2639] a: 트라스투주맙 원료

[2640] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량

[2641] UV 225nm의 경우, 유지시간 9.469분은 트라스투주맙 원료, 10.180분은 펩티드 유래의 피크라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 9.563분은 트라스투주맙 원료, 10.270분은 펩티드 유래의 피크라고 생각된다(도 28).

[2642] [실시예 18: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

[2643] (18-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2644] Ac-RGNCKWHRGELVWCTYH-NH_2(서열번호 44)의 서열을 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 펩티드 합성 장치는 CEM사 제조 Liberty Blue를 사용. 시약은 모두 와타나베 카가쿠코교 제조의 것을 사용. Resin은 Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL, 아르기닌(R), 시스테인(C), 히스티딘(H)은 더블 커플링을 행하였다. Resin으로부터의 절제는 트리플루오로아세트산:물:트리이소프로필실란:에탄디티올=94:2.5:1.0:2.5의 용액 중 3시간 교반의 조건으로 행하였다. 절제 후 Resin을 필트레이션에 의해 제거하고, 트리플루오로아세트산을 제거하였다. 생성된 결정 중에 디에틸에테르를 첨가하여 에테르 침전을 행하고, 생성된 백색 결정을 필트레이션에 의해 회수하였다. 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(77.8mg, 35.6μmol)을 수득하였다.

[2645] MS(ESI) m/z:z=3 729.70$[M+H]^+$, z=4 547.60$[M+H]^+$

[2646] (18-2) Ac-RGNCKWHRGELVWCTYH-NH_2(서열번호 44)의 4 위치와 14 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2647] [화 94]



[2648]



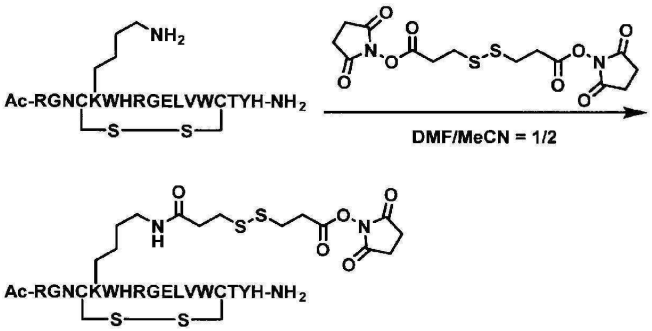
[2649] 상기 아미노산 서열은 서열번호 44이다.

[2650] (18-1)에서 합성한 펩티드(77.8mg, 35.6μmol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(71.0μL, 142μmol), 과산화수소물(145μL, 1.42mmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(40.0mg, 18.3μmol)을 수득하였다.

[2651] MS(ESI) m/z:z=3 729.00$[M+3H]^{3+}$, z=4 547.05$[M+4H]^{4+}$

[2652] (18-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2653] [화 95]



[2654]

[2655] 상기 아미노산 서열은 서열번호 44이다.

[2656] (18-2)에서 합성한 Ac-RGNCKWHRGELVWCTYH-NH_2(서열번호 44)(40.0mg, 18.3μmol, 다만 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(296mg, 0.733mmol)를 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용매로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(20.0mg, 8.09μmol)를 수득하였다.

[2657] MS(ESI) m/z:z=3 825.55$[M+3H]^{3+}$, z=4 619.45$[M+4H]^{4+}$

[2658] HPLC 순도: 31%

[2659] (18-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2660] (18-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500μg을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148222에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 150583에 피크가 관측되었다.

[2661] (18-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2662] (18-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50680, 50719 및, 원료와 같은 23438에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2663] (18-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2664] (18-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5μm을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2665] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2666] a: 트라스투주맙 원료

[2667] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2668] UV 225nm의 경우, 유지시간 9.462분은 트라스투주맙 원료, 10.142분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 9.554분은 트라스투주맙 원료, 10.230분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 29).

[2669] [실시예 19: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

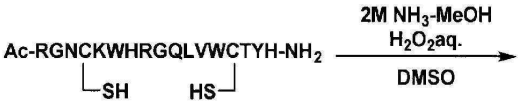
[2670] (19-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

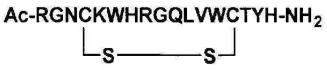
[2671] Ac-RGNCKWHRGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 45)의 서열을 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 펩티드 합성 장치는 CEM사 제조 Liberty Blue를 사용. 시약은 모두 와타나베 카가쿠코교 제조의 것을 사용. Resin은 Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL, 아르기닌(R), 시스테인(C), 히스티딘(H)은 더블 커플링을 행하였다. Resin으로부터의 절제는 트리플루오로아세트산:물:트리이소프로필실란:에탄디티올=94:2.5:1.0:2.5의 용액 중 3시간 교반의 조건으로 행하였다. 절제 후 Resin을 필트레이션에 의해 제거하고, 트리플루오로아세트산을 제거하였다. 생성된 결정 중에 디에틸에테르를 첨가하여 에테르 침전을 행하고, 생성된 백색 결정을 필트레이션에 의해 회수하였다. 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(74.1mg, 34.0μmol)을 수득하였다.

[2672] MS(ESI) m/z:z=3 729.40$[M+3H]^{3+}$, z=4 547.35$[M+4H]^{4+}$

[2673] (19-2) Ac-RGNCKWHRGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 45)의 4 위치와 14 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2674] [화 96]





[2675]

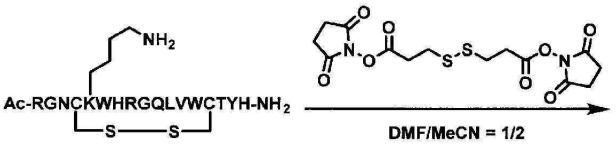
[2676] 상기 아미노산 서열은 서열번호 45이다.

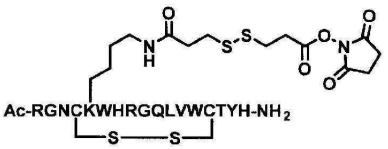
[2677] (19-2)에서 합성한 펩티드(74.1mg, 34.0μmol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(67.8μL, 0.136mmol), 과산화수소물(139μL, 1.36mmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(38.2mg, 17.5μmol)을 수득하였다.

[2678] MS(ESI) m/z:z=3 728.80$[M+3H]^{3+}$, z=4 546.85$[M+4H]^{4+}$

[2679] (19-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2680] [화 97]





[2681]

[2682] 상기 아미노산 서열은 서열번호 45이다.

[2683] (19-2)에서 합성한 Ac-RGNCKWHRGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 45)(38.2mg, 17.5㎛ol, 다만 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(283mg, 0.70mmol)를 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(16.5mg, 6.68㎛ol)를 수득하였다.

[2684] MS(ESI) m/z:z=3 825.25$[M+3H]^{3+}$, z=4 619.25$[M+4H]^{4+}$

[2685] HPLC 순도: 100%

[2686] (19-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2687] (19-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148064에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 150600에 피크가 관측되었다.

[2688] (19-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2689] (19-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50683, 50717 및, 원료와 같은 23440에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2690] (19-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2691] (19-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2692] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2693] a: 트라스투주맙 원료

[2694] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2695] UV 225nm의 경우, 유지시간 9.458분은 트라스투주맙 원료, 10.137분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 9.550분은 트라스투주맙 원료, 10.225분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 30).

[2696] [실시예 20: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

[2697] (20-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

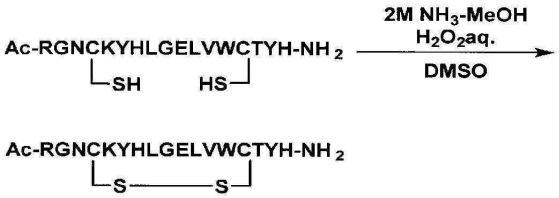
[2698] Ac-RGNCKYHLGELVWCTYH-NH_2(서열번호 46)의 서열을 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 펩티드 합성 장치는 CEM사 제조 Liberty Blue를 사용. 시약은 모두 와타나베 카가쿠코교 제조의 것을 사용. Resin은 Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL, 아르기닌(R), 시스테인(C), 히스티딘(H)은 더블 커플링을 행하였다. Resin으로부터의 절제는 트리플루오로아세트산:물:트리이소프로필실란:에탄디티올=94:2.5:1.0:2.5의 용액 중 3시간 교반의 조건으로 행하였다. 절제 후 Resin을 필트레이션에 의해 제거하고, 트리플루오로아세트산을 제거하였다. 생성된 결정 중에 디에틸에테르를 첨가하여 에테르 침전을 행하고, 생성된 백색 결정을 필트레이션에 의해 회수하였다. 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합

용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(34.5mg, 16.3μmol)을 수득하였다.

[2699] MS(ESI) m/z:z=3 707.80[M+3H]$^{3+}$, z=4531.10[M+4H]$^{4+}$

[2700] (20-2) Ac-RGNCKYHLGELVWCTYH-NH_2(서열번호 46)의 4 위치와 14 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2701] [화 98]



[2702]

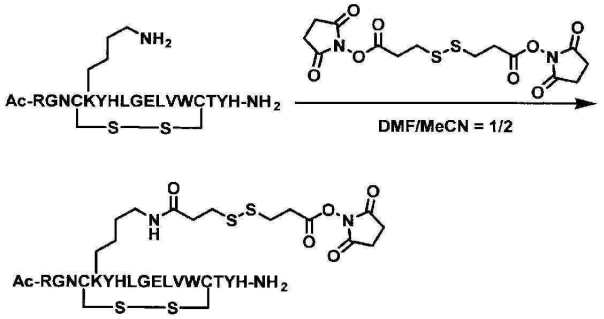
[2703] 상기 아미노산 서열은 서열번호 46이다.

[2704] (20-1)에서 합성한 펩티드(34.5mg, 16.3μmol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(17.0μL, 32.6μmol), 과산화수소물(33.0μL, 0.326mmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(15.6mg, 7.37μmol)을 수득하였다.

[2705] MS(ESI) m/z:z=3 707.10[M+3H]$^{3+}$, z=4 530.60[M+4H]$^{4+}$

[2706] (20-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2707] [화 99]



[2708]

[2709] 상기 아미노산 서열은 서열번호 46이다.

[2710] (20-2)에서 합성한 Ac-RGNCKYHLGELVWCTYH-NH_2(서열번호 46)(15.6mg, 7.37μmol, 다만 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(119mg, 0.295mmol)를 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하여, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(5.00mg, 2.08μmol)를 수득하였다.

[2711] MS(ESI) m/z:z=2 1204.85[M+2H]$^{2+}$, z=3 803.50[M+3H]$^{3+}$

[2712] HPLC 순도: 70%

[2713] (20-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2714] (20-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다.

[2715] (20-5) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2716] (20-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2717] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2718] a: 트라스투주맙 원료

[2719] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2720] UV 225nm의 경우, 유지시간 9.581분에 트라스투주맙 원료의 피크, 10.089분에 피크가 관측되었다. UV 280nm의 경우, 유지시간 9.663분에 트라스투주맙 원료의 피크, 10.307분에 피크가 관측되었다(도 31).

[2721] [실시예 21: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

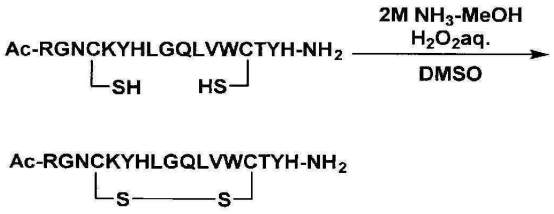
[2722] (21-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2723] Ac-RGNCKYHLGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 47)의 서열을 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 펩티드 합성 장치는 CEM사 제조 Liberty Blue를 사용. 시약은 모두 와타나베 카가쿠코교 제조의 것을 사용. Resin은 Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL, 아르기닌(R), 시스테인(C), 히스티딘(H)은 더블 커플링을 행하였다. Resin으로부터의 절제는 트리플루오로아세트산:물:트리이소프로필실란:에탄디티올=94:2.5:1.0:2.5의 용액 중 3시간 교반의 조건으로 행하였다. 절제 후 Resin을 필트레이션에 의해 제거하고, 트리플루오로아세트산을 제거하였다. 생성된 결정 중에 디에틸에테르를 첨가하여 에테르 침전을 행하고, 생성된 백색 결정을 필트레이션에 의해 회수하였다. 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(53.0mg, 25.0㎛ol)을 수득하였다.

[2724] MS(ESI) m/z:z=3 707.40$[M+3H]^{3+}$, z=4 530.80$[M+4H]^{4+}$

[2725] (21-2) Ac-RGNCKYHLGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 47)의 4 위치와 14 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2726] [화 100]

[2727] 

[2728] 상기 아미노산 서열은 서열번호 47이다.

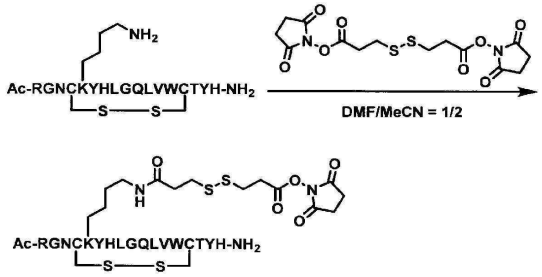
[2729] (21-1)에서 합성한 펩티드(53.0mg, 25.0㎛ol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(25.0μL, 50.0㎛ol), 과산화수소물(51.0μL, 0.500mmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(23.2mg,

10.9μmol)을 수득하였다.

[2730] MS(ESI) m/z:z=3 706.75[M+3H]$^{3+}$, z=4 530.35[M+4H]$^{4+}$

[2731] (21-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2732] [화 101]

[2733] 

[2734] 상기 아미노산 서열은 서열번호 47이다.

[2735] (21-2)에서 합성한 Ac-RGNCKYHLGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 47)(23.2mg, 10.9μmol, 다만 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(176mg, 0.436mmol)를 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(6.40mg, 2.66μmol)을 수득하였다.

[2736] MS(ESI) m/z:z=2 1204.30[M+2H]$^{2+}$, z=3 803.15[M+3H]$^{3+}$

[2737] HPLC 순도: 61%

[2738] (21-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2739] (21-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500μg을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148069에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물은 150515에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물은 152972에 피크가 관측되었다.

[2740] (21-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2741] (21-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50683, 50844, 및, 원료와 같은 23439에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2742] (21-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2743] (21-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5μm을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2744] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2745] a: 트라스투주맙 원료

[2746] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2747] UV 225nm의 경우, 유지시간 9.454분은 트라스투주맙 원료, 9.877분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 10.230분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 9.540분은 트라스투주맙 원료, 9.966분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 10.317분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 32).

[2748] [실시예 22: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

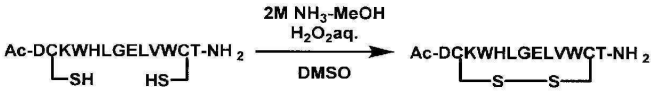
[2749] (22-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2750] Ac-DCKWHLGELVWCT-NH_2(서열번호 48)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(71.1mg, 43.6μmol)을 수득하였다.

[2751] MS(ESI) m/z:z=2 816.350$[M+2H]^{2+}$

[2752] (22-2) Ac-DCKWHLGELVWCT-NH_2(서열번호 48)의 2 위치와 12 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2753] [화 102]

[2754] 

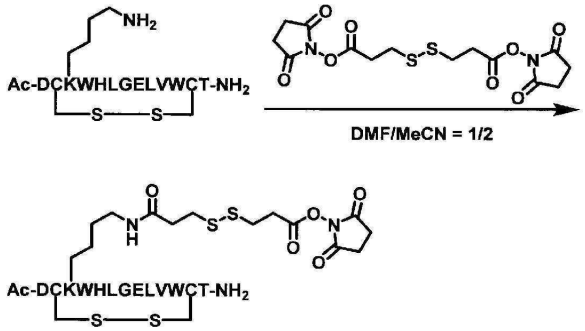
[2755] 상기 아미노산 서열은 서열번호 48이다.

[2756] (22-1)에서 합성한 펩티드(71.1mg, 43.6μmol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(43.6μL, 87.2μmol), 과산화수소물(88.8μL, 87.2μmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(31.6mg, 19.4μmol)을 수득하였다.

[2757] MS(ESI) m/z:z=2 815.350$[M+2H]^{2+}$

[2758] (22-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2759] [화 103]

[2760] 

[2761] 상기 아미노산 서열은 서열번호 48이다.

[2762] (22-2)에서 합성한 Ac-DCKWHLGELVWCT-NH_2(서열번호 48)(31.6mg, 19.4μmol, 다만 2번째와 12번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(312mg, 776μmol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동

결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(14.2mg, 7.40㎛ol)을 수득하였다.

[2763] MS(ESI) m/z:z=2 960.05$[M+2H]^{2+}$

[2764] HPLC 순도: 70%

[2765] (22-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2766] (22-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다.

[2767] (22-5) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2768] (22-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2769] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2770] a: 트라스투주맙 원료

[2771] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2772] UV 225nm의 경우, 유지시간 11.193분, 11.981분에 피크가 관측되었다. UV 280nm의 경우, 유지시간 11.257분, 12.057분에 피크가 관측되었다(도 33).

[2773] [실시예 23: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

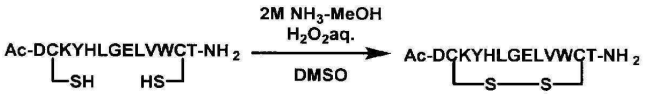
[2774] (23-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2775] Ac-DCKYHLGELVWCT-NH_2(서열번호 49)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(28.0mg, 17.4㎛ol)을 수득하였다.

[2776] MS(ESI) m/z:z=2 804.80$[M+2H]^{2+}$

[2777] (23-2) Ac-DCKYHLGELVWCT-NH_2(서열번호 49)의 2 위치와 12 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2778] [화 104]

[2779] 

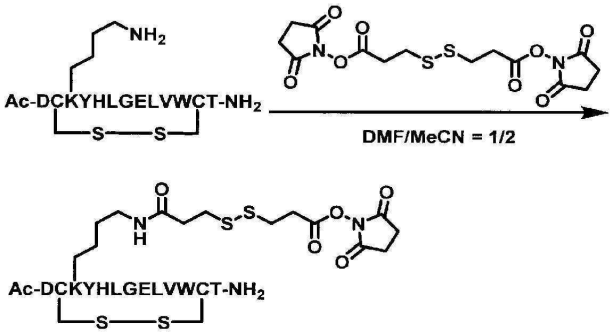
[2780] 상기 아미노산 서열은 서열번호 49이다.

[2781] (23-1)에서 합성한 펩티드(28.0mg, 17.4㎛ol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(17.4μL, 34.8㎛ol), 과산화수소물(35.4μL, 348㎛ol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(18.0mg, 11.2㎛ol)를 수득하였다.

[2782] MS(ESI) m/z:z=2 803.90$[M+2H]^{2+}$

[2783] (23-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2784] [화 105]



[2785]

[2786] 상기 아미노산 서열은 서열번호 49이다.

[2787] (23-2)에서 합성한 Ac-DCKYHLGELVWCT-NH_2(서열번호 49)(18.0mg, 11.2㎛ol, 다만 2번째와 12번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(181mg,448㎛ol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(2.75mg, 1.45㎛ol)를 수득하였다.

[2788] MS(ESI) m/z:z=2 948.55$[M+2H]^{2+}$

[2789] HPLC 순도: 75%

[2790] (23-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2791] (23-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물은 150001에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물은 151618에 피크가 관측되었다.

[2792] (23-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2793] (23-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50682, 50845 및, 원료와 같은 23439에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2794] (23-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2795] (23-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2796] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2797] a: 트라스투주맙 원료

[2798] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2799] UV 225nm의 경우, 유지시간 10.347분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 11.015분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 10.434분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 11.100분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 34).

[2800] [실시예 24: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

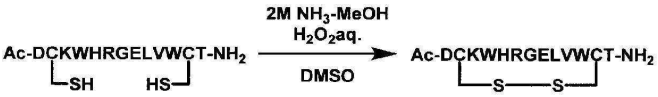
[2801] (24-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2802] Ac-DCKWHRGELVWCT-NH_2(서열번호 50)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(52.8mg, 31.5μmol)을 수득하였다.

[2803] MS(ESI) m/z:z=2 837.85$[M+2H]^{2+}$, z=3 558.90$[M+3H]^{3+}$

[2804] (24-2) Ac-DCKWHRGELVWCT-NH_2(서열번호 50)의 2 위치와 12 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2805] [화 106]

[2806] 

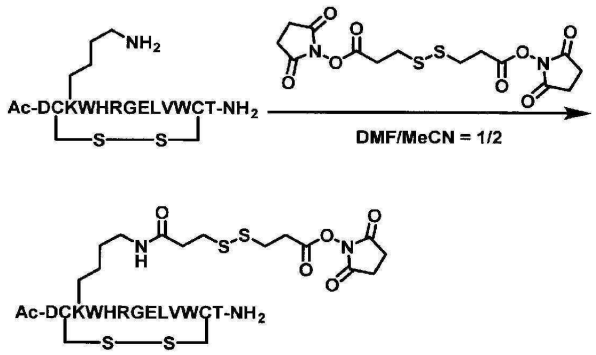
[2807] 상기 아미노산 서열은 서열번호 50이다.

[2808] (24-1)에서 합성한 펩티드(52.8mg, 31.5μmol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(31.5μL, 63.0μmol), 과산화수소물(64.0μL, 630μmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(26.9mg, 16.1μmol)를 수득하였다.

[2809] MS(ESI) m/z:z=2 836.75$[M+2H]^{2+}$, z=3 558.25$[M+3H]^{3+}$

[2810] (24-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2811] [화 107]

[2812] 

[2813] 상기 아미노산 서열은 서열번호 50이다.

[2814] (24-2)에서 합성한 Ac-DCKWHRGELVWCT-NH_2(서열번호 50)(26.9mg, 16.1μmol, 다만 2번째와 12번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(260mg, 644μmol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(8.40mg, 4.28μmol)를 수득하였다.

[2815] MS(ESI) m/z:z=2 981.50$[M+2H]^{2+}$, z=3 654.70$[M+3H]^{3+}$

[2816] HPLC 순도: 78%

[2817] (24-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2818] (24-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물은 150268에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물은 152295에 피크가 관측되었다.

[2819] (24-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2820] (24-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50682, 50841 및, 원료와 같은 23438에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2821] (24-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2822] (24-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2823] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2824] a: 트라스투주맙 원료

[2825] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2826] UV 225nm의 경우, 유지시간 10.749분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 11.679분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 10.849분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 11.782분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 35).

[2827] [실시예 25: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

[2828] (25-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2829] Ac-DCKWHLGQLVWCT-NH_2(서열번호 51)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(68.5mg, 42.0㎛ol)을 수득하였다.

[2830] MS(ESI) m/z:z=2 815.90$[M+2H]^{2+}$, z=3 544.25$[M+3H]^{3+}$

[2831] (25-2) Ac-DCKWHLGQLVWCT-NH_2(서열번호 51)의 2 위치와 12 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2832] [화 108]

[2833] 

[2834] 상기 아미노산 서열은 서열번호 51이다.

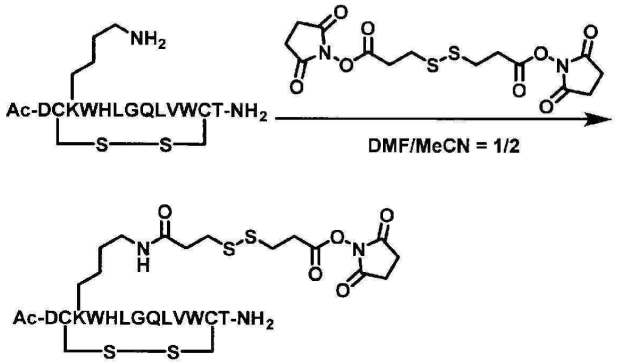
[2835] (25-1)에서 합성한 펩티드(68.5mg, 42.0㎛ol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(42.0μL, 84.0㎛ol), 과산화수소물(85.7μL, 840㎛ol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티

드(30.6mg, 18.8㎛ol)를 수득하였다.

[2836] MS(ESI) m/z:z=2 814.90[M+2H]$^{2+}$

[2837] (25-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2838] [화 109]



[2839]

[2840] 상기 아미노산 서열은 서열번호 51이다.

[2841] (25-2)에서 합성한 Ac-DCKWHLGQLVWCT-NH_2(서열번호 51)(30.6mg, 18.8㎛ol, 다만 2번째와 12번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(304mg,752㎛ol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(4.10mg, 2.14㎛ol)를 수득하였다.

[2842] MS(ESI) m/z:z=2 959.45[M+2H]$^{2+}$

[2843] HPLC 순도: 74%

[2844] (25-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2845] (42-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물은 150025에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물은 151878에 피크가 관측되었다.

[2846] (25-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2847] (25-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50682, 50844 및, 원료와 같은 23439에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2848] (25-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2849] (25-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2850] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2851] a: 트라스투주맙 원료

[2852] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2853] UV 225nm의 경우, 유지시간 10.761분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 11.722분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 10.849분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 11.807분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 36).

[2854] [실시예 26: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

[2855] (26-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2856] Ac-DCKYHRGELVWCT-NH_2(서열번호 52)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(100mg, 60.8μmol)을 수득하였다.

[2857] MS(ESI) m/z:z=2 826.35$[M+2H]^{2+}$, z=3 551.25$[M+3H]^{3+}$

[2858] (26-2) Ac-DCKYHRGELVWCT-NH_2(서열번호 52)의 2 위치와 12 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2859] [화 110]

[2860] 

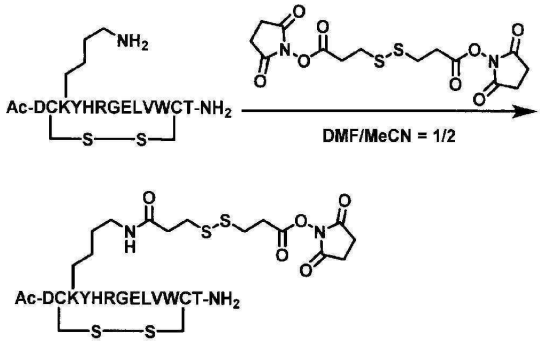
[2861] 상기 아미노산 서열은 서열번호 52이다.

[2862] (26-1)에서 합성한 펩티드(100mg, 60.8μmol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(60.8μL, 122μmol), 과산화수소물(125μL, 1.22mmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(74.5mg, 45.2μmol)를 수득하였다.

[2863] MS(ESI) m/z:z=2 825.30$[M+2H]^{2+}$, z=3 550.60$[M+3H]^{3+}$

[2864] (26-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2865] [화 111]

[2866] 

[2867] 상기 아미노산 서열은 서열번호 52이다.

[2868] (26-2)에서 합성한 Ac-DCKYHRGELVWCT-NH_2(서열번호 52)(74.5mg, 45.2μmol, 다만 2번째와 12번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(731mg, 1.81mmol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산

수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(23.0mg, 18.9㎛ol)를 수득하였다.

[2869] MS(ESI) m/z:z=2 970.00$[M+2H]^{2+}$

[2870] HPLC 순도: 69%

[2871] (26-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2872] (26-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 147074에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물은 150062에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물은 151873에 피크가 관측되었다. 154562에 부생성물에 의한 피크가 관측되었다.

[2873] (26-5) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2874] (26-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2875] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2876] a: 트라스투주맙 원료

[2877] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2878] UV 225nm의 경우, 유지시간 9.464분은 트라스투주맙 원료, 10.309분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 10.962분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 9.564분은 트라스투주맙 원료, 10.395분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 11.054분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 37).

[2879] 실시예 27: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

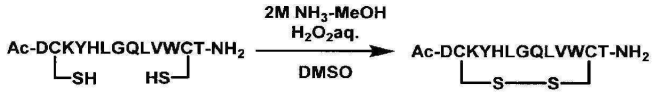
[2880] (27-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2881] Ac-DCKYHLGQLVWCT-NH_2(서열번호 53)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(85.6mg, 53.3㎛ol)을 수득하였다.

[2882] MS(ESI) m/z:z=2 804.45$[M+2H]^{2+}$, z=3 536.60$[M+3H]^{3+}$

[2883] (27-2) Ac-DCKYHLGQLVWCT-NH_2(서열번호 53)의 2 위치와 12 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2884] [화 112]

[2885] 

[2886] 상기 아미노산 서열은 서열번호 53이다.

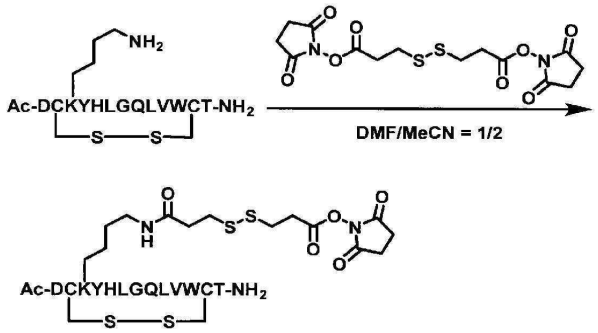
[2887] (27-1)에서 합성한 펩티드(85.6mg, 53.3㎛ol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(53.5μL, 107㎛ol), 과산화수소물(109μL, 1.07mmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데

실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(34.2mg, 21.3μmol)를 수득하였다.

[2888] MS(ESI) m/z:z=2 803.40$[M+2H]^{2+}$

[2889] (27-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2890] [화 113]

[2891] 

[2892] 상기 아미노산 서열은 서열번호 53이다.

[2893] (27-2)에서 합성한 Ac-DCKYHLGQLVWCT-NH_2(서열번호 53)(34.2mg, 21.3μmol, 다만 2번째와 12번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(345mg, 852μmol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(12.0mg, 6.34μmol)을 수득하였다.

[2894] MS(ESI) m/z:z=2 948.00$[M+2H]^{2+}$

[2895] HPLC 순도: 80%

[2896] (27-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2897] (27-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500μg을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 147285에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물은 150031에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물은 151947에 피크가 관측되었다. 154885에 부생성물에 의한 피크가 관측되었다.

[2898] (27-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2899] (27-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50685, 50847에 피크가 관측되었다.

[2900] (27-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2901] (27-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5μm을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃,

서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2902] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2903] a: 트라스투주맙 원료

[2904] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2905] UV 225nm의 경우, 유지시간 9.468분은 트라스투주맙 원료, 10.360분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 11.045분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 9.575분은 트라스투주맙 원료, 10.449분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 11.137분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 38).

[2906] [실시예 28: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

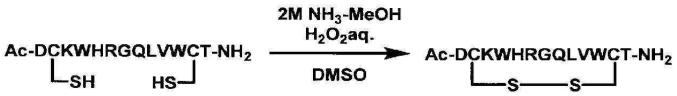
[2907] (28-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2908] Ac-DCKWHRGQLVWCT-NH_2(서열번호 54)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(89.4mg, 57.4μmol)을 수득하였다.

[2909] MS(ESI) m/z:z=2 837.30$[M+2H]^{2+}$, z=3 558.60$[M+3H]^{3+}$

[2910] (28-2) Ac-DCKWHRGQLVWCT-NH_2(서열번호 54)의 2 위치와 12 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2911] [화 114]

[2912] 

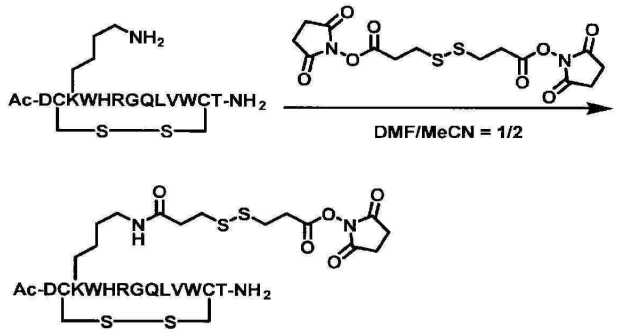
[2913] 상기 아미노산 서열은 서열번호 54이다.

[2914] (28-1)에서 합성한 펩티드(89.4mg, 57.4μmol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(53.5μL, 107μmol), 과산화수소물(109μL, 1.07mmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(64.4mg, 38.5μmol)를 수득하였다.

[2915] MS(ESI) m/z:z=2 836.35$[M+2H]^{2+}$, z=3 558.00$[M+3H]^{3+}$

[2916] (28-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2917] [화 115]

[2918] 

[2919] 상기 아미노산 서열은 서열번호 54이다.

[2920] (28-2)에서 합성한 Ac-DCKWHRGQLVWCT-NH_2(서열번호 54)(64.4mg, 38.5μmol, 다만 2번째와 12번째의 2개의 시스테

인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(623mg, 1.54mmol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(21.8mg, 11.1μmol)을 수득하였다.

[2921] MS(ESI) m/z:z=2 981.05$[M+2H]^{2+}$, z=3 654.25$[M+3H]^{3+}$

[2922] HPLC 순도: 82%

[2923] (28-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2924] (28-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500μg을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 147548에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물은 150261에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물은 152112에 피크가 관측되었다. 154824에 부생성물에 의한 피크가 관측되었다.

[2925] (28-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2926] (28-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50684, 50845에 피크가 관측되었다.

[2927] (28-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2928] (28-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5μm을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2929] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2930] a: 트라스투주맙 원료

[2931] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2932] UV 225nm의 경우, 유지시간 9.477분은 트라스투주맙 원료, 10.714분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 11.650분은 부생성물이라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 9.573분은 트라스투주맙 원료, 10.812분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 11.742분은 부생성물이라고 생각된다(도 39).

[2933] [실시예 29: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

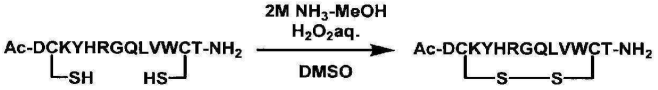
[2934] (29-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2935] Ac-DCKYHRGQLVWCT-NH_2(서열번호 55)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(93.6mg, 56.7μmol)을 수득하였다.

[2936] MS(ESI) m/z:z=2 825.80$[M+2H]^{2+}$, z=3 550.90$[M+3H]^{3+}$

[2937] (29-2) Ac-DCKYHRGQLVWCT-NH_2(서열번호 55)의 2 위치와 12 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2938] [화 116]

[2939] 

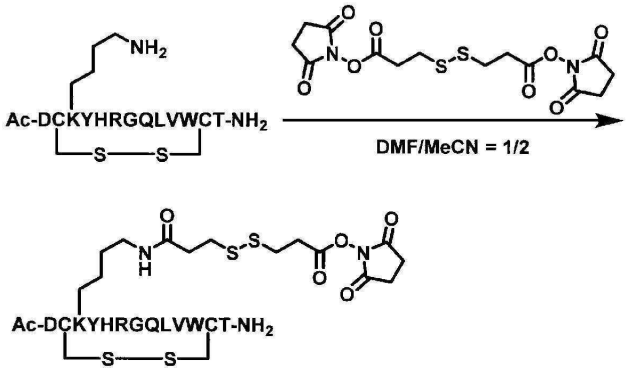
[2940] 상기 아미노산 서열은 서열번호 55이다.

[2941] (29-1)에서 합성한 펩티드(93.6mg, 56.7㎛ol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(56.5μL, 113㎛ol), 과산화수소물(115μL, 1.13mmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(71.6mg, 46.2㎛ol)를 수득하였다.

[2942] MS(ESI) m/z:z=2 824.85$[M+2H]^{2+}$, z=3 550.25$[M+3H]^{3+}$

[2943] (29-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2944] [화 117]

[2945] 

[2946] 상기 아미노산 서열은 서열번호 55이다.

[2947] (29-2)에서 합성한 Ac-DCKYHRGQLVWCT-NH_2(서열번호 55)(71.6mg, 46.2㎛ol, 다만 2번째와 12번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(747mg, 1.85mmol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(25.5mg, 13.2㎛ol)를 수득하였다.

[2948] MS(ESI) m/z:z=2 969.45$[M+2H]^{2+}$, z=3646.75$[M+3H]^{3+}$

[2949] HPLC 순도: 82%

[2950] (29-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2951] (29-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물은 149884에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물은 151873에 피크가 관측되었다.

[2952] (29-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2953] (29-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50682, 50844에 피크가 관측되었다.

[2954] (29-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2955] (29-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC-HPLC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2956] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2957] a: 트라스투주맙 원료

[2958] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2959] UV 225nm의 경우, 유지시간 10.292분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 10.949분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 10.381분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물, 11.038분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 40).

[2960] [실시예 30: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

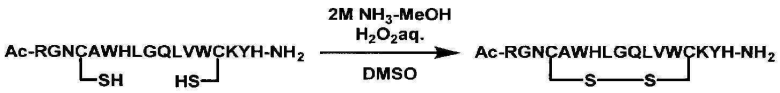
[2961] (30-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2962] Ac-RGNCAWHLGQLVWCKYH-NH_2(서열번호 56)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(54.2mg, 25.7㎛ol)을 수득하였다.

[2963] MS(ESI) m/z:z=3 705.05$[M+3H]^{3+}$, z=4 529.10$[M+4H]^{4+}$

[2964] (30-2) Ac-RGNCAWHLGQLVWCKYH-NH_2(서열번호 56)의 4 위치와 14 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2965] [화 118]

[2966] 

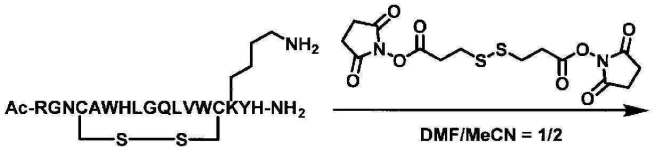
[2967] 상기 아미노산 서열은 서열번호 56이다.

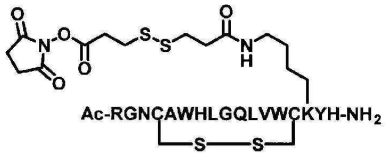
[2968] (30-1)에서 합성한 펩티드(54.2mg, 25.7㎛ol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(25.7μL, 51.4㎛ol), 과산화수소물(52.5μL, 514㎛ol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(13.3mg, 5.54㎛ol)를 수득하였다.

[2969] MS(ESI) m/z:z=3 704.45$[M+3H]^{3+}$, z=4 528.60$[M+4H]^{4+}$

[2970] (30-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2971] [화 119]





[2972]

[2973] 상기 아미노산 서열은 서열번호 56이다.

[2974] (30-2)에서 합성한 Ac-RGNCAWHLGQLVWCKYH-NH_2(서열번호 56)(13.3mg, 5.54μmol, 다만 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(89.6mg, 222μmol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(7.00mg, 2.92μmol)를 수득하였다.

[2975] MS(ESI) m/z:z=3 800.90$[M+3H]^{3+}$, z=4 600.80$[M+4H]^{4+}$

[2976] HPLC 순도: 69%

[2977] (30-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[2978] (30-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500μg을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148788에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 151375에 피크가 관측되었다.

[2979] (30-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[2980] (30-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50593, 50756 및, 원료와 같은 23337에 경쇄 피크가 관측되었다.

[2981] (30-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-HPLC 해석

[2982] (30-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 Butyl-NPR(TOSOH) 4.6×350mm 2.5μm을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 1.0ml/min, 그래디언트를 B 0→100%, 12min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 25℃, 서모스탯 온도는 TR, 검출기는 UV 225nm(Ch1), 280nm(Ch2)의 2파장으로 검출하였다.

[2983] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[2984] a: 트라스투주맙 원료

[2985] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[2986] UV 225nm의 경우, 유지시간 9.556분은 트라스투주맙 원료, 10.259분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물 유래의 피크라고 생각된다. UV 280nm의 경우, 유지시간 9.549분은 트라스투주맙 원료, 10.382분은 펩티드

가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물 유래의 피크라고 생각된다(도 41).

[2987] [실시예 31: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

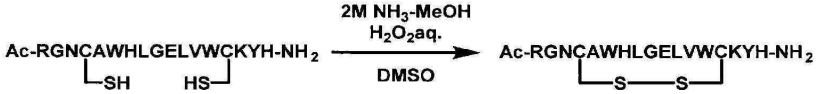
[2988] (31-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[2989] Ac-RGNCAWHLGELVWCKYH-NH_2(서열번호 57)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(34.0mg, 16.1μmol)을 수득하였다.

[2990] MS(ESI) m/z:z=3 705.40$[M+3H]^{3+}$, z=4 529.30$[M+4H]^{4+}$

[2991] (31-2) Ac-RGNCAWHLGELVWCKYH-NH_2(서열번호 57)의 4 위치와 14 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[2992] [화 120]

[2993] 

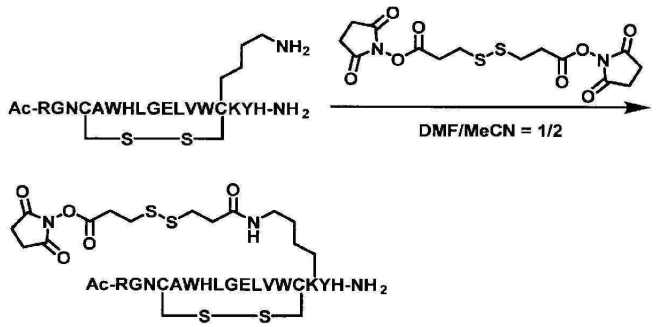
[2994] 상기 아미노산 서열은 서열번호 57이다.

[2995] (31-1)에서 합성한 펩티드(34.0mg, 16.1μmol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(16.1μL, 32.2μmol), 과산화수소물(32.9μL, 322μmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(13.6mg, 6.40μmol)를 수득하였다.

[2996] MS(ESI) m/z:z=3 704.85$[M+3H]^{3+}$, z=4 528.80$[M+4H]^{4+}$

[2997] (31-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[2998] [화 121]

[2999] 

[3000] 상기 아미노산 서열은 서열번호 57이다.

[3001] (31-2)에서 합성한 Ac-RGNCAWHLGELVWCKYH-NH_2(서열번호 57)(13.6mg, 6.40μmol, 다만 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(104mg, 256μmol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하여, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(1.5mg, 0.63μmol)을 수득하였다.

[3002] MS(ESI) m/z:z=3 801.45$[M+3H]^{3+}$, z=4 601.50$[M+4H]^{4+}$

[3003] HPLC 순도: 77%

[3004] (31-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3005] (31-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148219에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 도입된 생성물 유래의 피크는 관측되지 않았다.

[3006] (31-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[3007] (31-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50592, 50762 및, 원료와 같은 23338에 경쇄 피크가 관측되었다.

[3008] (31-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3009] (31-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2S_{04}$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A50% B50%→A0% B100%, 12min(데이터 채취15min), 컬럼 온도는 실온, 서모스탯 온도는 실온, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3010] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3011] a: 트라스투주맙 원료

[3012] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[3013] 유지시간 6.8590분은 트라스투주맙 원료, 8.0655분은 펩티드 유래의 피크라고 생각된다(도 42).

[3014] [실시예 32: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

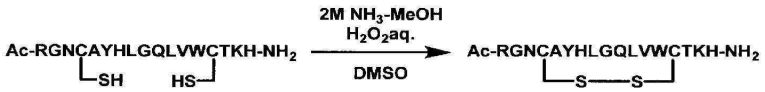
[3015] (32-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[3016] Ac-RGNCAYHLGQLVWCTKH-NH_2(서열번호 58)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(36.7mg, 18.1㎛mol)을 수득하였다.

[3017] MS(ESI) m/z:z=3 676.75$[M+3H]^{3+}$, z=4 507.80$[M+4H]^{4+}$

[3018] (32-2) Ac-RGNCAYHLGQLVWCTKH-NH_2(서열번호 58)의 4 위치와 14 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[3019] [화 122]

[3020] 

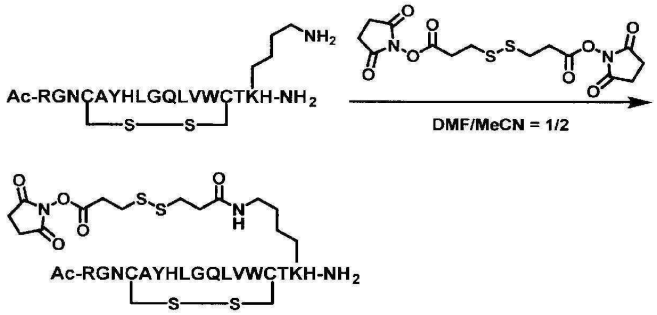
[3021] 상기 아미노산 서열은 서열번호 58이다.

[3022] (32-1)에서 합성한 펩티드(36.7mg, 18.1㎛mol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(18.1μL, 36.2㎛mol), 과산화수소물(37.0μL, 362㎛mol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(18.2mg, 8.99㎛mol)를 수득하였다.

[3023] MS(ESI) m/z:z=3 676.00[M+3H]$^{3+}$, z=4 507.30[M+4H]$^{4+}$

[3024] (32-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[3025] [화 123]



[3026]

[3027] 상기 아미노산 서열은 서열번호 58이다.

[3028] (32-2)에서 합성한 Ac-RGNCAYHLGQLVWCTKH-NH_2(서열번호 58)(18.2mg, 8.99㎛ol, 다만 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(145mg, 360㎛ol)을 아세토니트릴(1.50mL)에 용해한 용액을 첨가하여, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(3.00mg, 1.30㎛ol)를 수득하였다.

[3029] MS(ESI) m/z:z=3 772.45[M+3H]$^{3+}$

[3030] HPLC 순도: 90%

[3031] (32-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3032] (32-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148077에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 150281에 피크가 관측되었다.

[3033] (32-5) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3034] (32-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3035] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3036] a: 트라스투주맙 원료

[3037] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[3038] 유지시간 11.1800분은 트라스투주맙 원료, 11.8682분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 43).

[3039] [실시예 33: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

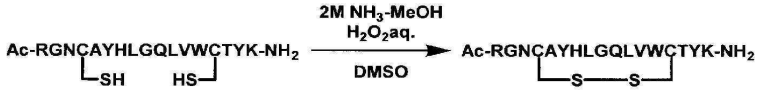
[3040] (33-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[3041] Ac-RGNCAYHLGQLVWCTYK-NH_2(서열번호 59)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(52.1mg, 25.4μmol)을 수득하였다.

[3042] MS(ESI) m/z:z=2 1027.3$[M+2H]^{2+}$, z=3 685.45$[M+3H]^{3+}$

[3043] (33-2) Ac-RGNCAYHLGQLVWCTYK-NH_2(서열번호 59)의 4 위치와 14 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[3044] [화 124]

[3045] 

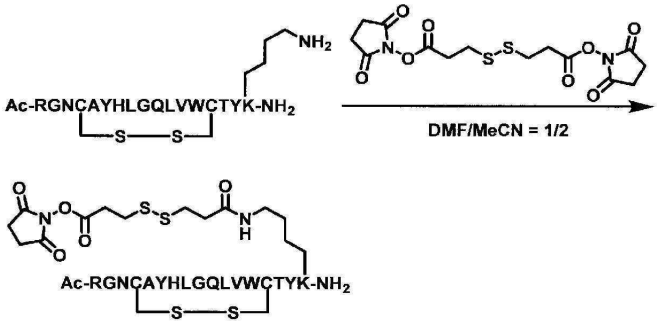
[3046] 상기 아미노산 서열은 서열번호 59이다.

[3047] (33-1)에서 합성한 펩티드(52.1mg, 25.4μmol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(25.4μL, 50.8μmol), 과산화수소물(51.9μL, 508μmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(4.70mg, 2.29μmol)를 수득하였다.

[3048] MS(ESI) m/z:z=2 1026.5$[M+2H]^{2+}$, z=3 684.75$[M+3H]^{3+}$

[3049] (33-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[3050] [화 125]

[3051] 

[3052] 상기 아미노산 서열은 서열번호 59이다.

[3053] (33-2)에서 합성한 Ac-RGNCAYHLGQLVWCTYK-NH_2(서열번호 59)(4.70mg, 2.29μmol, 다만 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(0.50mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(37.0mg,91.6μmol)을 아세토니트릴(1.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(5.00mg, 2.14μmol)를 수득하였다.

[3054] MS(ESI) m/z:z=3 781.20$[M+3H]^{3+}$

[3055] HPLC 순도: 79%

[3056] (33-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3057] (33-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로

하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148223에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 150488에 피크가 관측되었다.

[3058] (33-5) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3059] (33-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3060] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3061] a: 트라스투주맙 원료

[3062] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[3063] 유지시간 11.1867분은 트라스투주맙 원료, 12.2550분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 44).

[3064] [실시예 34(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

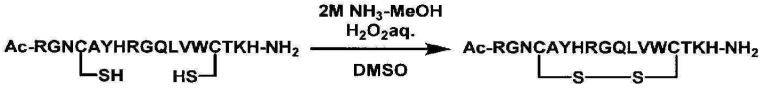
[3065] (34-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[3066] Ac-RGNCAYHRGQLVWCTKH-NH_2(서열번호 60)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물(66.3mg, 32.0㎛mol)을 수득하였다.

[3067] MS(ESI) m/z:z=3 691.10$[M+3H]^{3+}$, z=4 518.55$[M+4H]^{4+}$

[3068] (34-2) Ac-RGNCAYHRGQLVWCTKH-NH_2(서열번호 60)의 4 위치와 14 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[3069] [화 126]

[3070] 

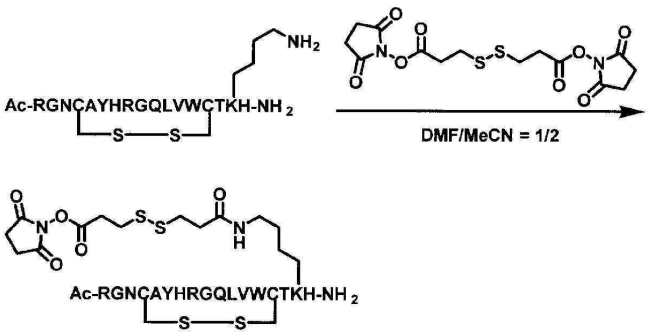
[3071] 상기 아미노산 서열은 서열번호 60이다.

[3072] (34-1)에서 합성한 펩티드(66.3mg, 32.0㎛mol)를 DMSO(5.00mL)에 용해하고, 2M NH_3-MeOH(32.0μL, 64.0㎛mol), 과산화수소물(65.4μL, 640㎛mol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반을 행하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드(40.0mg, 19.3㎛mol)를 수득하였다.

[3073] MS(ESI) m/z:z=3 690.40$[M+3H]^{3+}$, z=4 518.05$[M+4H]^{4+}$

[3074] (34-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[3075] [화 127]



[3076]

[3077] 상기 아미노산 서열은 서열번호 60이다.

[3078] (34-2)에서 합성한 Ac-RGNCAYHRGQLVWCTKH-NH_2(서열번호 60)(40.0mg, 19.3μmol, 다만 4번째와 14번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(312mg, 772μmol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(4.50mg, 1.91μmol)를 수득하였다.

[3079] MS(ESI) m/z:z=3 786.85$[M+3H]^{3+}$, m/z:z=4 590.45$[M+4H]^{4+}$

[3080] HPLC 순도: 78%

[3081] (34-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3082] (34-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500μg을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148081에 피크가 관측되었다.

[3083] (34-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[3084] (34-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50682, 50844 및, 원료와 같은 23439에 경쇄 피크가 관측되었다.

[3085] (34-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3086] (34-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5μm을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3087] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3088] a: 트라스투주맙 원료

[3089] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[3090] 유지시간 10.0610분은 트라스투주맙 원료유래의 화합물이라고 생각된다. 또한, 11.0666분에 피크가 확인되었다(도 45).

[3091] [실시예 35: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

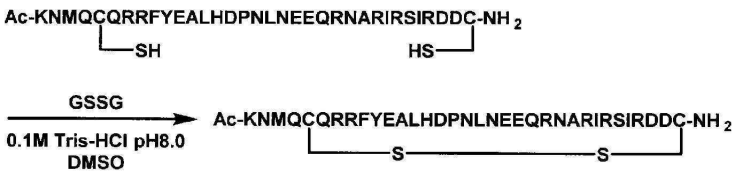
[3092] (35-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[3093] Ac-KNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 61)의 서열을 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 펩티드 합성 장치는 CEM사 제조 Liberty Blue를 사용. 시약은 모두 와타나베 카가쿠코교 제조의 것을 사용. Resin은 Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL, 아르기닌(R), 시스테인(C), 히스티딘(H)은 더블 커플링을 행하였다. Resin으로부터의 절제는 트리플루오로아세트산:물:트리이소프로필실란:에탄디티올=94:2.5:1.0:2.5의 용액 중 3시간 교반의 조건으로 행하였다. 절제 후 Resin을 필트레이션에 의해 제거하고, 트리플루오로아세트산을 제거하였다. 생성된 결정 중에 디에틸에테르를 첨가하여 에테르 침전을 행하고, 생성된 백색 결정을 필트레이션에 의해 회수하였다. 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(47.0mg, 11.0㎛ol)을 수득하였다.

[3094] MS(ESI) m/z:z=5 85853.35$[M+5H]^{5+}$, z=6 711.25$[M+6H]^{6+}$

[3095] (35-2) Ac-KNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 61)의 5 위치와 34 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[3096] [화 128]

[3097] 

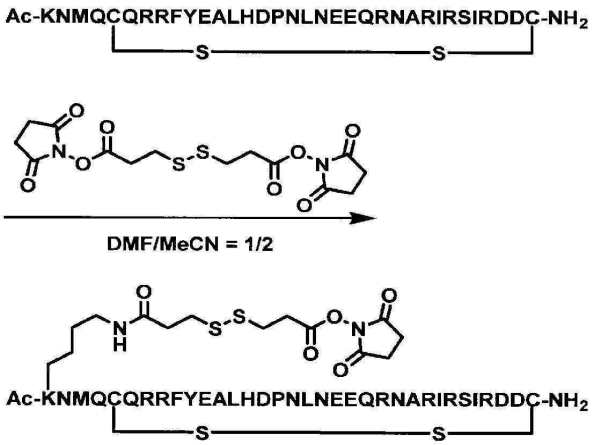
[3098] 상기 아미노산 서열은 서열번호 61이다.

[3099] (35-1)에서 합성한 펩티드(47.0mg, 11.0㎛ol)를 DMSO(1.10mL)에 용해하고, 0.1M Tris-HCl pH8.0(11.0mL)을 첨가하였다. 이 용액에 글루타티온 산화형 (34.0mg, 55.0㎛ol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산 0.05%을 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(18.1mg, 4.25㎛ol)을 수득하였다.

[3100] MS(ESI) m/z:z=5 85852.95$[M+5H]^{5+}$, z=6 710.95$[M+6H]^{6+}$

[3101] (35-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[3102] [화 129]

[3103] 

[3104] 상기 아미노산 서열은 서열번호 61이다.

[3105] (35-2)에서 합성한 Ac-KNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 61)(18.1mg, 4.25㎛ol, 다만 5번째와 34번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(69.0mg, 0.170mmol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(4.00mg, 0.80㎛ol)를 수득하였다.

[3106] MS(ESI) m/z:z=5 910.85$[M+5H]^{5+}$, z=6 759.20$[M+6H]^{6+}$

[3107] HPLC 순도: 60%

[3108] (35-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3109] (35-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 171μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 8.5μL(항체에 대하여 10등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148234에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 152672에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물이 157107에 피크가 확인되었다.

[3110] (35-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[3111] (35-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50684, 50844에 피크가 관측되었다.

[3112] (35-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3113] (35-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3114] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3115] a: 트라스투주맙 원료

[3116] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 10등량;

[3117] 유지시간 10.0542분은 트라스투주맙 원료, 9.4481분은 펩티드가 1개 도입된 화합물, 8.5522분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 46).

[3118] [실시예 36: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

[3119] (36-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

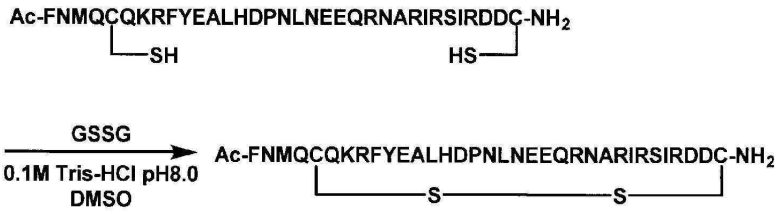
[3120] Ac-FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 62)의 서열을 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 펩티드 합성 장치는 CEM사 제조 Liberty Blue를 사용. 시약은 모두 와타나베 카가쿠코교 제조의 것을 사용. Resin은 Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL, 아르기닌(R), 시스테인(C), 히스티딘(H)은 더블 커플링을 행하였다. Resin으로부터의 절제는 트리플루오로아세트산:물:트리이소프로필실란:에탄디티올=94:2.5:1.0:2.5의 용액 중 3시간 교반의 조건으로 행하였다. 절제 후 Resin을 필트레이션에 의해 제거하고, 트리플루오로아세트산을 제거하였다. 생성된 결정 중에 디에틸에테르를 첨가하여 에테르 침전을 행하고, 생성된 백색 결정을 필트레이션에 의해 회수하였다. 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔

을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(76.3mg, 18.0μmol)을 수득하였다.

[3121] MS(ESI) m/z:z=5 85851.45[M+5H]$^{5+}$, z=6 709.75[M+6H]$^{6+}$

[3122] (36-2) Ac-FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 62)의 5 위치와 34 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[3123] [화 130]



[3124]

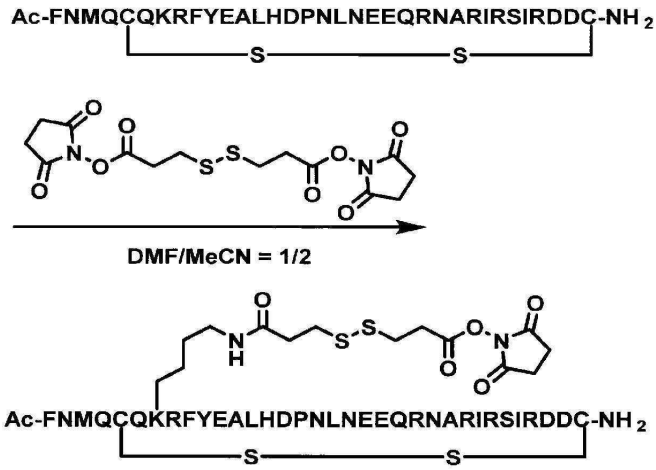
[3125] 상기 아미노산 서열은 서열번호 62이다.

[3126] (36-1)에서 합성한 펩티드(76.3mg, 18.0μmol)를 DMSO(1.80mL)에 용해하고, 0.1M Tris-HCl pH8.0(18.0mL)을 첨가하였다. 이 용액에 글루타티온 산화형 (55.0mg, 89.5μmol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산 0.05%을 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(28.5mg, 6.71μmol)을 수득하였다.

[3127] MS(ESI) m/z:z=5 85851.05[M+5H]$^{5+}$, z=6 709.40[M+6H]$^{6+}$

[3128] (36-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[3129] [화 131]



[3130]

[3131] 상기 아미노산 서열은 서열번호 62이다.

[3132] (36-2)에서 합성한 Ac-FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 62)(28.5mg, 6.71μmol, 다만 5번째와 34번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(108mg, 0.268mmol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출

하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(7.10mg, 1.56㎛ol)를 수득하였다.

[3133] MS(ESI) m/z:z=5 909.05$[M+5H]^{5+}$, z=6 757.70$[M+6H]^{6+}$

[3134] HPLC 순도: 87%

[3135] (36-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3136] (36-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 10mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148232에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 152664에 피크가 관측되었다.

[3137] (36-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[3138] (36-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50681에 피크가 관측되었다.

[3139] (36-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3140] (36-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3141] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3142] a: 트라스투주맙 원료

[3143] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[3144] 유지시간 9.6620분은 트라스투주맙 원료, 10.3237분은 펩티드가 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 47).

[3145] [실시예 37: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

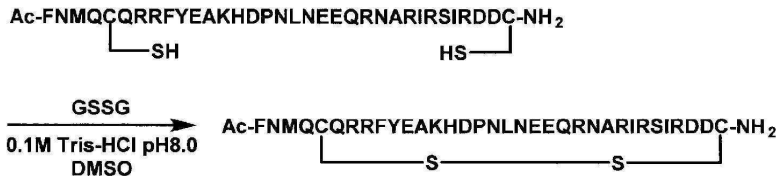
[3146] (37-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[3147] Ac-FNMQCQRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 63)의 서열을 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 펩티드 합성 장치는 CEM사 제조 Liberty Blue를 사용. 시약은 모두 와타나베 카가쿠코교 제조의 것을 사용. Resin은 Fmoc-NH-SAL-PEG Resin HL, 아르기닌(R), 시스테인(C), 히스티딘(H)은 더블 커플링을 행하였다. Resin으로부터의 절제는 트리플루오로아세트산:물:트리이소프로필실란:에탄디티올=94:2.5:1.0:2.5의 용액 중 3시간 교반의 조건으로 행하였다. 절제 후 Resin을 필트레이션에 의해 제거하고, 트리플루오로아세트산을 제거하였다. 생성된 결정 중에 디에틸에테르를 첨가하여 에테르 침전을 행하고, 생성된 백색 결정을 필트레이션에 의해 회수하였다. 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(67.4mg, 15.7㎛ol)을 수득하였다.

[3148] MS(ESI) m/z:z=5 85860.10$[M+5H]^{5+}$, z=6 716.95$[M+6H]^{6+}$

[3149] (37-2) Ac-FNMQCQRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 63)의 5 위치와 34 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[3150] [화 132]

[3151] 

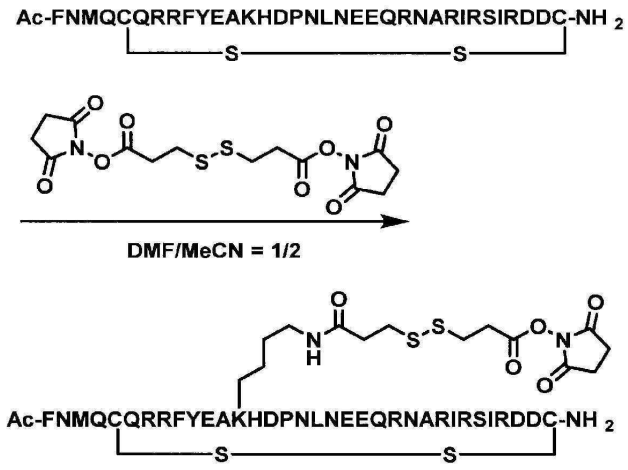
[3152] 상기 아미노산 서열은 서열번호 63이다.

[3153] (37-1)에서 합성한 펩티드(67.4mg, 15.7㎛ol)를 DMSO(1.50mL)에 용해하고, 0.1M Tris-HCl pH8.0(15.0mL)을 첨가하였다. 이 용액에 글루타티온 산화형 (48.0mg, 78.5㎛ol)을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(16.1mg, 3.75㎛ol)을 수득하였다.

[3154] MS(ESI) m/z:z=5 85859.75[M+5H]$^{5+}$, z=6 716.60[M+6H]$^{6+}$

[3155] (37-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[3156] [화 133]

[3157] 

[3158] 상기 아미노산 서열은 서열번호 63이다.

[3159] (37-2)에서 합성한 Ac-FNMQCQRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 63)(16.1mg, 3.75㎛ol, 다만 5번째와 34번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(61.0mg, 0.150mmol)을 아세토니트릴(2.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(5.30mg, 1.16㎛ol)을 수득하였다.

[3160] MS(ESI) m/z:z=5 917.60[M+5H]$^{5+}$, z=6 764.85[M+6H]$^{6+}$

[3161] HPLC 순도: 54%

[3162] (37-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3163] (34-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 21.6mM으로

하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 10mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 46.9μL에 용해시켜, 21.6mM의 펩티드 시약을 4.7μL(항체에 대하여 30등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148238에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 152703에 피크가 관측되었다.

[3164] (37-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[3165] (37-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50682에 피크가 관측되었다.

[3166] (37-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3167] (37-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3168] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3169] a: 트라스투주맙 원료

[3170] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 30등량;

[3171] 유지시간 9.5802분은 트라스투주맙 원료, 9.1031분은 펩티드가 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 48).

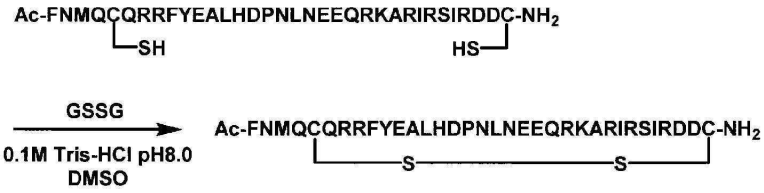
[3172] [실시예 38: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

[3173] (38-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[3174] Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 64)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물을 수득하였다.

[3175] (38-2) Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 64)의 5 위치와 34 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[3176] [화 134]

[3177] 

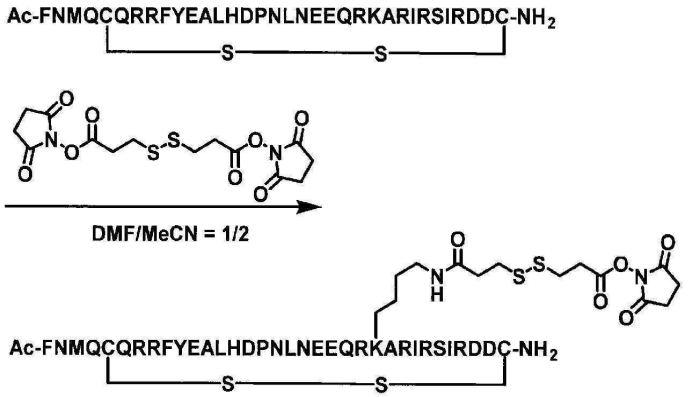
[3178] 상기 아미노산 서열은 서열번호 64이다.

[3179] (38-1)에서 합성한 펩티드를 DMSO에 용해하고, 0.1M Tris-HCl pH8.0을 첨가하였다. 이 용액에 글루타티온 산화형을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산 0.05%을 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(20.0mg, 4.66㎛ol)을 수득하였다.

[3180] MS(ESI) m/z:z=4 1074.15$[M+4H]^{4+}$, z=5 859.65$[M+5H]^{5+}$

[3181] (38-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[3182] [화 135]



[3183]

[3184] 상기 아미노산 서열은 서열번호 64이다.

[3185] (38-2)에서 합성한 Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 64)(20.0mg, 4.66μmol, 다만 5번째와 34번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(75.4mg, 186μmol)을 아세토니트릴(1.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(9.00mg, 1.96μmol)를 수득하였다.

[3186] MS(ESI) m/z:z=5 917.45$[M+5H]^{5+}$, z=6 764.65$[M+6H]^{6+}$

[3187] HPLC 순도: 100%

[3188] (38-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3189] (38-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500μg을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 171μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 8.5μL(항체에 대하여 10등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148070에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 152538에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물이 157165에 피크가 관측되었다.

[3190] (38-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[3191] (38-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오 프로피오닐이 도입된 50685, 50847 및, 원료와 같은 23439에 경쇄 피크가 관측되었다.

[3192] (38-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3193] (38-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5μm을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3194] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3195] a: 트라스투주맙 원료

[3196] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 10등량;

[3197] 유지시간 9.7820분은 트라스투주맙 원료, 9.3370분은 펩티드가 1개 도입된 화합물, 8.7313분은 펩티드가 2개 도

입된 화합물이라고 생각된다(도 49).

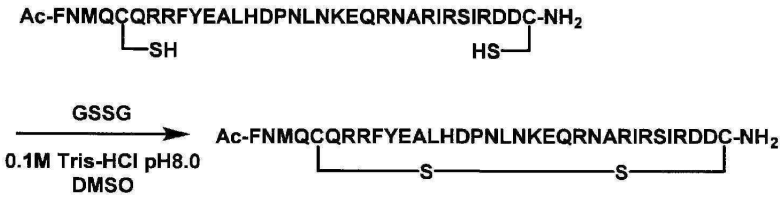
[3198] [실시예 39: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

[3199] (39-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[3200] Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 65)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물을 수득하였다.

[3201] (39-2) Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 65)의 5 위치와 34 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[3202] [화 136]



[3203]

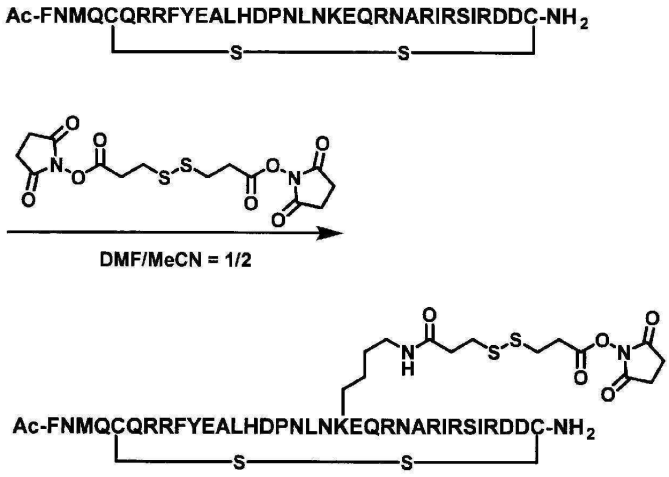
[3204] 상기 아미노산 서열은 서열번호 65이다.

[3205] (39-1)에서 합성한 펩티드를 DMSO에 용해하고, 0.1M Tris-HCl pH8.0을 첨가하였다. 이 용액에 글루타티온 산화형을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산 0.05%을 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(23.0mg, 5.38μmol)을 수득하였다.

[3206] MS(ESI) m/z:z=4 1070.55$[M+4H]^{4+}$, z=5 856.55$[M+5H]^{5+}$

[3207] (39-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[3208] [화 137]



[3209]

[3210] 상기 아미노산 서열은 서열번호 65이다.

[3211] (39-2)에서 합성한 Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 65)(23.0mg, 5.38μmol, 다만 5번째와 34번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(87.0mg, 215μmol)을 아세토니트릴(1.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체

크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(16.0mg, 3.50㎛ol)를 수득하였다.

[3212] MS(ESI) m/z:z=5 914.45$[M+5H]^{5+}$, z=6 762.15$[M+6H]^{6+}$

[3213] HPLC 순도: 83%

[3214] (39-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3215] (39-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 171μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 4.2μL(항체에 대하여 5등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148065에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 152525에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물이 156978에 피크가 관측되었다.

[3216] (39-5) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3217] (39-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3218] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3219] a: 트라스투주맙 원료

[3220] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 5등량;

[3221] 유지시간 9.2124분은 펩티드가 1개 도입된 화합물, 8.6157분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 50).

[3222] [실시예 40: 트라스투주맙의 티올 도입체의 펩티드 매핑]

[3223] (40-1) 트라스투주맙의 티올 도입체의 트립신 처리

[3224] 1.5mL 저흡착 마이크로테스트 튜브에 샘플 용액을 10μL, 50mM 탄산수소암모늄 완충액, 40% 트리플루오로에탄올에 용해한 20mM의 디티오스레이톨 수용액 10μL을 첨가하여 65℃에서 1시간 가온 후, 50mM의 요오드아세트아미드 수용액 10μL을 첨가하고, 차광하 실온에서 30분간 300rpm으로 진탕하여 반응시켰다. 반응 후, 50mM 탄산수소암모늄 완충액을 40μL 첨가하여 교반하고, 20ng/μL의 트립신 수용액(Proteomics Grade, Code No. T6567-5×20㎍(SIGMA))을 10μL 첨가하여 37℃에서 18시간 효소 소화하였다. 소화 후, 20% 트리플루오로아세트산 수용액을 2μL 첨가하여 반응을 멈추고, LC-MS/MS 측정을 실시하였다.

[3225] (40-2) 트라스투주맙의 LC-MS/MS 측정 조건

[3226] (분석 장치)

[3227] 나노 HPLC: EASY-nLC 1000(써모피셔사이언티픽)

[3228] 질량 분석계: 트리브리드 질량 분석계 Orbitrap Fusion(써모피셔사이언티픽)

[3229] (HPLC 분석 조건)

[3230] 트랩 컬럼: Acclaim PepMap(등록상표) 100, 75㎛×2cm(써모피셔사이언티픽)

[3231] 분석 컬럼: ESI-컬럼(NTCC-360/75-3-125, 75㎛×12.5cm, 3㎛(닛교테크노스 가부시키가이샤))

[3232] 이동상 A: 0.1% 포름산 수용액

[3233] 이동상 B: 0.1% 포름산, 아세토니트릴 용액

[3234] 로딩 용액: 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액

[3235] 유속: 300nL/min

[3236] 샘플 주입량: 1μL

[3237] 그래디언트 조건(B%): 2%(0.0-0.5분), 2%→30%(0.5-23.5분), 30%→75%(23.5-25.5분), 75%(25.5-35.0분)

[3238] (질량 분석계 분석 조건)

[3239] 이온화법: ESI, Positive 모드

[3240] 스캔 타입: 데이터 의존성 취득

[3241] 활성화 유형: 충돌 유도된 해리(CID)

[3242] 데이터의 취득은 부속 소프트인 Xcalibur 3.0(써모피셔사이언티픽) 및 Thermo Orbitrap Fusion Tune Application 2.0(써모피셔사이언티픽)을 사용하여 행하였다.

[3243] (40-3) 트라스투주맙의 수식 부위의 해석 조건

[3244] LC-MS/MS 측정 결과에 대한 수식 부위 해석에 대해서는, Proteome Discoverer version 1.4(써모피셔사이언티픽)를 사용하여 행하였다.

[3245] Proteome Discoverer에서의 해석은 Sequest HT를 검색 엔진으로서 사용하고, 프리커서 이온의 범위를 350 내지 5000Da, 총 강도 역치를 50000으로 하였다. 또한, 트립신을 소화 효소로서 설정하고, 최대 소실된 절단 부위(Maximum Missed Cleavage Sites)는 3으로 하였다. 또한, 프리커서 및 프래그먼트 이온의 매쓰 관용성은 각각 5ppm 및 0.5Da로 하였다. 스태틱 변형에는 요오드아세트아미드에 의한 시스테인 잔기의 수식으로서, 카바미도메틸(+57.021Da)을 설정하였다. 다이나믹 변형에 대해서는, 메티오닌의 산화(+15.995Da) 및 리신 잔기에 대한 수식체(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 설정하였다. 또한, 펩티드 컨피던스가 높은 것만으로 되도록 필터링하였다.

[3246] 또한, 수식 부위의 검색 대상의 아미노산 서열의 데이터로서 도 8에 도시된 (1), (3)을 사용하였다.

[3247] (40-4) 트라스투주맙의 LC-MS/MS에 의한 수식 부위의 해석 결과

[3248] LC-MS/MS를 사용한 해석 결과, 실시예 39의 바인더 펩티드를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는 아미노산 19잔기로 이루어지는 펩티드, VVSVLTVLHQDWLNGKEYK(서열번호 66)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 791.74872, 이론값 791.74753, 3가)이 관측되고(도 51), CID 스펙트럼에서 중쇄의 EU 넘버링에서의 317 위치의 리신 잔기의 수식을 나타내는, 2가의 b18에 상당하는 m/z 1114.35(이론값: 1114.06)의 프로덕트 이온이 확인되었다(도 52). 또한, 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는 아미노산 28잔기로 이루어지는 펩티드, EEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK(서열번호 67)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 886.93408, 이론값: 886.93215, 4가)이 관측되고(도 53), CID 스펙트럼에서 같이 중쇄의 317 위치의 리신 잔기의 수식을 나타내는, 2가의 y14에 상당하는 m/z 938.70(이론값: 938.46)의 프로덕트 이온이 확인되었다(도 54).

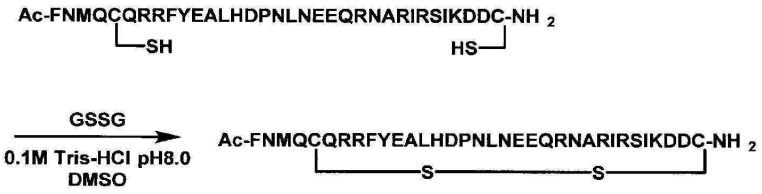
[3249] [실시예 41: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

[3250] (41-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[3251] Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH_2(서열번호 68)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물을 수득하였다.

[3252] (41-2) Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH_2(서열번호 68)의 5 위치와 34 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[3253] [화 138]



[3254]

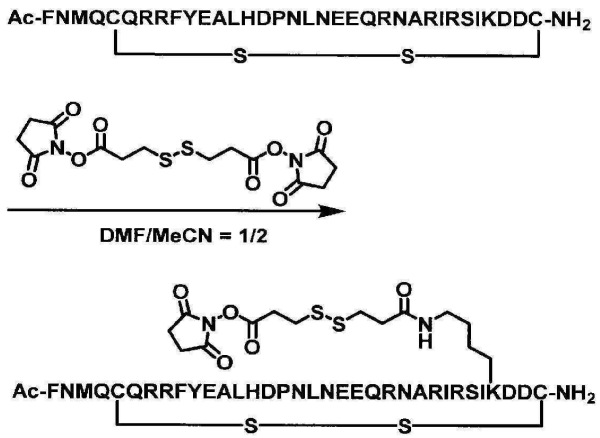
[3255] 상기 아미노산 서열은 서열번호 68이다.

[3256] (41-1)에서 합성한 펩티드를 DMSO에 용해하고, 0.1M Tris-HCl pH8.0을 첨가하였다. 이 용액에 글루타티온 산화형을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산 0.05%을 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(20.0mg, 4.70μmol)을 수득하였다.

[3257] MS(ESI) m/z:z=4 1063.65$[M+4H]^{4+}$, z=5 851.15$[M+5H]^{5+}$

[3258] (41-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[3259] [화 139]



[3260]

[3261] 상기 아미노산 서열은 서열번호 68이다.

[3262] (41-2)에서 합성한 Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC-NH_2(서열번호 68)(20.0mg, 4.70μmol, 다만 5번째와 34번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(76.0mg, 188μmol)을 아세토니트릴(1.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(12.0mg, 2.63μmol)를 수득하였다.

[3263] MS(ESI) m/z:z=5 908.95$[M+5H]^{5+}$, z=6 757.75$[M+6H]^{6+}$

[3264] HPLC 순도: 83%

[3265] (41-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3266] (41-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 500μg을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 171μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 8.5μL(항체에 대하여 10등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응

액을 NAP-5 컬럼에 첨가하고, 반응을 정지시켜 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148234에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 152648에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물이 157083에 피크가 관측되었다.

[3267] (41-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[3268] (41-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50686, 50847 및, 원료와 같은 23439에 경쇄 피크가 관측되었다.

[3269] (41-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3270] (41-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3271] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3272] a: 트라스투주맙 원료

[3273] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 10등량;

[3274] 유지시간 9.7202분은 트라스투주맙 원료, 9.2689분은 펩티드가 1개 도입된 화합물, 8.7994분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 55).

[3275] [실시예 42: 트라스투주맙의 티올 도입체의 펩티드 매핑]

[3276] (42-1) 트라스투주맙의 티올 도입체의 트립신 처리

[3277] (40-1)과 같은 처리를 행하였다.

[3278] (42-2) 트라스투주맙의 LC-MS/MS 측정 조건

[3279] (40-2)와 같은 측정 조건을 사용하였다.

[3280] (42-3) 트라스투주맙의 수식 부위의 해석 조건

[3281] (40-3)과 같은 해석 조건을 사용하였다.

[3282] (42-4) 트라스투주맙의 LC-MS/MS에 의한 수식 부위의 해석 결과

[3283] LC-MS/MS를 사용한 해석 결과, 실시예 41의 바인더 펩티드를 사용하여 수식한 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는 아미노산 18잔기로 이루어지는 펩티드, FNWYVDGVEVHNAKTKPR(서열번호 69)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 769.04688, 이론값: 769.04457, 3가)이 관측되고(도 56), CID 스펙트럼에서 중쇄의 EU 넘버링에서의 288 위치 또는 290 위치의 리신 잔기의 수식을 나타내는, 2가의 y12에 상당하는 m/z 741.15(이론값: 740.89)의 프로덕트 이온이 확인되었다(도 57).

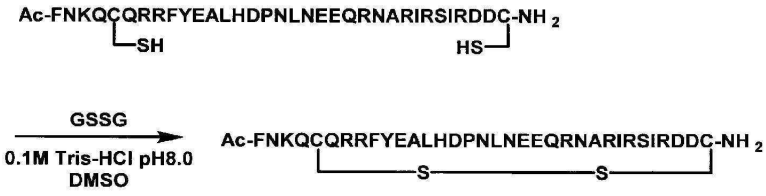
[3284] [실시예 43: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

[3285] (43-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[3286] Ac-FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 70)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물을 수득하였다.

[3287] (43-2) Ac-FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 70)의 5 위치와 34 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[3288] [화 140]



[3289]

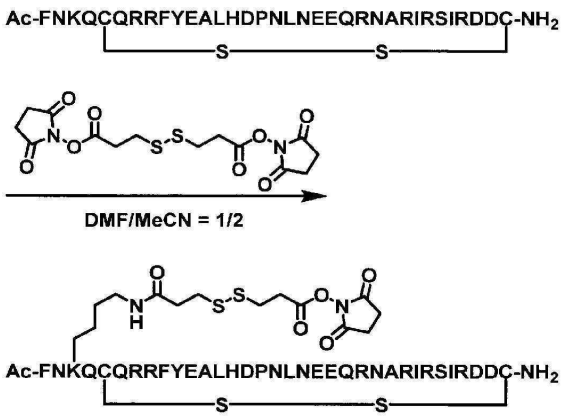
[3290] 상기 아미노산 서열은 서열번호 70이다.

[3291] (43-1)에서 합성한 펩티드를 DMSO에 용해하고, 0.1M Tris-HCl pH8.0을 첨가하였다. 이 용액에 글루타티온 산화형을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산 0.05%을 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(20.0mg, 4.67μmol)을 수득하였다.

[3292] MS(ESI) m/z:z=5 848.30$[M+5H]^{5+}$, z=6 707.10$[M+6H]^{6+}$

[3293] (43-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[3294] [화 141]



[3295]

[3296] 상기 아미노산 서열은 서열번호 70이다.

[3297] (43-2)에서 합성한 Ac-FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 70)(20.0mg, 4.67μmol, 다만 5번째와 34번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(0.50mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(76.0mg, 188μmol)을 아세토니트릴(0.60mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(9.00mg, 1.97μmol)를 수득하였다.

[3298] MS(ESI) m/z:z=6 761.85$[M+6H]^{6+}$

[3299] HPLC 순도: 85%

[3300] (43-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3301] (43-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙1000μg을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 342μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 17.0μL(항체에 대하여 10등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 100mM 시트르

산나트륨 완충액(pH2.9)으로 치환하여 반응을 정지시키고, 또한 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물이 156963에 피크가 확인되었다.

[3302] (43-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[3303] (43-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50686, 50847 및, 원료와 같은 23439에 경쇄 피크가 관측되었다.

[3304] (43-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3305] (43-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3306] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3307] a: 트라스투주맙 원료

[3308] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 10등량;

[3309] 유지시간 8.6251분은 펩티드가 2개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 58).

[3310] [실시예 44: 트라스투주맙의 티올 도입체의 펩티드 매핑]

[3311] (44-1) 트라스투주맙의 티올 도입체의 트립신 처리

[3312] 1.5mL 저흡착 마이크로테스트 튜브에 샘플 용액을 10μL, 50mM 탄산수소암모늄 완충액, 40% 트리플루오로에탄올에 용해한 20mM의 디티오스레이톨 수용액 10μL을 첨가하여 65℃에서 1시간 가온 후, 50mM의 요오드아세트아미드 수용액 10μL을 첨가하고, 차광하 실온에서 30분간 300rpm으로 진탕하여 반응시켰다. 반응 후, 50mM 탄산수소암모늄 완충액을 40μL 첨가하여 교반하고, 20ng/μL의 트립신 수용액을 10μL 첨가하여 37℃에서 18시간 효소 소화하였다. 소화 후, 20% 트리플루오로아세트산 수용액 2μL 첨가하여 반응을 멈추었다. 그 후, 50mM 탄산수소암모늄 완충액, 0.5% 트리플루오로아세트산을 사용하여 10배 희석하고, LC-MS/MS 측정에 사용하였다.

[3313] (44-2) 트라스투주맙의 LC-MS/MS 측정 조건

[3314] (분석 장치)

[3315] 나노 HPLC: EASY-nLC 1000(써모피셔사이언티픽)

[3316] 질량 분석계: 트리브리드 질량 분석계 Orbitrap Fusion(써모피셔사이언티픽)

[3317] (HPLC 분석 조건)

[3318] 트랩 컬럼: Acclaim PepMap(등록상표) 100, 75㎛×2cm(써모피셔사이언티픽)

[3319] 분석 컬럼: ESI-컬럼(NTCC-360/75-3-125, 75㎛×12.5cm, 3㎛(닛교테크노스 가부시키가이샤))

[3320] 이동상 A: 0.1% 포름산 수용액

[3321] 이동상 B: 0.1% 포름산, 아세토니트릴 용액

[3322] 로딩 용액: 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액

[3323] 유속: 300nL/min

[3324] 샘플 주입량: 1μL

[3325] 그래디언트 조건(B%): 2%(0.0-0.5분), 2%→30%(0.5-23.5분), 30%→75%(23.5-25.5분), 75%(25.5-35.0분)

[3326] (질량 분석계 분석 조건)

[3327] 이온화법: ESI, Positive 모드

[3328] 스캔 타입: 데이터 의존성 취득

[3329] 활성화 유형: 충돌 유도된 해리(CID)

[3330] 데이터의 취득은 부속 소프트인 Xcalibur 3.0(써모피셔사이언티픽) 및 Thermo Orbitrap Fusion Tune Application 2.0(써모피셔사이언티픽)을 사용하여 행하였다.

[3331] (44-3) 트라스투주맙의 수식 부위의 해석 조건

[3332] LC-MS/MS 측정 결과에 대한 수식 부위 해석에 대해서는, Proteome Discoverer version 1.4(써모피셔사이언티픽)를 사용하여 행하였다.

[3333] Proteome Discoverer에서의 해석은 Sequest HT를 검색 엔진으로서 사용하고, 프리커서 이온의 범위를 350 내지 5000Da로 하였다. 또한, 트립신을 소화 효소로서 설정하고, 최대 소실된 절단 부위 (Maximum Missed Cleavage Sites)는 3으로 하였다. 또한, 프리커서 및 프래그먼트 이온의 매쓰 관용성은 각각 5ppm 및 0.5Da로 하였다. 스태틱 변형에는 요오드아세트아미드에 의한 시스테인 잔기의 수식으로서, 카바미도메틸(+57.021Da)을 설정하였다. 다이나믹 변형에 대해서는, 메티오닌의 산화(+15.995Da) 및 리신 잔기에 대한 수식체(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 설정하였다. 또한, 펩티드 컨피던스가 높은 것만으로 되도록 필터링하였다. 실시예 43만, 총 강도 역치를 32000으로 하였다.

[3334] 또한, 수식 부위의 검색 대상의 아미노산 서열의 데이터로서 도 8에 도시된 (1), (3)을 사용하였다.

[3335] (44-4) 트라스투주맙의 LC-MS/MS에 의한 수식 부위의 해석 결과

[3336] LC-MS/MS를 사용한 해석 결과, 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는 아미노산 33잔기로 이루어지는 펩티드, THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(서열번호 40)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 952.23145, 이론값: 952.22900, 4가)이 관측되고(도 59), CID 스펙트럼에서 중쇄의 EU 넘버링에서의 246 위치의 리신 잔기의 수식을 나타내는, 2가의 y15에 상당하는 m/z 968.30(이론값: 968.01)의 프로덕트 이온이 확인되었다(도 60).

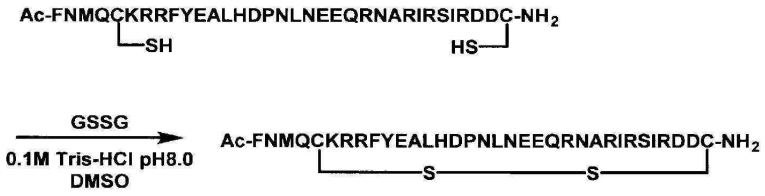
[3337] [실시예 45: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

[3338] (45-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[3339] Ac-FNMQCKRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 71)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물을 수득하였다.

[3340] (45-2) Ac-FNMQCKRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 71)의 5 위치와 34 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[3341] [화 142]

[3342] 

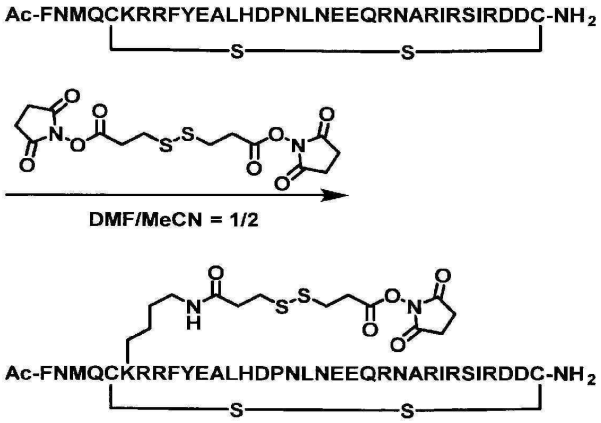
[3343] 상기 아미노산 서열은 서열번호 71이다.

[3344] (45-1)에서 합성한 펩티드를 DMSO에 용해하고, 0.1M Tris-HCl pH8.0을 첨가하였다. 이 용액에 글루타티온 산화형을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산 0.05%을 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(20.0mg, 4.67μmol)을 수득하였다.

[3345] MS(ESI) m/z:z=3 692.70$[M+3H]^{3+}$, z=4 519.80$[M+4H]^{4+}$

[3346] (45-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[3347] [화 143]



[3348]

[3349] 상기 아미노산 서열은 서열번호 71이다.

[3350] (45-2)에서 합성한 Ac-FNMQCKRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC-NH_2(서열번호 71)(20.0mg, 4.67㎛ol, 다만 5번째와 34번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(0.50mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(76.0mg, 188㎛ol)을 아세토니트릴(0.60mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(5.50mg, 1.20㎛ol)를 수득하였다.

[3351] MS(ESI) m/z:z=6 762.40$[M+6H]^{6+}$

[3352] HPLC 순도: 100%

[3353] (45-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3354] (45-2)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙 500㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 171μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 8.5μL(항체에 대하여 10등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 100mM 시트르산나트륨 완충액(pH2.9)으로 치환하여 반응을 정지시키고, 또한 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148226에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 152662에 피크가 확인되었다.

[3355] (45-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[3356] (45-3)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50686, 50847 및, 원료와 같은 23439에 경쇄 피크가 관측되었다.

[3357] (45-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3358] (45-3)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3359] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3360] a: 트라스투주맙 원료

[3361] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 10등량;

[3362] 유지시간 9.8954분은 트라스투주맙 원료, 9.4892분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 61).

[3363] [실시예 46: 트라스투주맙의 티올 도입체의 펩티드 매핑]

[3364] (46-1) 트라스투주맙의 티올 도입체의 트립신 처리

[3365] (44-1)과 같은 처리를 행하였다.

[3366] (46-2) 트라스투주맙의 LC-MS/MS 측정 조건

[3367] (44-2)와 같은 측정 조건을 사용하였다.

[3368] (46-3) 트라스투주맙의 수식 부위의 해석 조건

[3369] (44-3)과 같은 해석 조건을 사용하였다.

[3370] (46-4) 트라스투주맙의 LC-MS/MS에 의한 수식 부위의 해석 결과

[3371] LC-MS/MS를 사용한 해석 결과, 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는 아미노산 33잔기로 이루어지는 펩티드, THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR(서열번호 40)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 952.22968, 이론값: 952.22900, 4가)이 관측되고(도 62), CID 스펙트럼에서 중쇄의 EU 넘버링에서의 246 위치의 리신 잔기의 수식을 나타내는, 2가의 y12에 상당하는 m/z 764.60(이론값: 764.40)의 프로덕트 이온이 확인되었다(도 63).

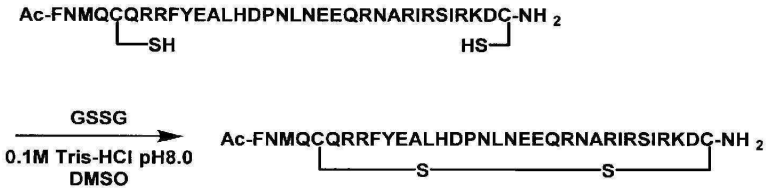
[3372] [실시예 47: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)의 합성, 및 당해 화합물을 사용한 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 수식 및 그 해석]

[3373] (47-1) IgG1 Fc 결합성 펩티드의 합성

[3374] Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC-NH_2(서열번호 72)의 서열을 실시예 1과 마찬가지로 Fmoc 고상 합성법에 의해 합성하였다. 목적물을 수득하였다.

[3375] (47-2) Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC-NH_2(서열번호 72)의 5 위치와 34 위치의 Cys에서의 분자내 디술피드 결합의 형성

[3376] [화 144]

[3377] 

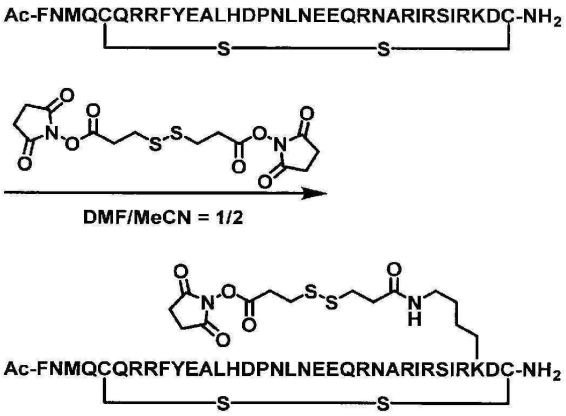
[3378] 상기 아미노산 서열은 서열번호 72이다.

[3379] (47-1)에서 합성한 펩티드를 DMSO에 용해하고, 0.1M Tris-HCl pH8.0을 첨가하였다. 이 용액에 글루타티온 산화형을 첨가하여 실온에서 20시간 교반하였다. 반응 용액에 2M 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 반응을 정지하고, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산 0.05%을 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 목적물(24.5mg, 5.71㎛mol)을 수득하였다.

[3380] MS(ESI) m/z:z=3 692.70$[M+3H]^{3+}$, z=4 519.80$[M+4H]^{4+}$

[3381] (47-3) 디술피드 링커와 펩티드의 연결

[3382] [화 145]



[3383]

[3384] 상기 아미노산 서열은 서열번호 72이다.

[3385] (47-2)에서 합성한 Ac-FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC-NH_2(서열번호 72)(24.5mg, 5.71μmol, 다만 5번째와 34번째의 2개의 시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N-디메틸포름아미드(1.00mL)에 용해하고, 3,3'-디티오디프로피온산디(N-숙신이미딜)(92.2mg, 228μmol)을 아세토니트릴(1.00mL)에 용해한 용액을 첨가하고, 실온에서 24시간 교반하였다. 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 이것을 0.05% 트리플루오로아세트산 수용액에 용해하고, 옥타도데실기 화학 결합형 실리카겔을 충전제로 하는 역상 고속 액체 크로마토그래피에 적용하여, 트리플루오로아세트산을 0.05% 함유하는 물과 아세토니트릴의 혼합 용액으로 용출하고, 각 분획을 LC-MS에 의해 확인하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴을 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체(7.50mg, 1.64μmol)를 수득하였다.

[3386] MS(ESI) m/z:z=6 762.40$[M+6H]^{6+}$

[3387] HPLC 순도: 84%

[3388] (47-4) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3389] (47-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙 500μg을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 171μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 8.5μL(항체에 대하여 10등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 100mM 시트르산나트륨 완충액(pH2.9)으로 치환하여 반응을 정지시키고, 또한 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148087에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 152694에 피크가 확인되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물이 157160에 피크가 확인되었다.

[3390] (47-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[3391] (47-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 5μL(항체에 대하여 등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 중쇄에 티오프로피오닐기가 도입된 50686, 50847 및, 원료와 같은 23439에 경쇄 피크가 관측되었다.

[3392] (47-6) 항-HER2IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3393] (47-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다.

[3394] 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5μm을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3395] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3396] a: 트라스투주맙 원료

[3397] b: 트라스투주맙+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 10등량;

[3398] 유지시간 9.5796분은 트라스투주맙 원료, 9.1199분은 펩티드가 트라스투주맙에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 64).

[3399] [실시예 48: 트라스투주맙의 티올 도입체의 펩티드 매핑]

[3400] (48-1) 트라스투주맙의 티올 도입체의 트립신 처리

[3401] (44-1)과 같은 처리를 행하였다.

[3402] (48-2) 트라스투주맙의 LC-MS/MS 측정 조건

[3403] (44-2)와 같은 측정 조건을 사용하였다.

[3404] (48-3) 트라스투주맙의 수식 부위의 해석 조건

[3405] (44-3)과 같은 해석 조건을 사용하였다.

[3406] (48-4) 트라스투주맙의 LC-MS/MS에 의한 수식 부위의 해석 결과

[3407] LC-MS/MS를 사용한 해석 결과, 트라스투주맙의 트립신 소화에 의한 리신 잔기에 대한 수식 부위(요오드아세트아미드에 의한 카바미도메틸화를 받은 티올 도입체(+145.019Da))를 포함하는 아미노산 33잔기로 이루어지는 펩티드, FNWYVDGVEVHNAKTKPR(서열번호 69)의 펩티드 프래그먼트의 MS 스펙트럼(실측값: m/z 769.04529, 이론값:769.04457, 3가)이 관측되고(도 65), CID 스펙트럼에서 중쇄의 EU 넘버링에서의 290 위치의 리신 잔기의 수식을 나타내는, 2가의 y8에 상당하는 m/z 549.11(이론값: 548.79)의 프로덕트 이온이 확인되었다(도 66).

[3408] [실시예 49: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)을 사용한 인간 IgG2 항체의 수식 및 그 해석]

[3409] (49-1) 인간 IgG2 항체의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3410] 실시예(2-2)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 인간 IgG2 항체(RayBiotech사 제조) 500㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 171μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 8.5μL(항체에 대하여 10등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 100mM 시트르산나트륨 완충액(pH2.9)으로 치환하여 반응을 정지시키고, 또한 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 IgG2 항체는 153047에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 155129에 피크가 확인되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물이 157699에 피크가 확인되었다.

[3411] (49-2) 인간 IgG2 항체의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3412] (49-1)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3413] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3414] a: 인간 IgG2 항체 원료

[3415] b: 인간 IgG2 항체+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 10등량;

[3416] 유지시간 9.0209분은 인간 IgG2 항체 원료, 10.2043분은 펩티드가 인간 IgG2 항체에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 67).

[3417] [실시예 50: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)을 사용한 인간 IgG2 항체의 수식 및 그 해석]

[3418] (50-1) 인간 IgG2 항체의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3419] 실시예(43-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 인간 IgG2 항체(RayBiotech사 제조) 500㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 171μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 8.5μL(항체에 대하여 10등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을

100mM 시트르산나트륨 완충액(pH2.9)으로 치환하여 반응을 정지시키고, 또한 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 IgG2 항체는 153047에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 하나 도입된 생성물이 157652에 피크가 확인되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물이 165043에 피크가 확인되었다.

[3420] (50-2) 인간 IgG2 항체의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3421] (50-1)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3422] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3423] a: 인간 IgG2 항체 원료

[3424] b: 인간 IgG2 항체+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 10등량;

[3425] 유지시간 9.0209분은 인간 IgG2 항체 원료, 8.3882분은 펩티드가 인간 IgG2 항체에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 68).

[3426] [실시예 51: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)을 사용한 인간 IgG4 항체의 수식 및 그 해석]

[3427] (51-1) 인간 IgG4 항체의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3428] 실시예(2-2)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 인간 IgG4 항체(RayBiotech사 제조) 500㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 171μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 8.5μL(항체에 대하여 10등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 100mM 시트르산나트륨 완충액(pH2.9)으로 치환하여 반응을 정지시키고, 또한 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 IgG2 항체는 154618에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물이 159130에 피크가 확인되었다.

[3429] (51-2) 인간 IgG4 항체의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3430] (51-1)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3431] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3432] a: 인간 IgG4 항체 원료

[3433] b: 인간 IgG4 항체+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 10등량;

[3434] 유지시간 10.3154분은 인간 IgG4 항체 원료, 11.2450분은 펩티드가 인간 IgG4 항체에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 69).

[3435] [실시예 52: 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체)을 사용한 인간 IgG4 항체의 수식 및 그 해석]

[3436] (52-1) 인간 IgG4 항체의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3437] 실시예(43-3)에서 합성한 펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 인간 IgG2 항체(RayBiotech사 제조) 500㎍을 50mM 아세트산나트륨 완충액(pH5.5) 171μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 8.5μL(항체에 대하여 10등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하였다. 반응액을 100mM 시트르산나트륨 완충액(pH2.9)으로 치환하여 반응을 정지시키고, 또한 20mMPBS 완충액으로 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 IgG2 항체는 154618에 피크가 관측되고, 결합성 펩티드가 2개 도입된 생성물이 163530에 피크가 확인되었다.

[3438] (52-2) 인간 IgG4 항체의 특이적 수식의 HIC-UPLC 해석

[3439] (52-1)에서 생성된 항체·펩티드 복합체와 원료의 항체를 HIC에 의해 해석하였다. 컬럼은 단백질-Pak Hi Res HIC 컬럼(Waters) 4.6×100mm 2.5㎛을 사용하였다. A_완충액: 0.1M PiNa, 2.3M$(NH_4)_2SO_4$, pH7.0, B_완충액: 0.1M PiNa, pH7.0으로 유속은 0.6ml/min, 그래디언트를 A60% B40%→A0% B100%, 16min(데이터 채취 20min), 컬럼 온도는 40℃, 서모스탯 온도는 40℃, 검출기는 280nm의 파장에서 검출하였다.

[3440] 샘플에 대해서는 이하의 조건으로 반응시켰다.

[3441] a: 인간 IgG4 항체 원료

[3442] b: 인간 IgG4 항체+펩티드디술피드 링커-연결물-NHS 활성화체 10등량;

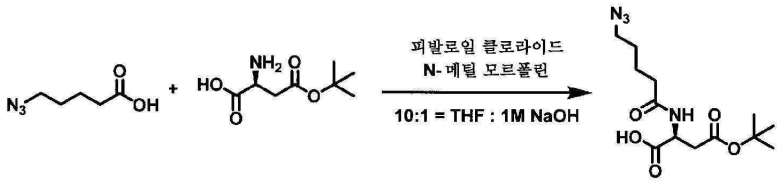
[3443] 유지시간 10.3154분은 인간 IgG4 항체 원료, 8.8645분은 펩티드가 인간 IgG4 항체에 1개 도입된 화합물이라고 생각된다(도 70).

[3444] [실시예 53: (1) 절단성 링커의 합성, 및 (2) 합성한 링커와 IgG1 Fc 결합성 펩티드와의 연결에 의한, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물(펩티드-아지드 수식 티오에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체)의 합성]

[3445] (53-1) 티오에스테르 링커의 합성과 펩티드와의 연결

[3446] (53-1-1) 티오에스테르 링커의 합성

[3447] [화 146]

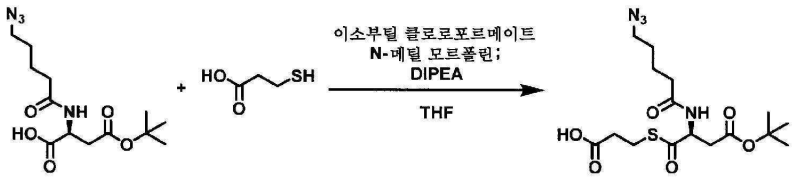


[3448]

[3449] 5-아지드펜탄산(200mg, 1.40mmol)을 THF 용매(12mL)에 용해시켜, 0℃에서 피발로일 클로라이드(206μL, 1.68mmol), N-메틸모르폴린(230μL, 2.10mmol)을 첨가하여 30분 교반하고, 5-아지드펜탄산의 혼합 산무수물을 조정하였다. 실온에서 4-(tert-부톡시-옥소)-2-아미노-부탄산(344mg, 1.82mmol)을 1M 수산화나트륨 수용액(1.82mL)에 용해시킨 뒤, 상술한 5-아지드펜탄산의 혼합 산무수물의 THF 용액을 실온에서 적하하였다. 실온에서 16시간 교반한 후, 6M 염산 수용액을 첨가하고, 계내의 pH를 3.0으로 조정하였다. 반응액을 아세트산에틸로 희석하고, 물, 식염수로 세정 후, 무수황산마그네슘을 첨가하여 5분 정치하였다. 필트레이션에 의해 황산마그네슘을 제거하고, 감압하 농축함으로써 조생성물을 수득한 후, 컬럼 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=10:1)로 정제하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써, 4-(tert-부톡시-옥소)-2-(5-아지드펜타-1-옥소)아미노-부탄산(320mg, 1.02mmol)을 수득하였다.

[3450] MS(ESI) m/z:337$[M+Na]^+$

[3451] [화 147]



[3452]

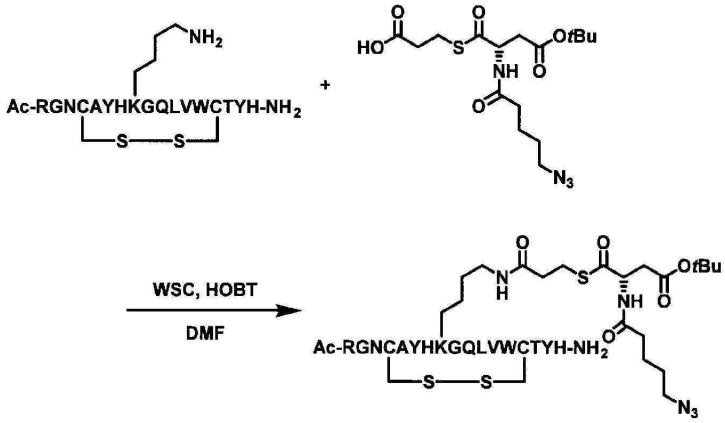
[3453] 4-(tert-부톡시-옥소)-2-(5-아지드펜타-1-옥소)아미노-부탄산(154mg, 0.490mmol)을 THF(4.9mL)에 용해시켜, 0℃에서 클로로탄산이소부틸(83.6μL, 0.637mmol), N-메틸모르폴린(108μL, 0.980mmol)을 첨가하여 30분 교반하고, 대응하는 혼합 산무수물을 조정하였다. 실온에서 머캅토프로피온산(128μL, 1.47mmol), N,N-디이소프로필에틸아민(253μL, 1.47mmol)을, 상술한 혼합 산무수물의 THF 용액을 실온에서 적하하였다. 실온에서 16시간 교반한 후, 1M 수산화나트륨 수용액을 첨가하고, 계내의 pH를 9.0으로 조정하였다. 반응액을 물과 아세트산에틸로 세정하고, 수상을 회수하였다. 수상에 6M 염산 수용액을 첨가하고, 계내의 pH를 3.0으로 조정한 후, 아세트산에틸에 의한 분액 추출을 행하고 나서 , 유기상을 식염수로 세정 후, 무수황산마그네슘을 첨가하여 5분 정치하였다. 필트레이션에 의해 황산마그네슘을 제거하고, 감압하 농축함으로써, 3-[4-(tert-부톡시-옥소)-2-(5-아

지드펜타-1-옥소)아미노-1-옥소]술파닐-프로판산(108mg, 0.268mmol)을 수득하였다.

[3454] MS(ESI) m/z:403[M+H]$^{+}$

[3455] (53-1-2) 티오에스테르 링커와 펩티드의 연결

[3456] [화 148]



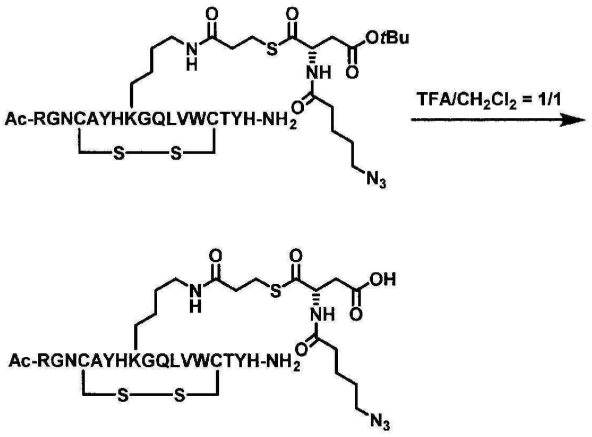
[3457]

[3458] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[3459] 실시예 1-2에서 합성한 Ac-RGNCAYHKGQLVWCTYH-NH_2(서열번호 39)의 펩티드 (31.8mg, 15.3μmol, 다만, 4번째와 14번째의 2개의 호모시스테인은 각각 분자내에서 디술피드 결합을 형성하고 있다)를 N,N'-디메틸포름아미드 1mL에 용해하고, 3-[4-(tert-부톡시-옥소)-2-(5-아지드펜타-1-옥소)아미노-1-옥소]-술파닐-프로판산(61.7mg, 0.153mmol), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드염산염(29.4mg, 0.153mmol), 1-하이드록시벤조트리아졸(10.4mg, 0.0766mmol)을 DMF 1mL에 용해시켜, 계중에 첨가하였다. 실온에서 2시간 교반한 후, 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드 링커 연결-tBu체(2.5mg, 1.02μmol)를 수득하였다.

[3460] MS(ESI) m/z:z=2 1230[M+2H]$^{2+}$, z=3 820[M+3H]$^{3+}$

[3461] [화 149]



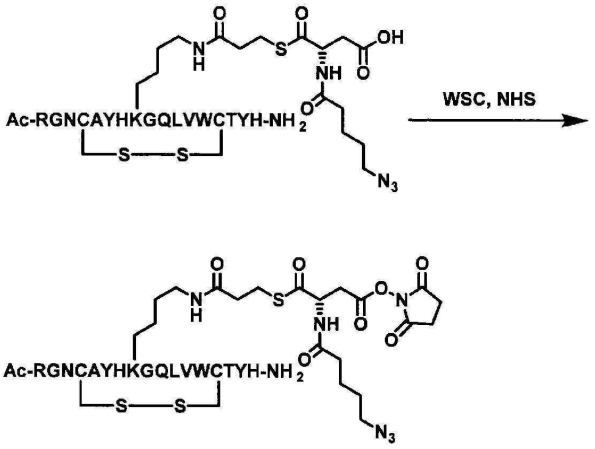
[3462]

[3463] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[3464] 상기 펩티드 링커 연결물(2.5mg, 1.02μmol)을 디클로로메탄 0.250mL 중에 용해하고, 트리플루오로아세트산을 0.250mL 첨가하여 실온 중에서 1시간 교반하였다. 감압 농축을 행한 후, 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드 링커 연결물-카복실산체를 수득하였다.

[3465] MS(ESI) m/z:z=2 1202[M+2H]$^{2+}$, z=3 802[M+3H]$^{3+}$

[3466] [화 150]



[3467]

[3468] 상기 아미노산 서열은 서열번호 39이다.

[3469] 상기 펩티드 링커 연결물-카복실산체를 N,N'-디메틸포름아미드 0.5mL에 용해하고, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드염산염(2.0mg, 10.2㎛ol), N-하이드록시숙신이미드(1.2mg, 10.2㎛ol)을 첨가하여 16시간 교반하였다. 반응액에 0.1% 트리플루오로아세트산 수용액을 첨가하여 역상 분취 크로마토그래피에 의해 용출하였다. 생성물이 포함된 분획을 회수하고, 감압하 농축함으로써 아세토니트릴만 제거한 후, 동결 건조를 행하여, 상기 펩티드-아지드 수식 티오에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체(0.5mg, 0.2㎛ol)를 수득하였다.

[3470] MS(ESI) m/z:z=2 1251$[M+2H]^{2+}$, z=3 834$[M+3H]^{3+}$

[3471] [실시예 54: 항-HER2 IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식, 및 ESI-TOFMS에 의한 해석]

[3472] (54-1) 아지드 수식 티오에스테르 링커 결합성 펩티드 시약에 의한 IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3473] 실시예 53의 (53-1-2)에서 합성한 펩티드-아지드 수식 티오에스테르 링커 연결물-NHS 활성화체는 N,N'-디메틸포름아미드에 용해하여 4mM으로 하였다. 항-HER2 IgG 항체 트라스투주맙(주가이세이야쿠) 1.48mg을 60mM 아세트산나트륨 완충액(pH4.7) 555μL에 용해시키고, 4mM의 펩티드 시약을 50μL(항체에 대하여 20등량) 첨가하여, 실온에서 1시간 교반하고, 100mM 시트르산에 의해 반응을 정지하였다. 반응액을 Amicon 10K에 의해 9.57mM PBS 완충액(pH7.4)으로 용매 치환하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 148225에 피크가 관측되고, 생성물은 결합성 펩티드가 2개 도입된 153143에 피크가 관측되었다.

[3474] (54-2) 항-HER2 IgG 항체 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[3475] (54-1)에서 생성된 항체·펩티드 복합체의 PBS 용액에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 2.0μL(항체에 대하여 100등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 트라스투주맙은 50595, 50757에 중쇄 피크, 23440에 경쇄 피크가 관측되고, 생성물은 중쇄에 결합성 펩티드가 도입된 52981 및 53143에 피크가 관찰되고, 원료와 같은 23440에 경쇄 피크가 관측되었다.

[3476] (54-3) 티오에스테르 링커의 절단과 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3477] 임의의 완충액(pH4.5 내지 pH9.0)에, (54-1)에서 합성한 항체·펩티드티오에스테르 링커 복합체를 용해하고, 하이드록실아민 수용액을 첨가하여 실온에서 교반함으로써 티오에스테르 구조가 가수분해되고, 아지드기가 항체 위에 남는다. 이것을 ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정할 수 있다.

[3478] (54-4) 트라스투주맙·펩티드 복합체의 링커 절단, 및 생성물의 ESI-TOFMS에 의한 해석

[3479] 우선, (54-1)에서 합성한 트라스투주맙·펩티드 복합체 120㎍을 0.5M 하이드록실아민 수용액(0.5M 하이드록실아민, 9.56mM의 PBS, 4.8g/mL의 EDTA를 순수에 용해시킨 수용액(pH7.2))에 용해하고, 실온에서 교반하여, 링커 중의 티오에스테르 결합을 절단하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 생성물은 아지드가 2개 도입된 148469에 피크가 관측되었다.

[3480] (54-5) 트라스투주맙의 특이적 수식체의 환원 조건에서의 ESI-TOFMS 해석에 의한 중쇄 선택성의 확인

[3481] (54-4)에서 생성된 항체·펩티드 복합체에 7mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀염산염 용액 2.0μL(항체에 대하여 100등량)을 첨가하여, 실온에서 20분 교반하였다. ESI-TOFMS에 의해 질량을 측정한 바, 원료의 항체·펩티드 복합체는 52981, 및 53143에 중쇄 피크, 23440에 경쇄 피크가 관측되고, 생성물은 중쇄에 아지드가 도입된 50836 및 50999에 피크가 관찰되고, 원료와 같은 23440에 경쇄 피크가 관측되었다.

[3482] (정리)

[3483] 이상의 결과를 정리하면 이하와 같다.

[3484] [표 2]

친화성 펩티드의 정리

아미노산 서열	서열번호	실시예
RGNCAYHKGQLVWCTYH	51	1～15
RGNCKYHRGQLVWCTYH	54	16
RGNCAWHRGKLVWCTYH	55	17
RGNCKWHRGELVWCTYH	56	18
RGNCKWHRGQLVWCTYH	57	19
RGNCKYHLGELVWCTYH	58	20
RGNCKYHLGQLVWCTYH	59	21
DCKWHLGELVWCT	60	22
DCKYHLGELVWCT	61	23
DCKWHRGELVWCT	62	24
DCKWHLGQLVWCT	63	25
DCKYHRGELVWCT	64	26
DCKYHLGQLVWCT	65	27
DCKWHRGQLVWCT	66	28
DCKYHRGQLVWCT	67	29
RGNCAWHLGQLVWCKYH	68	30
RGNCAWHLGELVWCKYH	69	31
RGNCAYHLGQLVWCTKH	70	32
RGNCAYHLGQLVWCTYK	71	33
RGNCAYHRGQLVWCTKH	72	34
KNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	73	35
FNMQCQKRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	74	36
FNMQCQRRFYEAKHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	75	37
FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRKARIRSIRDDC	76	38
FNMQCQRRFYEALHDPNLNKEQRNARIRSIRDDC	77	39
FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIKDDC	80	41
FNKQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	82	43
FNMQCKRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRDDC	83	45
FNMQCQRRFYEALHDPNLNEEQRNARIRSIRKDC	84	47

[3485]

[3486] 또한, 항체에 대해서, 246 위치 및/또는 248 위치의 리신 잔기(예, 실시예 8, 15, 44, 46), 288 위치 및/또는 290 위치의 리신 잔기(예, 실시예 42, 실시예 48), 317 위치의 리신 잔기(예, 실시예 40)를 비롯한 특정한 아미노산 잔기의 위치 선택적인 수식이 가능한 것을 나타냈었다.

[3487] 또한, 하기 식 (I)로 표시되는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 하기의 화합물에 대하여, 실시예의 일부를 예를 들어 설명하면 이하의 표 3과 같다.

[3488] A-L-B-R (I)

[3489] 〔식 중,

[3490] A는 가용성 단백질에 대한 친화성 물질이고,

[3491] L은 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이고,

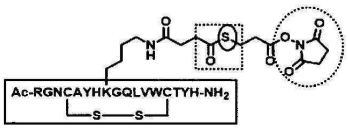
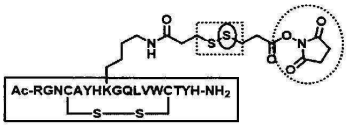
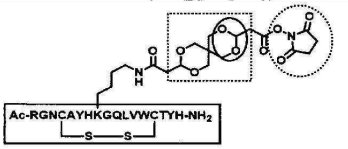
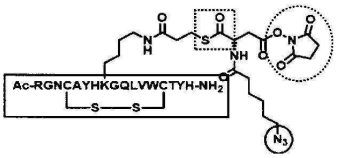
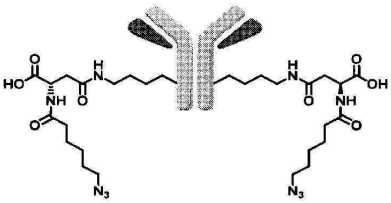
[3492] B는 (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기이고,

[3493] R은 상기 가용성 단백질에 대한 반응성기]

[3494] L은, (i) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커, 또는 (ii) 절단에 의해 생체 직교성 관능기를 반응성기측에 생성하는 능력을 갖지 않는 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커이다.

[3495] [표 3]

[3496] 표 3. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물과, 그에 따라 제조할 수 있는 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질(항체)과의 관계(그 1)

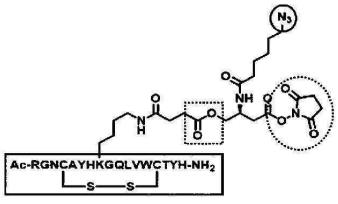
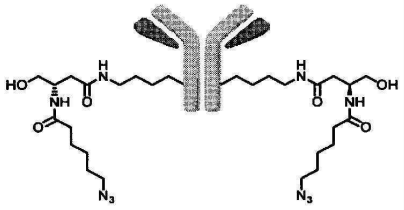
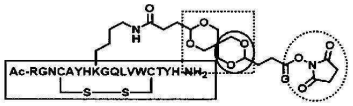
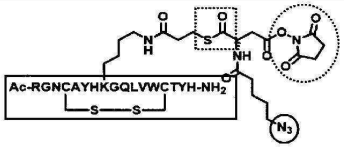
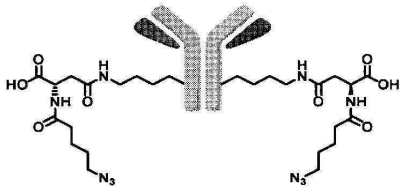
실시예	화합물의 구체적 구조 □ : 친화성 물질(A) ⬚ : 절단성 부분(L중) ○ : 생체 직교성 관능기 B(a) 또는 (ii) ◌ : 반응성기(R)	좌측 화합물을 사용하여 제조할 수 있는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질(항체) *
2-1	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	
2-2	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	
2-3	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	
11-1	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	

[3497]

[3498] *항체에서 연장되어 있는 NH-C4 알킬 부분은 항체의 리신 잔기 측쇄에 유래한다(이하, 동일)

[3499] [표 4]

[3500] 표 4. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물과, 그에 따라 제조할 수 있는 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질(항체)과의 관계(그 2)

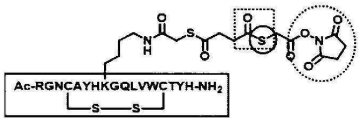
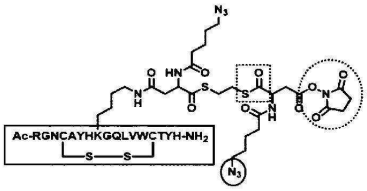
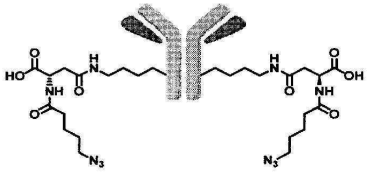
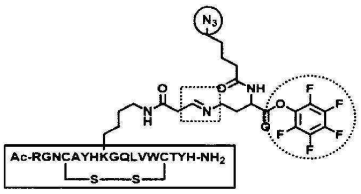
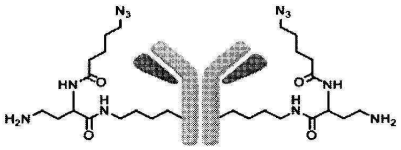
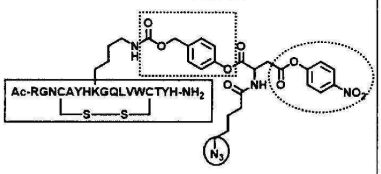
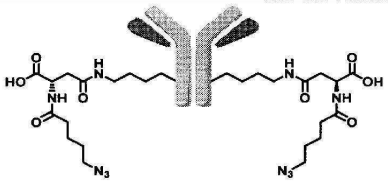
실시예	화합물의 구체적 구조 □ : 친화성 물질(A) ⬚ : 절단성 부분(L중) ○ : 생체 직교성 관능기 B(a) 또는(ii) ⬚ : 반응성기(R)	좌측 화합물을 사용하여 제조할 수 있는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질(항체) *
11-2	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	
11-3	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	
53	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	

[3501]

[3502] 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 다양한 화합물은 상술한 바와 같이, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질(A), 절단성 부분을 포함하는 2가의 기인 절단성 링커(L), (a) 생체 직교성 관능기를 포함하는 2가의 기, 또는 (b) 생체 직교성 관능기를 포함하지 않는 2가의 기(B), 가용성 단백질에 대한 반응성기(R)의 종류를 적절히 변경함으로써, 주지의 유기합성 방법에 따라 조제할 수 있다. 본 발명에 있어서 조제할 수 있는, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물의 새로운 예와, 그에 따라 제조할 수 있는 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질(항체)과의 관계는 이하와 같다.

[3503] [표 5]

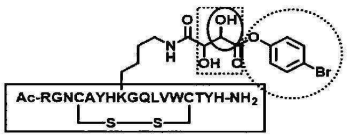
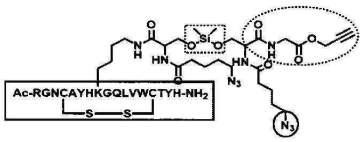
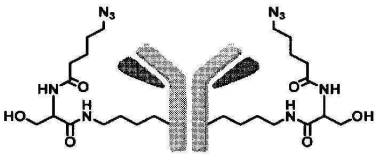
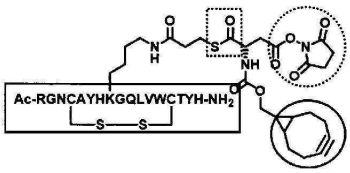
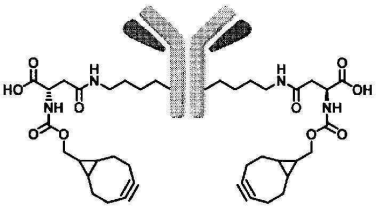
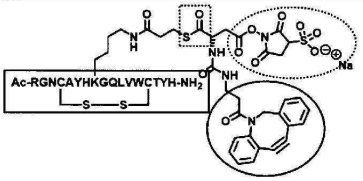
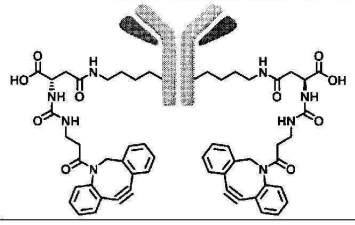
[3504] 표 5. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물과, 그에 따라 제조할 수 있는 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질(항체)과의 관계(그 1)

실시예	화합물의 구체적 구조 □ : 친화성 물질(A) ⬚ : 절단성 부분(L종) ○ : 생체 직교성 관능기 B(a) 또는 (ii) ⬚ : 반응성기(R)	좌측 화합물을 사용하여 제조할 수 있는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질(항체) *
55	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	
56	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	
57	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	
58	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	

[3505]

[3506] [표 6]

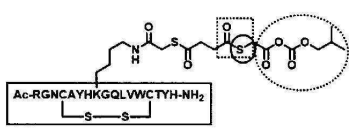
[3507] 표 6. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물과, 그에 따라 제조할 수 있는 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질(항체)과의 관계(그 2)

실시예	화합물의 구체적 구조 : 친화성 물질(A) : 절단성 부분(L중) : 생체 직교성 관능기 B(a) 또는(ii) : 반응성기(R)	좌측 화합물을 사용하여 제조할 수 있는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질(항체) *
59	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	
60	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	
61	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	
62	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	

[3508]

[3509] [표 7]

[3510] 표 7. 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물과, 그에 따라 제조할 수 있는 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질(항체)과의 관계(그 3)

실시예	화합물의 구체적 구조 : 친화성 물질(A) : 절단성 부분(L중) : 생체 직교성 관능기 B(a) 또는(ii) : 반응성기(R)	좌측 화합물을 사용하여 제조할 수 있는, 생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질(항체) *
63	 상기 아미노산 서열 : 서열번호 5 1	

[3511]

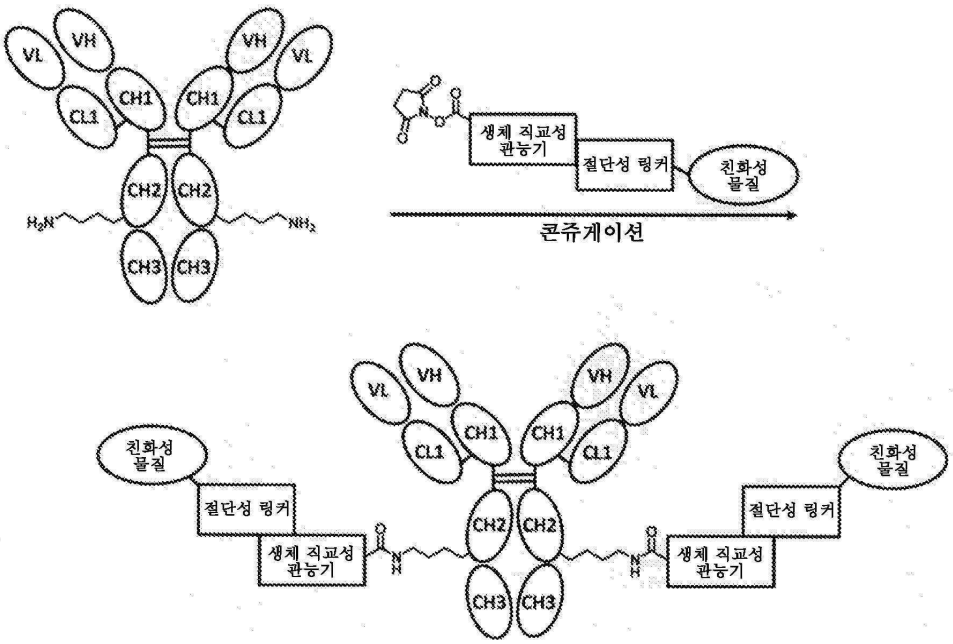
[3512] 이상에서, 가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물에 있어서, 친화성 물질의 종류, 친화성 물질과 반응성기 사이의 링커의 길이, 및 링커가 도입되는 친화성 물질 중의 위치 등 인자를 적절히 조절함으로써, 항체를 위치 선택적으로 수식할 수 있는 것을 나타내었다.

[3513] [산업상의 이용 가능성]

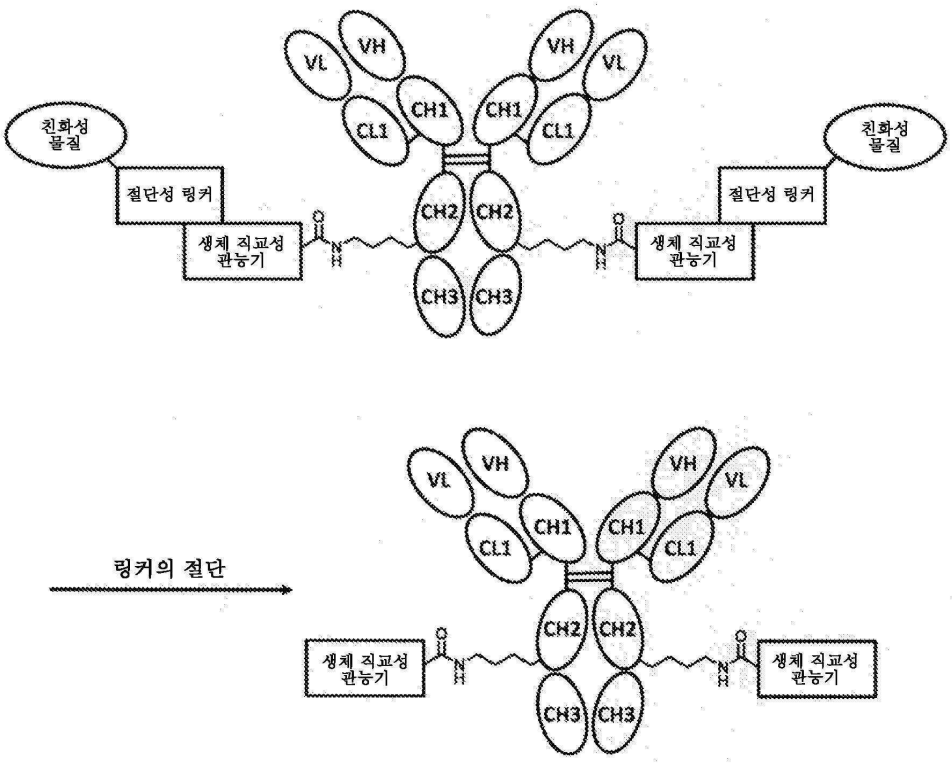
[3514] 본 발명은, 예를 들면, 위치 선택적으로 수식된 가용성 단백질의 제조에 유용하다.

도면

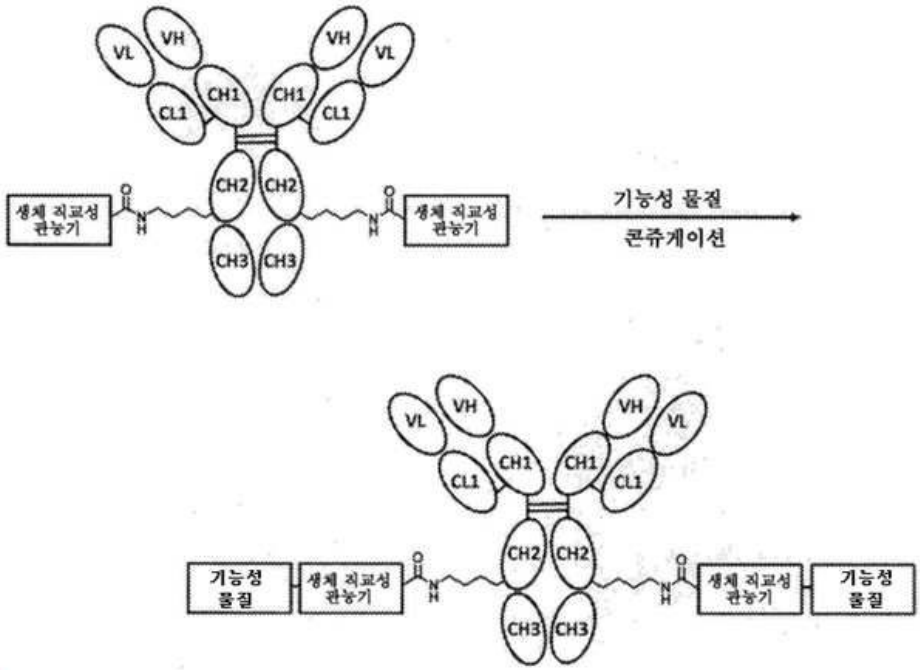
도면1a



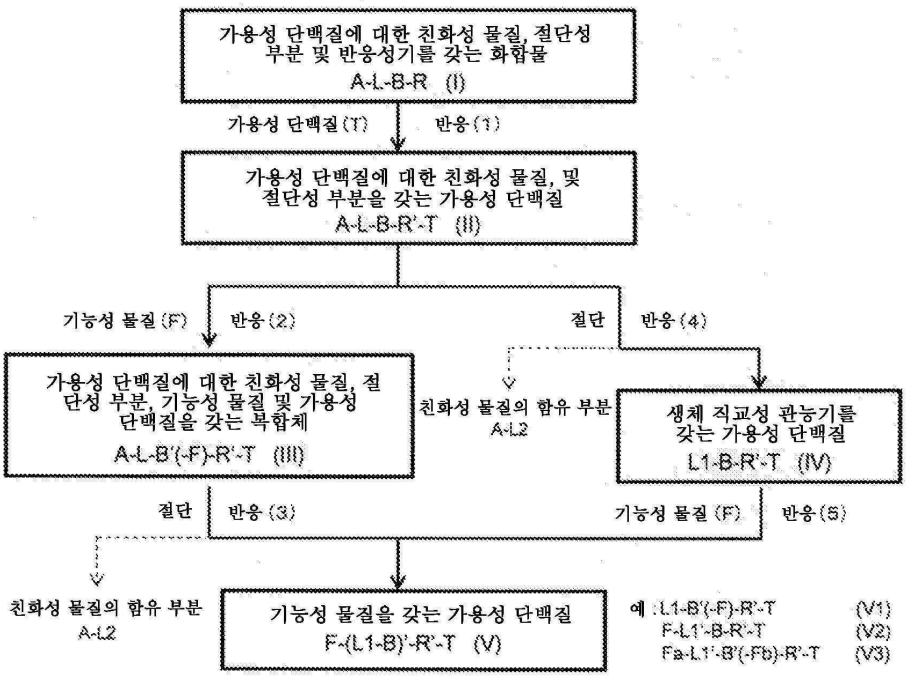
도면1b



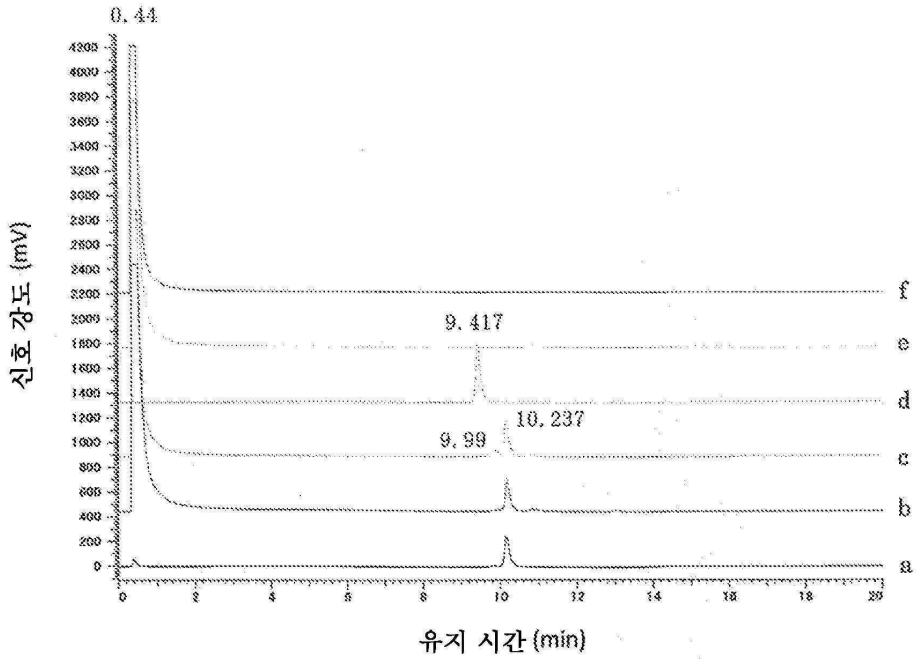
도면1c


VL
VH
CH1
CL1
CH2
CH3
생체 직교성 관능기
기능성 물질
콘쥬게이션

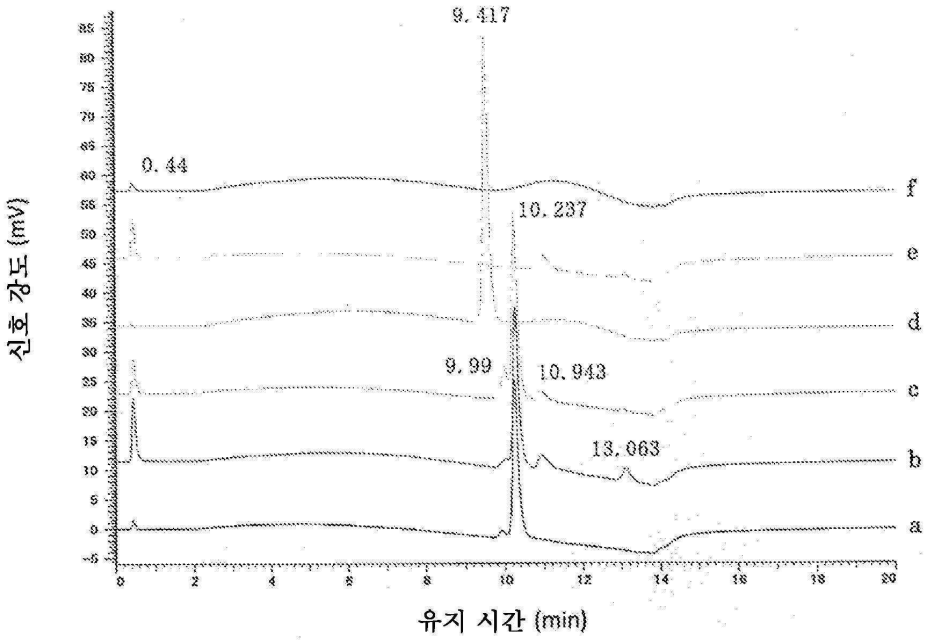
도면2


가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분 및 반응성기를 갖는 화합물
A-L-B-R (I)
가용성 단백질(T)
반응(1)
가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 및 절단성 부분을 갖는 가용성 단백질
A-L-B-R'-T (II)
기능성 물질(F)
반응(2)
절단
반응(4)
가용성 단백질에 대한 친화성 물질, 절단성 부분, 기능성 물질 및 가용성 단백질을 갖는 복합체
A-L-B'(-F)-R'-T (III)
친화성 물질의 함유 부분
A-L2
생체 직교성 관능기를 갖는 가용성 단백질
L1-B-R'-T (IV)
절단
반응(3)
기능성 물질(F)
반응(5)
친화성 물질의 함유 부분
A-L2
기능성 물질을 갖는 가용성 단백질
F-(L1-B)'-R'-T (V)
예 :L1-B'(-F)-R'-T (V1)
F-L1'-B-R'-T (V2)
Fa-L1'-B'(-Fb)-R'-T (V3)

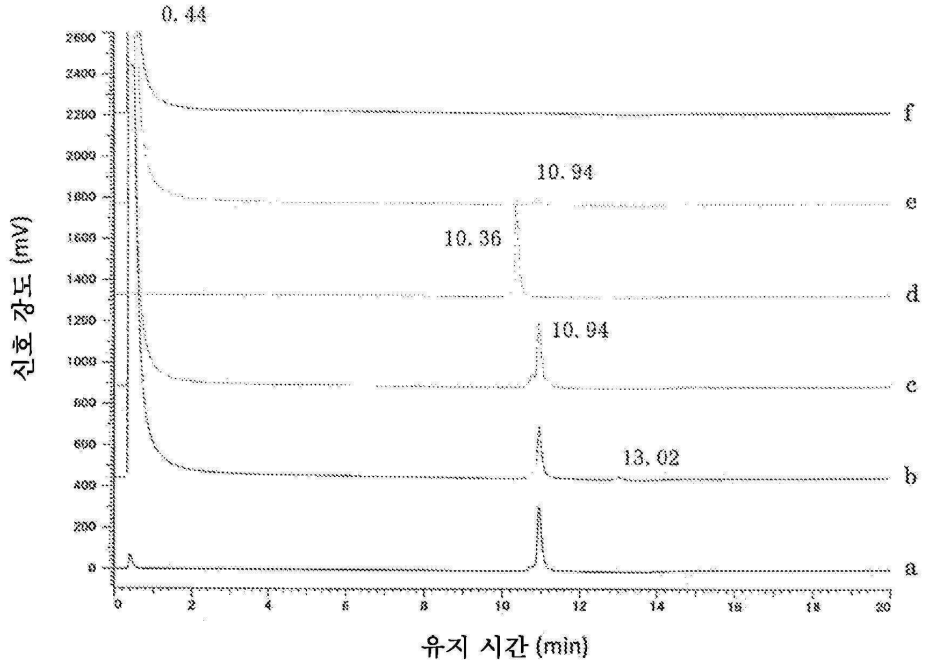
도면3


0.44
9.417
10.237
9.99
f
e
d
c
b
a
신호 강도 (mV)
유지 시간 (min)

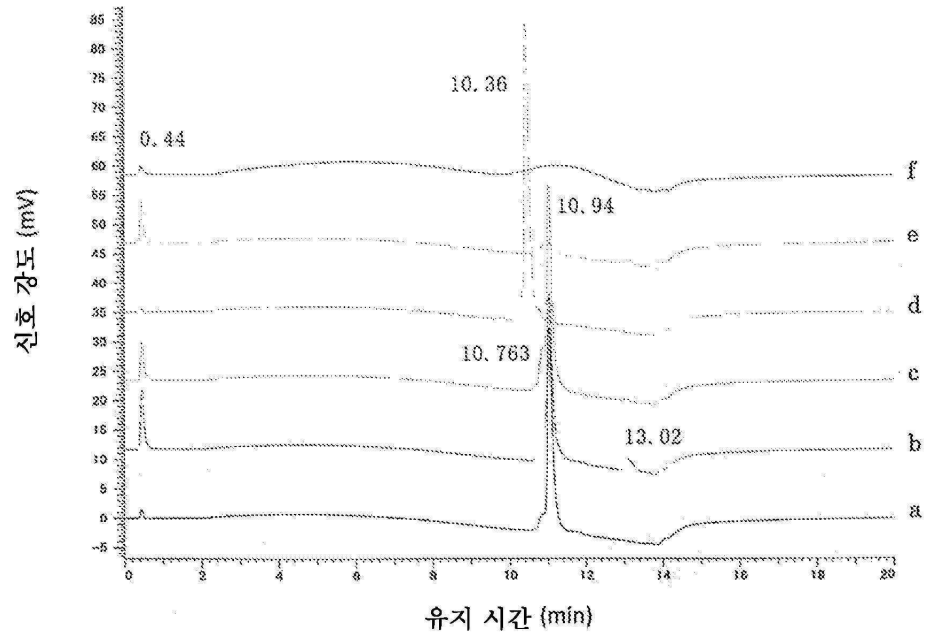
도면4


9.417
0.44
10.237
9.99
10.943
13.063
f
e
d
c
b
a
신호 강도 (mV)
유지 시간 (min)

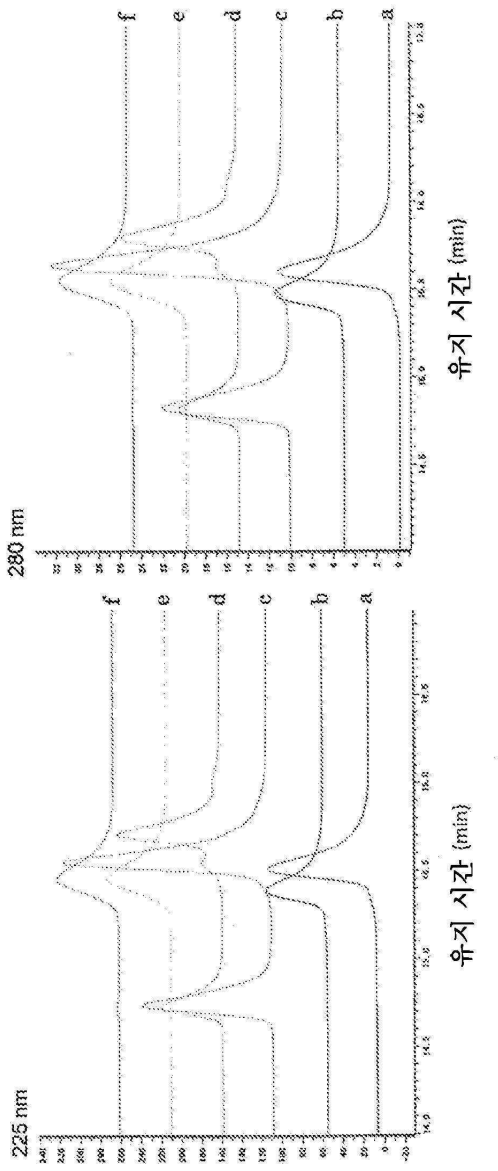
도면5


0.44
10.94
10.36
10.94
13.02
f
e
d
c
b
a
신호 강도 (mV)
유지 시간 (min)

도면6


10.36
0.44
10.94
10.763
13.02
f
e
d
c
b
a
신호 강도 (mV)
유지 시간 (min)

도면7



도면8

(1) 당쇄를 PNGase로 절단한 트라스투주맙의 중쇄의 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY
LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG (서열번호 2)

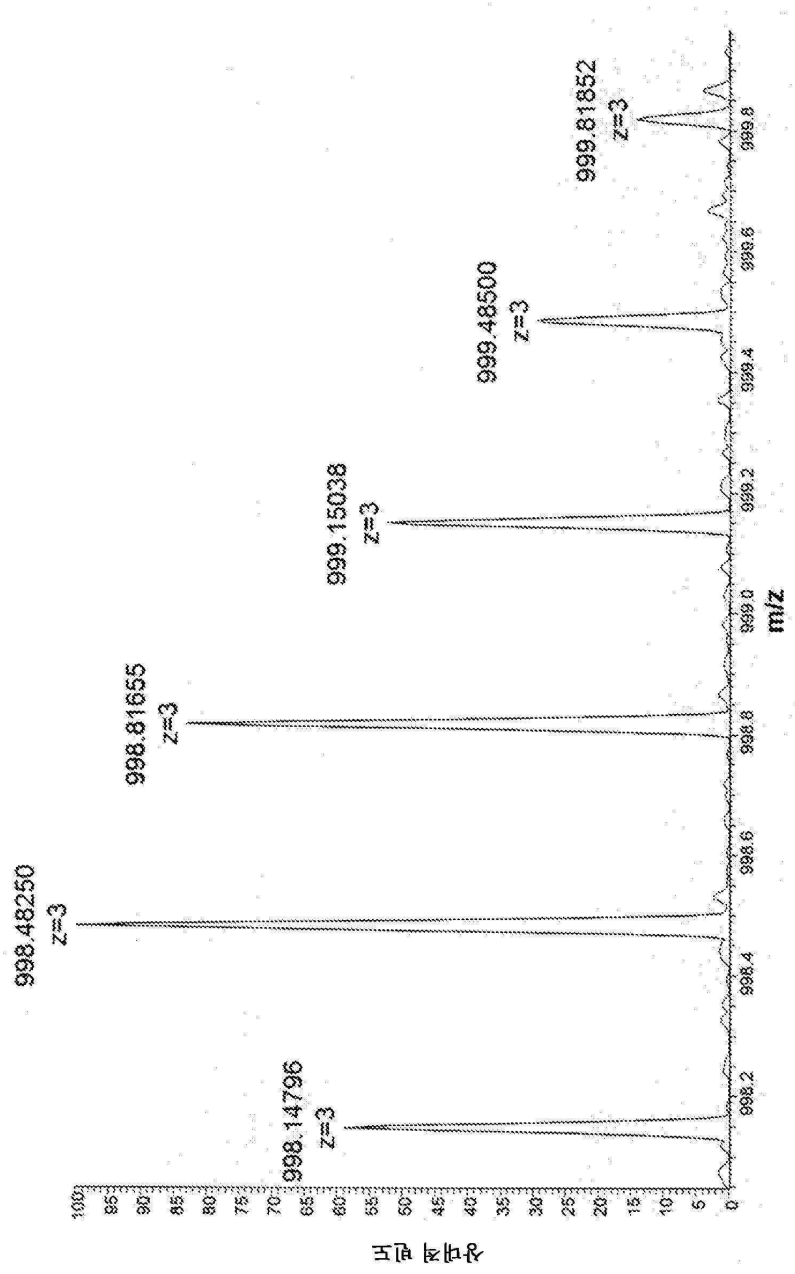
(2) 당쇄를 PNGase로 절단한 IgG1 Fc 영역의 아미노산 서열

IEGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYDSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열
번호 3)

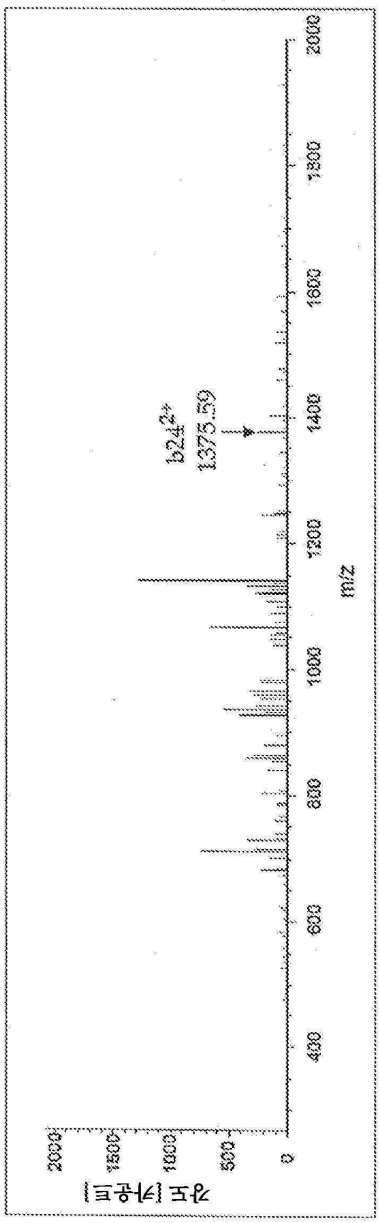
(3) 트라스투주맙의 경쇄의 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP
GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (서열번호 4)

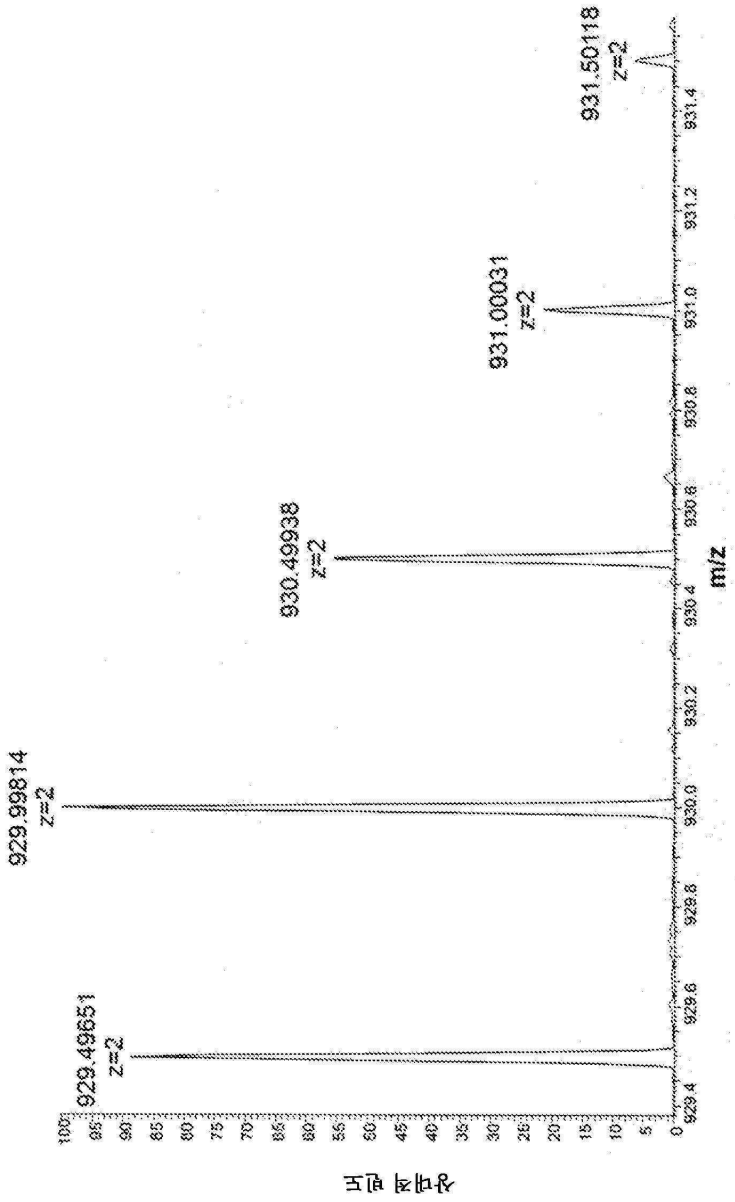
도면9


상대적 빈도
m/z
998.48250
z=3
998.81655
z=3
998.14796
z=3
999.15038
z=3
999.48500
z=3
999.81852
z=3

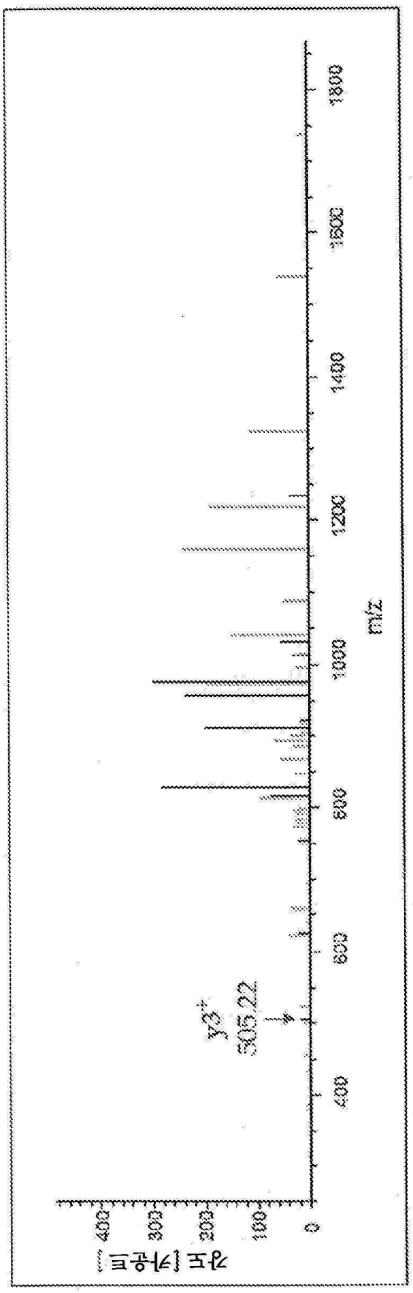
도면10


b24 2+
1375.59
m/z
강도 [카운트]
0
500
1000
1500
2000
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000

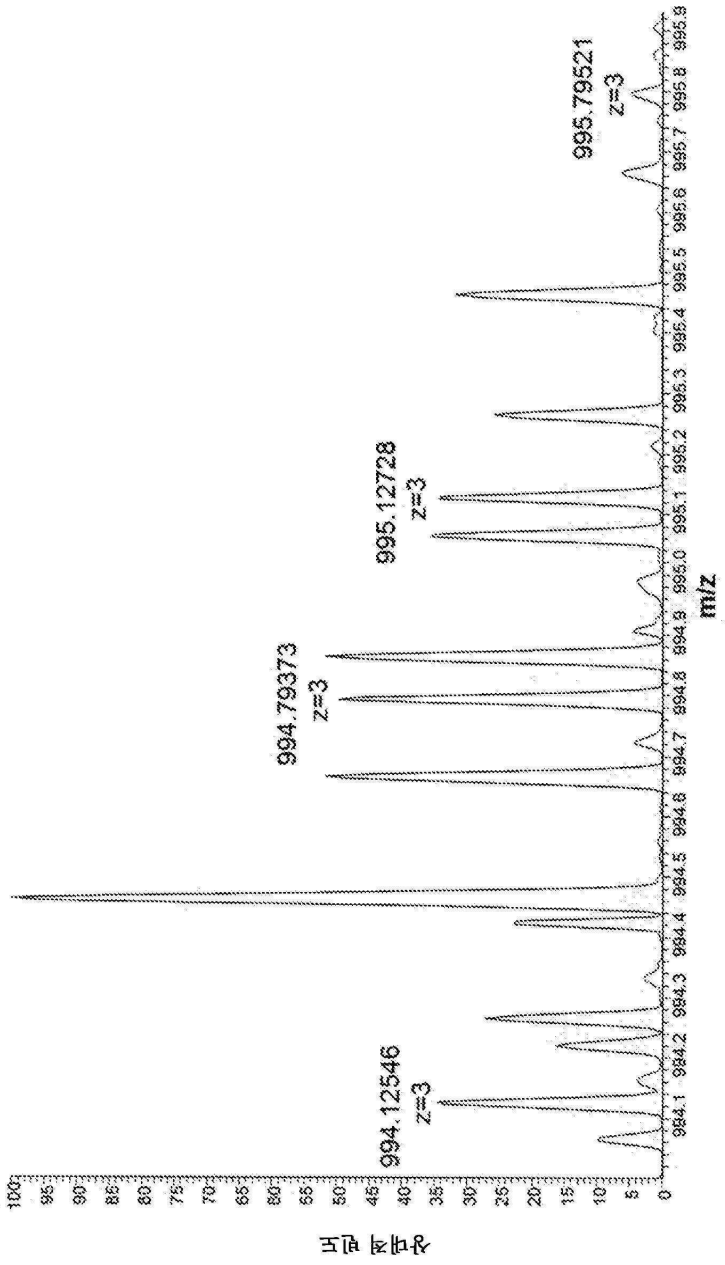
도면11


929.99814
z=2
929.49651
z=2
930.49938
z=2
931.00031
z=2
931.50118
z=2
m/z
상대적 빈도

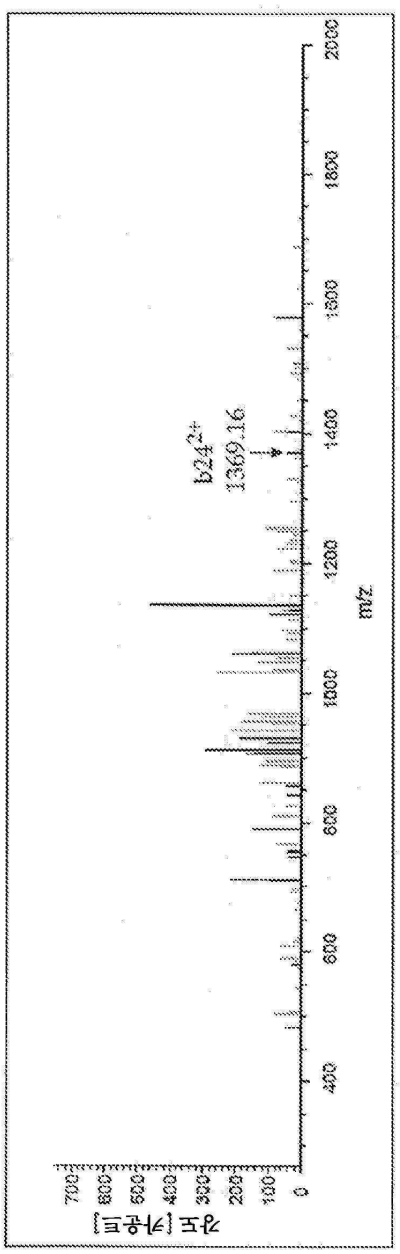
도면12


강도 [카운트]
0
100
200
300
400
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
m/z
y3+
505.22

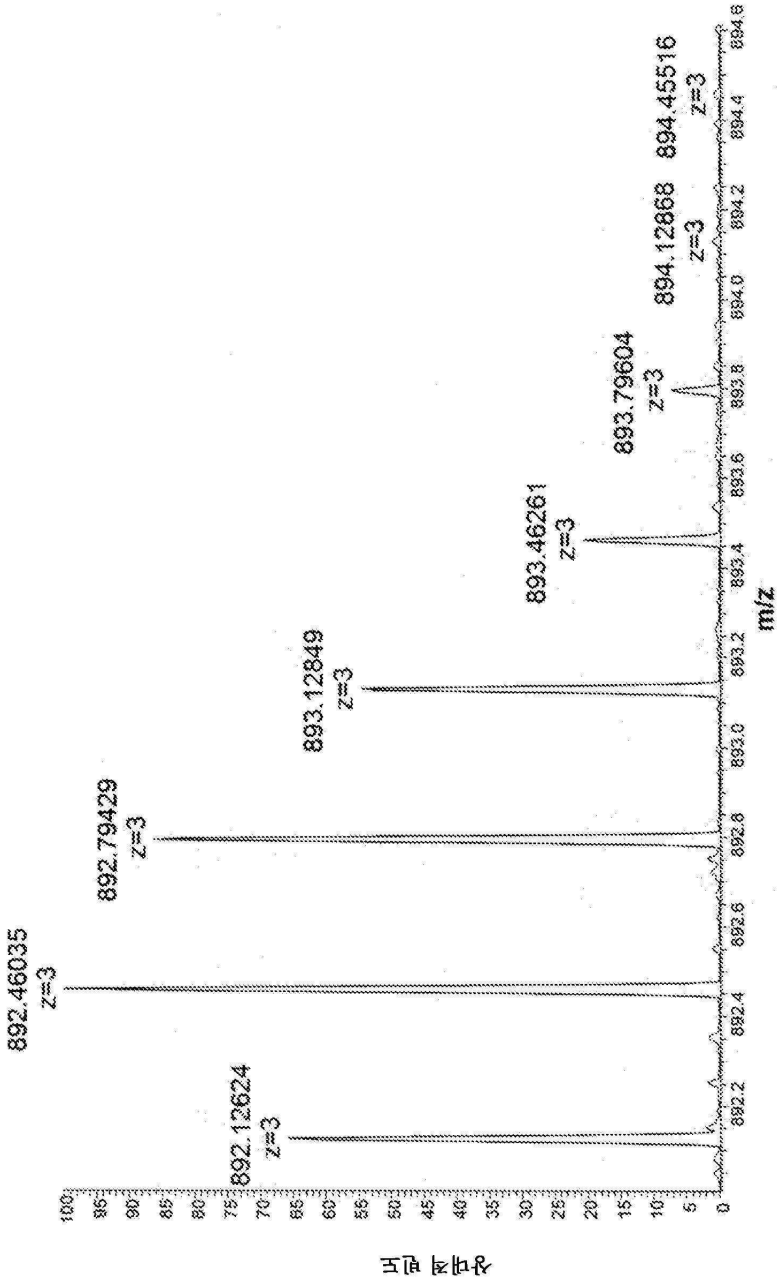
도면13



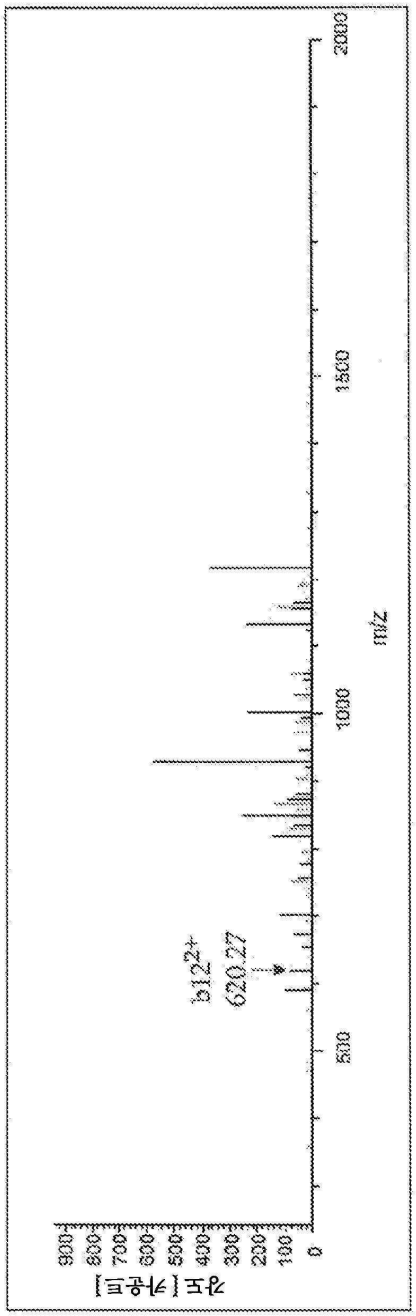
도면14



도면15


892.46035
z=3
892.79429
z=3
893.12849
z=3
893.46261
z=3
893.79604
z=3
894.12868
z=3
894.45516
z=3
892.12624
z=3
m/z
상대적 빈도

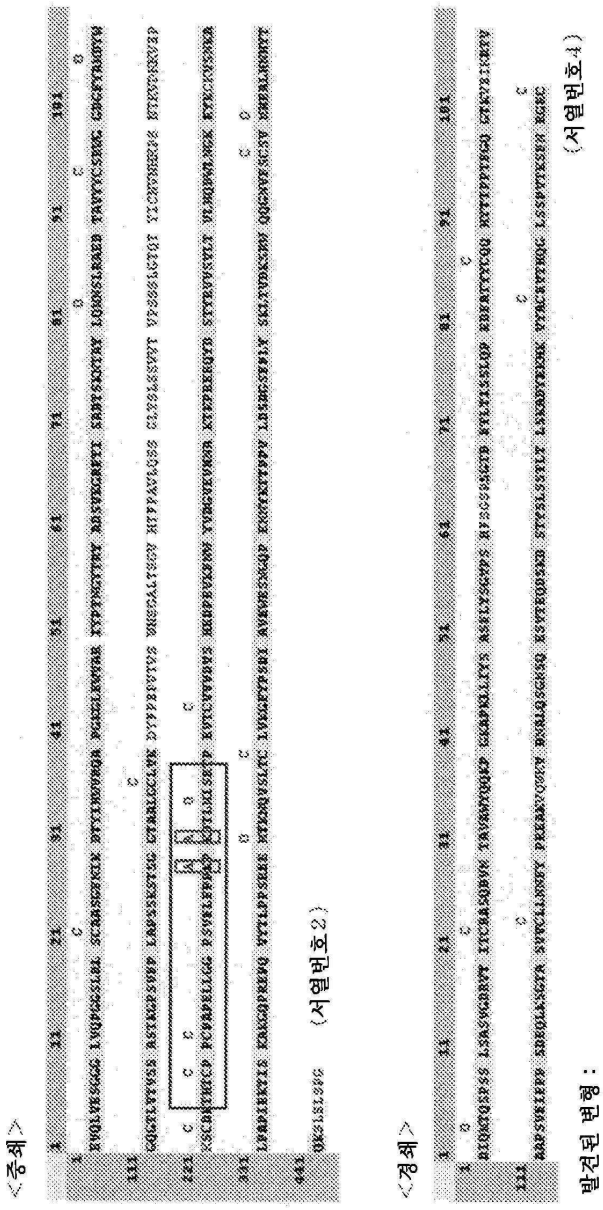
도면16



도면17

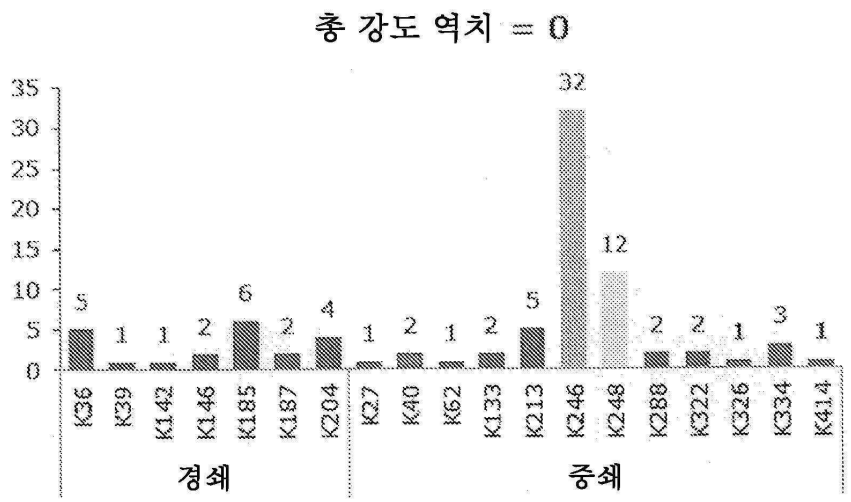
PKSCDKTHTCPPCPAPEXXGXPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
DSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRXEXTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKXTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열번호 1)

도면18

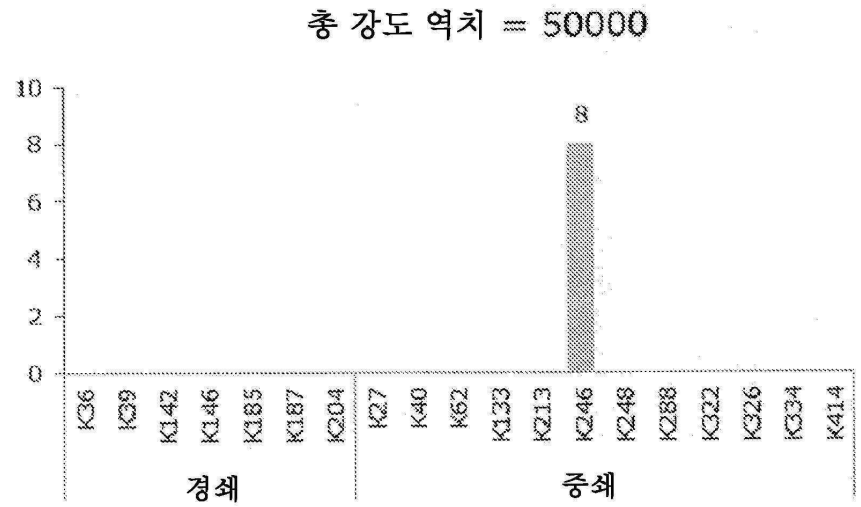


도면19

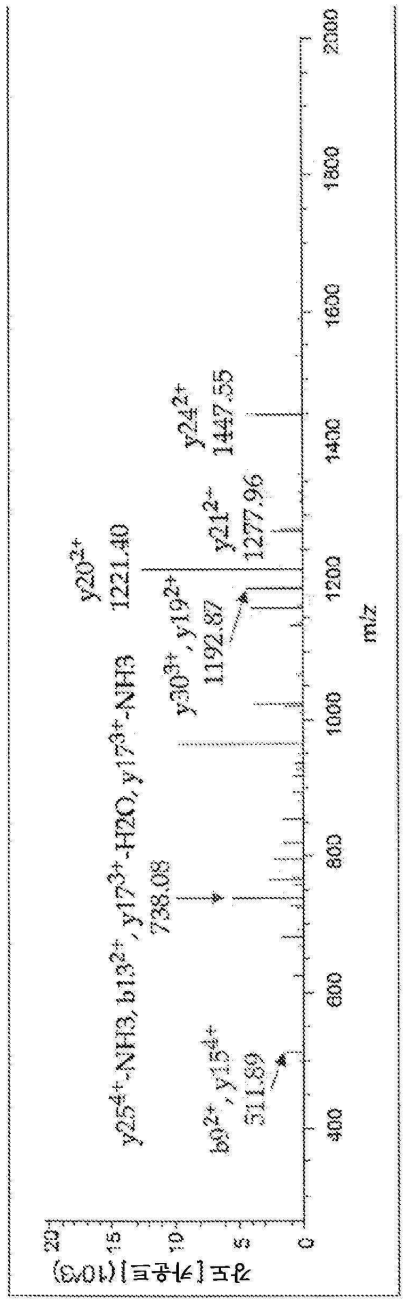
(1)


총 강도 역치 = 0
35
30
25
20
15
10
5
0
5
1
1
2
6
2
4
1
2
1
2
5
32
12
2
2
1
3
1
K36
K39
K142
K146
K185
K187
K204
K27
K40
K62
K133
K213
K246
K248
K288
K322
K326
K334
K414
경쇄
중쇄

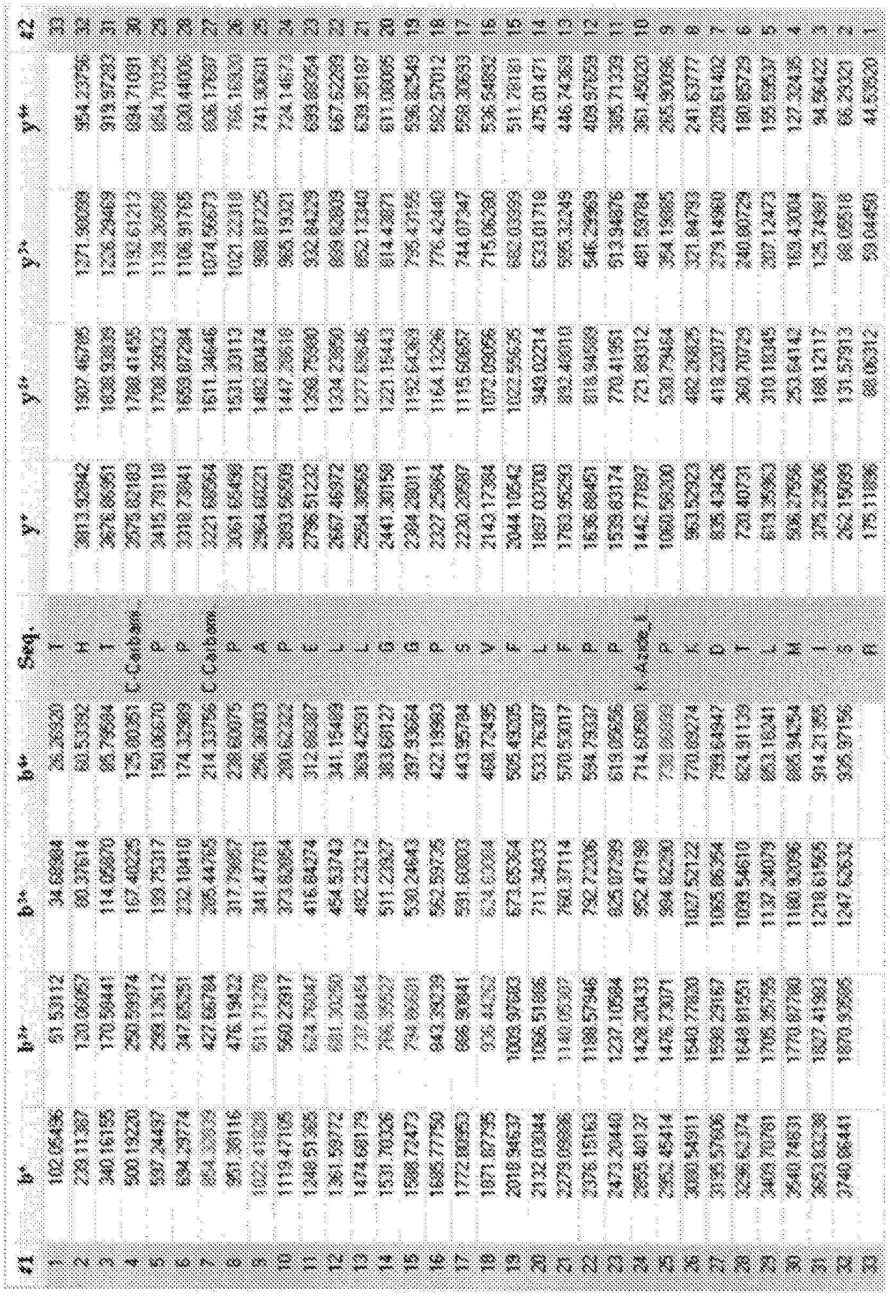
(2)


총 강도 역치 = 50000
10
8
6
4
2
0
8
K36
K39
K142
K146
K185
K187
K204
K27
K40
K62
K133
K213
K246
K248
K288
K322
K326
K334
K414
경쇄
중쇄

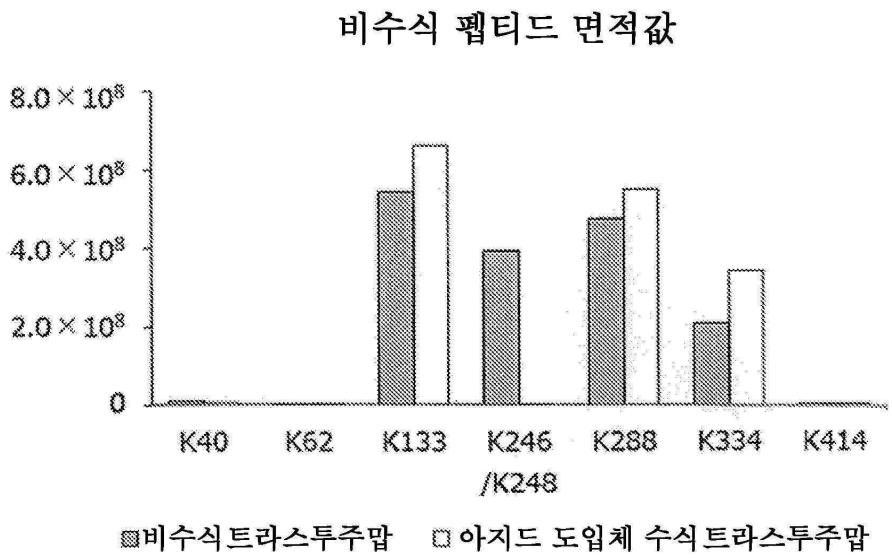
도면20


강도 [카운트] (10^3)
20
15
10
5
0
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
m/z
y25^4+-NH3, b13^2+, y17^3+-H2O, y17^3+-NH3
738.08
b6^2+, y15^4+
511.89
y30^3+, y19^2+
1192.87
y20^2+
1221.40
y21^2+
1277.96
y24^2+
1447.55

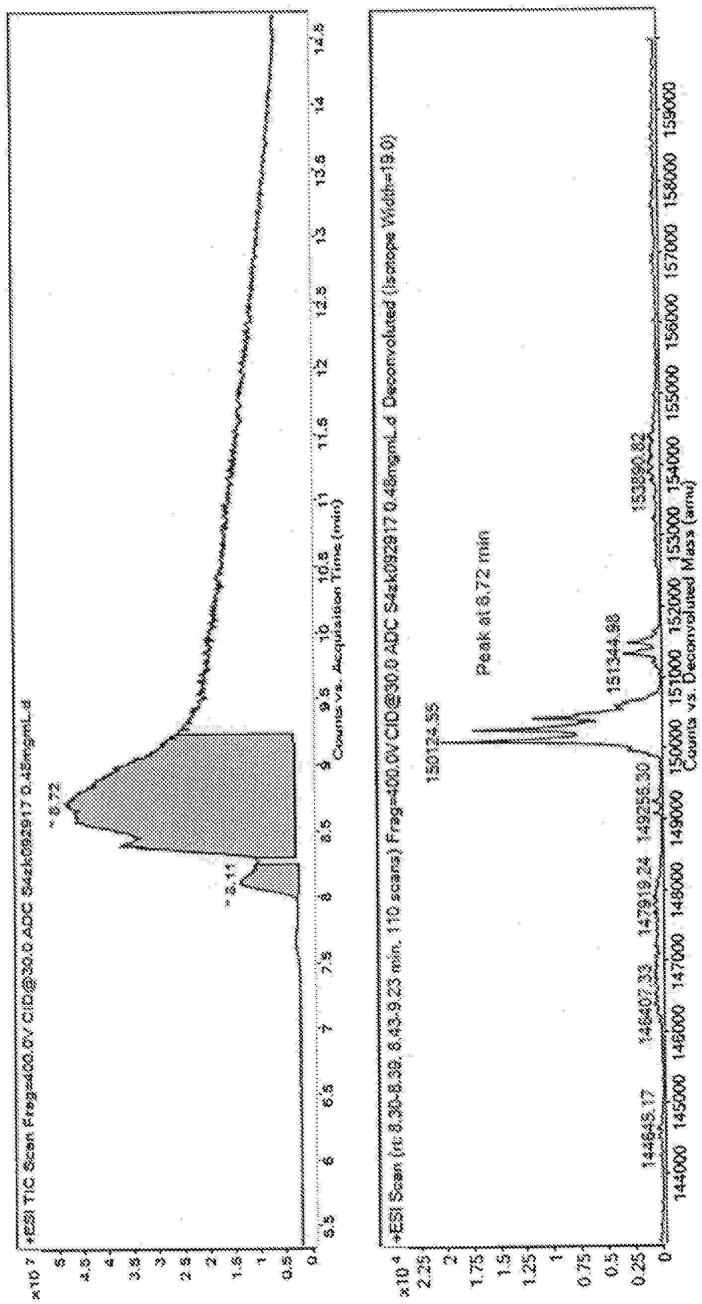
도면21



도면22


비수식 펩티드 면적값
8.0×10⁸
6.0×10⁸
4.0×10⁸
2.0×10⁸
0
K40
K62
K133
K246
/K248
K288
K334
K414
비수식트라스투주맙
아지드 도입체 수식트라스투주맙

도면23


+ESI TIC Scan Frag=400.0V CID@30.0 ADC S4zk092817 0.48mgmL_4
8.72
8.11
Counts vs. Acquisition Time (min)
+ESI Scan (rt: 8.30-8.38, 8.43-9.23 min, 110 scans) Frag=400.0V CID@30.0 ADC S4zk092817 0.48mgmL_4 Deconvoluted (Isotope Width=19.0)
Peak at 8.72 min
150124.55
151344.88
153290.82
146407.33
147919.24
149256.30
144648.17
Counts vs. Deconvoluted Mass (amu)

도면24

(1) >트라스투주맙 경쇄

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC (서열번호 4)

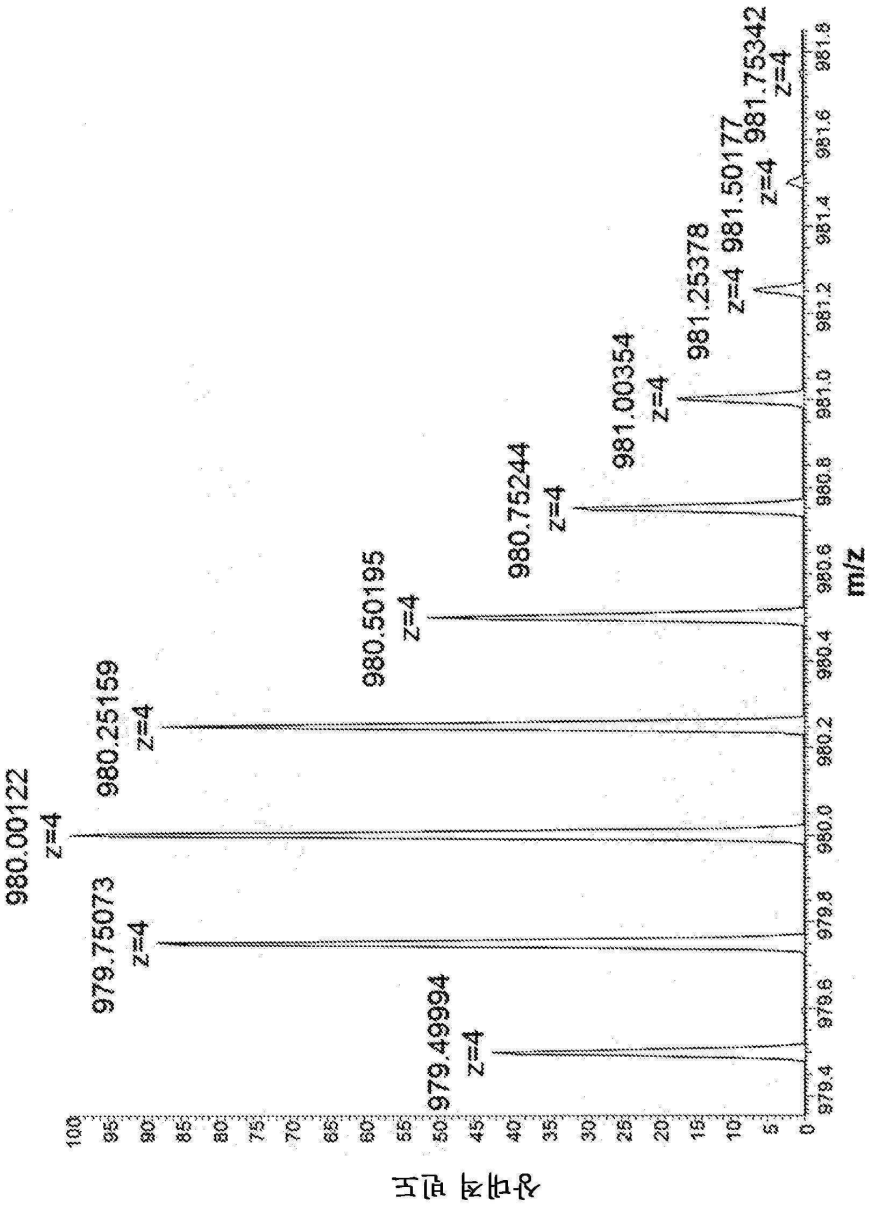
(2) > 트라스투주맙 중쇄

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG (서열번호 53)

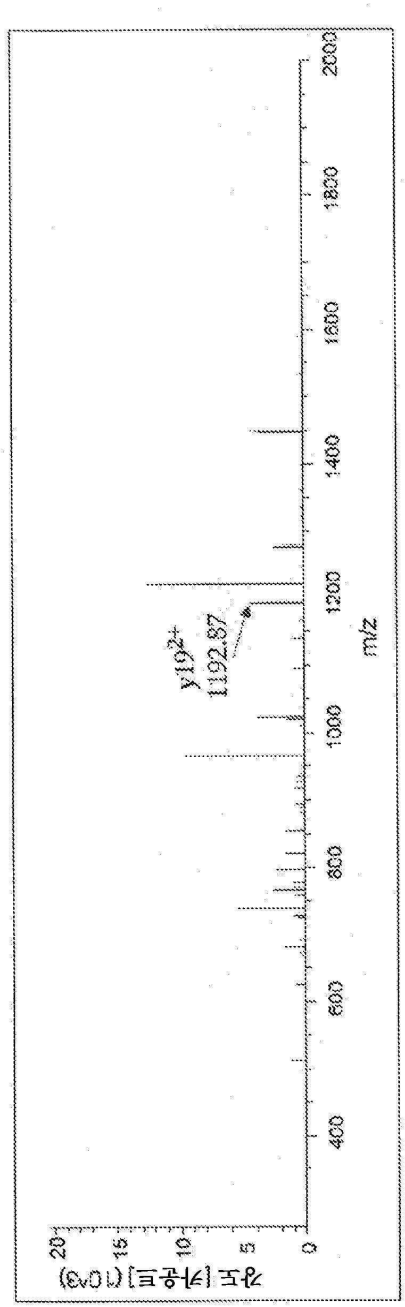
(3) > 트라스투주맙 중쇄 (N30Q)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYD
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG (서열번호 2)

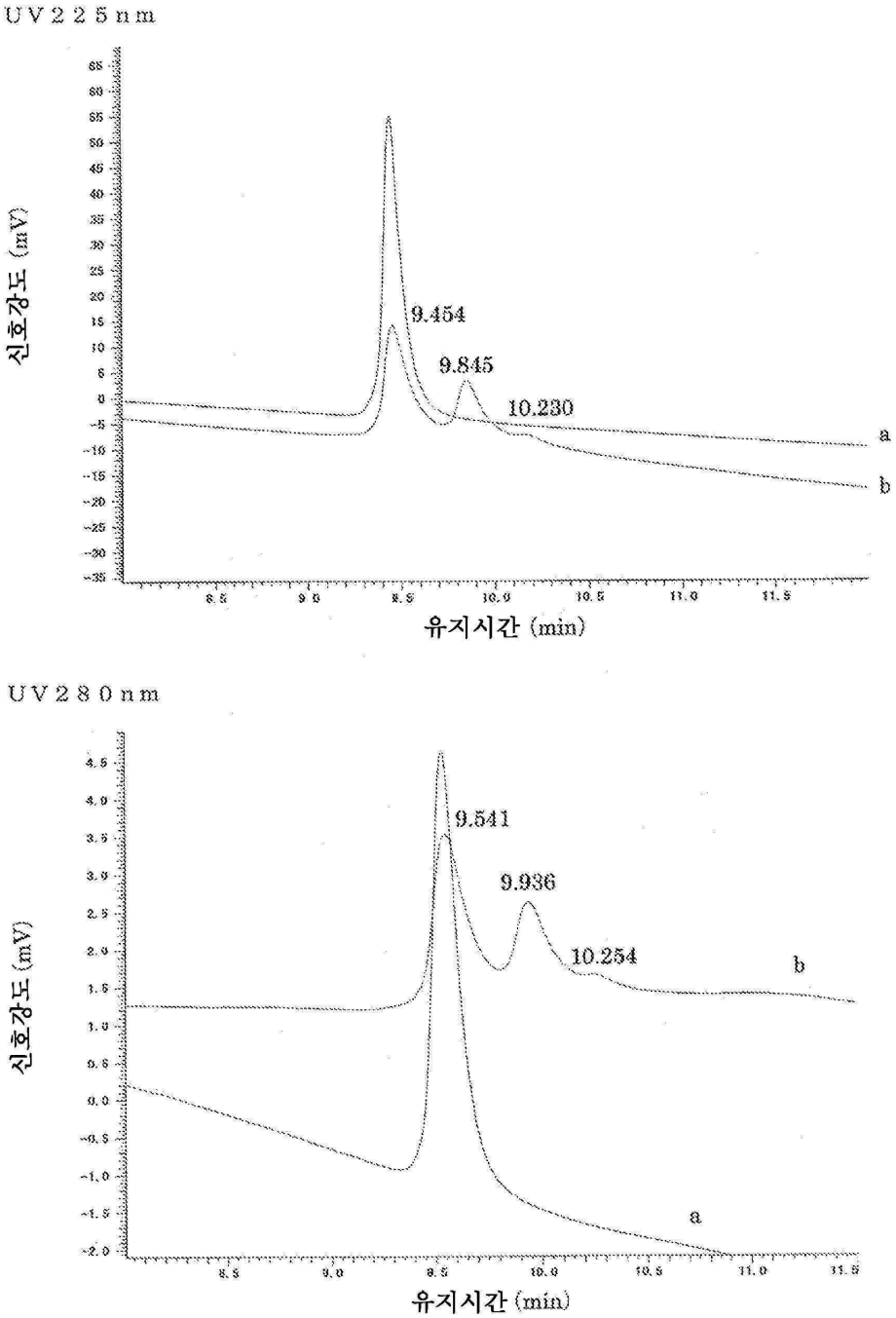
도면25


상대적 빈도
m/z
980.00122
z=4
979.75073
z=4
980.25159
z=4
979.49994
z=4
980.50195
z=4
980.75244
z=4
981.00354
z=4
981.25378
z=4
981.50177
z=4
981.75342
z=4

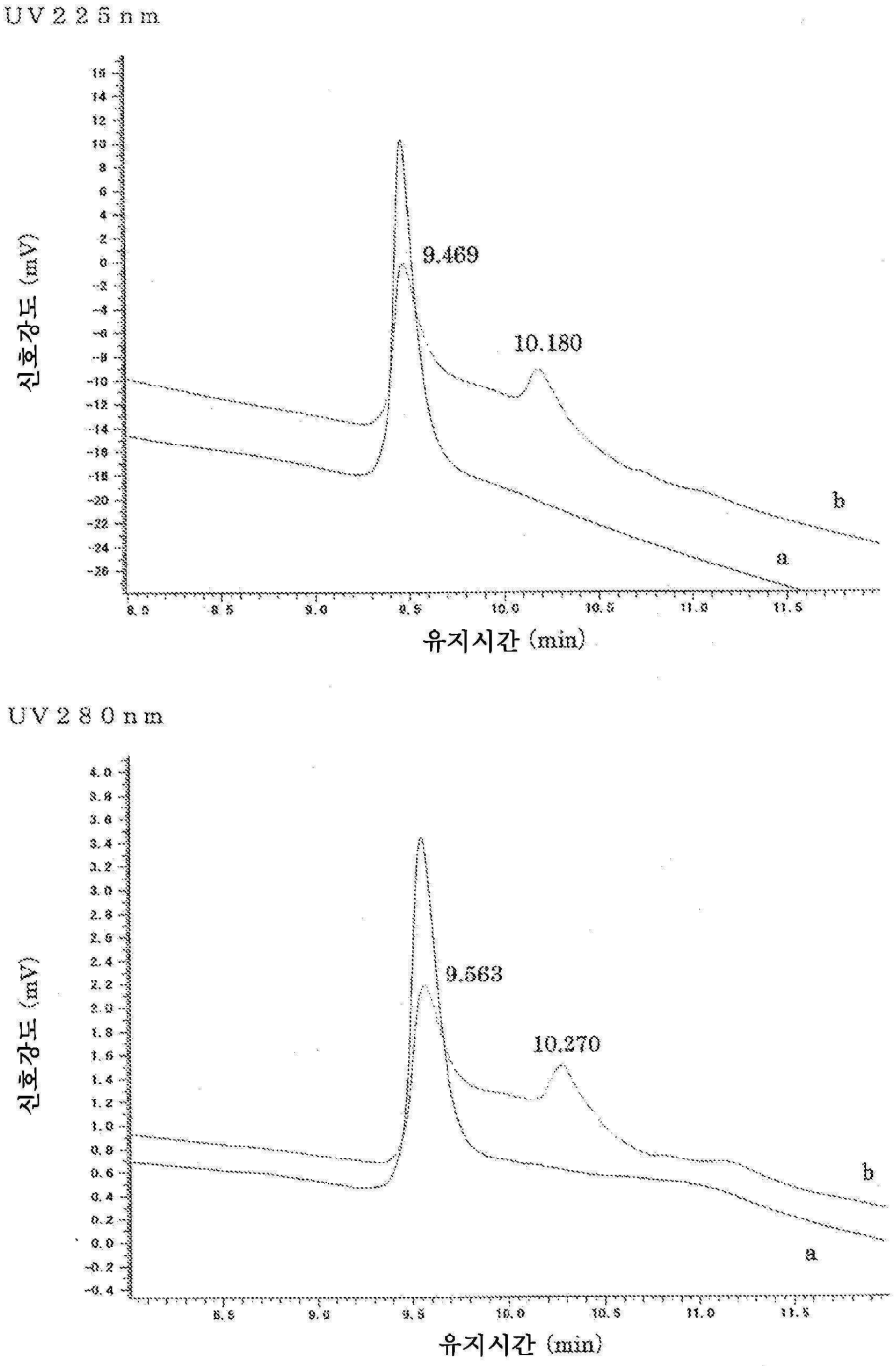
도면26


정도 [카운트] (103)
20
15
10
5
0
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
m/z
y19²⁺
1192.87

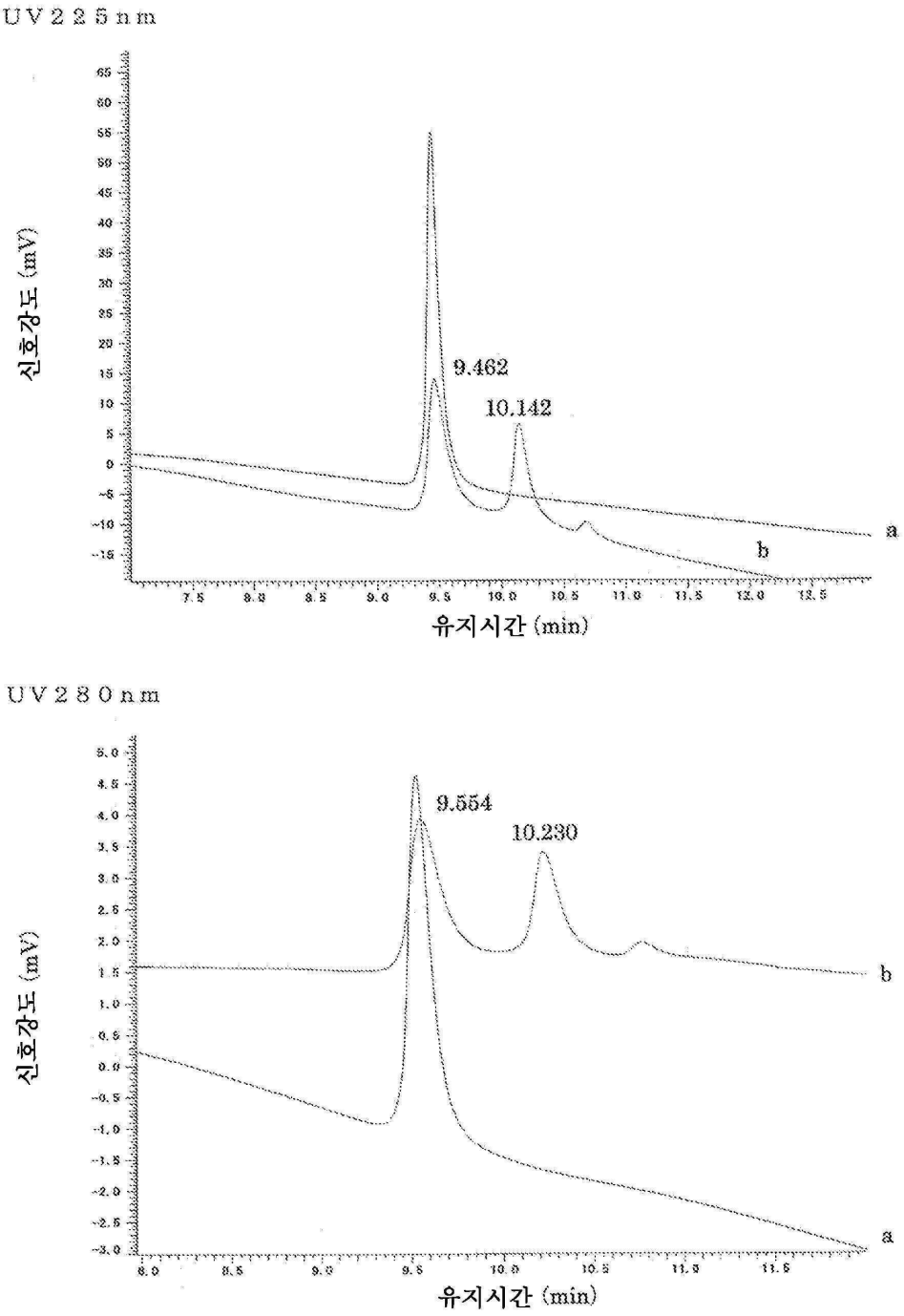
도면27


UV225nm
신호강도 (mV)
9.454
9.845
10.230
a
b
유지시간 (min)
UV280nm
신호강도 (mV)
9.541
9.936
10.254
b
a
유지시간 (min)

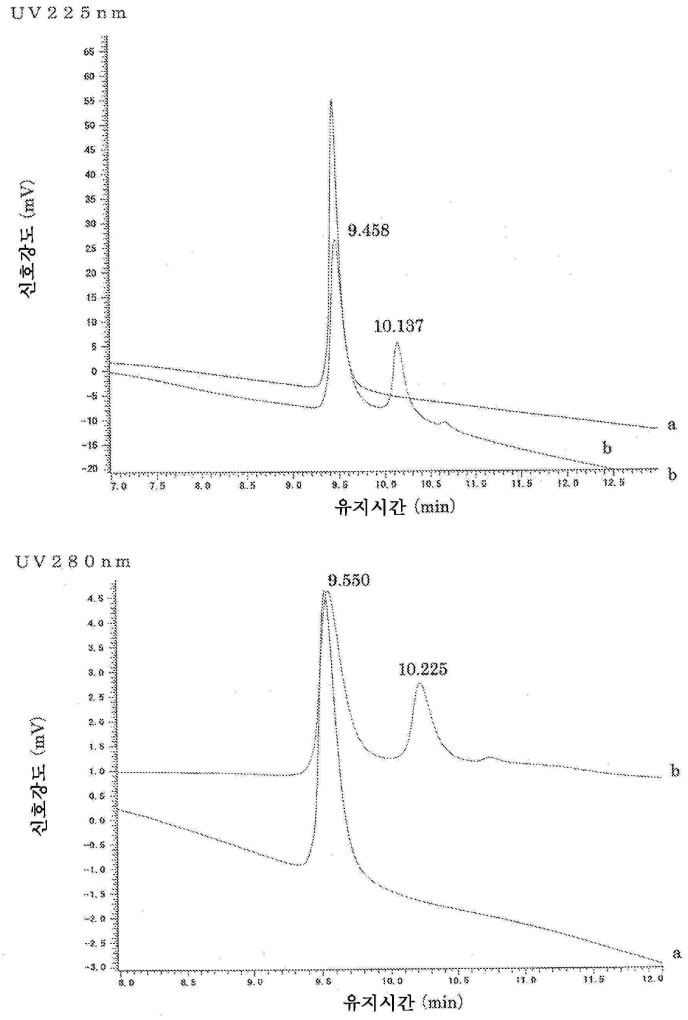
도면28


UV225nm
신호강도 (mV)
9.469
10.180
b
a
유지시간 (min)
UV280nm
신호강도 (mV)
9.563
10.270
b
a
유지시간 (min)

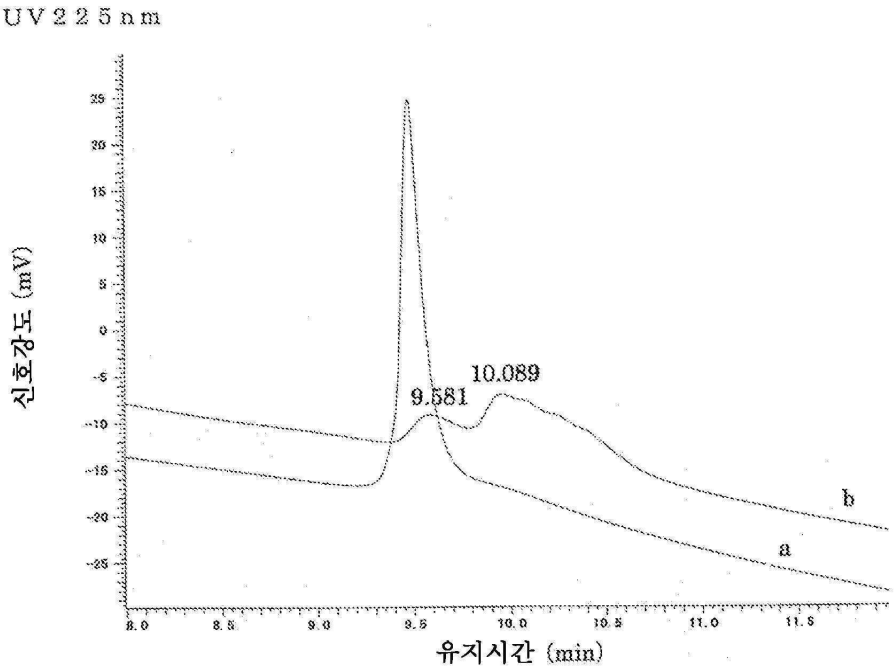
도면29

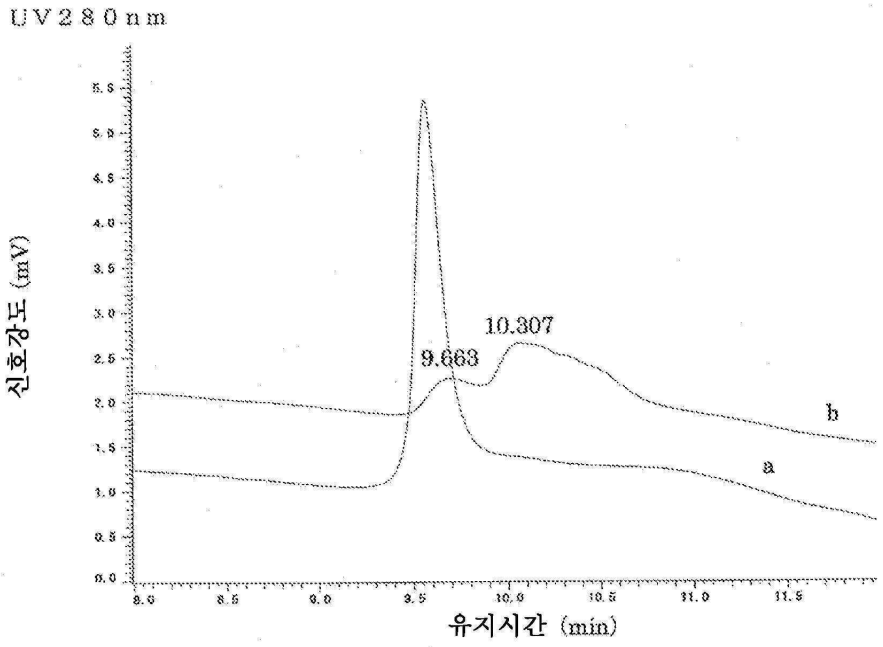

UV225nm
신호강도 (mV)
9.462
10.142
a
b
유지시간 (min)
UV280nm
신호강도 (mV)
9.554
10.230
b
a
유지시간 (min)

도면30


UV225nm
신호강도 (mV)
9.458
10.137
a
b
b
유지시간 (min)
UV280nm
신호강도 (mV)
9.550
10.225
b
a
유지시간 (min)

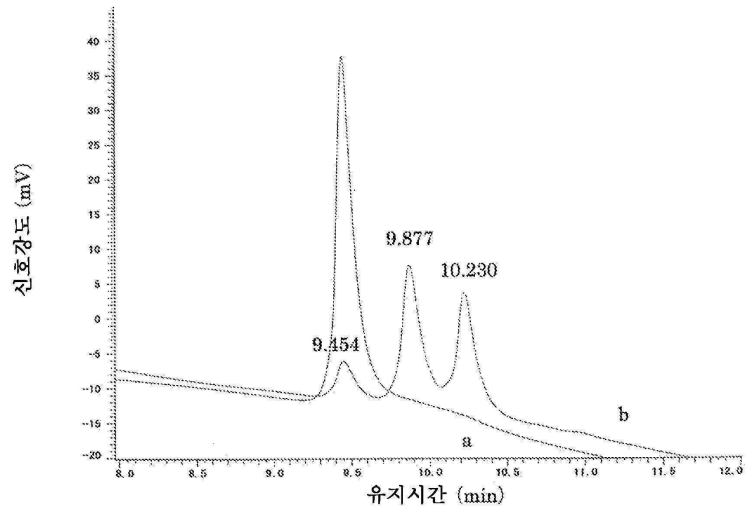
도면31


UV225nm
신호강도 (mV)
10.089
9.581
b
a
유지시간 (min)

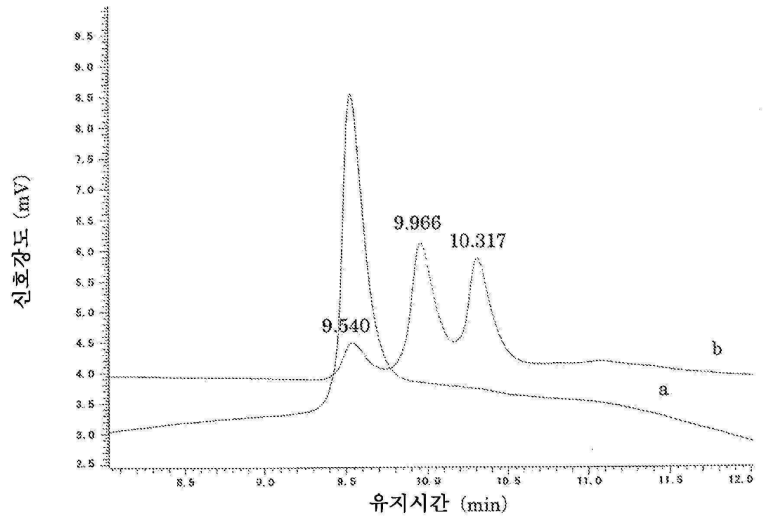

UV280nm
신호강도 (mV)
10.307
9.663
b
a
유지시간 (min)

도면32

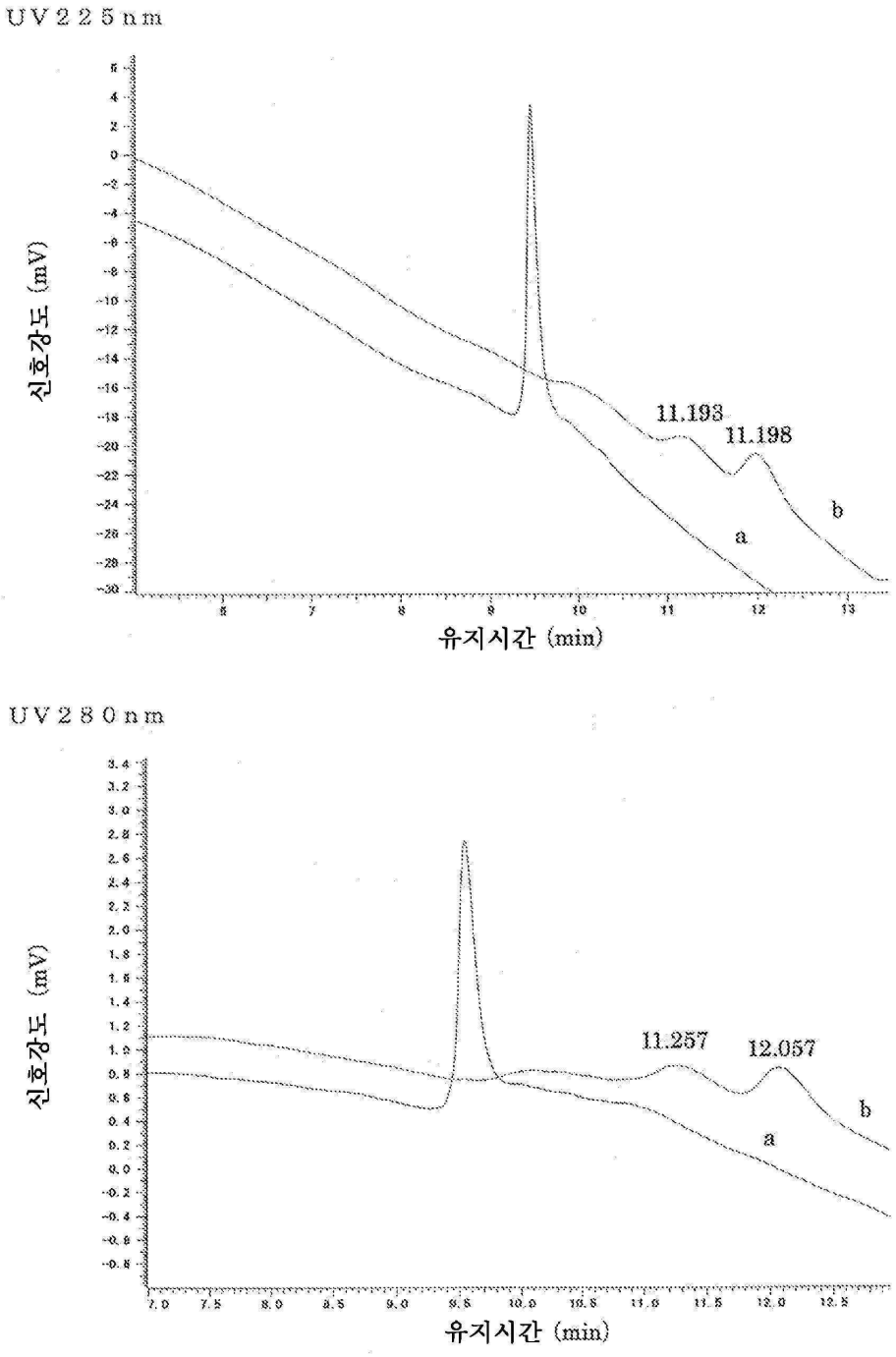
UV225nm



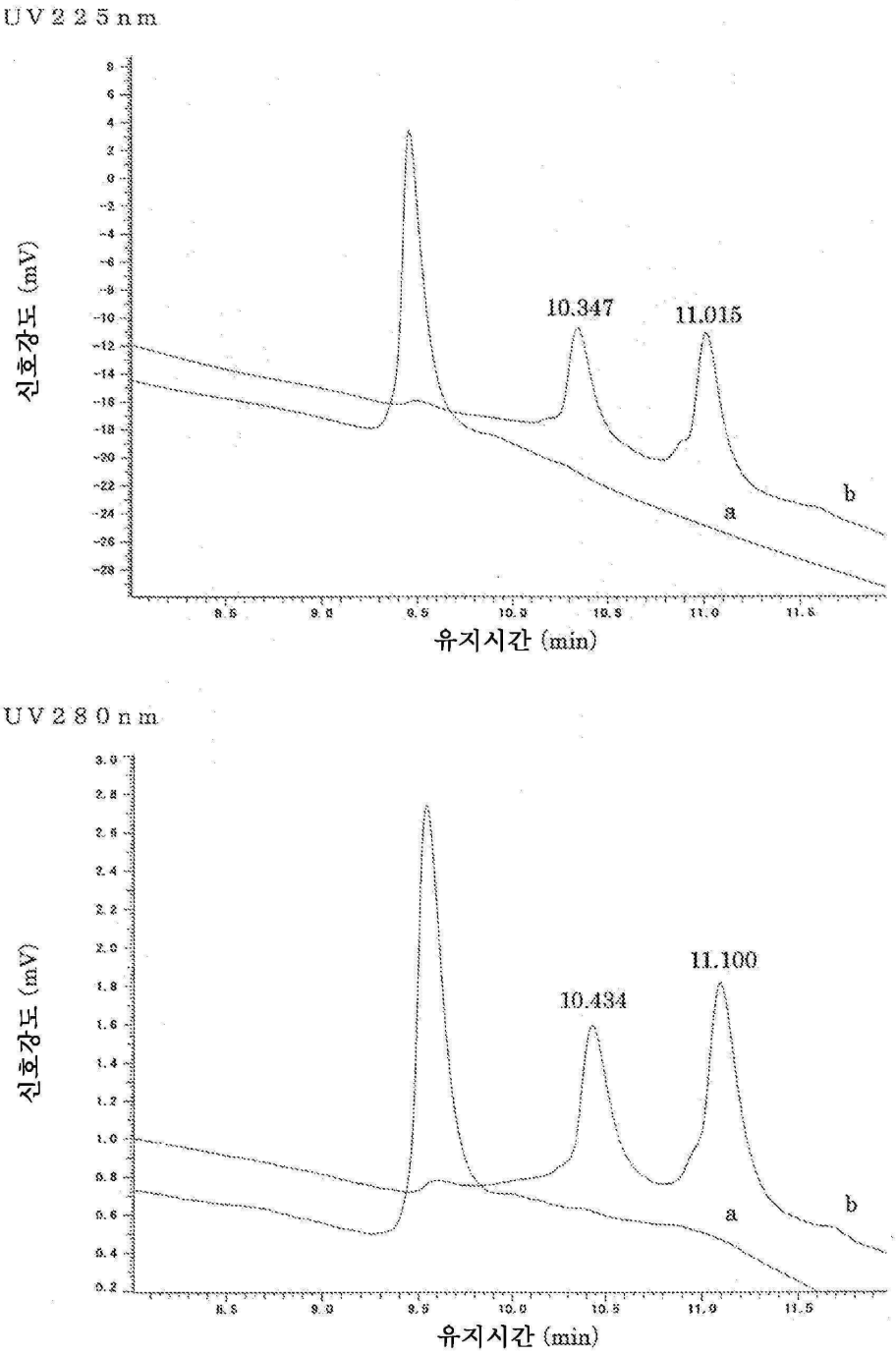
UV280nm



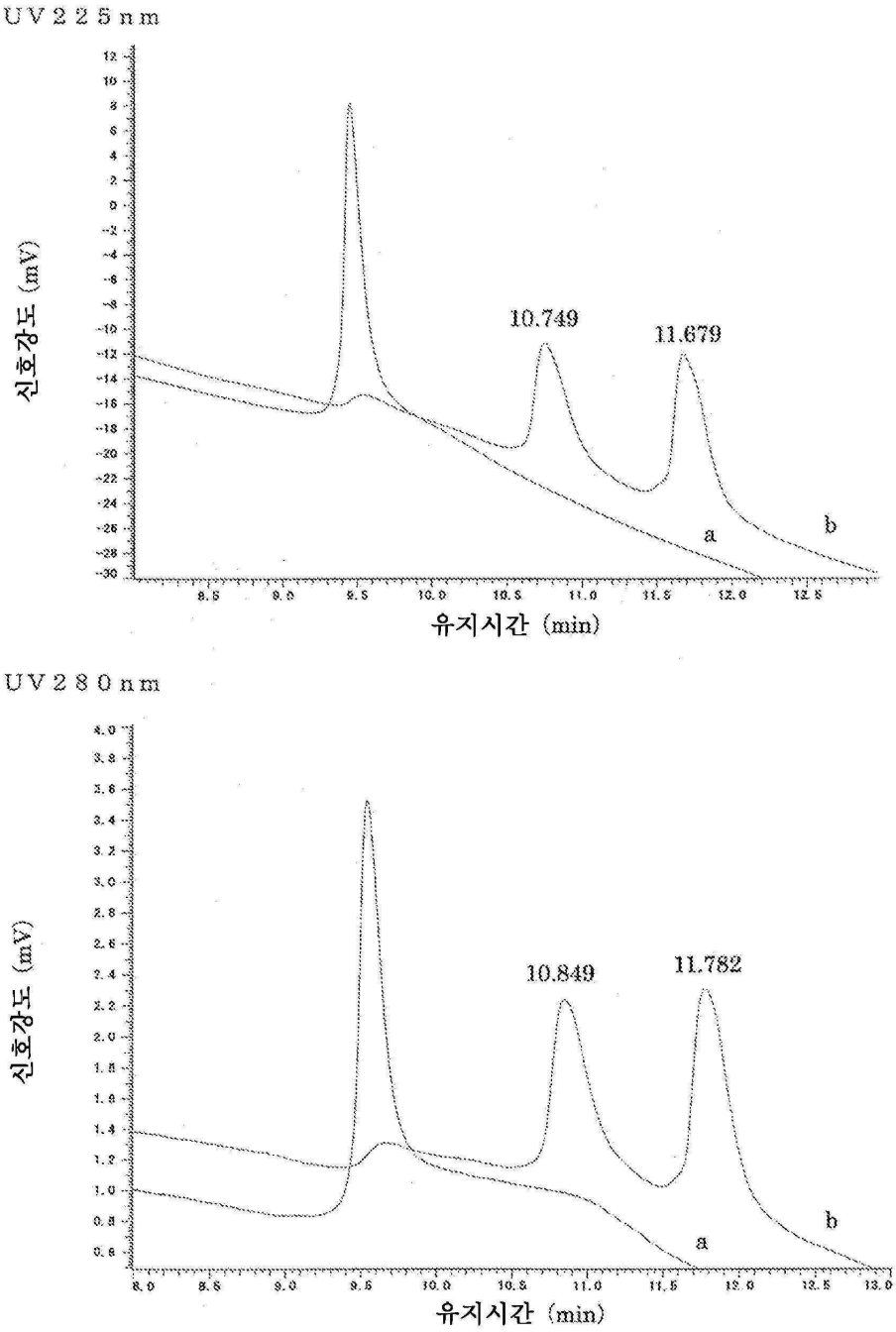
도면33


UV225nm
신호강도 (mV)
11.193
11.198
b
a
유지시간 (min)
UV280nm
신호강도 (mV)
11.257
12.057
b
a
유지시간 (min)

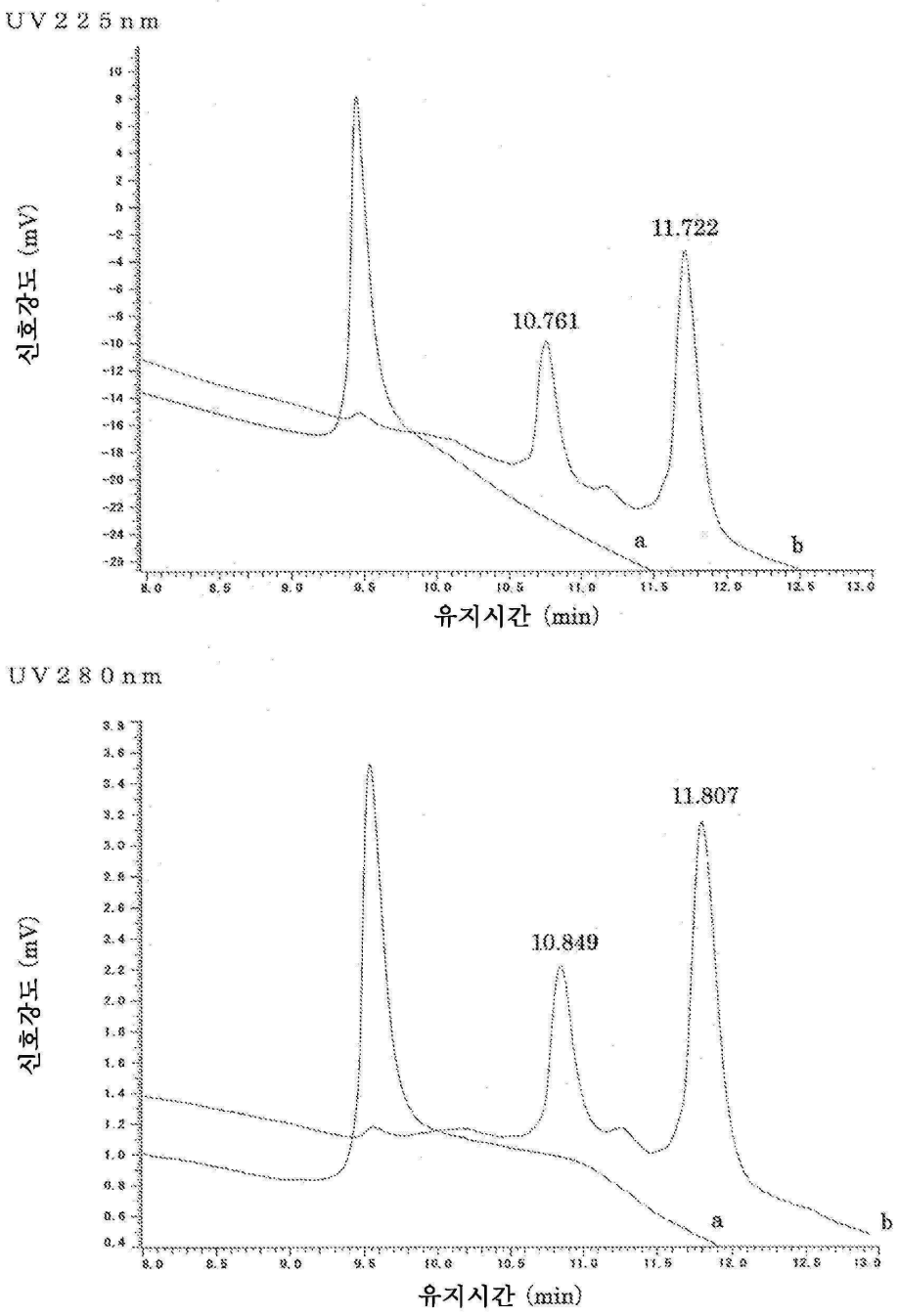
도면34


UV225nm
신호강도 (mV)
10.347
11.015
a
b
유지시간 (min)
UV280nm
신호강도 (mV)
10.434
11.100
a
b
유지시간 (min)

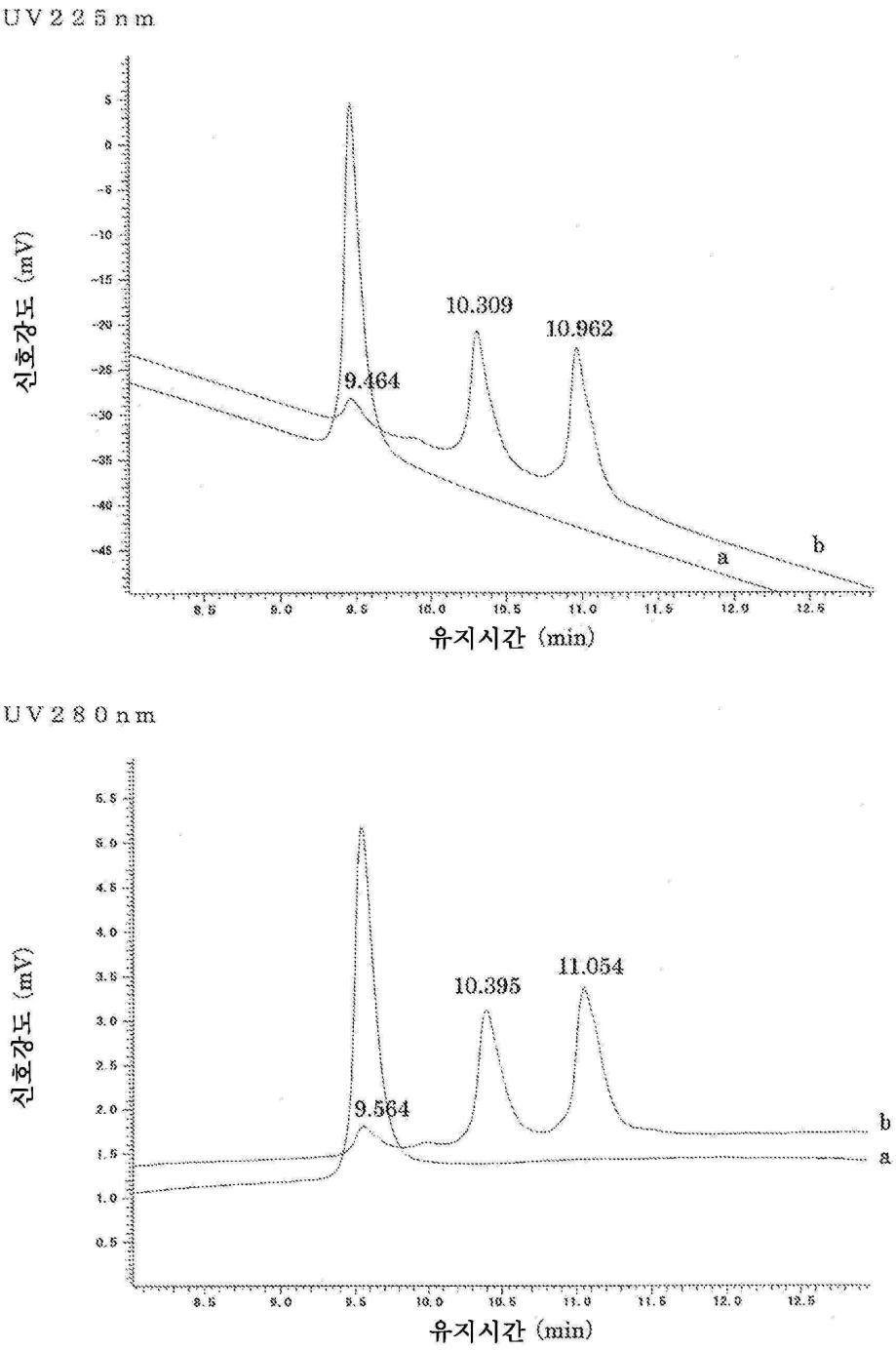
도면35


UV225nm
신호강도 (mV)
10.749
11.679
a
b
유지시간 (min)
UV280nm
신호강도 (mV)
10.849
11.782
a
b
유지시간 (min)

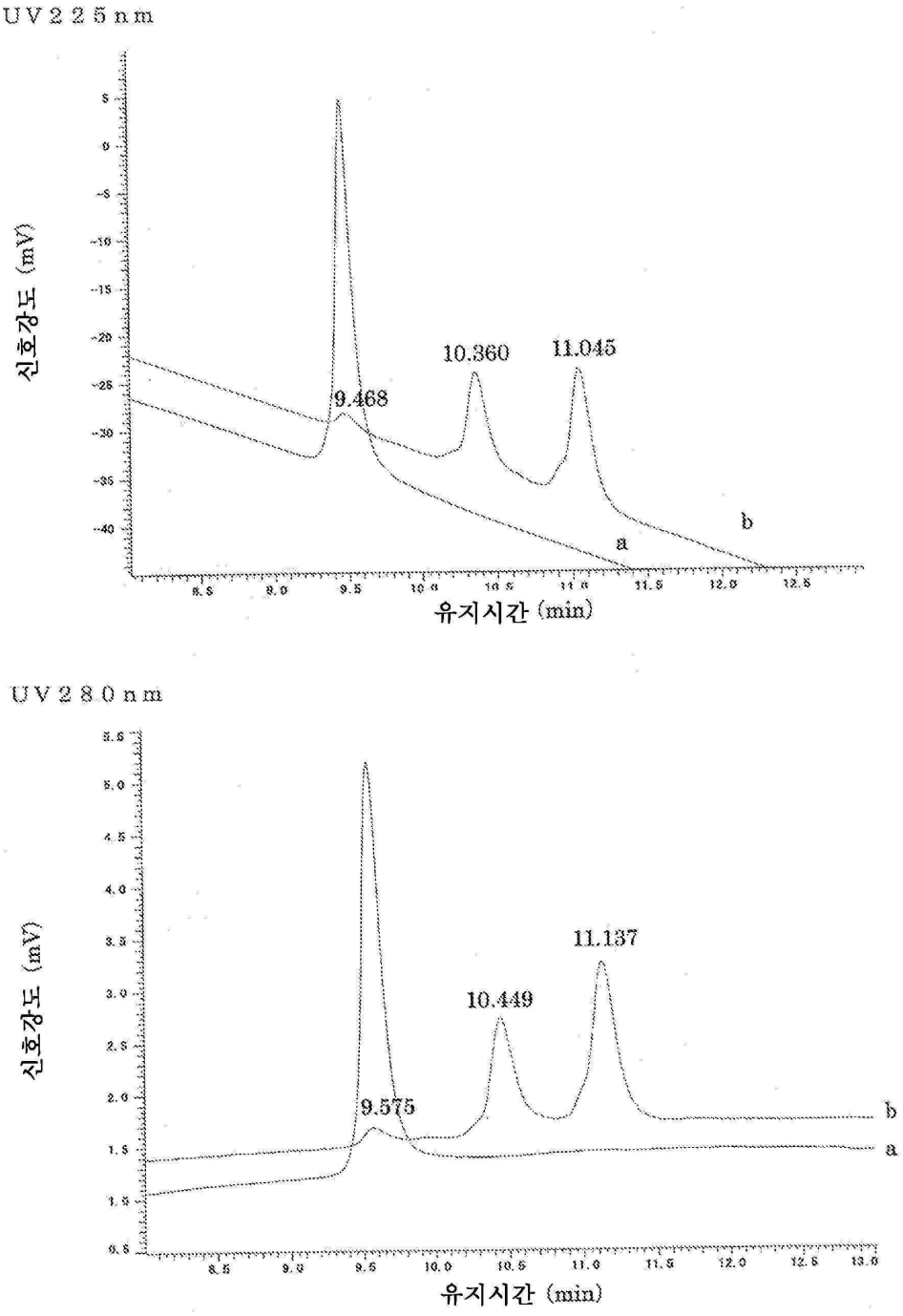
도면36


UV225nm
신호강도 (mV)
11.722
10.761
a
b
유지시간 (min)
UV280nm
신호강도 (mV)
11.807
10.849
a
b
유지시간 (min)

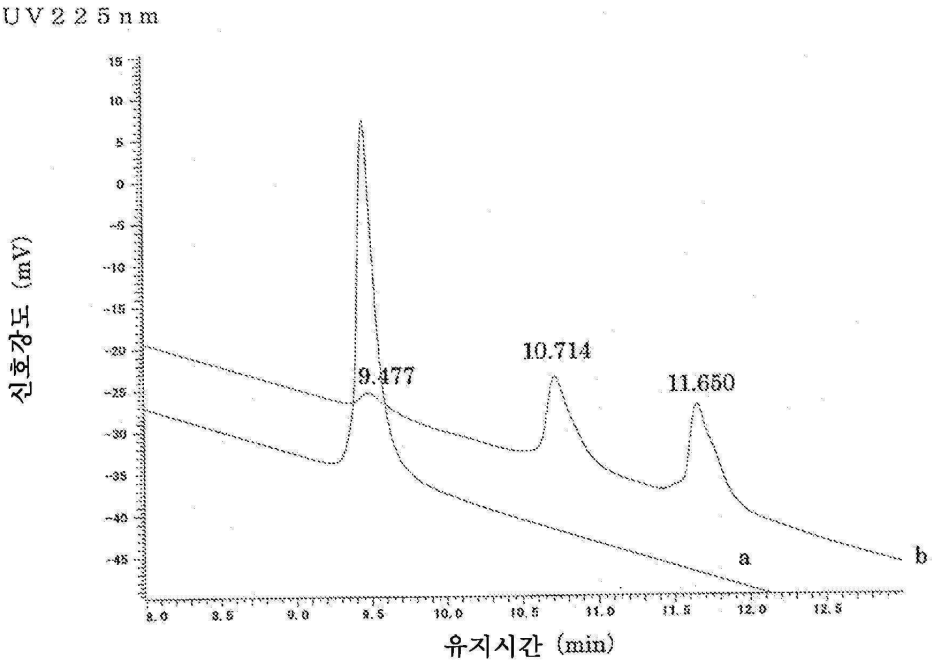
도면37

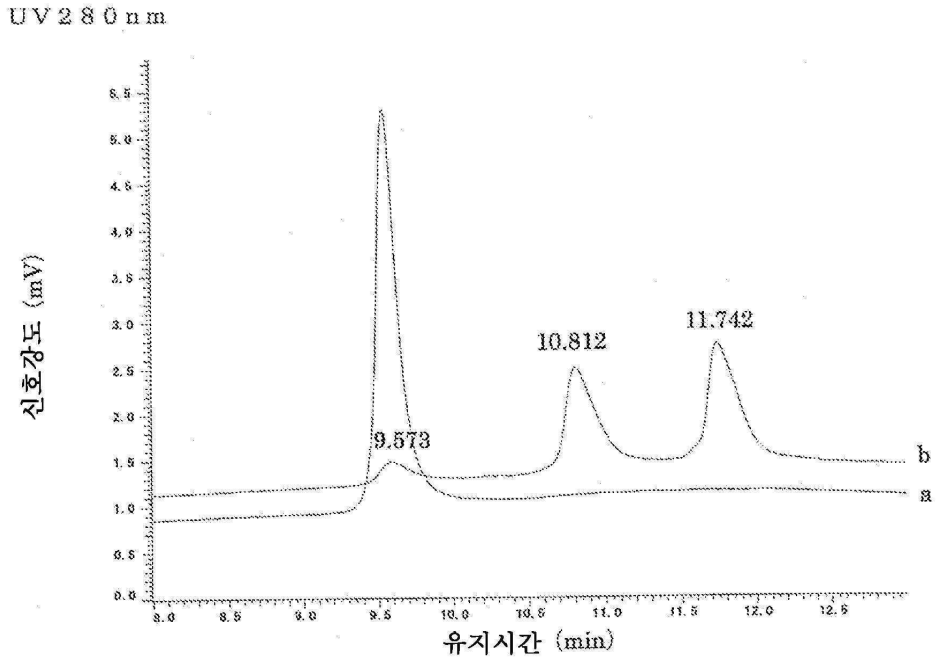

UV225nm
신호강도 (mV)
10.309
10.962
9.464
a
b
유지시간 (min)
UV280nm
신호강도 (mV)
10.395
11.054
9.564
b
a
유지시간 (min)

도면38


UV225nm
신호강도 (mV)
9.468
10.360
11.045
a
b
유지시간 (min)
UV280nm
신호강도 (mV)
9.575
10.449
11.137
a
b
유지시간 (min)

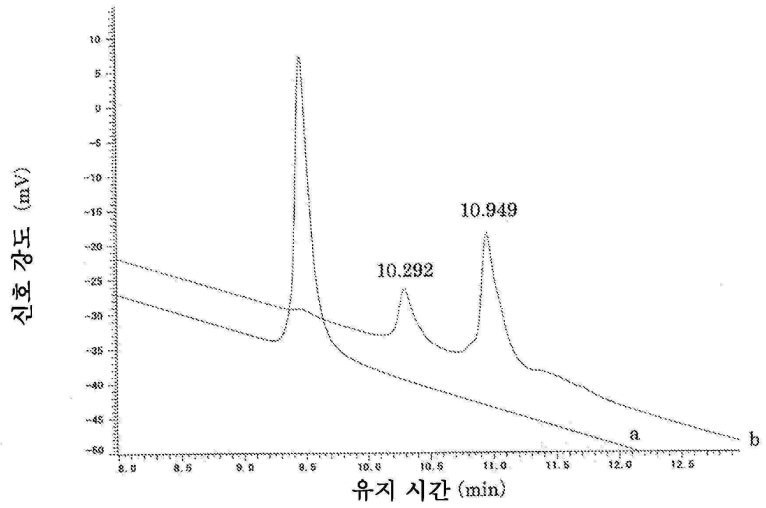
도면39


UV225nm
신호강도 (mV)
9.477
10.714
11.650
a
b
유지시간 (min)

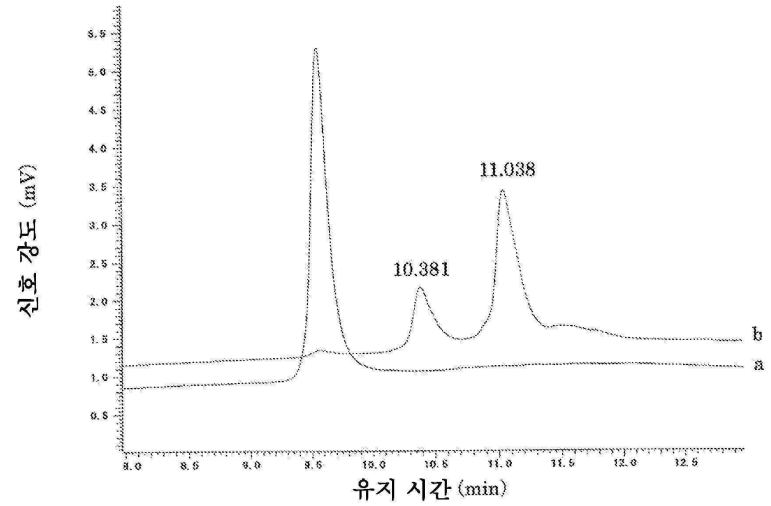

UV280nm
신호강도 (mV)
9.573
10.812
11.742
b
a
유지시간 (min)

도면40

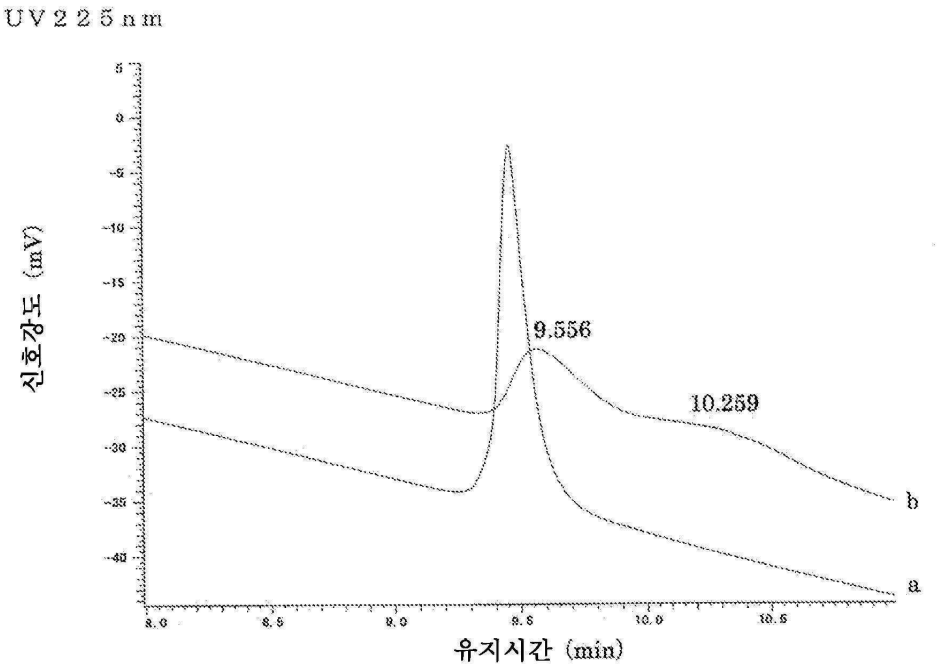
UV225nm

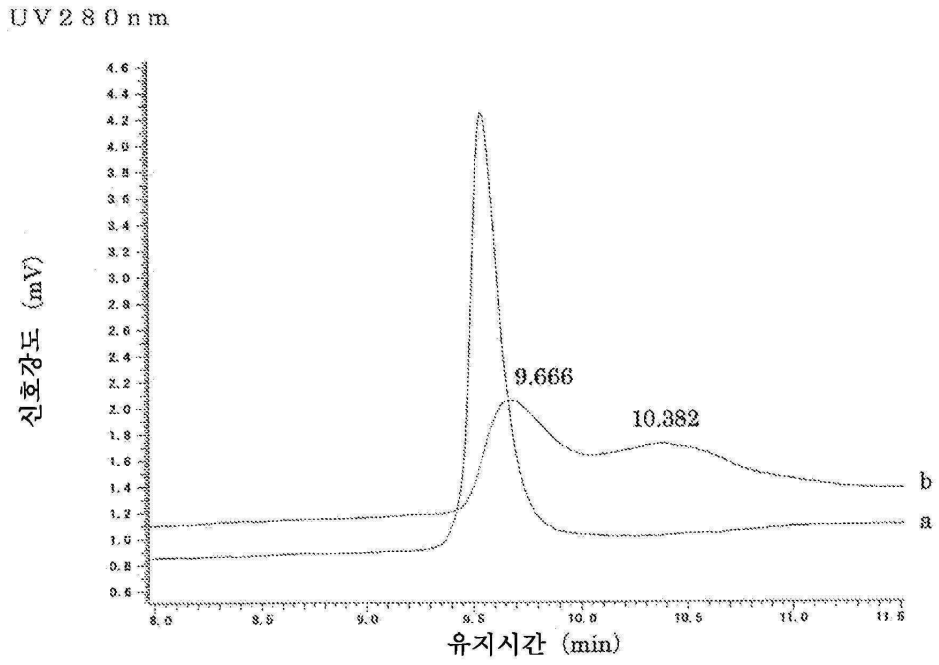


UV280nm

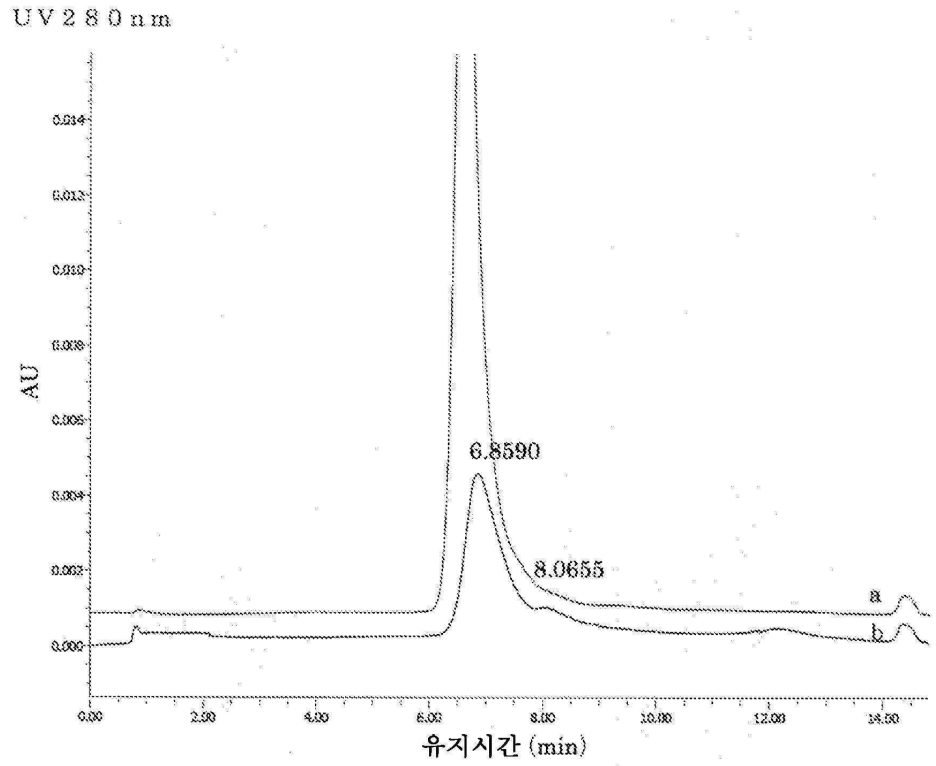


도면41

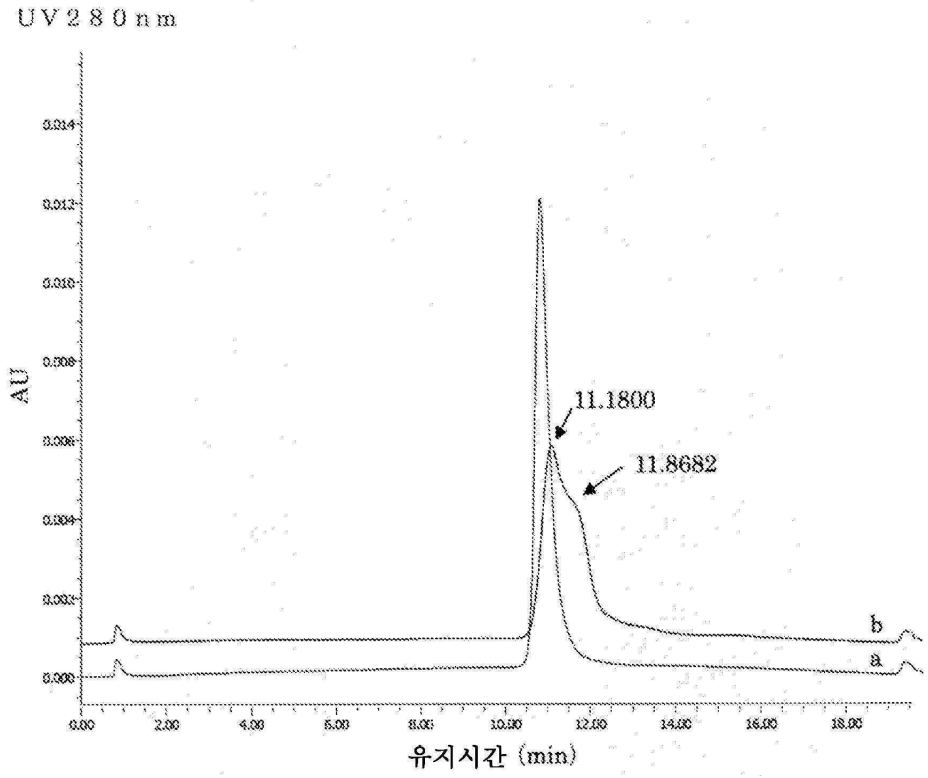

UV225nm
신호강도 (mV)
9.556
10.259
b
a
유지시간 (min)


UV280nm
신호강도 (mV)
9.666
10.382
b
a
유지시간 (min)

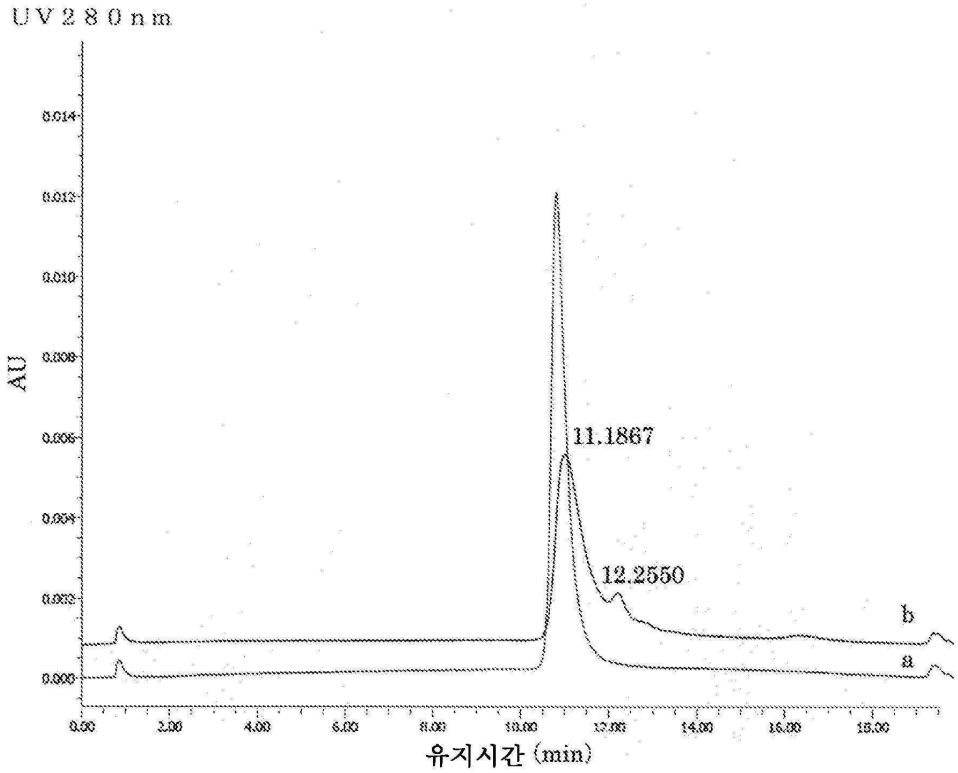
도면42


UV 280 nm
AU
6.8590
8.0655
a
b
유지시간 (min)

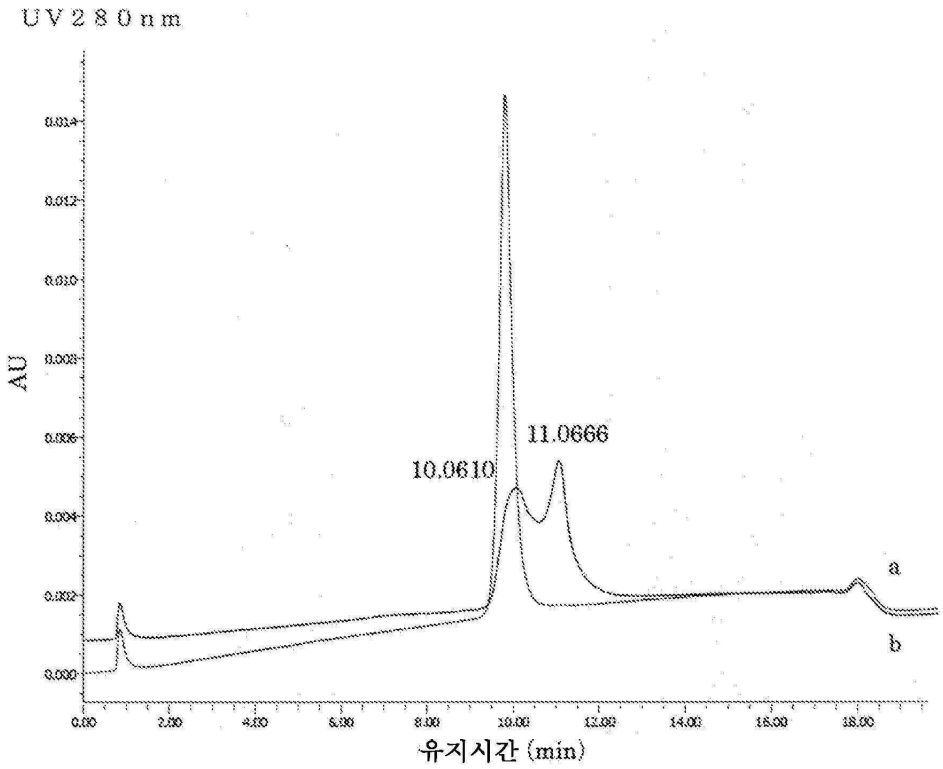
도면43


UV 280 nm
AU
11.1800
11.8682
b
a
유지시간 (min)

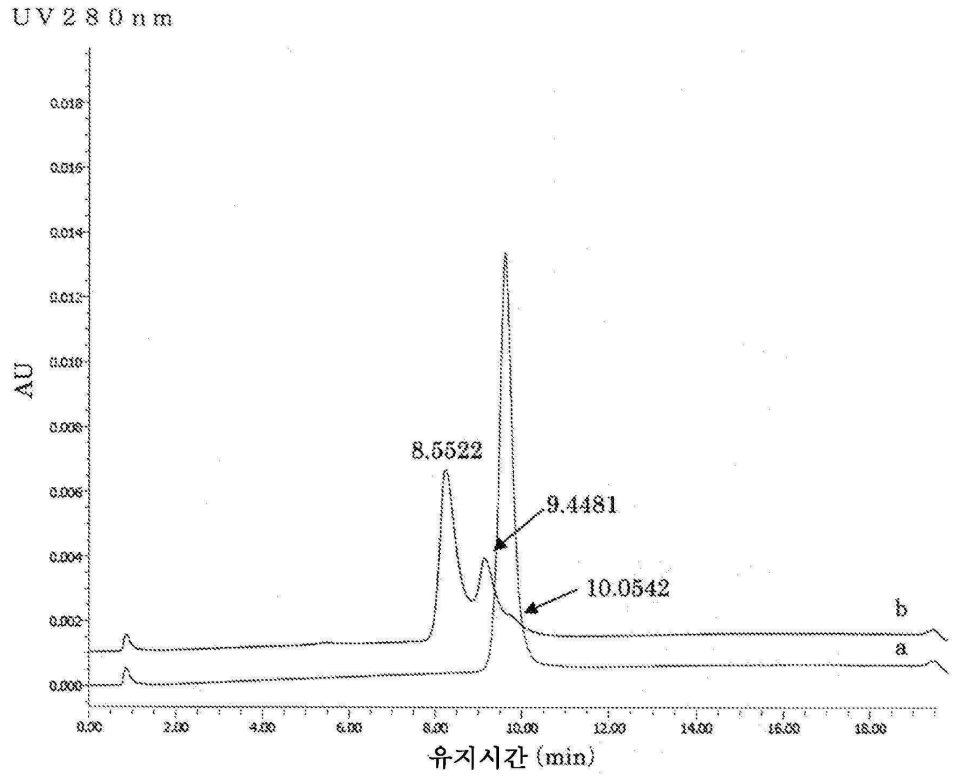
도면44


UV 280 nm
AU
11.1867
12.2550
b
a
유지시간 (min)

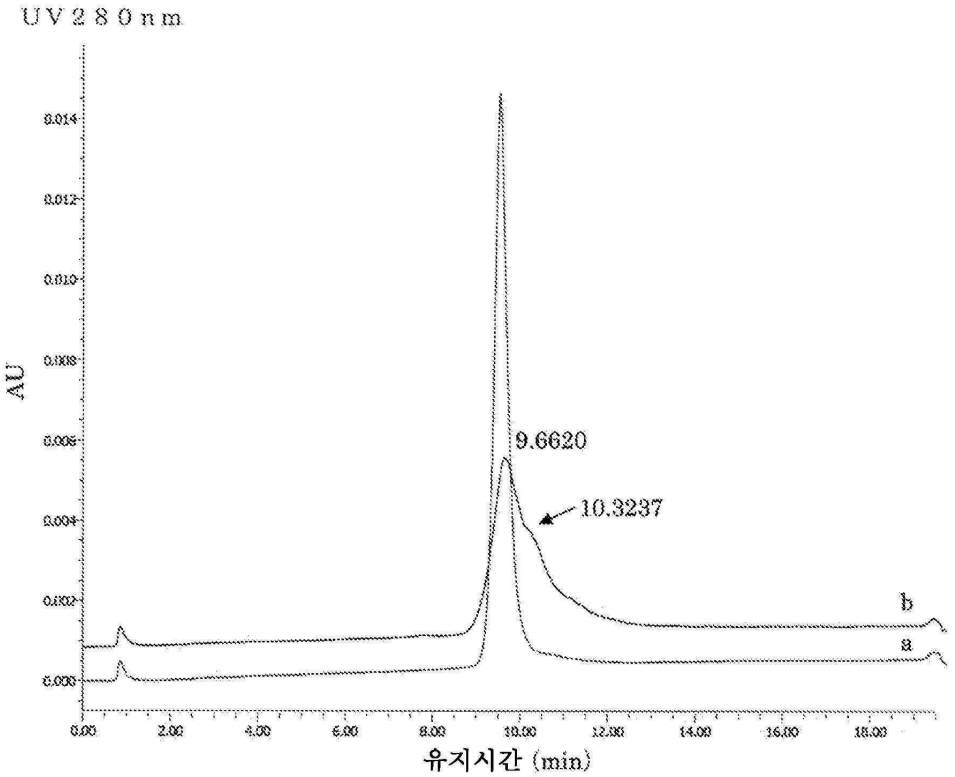
도면45


UV 280 nm
AU
10.0610
11.0666
a
b
유지시간 (min)

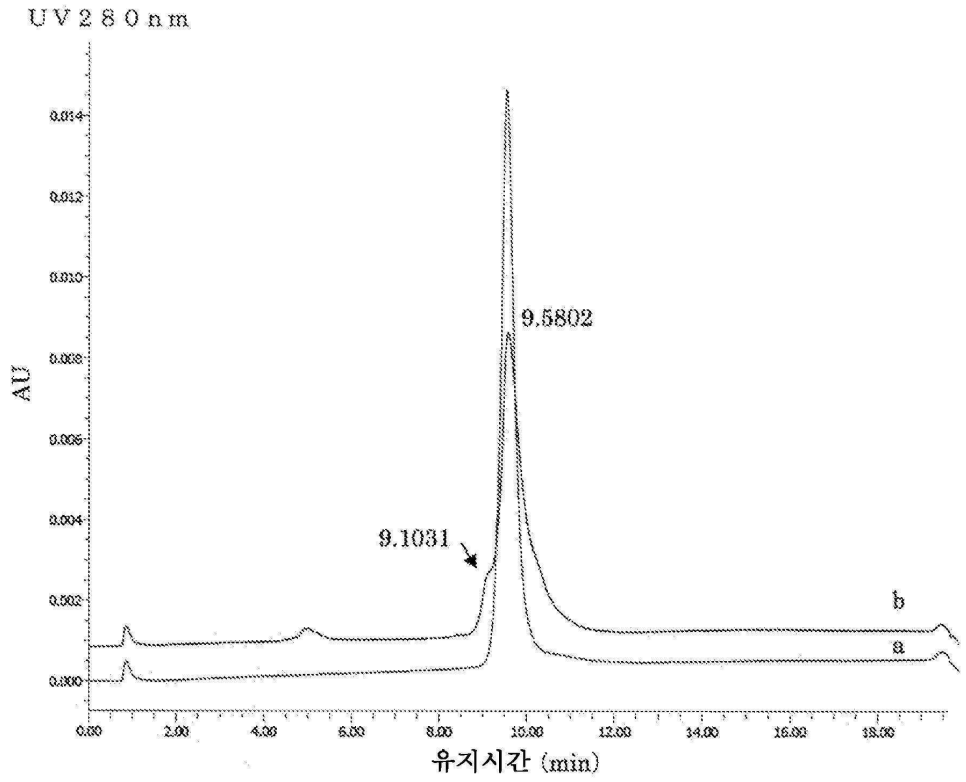
도면46


UV 280nm
AU
8.5522
9.4481
10.0542
b
a
유지시간 (min)

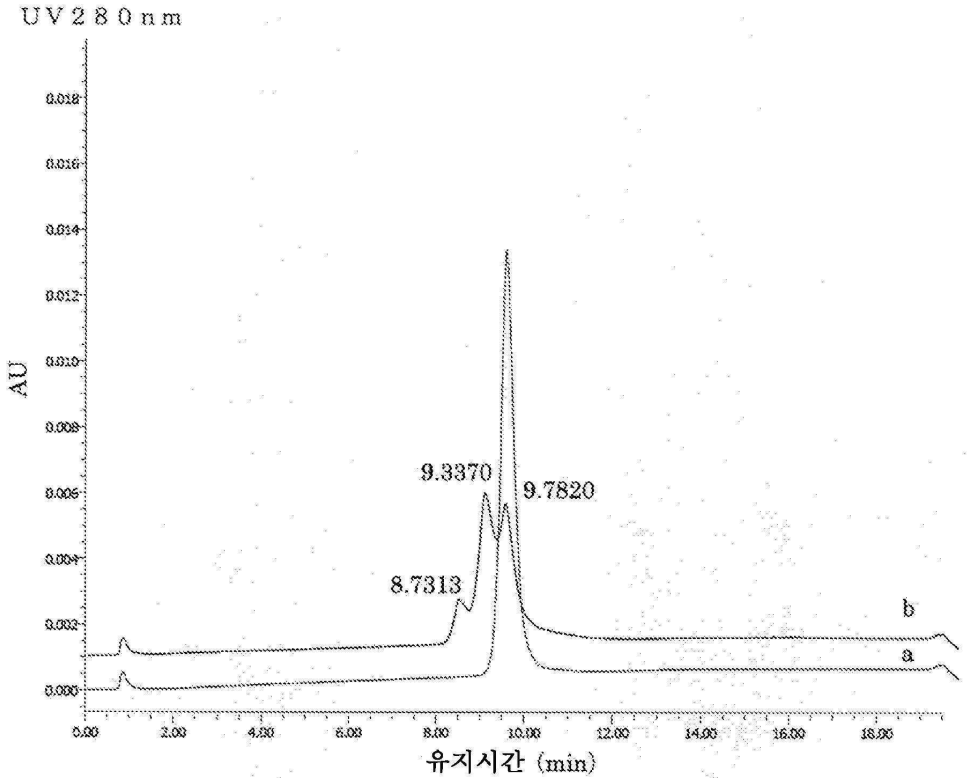
도면47


UV 280nm
AU
9.6620
10.3237
b
a
유지시간 (min)

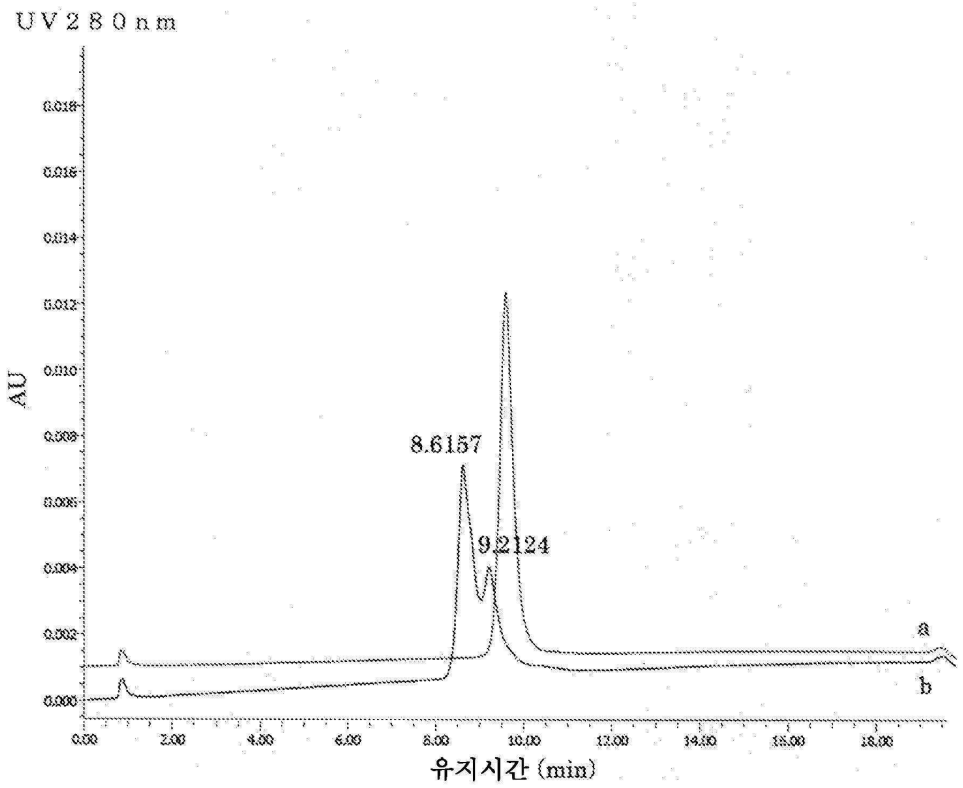
도면48


UV280nm
AU
9.5802
9.1031
b
a
유지시간 (min)

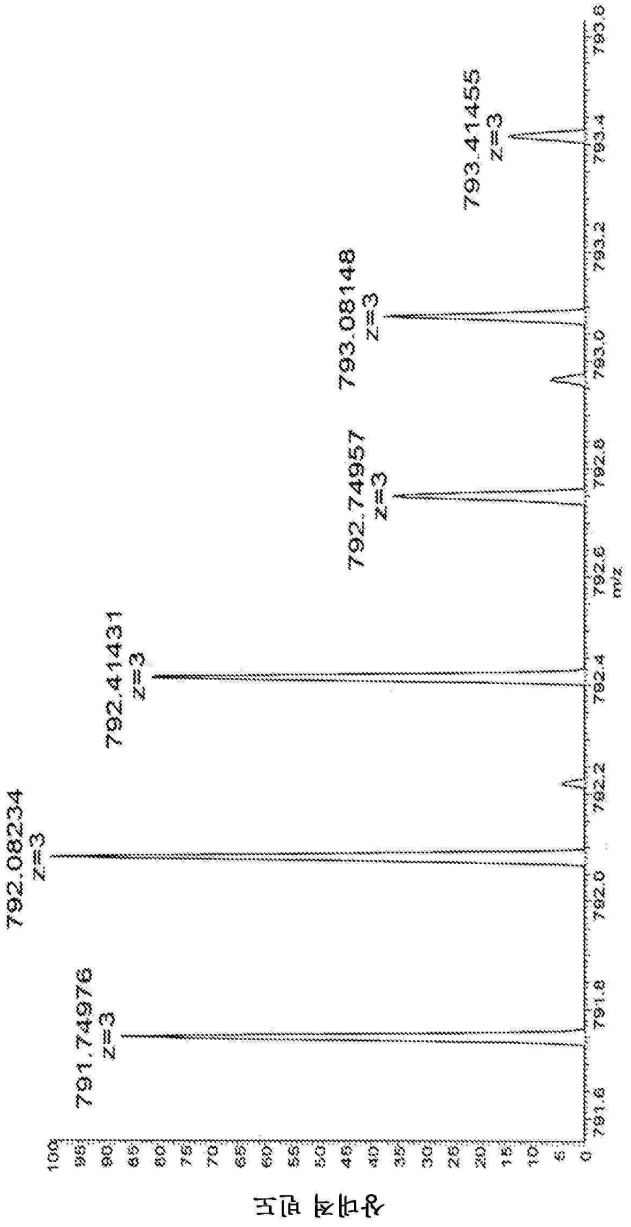
도면49


UV280nm
AU
9.3370
9.7820
8.7313
b
a
유지시간 (min)

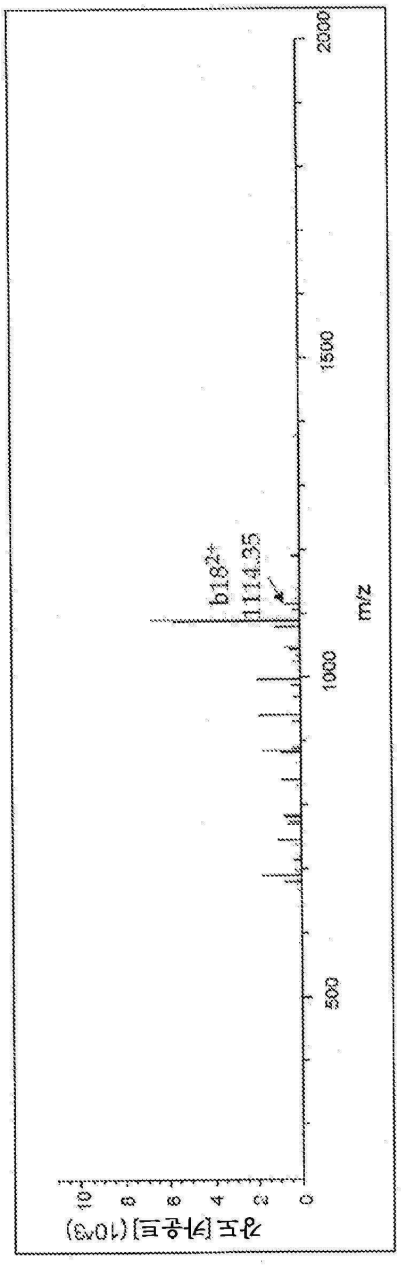
도면50



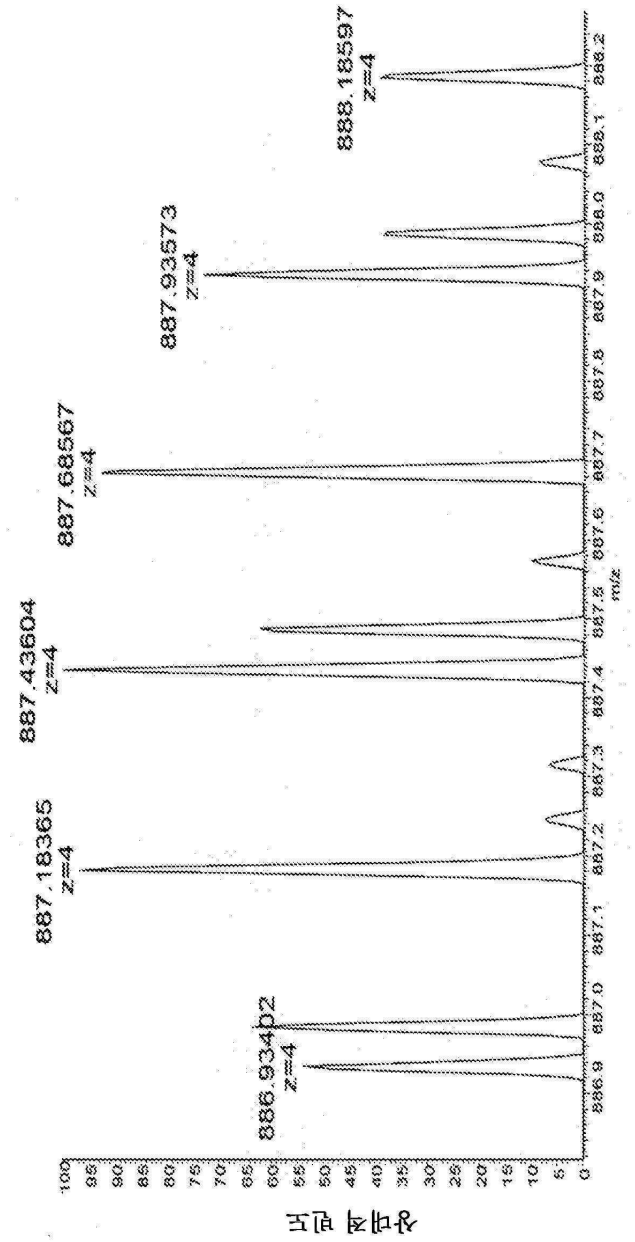
도면51


상대적 빈도
m/z
791.74976
z=3
792.08234
z=3
792.41431
z=3
792.74957
z=3
793.08148
z=3
793.41455
z=3

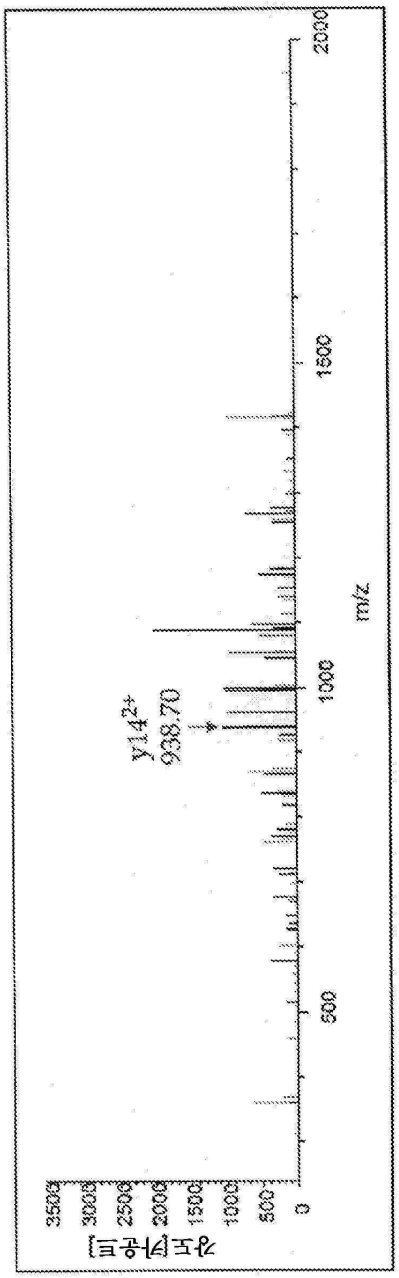
도면52



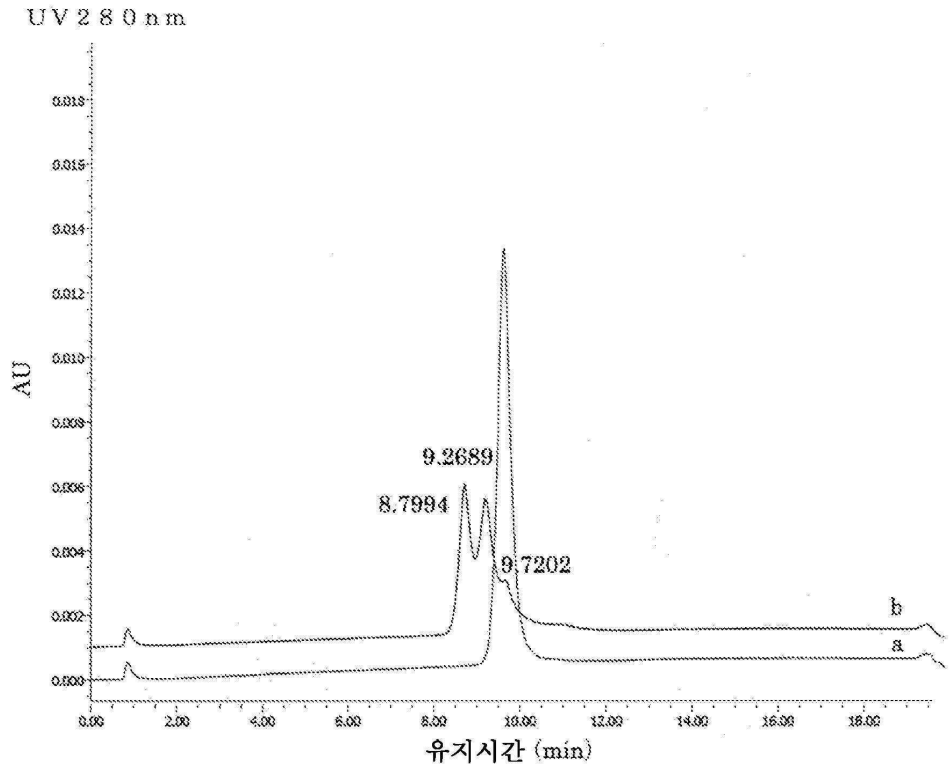
도면53


상대적 빈도
m/z
886.93402
z=4
887.18365
z=4
887.43604
z=4
887.68567
z=4
887.93573
z=4
888.18597
z=4

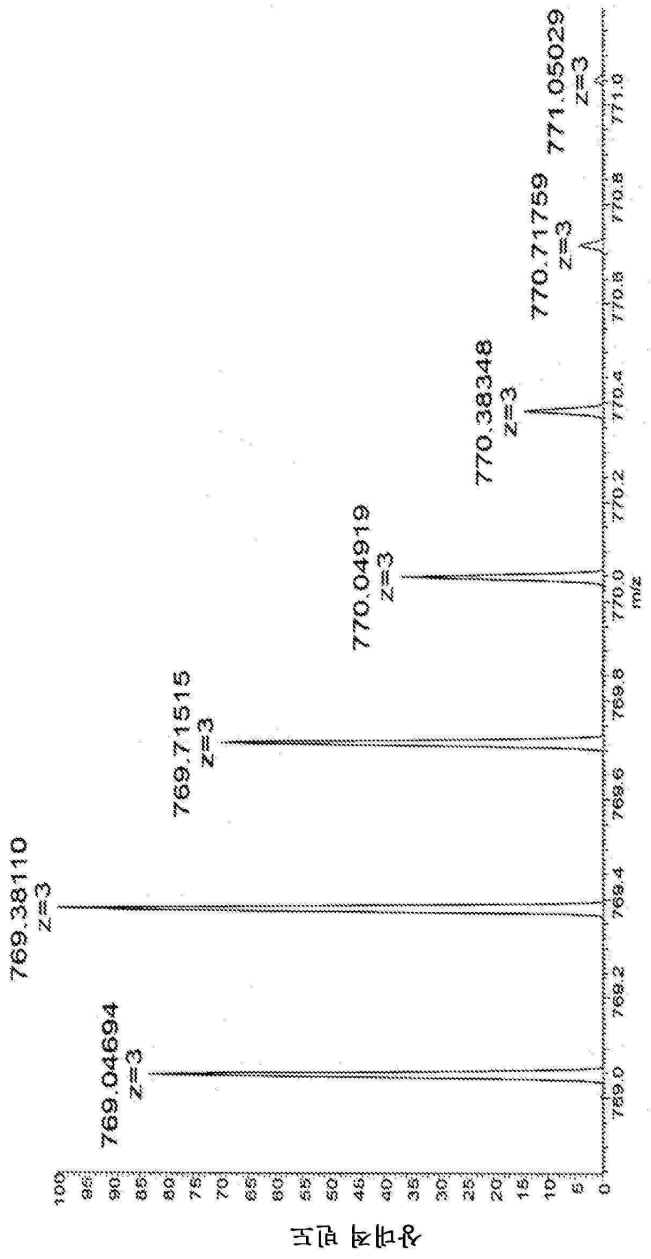
도면54


상도[카운트]
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
500
1000
1500
2000
m/z
y14 2+
938.70

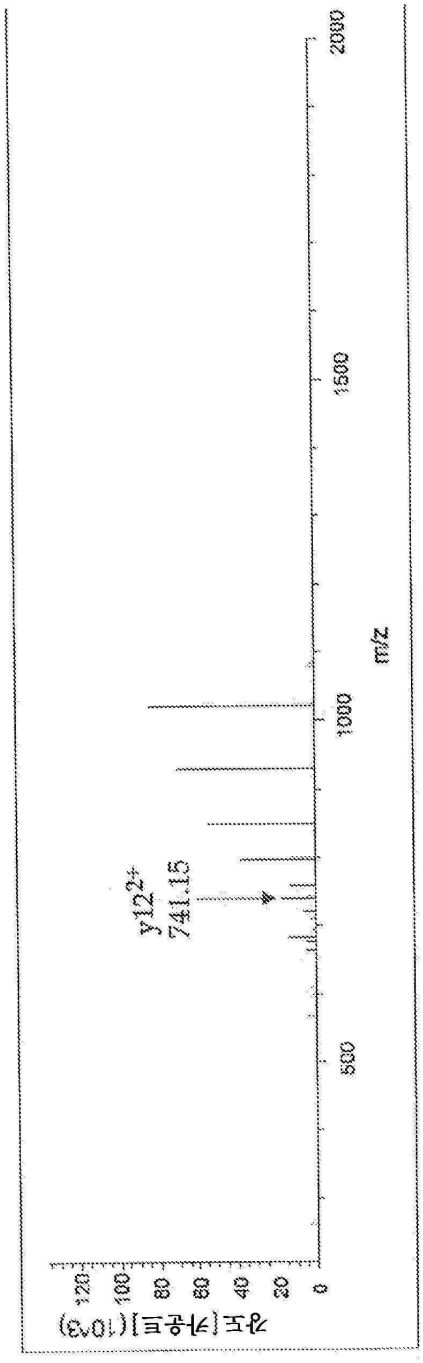
도면55



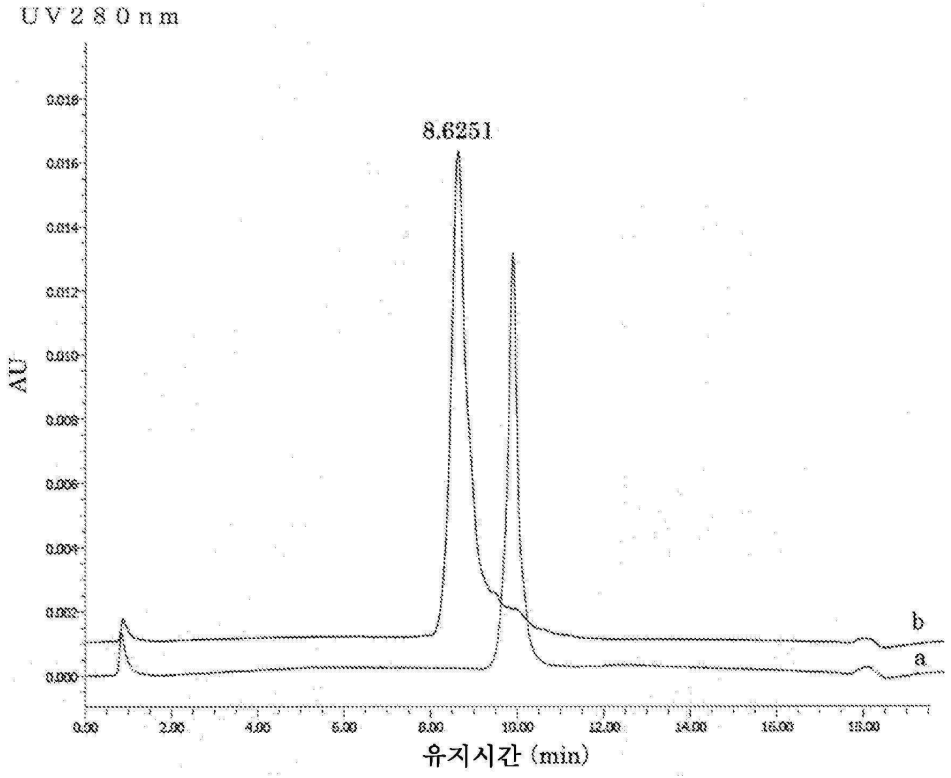
도면56


상대적 빈도
769.38110
z=3
769.04694
z=3
769.71515
z=3
770.04919
z=3
770.38348
z=3
770.71759
z=3
771.05029
z=3
m/z

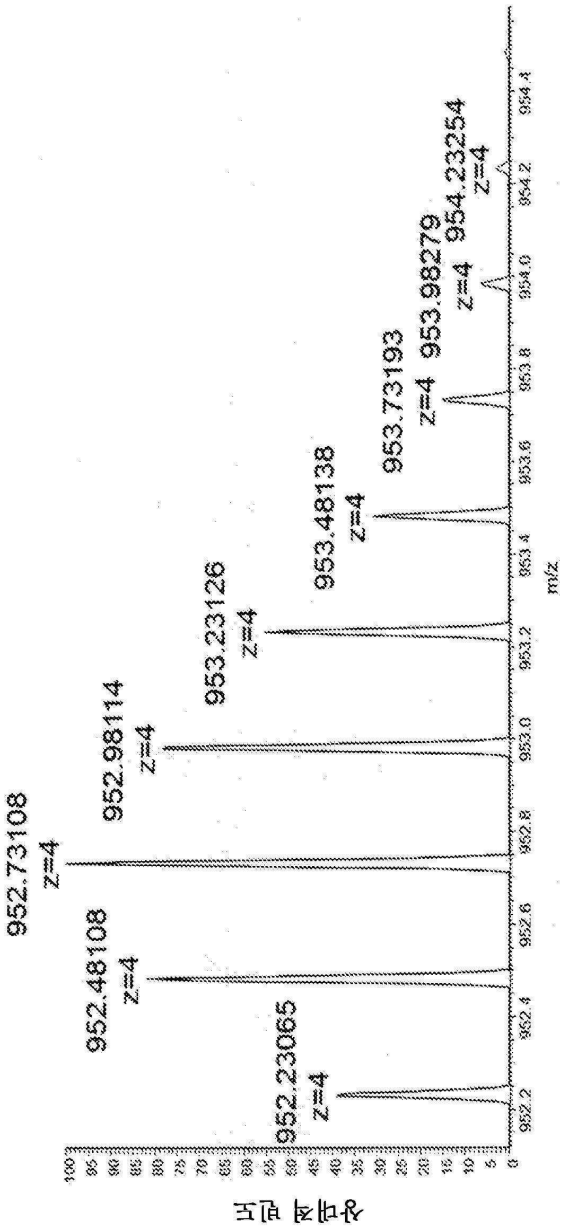
도면57



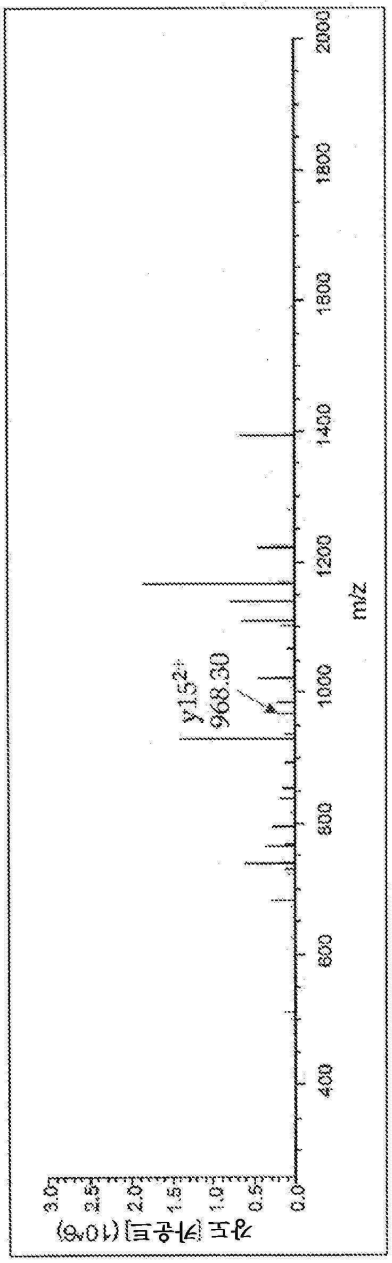
도면58



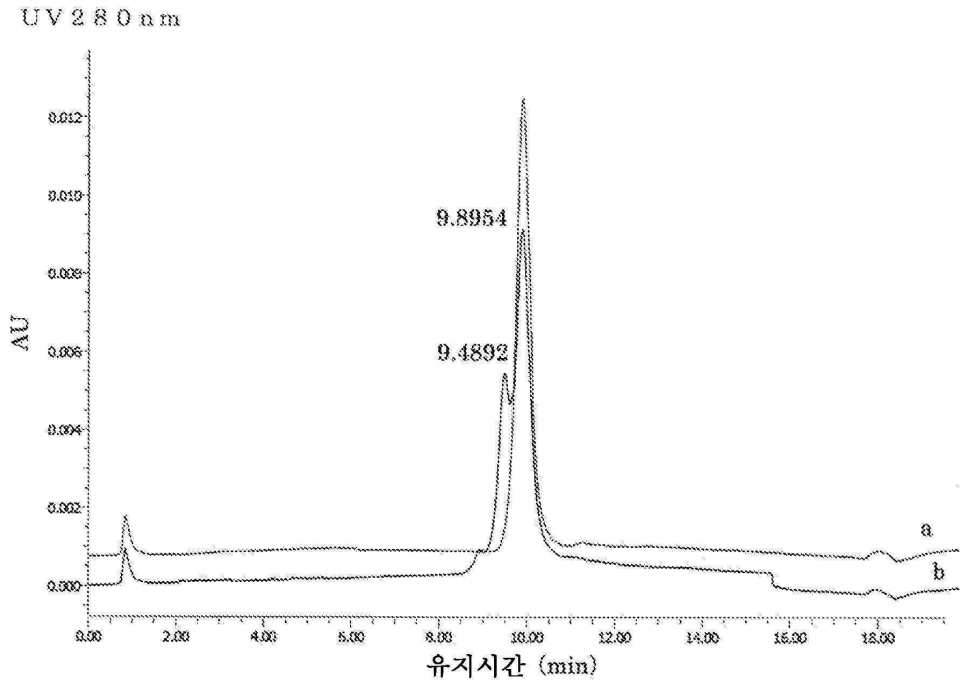
도면59


상대적 빈도
952.73108
z=4
952.48108
z=4
952.23065
z=4
952.98114
z=4
953.23126
z=4
953.48138
z=4
953.73193
z=4
953.98279
z=4
954.23254
z=4
m/z

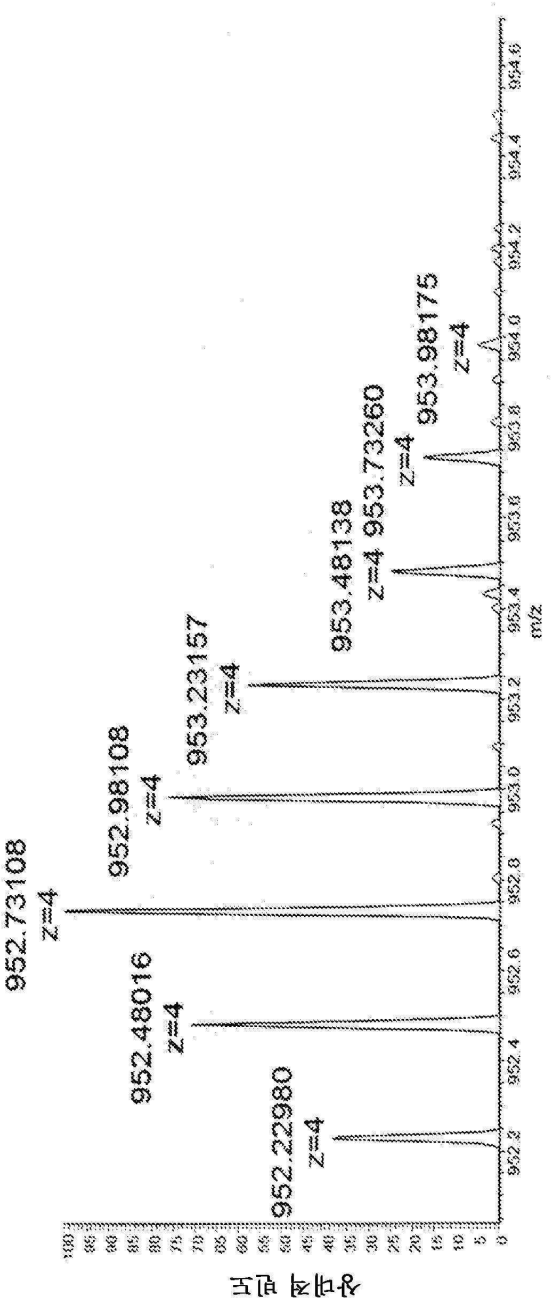
도면60


강도 [카운트] (10^6)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
m/z
y15^2+
968.30

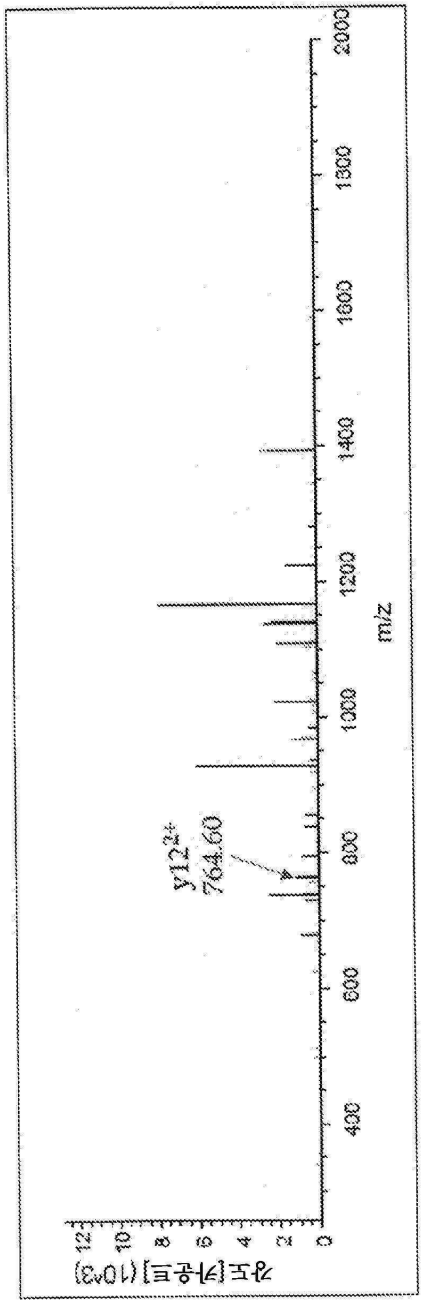
도면61


UV280nm
AU
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
9.8954
9.4892
a
b
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
유지시간 (min)

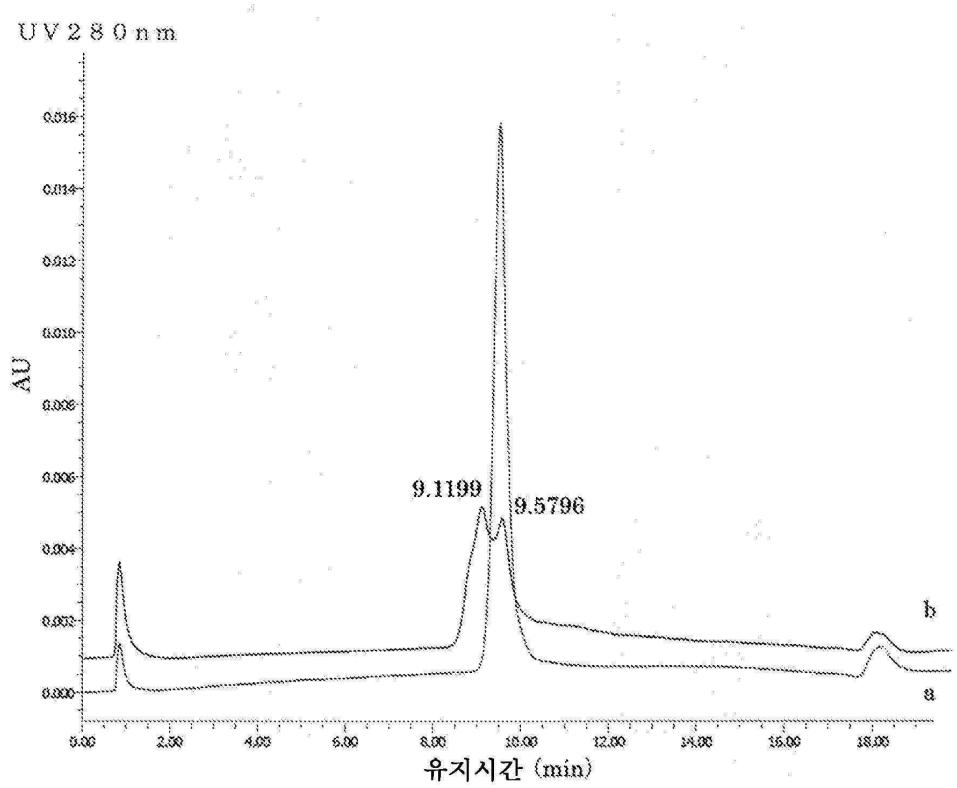
도면62


952.22980
z=4
952.48016
z=4
952.73108
z=4
952.98108
z=4
953.23157
z=4
953.48138
z=4
953.73260
z=4
953.98175
z=4
m/z

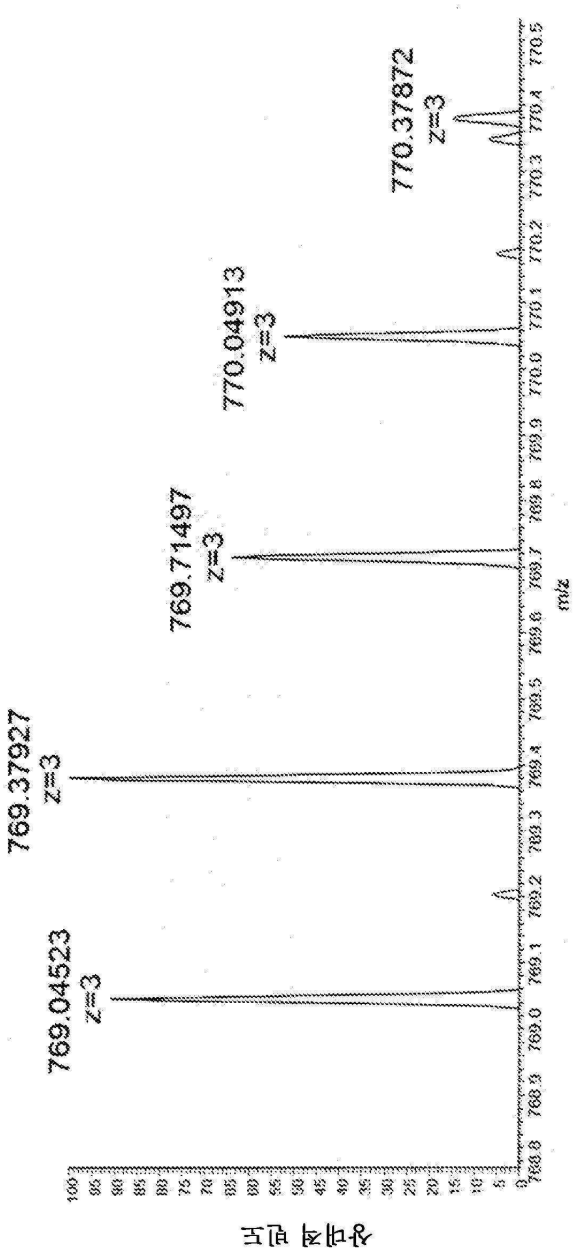
도면63


강도[카운트] (10^3)
12
10
8
6
4
2
0
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
m/z
y12^2+
764.60

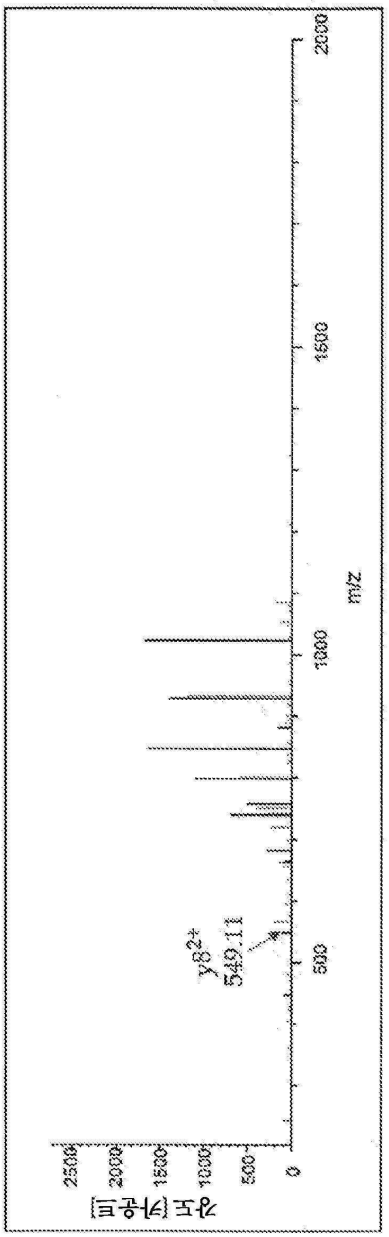
도면64



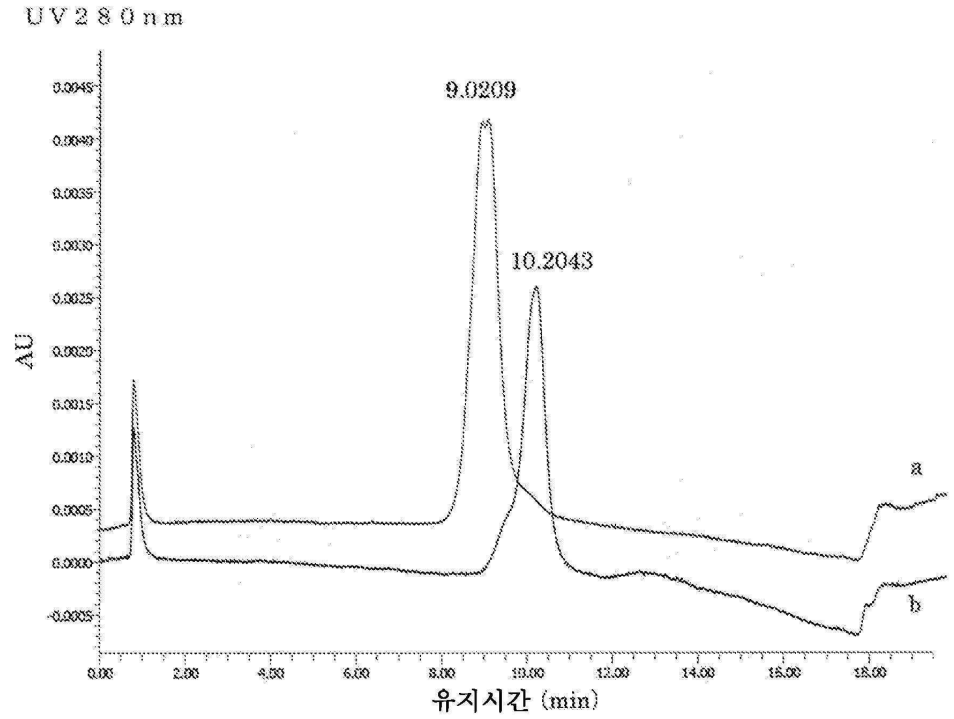
도면65


769.04523
z=3
769.37927
z=3
769.71497
z=3
770.04913
z=3
770.37872
z=3
m/z
상대적 빈도

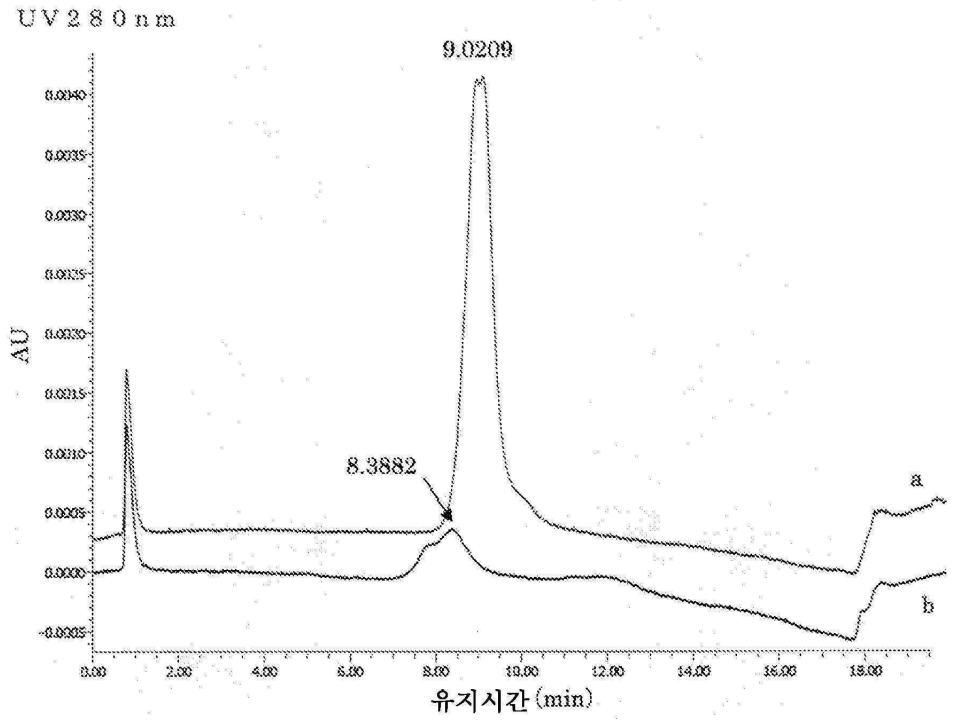
도면66


강도 [카운트]
2500
2000
1500
1000
500
0
500
1000
1500
2000
m/z
y8 2+
549.11

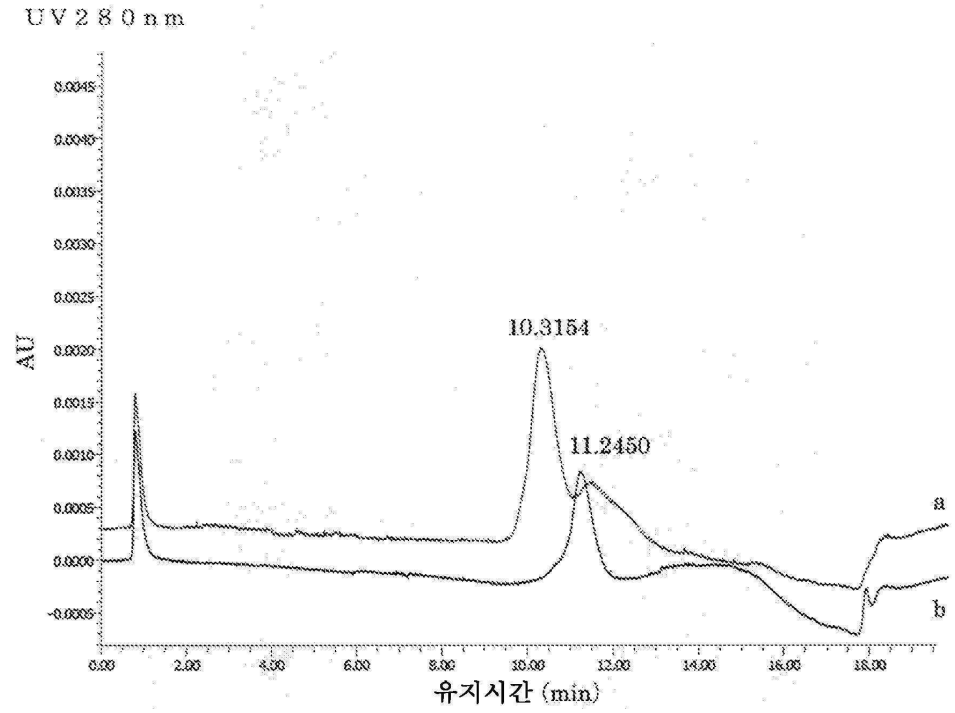
도면67


UV280nm
9.0209
10.2043
AU
a
b
유지시간 (min)

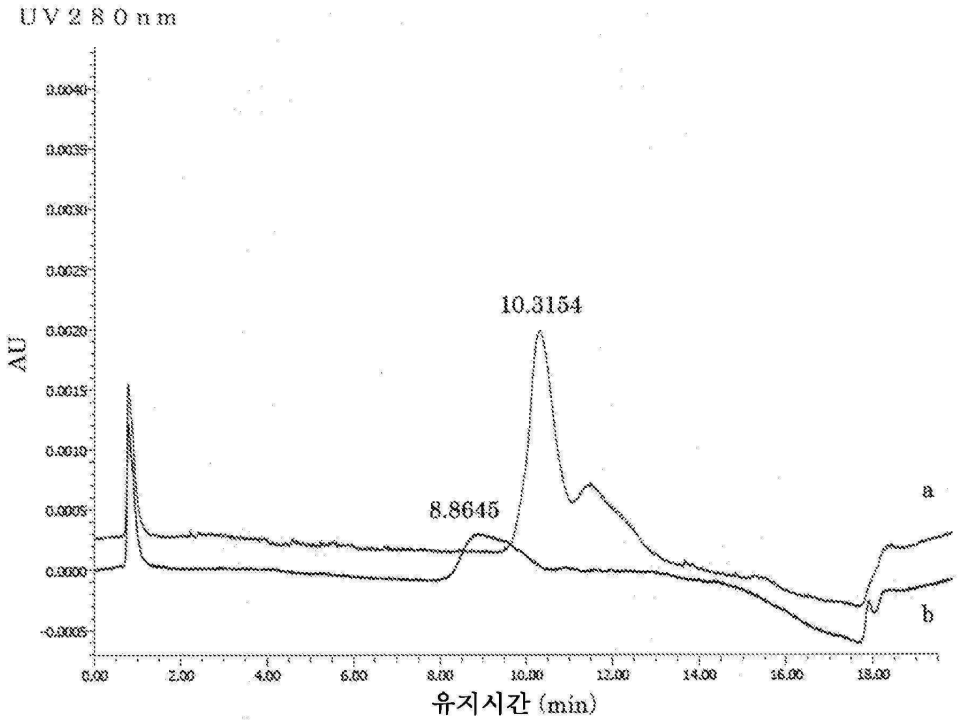
도면68


UV280nm
9.0209
8.3882
AU
a
b
유지시간 (min)

도면69



도면70



서 열 목 록

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Compounds and salts thereof comprising an affinity substance to a soluble protein, a clevable moiety, and a reactive group

<130> PAMA-19181

<150> JP2017-090679

<151> 2017-04-28

<160> 105

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc region of human IgG1

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(19)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (140)..(140)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (142)..(142)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (177)..(177)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 1

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

1 5 10 15

Glu Xaa Xaa Gly Xaa Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asp Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Xaa Glu Xaa Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

Xaa Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
225 230

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of Trastuzumab (humanized IgG1 monoclonal antibody)

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asp Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 3

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc region of human IgG1 antibody

<400> 3

Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys

1 5 10 15

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu

20 25 30

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

35 40 45

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

50 55 60

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

65 70 75 80

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asp Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

85 90 95

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

100 105 110

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

115 120 125

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

130 135 140

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

145 150 155 160

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

165 170 175

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Ala Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

180 185 190

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

195 200 205

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

210 215 220

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230 235

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of Trastuzumab (humanized IgG1 monoclonal antibody)

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment of Trastuzumab

<400> 5

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

20 25

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment of Trastuzumab

<400> 6

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

1 5 10 15

<210> 7

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment of Fc region of human IgG1 antibody

<400> 7

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro

1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

20 25

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide fragment of Fc region of human IgG1 antibody

<400> 8

Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Lys Asp Thr

1 5 10 15

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

20

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to CH2 region of human IgG

<400> 9

Glu Pro Ile His Arg Ser Thr Leu Thr Ala Leu Leu

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<400> 10

Phe Ala Arg Leu Val Ser Ser Ile Arg Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<400> 11

Phe Gly Arg Leu Val Ser Ser Ile Arg Tyr

1 5 10

<210

> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<400> 12

Thr Trp Lys Thr Ser Arg Ile Ser Ile Phe

1 5 10

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to specific region of human IgG

<400> 13

Gln Ser Tyr Pro

1

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<400> 14

His Trp Arg Gly Trp Val

1 5

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<400> 15

His Tyr Phe Lys Phe Asp

1 5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<400> 16

His Phe Arg Arg His Leu

1 5

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<400> 17

Asp Ala Ala Gly

1

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<400> 18

Asn Ala Arg Lys Phe Tyr Lys Gly

1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<400> 19

Asn Lys Phe Arg Gly Lys Tyr Lys

1 5

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 20

Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 21

Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe

1 5 10 15

His

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 22

Arg Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Ser

1 5 10

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 23

Gly Pro Arg Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Ser Phe

1 5 10 15

His

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 24

Ser Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe

1 5 10 15

His

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 25

Gly Asp Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe
1 5 10 15
His

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 26

Gly Pro Ser Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe
1 5 10 15

His

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 27

Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Ser Phe

1 5 10 15

His

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 28

Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr His

1 5 10 15

His

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 29

Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe

1 5 10 15

Tyr

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 30

Ser Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe

1 5 10 15

Tyr

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 31

Ser Asp Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Phe

1 5 10 15

Tyr

<210> 32

<211> 17

<212>

PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 32

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr
1 5 10 15

His

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is homoserine

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is homoserine

<400> 33

Gly Xaa Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Xaa
1 5 10 15

His

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 34

Arg Arg Gly Pro Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys
1 5 10 15

Thr Phe His

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 35

Asp Cys Thr Tyr His Xaa Gly Asn Leu Val Trp Cys Thr
1 5 10

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 36

Asp Cys Ala Tyr His Xaa Gly Asn Leu Val Trp Cys Thr
1 5 10

<210> 37

<211> 13

<

212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic

acid, or diaminopropionic acid

<400> 37

Asp Cys Thr Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> IgG-binding peptide

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic

acid, or diaminopropionic acid

<400> 38

Asp Cys Ala Trp His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arginine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine

residues may be linked by disulfide bridge

<400> 39

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Lys Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr

1 5 10 15

His

<210> 40

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide fragment of Trastuzumab (humanized IgG1 monoclonal antibody)

<400> 40

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5 10 15
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
20 25 30
Arg

<210> 41

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of Trastuzumab (humanized IgG1 monoclonal antibody)

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arginine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 42

Arg Gly Asn Cys Lys Tyr His Arg Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr

1 5 10 15

His

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arginine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 43

Arg Gly Asn Cys Ala Trp His Arg Gly Lys Leu Val Trp Cys Thr Tyr

1 5 10 15

His

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arginine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 44

Arg Gly Asn Cys Lys Trp His Arg Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Tyr

1 5 10 15

His

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arginine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 45

Arg Gly Asn Cys Lys Trp His Arg Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr

1 5 10 15

His

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arginine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 46

Arg Gly Asn Cys Lys Tyr His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Tyr

1 5 10 15

His

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arginine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 47

Arg Gly Asn Cys Lys Tyr His Leu Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr

1 5 10 15

His

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aspartic acid residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 48

Asp Cys Lys Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aspartic acid residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 49

Asp Cys Lys Tyr His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aspartic acid residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 50

Asp Cys Lys Trp His Arg Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Aspartic acid residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 51

Asp Cys Lys Trp His Leu Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aspartic acid residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 52

Asp Cys Lys Tyr His Arg Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 53

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aspartic acid residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 53

Asp Cys Lys Tyr His Leu Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aspartic acid residue at N-terminus may be acetylated and two

cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 54

Asp Cys Lys Trp His Arg Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aspartic acid residue at N-terminus may be acetylated and two

cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 55

Asp Cys Lys Tyr His Arg Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arginine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine

residues may be linked by disulfide bridge

<400> 56

Arg Gly Asn Cys Ala Trp His Leu Gly Gln Leu Val Trp Cys Lys Tyr

1 5 10 15

His

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arginine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 57

Arg Gly Asn Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Lys Tyr
1 5 10 15
His

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arginine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 58

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Leu Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Lys
1 5 10 15
His

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arginine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 59

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Leu Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr
1 5 10 15
Lys

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Arginine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 60

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Arg Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Lys

1 5 10 15

His

<210> 61

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lysine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 61

Lys Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro

1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Asp

20 25 30

Asp Cys

<210> 62

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenylalanine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 62

Phe Asn Met Gln Cys Gln Lys Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro

1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Asp

20 25 30

Asp Cys

<210> 63

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenylalanine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 63

Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Lys His Asp Pro

1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Asp

20 25 30

Asp Cys

<210> 64

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenylalanine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 64

Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro

1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Lys Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Asp

20 25 30

Asp Cys

<210> 65

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenylalanine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 65

Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro
1 5 10 15
Asn Leu Asn Lys Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Asp
20 25 30
Asp Cys

<210> 66

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide fragment

<400> 66

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
1 5 10 15
Glu Tyr Lys

<210> 67

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide fragment

<400> 67

Glu Glu Gln Tyr Asp Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
1 5 10 15
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
20 25

<210> 68

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenylalanine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 68

Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro
1 5 10 15
Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Lys Asp
20 25 30

Asp Cys

<210> 69

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide fragment

<400> 69

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
1 5 10 15
Pro Arg

<210> 70

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenylalanine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 70

Phe Asn Lys Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro

1 5 10 15
Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Asp
20 25 30
Asp Cys

<210> 71

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenylalanine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 71

Phe Asn Met Gln Cys Lys Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro
1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Asp
20 25 30

Asp Cys

<210> 72

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenylalanine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 72

Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro
1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Lys

20 25 30

Asp Cys

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 73

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr
1 5 10 15

His

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 74

Arg Gly Asn Cys Ala Trp His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr
1 5 10 15

His

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 75

Arg Gly Asn Cys Ala Trp His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Tyr
1 5 10 15

His

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 76

Arg Gly Asn Cys Lys Trp His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr
1 5 10 15

His

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223
> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 77

Arg Gly Asn Cys Lys Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Tyr
1 5 10 15

His

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,

2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 78

Arg Gly Asn Cys Lys Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr
1 5 10 15

His

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 79

Asp Cys Lys Trp His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr
1 5 10

<210> 80

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 80

Asp Cys Lys Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 81

Asp Cys Lys Trp His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 82

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 82

Asp Cys Lys Trp His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 83

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,

2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 83

Asp Cys Lys Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 84

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,

2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 84

Asp Cys Lys Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 85

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,

2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 85

Asp Cys Lys Trp His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 86

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 86

Asp Cys Lys Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 87

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 87

Arg Gly Asn Cys Ala Trp His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Lys Tyr

1 5 10 15

His

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,

2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 88

Arg Gly Asn Cys Ala Trp His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Lys Tyr

1 5 10 15

His

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223

> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,

2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 89

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Lys

1 5 10 15

His

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,

2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 90

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Tyr

1 5 10 15

Lys

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<400> 91

Arg Gly Asn Cys Ala Tyr His Xaa Gly Gln Leu Val Trp Cys Thr Lys

1 5 10 15

His

<210> 92

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenylalanine residue at N-terminus may be acetylated and two
cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 92

Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro

1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Arg Ile Arg Ser Ile Arg Asp

20 25 30

Asp Cys

<210> 93

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Phenylalanine residue at N-terminus may be acetylated and two cysteine residues may be linked by disulfide bridge

<400> 93

Phe Asn Met Gln Cys Gln Arg Arg Phe Tyr Glu Ala Leu His Asp Pro
1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Lys Ile Lys Ser Ile Arg Asp
20 25 30

Asp Cys

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is lysine, glutamine, glutamic acid, asparagine, or aspartic acid

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(17)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 94

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, cystein, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is glutamic acid, or aspartic acid

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(17)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 95

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, or leucine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is lysine, glutamic acid, or aspartic acid

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(17)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 96

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 97

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, cystein, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino

suberic acid, or diaminopropionic acid

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(17)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 97

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Tyr His Xaa Gly Asn Leu Val Trp Cys Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 98

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, cystein, aspartic acid,

glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(17)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 98

Xaa Xaa Xaa Cys Ala Xaa His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 99

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223

> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is alanine, serine, or threonine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is tyrosine, or tryptophan

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, cystein, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino
suberic acid, or diaminopropionic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is glutamic acid, or aspartic acid

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(17)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 99

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<

223> Xaa is lysine, cystein, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino
suberic acid, or diaminopropionic acid

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(17)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 100

Xaa Xaa Xaa Cys Ala Tyr His Xaa Gly Glu Leu Val Trp Cys Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa

<210> 101

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is alanine, or threonine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is tyrosine, or tryptophan

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is lysine, cystein, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino
suberic acid, or diaminopropionic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is glutamic acid, or aspartic acid

<400> 101

Asp Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 102

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is alanine, or lysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is tryptophan, or tyrosine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,

2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is lysine, glutamine, glutamic acid, asparagine, or aspartic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is threonine, or lysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is tyrosine, lysine, or absence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is histidine, lysine, or absence

<400> 102

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is alanine, or lysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is tryptophan, or tyrosine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid,
2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, glutamine, glutamic acid, asparagine, or aspartic
acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa is threonine, or lysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa is tyrosine, lysine, or absence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is histidine, lysine, or absence

<400> 103

Asp Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

<210> 104

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is alanine, or lysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is tryptophan, or tyrosine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, cystein, aspartic acid,
glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222
> (8)..(8)

<223> Xaa is lysine, glutamine, glutamic acid, asparagine, or aspartic
acid

<400> 104

Asp Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Thr

1 5 10

<210> 105

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide having an affinity to Fc region of human IgG

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is alanine, or lysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Tryptophan, or tyrosine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is arginine, leucine, lysine, aspartic acid, glutamic acid, 2-amino suberic acid, or diaminopropionic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is lysine, glutamine, glutamic acid, asparagine, or aspartic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is threonine, or lysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa is tyrosine, lysine, or absence

<220><221> MISC_FEATURE

<

222> (17)..(17)

<223> Xaa is histidine, lysine, or absence

<400> 105

Arg Gly Asn Cys Xaa Xaa His Xaa Gly Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa